

DOI: 10.13376/j.cbls/2016127

文章编号: 1004-0374(2016)08-0941-08



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70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“全国优秀青年女科学家”奖。现任 *the Journal of Biological Chemistry* 及《中国药理学报》编委。

全化学诱导体细胞重编程和转分化

付艳宾^{1,2}, 龙媛², 谢欣^{1,2*}

(1 同济大学生命科学与技术学院, 上海市信号转导与疾病研究重点实验室, 上海 200092;

2 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: 终末分化细胞可以通过重编程和转分化转变为其他类型的细胞, 对再生医学领域的研究有重要意义。化学小分子由于结构多样性, 及作用剂量、时间的可控性, 其在重编程和转分化领域的应用前景广阔。我国科学家在该方向的研究中也取得了许多引人瞩目的成就。对体细胞重编程和转分化的方式、小分子化合物在体细胞重编程研究领域的应用以及全化学诱导体细胞重编程和转分化研究的最新进展, 尤其是我国科学家在本领域的进展进行综述。

关键词: 小分子化合物; 体细胞重编程; 诱导性多能干细胞; 转分化

中图分类号: Q813 **文献标志码:** A

Recent progress in chemical-induced somatic cell reprogramming and trans-differentiation

FU Yan-Bin^{1,2}, LONG Yuan², XIE Xin^{1,2*}

(1 Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, Laboratory of Receptor-based Bio-medicine, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2 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 transformed back into pluripotent state or into other types of cells by reprogramming and trans-differentiation, and may provide functional cells for regenerative medicine. Due to their structural versatility and being easy of application in time- and concentration-dependent ways, small molecule compounds are highly useful in inducing somatic cell reprogramming or trans-differentiation. In this review, we

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性先导科技专项(XDA01040301); 干细胞研究国家重大科学研究计划(2015CB964503); 国家自然科学基金项目(81425024, 31371511)

*通信作者: E-mail: xxie@simm.ac.cn

summarize the recent progresses in full chemical-mediated reprogramming and trans-differentiation.

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

从受精卵成长为成熟生命体的过程被称为发育, 也称编程。在发育的各个阶段, 动物体内都存在一类具有自我更新和分化潜能的特殊细胞类群, 即干细胞 (stem cells)。干细胞的增殖能力和分化潜能是细胞数目和种类增加的前提, 也是发育的基础。

自然状态下, 发育是一个单向的生命旅程。在这一过程中, 分化潜能逐渐降低, 直至丧失。受精卵和早期的分裂球能够形成完整的生物体和胚外组织, 这种特性被称为全能性 (totipotency)。进入囊胚期后, 胚胎发育成两部分结构, 一部分是滋养外胚层细胞 (trophoblast), 位于囊胚的外层, 它们将形成胎盘等胚胎外组织, 供应胚胎发育所必需的营养物质和氧气^[1-2]; 另一部分是内细胞团 (inner cell mass, ICM), 大约有 20 个细胞, 聚集在囊胚内的一端。内细胞团的细胞能够形成胚胎外组织以外的所有的体细胞以及生殖细胞, 即能够形成完整的生物体, 这种特性为多能性 (pluripotency)。1981 年, 科学家从小鼠的囊胚中成功分离出内细胞团, 并在体外建立了小鼠的胚胎干细胞系 (mouse embryonic stem cells, mESCs 或 ES)^[3]。胚胎干细胞具有内细胞团的自我更新和多能性两大特征^[3], 且在适宜的培养条件下, 多能性能稳定地保持下去。组织干细胞 (tissue stem cells) 或成体干细胞 (adult stem cells) 的增殖和分化能力有限, 只具有有限的多能性 (multipotency) 或单能性 (monopotency), 只能分化成几种或一种成体细胞。而终末分化的成体细胞命运已经被决定, 不再具有成为其他类型细胞的能力。

