

- [7] Chung Y, Yang X, Chang SH, et al. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4⁺ T lymphocytes[J]. Cell Res, 2006, 16(11):902-907.
- [8] Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, et al. Interleukin-22 but not Interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation[J]. Immunity, 2007, 27(4):647-659.
- [9] Kohno M, Tsutsumi A, Matsui H, et al. Interleukin-17 gene expression in patients with rheumatoid arthritis[J]. Mod Rheumatol, 2008, 18(1):15-22.
- [10] Bullens DM, Truyen E, Coteur L, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? [J]. Respir Res, 2006, 7(1):135.
- [11] Wong CK, Lit LC, Tam LS, et al. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity[J]. Clin Immunol, 2008, 127(3):385-393.
- [12] Fransson ME, Liljenfeldt LS, Fagius J, et al. The T-cell pool is energized in patients with multiple sclerosis in remission[J]. Immunology, 2009, 126(1):92-101.
- [13] Cho ML, Yoon CH, Hwang SY, et al. Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(3):776-784.
- [14] Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, et al. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort) [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(4):1122-1131.
- [15] Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? [J]. Cytokine, 2008, 41(2):84-91.
- [16] Sylvester J, Liacini A, Li WQ, et al. Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes[J]. Cell Signal, 2004, 16(4):469-476.
- [17] Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis[J]. Front Biosci, 2006, 11(1):529-543.
- [18] Neumann E, Gay S, Müller-Ladner U. The RANK/RANKL/osteoprotegerin system in rheumatoid arthritis: new insights from animal models[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(10):2960-2967.
- [19] Hsu HC, Yang P, Wang J, et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice[J]. Nat Immunol, 2008, 9(2):166-175.
- [20] 徐雪, 邹和建, 吕玲. 系统性红斑狼疮患者外周血 IL-17 表达及其与疾病活动性的关系[J]. 复旦学报:医学版, 2010, 37(1):71-75.
- [21] Kurasawa K, Hirose K, Sano H, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(11):2455-2463.
- [22] Lock C, Hermans G, Pedotti R, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis[J]. Nat Med, 2002, 8(5):451-453.
- [23] Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation[J]. Nat Med, 2007, 13(10):1173-1175.
- [24] Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis [J]. Am J Pathol, 2008, 172(1):146-155.
- [25] Li J, Chen X, Liu Z, et al. Expression of Th17 cytokines in skin lesions of patients with psoriasis[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2007, 27(3):330-332.
- [26] 陈晋广, 任小丽. 寻常型银屑病患者外周血 Th17 细胞的检测[J]. 中华中医药学报, 2010, 28(3):557-558.
- [27] 常树霞, 陈永锋. Th17 细胞与银屑病[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2010, 17(1):71-74.

(收稿日期:2011-08-08)

• 综 述 •

诱导性多潜能干细胞的研究现状和应用前景

梁 骑 综述, 唐 中[△]综述

(川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637100)

关键词: 胚胎干细胞; 诱导性多潜能干细胞; ips 细胞; 体细胞重编程**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.035**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2011)20-2378-03

2006 年, Takahashi 和 Yamanaka^[1]将 4 个转录因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc(Yamanaka 四因子)导入已分化的小鼠成纤维细胞, 进而获得了类似于胚胎干细胞(ES 细胞)的多能性干细胞, 称之为“诱导多潜能干细胞”(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)。随后, iPS 细胞的研究引起了各国学者的广泛关注, 将干细胞的研究推向了一个全新的领域。由于 iPS 细胞研究的一个最重要目的就是进行临床应用, 因此, 研究者对 iPS 细胞的研究也主要集中在安全、效率及临床疾病应用等方面。

1 关于安全方面的研究

在 iPS 细胞建立的过程中, 转染方法、转染因子这两个环节对于产生 iPS 细胞的安全性起到了至关重要的作用。2006

年, Takahashi 和 Yamanaka^[1]在获得 iPS 细胞的试验中采用的转录方法是逆病毒转录的, 使用的转录因子是 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc。逆病毒转录的方法会将转录因子整合到供体细胞的基因组中, 虽然现在还不是很清楚这种整合对产生的 iPS 细胞会有什么具体的影响, 但是可以明确地知道, 基因组的整合肯定存在着潜在的未知的危险。Klf4 和 c-Myc 是两个致癌因子, 他们的存在会使得 iPS 细胞的安全性严重下降。因此, 2006 以来, 研究者在对 iPS 细胞进行的过程中, 对转染方法和转染因子这两个环节进行了大量的研究, 并取得了很大的进步。

