

文章编号: 1004-0374(2010)07-0674-08

microRNAs 和体细胞重编程

张璇*, 金由辛, 李劲松*

(中国科学院上海生命科学研究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, 上海200031)

摘要: 体细胞重编程与 microRNAs (miRNAs) 均为近年来研究的热点问题。到目前为止, 能成功诱导体细胞形成多能性干细胞的体细胞重编程方法有核移植(nuclear transfer, NT)和外源因子诱导形成多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSc)两种,这两种方法让人们看到了体细胞重编程在细胞治疗方面具有诱人的应用前景。miRNAs 是真核生物中存在的一类长度为 22 nt 左右起调控作用的内源性非编码 RNA, 它在转录后水平调节靶基因的表达, 是细胞内基因表达的基本调控机制之一。近年的研究结果表明, miRNAs 在干细胞干性维持和分化过程中具有重要的调节作用, 从 miRNAs 角度研究体细胞重编程机理将对体细胞重编程的应用具有重要意义。

关键词: 核移植; iPS 技术; 体细胞重编程; miRNAs

中图分类号: Q813; Q522 **文献标识码:** A

MicroRNAs and somatic reprogramming

ZHANG Xuan*, JIN Yong-xin, LI Jin-song*

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

Abstract: The research about somatic reprogramming and microRNAs (miRNAs) has received widespread attention in clinical and basic research. Adult cells can be successfully reprogrammed into pluripotent stem cells by nuclear transfer (NT) and induced pluripotent stem (iPS) cells. NT and iPS techniques offer tremendous promises for cell therapies. MiRNAs are small (~22 nucleotides) non-coding RNAs that play important role in posttranscriptional gene regulation. MiRNAs involved in maintaining self-renewal and differentiation of stem cells. Understanding of the mechanism of miRNAs in somatic reprogramming will provide theoretical basis on its clinical application.

Key words: nuclear transfer; iPS; somatic reprogramming; microRNAs

体细胞重编程技术不仅为移植治疗、药物发现及筛选、细胞及基因治疗等应用领域带来了新技术, 而且为生物基础研究领域带来新的理念; 但另一方面也提出了许多需要解答的科学问题, 特别是关于体细胞重编程的分子机理。核移植和 iPS 技术都能成功地诱导体细胞发生重编程, 但是目前对重编程机理了解还很少; 对于核移植和 iPS 技术诱导的体细胞重编程过程中到底发生了什么细胞和分子生物学事件, 它们是相同的还是不同的过程, 目前还不清楚。体细胞重编程过程中发生的分化细胞向

多能性干细胞的转变涉及到基因表达模式的改变, 如与分化有关的基因表达被关闭, 而与细胞多能性有关的基因表达被激活。越来越多的研究表明, 表观遗传调控在体细胞重编程过程中发挥了重要的调节作用^[1]。表观遗传调控指在不改变基因序列的前

收稿日期: 2010-05-07

基金项目: 中科院知识创新工程重要方向性项目 (KSCX2-YW-R-110) (KSCX2-YW-R-229)

*通讯作者: 张璇, E-mail: zhangxuan@sibs.ac.cn;
李劲松, E-mail: jsli@sibs.ac.cn

提下, 通过DNA甲基化、组蛋白修饰以及非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)等调控途径在多个层面上调节参与发育过程相关的基因表达, 从而影响生命进程和生物功能^[2]。ncRNA是指一些不编码蛋白质, 但具有特定功能的RNA, 其中包括核糖体RNA(rRNA)、转移RNA(tRNA)、miRNAs和小干扰RNA(small interfering RNAs, siRNAs)等多种已知功能的RNA, 还包括其他一些未知功能的RNA。这些RNA的共同特点是都能从基因组上转录而来, 虽然不能被翻译成蛋白质, 但是具有参与调节蛋白质翻译的作用。ncRNA作为表观遗传调控的一种重要方式, 在调控基因表达中扮演至关重要的角色。miRNAs是真核生物体内普遍存在的一类具有广泛调控功能的ncRNA, 长约22 nt, 约占动物基因组总量的1%, 在进化中高度保守; 其表达既具有时空特异性, 也具有组织和细胞特异性。miRNAs可通过作用于靶基因的3'非翻译区(3' UTR)抑制其表达, 从而广泛地参与发育、分化、生长和代谢等生命活动^[3]。越来越多的研究证据表明, miRNAs在细胞重编程方面也发挥了重要的作用。

