

多能干细胞制备方法的研究进展及问题

王 琥^{1*}, 王嘉军¹, 罗中华², 王世雄²

(1. 三峡大学 医学院 病原生物与免疫学系, 湖北 宜昌 443002; 2. 宜都市中医医院, 湖北 宜昌 443000)

摘要:多能干细胞为研究疾病的分子机制、药物筛选及再生医学应用提供理想的细胞来源,然而,当前多能干细胞的来源或制备方法面临众多瓶颈和挑战,本文回顾了多能干细胞制备方法的最新研究进展,为多能干细胞的后续研究提供思路。

关键词:多能干细胞;诱导多能干细胞;上胚层干细胞

中图分类号:Q254 文献标志码:A

Recent advances in the study of pluripotent stem cell generation

WANG Hu^{1*}, WANG Jia-jun¹, LUO Zhong-hua², WANG Shi-xiong²

(1. Dept. of Pathogen Biology and Immunology, Three Gorges University, Yichang 443002;

2. Yidu Traditional Chinese Medicine Hospital, Yichang 443000, China)

Abstract: Pluripotent stem cells provide an ideal cell source for the study of the molecular pathogenesis of disease, drug screening and regenerative medicine applications, however, the current study of pluripotent stem cells is facing many bottlenecks and challenges in cell production. To provide ideas for further study, here, we review recent advances in the study of pluripotent stem cell generation.

Key words: pluripotent stem cell; induced pluripotent stem cell; epiblast stem cell

多能性是指分化为任何类型细胞的能力,胚胎细胞随着分化进程逐渐失去多能性,然而,短暂的多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)可在胚胎发育过程中的不同时间点被捕获,如胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和上胚层干细胞(post-implantation epiblast-derived stem cells, EpiSCs)。迄今,PSC的研究越来越多,主要集中在ESC、EpiSC和重编程领域的iPSC。

1 胚胎干细胞(ESCs)

小鼠和人ESCs的相关研究较多,目前,客观评价其多能性的指标有:1)在非ESCs培养条件下培

养,能够自发分化;2)通过合适培养环境或调节特定基因表达,ESCs能够分化成特定细胞谱系;3)ESCs注入裸鼠体内后能够产生畸胎瘤;4)ESCs注入同种动物囊胚腔中,能够随着胚胎的生长,参与到不同组织器官的发育(包括生殖腺),产生嵌合体。这一特征被用作评估PSCs是否具备多能性的金标准。随后,四倍体补偿分析也被用作评价多能性的一个指标。出于伦理学的考虑,对人类ESCs还不能用于嵌合体进行多能性评价。而对恒河猴等灵长类ESCs进行嵌合体分析时,未能得到嵌合体后代,这一结果无疑会给人类ESCs的多能性蒙上一层阴影。因此,对人类ESCs的多能性还有待深入

收稿日期:2015-06-18 修回日期:2015-09-28

基金项目:国家自然科学基金(81501330);三峡大学人才启动基金(KJ2014B066)

*通信作者(corresponding author):biomed_wang@yahoo.com

研究。ESCs 的研究主要集中在哺乳类动物如人、小鼠和大鼠,虽然对羊、兔、牛和猪,甚至禽类^[1]等动物的 ESCs 也有研究,但都不太成熟,没有得到稳定的 ESCs 系。

虽然利用核移植技术获得小鼠 ESCs 比较成熟,但将核移植技术运用到制备人类 ESCs 时变得困难许多,主要是因为人源核移植胚胎发育至 8 细胞期时就出现停滞,不能形成用于分离内细胞团的囊胚。核移植胚胎发育停滞究竟是因为人卵母细胞重编程活力低,还是核移植技术本身存在缺陷,尚不明确。尽管将 MII 期人卵母细胞部分去核并植入人体细胞核后,能够发育至囊胚,也获得了三倍体多能性 ESCs,但仍不清楚为何基于小鼠的核移植方法运用到人类核移植时就出现困难。根据灵长类细胞核移植经验^[2],将核移植的实验步骤进一步优化后,尝试直接的人体细胞核移植,得到的核移植胚胎经咖啡因处理后,能够继续发育并形成囊胚,进而得到了人类核移植 ESCs^[3],且利用核移植方法获得的 ESCs 具有更强的自我更新和分化能力^[4],这就说明核移植技术还有它的优势所在。

