

多能性干细胞与再生医学

周琪 夏宝龙



专家介绍:周琪,研究员,博士研究生导师,中国科学院动物研究所所长助理,计划生育生殖生物学国家重点实验室主任,国际转基因协会终身荣誉会员,国际干细胞组织(ISCF)中国代表。主要从事体细胞重编程机理、干细胞生物学与再生医学领域的基础研究及应用基础研究工作。获得重编程技术发明专利4项。曾先后获得国际转基因研究 genOway 奖、何梁何利基金科学与技术奖、周光召基金会“杰出青年基础科学奖”等多项奖励。

在体内胚胎发育是一个连续的、时空精密调控的过程,伴随着受精卵的分裂、分化,最终发育为一个包含多种细胞类型,并由多种细胞类型形成复杂组织结构的完整个体。将原本连续的胚胎发育过程中的特殊阶段维持下来,使其既能维持在自我更新水平,又能回归发育过程分化为其他类型的细胞,这种细胞称之为干细胞。有些类型的干细胞是发育中不存在的,人为的调控信号通路将其在体外维持下来,例如通过持续激活 LIF-Stat3 通路和经 BMP4 通路从早期囊胚内细胞团建立的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞),通过调控成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF),activin 通路从植入后胚胎的表胚层建立的表胚层干细胞^[1];有些类型的干细胞在发育中存在,并作为“干细胞库”更新、修复组织,例如造血干细胞、毛囊干细胞等。

通过四倍体补偿实验可证明胚胎干细胞能分化为个体的所有细胞类型,具有完全的多能性^[2-3],因此,理论上胚胎干细胞可以作为所有类型细胞的种子细胞。胚胎干细胞可以分化为特定类型细胞进行细胞治疗,组织修复和再生,在再生医学中具有巨大的潜在价值。

一、胚胎来源的多能性干细胞的建立和维持

胚胎干细胞的建立和维持是实现应用面临的首要问题。最早的小鼠胚胎干细胞是通过将囊胚培养在胚胎癌细胞的条件下建立的,提示

这种条件培养基中含有促进胚胎干细胞增殖,抑制分化的因子^[4],最初称为 ES 细胞分化抑制活性(differentiation inhibitory activity, DIA)。之后纯化、鉴定出这种 DIA 与白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)相似^[5]。小鼠胚胎干细胞可以在含有 BMP4 和 LIF 的培养基中,通过持续激活 LIF-Stat3 通路和 BMP4 通路这类自我更新通路建立和维持。近年来,研究认为小鼠胚胎干细胞的多能性状态处于基态(ground state),即不存在分化信号时不用激活自我更新通路,小鼠胚胎干细胞依旧能维持多能性状态,因此用抑制剂抑制分化通路 Erk 和 GSK3 即可建立和维持小鼠胚胎干细胞^[6]。之后利用 2i 体系首次成功建立了大鼠 ES 细胞系^[7]。与小鼠不同的是,人的胚胎干细胞系并不依靠 LIF 和 BMP4 通路维持,而通过 FGF,activin 通路维持^[8]。通过调控 FGF,activin 通路在小鼠中可以建立表胚层干细胞^[9],一般认为表胚层干细胞处于“prime”多能性状态,而胚胎干细胞处于“naïve”多能性状态^[1]。不同物种的胚胎干细胞依靠不同通路建立和维持,可能是胚胎发育的物种特异性,也可能是维持不同发育阶段的多能性。

二、重编程获得多能性干细胞

从囊胚建立胚胎干细胞系由于必须破坏胚胎,面临严重的伦理争议,并且由于和患者基因型不匹配,应用时可能发生免疫排斥反应。用伦理上广泛接受的方法获得患者特异的多能性干细胞一直是这个领域的关键问题。将分化的成体细胞命运逆转成多能性干细胞,称为重编程。

将体细胞移入去核的卵母细胞,这种重构胚胎

可以像正常受精胚胎一样进行卵裂发育,直至形成完整个体^[10]。这种通过体细胞核移植形成的囊胚同样可以建立胚胎干细胞系。由于避免破坏正常胚胎,这种方法伦理争议较小。但由于核移植的低效率以及卵母细胞的来源短缺,都为这种方法的临床应用造成障碍。另外,虽然通过体细胞核移植的方法在非人灵长类的动物克隆和获得胚胎干细胞系中取得成功^[11-12],但迄今为止未有确切的关于人体细胞核移植产生正常二倍体胚胎干细胞的报道。2011年首次报道可以将人体细胞移入不去核的卵母细胞中得到胚胎干细胞^[13],但因为形成的是三倍体细胞,其临床应用仍不明确。另外,将终末分化的细胞与胚胎干细胞融合也可产生多能性干细胞,这种方法可以研究重编程过程的分子机制^[14],但因为形成的是四倍体细胞而制约了临床应用。

去核的卵母细胞和胚胎干细胞可以将终末分化的体细胞重编程为多能性干细胞,即卵母细胞和胚胎干细胞中的某些物质具有重编程能力。这个领域的一项里程碑式工作是2006年Takahashi和Yamanaka^[15]通过过表达Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc将终末分化细胞重编程为多能性状态。他们通过系统的筛选与多能性网络相关的关键转录因子确定出这4个重编程因子。通过这种方法形成的细胞称为诱导多能性干细胞。多能性干细胞在基因表达水平、拟胚体分化、畸胎瘤三胚层形成、二倍体嵌合以及四倍体补偿上均与胚胎干细胞相似,多能性干细胞通过四倍体补偿得到的个体与ES通过四倍体补偿得到的个体在发育上相似,但在肿瘤发生率方面显著高于后者^[16]。

