

体细胞重编程逆转为干细胞的研究进展

邱小燕¹⁾ 李跃民^{2)*}

(¹⁾西南大学动物科技学院, 重庆 400715; ²⁾西南大学胚胎工程实验室, 重庆 400715)

摘要 目前细胞和发育生物学上的研究成果为生物医学研究提供了广泛的前景. 将完全分化的细胞重编程, 不经过胚胎逆转为多能干细胞状态, 这点燃了再生医学应用的新希望, 这一成果从法律、道德、伦理等不同方面被人们所接受. 通过体细胞克隆胚胎获得干细胞所面临的破坏胚胎的伦理限制, 促使研究者去寻求将分化细胞重编程逆转为干细胞的新方法. 主要论述了体细胞重编程的原理、过程及不经过胚胎逆转为多能干细胞的方法.

关键词 体细胞, 重编程, 干细胞

学科分类号 Q291

多能干细胞是指有能力分化成各种特殊细胞类型的细胞. 一般而言, 尽管各种体细胞最初都是由胚胎细胞发育而来, 但是前者不具有再发育成其他类型体细胞的能力. 然而, 如果能够消除这些体细胞的“记忆”, 那么它们就有可能恢复到胚胎细胞的状态——科学家称之为把细胞“重编程”或“重塑”. 把通过“重编程”得到的干细胞在不同的环境条件下进行培养, 就能得到各种分化细胞.

对如何将体细胞重编程逆转为多能干细胞这一问题已困扰科学家多年. 通常所说的体细胞核移植(SNCT)即将体细胞核移入去核卵母细胞中, 移核后会经历一个重编程的过程. Wilmut等^[1]证明了通过SNCT可获得囊胚, 并且从获得的囊胚内细胞团(ICM)可分离到干细胞^[2]. 体细胞核移植胚胎分离干细胞的研究为体细胞在卵母细胞胞质作用下可重编程到多能干细胞状态提供了有效的证据. 目前, SCNT在很多物种上都获得了成功, 但克隆胚胎的发育率较体外受精或体内正常受精获得的胚胎要低得多, 其原因有很多. 但广泛认为的一个主要原因是供体细胞核的不完全重编程^[3]. 已分化细胞核移植到卵母细胞胞浆, 需要重编程以恢复正常的胚胎发育能力. 核不全重编程是克隆动物妊娠高流产率及产后高死亡率的原因, 也可能是重构胚胎干细胞分离诱导效率低的原因^[4].

尽管通过核移植可获得干细胞, 但这涉及到胚胎的破坏, 有伦理道德的限制. 因此科学家们设

想, 如果核移植后能产生无生育能力的胚胎, 从中获取干细胞是一种新的方法. Niwa等^[5]报道, 从Cdx2基因敲除胚胎获得了ESC. Cdx2是最早知道的滋养外胚层(TE)所特有的基因, 它干扰Oct-4转录的调节, 因此敲除Cdx2不能形成TE但可以形成正常的ICM. 美国科学家称这种方法为“修正转移技术”, 即使卵母细胞可以发育成胚泡, 但胚泡却没有能力在子宫内继续生长, 也不可能成为未来的生命, 因此从这种胚泡分离到的ESC不存在破坏胚胎一说. 但这一做法在胚胎形成的伦理道德上仍有争议. 于是科学家们开始寻求不通过胚胎将分化细胞重编程直接逆转为干细胞的新方法.

1 体细胞核移植胚胎核的重编程(重塑)

核重编程是指核移植后供体核停止本身的基因表达程序, 恢复为胚胎发育所必需的胚胎化基因表达程序状态. 核移植完成后, 核重编程立即开始进行, 其过程包括染色体结构重建、DNA甲基化、组蛋白乙酰化、印记基因表达、端粒长度恢复、X染色体失活等^[6]. 经过核重编程供体核的基因重新归零, 由分化状态恢复为未分化的初始基因表达状态.

* 通讯联系人.

Tel: 13608317936, E-mail: lym@swu.edu.cn

收稿日期: 2007-08-17, 接受日期: 2007-09-27

1.1 重塑基因表达

染色质重塑, 尤其是 DNA 分子和组蛋白的修饰在 ESC 和胚胎研究中日益深入. 核重编程属于表观遗传修饰, 包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰等.

