

DOI: 10.13376/j.cbbs/2014058

文章编号: 1004-0374(2014)04-0400-07

细胞直接重编程技术——疾病治疗的新策略

张田田^{1,2}, 齐 晖^{2*}, 李富荣^{2*}

(1 暨南大学第二临床医学院(深圳市人民医院)风湿免疫科, 深圳 518020; 2 暨南大学第二临床医学院(深圳市人民医院)干细胞与细胞治疗重点实验室, 深圳 518020)

摘要: 细胞直接重编程技术是近年来兴起的重要生物技术, 其广泛的应用可为疾病的治疗、模型的构建、再生医学的研究提供了一个新的方向。细胞直接重编程技术不同于诱导性多能干细胞技术, 它可将一种终末分化细胞直接转变为另一种终末分化细胞, 跨越了分化细胞去分化以及再定向分化为特定功能细胞的过程, 因而可避免多能干细胞本身可能带来的安全隐患。对体细胞直接重编程技术的研究现状作一综述。

关键词: 直接重编程; 诱导多能干细胞; 细胞治疗

中图分类号: Q813 **文献标志码:** A

Cell direct reprogramming technology - new strategies for the treatment of disease

ZHANG Tian-Tian^{1,2}, QI Hui^{2*}, LI Fu-Rong^{2*}

(1 Department of Rheumatism, The Second Clinical Medical College (Shenzhen People's Hospital), Jinan University, Shenzhen 518020, China; 2 The Key Laboratory of Stem Cell and Cellular Therapy, The Second Clinical Medical College (Shenzhen People's Hospital), Jinan University, Shenzhen 518020, China)

Abstract: Direct reprogramming technology sheds light on new direction for disease therapy, animal model, regenerative medicine. Different from the iPS technology, using direct reprogramming, one terminal differentiated cell can be transdifferentiated into another kind of terminal differentiated cell type, avoiding the de-differentiation and re-differentiation processes that may lead to the security consider. Based on the above mentioned, this paper was prepared to summarize the current status of direct reprogramming process.

Key words: direct reprogramming; iPS cells; cell therapy

从 1960 年 John Gurdon 等发现分化的青蛙细胞核移植之后, 恢复全能性并定向分化为一个新的青蛙个体, 到 1997 年 Dolly 羊的诞生, 最终研究证明了哺乳动物体内核移植技术的成功。20 世纪 80 年代, Weintraub 等发现单个转录因子 MyoD 将成纤维细胞重编程为骨骼肌细胞, 开辟了细胞直接重编程技术领域的先河。目前越来越多的研究关注于寻求新的细胞来源用于细胞替代治疗。胚胎干细胞由于存在伦理学、法律、免疫排斥等问题, 在实际应用中受到限制。2006 年, Takahashi 和 Yamanaka^[1]通过逆转录病毒载体, 导入转录因子 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 将成纤维细胞重编程为胚胎样细胞, 即诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs), 解决了伦理学和免疫排斥反应问

题。目前, 获得特定组织细胞再生主要有两个新的方法, 一是多能性细胞分化为不同类型的体细胞; 二是转分化, 体细胞直接重编程为另一种细胞。iPSCs 临床应用仍存在以下问题: (1) 在分化过程中会出现肿瘤的风险, 以及病毒介导的转染改变宿主细胞的基因表型; (2) 诱导效率低, 会出现中间细胞, 仅有很少一部分转变为 iPSC^[2]; (3) 诱导的 iPSC 是短暂的表观遗传记忆还是持续表达尚不清楚^[3]。近来, 新发展的细胞直接重编程 (direct reprogramming) 技术, 是指将一种终末分化细胞直

收稿日期: 2013-10-20; 修回日期: 2013-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(81270857)

*通信作者: E-mail: ftrli62@163.com(李富荣); qihui214@126.com(齐晖)

接转变为另一种终末分化的细胞, 不需要经过将成体细胞重编程为胚胎样干细胞, 再由胚胎样干细胞分化为另一种终末分化细胞, 避免了操作的复杂性、细胞免疫排斥反应以及伦理学和法律问题等。理论上来说, 这种不经过多能干细胞阶段, 直接重编程而来的细胞可能为将来的疾病治疗提供更为安全的细胞, 也可以减少肿瘤形成的风险。因此, 这一研究具有极其重要的应用价值, 为疾病治疗提供了新的技术。本文就利用体细胞直接重编程新技术及用于疾病治疗的现状作一综述。