1 体细胞重编程

体细胞重编程是指分化的体细胞在特定条件下被逆转后恢复到全能性或多能性状态, 形成新的个体或形成多能性干细胞的过程。诱导体细胞重编程的方法有许多, 如核移植(nuclear transfer, NT)、细胞融合、细胞提取物诱导、化学诱导、细胞体外扩增以及iPS技术等^[4]。到目前为止, 能成功地诱导体细胞形成多能性干细胞的重编程方法只有核移植和iPS技术两种, 其他的方法只能在细胞、分子或生化水平上产生诱导。

1.1 核移植诱导的体细胞重编程

1952年, Briggs和King^[5]首次通过核移植的方法获得了来自囊胚细胞的克隆蝌蚪, 从此揭开了核移植技术发展的序幕。核移植技术是指利用显微操作的办法将一个外源的细胞核(供体细胞核)移入去核的卵母细胞中, 使得去核的卵母细胞不经过与精子结合的有性繁殖过程, 在体外被活化、分裂并发育成新个体, 又可称为无性繁殖。在这个过程中, 供体核的基因得到重编程, 产生与其遗传上同质的动物个体。判断体细胞核移植后是否重编程成功有两个标准: (1) 是否具有获得多能干细胞的能力, 也就是重构胚胎在体外发育到囊胚阶段后是否能够建

立核移植胚胎干细胞系; (2) 是否具有获得克隆动物的能力, 即将重构胚胎移入受体动物中是否能获得克隆动物。1997年, 第一只体细胞克隆动物“Dolly”羊^[6]的诞生标志着分化的体细胞能够在特定条件下被诱导恢复全能性并发育成个体, 这是生物界具有里程碑意义的科研成果。核移植技术在动物育种、转基因动物制备、基因治疗及器官移植等方面具有广阔的应用前景。目前通过核移植技术, 人们已经获得了多种核移植克隆动物, 并建立了多种来源于核移植胚胎的胚胎干细胞系^[7]。核移植技术的出现让人们看到了体细胞逆转成干细胞的诱人应用前景, 特别是用这种方法建立来源于患者的多能性干细胞并分化成患者所需特定体细胞的治疗性克隆, 这一方面的应用更是对人类健康有着非常重要的意义。从“Dolly”羊诞生到现在的10多年中, 尽管核移植技术得到了长足的发展, 但是核移植技术却还很不成熟, 技术本身也有很大的局限性: 首先, 由于该技术具有的不易操作性, 使得核移植技术本身效率非常低, 目前通过胚胎移植后直接获得克隆动物的比例仅占重构囊胚的1%~3%^[8], 而且核移植技术产生的许多后代在发育过程中的各个阶段都出现严重的发育异常状况; 其次, 由于核移植技术中需要卵母细胞, 因此在治疗性克隆中会带来伦理道德问题; 再次, 关于核移植技术的一些基础理论问题还不是很清楚^[9]。核移植技术所具有的这些局限性都大大限制了这一技术的发展和應用。

1.2 iPS技术

2006年体细胞重编程领域再度取得了突破性的成果——科学家成功地在体外将体细胞逆转为“干细胞”。日本科学家Takahashi和Yamanaka^[10]利用反转录病毒载体将四个转录因子(Oct-4、Sox2、c-Myc和Klf4)导入小鼠皮肤成纤维细胞中, 可以使来自胚胎小鼠或者成年小鼠的成纤维细胞获得类似胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)的多能性。这些经过诱导得到的具有干细胞特性的细胞能表达ES细胞的各种表面标记分子, 并具有可以分化为各种组织细胞的潜能, 因此他们将通过这种方法获得的细胞命名为iPSC。紧接着在2007年, Yamanaka和Thomson研究组分别报道了利用不同的体外诱导方法将人体皮肤细胞成功诱导生成iPS细胞的研究成果^[11, 12]。这些研究成果的连续发布使得iPS技术获得了广泛的关注, 让人们看到了运用该技术进行疾病治疗的希望, 为再生医学应用打开了大门; iPS技术

