

重编程的机制研究进展*

阮光萍, 姚翔, 刘菊芬, 何洁, 王金祥, 杨建勇, 庞荣清 综述, 潘兴华[△] 审校

(解放军昆明总医院干细胞工程实验室, 昆明 650032)

关键词: 重编程; 核移植; 细胞融合; 细胞提取物; 诱导; 机制

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)07-0962-03

旧的观点认为发育是不可逆的过程, 而从分化的供者细胞克隆出哺乳动物驳斥了这个观点。现已证明卵母细胞能重编程供者核到胚胎状态, 并发育成一个新的生物。未来将研究替代核移植的重编程方法, 不使用卵母细胞, 在培养皿中重编程。本文综述了重编程的几种方法, 包括核移植、细胞融合、细胞提取物、培养诱导和分子介导重编程的方法, 对重编程的机制进行了探讨。

1 在哺乳动物发育中的表观重编程的机制

DNA 甲基化是基因组主要的表观修饰, 是调节基因组功能的关键方面。在哺乳动物的两个发育期, 在生殖细胞和胚胎植入前, 它们的甲基化形式是基因组广泛重编程, 产生的细胞有广泛的发育潜能, 在正常发育和克隆动物, 重编程对建立核的全能性有关键作用。

在所有单细胞和多细胞生物, DNA 甲基化是一个被较好研究的 DNA 表观修饰。在分化组织, 特定的去甲基化事件可以导致基因表达进一步发生变化。在哺乳动物发育期, 体内甲基化形式的基因组广泛重编程, 基因组的重要部分去甲基化, 过一段时间再甲基化。重编程事件的发展动力, 和一些酶机制, 开始逐渐被了解。

总之, 在哺乳动物胚胎有两个主要循环, 在胚胎植入前的发育和生殖细胞发育期的表观重编程基因组。重编程机制是在胚胎植入前影响克隆胚胎的表观遗传学修饰和基因组功能, 因此逃脱重编程可能参与表观遗传, 检测是否除了生殖细胞和早期胚胎, 重编程也参与干细胞分化是非常重要的。

2 核克隆和基因组表观重编程的机制

通过核移植(NT)克隆哺乳动物, 会导致妊娠失败和新生儿死亡, 大部分只有少量操作的胚胎活着出生。因为不适当的表观重编程, 许多活着的胚胎有各种异常, 克隆胚胎来源于供者, 比如胚胎干细胞, 它们的早期发育基因需要很少或不需要重编程, 而来源于体细胞的 NT 克隆则需要较多的重编程。克隆动物出生和之后的存活与哺乳动物发育一致, 尽管重要的转录后失调, 对表观遗传学异常相当耐受。

3 核重编程的几种方法

卵母细胞能重编程供者核到胚胎状态, 能指导发育成一个新的生物。来源于病人特异的胚胎干细胞通过核移植的前景强调了这项技术在再生医学的潜在使用。未来挑战将研究替代核移植, 在培养皿中重编程而不使用卵母细胞。

这篇综述讨论了不同方法用来诱导转化一个分化细胞到胚胎多能状态, 包括核移植、细胞融合、使用细胞提取物和培养诱导重编程。本质上, 重编程仍然是现象, 因此, 未来努力的目标是在分子和生物化学水平剖析重编程。

3.1 核移植重编程的方法 通过核移植产生动物是相当地无效, 植入后不久许多克隆死亡。少数克隆存活到出生但伴有严重的异常, 比如肥胖^[1]和成熟前死亡^[2]。在两栖动物的早期实验表明, 在供者细胞年龄和克隆存活之间有相反的联系。因此, 重要的问题是供者细胞分化的状态, 是否影响哺乳动物重编程的效率。通过评价克隆发育, 重编程可以被功能的测量, 在几个不同水平, 包括囊胚形成率、克隆胚胎存活到出生的百分比, 植入子宫后的生长, 来源于克隆囊胚植入培养时多能 ES 细胞的频数。植入前重建卵母细胞为囊胚的发育, 对实验参数特别敏感, 比如细胞周期阶段, 转移核的物理条件。