2 单倍体胚胎干细胞

基于青鳉鱼单倍体 ESCs 和小鼠孤雌单倍体 ESCs 的研究,说明利用核移植技术也可能得到相应的孤雄单倍体 ESCs。将小鼠精子头部注入去核的卵母细胞后,能够继续发育成孤雄单倍体囊胚,随后利用单倍体 ESCs 的建系方法结合流式分选技术,最终建成孤雄单倍体 ESCs 系。这些孤雄单倍体 ESCs 同孤雌单倍体 ESCs 一样,具有典型的多能性特征。孤雄单倍体 ESCs 在体内分化的同时也经历着二倍化的恢复。将孤雄单倍体 ESCs 技术与基因定点修饰新技术 CRISPR-Cas 系统相结合,实现了大鼠的单个或多个基因定点敲除^[5]。

筛选出具有生殖系嵌合的子代是传统基因工程修饰模型动物制备的关键步骤,然而这一过程相当复杂和漫长。单倍体 ESCs 只有一套染色体,单次遗传修饰就能获得相应表型,没有二倍体基因组的显性隐性之分。因此,在遗传筛选方面独具优势,还可以缩短模型动物的制备周期。在临床应用方面,单倍体 ESCs 没有伦理风险。目前,利用常规的 ESCs 技术制备基因工程大型模型动物还有很多困

难^[6]。单倍体 ESCs 技术的成熟将有可能为大型模型动物的制备提供便利。

3 上胚层干细胞(EpiSCs)

胚胎植入后晚期上胚层(epiblast)中的 EpiSCs^[7]与 ESCs 的相同之处在于:都具有自我更新和无限增殖能力;表达 Oct3/4 和 Nanog 等多能性标志物;体外能够形成类胚体;注射入裸鼠体内后能够产生畸胎瘤。两者的不同之处在于:EpiSCs 细胞集落较大呈平坦状克隆,而 ESCs 集落较小呈隆起状克隆;EpiSCs 对胰蛋白酶消化更加敏感;EpiSCs 无碱性磷酸酶活性;EpiSCs 中 Oct3/4 的表达主要依靠近端启动子,而 ESCs 中 Oct3/4 的表达主要依靠远端启动子;EpiSCs 多能性的维持主要依靠 Activin/Nodal 信号通路,而 ESCs 多能性的维持需要 LIF/JAK/STAT 信号通路;最为重要的是 EpiSCs 注射入囊胚后,不能随着组织器官的发育嵌合到各组织或器官中。EpiSCs 的这些特点与人源 ESCs 更为相似,而与鼠源 ESCs 不同,表明 PSCs 的多能性状态可能有原始态和始发态之分^[8]。具有生殖系嵌合能力的鼠源 ESCs 为原始态,而鼠源 EpiSCs 和灵长类 ESCs 则为始发态。

将小鼠囊胚来源的细胞置于 EpiSCs 的培养系统后,得到一种与 ESCs 和 EpiSCs 都不同的细胞,这种细胞表达多能性标志物如 Oct4、Nanog 和 Sox2 等,但在体外不能形成类胚体,在体内不能产生畸胎瘤以及嵌合体。当用 LIF 和 BMP4 蛋白因子诱导后,FAB-SCs 恢复了产生畸胎瘤和嵌合体的能力。这就说明,通过饲养层细胞和 ESCs 培养基等培养条件的驯化,能够使始发态的 EpiSCs 或人源 iPSCs 转化为原始态的 ESCs。此外,通过外源表达相关基因,也能够实现 EpiSCs 和 ESCs 之间的相互转化。如多能性相关基因如 *Klf4* 或 *Nanog* 的高表达,也能够使 EpiSCs 成功转化成为 ESCs,当撤去 ESCs 培养基,换为 EpiSCs 特异性培养基,就可使 ESCs 重新转化为 EpiSCs;生殖相关基因 *Prdm14* 和 *Klf2* 也能够协同加快 EpiSCs 向 ESCs 的转化。研究表明,PSCs 的多能性状态并不一定是稳定不变的,通过改变相应培养条件,不同多能性状态之间可以相互转变^[9]。

区域选择性多能干细胞(region-selective pluripotent stem cells, rsPSCs)^[10]有着与 ESCs 和 EpiSC

不同的典型特征,如高克隆形成能力和低致瘤性。根据转录组、表观遗传组、蛋白质组和代谢水平分析,rsPSCs 与植入后外胚层后部细胞谱系类似,而且利用其体外培养条件能够获得 ESCs 来源的 rsEpiSCs,这一类 PSCs 的发现不仅补充了上胚层干细胞的内涵,而且为胚胎发育和进化及再生医学应用提供理论基础。