的发展,将大大促进干细胞技术在再生医学上的广泛应用。

干细胞的干性或者多能性包含两个方面的内容:自我更新能力和多向分化潜能。从技术角度来说,在医学治疗上,具有“多能性”的ES细胞对于干细胞治疗是最理想的材料,但是使用ES细胞作为细胞治疗材料带来了来源困难、免疫排斥和伦理限制等问题,而iPS技术可以绕过使用ES细胞所带来的这些问题。运用iPS技术建立患者体细胞来源的患者特异性iPS细胞系,一方面作为很好的体外疾病研究模型,用于研究疾病机理或用于药物筛选;另一方面还可通过对患者来源的iPS细胞进行基因改造,矫正致病的基因缺陷,为患者提供一对一的细胞治疗方案。目前已经建立了许多来源于患者的疾病iPS细胞系,如来源于帕金森病、糖尿病、亨廷顿病(HD)等患者的细胞系^[13-15]。这些成果,让人们看到了运用iPS技术进行疾病治疗的希望,特别是对患者进行特异的细胞移植治疗。然而,目前iPS技术同样面临着重编程机制不清楚和重编程效率低下等问题。因此,研究iPS细胞的重编程机制,鉴定参与重编程过程的重要分子,以及一些重要的细胞生物学和分子生物学过程,将对iPS技术在临床治疗中的应用具有十分重要的意义。

2 miRNAs及其功能简介

2.1 miRNAs简介

在真核生物基因组的非蛋白质编码区存在大量ncRNA基因,这些非编码区域担负着基因表达调控等重要功能,它们的编码产物可在转录后水平调节靶基因的表达,是细胞内基因表达的基本调控机制之一。其中siRNAs和miRNAs是研究得较多的两类ncRNA,两者在成熟、加工以及功能方面有着相似的途径及方式。对siRNAs的研究多侧重于把它作为方法,用来研究编码蛋白基因的功能,而对内源性siRNA的研究相对较少。miRNAs作为真核生物体内普遍存在并具有广泛调控功能的一类ncRNA,已经成为研究的热点。

miRNAs是一种小分子内源性非编码RNA分子,大约由21~25个核苷酸组成,约占动物基因组总量的1%,在进化中高度保守,其表达既具有时空特异性,也具有组织和细胞特异性。基因组中的miRNAs基因转录生成初级转录物(Pri-miRNAs),Pri-miRNAs在细胞核中被RNase III型核酸内切酶Drosha及其辅酶(如人类的DGCR8或果蝇的Pasha)

加工成60~75 nt的发卡状前体(Pre-miRNAs),随后Pre-miRNAs被转运蛋白运输到细胞质中。在细胞质中的Pre-miRNAs被另一种RNase III型核酸内切酶Dicer及其辅助因子(如人类的TRBP/PACT和果蝇的Loquacious等)剪切加工成成熟的miRNAs,然后在Argonautes蛋白引导下结合到RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex,RISC)上,并由RISC介导其与靶mRNAs的3'非翻译区域结合,从而引起靶基因mRNA的降解或者抑制其蛋白质翻译,对基因进行转录后的表达调控,从而广泛地参与调节细胞增殖、分化、分泌和凋亡等生命活动^[16,17]。

2.2 miRNAs与卵细胞成熟和早期胚胎发育

Dicer是负责miRNAs合成加工的重要分子,在卵细胞的整个生长发育和成熟过程中都检测到有Dicer的表达。随着受精卵发育进行到胚胎二细胞期,Dicer的表达开始呈下降趋势,其表达水平稳定在桑葚胚和囊胚期胚胎中。功能研究表明,Dicer在卵细胞成熟过程中具有重要作用。敲除Dicer基因的鼠卵母细胞成熟过程阻滞在减数分裂I期,纺锤体结构异常导致染色体不能正常地排列,减数分裂过程不能正常进行^[18-20]。进一步的研究表明,在卵细胞中有miRNAs的表达,卵细胞中的miRNAs通过参与调节细胞质中mRNA的表达在卵成熟和胚胎早期发育过程中具有重要作用^[21,22]。现在已经发现了一些与减数分裂有关的miRNA,其中包括miR-103、let-7d、miR-16、miR-30b和miR-30c等^[23]。

小鼠卵细胞受精之后即发生卵子向合子的转变,伴随受精发生的分子生物学变化是卵细胞发育阶段积累的转录产物发生降解,细胞中开始表达并积累胚胎特异性的转录产物^[24];伴随受精过程发生的另外一个变化是基因表达的重编程,这种重编程过程是高度分化的卵细胞向具有全能状态的早期胚胎转变的分子基础^[25]。研究表明,在植入前胚胎发育过程中miRNAs也发挥了重要作用。Dicer功能缺陷也可导致受精后的卵裂出现异常^[19],而小鼠胚胎中Dicer功能的缺失会导致死胎现象^[26]。研究表明,大部分母源性基因直接或间接地受到miRNAs的调控,母源性miRNAs对鼠早期胚胎的正常发育过程是必需的。在合子中表达量最多的母源性miRNAs是let-7簇成员,它在卵细胞发育和早期胚胎发育过程中调控靶基因的表达;另外与细胞增殖有关的miR-17和miR-92在卵发育过程中的表达逐渐

