

诱导多能干细胞技术的生命伦理分析

孟凡芹^① 曲鑫建^② 朱 泓^③

摘要:诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是通过向分化的体细胞转入特定的外源转录因子进行重编程,从而获得具有自我更新能力和多能性的细胞。iPSCs 具有形成体内所有细胞类型的潜能,尤其是能以患者自身体细胞制备 iPSCs,可用于特定疾病的治疗,规避了异体移植引发的免疫排斥风险以及伦理和法律冲突等问题,在基础研究和临床应用都有广阔的应用前景。目前,在重编程体细胞为 iPSCs 的过程中,由于细胞来源不同,所采用的基因组合以及转基因方式各不相同,获得的 iPSCs 具有潜在的致癌性等安全隐患,导致 iPSCs 的临床应用面临新的生命伦理挑战。

关键词:诱导多能干细胞,胚胎干细胞,生命伦理

中图分类号:R-052 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-0772(2013)08-0048-03

Research on Bioethical Issues of Induced Pluripotent Stem Cells MENG Fan-qin, QU Xin-jian, ZHU Hong. *Research Center for Higher Education, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China*

Abstract: Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are derived from somatic cells by ectopic expression of a few transcription factors that have the ability of self-renew indefinitely and to differentiate into all cell types of an organism. The generation of patient-specific iPSCs provides an invaluable resource for regenerative medicine that can circumvent both the practical and ethical concerns, such as immune rejection of all organ grafts, ethical and legal conflicts in embryonic stem cells (ESCs) study, etc. Therefore, iPSCs have received widespread attention in basic and clinical research and holds tremendous potential for pharmacologic and medical applications. Although the generation of iPSCs has been proved as a robust technology, there are potential carcinogenicity and safety risk remain to be addressed for iPSCs in the clinical applications as result of the iPSCs generation methods, the original cell types and optimal culture conditions during reprogramming process.

Key Words: induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells, bioethics

自 2006 年,Yamanaka^[1]首次在 *Cell* 杂志上报道了使用反转录病毒载体将 4 个基因(*Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *c-Myc*)转入小鼠成纤维细胞中重编程具有胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)特性的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)新技术。2007 年,Yamanaka^[2] 研究组使用同样的 4 因子组合和 Thomson^[3] 研究组使用另外的 4 因子组合(*Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 和 *Lin28*)都将人的体细胞成功地重编程为 iPSCs,分别发表在 *Nature* 杂志和 *Science* 杂志上,由此,iPSCs 开始进入了干细胞研究的前沿领域。由于这项技术不使用卵细胞和胚胎等物质,重编程终末分化细胞使其转变为多能干细胞,打破了细胞命运发生逆转必须使用核移植技术或胚胎物质的传统认知,成为细胞重编程领域的重大突破,使得 iPSCs 的研究处于国际上干细胞领域的热点领域。

iPSCs 技术的建立,不仅可以在基础研究中为研究转录因子影响细胞分化潜能机制以及正常发育提供独特的工具;还可在体外重现疾病发生发育过程,有助于

医疗工作者了解疾病在细胞病理学和形态学变化,以便更准确的诊断和药物筛选工作。重要的是,iPSCs 技术可以直接将患者体细胞转变为多能干细胞,规避了胚胎干细胞及成体干细胞研究面临的一些生命伦理和法律冲突,同时解决了干细胞临床应用中细胞异体移植免疫排斥的技术难题。但由于 iPSCs 建立过程中有潜在的致癌性等问题,导致 iPSCs 的临床应用面临诸多障碍。

1 诱导多能干细胞技术的生命伦理解蔽

干细胞技术在为人类生命健康服务和给社会医学发展带来动力的同时,也警示任何企图以破坏胚胎来获取干细胞或开展克隆人的研究,都有悖于正常社会医学发展,并给人类社会造成伦理道德的恐慌^[4]。所以,因 ESCs 来自于胚胎而产生相应的伦理论争及其治疗性克隆与克隆人只差一步的法律禁区使 ESCs 的研究备受阻碍。

与经典的 ESCs 技术和克隆技术不同,iPSCs 具有形成体内所有细胞类型的潜能,尤其是能以患者自身体细胞制备 iPSCs 用于特定疾病的治疗,规避了异体干细胞移植引发的免疫排斥风险以及伦理和法律冲突等问题,在基础研究和再生医学领域都具有广阔的应用前景。