1 细胞直接重编程技术

修复和替代坏死的组织细胞是再生医学领域的一个靶目标, 先前研究认为终末分化细胞的单向性使得细胞表型的转变存在争议; 然而, 近年来研究发现一项新的技术——细胞直接重编程技术(转分化), 可将一种终末分化细胞直接重编程为另一种细胞, 如成纤维细胞直接重编程为神经细胞、血液细胞^[4]、脂肪细胞^[5], 脂肪细胞直接重编程为成骨细胞等。终末分化的细胞如何转分化为靶细胞以及直接重编程的过程中是否涉及到去分化的过程, 引发不同的观点却没有一个具体机制的阐述。有报道称转分化是细胞融合的结果^[6], 也有研究指出转分化是细胞培养过程中人为干预所致^[6]。然而, Song 和 Tuan^[7] 在细胞分化和去分化过程中, 通过绿色荧光蛋白标记和追踪否定了以上观点。去分化是转分化过程的一部分, 如脂肪细胞向骨骼肌细胞的转变需要去分化^[8]。同样, 卵泡颗粒细胞和成熟脂肪细胞向成骨细胞的转变也需要去分化^[5]。Ullah 等^[9] 指出, 去分化是脂肪细胞向成骨细胞转变的一个关键步骤。从基因层面分析, DNA 甲基化抑制剂是控制细胞表型转变的一个分子^[10]; 同样, 转录因子也是成体细胞转变的一个关键因素, 如重编程脂肪细胞的 CEBP 和 PPARG, 以及重编程成骨细胞的 RUNX2 等。从分子层面分析^[9], 在分化细胞直接重编程的过程中细胞周期也是一个关键因素。对于分化细胞表型的转变需要去分化这一中间过程还是直接转分化存在争议。转分化其实是一个分化、去分化和再分化的过程。在转分化过程中, 细胞命运的改变是基因重塑的一个间歇期^[8]: 分化是短暂的锁定, 去分化是短暂解锁的过程。细胞直接重编程无需去分化直接重编程而来, 如成纤维细胞直接重编程为血液细胞和神经细胞等^[4]。这些研究使得细胞命运转变在转分化过程中是否涉及去分化还是直

接重编程尚未确定。或许, 直接重编程对基因重塑是一个挑战, 需要给予一个特殊的时间窗实现细胞表型的转变, 还有待于我们继续研究。目前筛选的关键转录因子有编码神经细胞的 *Ascl1*、*Brn2*、*Myth11* 组合; 编码骨骼肌细胞的 *MyoD*; 编码嗜酸性粒细胞和血小板的 *CATA-1*; 编码巨噬细胞的 *CEBP- α* 和 *CEBP- β* ; 编码心肌细胞的 *Cata4*、*Tbx5*、*Baf60c* 组合; 编码胰岛 β 细胞的 *pdx1*、*Ngn3*、*Mafa* 组合等, 可见不同的转录因子组合可以直接重编程不同的成体细胞。转分化所需要的转染方法最初是腺病毒和逆转录病毒载体系统, 虽有较高的转染效率, 但会引起外源性基因的激活或沉默, 导致宿主基因表型的改变。近年来, 又发现一些非整合型病毒及基因载体, 如重组腺病毒(rAAV)^[11]、人工染色体(HACs)载体^[12]、多西环素诱导的质粒载体^[13]、小分子治疗^[14]、细胞信号肽(如 Wnt 信号)^[15], 以及小分子 RNA^[16]、PLGA/bPEI-DNA 纳米粒(6:3:2)^[17] 等, 因此, 还有待于我们进一步应用最少的转录因子和安全高效的转染技术, 以提高直接重编程技术效率和安全性。直接重编程技术避免多能干细胞阶段, 为自体细胞替代治疗提供了一种新的获得缺失细胞的方法。

2 细胞直接重编程——疾病治疗的新策略

2.1 直接重编程为胰岛 β 细胞

2008 年, Zhou 等^[18] 从胰腺 β 细胞发育相关的 20 个转录因子中筛选出最佳组合 *pdx1*、*Ngn3*、*Mafa*(PNM), 用慢病毒转染的方法, 在 2 月龄的免疫缺陷小鼠(NOD-SCID)体内成功重编程胰腺外分泌细胞为胰岛 β 样细胞, 重编程细胞 3 d 后由鹅卵石样外观向更小梭形样结构转变, 且保持单个细胞或聚集状态, 重编程效率为 20%, 体积较小且没有形成胰岛样结构。移植实验发现, 小鼠血清胰岛素水平明显增加, 但胰岛素释放量较少, 可能与缺乏胰岛组织结构, 削弱诱导性 β 细胞功能有关。为进一步研究机制, 2012 年, Akinci 等^[19] 在体外建立大鼠 AR42j-B13 细胞系, 转染该组合后发现显著细胞表型转变, 呈扁平的成纤维细胞样形态, 胰腺外分泌细胞特性基因下调, 大量胰腺 β 细胞特性基因表达。然而, 该重编程过程缺乏 *Glut2* 和 *Kir-6.2* 等重要基因的表达。*Pdx1* 和两个胰岛素基因的组蛋白和 DNA 甲基化研究表明, PNM 组合修饰染色体促进其表达。在胚胎发育期, 肝脏和胰腺共同起源于腹部前肠内胚层细胞, 表明胰腺发育相关转录因

