

DOI: 10.13376/j.cblls/2015044

文章编号: 1004-0374(2015)03-0327-09



谢欣, 中科院上海药物研究所研究员 / 课题组长, 国家新药筛选中心副主任, 科技部重大科学研究计划首席科学家, 国家杰出青年基金获得者。主要从事基于 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 和干细胞的重大疾病新机制、药物作用新靶点及生物活性新分子研究。发表 SCI 论文 60 余篇, 获授权和申请国内外发明专利 20 余项。获得过多项荣誉及奖励, 包括新世纪百千万人才工程国家级人选、中科院上海分院系统杰出青年科技创新人才、上海市优秀学术带头人、上海市三八红旗手、国务院政府特殊津贴专家等, 并于 2013 年获第十届中国青年女科学家奖。现任 *Journal of Biological Chemistry* 及 *Acta Pharmacologica Sinica* 编委。

改变细胞命运的重编程

龙 媛, 张立红, 谢 欣*

(中国科学院上海药物研究所中国科学院受体结构与功能重点实验室, 国家新药筛选中心, 上海 201203)

摘 要: 体细胞重编程是指用特定方法使已分化的细胞重新获得多能性的过程, 可通过核移植、细胞融合、多能细胞提取物共培养和诱导性多能干细胞等途径实现。其中, 诱导性多能干细胞技术发展最为迅速, 应用前景广阔。现主要介绍重编程领域近年的研究进展。

关键词: 体细胞重编程; 诱导性多能干细胞; 小分子化合物; 转分化

中图分类号: Q343.5; Q813 **文献标志码:** A

Recent progress in somatic cell reprogramming

LONG Yuan, ZHANG LI-Hong, XIE Xin*

(CAS Key Laboratory of Receptor Research, the National Center for Drug Screening, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: Differentiated somatic cells can be reprogrammed to pluripotent state by several techniques, including nuclear transfer, cell fusion, co-culture with pluripotent cell extracts and the recently discovered induced pluripotent stem cell (iPSC) technology. iPSCs are highly valuable in regenerative medicine and the techniques in generating iPSCs are evolving very fast. In this review, we summarize recent progress in the research of somatic cell reprogramming and iPSCs.

Key words: somatic cell reprogramming; induced pluripotent stem cell; small molecules; trans-differentiation

从一颗受精卵最终形成完整生命个体的过程, 称为发育, 又称编程, 是一个细胞数目和种类同时

增加的复杂的生命活动。这一进程伴随着细胞数目的增加 (增殖) 和前体细胞向下一级细胞的演变 (分

收稿日期: 2014-12-23

基金项目: 干细胞研究国家重大科学研究计划(2015CB964503); 中国科学院干细胞先导专项(XDA01040301); 国家自然科学基金项目(81425024, 31371511)

*通信作者: E-mail: xxie@simm.ac.cn

化), 最终形成具有复杂功能的生命体。

受精卵和早期分裂球具有全能性, 能够形成整个的生物体和胚外组织。发育早期的胚胎由两部分构成: 一部分是滋养外胚层细胞, 它们形成胚胎外组织, 如胎盘, 为胚胎发育供应必需的营养物质, 保证氧气的供应^[1-2]; 另一部分是大约 20 个细胞的内细胞团 (inner cell mass, ICM), ICM 的细胞进一步分化为 3 个胚层, 进而形成由不同器官和组织构成的复杂个体。ICM 的细胞能够形成所有的体细胞以及生殖细胞的特性被定义被多能性。1981 年, 科学家从 ICM 中分离细胞, 成功建立了小鼠的胚胎干细胞系 (mouse embryonic stem cells, mESCs)^[3]。mESCs 具有两个重要特征——自我更新和多能性。在特定的培养条件下, mESCs 可以一直稳定传代, 并维持胚胎干细胞状态和特征 (自我更新), 保持基因稳定; 该细胞同时具有向 3 个不同胚层细胞分化的能力 (多能性), 在特定的诱导条件下可以向分化为不同种类的细胞。