4 诱导多能干细胞(iPSCs)

ESCs 的一大特点就是表达多种多能性标志物。然而,这些多能性标志物是多能性产生的原因还是结果,一直未能得到清晰答案。起初的 iPSCs 研究^[11]并未涉及其多能性是否完全与 ESCs 相同。因此,iPSCs 的多能性在一段时间内备受质疑。直到运用多能性检测金标准四倍体补偿技术证实后^[12],这一结果才打消了人们对 iPSCs 多能性的怀疑。活鼠体内的肾、胃、小肠和胰腺等器官内的功能性细胞被重编程至多能性状态后,注射入异体腹腔,能够产生胚胎样结构、表达胚胎和胚外组织基因。这就说明,体内重编程得到的 iPSCs 可能比体外产生的 iPSCs 具有更强的分化潜能^[13],甚至有全能性的趋势。迄今 iPS 技术在人和鼠等哺乳动物中研究较多,在家禽、非哺乳类脊椎动物和无脊椎动物^[14]中也有报道。除人和鼠以外的其他哺乳动物 ESCs 还很难在体外大量扩增以及建系,利用 iPS 技术优化 PSCs 的培养条件,就有可能为其他哺乳动物 ESCs 的建系等研究提供参考。

iPS 技术不像 ESCs 技术那样受到物种的限制,也不受细胞来源的限制。利用大鼠、猪、猕猴和人类来源成纤维细胞、脂肪来源细胞、胰腺 β 细胞、角质细胞和肝细胞等所有终末分化成熟类型细胞或成体干细胞^[15]均可获得 iPSCs。但不同来源和相同来源不同表观遗传学状态^[16]的细胞,其重编程效率可能不同,相同来源但不同分化程度细胞的重编程效率也不相同^[17]。iPS 技术虽不受组织细胞来源和物种限制,但重编程效率可能与细胞的起始状态有关。

iPS 技术是干细胞研究领域的一项重大突破,iPS 细胞的获得无需胚胎参与,从而巧妙的回避了伦理争议。同时,iPS 技术还可以解决所有临床移植前必须经历的难题——免疫排斥反应。利用 iPS 技术可以制备疾病特异性或患者特异性 PSCs,使得

个性化治疗成为可能。但 iPS 技术在大规模临床应用之前,还有一些重要问题需要解决,如:用于导入基因的病毒载体整合到基因组后可能导致突变,或将引起癌症或遗传疾病;此外,目前的重编程效率仍然低下,以及表观遗传学记忆可能导致重编程之前的种子细胞被重新唤起^[17]等。

为解决上述问题,如利用低基因组整合率的腺病毒载体、融合表达质粒、转座子系统、小分子及蛋白转导等方法减少或替换具有潜在插入整合风险的病毒载体方法^[18]。为提高重编程效率,在重编程过程中,可添加具有调控表观遗传作用的小分子化合物(DNA 甲基转移酶抑制剂、赖氨酸特异性去甲基化酶抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂和组蛋白甲基转移酶抑制剂等),以及各种信号通路抑制剂,如 MEK 抑制剂、GSK3 抑制剂、TGF- β 受体阻断剂、钙通道激动剂和 Wnt3a 抑制剂等^[19]。另外,抗氧化剂维生素 C 也能够提高人和鼠 iPSCs 的产生效率^[20]。尽管这些不同类型的小分子能够一定程度地提高重编程效率,但重编程仍然离不开某个特定基因的高表达。据称无需外源基因高表达,仅仅联合 7 种小分子化合物就能成功诱导出 CiPSCs,这些 PSCs 与常规的 iPSCs 具有相似的基因表达谱、表观遗传学修饰及多向分化潜能^[21],这种化学诱导方法无疑是体细胞重编程领域的又一突破。

iPS 技术以及直接转分化技术^[15]都是基于相关转录因子的高表达,这是否意味着种子细胞向目的细胞状态的转变,仅依赖于某几个特异性转录因子呢?新近研究的跷跷板模型理论对体细胞重编程做出了新的解释,分化与干性保持之间就像跷跷板的左右两极,将调控外胚层和中内胚层分化的基因同时高表达,就可以替代体细胞重编程中最为关键的干性因子 Oct4 和 Sox2^[22-23]。这就说明,种子细胞向目的细胞状态的转变不仅仅局限于某一类特定转录因子。卵母细胞和 PSCs 提取物诱导的重编程就说明,通过某些因子调控体细胞的表观遗传学修饰或染色体重塑^[24],进而关闭终末分化相关基因,同时开启多能性相关基因的表达,最终实现体细胞的重编程^[25]。