Okita 等^[2]采用一个含 Oct4、Klf4、Sox2 的质粒和一个含

[△] 通讯作者, E-mail: tz5331@163.com。

c-Myc 的质粒反复转染小鼠胚胎成纤维细胞,成功得到了无病毒载体整合的 iPS 细胞;Yu 等^[3]使用一种游离载体,即 oriP/EBNA1 载体,转染 Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc、Nanog、Lin28、SV40LT 进入人类成纤维细胞,成功得到了无载体整合的人类 iPS 细胞。此外,还有研究小组通过 Cre/LoxP 重组酶系统^[4],以及 piggyBac 转座子传递系统清除融合到宿主基因组中的转基因序列从而获得了无转基因的 iPS 细胞^[5]。而 Zhou 等^[6]则通过短肽介导的蛋白转导的方法将 Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc 4 种蛋白转入小鼠胚胎成纤维细胞和人新生儿胎儿成纤维细胞也成功得到了 iPS 细胞。

从逆转病毒转染到 Cre/LoxP 重组酶系统再到游离载体以至到重组蛋白,转录因子对供体细胞基因组的影响越来越小,这意味着,研究者得到的 iPS 细胞也越来越自然,越来越安全,这些成果都预示着,通过研究者的努力,iPS 细胞在不断向临床应用迈进,直到它真正应用于临床。

2 关于效率方面的研究

2007 年,有研究小组采用逆转录病毒转染 Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc 四因子的方法诱导 iPS 细胞并计算诱导效率,发现带有 Nanog 报告基因系统的小鼠胚胎成纤维细胞的诱导效率约为 0.001%~0.03%,而带有 Fbx15 报告基因系统的小鼠胚胎成纤维细胞的诱导效率约为 0.01%~0.5%,总的来说,iPS 细胞的诱导重编程效率很低^[7]。而如果要使 iPS 细胞这个技术真正应用于临床,高效率的诱导重编程效率也是一个很重要的前提,虽然现在还不能清楚地阐明 iPS 细胞产生的具体机制,但是可以知道,从体细胞诱导成为 iPS 细胞的过程中,由于外源因子的诱导,使得体细胞的表现遗传修饰发生变化,重新达到了类似胚胎干细胞的状态。此外,在先前的研究中已经发现,在细胞核移植过程中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂和 DNA 脱甲基化在一定程度上能提高重编程效率^[8],一些细胞存活有关的通路,比如 MAPK 信号通路^[9]、p53 信号通路^[10]等都可能有利于提高细胞重编程效率。因此,研究者在这些方面也做了大量的研究。Huang 等^[11]通过逆转录病毒转染四因子与化学物质处理相结合的方法研究 iPS 细胞诱导重编程效率发现,四因子转染结合 5'-azacytidine(DNA 甲基化酶抑制剂)处理可以提高诱导重编程效率约 10 倍,而另外 3 种组蛋白去乙酰化抑制剂辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)、曲古抑菌素 A(TSA)及丙戊酸(VPA)也都能提高诱导重编程效率,其中 VPA 的效果最好,可以提高效率约 100 倍。Shi 等^[12]的研究结果则表明,BIX01294(组蛋白甲基转移酶抑制剂)处理 Oct4/Klf4 两因子转染的小鼠神经祖细胞后,其诱导重编程效率可以达到四因子转染的水平。

Zhao 等^[13]利用四因子、p53siRNA、UTF1 联合共转染的方法使人类包皮成纤维细胞的诱导重编程效率提高了 100 倍。2009 年,有 5 个研究小组都通过对 p53 信号通路方面进行抑制从而提高 iPS 细胞的诱导重编程效率。Marion 等^[14]在四因子诱导人类包皮成纤维细胞时共转染 p53 shRNA,发现可以使诱导重编程效率提高 6 倍;Utikal 等^[15]研究发现,对供体细胞进行 p53 或 Ink4a/Arf 缺失后,其四因子诱导重编程效率可以提高 30~40 倍,或者在四因子诱导过程中的不同时间点用 p53 shRNA 处理,也均能显著提高重编程效率;Kawamura 等^[16]通过 RNA 干扰抑制 p53 或其下游靶基因 p21 使重编程效率提高 2~5 倍,而对供体细胞进行 p53 敲除的话则会使诱导重编程效率提高 10 倍;Hong 等^[17]的研究则表明,p53 缺失的小鼠成纤维细胞四因子诱导重编程效率达 20%,三因子则