人们曾经认为在已分化的细胞中, 细胞命运的单向性是因为发育过程中细胞基因组水平发生了变化, 因此这个过程是不可逆的。但是 1962 年, Gurdon^[4] 将非洲爪蟾蝌蚪的上皮细胞的细胞核, 注入经过紫外照射破坏细胞核的卵细胞中, 成功克隆出了爪蟾, 这一成功改变了人们的认知。核移植 (nuclear transfer) 实验的成功揭示了已分化的体细胞依然具有发育为一个完整生物个体的全套遗传物质, 只要条件适宜, 细胞命运也可能改变。1997 年, 克隆羊的诞生证明了哺乳动物体细胞也有类似的潜能^[5]。

随着生命科学的发展, 人们陆续发现了多种改变细胞命运的方法, 这些方法大致可以分为两大类:

(1) 将终末分化的成体细胞重新逆转为具有多能性, 甚至全能性的细胞, 这种方法被称为体细胞重编程 (somatic cell reprogramming) 或简称为重编程 (reprogramming); (2) 将一种类型的终末分化细胞转变成其他类型的功能细胞或是祖细胞, 而不经过多能性细胞阶段, 这种方法被称为转分化 (trans-differentiation), 也称谱系重编程 (lineage reprogramming)。

1 重编程

除了上文提到的核移植, 科学家还发现了细胞融合 (cell fusion) 和多能细胞提取物 (cell extracts) 共培养等重编程方法。细胞融合是指将成体细胞用化学或生物学方法, 与胚胎肿瘤细胞 (embryonal carcinoma cells, EC cells)^[6]、胚胎干细胞或胚胎生殖干细胞 (embryonic germ cells, EG cells) 融合^[7], 而得到具有干细胞特性的细胞的方法。人的体细胞与胚胎干细胞融合后也能实现重编程^[8-9]; 而多能细胞提取物共培养是指将干细胞的提取物与成体细胞共培养, 也能够实现某些体细胞的重编程^[10]。以上三种方法虽然都完成了体细胞重编程, 但重编程过程都需要胚胎干细胞、胚胎来源的其他细胞或原始生殖细胞, 因此都存在伦理问题, 不能真正用于人类的再生医学。

2006 年, 日本 Yamanaka 实验室报道了重编程的重大进展: 他们以逆转录病毒为载体, 在小鼠的成纤维细胞中导入 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 四种转录因子, 获得了具有大部分干细胞特性的细胞, 因其是由成纤维细胞经过诱导转变而成的干细胞, 所以将其命名为诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, 简称 iPS)^[11]。

iPS 技术的诞生引发了生命科学界的轰动。iPS 的获得不需要胚胎干细胞, 避免了核移植、细胞融合等技术的伦理问题; 同时, iPS 细胞来源于自身的成体细胞, 临床应用时的免疫排斥问题也迎刃而解了。

iPS 技术有着区别于传统重编程手段的巨大优势, 但也存在不少缺陷。如 iPS 诱导过程中使用了 Klf4 和 c-Myc 两个原癌基因, 用逆转录病毒为载体导入基因可能引起插入突变, 同时, iPS 诱导效率也有待提高。随着研究的不断进展, 尽管科学家已

经将转录因子减少到 Oct4 一因子即能成功诱导出 iPS^[12-13], 转录因子导入细胞的方式也从早期以逆转录、慢病毒^[14]等整合性病毒为载体, 陆续发展为腺病毒载体导入^[15]、质粒反复瞬转^[16]、转座子^[17]、修饰的 RNA^[18]等非整合的导入方式, 但是仍不能高效、安全地获得 iPS。

2 小分子化合物在iPS研究中的应用

随着 iPS 技术的发展, 多种小分子化合物在 iPS 诱导方面的作用陆续被报道。有些小分子化合物能够提高 iPS 诱导效率; 有些除了提高效率还可以替代四因子中一个或多个因子, 能一定程度上解决 iPS 的安全性和效率问题。同时, 小分子化合物因其靶点相对清晰、作用相对可控的独特优势, 对体细胞重编程机制的研究也起了很大的推动作用。

