

文章编号: 1004-0374 (2009) 05-0658-05

新物种诱导多能干细胞的研究进展

吴昭, 成璐, 肖磊*

(中国科学院生物化学与细胞生物学研究所分子细胞生物学重点实验室,
中国科学院上海生命科学院干细胞库, 上海 200031)

摘要: 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)在人类遗传病学研究、疾病模型建立、器官再生以及动物物种改良和定向变异等方面的地位是其他类型的细胞不可取代的。但是, 由于实验技术和体外培养条件的限制, 除了小鼠、恒河猴和人之外, 大鼠、猪、牛、羊等其他哺乳动物的ES细胞系被证明很难获得。先后有多个研究小组报道了他们利用新兴的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)技术成功建立大鼠和猪的iPS细胞系的研究成果。迄今为止, 这两个物种是在未成功建立ES细胞系之前利用iPS技术建立多能干细胞系的成功范例。这些研究对于那些还未建立ES细胞的物种建立多能干细胞系提供了一种新的方案, 也将给这些物种的胚胎干细胞的建立、基因修饰动物的产生以及人类医疗事业的促进和发展带来新的希望。

关键词: 干细胞; 胚胎干细胞; 诱导多能干细胞; 基因修饰动物

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Progress in the research of induced pluripotent stem cells from new species

WU Zhao¹, CHENG Lu¹, XIAO Lei^{1*}

(Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Stem Cell Bank, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Embryonic stem (ES) cells have been demonstrated very important in the study of human genetic diseases, disease modeling, organ regeneration, and directed mutation in animals. However, the ES cell lines of rats, pigs, cattle, sheep and other mammals have been proved difficult to obtain. Recently, several research groups reported that rats and pigs pluripotent stem cell lines have been successfully established by using the induced pluripotent stem cells (iPS) technique. These studies provide an alternative way to derive the pluripotent stem cells of other species, and also will be valuable for the establishment of embryonic stem cells, production of genetically modified animals, and the development of medical treatment.

Key words: stem cell; embryonic stem cells; induced pluripotent stem cells; genetically modified animals

1 胚胎干细胞是动物遗传操作的重要载体

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)是当受精卵分裂发育成囊胚时,内细胞团(inner cell mass)的细胞在体外培养而成,无限增殖,自我更新且具有发育全能性的一种细胞。胚胎干细胞的研究意义十分重大且具有广阔的应用前景。首先,它带来了人类细胞移植治疗的一次重大革命。由于它能分化出成体的所有组织和器官,包括生殖细胞,因而有望成为实施器官再生医学和现代生物细胞疗法的重要细胞来源,也将为目前大量疑难病症(如神经退行

性疾病、癌症、器官移植和损伤再生等)的发病机理和治疗学提供研究途径,如用分化的神经细胞治

收稿日期: 2009-09-01

基金项目: 国家重点基础研究和发育计划项目(2007CB948003; 2009CB941000); 国家自然科学基金项目(30621091); 中国科学院知识创新计划(KSCX1-YW-R-54; KSCX1-YW-R-46); 上海科学与技术发展基金(08DJ1400500); 上海生命科学研究院优秀青年人才计划(2007KIP401)

*通讯作者 E-mail: leixiao@sibs.ac.cn

疗神经性疾病(帕金森综合征、亨廷顿舞蹈症、阿尔茨海默病等);用造血干细胞重建造血功能;用胰岛细胞治疗糖尿病;用心肌细胞修复已坏死的心肌;用肝细胞治疗肝病,等等。其次,我们还可以对胚胎干细胞进行基因操作,通过同源重组等方法对干细胞中特定的基因进行修饰(敲除或敲入),从而使特定基因在发育、生理和病理过程中的作用得以确定。第三,胚胎干细胞可用来生产克隆动物和基因修饰的动物。一方面可以提高对不同的动物品种进行定向变异和培养,以提高其经济价值或用于人类的医疗事业;另一方面可以保护许多珍稀的野生动物,甚至生产出新的动物品种。