子可能适用于成熟肝脏细胞染色体重塑。同年, Banga 等^[20]将 *pdx1*、*Ngn3*、*Mafa* 组成单个腺病毒串联载体, 经尾静脉注射到免疫缺陷小鼠体内, 发现胰腺相关基因表达集中于肝脏并非胰腺或其他内脏结构。转染后细胞两周内呈簇状聚集, 具有相关基因表达和释放胰岛素功能, 重编效率达 20%, 3~16 周内呈现具有毛细血管的导管样结构, 证实这些导管样结构源于 *SOX9*⁺ 细胞, 表达 C 肽、*MAFA* 等, 在肝脏中有 10 倍胰岛素水平表达, 且能维持较长时间, 说明结构完整性的重要性。鉴于胆胰同源性^[21], Hickey 等^[22]报道, 转录因子 *pdx1*、*Mafa*、*Neurog3* 能将小鼠胆囊细胞直接重编程为胰岛素分泌细胞。同时, *H3K4me3* 和 *H3K27me3* 能够改变人类胰岛组蛋白甲基化, 从而促进 α 与 β 细胞的直接重编程, 用非特异性组蛋白甲基转移酶抑制剂 ADOX 治疗后, 有胰高血糖素和胰岛素的表达, 能够直接重编程内分泌细胞^[23]。Pennarossa 等^[24]首次通过 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-胞嘧啶 (5-aza-CR) 三步诱导法将猪的成纤维细胞直接重编程为胰岛素分泌细胞, 在重编后第 36 天达到高峰, 并能维持 102 d, 流式检测重编程效率达 (38.1 ± 9.2)%, 这一过程不同于之前的报道, 未涉及到转录因子和 microRNAs 的参与。以上成功事例证明直接重编程技术为 β 细胞的来源提供了新的途径。这一过程避免胰岛移植供体不足和免疫排斥等限制, 也可避免干细胞体外转分化效率低, 以及安全性问题, 由于不会给患者带来很大的创伤, 从心理和生理上对患者都有极大的帮助, 可能成为治疗糖尿病新的潜在技术。

2.2 直接重编程为心肌细胞

Ieda 等^[25]首次报道体外借助标记有特异 α -心肌肌球蛋白重链启动子 (*aMHC-GFP*) 的转基因小鼠从 14 个心肌转录因子中筛选出最佳组合 *Gata4*、*Mef2c* 和 *Tbx5* (GMT), 将终末分化的成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞 (iCMs)。病毒转染后, *aMHC-GFP*⁺ 细胞达 10%~20%, 其中, 50% 细胞表达心肌肌钙蛋白 T (cTnT), 20% 细胞有钙离子瞬间流动, 仅有 0.5% 重编程细胞为有功能的心肌细胞。尽管重编程跳动心肌细胞的比例较低, 但基因芯片显示有相似心肌基因表达和不同程度类似肌节样结构, 表观遗传稳定在 DNA 甲基化和组蛋白修饰位点, 转录因子过表达消失后依然持续存在细胞表型的改变, 这些心肌样细胞 (iCMs) 只是类似却不同于新生心肌细胞。为研究细胞转变机制, 他们通过