2.1 促进iPS诱导的小分子化合物

科学家最早发现的能促进 iPS 诱导的化合物是丙戊酸 (valproic acid, VPA)^[19], 一种作用于组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 的抑制剂。VPA 通过推动组蛋白乙酰化, 改变细胞整体的转录活性, 使细胞具有更为松散的染色体结构, 易于外源转录因子结合, 从而将重编程的效率分别提高 50 倍 (三因子诱导) 或 100 倍 (四因子诱导)。此后, 数十种小分子被报道能促进 iPS 诱导, 这些小分子作用于表观遗传、重编程相关信号通路、代谢调节及维持自我更新等多个方面, 在重编程研究中发挥了重要的作用^[20]。

我国科学家在 iPS 领域的研究一直处于国际先进水平, 取得了很多令人瞩目的成果。我国科学家率先建立了恒河猴^[21]、大鼠^[22]和猪^[23]的 iPS 细胞系, 并利用四倍体囊胚互补技术得到了完全由 iPS 细胞发育而来的小鼠^[24-25]。在小分子化合物诱导重编程的研究方面, 我国多个实验室也取得了丰硕的成果。

早在 2010 年, 裴端卿研究组就发现在进行重编程实验时, 有些细胞的形态和增殖能力与多能性干细胞类似, 但多能性基因的表达与表观遗传特性却与干细胞不同, 这些细胞被称为前 iPS (pre-iPSC) 细胞。维生素能促进 pre-iPSC 转化为真正的 iPSC, 大大提高了重编程效率^[26]。进一步研究证实, 维生素 C 能作用于组蛋白去甲基化酶 Jhdmla/1b, 通过影响细胞周期、抑制细胞衰老、促进 H3K36 的去甲基化等多方面的作用, 实现对多能性基因的表达调控, 促进重编程进程^[27]。裴端卿研究组还发现, iPSC 诱导常用的成纤维细胞在重编程过程中会发生间质-上皮转化 (mesenchymal-to-epithelial transition,

MET), 与正常发育中常见的上皮细胞向间充质细胞转换 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 过程刚好相反。MET 过程由外源的重编程转录因子引发, 包含了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变化过程。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^[28]。

裴钢研究组发现, 天然产物芹菜素 (apigenin) 和木犀草素 (luteolin) 可以在重编程早期通过上调上皮特异基因 E-cadherin, 增强细胞间的紧密连接, 促进间质-上皮转化, 有利于 iPS 诱导^[29]。裴钢研究组还发现, mTOR 抑制剂雷帕霉素 (Rapamycin) 和 PP242、PI3K 抑制剂 LY294002 等化合物可延长果蝇的寿命, 同时也可以促进 iPS 的诱导。研究人员认为, 自然状态下, 衰老是生命进程的必经过程, 而抵抗、延缓这一过程的某些化合物, 也有助于逆转细胞命运, 有利于重编程^[30]。

邓宏魁实验室在早期使用 Oct4 一个转录因子, 同时添加丙戊酸 (VPA)、GSK-3 β 信号通路的抑制剂 CHIR99021、TGF- β 信号通路抑制剂 616452 (Repsox) 和 LSD-1 抑制剂 Parnate 4 种小分子诱导出了小鼠 iPS 细胞^[31], 避免了使用原癌基因 Klf4 和 c-Myc, 提高了安全性, 也为研究全化合物诱导重编程打下了基础。

本实验室也发现了多个有利于重编程的小分子。经典的精神疾病治疗药物 LiCl 能够提高 iPS 诱导效率, 并在小鼠和人的系统中通过和其他化合物的组合完成了 Oct4 单因子诱导的体细胞重编程。作为一个 GSK3 (glycogen synthase kinase 3) 的抑制剂, LiCl 除了抑制 GSK-3 β , 还能增强 Nanog 的表达水平和转录活性, 抑制组蛋白去甲基化酶 LSD-1, 从多方面促进重编程^[32]。本实验室还发现一个从未见报道的小分子 CYT296 能显著提高四因子, 两因子 (OK) 或一因子 (O) 体系的 iPS 诱导效率。其具体作用靶点和机制尚待研究, 但本实验室发现 CYT296 能加速重编程过程中 HP1 α 蛋白的下调, 抑制异染色质的形成, 使体细胞染色质处于更开放的状态, 有利于重编程的进程^[33]。此外还发现, 高浓度氯化钠等引起的高渗条件能够提高四因子介导的小鼠体细胞重编程, 也可以提高两因子 (OK、OS) 或一因子 (O) 体系中的诱导效率。高渗作为一种环境压力, 可以激活 p38 通路, 引发细胞整体的 DNA 甲基化水平降低, 从而使重编程变得更为容