增加, 在胚胎发育到两细胞阶段后其表达水平有一个再次增加的现象^[27]。这些研究都表明 miRNAs 在卵细胞成熟和胚胎早期发育中具有重要作用。

关于 miRNAs 在卵成熟和早期胚胎发育中的作用, 最近报道了一个非常有意思的结果: 研究发现在卵成熟和早期胚胎发育过程中, miRNAs 的功能是受到抑制的。怎么样解释一方面 miRNAs 在卵细胞中高丰度的表达; 而另一方面其功能又受到抑制这一看似矛盾的现象呢? 可能 miRNAs 功能受到抑制是为了维持卵细胞质中富集的 mRNA 的稳定以积累 mRNA, 另一方面卵细胞中 miRNAs 活性的降低也是合子基因组正常活化和基因表达重编程的需要^[28, 29]。

2.3 miRNA 与干细胞

干细胞是一类具有自我增殖能力(self-renewing)的多潜能细胞, 在一定条件下, 它可以分化成多种类型细胞。miRNAs 通过调控基因表达参与干细胞自我更新和分化过程。负责 miRNAs 合成的 Dicer 有两种同工酶: Dicer1 和 Dicer2, 其中 Dicer1 是 miRNAs 加工成熟所必需的; Dicer2 负责 siRNAs 的合成。Dicer1 功能缺失可以阻断 miRNAs 合成通路^[30]。研究发现, Dicer1 蛋白对于干细胞干性的维持和保持干细胞的未分化状态具有重要的作用。小鼠胚胎中的 Dicer1 表达的降低可以引起 Oct4 等相关基因表达的下降^[20]; 进一步的敲除实验表明, 小鼠 Dicer1 基因被敲除后, 胚胎在发育的早期阶段死亡, 而且胚胎中不表达 ES 细胞的标记分子 Oct4^[26]。这些数据都表明, Dicer1 参与的 miRNAs 合成途径在对胚胎发育早期中干细胞特性的形成具有重要作用。

目前在小鼠和人 ES 细胞中发现了十几个特异表达的 miRNAs, 概括起来可分为 3 大簇: miR-290 簇、miR-302 簇和 miR-371 簇^[31-33], 其中在小鼠 ES 细胞中特异表达的是 miR-290 簇和 miR-302 簇; 人 ES 细胞中特异表达的是 miR-302 簇和 miR-371 簇, 以及后来发现的 miR-200c 簇^[34]。另外 miR-302 簇的一些成员, 如 miR-302b、miR-302c 和 miR-367, 在人、小鼠和狗的 ES 细胞中都有表达, 并且人和鼠的 ES 细胞中特异表达的 miR-302 簇与斑马鱼的 ES 细胞中特异表达的 miR-403 簇是同源的^[35-37], 表明 miRNAs 在干细胞中的作用具种间保守性。另外一些致癌性 miRNAs (miR-17-3pN、miR-17-5pN、miR-18、miR-19a、miR-19b、miR-20、miR-25、miR-92、miR-93、miR-106b 等) 也大量表达在 ES 细

胞中, 而在成体组织细胞中表达量下降^[33], 说明这些致癌 miRNAs 也参与了 ES 细胞的干性维持过程。在果蝇生殖细胞和小鼠 ES 细胞中的研究发现, miRNAs 参与了干细胞周期 G₁/S 细胞周期检查点的调节, 提示 miRNAs 通过参与调节细胞分裂周期的方式参与干细胞干性的维持^[38, 39]; 进一步的功能研究表明, miR-130b、miR-291a-5p 和 miR-294 参与了胚胎干细胞干性维持的正向调节, 而 let-7 具有抑制胚胎干细胞干性维持的作用^[40]。