目前,人们已成功从小鼠、恒河猴、人和大鼠四个物种中建立了胚胎干细胞,其中大鼠胚胎干细胞是经过几十年努力才摸索出适宜的条件,最近才成功建立的^[1-5]。但是,到目前为止,由于体外培养条件等因素的限制,我们仍无法成功建立其他哺乳动物的胚胎干细胞系,包括猪、牛、羊等,从而限制了这些物种在生物学基础研究、生物医学以及畜牧业中的重要作用。

2 诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)技术的诞生

诱导多能干细胞技术对于难以建立胚胎干细胞系的动物细胞无疑提供了一种可能的替代方案。iPS技术诞生于2006年,日本的Yamanaka和Takahashi^[6]利用逆转录病毒作为载体将外源的四种转录因子(Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4)导入小鼠成纤维细胞,诱导小鼠成纤维细胞“重编程”,逆转至多能干细胞状态。2007年底,Takahashi等^[7]和Yu等^[8]分别用两种不同的四因子组合将人类成纤维细胞诱导成多能干细胞。这一新的突破为干细胞与再生医学研究与应用开辟了一个全新的领域。此后,iPS技术在其他物种中也得以成功运用,建立了相应物种的诱导性多能干细胞系,如大鼠、猪^[9-13]。

2.1 大鼠iPS细胞的研究进展 大鼠是历史上第一个被驯化用于科学研究的哺乳动物,用于科研已经超过150年。由于大鼠在生理结构上具有许多独特的特点,与小鼠相比更接近人类,而且体型比小鼠大,手术操作方便,使得大鼠成为生物、医学、药物、营养、行为等方面研究的良好模型,广泛应用于生物医药研究中。自从20世纪80年代,许多研究小组屡经尝试建立大鼠胚胎干细胞但都未获成功,直至2008年12月24日,Buehr等^[4]和Li等^[5]

终于报道了大鼠胚胎干细胞的成功建立。但是,在此之前都没有用传统方法成功地从囊胚内细胞团中建立大鼠胚胎干细胞的报道,因此人们试图通过iPS技术来建立大鼠的多能干细胞。2008年12月18日,Liao等^[9]和Li等^[10]同时在Cell Stem Cell杂志上发表了建立大鼠诱导多能干细胞的研究。Liao等^[9]成功运用慢病毒表达的四个转录因子(Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4)迫使大鼠成体细胞成功地重编程到多能干细胞状态。他们从数百个形态类似胚胎干细胞的细胞克隆中,建立了22个类似胚胎干细胞的细胞系。经过进一步筛选、鉴定,最终获得两株符合多能干细胞标准的大鼠iPS细胞系。这些细胞系形态类似小鼠胚胎干细胞,具有跟小鼠胚胎干细胞类似的干细胞标记基因的表达,而且在体外和体内都具有向内、中、外三个胚层分化的能力。

Li等^[10]则用一种将化学分子和基因重编程技术结合起来的特殊方法构建了大鼠诱导性多能干细胞。在此研究中,他们利用MEK抑制剂和GSK3抑制剂的联合作用来激活Wnt通路,并进一步用TGFβI型受体的抑制剂来稳定这种作用,在此基础上用逆转录病毒表达的三因子(Oct4、Sox2、Klf4)成功地将大鼠的肝细胞重编程为小鼠诱导性多能干细胞(riPSCs)。由此得来的riPSCs在形态上与小鼠ESCs相似,并且其长期的增殖更新同样需要LIF的维持,这点与Liao等^[9]得到的riPSCs是不同的。另外,他们得到的riPSCs同样在体外及体内均能分化为内、中、外三个胚层。

2.2 猪iPS细胞的研究进展 紧随大鼠iPSCs的步伐,Wu等^[11]、Esteban等^[12]和Ezashi等^[13]相继发表了成功建立猪诱导多能干细胞的研究成果。