易。抑制蛋白质合成的化合物 Anisomycin 也可以激活 P38, 同样可以提高诱导效率^[34]。有意思的是, 研究还发现抗肿瘤药舒尼替尼 (Sunitinib) 可以通过抑制 VEGF 受体, 防止干细胞自发分化, 维持自我更新, 同时能显著提高 iPS 诱导效率。进一步研究表明, 7 种 VEGFR 抑制剂 Axitinib、TKi258、Eisai、BIBF1120、Vandetanib、Tivozanib、Semaxinib 都与 Sunitinib 有类似的作用^[35], 这也提示人们要进一步研究该类抗肿瘤药物是否会在抑制普通肿瘤细胞的同时促进肿瘤干细胞的生存。

2.2 全化合物诱导 iPS

截至 2010 年, 在与化合物组合的条件下, 科学家已经可以将诱导 iPS 的转录因子减少为 Oct4 一因子, 这使得全化合物诱导重编程的梦想不再遥不可及。

2013 年 7 月, 邓宏魁实验室使用 7 个小分子化合物 VPA、CHIR99021、616452 (Repsox)、Tranylcypromine (Parnate)、Forskolin、DZNep 和 TTNPB 组合, 完成了小鼠体细胞重编程, 这种由全化合物诱导得到的 iPS, 被称为化合物诱导性多能干细胞 (chemical induced pluripotent stem cell), 简称 CiPS。VPA、CHIR99021、616452 和 Tranylcypromine 与 Oct4 一因子组合可以实现重编程^[31], 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 CiPS 的诱导。进一步的研究表明, 仅用其中的 4 种小分子 CHIR99021、616452 (Repsox)、Forskolin 和 DZNep 就能完成体细胞重编程, 其中 CHIR99021、616452 (Repsox) 和 Forskolin 能够激活 Sall4、Sox2 的表达, 而 DZNep 能激活 Oct4 的表达^[36]。CiPS 技术只使用小分子化合物来完成重编程, 没有引入任何外源基因, 因此解决了转录因子诱导 iPS 的安全问题, 是 iPS 走向临床应用的重大突破。

本实验室在 2015 年报道了常用的生物学试剂 BrdU 对重编程的促进作用。BrdU 不仅提高四因子、三因子 (OSK) 或两因子 (OK) 体系的 iPS 诱导效率, 还能代替最重要的因子 Oct4, 与其他转录因子完成 iPS 诱导。进一步研究显示, BrdU 可以与 3~7 个小分子化合物组合, 实现全化学诱导 iPS, 其中化合物最少的组合为: BrdU、CHIR99021、Repsox 和 Forskolin。这些化合物诱导产生的 CiPS 细胞具有胚胎干细胞的特性, 在体内外具有自我更新及分化能力, 并能成功产生嵌合小鼠。基因突变实验证实

在重编程使用的浓度下, BrdU 并不会导致基因突变及基因组的不稳定^[37]。BrdU 促进体细胞重编程可能是通过降低细胞整体 DNA 甲基化水平来实现的。由于 BrdU 已经用于人类肿瘤的辅助诊断, 本实验室的研究为安全、高效地获得 iPS 提供了新的途径, 为研究全化合物诱导人类 iPS 提供了重要的候选化合物和组合, 有利于 iPS 的临床应用。