1.1.1 DNA 甲基化. 甲基化是调节核重编程的一个重要因素. 甲基化水平变化最强烈的阶段是配子形成和早期胚胎发育阶段. 对移植前胚胎不同阶段甲基化状态进行整体研究表明, 父源性和母源性配子强烈的去甲基化发生在受精后的早期胚胎, 特别是从 8 细胞阶段向胚泡发育阶段^[7]. 尽管对早期胚胎去甲基化的生物学意义还不清楚, 但这些去甲基化过程是消除配子特定甲基化方式的差别, 以及在正常发育起始前对基因组进行重定格所必需的. 一般来说, 整个基因组范围的去甲基化过程是哺乳动物早期胚胎发育所特有的. 早期胚胎的核重编程消除了配子遗传自父母特定的甲基化方式. 整个基因组范围的去甲基化过程对形成多能干细胞至关重要, 而多能干细胞在后期发育中起重要作用. 在移植后的发育时期, 整个基因组进行甲基化, 多数基因组 DNA 在某一特定的发育时间点进行甲基化. 另一核重编程的去甲基化和重新甲基化发生在配子形成时期, 它是重新进行基因组印迹所必需的. 因此, 基因组 DNA 的动态变化是哺乳动物胚胎发育阶段所必需的和特有的. 成功的核移植动物克隆需要将供体细胞核重编程为全能的、胚胎化的状态, 这意味着供体核必须停止本身的基因表达程序, 恢复为正常发育所必需的特定的胚胎表达程序状态.

1.1.2 合子型基因的重新激活. 供体染色质的重编程导致合子型基因的重新激活^[8], 包括对胚胎发育所必需的胚胎化基因的活化和对供体核本身基因表达的抑制. 这需要正常的基因调控来保证胚胎发育、ICM 和滋养层的产生, 其中维持多能性的必需基因的活化是体细胞重编程逆转为多能干细胞的關鍵. Oct-4 为 POU 家族的转录因子^[9], POU 家族转录因子都有一个保守的 DNA 结合结构域——POU 结合域. Oct-4 含有家族的保守区, 其 N 端和 C 端各有一个脯氨酸富集区, 这些脯氨酸富集区是 Oct-4 因子的转录活性区. Oct-4 因子能特异地识别八聚体序列 (ATTTGCAT) 和一个 AT 富集序列 (TTAAATTCA), Oct-4 转录因子就是因能与含八聚体模体的 DNA 结合而命名的, Oct-4 转录因子正是通过结合到八聚体模体上而调节基因的转录.

目前实验表明, Oct-4 是植入前胚胎发育的重要调节因子. 在小鼠胚胎发育过程中, 小鼠成熟的

卵母细胞具有 Oct-4 活性, 受精后在 2 细胞~4 细胞胚胎阶段, 在所有卵裂球胞质中 Oct-4 蛋白的表达水平降低^[10]. 在 4 细胞胚胎阶段 Oct-4 的表达被激活, 到桑椹胚, 在所有胚胎细胞核中的 Oct-4 蛋白高水平表达^[11]. 到囊胚时期, Oct-4 蛋白只在 ICM 中维持较高的水平, 而在滋养层细胞中表达下降^[10], 最后只在原始生殖细胞中表达. 在体外, Oct-4 只在未分化的胚胎干细胞(ES 细胞)、胚胎癌细胞(EC 细胞)和胚胎生殖细胞(EG 细胞)中表达, 当这些细胞被诱导分化为体细胞时, Oct-4 表达下降^[9], 由此可见, Oct-4 在哺乳动物胚胎发生中是一个关键的调控因子, 而且可能在维持细胞的全能性及未分化状态中起着重要的作用. Niwa 等^[12]实验结果表明, Oct-4 是细胞全能性的标志, 它能够促使 ICM 形成、维持胚胎干细胞未分化状态并促进其增殖, 并且精确水平的 Oct-4 表达对于维持 ES 细胞的正常自我更新是至关重要的. 因此 Oct-4 的活化被认为是重编程为多能干细胞的标志, 然而 Jiang 等^[13]研究表明, Oct-4 在间充质干细胞中低水平表达, 说明 Oct-4 不是维持多能性的唯一基因.

Chambers 等^[14]研究表明, Nanog 在 ESC 中也表达并且是维持多能性和自我更新必需的, 然而对 Nanog 表达的调控还未完全阐明.

1.2 重塑核结构

细胞核膜包含有 A、B、C 三种核纤层蛋白 Lamin. Hutchison^[15]发现 A-Lamin 存在于几乎所有的分化细胞中, 表明 A-Lamin 可能与细胞分化有关. 进一步研究表明, 在胚胎形成过程中, 2~4 细胞阶段 A-Lamin 低水平表达, 在囊胚期未检测到其表达, 在核移植囊胚同样未检测到其表达, 说明核移植胚与正常受精胚一样发生了 Lamin 的重塑.

另外, 卵母细胞卵浆中含有充分的减数分裂促进因子(mitosis. Promoting factor, MPF)和有丝分裂原蛋白激活激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)^[16], 这两种因子是促进核重编程进行的有效因子. 卵浆对供体核的重编程涉及对细胞结构的修饰, 这些修饰是表观遗传学改变, 细胞的基因组成并未改变. 因此供体核的表观遗传状态限制了 SCNT 后卵母细胞对供体核的重编程能力. 因此在探求体细胞逆转为干细胞方法时必须考虑到体细胞的表观遗传修饰.