Wu等^[11]利用可诱导(Tet-on/off系统)的慢病毒表达系统分别表达SY4: Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和6因子: Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog和Lin28诱导猪骨髓间充质细胞(BMC)以及猪耳尖成纤维细胞(PEF)重编程为猪iPS细胞。染色显示得到的猪iPS细胞为碱性磷酸酶阳性,同时都特异表达干细胞表面抗原SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81、OCT3/4、NANOG、SOX2、REX1和CDH1。进一步的基因表达分析显示,在猪iPS细胞形成过程中,内源的Oct4、Nanog等关键转录因子被激活,而且它们具有很高的端粒酶活性,并具有正常的核型。为验证其多能性,将得到的猪iPS细胞进行体外分化实验,结果显示其能够形成拟胚体,并

分化为所有三胚层的细胞。体内分化实验也表明,得到的猪iPS细胞注射免疫缺陷小鼠可以得到包含三胚层组织细胞的畸胎瘤。这是人们首次从有蹄类动物中得到iPS细胞,并首次确定了猪多能干细胞的形态、表面分子特征、基因表达谱、发育潜力等一系列多能干细胞具有的特征。

在Esteban等^[12]的研究中,他们通过逆转录病毒系统表达小鼠或人的Sox2、Klf4、Oct4和c-Myc分别在标准的小鼠ESC培养条件和人ESC培养条件下将西藏小型猪(Tibetan pigs)胎儿成纤维细胞重编程为猪iPS细胞。

Ezashi等^[13]使用人的四因子Sox2、Klf4、Oct4和c-Myc在人ESC培养条件下获得了猪iPS细胞系。但与前两篇报道不同,其获得的猪iPS细胞表达干细胞表面标记SSEA-1,但不表达SSEA-3和SSEA-4,这较类似于小鼠ESC,而不是前两篇报道中那样类似于人ESC,表达SSEA-3和SSEA-4,而不表达SSEA-1。而Wu等^[11]研究表明,其获得的猪iPS细胞在分化之后才会表达SSEA-1,这与人类ESC十分相似(未发表数据)。

此外,Ezashi等^[12]和Esteban等^[13]的研究中都是使用不可调控的病毒表达系统,实验结果也显示在其获得的猪iPS细胞中都有较高的外源基因表达,而Wu等^[11]使用了可诱导的病毒表达系统,在撤去Dox后外源基因的表达基本消失。Dox可诱导系统为寻找和确定刺激猪多能干细胞自我更新的生长因子和(或)小分子提供了一个独特的平台,这也将有助于最终由囊胚建立真正的猪ES细胞系。同时该系统也使猪iPS细胞可以用于探索调节内源Oct4和Nanog表达的信号途径的特性。此外,Dox可诱导系统避免外源基因的表达,有利于今后产生嵌合体和克隆猪。由于缺乏合适的外在培养体系,目前世界上仍然没有培育出一株公认的标准猪ES细胞系,因而成功培育出猪iPS细胞意味着科学家继续建立来自猪或其他有蹄类动物的ES细胞系将变得更加容易。

3 新物种iPS细胞的应用前景

迄今为止,虽然科学家投入大量精力,试图从早期胚胎建立除小鼠、猴和人类之外的其他哺乳动物的多能干细胞,但都没有获得成功。直至2008年底,Buehr等^[4]Li等^[5]利用特殊的培养条件3i培养液成功培养出大鼠ES细胞。这种3i培养液中包含了抑制三种特异性基因信号:GSK3、MEK和FGF

受体激酶的分子。通过阻断引起大鼠干细胞分化的信号,才使得大鼠ES细胞得以分离和培养。虽然这一关键技术的发展也许能帮助建立其他哺乳动物的ES细胞系,但是显而易见,摸索的道路仍然很遥远,并且这种特殊的3i培养液并不是万能的,对于小鼠和大鼠之外的其他物种ES细胞系的建立也许帮助甚微。相比而言,iPS技术似乎更容易为这些历史上难以建立ES细胞系的物种建立多能的干细胞系,这些iPS不仅能帮助人们用传统的方法从动物胚胎中获得ES细胞,而且也有可能直接用于产生基因敲除动物和转基因动物。