建立标记早期中胚层祖细胞 (*Mesp1*⁺) 和心肌祖细胞 (*Isl1*⁺) 的转基因小鼠检测发现这些 (iCMs) 并未激活 Cre 重组酶, 表明这一细胞转变过程未经过祖细胞, 电生理活性更类似于新生心肌细胞而非多能干细胞。为提高体外重编程效率, Song 等^[26]发现组合 GHMT (*GATA4*、*Hand2*、*MEF2C*、*Tbx5*) 优于组合 GMT (*GATA4*、*MEF2C*、*Tbx5*), 转染效率是之前报道的 4 倍之多, 这些心肌样细胞在转染第 30 天, GHMT 组合中有 15% 小鼠心肌成纤维细胞和 18% 尾尖成纤维细胞转变为 α MHC-GFP⁺ 细胞, 其中分别有 30% 和 10% 出现肌节样结构。2013 年, Addis 等^[27]在心肌特异性肌钙蛋白 T 启动子标记的钙指示剂 GCaMP 作用下, 通过钙离子振荡影响心肌功能来量化钙离子评估重编程心肌细胞的效率, 筛选出最佳组合 *Hand2*、*Nkx2.5*、*Gata4*、*Mef2c*、*Tbx5* (HNGMT), 重编效率是 GMT 组合的 50 倍之多, 可以提高直接重编程细胞的效率和功能特性^[28], 可见不同组合对于重编程效率的重要性。Jayawardena 等^[29]研究发现 4 个 microRNAs (*miR-1*、*miR-133*、*miR-208* 和 *miR-499*) 混合物过表达能将 1.5%~5% 的成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞, 其中, 仅单个 *miR-1* 过表达, 通过添加 JAK 抑制剂, 能促进 microRNA 部分重编程细胞向心肌细胞分化, 重编程效率能提高 13%~27%。与转录因子参与的重编程类似, 心肌细胞的特异基因表达升高, 1%~2% 的转染细胞有 Ca^{2+} 流动, 表明 microRNA 也具有与转录因子同样重编程的功能。心肌成纤维细胞占整个心脏细胞总数的一半以上的, 它是完全分化成熟的成体细胞, 提供结构支持、分泌信号因子以及对心肌细胞的损伤有修复作用。若能将心脏中的心肌成纤维细胞重编程为心肌细胞, 那么对于心肌源性心脏疾病的治疗将会有很大的帮助。2012 年, Qian 等^[30]通过结扎小鼠心脏左前降支, 导致成纤维细胞扩增形成瘢痕, 并标记非心肌细胞, 用逆转录病毒的转染方法将 GMT 注入成纤维细胞形成瘢痕的心肌缺血区, 追踪心肌标记物发现, 在心肌缺血区有 9%~35% 心肌细胞, 表明重编细胞源于体内成纤维细胞。分离源于受损心肌的 iCMs, 发现具有动作电位、钙离子瞬间流动和心肌收缩功能。4 周后的组织切片发现有 50% 重编细胞有肌节样结构形成, 体内 50% 重编程细胞具有心肌跳动性。与对照组相比, GMT 处理后心脏射血分数、心输出量、每搏输出量都有改善, 心脏瘢痕组织减少。与体外研究相比, 体内实验表明, 一些未知的因子, 如细

胞信号、细胞外基质等体内环境可能有助于提高重编程细胞的成熟度。以同样的方法, Jayawardena 等^[29]也证实了 microRNAs 介导的重编程体内研究, 受损心肌有 1% 的 iCMs, 但是否具有改善受损心肌的功能尚未测定。心肌重编程的最终目的是用于人类心脏疾病的治疗, 有报道称仅 GMT 或 GHMT 未能将人的成纤维细胞直接重编程为心肌样细胞^[31], 但 Nam 等^[32]发现在 GHMT 的基础上联合 miRNAs (miR-1 和 miR-133) 能重编程人成纤维细胞为表达 cTnT 的心肌细胞, 重编效率达 20%, 与体外研究相似, 具有钙离子瞬间流动和心肌相关基因表达, 但并非所有心肌相关基因都上调, 表明重编程的不完全性。Fu 等^[33]发现, 在 GMT 的基础上添加心肌蛋白和核激素受体 ESRRG 和 MESP1 能将人成纤维细胞转变为心肌样细胞, 20% 的细胞有钙离子瞬间流动以及心肌细胞相关的特性。不同研究发现, 添加 MESP1 和 ETS-2 能将终末分化的人成纤维细胞重编程为心肌祖细胞并定向分化为心肌细胞^[34]。可见, 各种不同的组合可以实现人类心肌细胞的重编程, 这一技术在疾病治疗的应用中具有巨大的优势。首先, 这一过程周期短, 极大缩短治疗时间; 其次, 避免了干细胞诱导阶段的低效率和肿瘤风险; 再次, 体内直接重编程避免了移植成活率低的问题。