最初,通过转基因技术将 4 种~6 种基因转入小鼠

①大连理工大学高等教育研究中心 辽宁大连 116024

②大连理工大学化学与环境生命学部 辽宁大连 116024

③大连理工大学教务处 辽宁大连 116024

成纤维细胞和人皮肤成纤维细胞使其转变为 iPSCs,再诱导 iPSCs 分化为造血前体细胞,成功治疗了镰状红细胞贫血,从理论和实践上为人类单基因遗传病的治疗奠定了基础^[5];发展到 3 种基因或更少基因将鼠和人成纤维细胞重编程为更安全的 iPSCs,并证实鼠 iPSCs 来源的多巴胺能神经元移植进帕金森病大鼠脑内,可有效缓解其症状和改善其行为,说明 iPSCs 对复杂疾病治疗的可能性。随着技术方法的改进,从应用慢病毒载体、腺病毒载体到应用转座子、质粒以及小分子化合物等方法^[6],除了可将终末分化的鼠成熟 B 细胞、鼠胰腺 β 细胞、小鼠成年肝细胞和胃细胞、神经干细胞、人脂肪细胞和人角质细胞转变为 iPSCs^[7];还能由重症肌无力病人体细胞制备的 iPSCs 可在体外定向诱导分化为运动神经元^[8],以及移除外源基因的人 iPSCs 成功诱导成多巴胺能神经元,为帕金森氏症的治疗带来福音;从 iPSCs 诱导来的内皮前体细胞和内皮细胞成功治疗血友病,从实践上为人类单基因遗传病治疗奠定了基础^[9]。

2 诱导多能干细胞技术潜在的伦理挑战

iPSCs 技术被誉为继克隆技术、ESCs 技术之后再生医学领域的第三次技术革命。但是在 iPSCs 建立过程中,由于转录因子的转化效率较低、可预测性较差、存在潜在的致癌性等诸多问题,导致 iPSCs 的临床应用面临技术、伦理及法律等重重障碍,这引起了学术界的高度关注^[10-12]。

2.1 潜在的致癌性风险

首先,在获得 iPSCs 时,细胞种类、导入的外源基因选择可能导致潜在致癌性风险。iPSCs 具有类似 ESCs 的性能,通过诱导可以定向分化为不同类型的组织细胞。不同来源组织的人 iPSCs 在特定方向的分化潜能方面存在显著的差异,另外长期保存及体外培养的人 iPSCs 也存在染色体不稳定等问题^[13],在分化的特定组织中由于可能残留少量的未分化 iPSCs,造成组织移植后形成畸胎瘤的风险。

实验证明,用不同方法和不同种类的体细胞培育出的 iPSCs 移植后,使实验鼠出现肿瘤的危险性存在很大差异。研究发现,被植入来自成年小鼠尾巴皮肤细胞诱导而来的 iPSCs 的实验鼠,有 83% 体内出现了肿瘤;被植入来自于小鼠胚胎皮肤细胞来源的 iPSCs 的实验鼠中只有 8% 出现肿瘤;而移植来源于成年小鼠的胃细胞的 iPSCs,其体内没有出现肿瘤^[14]。

除了受细胞种类影响外,导入的外源基因选择也可能导致潜在致癌性风险。 $c-Myc$ 基因属于原癌基因,研究发现,利用含有原癌基因重编程体细胞获得的 iPSCs,在未完全分化状态下植入动物体内,产生肿瘤的几率较大;但在原癌基因处于沉默状态时移植,诱导分化后的细胞其增殖速度处于正常状态。人体脂肪间充质干细胞可在使用 *Oct4*、*Sox2* 和 *Klf4*,不使用 $c-$

Myc 基因情况下重编程为 iPSCs,细胞癌化的几率大大降低。Kawamura 等^[15]发现抑制 *P53* 基因表达时仅需导入 *Oct4*、*Sox2* 即可诱导 iPSCs 产生。*P53* 缺失的 iPSCs 转入小鼠胚胎时能产生成体细胞,但因 *P53* 的失活将促进基因组的不稳定性和诱导癌症发生。这种缺失关键肿瘤抑制基因的 iPSCs 所带来的风险可能大于其带来的益处^[16-17]。因此,在获得 iPSCs 时,选择合适的细胞类型与导入的外源因子安全性问题是不容忽视的。