发育过程是多因子共同调节的结果, 细胞在发育过程中命运被决定, 逐渐变成单能性。最终, 终末分化的细胞不再具有分化能力。在自然状态下, 这一过程基本不可逆。随着生命科学的进展, 人们通过核移植、细胞融合以及导入特定转录因子等方法, 成功地将已分化的成体细胞逆转为具有多能性或是全能性的细胞, 这一逆转过程被定义为体细胞重编程 (somatic cell reprogramming)。体细胞重编程技术可以使分化的细胞重新获得多能性, 进而建立稳定遗传的干细胞系或进一步发育成组织、器官或完整的个体。体细胞重编程技术经过了几十年的发展, 取得了很多意义重大的进展, 本综述将从体细胞重编程技术的几类主要方法入手, 对该技术的进展和研究现状进行介绍。

1 重编程策略

1.1 细胞核移植(nuclear transfer)

1952 年, Briggs 和 King^[4] 将囊胚细胞的细胞核转移至蛙卵中, 首次克隆出了脊椎动物北方豹纹蛙。1962 年, Gurdon^[5] 用紫外照射破坏非洲爪蟾的未受精卵细胞核, 然后将蝌蚪上皮细胞的细胞核注入核被破坏的卵细胞中, 得到了发育完全正常的爪蟾。实验中使用的细胞核来源于已经分化的成体细胞, 这一实验首次证明了完整生物体发育所需的所有基因都存在于已分化细胞的核内, 而且这些基因可以被卵细胞内存在的某些因子重新激活。值得一

提的是, 1963 年, 我国科学家童第周等将雄性鲤鱼的细胞核移植入雌性鲤鱼的去核卵细胞, 首次得到了克隆鱼。

在随后的几十年间, 科学家一直在尝试对哺乳动物进行克隆。1997 年, Wilmut 等^[6] 从成年羊的乳腺中分离出体细胞, 将细胞核移植到去核的卵母细胞后, 获得了一只成体羊, 也就是著名的克隆羊多莉。克隆羊多莉的诞生, 证明哺乳动物的体细胞核在移植入卵母细胞后能产生类似于胚胎干细胞的新细胞, 并进一步发育形成完整个体。

随后, 科学家相继应用核移植技术克隆出了多种哺乳动物, 但这些克隆动物普遍存在早衰现象及其他缺陷。2003 年, 多莉因严重肺病被安乐死, 活了 6 岁, 而羊的平均寿命是 12 岁。人们还发现, 只有 1% 的克隆小鼠及 3% 的克隆牛可以正常生长, 这个数值远小于自然比率^[7]。同时, 核移植技术的关键步骤是将体细胞核导入去核的卵母细胞, 这种方法涉及伦理问题, 并不适用于人类, 因此, 并不能应用于人类再生医学领域。

1.2 细胞融合(cell fusion)

细胞融合是指用化学或生物学方法将两种或者多种细胞类型的细胞形成一个细胞整体。科学家曾经尝试将体细胞与胚胎癌细胞^[8]、胚胎生殖细胞或者胚胎干细胞融合^[9], 得到的细胞均能向干细胞方向转变。人的胚胎干细胞也能在细胞融合后重编程体细胞核^[10-11], 在细胞融合之后, 沉默的多能性基因能够被重新启动, 进而获得一定的多能性。但是, 通过细胞融合的方法得到的重编程细胞是四倍体。尽管有实验技术可以选择性地消除原有胚胎干细胞的染色体^[12], 但是多倍体的细胞仍存在很大程度的基因组不稳定性, 限制了该技术的应用。

1.3 多能细胞提取物(cell extracts)共培养

Taranger 等^[13] 的研究发现, 使用多能细胞提取物与体细胞共培养, 也可以实现体细胞重编程, 但是这一方法依然需要干细胞, 依然不能克服伦理学问题。

1.4 诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)——里程碑式的发现

2006 年, Yamanaka 实验室发现并报道了体细胞重编程的一项重大进展^[14], 他们利用逆转录病毒在小鼠的成纤维细胞中导入 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 等 4 种转录因子而得到具有大部分干细胞特性的细胞, 因其是由成纤维细胞诱导获得的干细胞, 所以将其命名为诱导性多能干细胞 (iPSCs)。研究