邓宏魁实验室近期发现, 在化学重编程过程中存在一个中间状态, 这一中间状态的细胞表达 Sall4、Gata4、Gata6 和 Sox17 等转录因子, 在细胞的基因表达谱和体内发育能力上类似胚外内胚层 (extraembryonic endoderm, XEN) 细胞。化合物诱导重编程可以分为体细胞至 XEN 细胞和 XEN 细胞至 CiPS 细胞两个变化过程, 通过分步精确操控这两个过程, 能大幅提高重编程的效率。在第一阶段, 使用 VPA、CHIR99021、616452、Tranylcypromine、Forskolin、维甲酸受体激动剂 AM580 和 DOT1L 抑制剂 EPZ004777 诱导体细胞转变为至 XEN 细胞; 第二阶段使用 VPA、CHIR99021、616452、Tranylcypromine、Forskolin、DZNep、5-aza-dC 和 DOT1L 抑制剂 SGC0946 诱导 XEN 细胞至 CiPS 细胞转变, 最终用添加了 PD0325901 和 CHIR99021 的培养条件维持 CiPS 细胞的多能性。这一发现表明, 化合物诱导重编程在分子路径上不同于基因诱导的重编程, 精确利用化合物诱导重编程进程中的关键步骤, 就可能找到高效完成重编程的新方法。

3 转分化

近年来, 体细胞转分化的研究发展迅猛, 研究领域不断拓展。科学家们通过导入特定的转录因子或 miRNA 的方式已实现了多种细胞的转分化, 如心肌细胞^[38-40]、肝细胞^[41-43]、神经干细胞和神经元^[44-46]、星形胶质细胞^[47]、内皮细胞^[48]、胰岛 β 细胞^[49]、造血干细胞^[50] 和巨噬细胞^[51] 等 (表 1)。

转分化包括直接转分化 (direct trans-differentiation) 和间接谱系转化 (indirect lineage reprogramming, ILC)。直接转分化, 就是直接将体细胞转化成其他类型的功能细胞或祖细胞, 一般需要过表达相应谱系的特异性转录因子。例如, 惠利健研究组通过导入一些肝细胞特异性转录因子将小鼠和人的成纤维细胞转分化为成熟的诱导性肝细胞样细胞 (induced hepatocyte-like cells, iHep)^[41-42]; Ieda 等^[38] 通过导入心肌细胞谱系特异转录因子将小鼠心脏和皮肤成纤维细胞转分化为诱导性心肌细胞; 周琪研究组通过导入包括

表1 通过转录因子和miRNA诱导的体细胞转分化

起始细胞	诱导因子	目的细胞	参考文献
小鼠成纤维细胞	Gata4、Mef2c、Tbx5;	心肌细胞	[38]
小鼠成纤维细胞	Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc	心肌细胞	[39]
人成纤维细胞	GATA4、HAND2、MYOCD、TBX5、miR-1、miR-133	心肌细胞	[40]
小鼠成纤维细胞	Gata4、Hnf1 α 、Foxa3、P19ARF敲减;	肝脏干细胞和肝细胞	[41]
小鼠成纤维细胞	Oct4、Sox2、Klf4	肝脏干细胞和肝细胞	[43]
人成纤维细胞	HNF1A、HNF4A、FOXA3、SV40大T抗原	肝脏干细胞和肝细胞	[42]
小鼠支持细胞	Ascl1、Ngn2、Hes1、Id1、Pax6、Brn2、Sox2、c-Myc、Klf4	神经干细胞和神经元	[44]
小鼠成纤维细胞	OCT4、SOX2、KLF4、c-Myc	神经干细胞和神经元	[45]
人尿上皮样细胞	OCT4、SOX2、KLF4、SV40LT、miR302-367	神经干细胞和神经元	[46]
小鼠成纤维细胞	ERG、GATA2、LMO2、RUNX1c、SCL、p53 ^{-/-}	造血干细胞	[50]
小鼠B细胞	CEBP α	巨噬细胞	[51]
小鼠成纤维细胞	Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc	胰岛 β 细胞	[49]
小鼠成纤维细胞	Nfia、Nfib、Sox9	星形胶质细胞	[47]
小鼠成纤维细胞	Foxo1、Er71、Klf2、Tal1、Lmo2	内皮细胞	[48]

神经外胚层谱系在内的相关转录因子组合将支持细胞转变为神经干细胞 (induced neural stem/progenitor cells iNSCs), 再分化为胶质细胞和神经元^[44]。