首先,对于还未成功建立ES细胞系的物种而言,建立iPS细胞有助于深入了解其ES细胞的许多特性,包括其形态、表面标记物和全能性等。在大鼠和猪的iPS细胞系建立之前,人们曾建立过许多的类ES细胞,但是却一直对真正的ES细胞的形态、标记物等方面存在争议。而iPS细胞系的建立给予的信息终于让我们对ES细胞的一系列特性有了明确的认识。例如,发现猪iPS细胞在形态和表面标记物上更类似于人ES细胞,其在未分化状态时表达干细胞标记SSEA-3和SSEA-4,但不表达SSEA-1。而当其自然分化后就开始表达SSEA-1(未发表数据)。这些研究将有利于真正的猪ES细胞的建立。同理,在无法直接通过传统方法获得ES细胞之前,我们也可以利用iPS细胞技术来建立其他物种,如牛、羊等等的多能干细胞系,掌握这些多能干细胞系所具有的各种干细胞特性,研究保持其全能性的内在信号通路或外在的添加因子,这些信息将有利于最终从这些物种的囊胚中获得真正的ES细胞系。

其次,iPS细胞可以直接用来产生转基因动物和基因敲除或敲入动物。众所周知,利用同源重组技术对ES细胞进行遗传操作,使目的基因定点整合或敲除,可以较高效率地生产出高质量的转基因动物。长久以来,我们已经能熟练地对小鼠ES细胞进行基因操作,从而产生了大量的转基因小鼠和基因敲除或敲入的小鼠模型。但是由于很难从猪、牛、羊以及其他一些动物中获得胚胎干细胞系,因此目前常用的定点整合转基因方法为体细胞基因打靶结合克隆动物的方法。然而这种体细胞克隆技术存在诸多问题,譬如产生可育的转基因动物的效率很低。研究表明通常体细胞基因打靶的绝对效率比ES细胞低2个数量级,同时ES细胞相对于其他任

何细胞都具有更高的克隆效率^[14, 15]。在ES细胞尚未成功建立之时, 基于iPS细胞的基因打靶技术可能是目前解决转基因效率低下的最佳替代方案。

这就使得细胞具有了更广泛的用途。利用大鼠或猪iPS细胞产生人类遗传疾病模型。以往的研究中, 由于缺乏其他物种的多能干细胞, 研究人员大多只能用小鼠来建立各种人类疾病模型。基因敲除和基因敲入小鼠模型在人类疾病的研究中已得到广泛的应用, 使人们认识到更深刻的疾病机制并找到相应的治疗办法, 然而小鼠动物模型有其局限性。无疑, 跟小鼠相比, 大鼠或猪在解剖学、生理学、心血管系统、消化系统、皮肤结构、营养需要、矿物质代谢等多项都与人类有较大的相似性, 适用于多种人类疾病的复制和治疗研究。许多人类疾病, 例如糖尿病, 是由于基因表达紊乱而导致的。我们可以在大鼠或猪的iPS细胞中修饰其基因, 从而产生携带相同基因疾病的大鼠或猪。它们具有和人类患者相似的症状, 这样就可能使用此类模型研发治疗这种疾病的方法。

第三, 用多能干细胞来产生器官移植治疗的转基因动物。以猪为例, 猪的器官一直是人类异种移植的首选供体和研究开发的热点。例如猪胚胎胰腺细胞进行异体移植治疗灵长类1型糖尿病已获得初步成功^[16], 在墨西哥等国移植猪胰腺组织进行人类糖尿病治疗也有报道。但是由于猪的内皮细胞表面一种名为 α -1, 3-半乳糖基转移酶所产生的半乳糖 α -1, 3-半乳糖表位是引起将猪器官移植给人时产生超急性免疫排斥的主要因素, 它会触动人类免疫系统发生强烈的排斥反应, 人类体内的天然抗体会附着在这些糖分子上, 并快速摧毁移植的猪器官^[17]。我们能够使用猪iPS细胞进行定点基因修饰敲除其免疫相关基因, 从而使猪的器官能够耐受人的免疫系统。这样我们就可以使用猪作为器官供体为患者提供不会触发其自身免疫系统的移植器官, 不仅能缓解目前器官资源严重缺乏的困境, 还可以克服灵长类动物异种带来的伦理、烈性病毒传染病等问题。