达 10%,并且他们还将 p53 缺失的小鼠 T 淋巴细胞重编程为 iPS 细胞,野生型的 T 淋巴细胞则不能形成 iPS 细胞,四因子(或三因子)+p53 shRNA 共转染人皮肤成纤维细胞也能显著提高重编程效率;Li 等^[18]通过研究也得到了类似的结果,p53 P21 Ink4/Arf 缺失小鼠成纤维细胞重编程效率都有所提高,而 RNA 干涉以后也能提高重编程效率。而 Lin 等^[19]从 TGF β 和 MAPK 信号通路出发进行研究,发现两种化学物质-ALK5 (TGF β I 型受体)抑制剂 SB43142 和 MEK(丝裂原活化蛋白激酶)抑制剂 PD0325901 的组合,提高 iPS 细胞诱导重编程效率,比传统方法的效率约高 100 倍,而另外一种新型化合物,Thiazovivin 与 SB43142、PD0325901 结合使用,可提高效率约 200 倍,同时将缩短转化周期。

从上述研究结果可以看到,在诱导 iPS 细胞的过程中,适当利用一些甲基化或乙酰化抑制剂处理细胞以及从信号通路方面入手对提高 iPS 细胞诱导重编程效率有明显的作用。

3 临床疾病方面的研究

建立动物疾病模型、克隆性组织器官移植、药物毒理学研究、药物开发等,iPS 细胞的潜在应用价值无疑是非常巨大的,而且,在研究者的努力下,iPS 细胞产生也越来越安全,越来越高效,而对于 iPS 细胞最重要的应用——临床应用方面的研究也有很多。

目前,在小鼠模型上,将 iPS 细胞应用于疾病治疗的研究已经取得了一些进展。Hanna 等^[20]用患有镰刀型贫血症小鼠的皮肤成纤维细胞为供体建立了 iPS 细胞,通过对 iPS 细胞进行改造和分化,得到了具有正常功能的造血前体细胞,移植后治疗小鼠的镰刀型贫血症,起到了较好的效果;Wernig 等^[21]报道,采用 Yamanaka 四因子重编程小鼠成纤维细胞产生 iPS 细胞并移植进入小鼠胚胎后能移行进入不同脑区,分化成胶质和不同亚型的神经元,并且具有良好的功能和活性,而进一步研究证明其还可以明显改善成年帕金森症动物模型小鼠的症状;Yamanaka 小组将得到的小鼠 iPS 细胞诱导分化成为了包括动脉上皮细胞、静脉上皮细胞、淋巴上皮细胞及自主跳动的心肌细胞的心血管类细胞^[22]。

由于 iPS 细胞存在的不安全因素,因此,在人类 iPS 细胞临床相关的研究主要是集中在疾病特异性 iPS 细胞的获得和 iPS 细胞的分化方面。Dimos 等^[23]将肌萎缩性侧索硬化症[ALS,一种由于脊髓和运动(神经)皮质中运动神经元缺失从而导致进行性麻痹和死亡的神经变性疾病]患者的皮肤成纤维细胞重编程为 iPS 细胞并且诱导其分化成运动神经元。Karrambayaram 等^[24]也成功将人类 iPS 细胞直接分化成为有活性的运动神经元。Raya 等^[25]从范可尼贫血(一种罕见的常染色体隐性遗传性血液系统疾病,除有典型再障表现外,还伴有多发性的先天畸形)患者身上获取皮肤细胞,然后利用一个病毒运送与病情相关的一个缺陷基因的功能性副本,再经转录因子诱导得到了没有疾病特性的 iPS 细胞并将其分化成了正常的造血干细胞。此外,还有多个研究小组都得到了很多人类疾病特异性的 iPS 细胞,这些疾病主要包括帕金森症、脊髓性肌萎缩、唐氏综合征、青少年糖尿病、贝克肌肉萎缩症等^[4,26-27]。