进一步的研究表明, miRNAs 不仅在干细胞的干性维持过程中有重要作用, 另外还参与了干细胞分化的调节。Dicer 敲除后的 ES 细胞失去了在裸鼠中生成畸胎瘤的能力, 说明这些 ES 细胞的分化能力受到了影响, 证明 miRNAs 具有调节干细胞定向分化的功能^[41]。通过比较分析人类和小鼠 ES 细胞以及分化组织的 miRNAs 表达谱, 筛选出了很多差异表达的 miRNAs^[31, 42, 43]。研究发现, miR-290 家族可通过抑制 Rb121 (转录抑制因子) 的表达调节 ES 细胞中 DNA 的甲基化水平; miR-134 可通过参与调节 Nanog 的表达促进小鼠 ES 细胞向外胚层分化^[44]。另外 miRNAs 可以和 *Nanog*、*Oct4*、*Sox2* 等基因的编码区结合, 调节这些基因的表达, 从而调节 ES 的分化过程^[45]。

尽管目前已经有确切的证据表明, miRNAs 是干细胞干性维持和分化过程中的重要调节因素, 但还不清楚具体是哪个 miRNAs 分子的作用, 其信号传导机制也不清楚。深入研究 miRNAs 在干细胞中的表达谱以及特定的 miRNAs 的信号传导机制将有助于了解 miRNAs 在干细胞干性维持和分化中作用机理。

3 miRNA 与体细胞重编程

从克隆羊到 iPS 技术成功, 体细胞重编程领域取得了许多突破性进展。这些发展不仅对发育生物学和细胞生物学等基础研究领域具有重要推动作用, 而且为细胞治疗以及再生医学提供了理论依据。干细胞为治愈多种再生和自体免疫性疾病, 如帕金森病 (Parkinson's disease)、多发性硬化症 (multiple sclerosis)、脊髓损伤 (spinal cord injuries)、糖尿病以及心肌梗死等疾病提供了一个充满希望的治疗策略^[46]; 但在体细胞重编程技术真正应用于临床之前还有许多问题需要解决, 目前困扰体细胞重编程领域发展的两个主要问题是: 重编程效率低以及

对重编程机理缺乏了解。

在核移植诱导的体细胞重编程过程中,分化的细胞核在去核的卵母细胞中能够进行重编程恢复为全能状态,表明在这个过程中卵母细胞本身所具有的母源因子发挥了至关重要的作用。在卵细胞生长发育过程中,卵细胞质中积累了大量的母源RNA和蛋白质,为卵受精和胚胎发育打下物质基础^[47];另外,卵细胞自身所具有的各种活跃的信号调节网络,对于保证卵细胞正常发育和成熟起到重要作用^[48]。在小鼠卵子成熟过程中,和mRNA类似,miRNAs的表达也呈现动态的变化。很多母源基因的表达都直接或者间接地受到miRNAs的调节^[19];另外,多数动物的卵细胞成熟和早期的胚胎发育过程中,翻译调控是作为基因表达调控的主要方式存在的^[49]。这些研究结果提示,作为表观遗传调控重要组成部分的miRNAs可能在核移植诱导的重编程过程中具有重要作用。

通过比较克隆牛胚胎、体外受精牛胚胎和供体细胞miRNAs的表达谱发现,在克隆牛胚胎中,只有部分在体细胞中沉默的miRNAs基因被成功激活表达,另外一部分没有被成功激活^[50],提示miRNAs基因的不完全重编程可能是造成克隆失败的原因。另外牛核移植胚胎中有miRNAs表达下降现象,鉴于miRNAs在基因表达调节以及卵成熟和胚胎早期发育中的作用,因此推测miRNAs表达的下降引起了和发育相关的基因表达受到异常调节,导致了核移植重构胚胎不能正常发育。进一步的研究表明,在牛体细胞核移植过程中,由于发生一些基因,如*FGF4*、*FGFR2*和*IL-6*的异常表达现象导致克隆胚胎在早期发育过程中流产^[51-53];推测在核移植胚胎发育过程中,由于miRNAs表达的变化引起了细胞中的信号调控异常,从而导致胚胎发育的异常或者终止。在克隆小鼠胚胎中,通过研究miR127和miR136的表达水平变化表明,在核移植过程中,miRNAs的表达异常与克隆胚胎发育中表现出的表观遗传异常现象有密切关系^[54]。以上的研究结果表明,在核移植诱导的体细胞重编程过程中,作为母源因子的miRNAs起到重要的调节作用,但是哪些miRNAs参与了此过程及作用机制如何,还要进一步的探讨。