人员最初选取了 24 个与胚胎干细胞相关的基因作为候选基因, 以逆转录病毒为基因载体的方式, 用混合有多种不同基因的病毒感染小鼠成纤维细胞, 最终以细胞形态学特征、胚胎干细胞特定基因的表达以及畸胎瘤的形成等指标作为诱导性多能干细胞多能性的鉴定指标。实验中最终将 24 个候选基因减少到 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 这 4 个转录因子。在这篇文章中, 研究人员成功得到了具有三胚层特定组织的畸胎瘤, 说明分化细胞通过重编程重新获得了向三个胚层细胞分化的能力(多能性)。这一突破为干细胞研究领域, 乃至整个生命科学领域都带来了概念性的革新。iPSC 技术对于干细胞自我更新机制的研究、干细胞信号调控的研究以及很多疾病的发病机制和治疗研究都有很大意义, 在临床疾病治疗方面的应用价值巨大。它不但脱离了传统的核移植或者细胞融合等获取干细胞的方式, 避免了破坏胚胎的伦理学问题; 并且, 它由成体细胞重编程为胚胎干细胞的特性还避免了免疫排斥, 使得自体移植变得更加可行。

在此之后, Takahashi 等^[15]和 Yu 等^[16]也分别获得人成纤维细胞来源的 iPSC。目前, 科学家已经可以从神经祖细胞^[17]、皮肤细胞^[18]、精原细胞^[19]、头发角质细胞^[20]、胰岛 β 细胞^[21] 和淋巴细胞^[22] 等获得 iPSC。这些细胞分别代表 3 个胚层来源的分化细胞, 表明从不同组织来源的体细胞都能获得 iPSC。在临床疾病治疗方面, 已有多个研究小组直接利用患者的细胞诱导获得 iPSC, 包括肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS)^[23]、脊髓性肌萎缩症 (SMA)^[24]、帕金森病^[25] 等。这些患者来源的 iPSC 可望成为药物筛选、疾病模型建立和疾病治疗的有力工具。

2 iPSC 诱导技术进展

作为一项新生的技术, iPSC 技术具有独特的优势, 但也存在不少缺陷。优势在于 iPSC 诱导可以通过明确的操作, 如特定转录因子的表达、特定基因的敲除及靶点明确的化合物处理等, 探究重编程的机制。但 iPSC 诱导过程中使用了 Klf4 和 c-Myc 等原癌基因, 以及导入方式可能引起插入突变等, 存在不安全因素; 同时, iPSC 诱导效率也很低 (Yamanaka 等在 2006 年报道的 iPS 诱导效率仅有万分之几)。为了解决这些问题, 科学家做了很多诱导方法上的改进。

在减少转录因子的使用方面, 2010 年已有多个研究小组可以将最初的 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc

等 4 种因子减少到能单独运用 Oct4 一种因子即可获得能够产生嵌合体小鼠的 iPSC^[26-27]。在转录因子导入细胞的方式上, 最初使用的是逆转录病毒或是慢病毒^[28] 等整合载体, 后来科学家尝试使用非整合的方式进行基因导入, 包括使用腺病毒载体转染^[29] 或直接使用质粒反复进行瞬转^[30], 也有使用转座子作为插入方式^[31] 的, 运用细胞通透蛋白经过修饰的 RNA、小 RNA 等也是非整合诱导方式的主要途径。目前, 非病毒介导的人类 iPSC 已经获得^[32]。这些方法虽然一定程度上解决了安全性或低效率的问题, 但仍没有一种方法能高效安全地得到 iPSC。

3 小分子化合物在 iPSC 研究中的应用

从 iPSC 技术诞生起, 许多小分子化合物陆续出现在 iPSC 相关研究成果之中。这些小分子化合物不仅能够提高效率, 有些还可以替代四因子中一个或多个; 而且, 小分子化合物因为其靶点相对清晰、便于操作、作用可控, 并且能够特异性地调节某些蛋白质的功能, 在干细胞机制研究中也非常重要。

表 1 中列出了目前报到的能够促进重编程的小分子化合物。根据这些小分子的作用机制, 可以分为表观遗传调节剂、EMT-MET 调节剂、代谢调节剂、其他促进重编程的化合物以及维持自我更新的化合物等几大类。下面我们将分别加以阐述。

3.1 促进转录因子诱导的重编程

3.1.1 表观遗传调节剂

在重编程过程中, 原本在体细胞中处于沉默状态的多能性基因启动, 分化相关基因沉默, 这一过程由表观遗传修饰直接调控, 因此, 直接作用于表观遗传的小分子化合物对于重编程的影响很大。这些小分子主要作用于组蛋白去乙酰化酶、DNA 甲基转移酶、组蛋白甲基转移酶、去甲基化酶等靶点。