3.2 通过细胞融合重编程的方法 不同细胞类型之间的融合被用来研究分化状态的可逆性^[3]。在许多杂交体, 较少分化融合的配偶体的表型是主要的, 超过较多分化融合的配偶体。多能细胞对分化细胞的支配地位, 在细胞杂交中表明, 在体细胞和鼠胚胎生殖细胞(EG)^[4]和 ES 细胞^[5]之间, 这个重编程能力在人 ES 细胞是保守的^[6]。

从融合实验升起两个关键问题, 对重编程是否 ES 细胞核和细胞质是需要的, 是否 DNA 复制是需要的。第一个问题被解决通过从一个 ES 细胞分离核组分(成核细胞)从细胞质组分(细胞质), 这些组分分别与分离自神经球的神经元细胞融合^[7], 在杂交体产生 ES 细胞成核细胞, OCT4 绿色荧光蛋白转基因的再活化被检测到。通过对比, 用 ES 细胞胞质融合神经细胞球没有绿色荧光蛋白信号, 表明核因子对分子重编程是必需的, 这些结论与两栖类^[8]和鼠的克隆实验一致, 这表明成功重编程依赖于直接注射核到生殖囊泡或分裂期的卵母细胞, 在细胞质中核因子是可用的。重编程体细胞到多能性是潜在有吸引力的方法, 可产生定制细胞用于治疗而不依赖核移植。

3.3 用细胞提取物重编程的方法 用无细胞系统研究重编程是对核转移和细胞融合有吸引力的替代。重要的抽提物能被允许纯化, 参与重编程的蛋白复合物。例如, 暴露渗透的体青蛙细胞到从蟾蜍卵制备的提取物中表明体细胞特异的 TATA 连结蛋白 TBP 从染色质活性解离, 通过 ATP 依赖的染色质重塑因子 ISWI 的活性^[9], 表明主要的染色质重塑复合物参与到重编程。在不同一套实验, 人细胞暴露给蟾蜍卵提取物, 处理后升高的 OCT4 转录水平被检测到^[10]。然而, 后来的实验不能排除可能性, 检测到的 OCT4 信号来自于转录的 OCT4 假基因或蟾蜍 OCT4 同系物, 而不是再活化的内源 OCT4。另外, 没有稳定的重编程可见, 在可逆渗透的传代培养的体细胞, 表明一个完整的卵母细胞是需要的, 对功能去分化到多能状态。

概念上更简单的方法诱导重编程, 渗透的 293T 细胞暴露 1 小时在 EC 细胞^[11]提取物中或 T 细胞系提取物^[12], 各自的

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31172170)、国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2012CB518106)、云南省高新技术产业发展专项基金资助项目(201204)、国家支撑计划资助项目(2014BAI01B01)。 作者简介: 阮光萍, 女, 副主任医师, 主要从事干细胞基础与重编程研究。 [△] 通讯作者, E-mail: ynkmyr@163.com。

OCT4 或 T 细胞受体表达,被 RNA 和蛋白分析检测到。然而结论表明重编程体供者细胞到其他细胞类型是有问题。呈递的数据不能排除可能性,被用来制备提取物的细胞基因产物被检测到。关键报道 TCR 活化在重编程的成纤维细胞中,TCR 表达要求 TCR 环的功能基因组重排,在重编程的成纤维细胞没有被证明,表明检测到的信号是因为短暂吸收提取物中的 TCR 分子,而不是活化内源的 TCR 环。