另外, 卵母细胞重编程供体核并使其成功发育, 在很大程度上还与供体细胞类型有关. 研究表

明供核细胞分化程度越低,核重编程的效率越高. Hochedlinger 和 Jaenisch 等^[17]将供体核依次通过两个去核卵母细胞,表明对一些终末分化细胞连续多次的重编程是必需的.

2 细胞质重编程——miRNA

除了核重编程作为一种改变基因表达的模式,研究表明胞质重编程也能改变细胞蛋白质的合成. Bartel^[18]证明了小分子 RNA 在翻译调节中有重要作用. miRNA 最早发现于线虫,是一类约 22 nt 的小分子非编码单链 RNA,通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区(3' UTR)不完全互补配对,抑制 mRNA 的翻译或影响 mRNA 的稳定性,减少蛋白质的表达^[19]. miRNAs 具有以下特点: a. miRNAs 在物种进化中相当保守; b. 只在特定的组织和发育阶段表达,可作为某些特定细胞的分子标志; c. 在不同发育阶段、分化进程中出现特定的 miRNA,能够决定细胞的分化方向以及分化时相.

干细胞被认为有分化能力,因此在分化过程中必然伴随着 miRNA 的变化. 现有的研究已证实:胚胎干细胞中存在某些独特的 miRNA,可以作为未分化的标志^[20]; miR-181 控制哺乳动物造血细胞分化为 B 细胞^[21]; 4miR-124a 和 miR-9 在胚胎干细胞向神经元和胶质细胞分化过程中发挥重要的调节作用^[22]等. 在发育过程中 miRNA 通过关闭或开放基因表达,指导细胞定向分化并决定细胞命运. Boyer 等^[23]发现,细胞中 miRNA 成分的改变能提高细胞对调节基因表达重编程的外源因子如 Oct-4、Sox2、Nanog 等转录因子的反应.

3 体细胞重编程不经过胚胎逆转为多能干细胞的方法

3.1 多能干细胞与体细胞融合

异核体是指包含两个独立细胞核的两细胞的融合体. 融合细胞被广泛使用来重编程体细胞. Takagi 等^[24]将胚胎癌细胞(EC)与体细胞融合能重新活化失活的 XC,表明多能细胞有很强的重编程体细胞的能力. Tada 等^[25]将胚胎生殖细胞与胸腺细胞融合,发现在某些 DNA 位点发生了甲基化. Do 和 Scholer 等^[26]将去核 ESC 与神经细胞融合,发现 Oct-4 未活化,然而用有核 ESC 融合后 Oct-4 被重新活化,表明 ESC 的核在重编程中是必需的. Cowan 等^[27]报道,用病毒和聚乙烯乙二醇使 ESC

与皮肤成纤维细胞融合,获得稳定杂交细胞,这种杂交细胞的分裂方式、细胞周期等与 ESC 几乎一样,拥有 ESC 的特征物质并能在一定药物诱导下分化为各种组织细胞,他们认为这一新型细胞产生的原因是 ESC 将皮肤细胞的细胞核“重编程”.

3.2 通过特定基因的表达将体细胞重编程逆转为干细胞

Takahashi 和 Yamanaka 等^[28]使用一种逆转录病毒载体,将 4 种转录因子的基因副本即 Oct-4、Sox2、C-Myc、Klf4 导入小鼠皮肤成纤维细胞中,发现细胞最终会具有类似干细胞的功能,这种仿制的 ESC 被称为“被诱导的多能干细胞”(iPS). 实验证明,iPS 细胞功能几乎和 ESC 一样,表达 ESC 的各种表面标记,可以分化为各种组织细胞. 但此实验还有很多问题有待解决: a. 尽管 iPS 细胞具有多能性,但不完全等同于 ESC. iPS 细胞注入囊胚后会产生非正常嵌合体胚胎,这种胚胎植入子宫后无法继续正常发育. b. 基因表达模式与 ESC 还存在一些不同. c. 因为 4 种转录因子是通过逆转录病毒载体持续表达来转导的,而研究表明,在皮肤成纤维细胞转变成 iPS 细胞过程中,伴随载体编码转录因子的逐渐沉默(甲基化),所以 iPS 细胞多能性的维持是否需要载体的持续表达有待研究.

d. 效率很低,重组率只有 0.1%.