3.1.1.1 组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂

已报道的促进重编程的 HDAC 抑制剂包括 VPA、TSA、SAHA 和丁酸钠^[33-34]。VPA 可以将重编程的效率提高 50 倍 (三因子诱导) 或 100 倍 (四因子诱导), 还可以在无病毒的重组蛋白诱导重编程的过程中促进重编程。VPA 通过推动组蛋白乙酰化, 改变细胞整体的转录活性, 并且和其他的 HDAC 抑制剂一样可以使 MEF 细胞具有更为松散的染色体结构, 从而易于外源转录因子的结合。

3.1.1.2 DNA 甲基转移酶抑制剂

在分化细胞中, 内源的多能性基因 Oct4、

表1 促进重编程的小分子化合物

名称	性质	作用	参考文献
VPA(丙戊酸)	HDAC抑制剂	提高OSKM 诱导效率, 可与Oct4和Sox2诱导hiPS	[33]
TSA	HDAC抑制剂	提高OSKM 诱导效率	[34]
SAHA	HDAC抑制剂	提高OSKM 诱导效率	[34]
NaB(丁酸钠)	HDAC抑制剂	提高OSKM 诱导效率	[34]
5-AZA	DNMT抑制剂	提高OSKM 诱导效率	[35]
BIX-01294	G9a HMTase抑制剂	促进 NPC 和 MEF重编程	[36]
Parnate	LSD1抑制剂	可与Oct4 和Klf4诱导hiPS	[37]
LiCl	LSD1和 GSK3的抑制剂	提高OSKM 诱导效率, 可与Oct4组合诱导hiPS	[38]
Vitamin C	增强Tet活性, 促进DNA去甲基化	提高OSKM 诱导效率	[39-40]
Anisomycin	p38 MAPK激活剂	提高OSKM 诱导效率	[41]
A83-01	ALK4/5/7抑制剂	促进重编程, 与MEK和Rock 抑制剂组合促进人成纤维细胞重编程	[42-43]
616452 (RepSox)	ALK5抑制剂	促进重编程, 在重编程过程中替代Sox2	[44]
Apigenin	E-cadherin诱导剂	提高OSKM 诱导效率	[45]
luteolin	E-cadherin诱导剂	提高OSKM 诱导效率	[45]
Thiazovivin	ROCK抑制剂	促进人成纤维细胞重编程	[46]
PS48	PDK1/PI3K/Akt的激活剂	与Oct4组合诱导hiPS	[27]
2,4-dinitrophenol (DNP)	氧化呼吸链解偶联剂	与Oct4组合诱导hiPS	[27]
Fructose 6-phosphate	刺激糖酵解	与Oct4组合诱导hiPS	[27]
Nicotinic acid	刺激糖酵解	与Oct4组合诱导hiPS	[27]
Quercetin	激活HIF通路	与Oct4组合诱导hiPS	[27]
CD437	RAR激动剂	提高OSKM 诱导效率	[47]
AM580	RAR激动剂	提高OSKM 诱导效率	[47]
Rapamycin	mTOR的抑制剂	提高OSKM 诱导效率	[48]
PP242	mTOR的抑制剂	提高OSKM 诱导效率	[48]
LY294002	PI3K抑制剂	提高OSKM 诱导效率	[48]
PD0325901	MEK抑制剂	促进人成纤维细胞重编程, 维持干细胞自我更新	[43,49]
CHIR99021	GSK3抑制剂	提高Oct4 和Klf4 诱导效率, 维持干细胞自我更新	[49]
BIO (6-Bromindirubin -3'-oxime)	GSK3β抑制剂	在无滋养层细胞的条件下维持干细胞自我更新	[50]
Y-27632	ROCK抑制剂	提高小鼠和人的干细胞复苏存活率, 有助于维持自我更新	[51]
Sunitinib	RTK抑制剂	在无滋养层细胞的条件下维持小鼠干细胞自我更新, 提高Oct4诱导效率	[52]
Forskolin	腺苷酸环化酶激活剂	提高SKM诱导效率, 与其他化合物诱导 CiPS	[53]
DZNep	组蛋白甲基转移酶抑制剂	与其他化合物诱导 CiPS	[53]
TTNPB	维甲酸受体激动剂	提高CiPS诱导效率	[53]

Nanog 等因为启动子区域的甲基化而处于沉默状态, 因此, DNA 甲基转移酶抑制剂能够促进重编程, 帮助克服 DNA 甲基化这一障碍。Meissner 实验室使用 DNA 甲基转移酶抑制剂 AZA 处理重编程过程中的细胞, 细胞的 Oct4 基因启动子区域 DNA 甲基化去除, Oct4 基因重新激活^[35]。