由于最初多能性干细胞通过逆转录病毒过表达四因子,病毒随机整合基因组和重编程因子的潜在致癌性是多能性干细胞临床应用的重要安全隐患。之后随着技术的改进,利用游离质粒、小分子、蛋白质以及mRNA进行重编程的方法相继出现,为安全获得多能性干细胞提供了技术手段^[17]。

虽然多能性干细胞和胚胎干细胞在多能性标准检测中相似,但也有研究表明多能性干细胞存在重编程不完全,表观遗传记忆^[18],甚至免疫原性等问题^[19]。我们的研究表明小鼠12号染色体长臂末端上一个印记区Dlk1-Dio3的开放和沉默可以作为重编程完全与否的标志:四倍体补偿的多能性干细胞这一印记区是开放的,而未完全重编程的细胞这一区域是沉默的^[20]。表观遗传记忆和免疫原性是

由重编程不完全导致还是由多能性干细胞技术本身导致仍需进一步研究。

三、多能性干细胞应用展望

成体共有上百种细胞类型,如何调控多能性干细胞分化成特定类型的细胞是进行临床应用的另一个重要问题。目前大多分化方法是根据发育的知识,先将多能性干细胞特化为某一特定细胞谱系,然后分化为特定类型的细胞。迄今为止,人们已经建立从多能性干细胞分化为多种细胞类型的方法,包括神经细胞、造血细胞、皮肤细胞、内分泌细胞、生殖细胞等。这些都为多能性干细胞的临床应用提供基础。但如何获得成熟的,有功能的分化细胞仍是这一领域尚需解决的问题^[17]。

除了分化为特定细胞类型用于细胞移植,人体组织是由多种细胞类型形成的具有三维复杂的结构,通过模拟发育过程利用多能性干细胞形成具有三维复杂结构的组织用于组织替代是再生医学中一个更高层次的需求。这一过程包括细胞特化、形态发生、组织成熟等阶段,需要不同信号动态的、时空特异的调控。已有文献报道可以从人胚胎干细胞得到由有功能的杯状细胞、潘氏细胞、肠内分泌细胞等多种肠上皮细胞形成的有序的肠绒毛和肠陷窝样结构^[21];通过拟胚体模拟眼发育中视杯的形态发生,并形成由色素上皮和神经视网膜组成的视网膜结构^[22];利用胚胎干细胞通过拟胚体形成非神经外胚层和下丘脑神经外胚层的相互作用,形成有功能的腺垂体结构^[23]。这些过程为研究组织形成及形态发生提供新的途径,也为由多能性干细胞得到复杂组织进行组织移植开辟了道路。

利用安全有效的方法获得患者特异性的多能性干细胞,并由这些多能干细胞得到成熟的,有功能的细胞或具有复杂三维结构的组织用于细胞和组织移植,这是再生医学研究的主要方向。我们欣喜地看到这个领域的快速进展,也看到这个领域存在的问题和挑战,但这些挑战也是研究进展的巨大机遇。

参 考 文 献

- 1 Buecker C, Geijsen N. Different flavors of pluripotency, molecular mechanisms, and practical implications [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(5): 559-564.
- 2 Nagy A, Diaz EM, Prideaux VR, et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse [J]. *Development*, 1990, 110(3): 815-821.

- 3 Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. *Nature*, 2009, 461(7260): 86-90.
- 4 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell-line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem-cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, 78(12): 7634-7638.
- 5 Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem-cell differentiation by purified polypeptides [J]. *Nature*, 1988, 336(6200): 688-690.
- 6 Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal [J]. *Nature*, 2008, 453(7194): 519-625.
- 7 Buehr M, Meek S, Blair K, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts [J]. *Cell*, 2008, 135(7): 1287-1298.
- 8 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-1147.
- 9 Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2007, 448(7150): 196-199.
- 10 Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-813.
- 11 Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer [J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 497-502.
- 12 Meng L, Ely JJ, Stouffer RL, et al. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer [J]. *Biol Reprod*, 1997, 57(2): 454-459.
- 13 Noggle S, Fung HL, Gore A, et al. Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state [J]. *Nature*, 2011, 478(7367): 70-75.
- 14 Pereira CF, Piccolo FM, Tsubouchi T, et al. ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(6): 547-556.
- 15 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.
- 16 Tong M, Lv Z, Liu L, et al. Mice generated from tetraploid complementation competent iPS cells show similar developmental features as those from ES cells but are prone to tumorigenesis [J]. *Cell Res*, 2011, 21(11): 1634-1637.
- 17 Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy [J]. *Nature*, 2012, 481(7381): 295-305.
- 18 Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2010, 467(7313): 285-290.
- 19 Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2011, 474(7350): 212-215.
- 20 Liu L, Luo GZ, Yang W, et al. Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19483-19490.
- 21 McCracken KW, Howell JC, Wells JM, et al. Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells in vitro [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(12): 1920-1928.
- 22 Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture [J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 51-56.
- 23 Suga H, Kadoshima T, Minaguchi M, et al. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture [J]. *Nature*, 2011, 480(7375): 57-62.

(收稿日期 :2012-06-13)

(本文编辑 :洪权 谢院生)

周琪,夏宝龙. 多能性干细胞与再生医学[J/CD]. 中华肾病研究电子杂志, 2012, 1(2): 84-86.