iPS技术是另外一种重要的体细胞重编程的方式,由于其可操作性强,且可获得来自患者特异的多能干细胞而成为当今生物医学研究中最前沿的领

域之一。miRNAs在多能干细胞的干性维持和定向分化过程中具有重要的调节作用,但目前关于miRNAs和iPS诱导的体细胞重编程之间关系的了解还很少。目前常用的诱导iPS细胞产生的办法是通过反转录病毒载体向体细胞导入四个转录因子组合(OCT4、SOX2、KLF4和c-MYC或者OCT4、SOX2、NANOG和LIN28)。受到多种因素的影响,用这种方法产生iPS细胞的过程是一个缓慢的渐进过程,需要几个星期的时间而且诱导效率非常的低^[55-58]。造成效率低下的原因非常多,其主要原因就是不能有效地把诱导因子导入细胞内以及目前对iPS诱导的重编程机制缺乏了解^[4,59]。近些年越来越多的研究表明细胞重编程和基因表观遗传调控之间有密切的关系^[60]。在小鼠ES细胞特异性表达的miRNAs中,miR-290簇占了大约70%的比例,而且随着ES细胞的分化,miR-290的表达迅速下调,而且一些miR-290成员在调节ES细胞周期中具有重要作用^[39]。受此启发,美国加利福尼亚大学旧金山分校科学家利用与ES细胞周期调节相关的miRNAs(miR-291-3p、miR-294和miR-295)取代转录因子c-Myc,成功地利用Oct4、Sox2、Klf4和miRNAs诱导小鼠皮肤细胞转变为iPS细胞,这个结果证明miRNAs参与了iPS诱导的体细胞重编程过程。为了研究miRNAs在重编程过程中的作用机理,利用生物信息学方法进一步研究了参与重编程的miR-290的信号传导机制,结果发现在miR-290的启动子区域有Oct4、Sox2、Nanog和c-Myc的结合位点,但是miRNAs在iPS中的具体机制还不清楚。深入研究体外诱导的重编程过程中miRNAs的下游信号分子以及作用靶基因将加深对重编程机制的了解,也为筛选miRNAs以及其他一些小分子作为体外诱导重编程因子起到重要指导作用^[61]。研究人员通过比较iPS、ES和体细胞的miRNAs的表达谱发现,与体细胞相比,在iPS细胞和ES细胞中,miR-302、miR-17和miR-92表达水平升高^[62]。2009年,中国科学家首次利用四倍体补偿技术培育出由iPS细胞发育来的小鼠,进一步显示了iPS细胞和ES细胞在发育潜能上的一致性。然而,尽管iPS和ES细胞之间存在着诸多相似性,但不能忽视的是体外诱导重编程产生的大多数iPS细胞系在进行二倍体注射之后的嵌合率非常低以及利用四倍体补偿技术不能发育成iPS小鼠现象的存在^[63,64]。进一步在分子水平上的研究结果表明,iPS细胞和ES细胞这两种多能性细胞的

miRNAs 表达谱存在一些表达差异, 其中包括 miR371、miR372 和 miR373^[63]。最近在小鼠中的研究发现, 与 ES 细胞相比, 位于第 12 号染色体的印记基因簇 Dlk1-Dio3 在大部分 iPS 细胞系中是不表达的, 这些沉默 Dlk1-Dio3 表型的 iPS 细胞系的二倍体嵌合率低, 且不能发育成 iPS 小鼠。因此, Dlk1-Dio3 的表达水平和 iPS 细胞多能性密切相关, 可作为 iPS 细胞多能性水平的标记因子^[65, 66] (关于与重编程相关的 miRNA 的功能以及信号传导通路见表 1 以及图 1)。从 miRNAs 角度深入了解这些差异将有助于加深对重编程过程的了解, 有助于提高编程的效率

表 1 与重编程有关 miRNAs 的功能

miRNA 名称	功能	参考文献
let-7	抑制胚胎干细胞干性维持	[40]
miR-130b	胚胎干细胞的干性维持	[40]
miR-291a-5p	胚胎干细胞的干性维持	[40]
miR-294	胚胎干细胞的干性维持	[40]
miR-290	胚胎干细胞的干性维持	[61]
miR-127	核移植诱导的重编程过程	[54]
miR-136	核移植诱导的重编程	[54]
miR-291-3p	iPS 诱导的体细胞重编程	[62]
miR-294	iPS 诱导的体细胞重编程	[62]
miR-295	iPS 诱导的体细胞重编程	[62]