3.1.1.3 组蛋白甲基转移酶、去甲基化酶抑制剂

G9a 组蛋白甲基转移酶抑制剂 BIX-02194 能够将 OK 两因子诱导的神经前体细胞重编程效率提高 8 倍^[36]。曾有报道, G9a 组蛋白甲基转移酶可以在分化时下调 Oct4, 还可以失活 Nanog、Dnmt31 等多能性基因^[54], 因此, G9a 可能是多能细胞中

DNA 甲基化和转录抑制的重要调节分子。BIX 通过抑制 G9a 推动重编程, 这也说明特定位点的组蛋白修饰 (如 BIX 所针对的 H3K9me2) 对重编程的过程有着重要的影响。

LSD-1 (lysine-specific demethylase) 抑制剂 Parnate 能够和其他化合物合用完成 OK 两因子诱导的人原始角质细胞重编程^[37]。本课题组研究发现, GSK3 (glycogen synthase kinase 3) 的抑制剂 LiCl 可以明显提高诱导效率, 并能与其他化合物完成 Oct4 一因子诱导; 在机制研究中发现, LiCl 也可以抑制 LSD-1^[38]。LSD-1 是 2004 年发现的赖氨酸特异组蛋白去甲基化酶, 能够特异地去甲基化组蛋白 H3K4me3^[55]。而 H3K4me3 正是胚胎干细胞中染色体活性的特异性标记分子, 因此, 抑制 LSD-1 也对重编程有推动作用。

3.1.1.4 其他表观遗传调节剂

具有抗氧化、抗衰老作用的 Vitamin C 对人和小鼠的 iPSC 诱导都有明显的促进作用, 这种作用是通过 H3K36 的去甲基化来实现对多能性基因的表达调控^[39]。同时, Vitamin C 可显著增强 DNA 羟化酶 Tet 氧化 5-甲基胞嘧啶的活性, 进而促进 DNA 去甲基化作用^[40]。本课题组研究还发现, 高渗条件可以激活 P38, 降低细胞整体的 DNA 甲基化水平, 促进重编程; 抑制蛋白质合成的化合物 Anisomycin 也可以激活 P38, 提高诱导效率^[41]。

3.1.2 间质-上皮转化调节剂

iPSC 诱导常用的细胞是成纤维细胞, 重编程过程中会发生间质-上皮转化 (mesenchymal-to-epithelial transition, MET)。MET 过程由外源的重编程转录因子引发, 整个过程包含了细胞从基因表达达到细胞形态和功能的重大改变, 包括表皮特异基因的上调、细胞形态的变化、细胞紧密连接的增加等。TGF β (transforming growth factor β) 信号通路是 MET 所必需的信号通路。TGF β 信号通路的抑制剂 A-83-01 可以推动 EMT, 促进并加快重编程^[42]; 另一个 TGF β 信号通路抑制剂 616452 (Repsox) 可以在重编程中替代 Sox2^[44]; apigenin 和 luteolin 可以在重编程早期通过上调上皮特异基因 E-cadherin 促进重编程^[45]; 另有研究发现, ROCK 抑制剂 Thiazovivin 可以通过提高 E-cadherin 稳定性加强细胞间相互作用, 与其他药物合用促进重编程^[46]。

3.1.3 代谢调节剂

已分化的细胞能量主要来源于线粒体内的氧化磷酸化, 而干细胞能量主要来源于糖酵解^[56]。因此,

在体细胞重编程过程中, 一定伴随着代谢活动的转变, 而推动这一变化的小分子就可能促进重编程。3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1(PDK1) 的小分子激活剂 PS48 通过激活 PI3K/Akt 信号通路, 提高糖酵解相关基因的表达, 可与 Oct4 完成人 iPSC 的诱导^[27]; 线粒体解偶联化合物 2,4-dinitro-phenol (DNP) 也可以明显提高诱导效率^[27]; 刺激糖酵解的果糖-6-磷酸 (fructose 6-phosphate)、烟酸 (nicotinic acid) 等也有相似作用^[27]; 而激活 HIF 通路的 Quercetin 也可以促进糖酵解, 进而推动重编程^[27]。