2.3 直接重编程为神经细胞

2010 年, Veirbuchen 等^[35]通过慢病毒载体, 从 19 个神经细胞发育相关的转录因子中筛选出最佳组合 Brn2、Ascl1 和 Myt1l (BAM), 体外将小鼠胚胎成纤维细胞和出生后成纤维细胞重编程为功能性神经细胞 (具有兴奋性神经递质谷氨酸和抑制性递质 GABA 表型的电生理活性), 细胞转染两周后, 重编程效率达 20%。在 BAM 的基础上, 体外转染人胚胎成纤维细胞、胎儿肺部成纤维细胞以及人星形胶质细胞并添加多西环素进行诱导, 移植到大鼠纹状体和海马处, 可实现体内直接重编程为神经细胞, 与体外转染效率相近, 转染细胞一旦聚集到脑实质神经细胞, 发育相关基因即被激活实现重编程, 表明大脑内环境是直接重编程的一个影响因素^[36]。然而, 不管是大脑星形胶质细胞^[37]、周细胞^[38]的体外重编程还是纹状体部位星形胶质细胞^[36]的体内重编程, 都只是源于一种细胞表型的重编程, 不具有增殖功能。Han 等^[39]通过转录因子组合 Brn4/Pou3f4、Sox2、Klf4、c-Myc 和 E47/Tcf3 实现小鼠成纤维细胞直接重编程为神经祖细胞 (iNSCs)。该 iNSCs 具有增殖性且能定向分化为神经细胞、星形

胶质细胞和少突胶质细胞等, 未观察到突触等特性, 存在供体细胞的表现记忆, 但不影响 iNSCs 在体内外功能, 说明这一技术存在一定的不足, 有待于进一步研究。Kim 等^[40-41]发现, iPS 重编因子 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 分别与神经细胞生长因子和 JAK、GSK-3 β 抑制剂联用可将小鼠成纤维细胞重编程为神经祖细胞 (iNSCs) 和多巴胺能神经祖细胞, 这一技术的不同点在于重编程细胞不但具有增殖性, 而且采用传统重编因子而非神经细胞发育相关转录因子在适当条件下也可实现直接重编程, 说明 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 诱导的重编程中, iPS 可能只是其中的一种结果。其中, 在重编程过程中小分子 TGF- β 抑制剂 A83-01 和 GSK-3 β 抑制剂 CHIR99021 可促使单个 Oct4 直接重编程^[42]; 而 Sox2 过表达虽未能实现, 但在 3D 环境下培养也可以实现神经祖细胞的重编程^[43], 说明 Oct4 独特的重编程能力以及环境因素的重要性。Zou 等^[43]报道, 转录因子 Sox2、c-Myc 和 Brn2 或 Brn4 能将人胚胎成纤维细胞重编程为神经限制性祖细胞 (NRPs), 这些重编程细胞具有神经细胞特性和相关基因表达, 能分化为除少突胶质细胞外的各种终末分化的神经细胞, 其中 Sox2、c-Myc 诱导成纤维细胞向增殖性的祖细胞分化, 而 Brn2 或 Brn4 具有促使祖细胞向神经细胞分化的作用。鉴于正常情况下处于静止状态的大脑皮质和纹状体本身具有向神经祖细胞分化的潜能, Grande 等^[44]通过刺伤该部位造成局部缺血, 用病毒转染转录因子 Neurog2 和生长因子, 实现了大脑部位重编程, 这也为特定部位细胞损伤缺血的替代治疗提供了一定的靶向性。为获取特定神经细胞亚型, Liu 等^[45]首次报道单个转录因子 Ngn2 分别联合小分子 FSK(cAMP 信号激活剂)、DM(骨形成蛋白信号抑制剂) 和 SOX11、生长因子 FGF2, 用逆转录病毒转染的方法, 分别将胎儿肺和成人皮肤成纤维细胞重编程为胆碱能神经细胞, 其中, Ngn2 具有激活神经细胞向其亚型转变的功能, 小分子 FSK 促进细胞成熟以及参与 Oct4 介导的神经祖细胞的直接重编程, 表明除转录因子外, 小分子在重编程过程中发挥重要作用。在人体的神经系统中, 若脑损伤或是神经细胞退行性导致的神经系统疾病能通过细胞直接重编程技术获得相应的神经细胞进行靶向治疗, 相信这将是治疗神经系统疾病的一个新的突破。

2.4 直接重编程为软骨细胞

2011 年, Hiramatsu 等^[46]从 4 个重编因子 Oct3/4、

Sox2、c-Myc、Klf4 和 1 个软骨发育相关因子 Sox9 中筛选出最佳组合 c-Myc、Klf4、Sox9, 将表达 β 半乳糖苷酶的转基因小鼠成纤维细胞重编程为不含 I 型胶原蛋白的软骨细胞。甲苯胺蓝染色显示, 92% 转染细胞有多边形的形态学转变并有软骨相关基因表达, 裸鼠体内移植实验发现部分诱导的细胞有肿瘤形成, 但未出现肿瘤的重编程细胞有软骨样组织出现, 且能维持较长的时间, 表明这一过程可能是由于 Sox9 易位表达激活转录因子 c-Myc、Klf4 向软骨样细胞转变, 而软骨细胞重编程成功的关键是 I 型胶原蛋白基因的沉默, 且未经过诱导性多能干细胞阶段^[47]。此外, 该组合可将人成纤维细胞重编程为软骨细胞, 与小鼠的重编程不同点在于裸鼠体内移植未有肿瘤形成, 可能是源于人的重编程细胞具有有限增殖能力而源于小鼠的重编程细胞具有无限增殖的潜能所致, 表明源于人成纤维细胞的直接重编程更有利于软骨疾病的替代治疗^[48]。除以上组合, 组合 BCL6、T、c-MYC、MITF 和 BAF60C 能将人胎盘重编程为软骨样细胞^[49], 在 3D 环境下添加 TGF- β ^[50] 以及 Pax1 的下调促进软骨细胞的成熟, 表明环境因素和细胞转导信号的重要性^[51]。