间接谱系转化是使体细胞退回到更早的状态, 达到可塑的中间过渡态, 在适宜条件下转化成特定谱系的功能细胞或祖细胞, 也被称为细胞激活 - 信号指导 (cell-activation and signaling-directed, CASD) 策略的转分化。这种转分化策略需要用重编程因子或化合物短暂处理体细胞使其达到某种过渡状态 (cell activation, CA), 然后通过可溶的谱系特异性信号 (signaling-directed, SD) 将其重编程为不同类型的细胞, 在整个过程并没有建立多能状态。丁胜研究组通过这种方式用小鼠成纤维细胞成功诱导出了神经干细胞^[45]、胰腺 β 细胞^[49]、心脏前体细胞和心肌细胞^[39], 将人类成纤维细胞诱导成内皮细胞^[52]、限定性内胚层祖细胞和肝细胞^[43]; 而裴端卿研究组也通过重编程因子将人的尿液上皮样细胞诱导成神经干细胞^[46]; Kurian 等^[53]也以非整合的方式在人类成纤维细胞中短暂表达重编程因子 Oct4、Sox2、Klf4, 以及 MYCL1、LIN28、shP53 后, 将其转变为中胚层祖细胞, 再向内皮细胞和血管平滑肌细胞分化。

4 全化合物诱导细胞转分化

近年来, 一些小分子化合物也被报道可以提高细胞转分化的诱导效率, 或是替代外源因子, 或是直接实现细胞的转分化。目前已报道的全化合物诱导转分化的细胞有神经干细胞、神经元、内皮细胞和心肌细胞。

4.1 成纤维细胞向神经方向转分化

2014年3月, 裴钢研究组首先报道了他们在低氧条件下采用 VPA、CHIR99021 和 Repsox 三种小分子化合物的 VCR 化学鸡尾酒组合, 成功将小鼠和人的成纤维细胞转变为神经祖细胞 (chemical-induced NPCs, ciNPCs)^[54]。他们通过 VCR 组合抑制组蛋白去乙酰化酶 (HDACs)、GSK-3 β 信号通路以及 TGF- β 信号通路, 使分化的体细胞退回到一个中间状态, 然后再以利于神经干细胞生长的培养条件诱导成为 ciNPCs。这些 ciNPCs 具有良好的增殖和自我更新能力, 在分化培养基中可以分化为星形胶质细胞、谷氨酸能神经元和氨基丁酸能神经元。

2015年8月, 裴钢研究组又报道了通过 VCRFSGY 小分子化合物组合将正常人和阿尔兹海默症患者的成纤维细胞直接诱导为成熟的功能性神经元 (human chemical induced neurons, hciNs)^[55]。他们在原先 VCR 的诱导基础上筛选了一些有利于神经祖细胞向神经元分化的化合物, 最终得到这样的七个小分子组合: VPA、CHIR99021、Repsox、Forskolin、SP600125、GO6983 和 Y-27632。他们发现, 使用 VCRFSGY 组合可以让体细胞更早地出现形态变化, 并且抑制成纤维细胞特异性基因的表达, 促进神经元特异性基因的表达, 能够将成纤维细胞直接诱导为成熟的神经元。那些来自阿尔兹海默症患者的 hciNs 表现出淀粉样蛋白分泌异常等与疾病相关的病理特征, 表明化合物诱导转分化策略是获得患者特异性神经元细胞的可行性方法, 该方法可用于构建神经系统疾病模型, 然后为筛选治疗

性药物提供平台。邓宏魁研究组同期报道了使用 ISX9、Forskolin、CHIR99021、I-BET151 四种化合物组合将小鼠成纤维细胞直接转分化为神经元细胞^[56]。其中 ISX9 是一种异恶唑类化合物，能够激活多种神经元特异性基因，包括 NeuroD1 和 Ngn2 等关键的神经营运决定基因的表达，而 I-BET151 可抑制成纤维细胞基因表达。

与神经元转分化的研究相比，向胶质细胞转分化的研究相对较少。2014 年 7 月，Thoma 等^[57]采用 VPA、Noggin、TGF- β 抑制剂 SB431452 和 CP21 将人的成纤维细胞转分化成施万细胞 (induced Schwann cells, iSCs)。化合物作用 1 周后，成纤维细胞转变至中间前体状态 (transient precursor stage, tP)，然后再用分化培养基将细胞转变成施万细胞。该中间体在给予其他诱导条件后，还能分化成脂肪细胞和平滑肌细胞。