3.1.4 其他促进重编程的小分子

重编程过程是一个复杂的变化过程, 多条信号通路参与其中, 能够调控这些通路的小分子也陆续被报道能够促进重编程, 如 RAR 激动剂 CD437 和 AM580^[47]、mTOR 抑制剂雷帕霉素 (Rapamycin) 和 PP242^[48]、PI3K 抑制剂 LY294002^[48] 等。这些化合物的发现, 帮助研究人员明确了很多与重编程相关的生命活动, 极大地推动了机制研究。

3.1.5 维持自我更新的化合物

iPSC 诱导过程可以分为两个步骤, 首先是用各种方法推动体细胞向干细胞转变, 然后就是维持获得的 iPSC 的自我更新能力, 因此, 有利于干细胞维持自我更新能力的化合物往往也对重编程有利。最初, 胚胎干细胞在体外培养时, 需要养在滋养层细胞上, 培养基中要包含血清才能维持 ES 的自我更新能力^[3,57]。后来的研究发现, 滋养层细胞通过分泌 LIF (leukemia inhibitor factor) 来维持干细胞的特性^[58], 而血清中的 BMP4 (bone morphogenetic protein 4) 也有维持自我更新的能力^[59]。维持自我更新包含保持无限增值和抑制分化两方面。LIF 激活 STAT3 信号通路刺激干细胞增殖, 而 BMP4 通过 SMAD 通路抑制分化来发挥作用。此外, bFGF^[60-61]、TGF β /activin A^[62-63]、Wnt^[3,49] 等与增殖和分化有关的通路也被报道和自我更新有关, 而能调控这些重要通路的小分子在维持自我更新能力方面的作用也多有报道, 如 MEK 信号抑制剂 PD0325901 和 GSK3 信号通路抑制剂 CHIR99021 联用可以抑制分化^[49], 被广泛运用到干细胞培养和 iPSC 诱导中; GSK3 β 的抑制剂 BIO 可以在无滋养层细胞的条件下维持干细胞自我更新^[50]; ROCK 抑制剂 Y-27632 可以抑制干细胞凋亡, 维持自我更新^[51]; 本课题组发现抗肿瘤药物舒尼替尼 (Sunitinib) 通过抑制 VEGF 受体可有效防止胚胎干细胞的自发分化, 并在无 LIF 和滋养层细胞的条件下促进干细

胞自我更新, 舒尼替尼也可以促进 Oct4 一因子诱导的体细胞重编程^[52]。

3.2 全化合物组合诱导iPSC

至 2010 年, 外源病毒表达 Oct4 一因子并加入化合物组合就可以在小鼠和人的系统中实现重编程^[27,43]。邓宏魁实验室用 VPA、CHIR99021、6616452、反苯环丙胺 (Tranlycypromine) 与 Oct4 一因子得到了小鼠的 iPSC^[27]; 丁胜实验室用 NaB、PS48、A-83-01 和 PD0325901 等 4 个化合物与 Oct4 一因子获得了人的 iPSC^[43]。Oct4 一因子与化合物组合成功诱导 iPSC, 给了科学家研究全化合物诱导 iPSC 的信心, 研究人员开始致力于研究全化合物诱导重编程。

2013 年 7 月, 邓宏魁实验室发现, 仅使用 7 个小分子化合物组合就可以完成小鼠体细胞重编程, 这样得到的 iPSC 被称为化合物诱导多能干细胞, 简称为 CiPSC^[53]; 在进一步研究中, 化合物最少可以减至 4 个, 虽然诱导效率会明显下降, 但是仍能得到具有多能性的干细胞。邓宏魁实验室使用的 7 个小分子化合物是 VPA、CHIR99021、6616452、Tranlycypromine、Forskolin、DZNep 和 TTNPB。VPA、CHIR99021、6616452 和 Tranlycypromine 与 Oct4 一因子组合可以实现重编程^[27], 而 Forskolin 与 Sox2、Klf4 和 c-Myc 组合也可以完成重编程, 这 5 个化合物再与组蛋白甲基化抑制剂 DZNep 和维甲酸受体激动剂 TTNPB 组合, 最终完成了 CiPSC 的诱导。CiPSC 由于没有外源基因的干预, 只是靠作用靶点相对明确、作用效果可控的化合物来实现, 理论上可以解决外源基因导致的 iPSC 的安全隐患, 对于 iPSC 真正用于临床意义重大。