3.4 培养诱导重编程的方法 至今讨论的方法要求暴露体核到卵母细胞或 ES 细胞的核/质因子,而引起核重编程。然而,在特定的物理条件下,整个细胞能去分化或转分化为另外的细胞命运。细胞重编程的例子包括原基形成,在蝶螈或斑马鱼的附属物再生过程中,测定成虫椎间盘细胞在果蝇,在哺乳动物和果蝇重编程生殖细胞,重编程原始生殖细胞(PGC)为 EG 和 EC 细胞能被检测,当对比细胞来源的发育潜能和它们的体外产物。例如,囊胚的内细胞团和来源的 ES 细胞都是多能的,能成长为所有鼠的细胞类型,包括生殖细胞。尽管来自内细胞团的 ES 细胞系^[13]可能诱导表观变化有助于永久生长,在培养细胞前后在发育潜能上没有不同被观察到。

最近,新生儿^[14]和成人^[15]睾丸细胞当暴露给特定组合的生长因子表明,长成 ES 样细胞。ES 样细胞表达多能细胞的所有标志,移植后形成畸胎瘤,传递到生殖系成长为嵌合动物。这样这些细胞代表仅有的清楚的例子,从正常新生和成年的哺乳动物来源的多能细胞,对研究遗传疾病在不同细胞系可能有用。然而,潜在严重的关心对这些细胞的任何治疗应用是不平衡的基因组印记。父母的印记在 PGC 被擦除,随后重建雄性特异或雌性特异形式,在随后的配子^[16]。雄性 ES 细胞来源于两个雄性配子有雄性特异形式的印记,而雌性 ES 细胞来源于两个雌性配子有雌性特异形式的印记^[17]。雄性 ES 细胞不能广泛地贡献于嵌合体,培养中的成纤维细胞显示了公开的转化表型。相对地,雌性 ES 细胞显示了更广泛的分化潜能,从嵌合胚胎解救的成纤维细胞进行了成熟前衰老。

3.5 分子介导重编程的方法 细胞提取物和核移植实验意味着,在重编程体核时染色质重塑因子、DNA 和组蛋白修饰。通过组合细胞外和细胞内信号 ES 细胞多能性维持。然而几乎不知道这些修饰中哪个因子是目标,和对重编程是关键的。较好理解基因对维持 ES 细胞多能性是重要的,ES 细胞自身有重编程活性,这些基因中的一些可能对体细胞重编程有作用。

ES 细胞多能性通过组合细胞内和细胞外信号被维持,细胞外信号包括属的信号通路,比如信号转导子,转录活化剂 3 (STAT3),骨形态发生蛋白(BMP)和 WNT 级连,而固有信号包括 ES 细胞特异因子在转录水平执行维持多能性^[18]。至今,没有功能分析多能维持基因对细胞重编程的效果。然而,间接证据表明,在来自体细胞的囊胚克隆的多能基因 OCT4、NANOG 和 SOX2 的异常再活化,与克隆的异常发育之间有一个联系^[19]。相对地,来自于已经表达多能基因的 ES、EG 或 EC 细胞的克隆显示了忠实的 OCT4 活化,展示了增加的克隆效率。

当前研究的一个关键问题是定义多能基因的下游目标基因。基因组广泛定位分析人^[20]和鼠^[21] ES 细胞的 OCT4、NANOG 和 SOX2,表明了这些转录因子合作形成特定 ES 细胞调节循环。这三个调节的目标基因常常编码其他发育重要的转录因子基因,它们在多能未分化细胞中是沉默的,支持抑制分化通路对维持多能性是必需的这一观点。