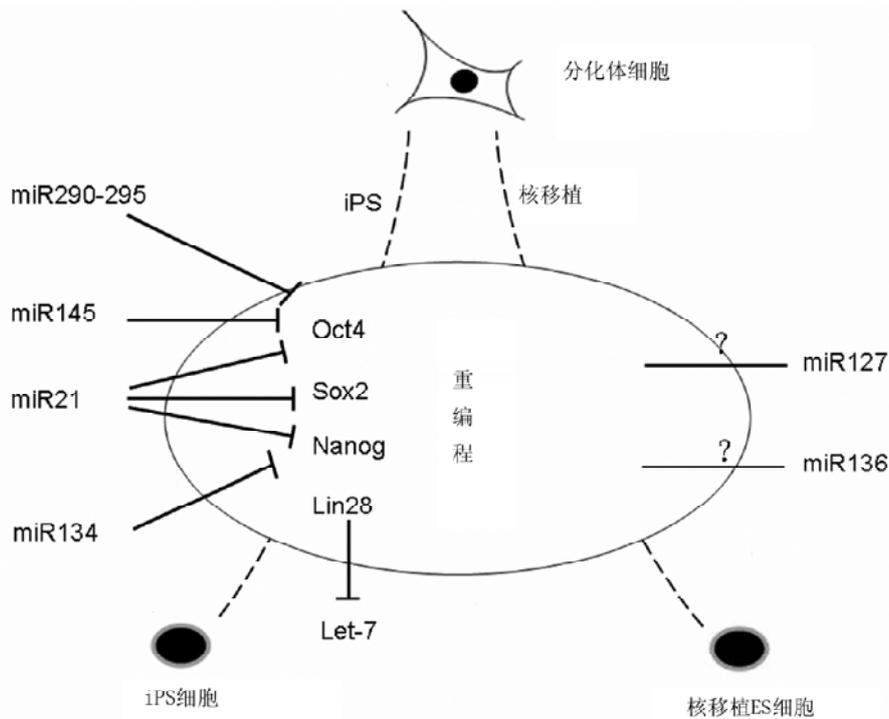


图1 重编程过程中miRNAs的细胞信号传导通路

和 iPS 应用的安全性, 为体细胞重编程的实际应用打下坚实的理论基础, 对干细胞治疗起到积极的推动作用。

4 体细胞重编程中 miRNAs 研究存在的问题与展望

对于 miRNAs 体细胞重编程中的作用机制的研究是个新开展的领域, 目前已获得了一些初步的结果, 但同时还要看到目前面临的一些问题。对于 miRNAs 在干细胞中作用机理的研究才刚刚开始, 对其在细胞重编程过程中的作用了解不多。开展

miRNAs 在体细胞重编程过程中机制的研究要受控于对 miRNAs 分子生物学的研究进展, 另外, miRNAs 本身就是个较新的研究领域, 现在对 miRNAs 调节机理的研究还不是非常充分, 比如 miRNAs 上游和下游的调节分子是哪些; 公认的 miRNAs 作用是作为转录调节因子, 那么与一般意义上以蛋白形式存在的转录调节因子相比, miRNAs 又具有哪些优点; miRNAs 作用特点之一就是一个 miRNA 分子可以调节多种因子的表达, 是不是这种多向调节使得它在精确协调细胞生命活动中具有不可比拟的优势。开展体细胞重编程中 miRNAs 作用机制的研

究, 不仅会增加对 miRNAs 自身分子生物学的了解, 而且更重要的是, 从表观遗传学角度, 研究 miRNAs 在细胞重编程机制的作用, 将加速我们对重编程机制的理解, 促进体细胞重编程技术在生物医学领域的应用。

[参 考 文 献]