4 转分化

重编程是分化细胞重回到全能细胞的细胞命运转化, 是一个“逆转”过程。除此之外, 科学家通过导入特定转录因子、化合物处理等方法, 将分化的成体细胞转变为另一种细胞, 这一过程被定义为转分化 (trans-differentiation)。转分化从技术方面分为直接转分化 (direct trans-differentiation) 和间接谱系转化 (indirect lineage conversion, ILC)。近年来, 随着重编程的发展, 转分化研究也取得了长足进展。类似减因子和全化合物诱导 iPSC, 科学家也在不断利用转录因子、转录因子加小分子, 甚至全化合物诱导细胞转分化获得各种有功能的细胞。

4.1 直接转分化

顾名思义, 直接转分化就是在体外或体内直接将一种已分化细胞变成另外一种。科学家已经完成了多种细胞的转分化, 如 Ieda 等^[64]将小鼠心脏及尾尖的成纤维细胞直接转分化为诱导性心肌细胞 (induced cardiomyocytes, iCMs); Huang 等^[65]将小鼠胚胎成纤维细胞及小鼠尾尖成纤维细胞转化为具有功能的诱导性肝样细胞 (induced hepatocyte-like cell, iHep); Cheng 等^[66]利用小分子化合物组合将小鼠胚胎成纤维细胞转分化为神经干细胞 (NPC); 2014 年, 科学家还成功将人的成纤维细胞转变为功能性的黑色素细胞, 为治愈白癜风等皮肤病、筛查黑色素细胞瘤等提供了帮助^[67]。

直接转分化最理想的情况就是将细胞命运原地转变, 如心肌、大脑、肝脏等重要器官发生损伤时, 将成纤维细胞等原地转分化为心肌细胞、神经干细胞等, 从而治愈损伤。2008 年, 科学家成功用转录因子在小鼠胰腺中将外分泌细胞转分化为可产生胰岛素的内分泌细胞^[68], 在小鼠上初步实现了这一理想。相信在不远的将来, 不依赖转录因子的、更安全的途径, 如小分子诱导体内转分化, 将为临床治疗做出巨大贡献。

4.2 间接谱系转化

2012 年, Kurian 等^[69]将 Sox2、Oct4、Klf4、MYCL1、LIN28 及 shP53 等 6 因子导入人皮肤成纤维细胞, 在 iPSC 培养体系中培养, 在使细胞达到一种中间态后转入中胚层诱导培养基, 获得了具有分化为内皮细胞和血管平滑肌细胞的能力的 CD34⁺ 细胞。这种先部分重编程, 然后再分化为特定细胞的转化技术称作间接谱系转化 (indirect lineage conversion, ILC)。这种技术能够快速地完成转化, 并且从中间态分化时, 只要给予合适的分化诱导条件, 就可方便地获得各种想要的细胞, 因此具有广阔的应用前景。

5 小结与展望

综上, 应用体细胞重编程技术可将已分化的细胞的平衡状态打破, 使之处在一种活化状态, 从而推动细胞内一系列生物过程变化, 使之重新获得自我更新能力和多向分化潜能。体细胞重编程技术打破“终末细胞”这一概念, 实现了生命过程的逆转, 具有重大的科学意义和应用价值。2012 年诺贝尔生理学或医学奖颁给了体细胞重编程领域的两位科学家: 英国剑桥大学格登研究所的 John Bertrand

Gurdon 和日本京都大学再生医科研究所的 Shinya Yamanaka, 这不仅是对两位科学家的表彰, 也是对重编程研究对生命科学的贡献的肯定。目前, 关于重编程和转分化的研究方兴未艾, 并且不断取得新的进展。2014 年 9 月, 日本开始了世界首例应用 iPSC 的临床研究。科学家将一名老年性黄斑变性患者的皮肤细胞诱导成 iPSC, 然后将这些细胞诱导为视网膜色素上皮细胞, 移植到受损的视网膜处。术后将对患者观察 1~3 年, 以确定疗效和安全性。相信在全世界科学家的共同努力下, 这些新技术将在不久的将来真正广泛用于临床治疗, 为人类的健康做出巨大贡献。

[参 考 文 献]