4 展 望

这是可能的吗?充分重编程一个体细胞到 ES 样细胞而

不需要暴露核到卵母细胞的重编程因子。对重编程的基因和通路是必需被鉴定的吗?成体细胞的证据支持删除或活化单个基因,能方便成熟细胞去分化为不成熟状态吗?例如,在 B 细胞异位表达 CCAAT/增强子连结蛋白- α (C/EBP α)和 C/EBP β 有助于它们重编程为巨噬细胞^[22],相似的,失去 PAX5 或异位表达 β -连环蛋白^[23]在淋巴细胞前体赋予它们多系分化潜能。在神经系统,当暴露给细胞外信号因子的特定组合^[24],少突胶质细胞前体重编程为多能中枢神经系统样干细胞。相似的,在呈递上皮生长因子时^[25],星形胶质细胞缺乏 Ink4a/Arf 肿瘤抑制环,有潜能重编程为 NS 细胞。一些实验室发现异位活化多能因子 OCT4 在成年鼠,导致扩增成人前体细胞和肿瘤形成^[26]。重要地,当 OCT4 关闭表达肿瘤完全被抑制,因为扩增的前体细胞不断发生分化。这个发现表明成人前体细胞仍然是有反应的,对这个关键的胚胎转录因子,因此,可以鉴定成人前体细胞作为一个理想目标,对未来重编程进行努力。一些 ES 细胞的多能维持基因通过遗传学筛选被鉴定^[27],因此,这将是可能的,设计获得功能和失去功能策略来鉴定基因有助于重编程体细胞为 ES 样细胞。最后,这是可能的,进一步选择重编程细胞,通过探索 ES 细胞抵抗发生 DNA 去甲基化^[28],这个处理,任何其他细胞类型不耐受的。

参考文献

- [1] Tamashiro KL. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring[J]. *Nat Med*, 2002, 8(3): 262-267.
- [2] Ogonuki N. Early death of mice cloned from somatic cells[J]. *Nat Genet*, 2002, 30(3): 253-254.
- [3] Blau HM, Blakely TB. Plasticity of cell fate: insights from heterokaryons[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1999, 10(3): 267-272.
- [4] Tada M. Pluripotency of reprogrammed somatic genomes in embryonic stem hybrid cells[J]. *Dev Dyn*, 2003, 227(4): 504-510.
- [5] Tada M. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells[J]. *Curr Biol*, 2001, 11(19): 1553-1558.
- [6] Cowan CA. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells[J]. *Science*, 2005, 309(5739): 1369-1373.
- [7] Do JT, Scholer HR. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(6): 941-949.
- [8] Byrne JA. Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes[J]. *Curr Biol*, 2003, 13(14): 1206-1213.
- [9] Kikyo N. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI[J]. *Science*, 2000, 289(23): 2360-2362.
- [10] Hansis C. Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1[J]. *Curr Biol*, 2004, 14(16): 1475-1480.
- [11] Taranger CK. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(12): 5719-5735.
- [12] Hakelien AM. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 460-466.
- [13] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-166.
- [14] Kanatsu-Shinohara M. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis[J]. *Cell*, 2004, 119(7): 1001-1012.

- [15] Guan K. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis[J]. *Nature*, 2006, 440(10): 1199-1203.
- [16] Yamazaki Y. Adult mice cloned from migrating primordial germ cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11361-11366.
- [17] Hernandez L. Paternal and maternal genomes confer opposite effects on proliferation, cell-cycle length, senescence, and tumor formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13344-13349.
- [18] Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7150-7160.
- [19] Li XY, Kato Y. Comparative analysis of development-related gene expression in mouse preimplantation embryos with different developmental potential[J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 72(2): 152-160.
- [20] Boyer LA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2005, 122(6): 947-956.
- [21] Loh YH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(4): 431-440.
- [22] Xie H. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages[J]. *Cell*, 2004, 117(5): 663-676.
- [23] Baba Y, Garrett K, Kincade PW. Constitutively active beta-catenin confers multilineage differentiation potential on lymphoid and myeloid progenitors[J]. *Immunity*, 2005, 23(6): 599-609.
- [24] Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells[J]. *Science*, 2000, 289(16): 1754-1767.
- [25] Bachoo RM. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis[J]. *Cancer Cell*, 2002, 1(3): 269-277.
- [26] Hochedlinger K. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues[J]. *Cell*, 2005, 121(3): 465-477.
- [27] Chambers I. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 643-655.
- [28] Li ET, Bestor H, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality[J]. *Cell*, 1992, 69(6): 915-926.