2.5 直接重编程为肝样细胞

2011 年, Huang 等^[52] 从 14 个肝细胞发育相关的转录因子中筛选出最佳组合 Gata4、Hnf1a 和 Foxa3 并抑制细胞周期抑制因子 p19Arf 的活性, 直接重编程小鼠尾尖的成纤维细胞为诱导性肝样细胞 (iHep), 这些 iHep 具有原代肝细胞相关基因的表达, 同时具有肝脏细胞功能, 如糖原合成、ALB 的分泌、LDL 的摄取和 CYP 的代谢活性等。体内移植模拟人类酪氨酸代谢缺陷疾病的小鼠 (Fah^{-/-} 小鼠) 实验后发现能够重建和修复受损肝脏细胞, 小鼠的总胆红素、转氨酶、酪氨酸等肝功能指标出现明显好转, 近半数的小鼠得以存活。Sekiya 和 Suzuki 报道^[53] 2 个转录因子 Hnf4a 和 1 个 Foxa 家族因子也可直接重编程为类似的 iHep, 然而, 与之前报道相比, 重编程效率较低, 细胞转变时间较长。这两项研究都实现了成纤维细胞向肝样细胞的直接重编程, 能否实现具有增殖性的祖细胞成为一个新方向。Yu 等^[54] 报道的转录因子 Hnf1b 和 Foxa3 可将小鼠胚胎成纤维细胞直接重编程为肝样祖细胞, 而且具有定向分化为肝样细胞和胆管细胞的潜能。除转录因子之外, 细胞的生长环境也可以促使直接重编程的实现, 2013 年, Zhang 等^[55] 发现的小鼠精原干细胞无需转录因子可直接重编程为肝脏祖细胞并能定向分化

为小肝样细胞, 这一过程主要通过激活 ERK1/2 和 Smad2 信号通路并非经过多能干细胞阶段, 不但实现了提高细胞成熟度还具有增殖性。他们将 4 个生长因子 Activin A、Nodal、Wnt3a、bFGF 设置 6 个培养条件, 从中筛选出最佳生长因子组合 Nodal、Wnt3a、bFGF, 培养精原干细胞系 C18-4 和原代精原干细胞 10 d 后具有肝卵圆细胞样的椭圆形形态学变化, 97% 细胞表达 CK18, 具有较高的重编程效率, 表明环境因素的重要性。直接重编程技术为再生医学的发展带来可观的优势, 一是降低实验操作的复杂性; 二是移植时可避免多能干细胞导致肿瘤的风险, 重要的是直接重编程的祖细胞解决了体外移植肝细胞数量不足的问题, 相信这一技术的发现为肝脏疾病的治疗带来新希望。

2.6 直接重编程为内皮细胞

缺血性血管疾病, 如外周动脉疾病、冠状动脉疾病、脑血管疾病等, 很大程度上会引起坏疽、心肌梗死、中风等严重并发症, 血管的再生成为一个新的研究热点。成纤维细胞来源广泛, 是体细胞直接重编程的首选目标。Margariti 等^[56] 首次通过转录因子 Oct4、Sox2、Klf4、和 c-Myc 重编程人成纤维细胞, 4 d 后形成部分 iPS (Pips), 不但未形成肿瘤, 而且具有向内皮细胞 (EC) 分化的潜能, 这些诱导细胞具有良好的黏附性、稳定性和通畅的内皮细胞结构, 这一发现为内皮细胞重编程开创了先例。Li 等^[57] 报道, 仅仅两个转录因子 Oct4 和 Klf4 足以实现内皮细胞的直接重编程, 诱导 28 d 后出现类似内皮样 (iEnd) 细胞的形态学变化, 将这些 iEnd 细胞体内移植发现具有增加毛细血管密度和血液灌注量的功能, 与之前报道相比, 重编程效率有所降低。此外, 将成纤维细胞在中胚层诱导性培养基 (MIM) 中培养可实现 CD34⁺ 内皮祖细胞的直接重编程, 这些祖细胞不但具有增殖性还有向内皮细胞和平滑肌细胞分化的潜能, 表明环境因素的重要性^[58]。除了源于成纤维细胞的重编程之外, Ginsberg 等^[59] 报道, 人类妊娠中期的 C 系羊水细胞 (ACS) 在 TGF- β 抑制剂作用下, 通过 ETV2 的瞬时表达以及 ERG1/FLI1 的联合应用, 也可实现内皮细胞的重编程以及视网膜内皮细胞的直接重编程^[60] 等, 这一系列的发现为新生内皮细胞治疗缺血性血管疾病提供新的细胞来源。