4.2 成纤维细胞转分化为心肌细胞

2015 年 8 月，本研究组报道了使用 CHIR99021、6616452 (Repsox)、Forskolin、VPA、Tranylcypromine (Parnate) 和 TTNPB 六个小分子的化学鸡尾酒组合 (CRFVPT)，实现了小鼠胚胎和尾尖成纤维向心肌细胞的转分化^[58]。其中 CHIR99021、RepSox、Forskolin 和 VPA 四个化合物为核心化合物 (CRFV)，Parnate 和 TTNPB 对诱导也有促进作用。这一诱导过程分两个阶段进行：第一阶段是诱导期，培养液中的 CRFVPT 化合物组合作用于成纤维细胞，使成纤维细胞退回至一个不稳定的中间状态；第二阶段是成熟和维持期，通过有利于心肌细胞分化和生长的培养条件使中间状态的细胞向心肌细胞分化。诱导后大概 6~8 d 左右，就能看少量能够收缩的细胞，随着诱导进程逐渐会形成更多自动有节律收缩的心肌样细胞。这些化学诱导获得的心肌样细胞 (chemical induced cardiomyocytes, ciCMs) 可以表达心肌特异性的基因，并拥有心肌类似的电生理特征。进一步实验显示，成纤维细胞向 CiCMs 转分化过程中并没有通过 iPSC 阶段，而是经过了心肌前体样细胞这一阶段，也属于间接谱系转化。谱系追踪实验也显示，这些 CiCMs 确实起源于成纤维细胞。Park 等^[59]近期也报道了使用 Forskolin、A-8301、CHIR99021、(\pm)BayK 8644 和 SC1 五个小分子化合物的组合 (FASCB)，可以诱导小鼠成纤维细胞转分化为心肌样细胞。通过全化合物诱导成纤维细胞向心肌细胞的转分化，有可能为心脏损伤和心肌梗死提供一个治疗方法。

4.3 成纤维细胞向内皮细胞转分化

2015 年 1 月，Sayed 等^[60]用 Toll 样受体 3 (Toll-like receptor 3, TLR3) 激动剂 Poly I:C、8Br-cAMP、SB431542 和一些生长因子将人的成纤维细胞转分化为了内皮细胞。他们先通过 Poly I:C 激活成纤维细胞内的 TLR3，引发细胞内的天然免疫应答，然后再用内皮细胞的一些生长因子和 8Br-cAMP、SB431542 促进细胞的间质-上皮转化 (MET)，最后诱导得到内皮细胞 (induced endothelial cells, iEC)。iEC 与人的血管内皮细胞有相似的基因表达谱，在移植到动脉末梢疾病模型小鼠体内后能促进肢体的血流，减少组织损伤，促进组织的修复。

5 展望

化合物诱导体细胞重编程和转分化取得了重大进展。但是，体细胞通过化合物重编程和转分化的分子机制目前尚不完全清楚，其诱导效率也仍需提高，还需要寻找更多小分子组合诱导其他类型细胞转分化。化合物诱导体细胞重编程和转分化有很好的应用前景和优势，相比传统的基因操作方式更加安全、可控和易操作。随着对这项技术的深入研究，这项技术将在再生医学及相关领域中有广阔的应用前景，有可能为心血管疾病、神经退行性疾病等提供良好的治疗方法。

[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: 1145-7
- [2] Rossant J. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells*, 2001, 19: 477-82
- [3] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154-6
- [4] Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol*, 1962, 4: 256-73
- [5] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-3
- [6] Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*, 2006, 7: 319-27
- [7] Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development*, 2005, 132: 227-33
- [8] Cowan CA, Atienza J, Melton DA, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005, 309: 1369-73
- [9] Yu J, Vodyanik MA, He P, et al. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell

- fusion. *Stem Cells*, 2006, 24: 168-76
- [10] Taranger CK, Noer A, Sørensen 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: 5719-35
- [11] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [12] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, 136: 411-9
- [13] Zhu S, Li W, Zhou H, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 651-5
- [14] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, 322: 945-9
- [15] Okita K, Nakagawa M, Hyunjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, 322: 949-53
- [16] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458: 766-70
- [17] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, 324: 797-801
- [18] 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: 618-30
- [19] 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
- [20] 龙媛, 张立红, 谢欣. 改变细胞命运的重编程. *生命科学*, 2015, 27: 327-35
- [21] Liu H, Zhu F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 587-90
- [22] 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
- [23] 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: 46-54
- [24] Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461: 86-90
- [25] 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: 135-8
- [26] 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: 71-9
- [27] Wang T, Chen K, Zeng X, et al. The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 575-87
- [28] 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: 51-63
- [29] 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: 1315-25
- [30] 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: 908-11
- [31] Li Y, Zhang Q, Yin X, et al. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, *Oct4*, and small molecules. *Cell Res*, 2011, 21: 196-204
- [32] 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: 1424-35
- [33] Wei X, Chen Y, Xu Y, et al. Small molecule compound induces chromatin de-condensation and facilitates induced pluripotent stem cell generation. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6: 409-20
- [34] Xu X, Wang Q, Long Y, et al. Stress-mediated p38 activation promotes somatic cell reprogramming. *Cell Res*, 2013, 23: 131-41
- [35] 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: 1121-36
- [36] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 2013, 341: 651-4
- [37] Long Y, Wang M, Gu H, et al. Bromodeoxyuridine promotes full-chemical induction of mouse pluripotent stem cells. *Cell Res*, 2015, 25: 1171-4
- [38] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010, 142: 375-86
- [39] Efe JA, Hilcove S, Kim J, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 215-22
- [40] 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
- [41] 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
- [42] Huang P, Zhang L, Gao Y, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 370-84
- [43] Zhu S, Rezvani M, Harbell J, et al. Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature*, 2014, 508: 93-7
- [44] Sheng C, Zheng Q, Wu J, et al. Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined

- factors. *Cell Res*, 2012, 22: 208-18
- [45] 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
- [46] Wang L, Wang L, Huang W, et al. Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nat Methods*, 2013, 10: 84-9
- [47] Caiazzo M, Giannelli S, Valente P, et al. Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors. *Stem Cell Reports*, 2015, 4: 25-36
- [48] Han JK, Chang SH, Cho HJ, et al. Direct conversion of adult skin fibroblasts to endothelial cells by defined factors. *Circulation*, 2014, 130: 1168-78
- [49] Li K, Zhu S, Russ HA, et al. Small molecules facilitate the reprogramming of mouse fibroblasts into pancreatic lineages. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 228-36
- [50] Batta K, Florkowska M, Kouskoff V, et al. Direct reprogramming of murine fibroblasts to hematopoietic progenitor cells. *Cell Rep*, 2014, 9: 1871-84
- [51] Bussmann LH, Schubert A, Vu Manh TP, et al. A robust and highly efficient immune cell reprogramming system. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 554-66
- [52] 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
- [53] Kurian L, Sancho-Martinez I, Nivet E, et al. Conversion of human fibroblasts to angioblast-like progenitor cells. *Nat Methods*, 2013, 10: 77-83
- [54] Cheng L, Hu W, Qiu BY, et al. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res*, 2014, 24: 665-79
- [55] Hu W, Qiu B, Guan W, et al. Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 204-12
- [56] Li X, Zuo X, Jing J, et al. Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 195-203
- [57] Thoma EC, Merkl C, Heckel T, et al. Chemical conversion of human fibroblasts into functional Schwann cells. *Stem Cell Reports*, 2014, 3: 539-47
- [58] Fu Y, Huang C, Xu X, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res*, 2015, 25: 1013-24
- [59] Park G, Yoon BS, Kim YS, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocyte-like cells using small molecule treatments. *Biomaterials*, 2015, 54: 201-12
- [60] Sayed N, Wong WT, Ospino F, et al. Transdifferentiation of human fibroblasts to endothelial cells: role of innate immunity. *Circulation*, 2015, 131: 300-9