(收稿日期: 2014-11-25)

• 综 述 •

蛋白质组学在胚胎领域的应用概述*

畦维国¹, 史舟芳², 陈洁晶¹综述, 戴 勇^{3△}, 薛 雯¹审校

(1. 中国人民解放军第 181 医院肾脏科、全军计划生育优生优育技术中心、广西代谢性疾病研究重点实验室, 广西桂林 541002; 2. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541002; 3. 深圳市人民医院, 广东深圳 518020)

关键词: 辅助生殖技术; 组学; 胚胎; 蛋白质组; 分泌蛋白质组学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)07-0964-04

人类辅助生殖技术(assisted reproductive technologies, ART)对于临床不孕不育的治疗无疑是 20 世纪的一项伟大成就。在辅助生殖技术中对配子和胚胎的非侵入性的评估是一个焦点^[1]。选出最适合移植的胚胎是人工辅助生殖成功的重要部分,通常筛选胚胎的方法是对胚胎进行系统的形态学评估^[2-3]。尽管这种方法相对成熟,并且提高了怀孕率,但它自身的缺陷仍然使超过 70% 的体外受精胚胎未能在母体内发育。因此,人工辅助生殖技术将可能从众多的胚胎发育能力鉴定方法中获益,从而进一步提高女性怀孕率并使日常的单胚胎移植成为可能^[4]。

在组学(包括转录组学、基因组学、蛋白质组学和代谢组学)技术的最新研究进展中,技术平台敏感性的提高使得运用分子手段选择胚胎成为可能。人类特别关注对胚胎蛋白质组的评估,它展现了胚胎的细胞功能和生理机能之间的联系。另外,胚胎分泌蛋白质组学分析为胚胎评估提供了非侵入性的方法^[1]。在本文中,综述讨论了蛋白质组学在人类胚胎分泌蛋白质组学鉴定中的角色及其在体外受精领域的潜在适用性和重要性。鉴定和分析胚胎分泌蛋白质组学也将拓展我们有关于早期胚胎形成的知识,推动人类了解有关胚胎在植入过程中的作用。

1 蛋白质组学和胚胎

人类蛋白质组由超过 100 万个蛋白质组成,其特征包括蛋白质的表达水平,翻译后的修饰,蛋白与蛋白相互作用以及蛋白质活性都会由于自身和外部条件刺激的影响而不断改变。蛋白质组控制细胞功能并包含从每个细胞的特定基因表达产物翻译得到的所有蛋白质^[5]。因此,关于蛋白质自身的研究对于充分了解生物过程和细胞功能是至关重要的。

尽管最近蛋白质组学技术有所发展,但人类所掌握的胚胎蛋白质组知识仍然非常有限。有限的模板、低浓度蛋白质、技术平台敏感性不高、有限的蛋白质数据库信息等,仍是研究中的主要障碍。分泌蛋白质组是指由细胞在特定时间产生和分泌的蛋白质,它对于试图鉴别涉及特殊疾病状态的蛋白质的研究人员来说有着特殊的意义^[6-7]。在人类辅助生殖技术中,分泌蛋白质组包括由胚胎产生并分泌到周围培养基的蛋白质。对这些胚胎分泌的蛋白质的蛋白质组评估可以促进非侵入性的胚胎筛选方法的产生,从而提高人工辅助生殖的成功率^[8]。目前来看,这项技术无疑是一项具有挑战性的工作,但随着蛋白质组学技术的发展有望实现。

2 分泌蛋白质组和单蛋白质分析

在人类胚胎蛋白质组的初步研究中,主要进行的是对个别

* 基金项目:广西重点实验室建设项目计划资助项目(13-051-31)。

作者简介:畦维国,男,主任医师,主要从事重大疾病分子机理研究。

△ 通讯作者, E-mail: daiyong2222@gmail.com。