5 总结

多能干细胞独特的再生能力将为治疗多种疾病带来新的希望,尽管当前有关多能性的评价标准和

实际运用还有很大差距,包括 ESC 和 EpiSC 的来源有限、iPSC 的重编程机制不明、多能性的评价尚未标准化、无法适时准确追踪与控制多能性和多能性维持成本较高等问题,但随着 CRISPR-Cas 基因组编

辑、单细胞测序、三维打印和三维类器官操作等技术的出现,将会成为多能干细胞有关多能性基础研究的得力工具。

参考文献:

- [1] Aubel P, Pain B. Chicken embryonic stem cells: establishment and characterization [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1074:137-150.
- [2] Tachibana M, Amato P, Sparman M, *et al.* Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases [J]. *Nature*, 2013, 493:627-631.
- [3] Tachibana M, Amato P, Sparman M, *et al.* Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell*, 2013, 153:1228-1238.
- [4] Le R, Kou Z, Jiang Y *et al.* Enhanced telomere rejuvenation in pluripotent cells reprogrammed via nuclear transfer relative to induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14:27-39.
- [5] Shuai L, Zhou Q. Haploid embryonic stem cells serve as a new tool for mammalian genetic study [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5:20. doi: 10.1186/sert409.
- [6] Tachibana M, Sparman M, Ramsey C, *et al.* Generation of chimeric rhesus monkeys [J]. *Cell*, 2012, 148:285-295.
- [7] 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, 448:196-199.
- [8] Welling M, Geijsen N. Uncovering the true identity of naive pluripotent stem cells [J]. *Trends Cell Biol*, 2013, 23:442-448.
- [9] Fonseca SA, Costas RM, Pereira LV. Searching for naive human pluripotent stem cells [J]. *World J Stem Cells*, 2015, 7:649-656.
- [10] Wu J, Okamura D, Li M, *et al.* An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency [J]. *Nature*, 2015, 521:316-321.
- [11] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126:663-676.
- [12] Zhao XY, Li W, Lv Z, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. *Nature*, 2009, 461:86-90.
- [13] Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, *et al.* Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features [J]. *Nature*, 2013, 502:340-345.
- [14] Rossello RA, Chen CC, Dai R, *et al.* Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species [J]. *Elife*, 2013, 2:e00036. doi: 10.7554/eLife.00036.
- [15] Guo J, Wang H, Hu X. Reprogramming and transdifferentiation shift the landscape of regenerative medicine [J]. *DNA Cell Biol*, 2013, 32:565-572.
- [16] Wu T, Liu Y, Wen D, *et al.* Histone variant H2A.X deposition pattern serves as a functional epigenetic mark for distinguishing the developmental potentials of iPSCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15:281-294.
- [17] Liang G, Zhang Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13:149-159.
- [18] Deng XY, Wang H, Wang T, *et al.* Non-viral methods for generating integration-free, induced pluripotent stem cells [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2015, 10:153-158.
- [19] Lin T, Wu S. Reprogramming with small molecules instead of exogenous transcription factors [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015:794632. doi: 10.1155/2015/794632.
- [20] Chen J, Guo L, Zhang L, *et al.* Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming [J]. *Nat Genet*, 2013, 45:1504-1509.
- [21] Hou P, Li Y, Zhang X, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds [J]. *Science*, 2013, 341:651-654.
- [22] Shu J, Wu C, Wu Y, *et al.* Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers [J]. *Cell*, 2013, 153:963-975.
- [23] Montserrat N, Nivet E, Sancho-Martinez I, *et al.* Reprogramming of human fibroblasts to pluripotency with lineage specifiers [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13:341-350.
- [24] Østrup O, Hyttel P, Klærke DA, *et al.* Remodeling of ribosomal genes in somatic cells by *Xenopus* egg extract [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412:487-493.
- [25] Halley-Stott RP, Pasque V, Gurdon JB. Nuclear reprogramming [J]. *Development*, 2013, 140:2468-2471.