- [1] Armstrong L, Lako M, Dean W, et al. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 805-14
- [2] Xi JF, Yue W, Pei XT. Cellular reprogramming and epigenetic gene regulation. *Chn Bull Life Sci*, 2009, 21: 357-62
- [3] Song L, Tuan RS. MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2006, 78(2): 140-9
- [4] Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 2008, 132(4): 567-82
- [5] Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1952, 38(5): 455-63
- [6] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-3
- [7] Gurdon JB, Byrne JA. The first half-century of nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8048-52
- [8] Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, 2009, 136(4): 509-23
- [9] Yang X, Smith SL, Tian XC, et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 295-302
- [10] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76
- [11] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-20
- [12] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72
- [13] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134(5): 877-86
- [14] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321(5893): 1218-21
- [15] Ebert AD, Yu J, Rose FF, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, 457(7227): 277-80
- [16] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97
- [17] Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*, 2006, 25(46): 6156-62
- [18] Murchison EP, Stein P, Xuan Z, et al. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev*, 2007, 21(6): 682-93
- [19] Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev*, 2007, 21(6): 644-8
- [20] Cui X, Shena X, Kim N. Dicer1 expression in preimplantation mouse embryos: involvement of Oct3/4 transcription at the blastocyst stage. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352(1): 231-6
- [21] Tam OH, Aravin AA, Stein P, et al. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, 2008, 453(7194): 534-8
- [22] Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 2008, 453(7194): 539-43
- [23] Murchison EP, Stein P, Xuan Z, et al. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev*, 2007, 21(6): 682-93
- [24] Bachvarova R, Cohen EM, De Leon V, et al. Amounts and modulation of actin mRNAs in mouse oocytes and embryos. *Development*, 1989, 106(3): 561-5
- [25] Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM. Transcript profiling during preimplantation development. *Dev Biol*, 2004, 272(2): 483-96
- [26] Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 2003, 35(3): 215-7
- [27] Marcon E, Babak T, Chua G, et al. miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res*, 2008, 16(2): 243-60
- [28] Ma J, Flemr M, Stein P, et al. MicroRNA activity is suppressed in mouse oocytes. *Curr Biol*, 2010, 20(3): 265-70
- [29] Suh N, Baehner L, Moltzahn F, et al. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Curr Biol*, 2010, 20(3): 271-7
- [30] Lee YS, Nakahara K, Pham JW, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer1 and Dicer2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 2004, 117(1): 69-81
- [31] Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Dev Cell*, 2003, 5(2): 351-8
- [32] Houbaviy HB, Dennis L, Jaenisch R, et al. Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. *RNA*, 2005, 11(8): 1245-57
- [33] Chen C, Ridzon D, Lee CT, et al. Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets. *Mamm Genome*, 2007, 18(5): 316-27
- [34] Lakshminpathy U, Love B, Goff LA, et al. MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(6): 1003-16
- [35] Alvarez-garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 2005, 132(21): 4653-62
- [36] Stadler BM, Ruohola-baker H. Small RNAs: keeping stem cells in line. *Cell*, 2008, 132(4): 563-6
- [37] Hayes B, Fagerlie SR, Ramakrishnan A, et al. Derivation, characterization, and *in vivo* differentiation of canine embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 465-73
- [38] Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, et al. Stem cell

- division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*, 2005, 435(7044): 974-8
- [39] Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1478-83
- [40] Melton C, Judson RL, Blelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2010, 463(7281): 621-6
- [41] Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, et al. Dicer deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, 2005, 19(4): 489-501
- [42] Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*, 2008, 18(4): 610-21
- [43] Callis TE, Chen JF, Wang DZ. MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA Cell Biol*, 2007, 26(4): 219-25
- [44] Tay YM, Tam WL, Ang YS, et al. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 17-29
- [45] Tay Y, Zhang J, Thomson AM, et al. MicroRNAs to *Nanog*, *Oct4* and *Sox2* coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008, 455(7216): 1124-8
- [46] Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*, 2005, 85(2): 635-78
- [47] Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*, 1990, 26(1): 90-100
- [48] Song JL, Wessel GM. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. *Differentiation*, 2005, 73(1): 1-17
- [49] Wormington M. Poly(A) and translation: development control. *Curr Opin Cell Biol*, 1993, 5(6): 950-4
- [50] Castro FO, Sharbati S, Rodríguez-Alvarez LL, et al. MicroRNA expression profiling of elongated cloned and *in vitro*-fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 2010, 73(1): 71-85
- [51] Daniels R, Hall V, Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod*, 2000, 63(4): 1034-40
- [52] Daniels R, Hall VJ, French AJ, et al. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(3): 281-8
- [53] Hall VJ, Ruddock NT, French AJ. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 2005, 72(1): 16-24
- [54] Cui XS, Zhang DX, Ko YG, et al. Aberrant epigenetic reprogramming of imprinted microRNA-127 and Rtl1 in cloned mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(2): 390-4
- [55] Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 55-70
- [56] Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 2007, 448(7151): 318-24
- [57] Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 151-9
- [58] Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, et al. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPSC reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 230-40
- [59] Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 39-49
- [60] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454(7200): 49-55
- [61] Judson RL, Babiarz JE, Venere M, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(5): 459-61
- [62] Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, et al. MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(5): 749-58
- [63] Zhao XY, Li W, Lü Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461(7260): 86-90
- [64] Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(2): 135-8
- [65] Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, 465(7295): 175-81
- [66] Liu L, Luo GZ, Yang W, et al. Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19483-90