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7
- [2] Rossant J. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells*, 2001, 19(6): 477-82
- [3] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-6
- [4] 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
- [5] Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol*, 1962, 4: 256-73
- [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. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 1-22
- [8] Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(4): 319-27
- [9] Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development*, 2005, 132(2): 227-33
- [10] Cowan CA, Atienza J, Melton DA, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005, 309(5739): 1369-73
- [11] Yu J, Vodyanik MA, He P, et al. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 168-76
- [12] Matsumura H, Tada M, Otsuji T, et al. Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. *Nat Methods*, 2007, 4(1): 23-5
- [13] Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, et al. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(12): 5719-35
- [14] 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
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Eminli S, Utikal J, Arnold K, et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*, 2008, 26(10): 2467-74
- [18] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318(5858): 1920-3
- [19] Kossack N, Meneses J, Shefi S, et al. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells*, 2009, 27(1): 138-49
- [20] Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1276-84
- [21] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic β cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 2008, 18(12): 890-4
- [22] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133(2): 250-64
- [23] 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
- [24] Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, 457(7227): 277-80
- [25] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009, 136(5): 964-77
- [26] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, 136(3): 411-9
- [27] Zhu S, Li W, Zhou H, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6): 651-5
- [28] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, 322(5903): 945-9
- [29] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, 322(5903): 949-53
- [30] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-70
- [31] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, 324(5928): 797-801

- [32] Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(5): 618-30
- [33] 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(7): 795-7
- [34] Mali P, Chou BK, Yen J, et al. Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells*, 2010, 28(4): 713-20
- [35] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454(7200): 49-55
- [36] Shi Y, Do JT, Despoints C, et al. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6): 525-8
- [37] Li W, Zhou H, Abujarour R, et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells*, 2009, 27(12): 2992-3000
- [38] Wang Q, Xu X, Li J, et al. Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Res*, 2011, 21(10): 1424-35
- [39] Esteban MA, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1): 71-9
- [40] Yin R, Mao SQ, Zhao B, et al. Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(28): 10396-403
- [41] Xu X, Wang Q, Long Y, et al. Stress-mediated p38 activation promotes somatic cell reprogramming. *Cell Res*, 2013, 23(1): 131-41
- [42] Li R, Liang J, Ni S, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 51-63
- [43] Yuan X, Wan H, Zhao X, et al. Brief report: combined chemical treatment enables Oct4-induced reprogramming from mouse embryonic fibroblasts. *Stem Cells*, 2011, 29(3): 549-53
- [44] Ichida JK, Blanchard J, Lam K, et al. A small-molecule inhibitor of Tgf- β signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing *Nanog*. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(5): 491-503
- [45] Chen T, Yuan D, Wei B, et al. E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells*, 2010, 28(8): 1315-25
- [46] Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods*, 2009, 6(11): 805-8
- [47] Wang W, Yang J, Liu H, et al. Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(45): 18283-8
- [48] Chen T, Shen L, Yu J, et al. Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *Aging Cell*, 2011, 10(5): 908-11
- [49] Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, 453(7194): 519-23
- [50] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 2004, 10(1): 55-63
- [51] Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(6): 681-6
- [52] Chen G, Xu X, Zhang L, et al. Blocking autocrine VEGF signaling by sunitinib, an anti-cancer drug, promotes embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Cell Res*, 2014, 24(9): 1121-36
- [53] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 2013, 341(6146): 651-4
- [54] Feldman N, Gerson A, Fang J, et al. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(2): 188-94
- [55] Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 2004, 119(7): 941-53
- [56] Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20914
- [57] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(12): 7634-8
- [58] Williams RL, Hilton DJ, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 1988, 336(6200): 684-7
- [59] Ying QL, Nichols J, Chambers I, et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 2003, 115(3): 281-92
- [60] Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(2): 185-7
- [61] Xu RH, Peck RM, Li DS, et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods*, 2005, 2(3): 185-90
- [62] Vallier L, Reynolds D, Pedersen RA. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol*, 2004, 275(2): 403-21
- [63] Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells*, 2005, 23(4): 489-95
- [64] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct

- reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010, 142(3): 375-86
- [65] Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 2011, 475(7356): 386-9
- [66] Cheng L, Hu W, Qiu B, et al. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res*, 2014, 24(6): 665-79
- [67] Yang R, Zheng Y, Li L, et al. Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. *Nat Commun*, 2014, 5: 5807
- [68] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 2008, 455(7213): 627-32
- [69] Kurian L, Sancho-Martinez I, Nivet E, et al. Conversion of human fibroblasts to angioblast-like progenitor cells. *Nat Methods*, 2013, 10(1): 77-83