第四, 将抗病性的基因导入多能干细胞系来培育各种具有抗病性的动物。例如, 为了对抗猪流感, 可以建立精确基因修饰的猪, 从而提高其对此类疾病的抗性。首先, 寻找一个可以抗猪流感病毒活性或抑制猪流感病毒增殖的基因, 然后通过一种称为基因楔入的过程将这个基因通过多能干细胞引入猪中。另一方面, 由于猪流感病毒需要结合于猪

细胞膜上的受体才能进入细胞并增殖, 如果在猪iPS细胞中通过基因打靶技术剔除这个受体基因。那么缺少这个受体后, 病毒就不能感染猪了。与此相同, 我们也可以通过敲除与疯牛病相关的基因来生产抗疯牛病的基因敲除牛, 以避免该类疾病给人类健康带来的巨大威胁。

iPS细胞除了对人类的医疗应用具有重要意义外, 还可以通过定点基因修饰导入促进生长, 或促进肌肉发育、促进长毛等基因, 以调控家畜身体组织的生长, 改良肉质、毛质、奶质或改良生长性状, 提高其生产性能, 或增加生存率, 从而促进畜牧业发展。此外, 通过导入编码某些特殊蛋白质的基因, 把猪、牛、羊等作为一种生物反应器, 生产人类所需要的药用蛋白、营养蛋白等功能成分, 包括治疗用药物、激素和抗体药物等。

另外, iPS技术还可用于挽救一些濒危动物, 避免它们的灭绝, 甚至还可能将已灭绝的生物体内的细胞重编程为多能干细胞从而再繁育出同样的个体。譬如, 大熊猫是我们的国宝级动物, 正濒临灭绝。我们可以通过iPS技术, 将幸存的大熊猫的成体细胞重编程为多能干细胞, 最终用于克隆出相同的个体。这一切都将随着iPS技术的推广和发展而变成现实。然而我们不得不重新审视iPS细胞本身可能存在的安全隐患, 以及iPS技术上存在的效率低、速度慢等问题, 清楚认识到要将其真正应用于临床或者是动物个体克隆还有一段很长的路要走。但是我们相信, iPS技术发挥的作用将会越来越大, 最终为人类的健康, 畜牧经济的发展, 生态环境的保护等提供有力的保障。

ÖÄÐ»£ÓÉÖÔ, ÐÐ»' Þ'œ©Ê¿ÔÚ, ÄÄÛÏÄÐ, Ä'ÿ¿ÏÖÐlá'©
µÄÏÐË½°'ïÖú£¡

[参 考 文 献]

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154-6
- [2] Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7844-8
- [3] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145-7
- [4] Buehr M, Meek S, Blair K, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135: 1287-98

- [5] Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135: 1299-310
- [6] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [7] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131: 861-72
- [8] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318: 1917-20
- [9] Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 11-5
- [10] Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 16-9
- [11] Wu Z, Chen J, Ren J, et al. Generation of pig-induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1: 1-9
- [12] Esteban MA, Xu J, Yang J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*, 2009, 284: 17634-40
- [13] Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 10993-8
- [14] Jaenisch R, Eggan K, Humpherys D, et al. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4: 389-96
- [15] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 2006, 441: 1061-7
- [16] Hecht G, Eventov-Friedman S, Rosen C, et al. Embryonic pig pancreatic tissue for the treatment of diabetes in a non-human primate model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 8659-64
- [17] Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295: 1089-92