其次,协助传送转录因子的载体选择也有诱发肿瘤的风险。逆转录病毒、慢病毒载体均可能增加病毒感染细胞的风险。这两种载体具有自主整合宿主染色体的特性,常导致插入突变等问题。最初,iPSCs 的产生是使用 4 种病毒载体分别携带 4 种基因感染细胞,宿主细胞基因组的整合位点也因此增多;后来,Mostoslavsky 等^[18]首次实验成功仅用 1 个病毒载体同时表达 4 种转录因子,减少了细胞中病毒整合的位点,也降低了插入突变的概率。此种做法只是降低了诱发肿瘤的风险,并未彻底消解风险。为了彻底摆脱病毒载体插入细胞基因组造成的风险,有人尝试使用较为安全的质粒载体,此种方法,不会导致基因组插入突变,但由于此种方法效率较低,需要质粒的多次反复感染,最终并未得到大范围应用。

规避 iPSCs 技术潜在致癌性风险,需要彻底解决载体插入突变问题。2010 年哈佛医学院等研究机构的研究人员创建核糖核酸诱导多能干细胞(RNA induced Pluripotent Stem cells, RiPSCs)。RiPSCs 因没有被改变宿主基因组,比传统方法获得的诱导多能干细胞更像胚胎干细胞。该方法类似细胞自身基因的转录机制,不会发生基因组整合风险^[19],不会引发技术致癌性。但因该方法制作价格昂贵,需要多次操作,亦限制了其应用。iPSCs 另一重大技术突破是转录因子蛋白质诱导多能干细胞技术^[20]。这种方法类似细胞内部基因的翻译原理,不存在技术致癌性,安全性得到极大的提高。这种方法的弊端,也是制作价格昂贵,操作复杂,仅限于研究阶段。可见,这两种方法规避了载体插入突变问题,也更符合细胞生理“仿生”特点,不会引发技术上致癌性风险。因此,这为 iPSCs 在未来的临床应用,更具有庞大的治疗前景。

此外,由于 iPSCs 技术的潜在致癌性,临床医疗与科研也将面临知情同意的伦理挑战。临床医疗是为改善患者个体健康而进行的医学干预,为特定患者提供诊断治疗或预防手段。在临床医疗中,“那些有一定风险的临床诊断或治疗干预措施需要明确的知情同意”^[21]。在伦理及法律层面上,知情同意权都是医疗主体的基本权利,它是医疗行为合法化的基础。由于 iPSCs 具有潜在致癌性等风险,在临床科研中也将面临知情同意的伦

理挑战。“生物医学研究中涉及人类受试者的知情同意原则,起源于二战后对纳粹惨无人道的人体试验的反思。”^[22]

2.2 面临单性遗传危险

iPSCs 技术规避了 ESCs 研究面临的一些生命伦理和法律冲突以及异体移植免疫排斥等障碍,由于 iPSCs 与 ESCs 的密切双关性,iPSCs 的分化全能性存在被分化为有生殖力配子的可能性,人类又将陷入潜在的单性遗传新的危险。

iPSCs 和 ESCs 一样具有分化全能性,能分化为个体所有组织和器官细胞。iPSCs 不仅在细胞形态、生长特性、干细胞标志物表达等方面与 ESCs 非常相似,而且在 DNA 甲基化方式、基因表达谱、染色质状态、形成嵌合体动物等也与 ESCs 几乎完全相同。从历时性上看,iPSCs 领域研究是建基于 ESCs 研究的,二者具有密切的相关性。在 iPSCs 研究中,不仅借鉴 ESCs 的研究方法,对产生的 iPSCs 进行鉴定与分化潜能进行研究;同时,也以 ESCs 作为对照,观察体细胞重编程为 iPSCs 的效率与效果。研究已经证明,ESCs 在一定条件下可以被分化为有生殖力的配子。如果 iPSCs 也可以被分化为有生殖力的配子,那么它可能分化为精子或卵子。如果 iPSCs 能分化为精子,这意味着女性也可以产生人造精子,未来单性生殖孕育后代将成为可能。这是否超越了人类的道德底线?又将引发新的伦理学与法律的论争^[23]。