3.3 多能细胞的提取物与体细胞共孵育

Taranger 等^[29]的研究表明,使用多能细胞的提取物来诱发体细胞重编程,能驱动体细胞新的基因表达模式. 这种方法目前被用于 293T 细胞和 NIH3T3 成纤维细胞的去分化,这些细胞与多能细胞的提取物共孵育,可使其重编程,重新去分化为多能细胞. 其重编程涉及染色质的表观遗传修饰,包括特殊基因的表达、组蛋白乙酰化等.

4 结 语

本文讨论了诱导体细胞重编程的不同方法. 将完全分化的细胞重编程,不经过胚胎逆转为多能干细胞状态使科学家能找到无须毁灭胚胎而得到胚胎干细胞的途径,不再因伦理道德问题而束缚探索真理的手脚,其重编程涉及细胞结构的重塑,染色质表观遗传的修饰以及转录、后转录调节因子的表达. 重编程体细胞最终能重新诱导进入特异分化模式,生成另外的分化细胞,然而重编程后细胞的命运仍需进一步探索.

参 考 文 献

- 1 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385** (6619): 810~813
- 2 Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, *et al.* Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*, 2001, **292**(5517): 740~743
- 3 Campbell KHS, Alberio R. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reproduction*, 2003, **61**(Suppl): 477~494
- 4 李雁, 冯云, 孙贻娟. 体细胞核移植后核重编程的影响因素. *生命科学*, 2006, **18**(4): 355~360
Li Y, Feng Y, Sun Y J. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2006, **18** (4): 355~360
- 5 Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, *et al.* Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 2005, **123**(5): 917~929
- 6 Piedrahita J A, Mir B, Dindot S, *et al.* Somatic cell cloning: the ultimate form of nuclear reprogramming. *J Am Soc Nephrol*, 2004, **15**(5): 1140~1144
- 7 Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*, 1987, **99**(3): 371~382
- 8 胡炜, 汪亚平, 朱作言. 核移植后的细胞核再程序化机制研究进展. *遗传学报*, 2003, **30**(5): 485~492
Hu W, Wang Y P, Zhu Z Y. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30**(5): 485~492
- 9 Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998, **95**(3): 379~391
- 10 Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, **418**: 41~49
- 11 Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, **113**(5): 643~655
- 12 Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cell. *Cell Struct Funct*, 2001, **26**(3): 137~148
- 13 Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, **418**(6893): 41~49
- 14 Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, **113**(5): 643~655
- 15 Hutchison C J. Lamins: building blocks or regulators of gene expression?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, **3**(11): 848~858
- 16 Miyoshi K, Ruzicidlo S J, Pratt S L, *et al.* Improvement in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *BiolReprod*, 2003, **68**(4): 1079~1086
- 17 Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 2002, **415**(6875): 1035~1038
- 18 Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281~297
- 19 Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418**(6894): 244~251
- 20 Suh M R, Lee Y, Kim J Y, *et al.* Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, 2004, **270**(2): 488~498
- 21 Chen C Z, Li L, Lodish H F, *et al.* MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, **30** (5654): 83~86
- 22 Krichevsky A M, Sonntag K C, Isacson O, *et al.* Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*, 2006, **24**(4): 857~864
- 23 Boyer L A, Lee T I, Cole M F, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, **122**(6): 947~956
- 24 Takagi N, Yoshida M A, Sugawara O. Reversal of X-inactivation in female mouse somatic cells hybridized with murine teratocarcinoma stem cells *in vitro*. *Cell*, 1983, **34**(3): 1053~1062
- 25 Tada M, Tada T, Lefebvre L, *et al.* Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO Journal*, 1997, **16**(21): 6510~6520
- 26 Do J T, Scholer H R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells*, 2004, **22**(6): 941~949
- 27 Cowan C A, Atienza J, Melton D A. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005, **309**(5739): 1369~1373
- 28 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, **126**(4): 663~676
- 29 Taranger C K, Noer A, Sorensen A L, *et al.* Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, **16**(12): 5719~5735

Progress in Reprogramming Somatic Cells Into Stem Cells

QIU Xiao-Yan¹⁾, LI Yue-Min^{2)*}

¹⁾ College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

²⁾ Embryo engineering Laboratory, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract Recent scientific achievements in cell and developmental biology have provided unprecedented opportunities for advances in biomedical research. The demonstration that fully differentiated cells can reverse their gene expression profile to that of pluripotent cells, and the successful derivation and culture of human embryonic stem cells (ESCs) have fuelled hopes for applications in regenerative medicine. Ethical issues concerning the use of cloned human embryos for the derivation of stem cells have stimulated the search for alternative methods for reversing differentiated cells into pluripotent cells. The present state of these reprogramming technologies will be reviewed and their relative success will be discussed.

Key words differentiated cells(somatic cells), reprogramming, pluripotent cells(stem cells)

*Corresponding author.

Tel: 13608317936, E-mail: lym@swu.edu.cn

Received: August 22, 2007 Accepted: September 27, 2007