人类疾病特异性 iPS 细胞的获得为疾病体外模型的建立、药物筛选、药物开发等提高了基础,Raya 等^[25]将患者细胞通过基因纠正以后获得无疾病性的 iPS 细胞并将其分化,则使得 iPS 细胞在人类遗传性疾病临床治疗方面的研究又向前迈进了一步。而小鼠疾病模型上 iPS 细胞对疾病的治疗也已经起到了一定的作用。这一系列的研究成果都在某种程度上暗示

着研究者能够很快将 iPS 细胞真正应用于临床。

4 小 结

从 iPS 细胞首次在实验动物中诞生,到 iPS 细胞在人类细胞中成功获得,再到 iPS 细胞在疾病模型动物治疗中的应用,前后一共只用了短短 3 年左右的时间,研究可以看到 iPS 细胞的发展是多么的迅速。但是,研究者仍然还有很多问题需要面对。首先,人们还没有真正了解 iPS 细胞产生的具体机制,因此,在今后的工作中,必须进一步的加深对重编程和多能性调节机制的认识,在研究中通过 RNA 干涉、超表达等各种技术人为的对转录因子的表达时间、表达量以及转录因子的表达顺序进行调控,通过不断研究尝试,从根本上了解转录因子诱导重编程发生的过程和机制,才能为 iPS 细胞更深入的研究利用打下坚实的基础;其次,虽然 iPS 细胞在疾病模型动物治疗中已经有一定有应用,但是,距离人类疾病的治疗还尚需时日,因此,如果研究者能在了解 iPS 细胞产生机制的基础上,通过更简单、方便和安全的方式来诱导产生 iPS 细胞使其达到完全重编程并具有与胚胎干细胞完全相同的状态,那么,iPS 细胞用于人类疾病的治疗就将成为可能;再次是效率问题,目前,诱导产生 iPS 细胞的效率仍然很低,这与基因导入的方式、整合位点、表观遗传学等多种因素有关。这已成为制约 iPS 由实验室走向临床的最大瓶颈。因此,如何提高 iPS 细胞的制备效率仍是研究普遍关注的问题^[28]。

iPS 技术为人类疾病治疗带来了希望和契机,期待在不远的将来,iPS 技术会在人们的不断努力下完善成熟,使得 iPS 细胞真正安全高效的应用于临床,解决人类面临的各种疾病。

参考文献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [2] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 949-953.
- [3] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences[J]. *Science*, 2009, 324(5932): 797-801.
- [4] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors[J]. *Cell*, 2009, 136(5): 964-977.
- [5] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-770.
- [6] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 1-4.
- [7] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-318.
- [8] Belloch R, Wang Z, Meissner A, et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(9): 2007-2013.
- [9] Chen S, Takanashi S, Zhang Q, et al. Reversine increases the plasticity of lineage-committed mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(25): 10482-10487.
- [10] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis[J]. *Cell*, 2004, 119(7): 1001-1012.
- [11] Huang FD, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 795-797.
- [12] Shi Y, Despons C, Do JT, et al. Induction of Pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 568-574.
- [13] Zhao Y, Yin X, Qin H, et al. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 475-479.
- [14] Marión RM, Strati K, Li H, et al. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity[J]. *Nature*, 2009, 460(7259): 1149-1153.
- [15] Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells[J]. *Nature*, 2009, 460(7259): 1145-1148.
- [16] Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming[J]. *Nature*, 2009, 460(7259): 1140-1144.
- [17] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway[J]. *Nature*, 2009, 460(7259): 1132-1135.
- [18] Li H, Collado M, Villasante A, et al. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming[J]. *Nature*, 2009, 460(7259): 1136-1141.
- [19] Lin TX, Ambasudhan R, Yuan X, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(11): 805-824.
- [20] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1920-1923.
- [21] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5856-5861.
- [22] Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells[J]. *Circulation*, 2008, 118(5): 498-506.
- [23] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons[J]. *Science*, 2008, 321(5893): 1218-1221.
- [24] Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, et al. Directed differentiation of human-Induced pluripotent stem cells generates active motor neurons[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(4): 806-811.
- [25] Raya A, Rodriguez-Pizà I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2009, 460(7251): 53-61.
- [26] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2008, 134(5): 877-886.
- [27] Ebert AD, Yu J, Rose FF, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient[J]. *Nature*, 2009, 457(7227): 277-280.
- [28] 秦彤, 苗向阳. iPS 细胞研究的新进展及应用[J]. *遗传*, 2010, 32(12): 1205-1214.