3 展望

体细胞直接重编程技术所获得的细胞是成体细

胞, 既可避免干细胞诱导中存在畸胎瘤的风险, 也缩短了干细胞分化需要的时间。糖尿病、心肌梗死、帕金森综合症等慢性疾病, 目前临床上治疗非常棘手, 主要是由于功能细胞的生理特性发生障碍, 对于功能细胞的替代治疗还没有非常成熟的策略和方式, 随着体细胞直接重编程技术的发现, 为解决这一类难题提供了新的选择。如上所述, 有望通过该技术的应用, 将一种体细胞直接转分化为特定功能的体细胞, 从而替代坏死缺失的功能细胞, 从而达到治疗疾病的目的。目前这一技术主要采用病毒转染, 存在一定的安全性风险。另外, 直接重编程对细胞数量和功能控制还刚起步, 还有很长的路要走, 但相信这一新技术的发现将会为疾病治疗提供新的策略。

[参 考 文 献]

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [2] Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 2008, 132: 567-82
- [3] Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 848-55
- [4] Szabo E, Rampalli S, Risueno RM, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*, 2010, 468: 521-6
- [5] Zhu J, Pang D, Zhou Y, et al. Direct conversion of porcine embryonic fibroblasts into adipocytes by chemical molecules. *Cell Reprogram*, 2012, 14: 99-105
- [6] Wurmser AE, Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature*, 2002, 416: 485-7
- [7] Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J*, 2004, 18: 980-2
- [8] Eguizabal C, Montserrat N, Veiga A, et al. Dedifferentiation, transdifferentiation, and reprogramming: future directions in regenerative medicine. *Semin Reprod Med*, 2013, 31: 82-94
- [9] Ullah M, Stich S, Notter M, et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells-derived adipogenic-differentiated cells into osteogenic- or chondrogenic-differentiated cells proceeds via dedifferentiation and have a correlation with cell cycle arresting and driving genes. *Differentiation*, 2013, 85: 78-90
- [10] Wagner BK. Grand challenge commentary: chemical transdifferentiation and regenerative medicine. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 877-9
- [11] Weltner J, Anisimov A, Alitalo K, et al. Induced pluripotent stem cell clones reprogrammed via recombinant adeno-associated virus-mediated transduction contain integrated vector sequences. *J Virol*, 2012, 86: 4463-7
- [12] Hiratsuka M, Uno N, Ueda K, et al. Integration-free iPS cells engineered using human artificial chromosome vectors. *PLoS One*, 2011, 6: e25961
- [13] Merkl C, Saalfrank A, Riesen N, et al. Efficient generation of rat induced pluripotent stem cells using a non-viral inducible vector. *PLoS One*, 2013, 8: e51170
- [14] Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 795-7
- [15] Marson A, Foreman R, Chevalier B, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 132-5
- [16] Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 443-8
- [17] Seo EJ, Jang IH, Do EK, et al. Efficient production of retroviruses using PLGA/bPEI-DNA nanoparticles and application for reprogramming somatic cells. *PLoS One*, 2013, 8: e76875
- [18] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 2008, 455: 627-32
- [19] Akinci E, Banga A, Greder LV, et al. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a β (β) cell character using *Pdx1*, *Ngn3* and *MafA*. *Biochem J*, 2012, 442: 539-50
- [20] Banga A, Akinci E, Greder LV, et al. *In vivo* reprogramming of Sox9+ cells in the liver to insulin-secreting ducts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 15336-41
- [21] Spence JR, Lange AW, Lin SC, et al. Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell*, 2009, 17: 62-74
- [22] Hickey RD, Galivo F, Schug J, et al. Generation of islet-like cells from mouse gall bladder by direct *ex vivo* reprogramming. *Stem Cell Res*, 2013, 11: 503-15
- [23] Bramswig NC, Everett LJ, Schug J, et al. Epigenomic plasticity enables human pancreatic α to β cell reprogramming. *J Clin Invest*, 2013, 123: 1275-84
- [24] Pennarossa G, Maffei S, Campagnol M, et al. Reprogramming of pig dermal fibroblast into insulin secreting cells by a brief exposure to 5-aza-cytidine. *Stem Cell Rev*, 2014, 10(1): 31-43
- [25] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010, 142: 375-86
- [26] Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*, 2012, 485: 599-604
- [27] Addis RC, Ifkovits JL, Pinto F, et al. Optimization of direct fibroblast reprogramming to cardiomyocytes using calcium activity as a functional measure of success. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 60: 97-106