3 结语

至此,诱导多能干细胞技术理论上突破了人类已经分化成熟的细胞可以重新编程为具备全能性的胚胎样干细胞,规避了胚胎干细胞异体移植引发的免疫排斥风险以及伦理和法律冲突等问题,在基础研究和临床应用以及再生医学领域都具有广阔的应用前景,为干细胞与再生医学开创了一个全新领域,给予生命学科和人类健康新的希望。21 世纪是生命科学的时代,至于由此引发的新的生命伦理与法律冲突还需要人类付出更多的努力来克服。

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, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2007, 448(7151): 313—317.
- [3] Yu J Y, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858): 1917—1920.
- [4] Rnnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(19/20): 2535—2548.
- [5] Zheng Z, Jian J, Zhang X L, et al. Reprogramming of human fibroblasts into multipotent cells with a single ECM proteoglycan, fibro-
- modulin[J]. Biomaterials, 2012, 33(24): 5821—5831.
- [6] Yang C S, Li Z H, Rana T M. microRNAs modulate iPS cell generation[J]. RNA, 2011, 17(8): 1451—1460.
- [7] Weinacht K G, Brauer P M, Felgentref K, et al. The role of induced pluripotent stem cells in research and therapy of primary immunodeficiencies[J]. Curr Opin Immunol, 2012, 24(5): 617—624.
- [8] Yi F, Qu J, Li M, et al. Establishment of hepatic and neural differentiation platforms of Wilson's disease specific induced pluripotent stem cells[J]. Protein Cell, 2012, 3(11): 855—863.
- [9] Yang S, Bo J, Hu H, et al. Derivation of male germ cells from induced pluripotent stem cells in vitro and in reconstituted seminiferous tubules[J]. Cell Prolif, 2012, 45(2): 91—100.
- [10] Loh Y H, Hartung O, Li H, et al. Reprogramming of T Cells from Human Peripheral Blood[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(1): 15—19.
- [11] Ng J H, Heng J C D, Loh Y H, et al. Transcriptional and epigenetic regulations of embryonic stem cells[J]. Mutation Research, 2008, 647(1/2): 52—58.
- [12] Bhutani N, Brady J J, Damian M, et al. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation[J]. Nature, 2010, 463(7284): 1042—1057.
- [13] Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, et al. Characterization of human embryonic stem cells lines by the International Stem Cell Initiative[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(7): 803—816.
- [14] 陈晓晓, 苗向阳, 王建民, 等. 诱导性多能干细胞研究的新进展[J]. 生物学通报, 2011, 46(3): 1—4.
- [15] Kawamura T, Suzuki J, Yunyuan V W, et al. Linking the p53 tumor suppressor pathway to somatic cell reprogramming[J]. Nature, 2009, 460(7259): 1140—1144.
- [16] 杨梦哈, 化冰, 池亚菲, 等. 诱导多能干细胞研究进展[J]. 生物科学进展, 2012, 43(1): 37—40.
- [17] Qu X J, Liu T Q, Song K D, et al. Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Human Ddipose-Derived Stem Cells Using a Non-Viral Polycistronic Plasmid in Feeder-Free Conditions[J]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e48161.
- [18] Sommer C A, Stadtfeld M, Murphy G J, et al. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette[J]. Stem Cells, 2009, 27(3): 543—549.
- [19] Warren L, Manos P D, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(5): 618—630.
- [20] Rhee Y H, Ko J Y, Chang M Y, et al. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease[J]. J Clin Invest, 2011, 121(6): 2326—2335.
- [21] 翟晓梅. 临床医疗和临床科研中的知情同意问题[J]. 基础医学与临床, 2007, 27(1): 108—112.
- [22] 陈元芳, 邱仁宗. 生物医学研究伦理学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003: 7.
- [23] 丘祥兴, 胡庆澧, 沈铭贤, 等. 干细胞研究与应用中伦理问题的再调查: 结果与建议[J]. 医学与哲学: 人文社会医学版, 2010, 31(2): 19—22.

作者简介: 孟凡芹(1976—), 女, 吉林长春人, 博士研究生, 研究方向: 教育管理、科技伦理。

收稿日期: 2013—01—05

修回日期: 2013—06—25

(责任编辑: 杨阳)