- [28] Bader AG, Brown D, Stoudemire J, et al. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther*, 2011, 18: 1121-6
- [29] Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, et al. MicroRNA-mediated *in vitro* and *in vivo* direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res*, 2012, 110: 1465-73
- [30] Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 2012, 485: 593-8
- [31] Wada R, Muraoka N, Inagawa K, et al. Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12667-72
- [32] Nam YJ, Song K, Luo X, et al. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 5588-93
- [33] Fu JD, Stone NR, Liu L, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state. *Stem Cell Reports*, 2013, 1: 235-47
- [34] Islas JF, Liu Y, Weng KC, et al. Transcription factors ETS2 and MESP1 transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 13016-21
- [35] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, 463: 1035-41
- [36] Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, et al. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 7038-43
- [37] Corti S, Nizzardo M, Simone C, et al. Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res*, 2012, 318: 1528-41
- [38] Karow M, Sanchez R, Schichor C, et al. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 471-6
- [39] Han DW, Tapia N, Hermann A, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 465-72
- [40] Kim J, Efe JA, Zhu S, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 7838-43
- [41] Kim HS, Kim J, Jo Y, et al. Direct lineage reprogramming of mouse fibroblasts to functional midbrain dopaminergic neuronal progenitors. *Stem Cell Res*, 2014, 12: 60-8
- [42] Zhu S, Ambasudhan R, Sun W, et al. Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells. *Cell Res*, 2014, 24: 126-9
- [43] Zou Q, Yan Q, Zhong J, et al. Direct conversion of human fibroblasts into neuronal restricted progenitors. *J Biol Chem*, 2014, 289: 5250-60
- [44] Grande A, Sumiyoshi K, Lopez-Juarez A, et al. Environmental impact on direct neuronal reprogramming *in vivo* in the adult brain. *Nat Commun*, 2013, 4: 2373
- [45] Liu ML, Zang T, Zou Y, et al. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat Commun*, 2013, 4: 2183
- [46] Hiramatsu K, Sasagawa S, Outani H, et al. Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. *J Clin Invest*, 2011, 121: 640-57
- [47] Outani H, Okada M, Hiramatsu K, et al. Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411: 607-12
- [48] Outani H, Okada M, Yamashita A, et al. Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. *PLoS One*, 2013, 8: e77365
- [49] Ishii R, Kami D, Toyoda M, et al. Placenta to cartilage: direct conversion of human placenta to chondrocytes with transformation by defined factors. *Mol Biol Cell*, 2012, 23: 3511-21
- [50] Lehmann M, Martin F, Mannigel K, et al. Three-dimensional scaffold-free fusion culture: the way to enhance chondrogenesis of *in vitro* propagated human articular chondrocytes. *Eur J Histochem*, 2013, 57: e31
- [51] Takimoto A, Mohri H, Kokubu C, et al. Pax1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Exp Cell Res*, 2013, 319: 3128-39
- [52] Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 2011, 475: 386-9
- [53] Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*, 2011, 475: 390-3
- [54] Yu B, He ZY, You P, et al. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 328-40
- [55] Zhang Z, Gong Y, Guo Y, et al. Direct transdifferentiation of spermatogonial stem cells to morphological, phenotypic and functional hepatocyte-like cells via the ERK1/2 and Smad2/3 signaling pathways and the inactivation of cyclin A, cyclin B and cyclin E. *Cell Commun Signal*, 2013, 11: 67
- [56] Margariti A, Winkler B, Karamariti E, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 13793-8
- [57] Li J, Huang NF, Zou J, et al. Conversion of human fibroblasts to functional endothelial cells by defined factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33: 1366-75
- [58] Kurian L, Sancho-Martinez I, Nivet E, et al. Conversion of human fibroblasts to angioblast-like progenitor cells. *Nat Methods*, 2013, 10: 77-83
- [59] Ginsberg M, James D, Ding BS, et al. Efficient direct reprogramming of mature amniotic cells into endothelial cells by ETS factors and TGF β suppression. *Cell*, 2012, 151: 559-75
- [60] Zhang K, Liu GH, Yi F, et al. Direct conversion of human fibroblasts into retinal pigment epithelium-like cells by defined factors. *Protein Cell*, 2014, 5: 48-58