

## 诱导多能干细胞 (iPS) 的诱导培养与鉴定

成德, 雷蕾, 卢智娟, 李珍, 王华岩

西北农林科技大学动物医学院 陕西省农业分子生物学重点实验室 陕西省干细胞工程技术研究中心, 杨凌 712100

**摘要:** 通过外源转录调控因子的诱导, 使成体细胞重编程为胚胎干细胞 (ES 细胞) 样的多能细胞, 这种细胞称为诱导多能干细胞 (iPS 细胞), 这一方法被称为 iPS 技术。目前, iPS 技术已先后在小鼠、人、猕猴、大鼠和猪中成功应用, 建立了相应的 iPS 细胞系, 并获得了 iPS 细胞嵌合小鼠和四倍体克隆小鼠。尽管 iPS 与 ES 细胞在形态和生长特性上有许多相同之处, 但 iPS 细胞的建立需要较独特的诱导培养体系和鉴定方法。以下结合近年来 iPS 技术的发展和实验室的相关研究, 对 iPS 细胞的建立和培养体系的优化进行了深入探讨。

**关键词:** 诱导多能干细胞, 转录因子, 细胞重编程, 诱导, 胚胎干细胞

## Induction and characterization of induced pluripotent stem (iPS) cells: a review

De Cheng, Lei Lei, Zhijuan Lu, Zhen Li, and Huayan Wang

*Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Shaanxi Center for Stem Cell Engineering and Technology, College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China*

**Abstract:** The somatic cells can be induced into ES-like stem cells when retrovirally infected the defined transcription factors including Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc. These ES-like cells are named induced pluripotent stem (iPS) cells and this method is called iPS technology. Until the end of 2009, iPS cell lines have been generated in various animal species, such as mouse, human, rhesus monkey, rat and pig. Mouse iPS cells are also used to generate chimera mice and viable mice through the tetraploid complementation. Although iPS cells are extremely similar to ES cells in both morphology and growth features, to generate iPS cells do need the defined culture procedures. Based on the update global iPS technology development and the iPS studies in our laboratory, this paper focused on the establishment of iPS cell lines and improvement of iPS cell culture condition.

**Keywords:** iPS, transcription factor, reprogramming, induction, embryonic stem cell

1981年, Evans等<sup>[1]</sup>成功分离出第一株小鼠胚胎干细胞。至今, 胚胎干细胞已成为生命科学领域的热门话题。尤其是人类胚胎干细胞的成功建系为再

生医学的研究开辟了新的途径, 但是免疫排斥和伦理道德问题给胚胎干细胞在临床应用上带来了很大的困扰<sup>[2]</sup>。1997年, 克隆羊多莉的诞生使科学家认

**Received:** October 29, 2009; **Accepted:** March 2, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30871786), High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA101005), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB941002).

**Corresponding author:** Huayan Wang. Tel: +86-29-87080069; E-mail: hhwang101@163.com

国家自然科学基金项目 (No. 30871786), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2008AA101005), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB941002) 资助。

识到, 通过卵母细胞中的母源性表观遗传修饰可以使成体细胞重编程为多能干细胞<sup>[3]</sup>。这种用体细胞核移植技术进行细胞重编程的研究, 由于对设备条件要求高, 操作技术复杂, 阻碍了该技术的广泛应用<sup>[4]</sup>。另外一种进行细胞重编程的技术是将成体细胞与胚胎干细胞进行细胞融合, 使融合后的成体细胞恢复多能性, 但是融合细胞由于核型异常等问题难以应用于临床上<sup>[5-6]</sup>。2006年, 通过对卵母细胞和胚胎干细胞中涉及细胞重编程的细胞因子的深入分析和研究, 日本科学家 Takahashi 和 Yamanaka 研究小组利用 4 个基因转录因子, 成功在体外将成体细胞诱导成为胚胎干细胞样的多能干细胞, 并将其命名为诱导多能干细胞 (iPS 细胞), 而产生 iPS 细胞的方法称为 iPS 技术<sup>[7]</sup>。

## 1 iPS 细胞诱导

2006 年, 日本京都大学 Yamanaka (山中伸弥) 教授所率领的研究小组筛选出了 4 个在胚胎干细胞或肿瘤细胞中高表达的基因转录因子 (Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc, OSKM), 并利用逆转录病毒载体将这些因子转染到小鼠成纤维细胞中。通过这些因子在受体细胞内过量表达, 诱导成纤维细胞去分化, 使成体细胞重编程为多能干细胞, 并将其定义为诱导多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPS)<sup>[7]</sup>。iPS 细胞的主要特征表现为: 能够形成 ES 细胞样的集落, 胞核较大核质比高, 碱性磷酸酶 (AP) 染色呈阳性, 表达内源性 Oct4、Sox2 和 Nanog, 端粒酶活性提高, 能在裸鼠体内形成畸胎瘤等。经基因芯片分析, iPS 细胞的基因表达谱与 ES 细胞相类似, 而与诱导之前的受体细胞明显不同。在小鼠嵌合试验中, 对胎儿进行切片染色, 证明 iPS 细胞在生殖系中嵌合成功<sup>[8-11]</sup>。

最初获得小鼠 iPS 细胞的效率很低, 所采用的技术手段也存在缺陷, 例如采用 *Fbx15* 基因作为诱导标记、在诱导过程中采用药物筛选等。因此, 有研究者甚至怀疑 iPS 细胞是生物体内残留的极少量干细胞经外源基因的诱导激发而产生的多能细胞。但最近几年, iPS 技术得到了迅速发展, 产生了不同

的 iPS 诱导技术, 例如采用 Oct4/Sox2/Nanog/Lin28 (OSNL) 因子诱导等。至今为止, 小鼠、人、猕猴、大鼠、猪等物种都已建立了 iPS 细胞系<sup>[7,12-15]</sup>。而且通过四倍体囊胚嵌合技术, 证实了小鼠 iPS 细胞能发育成为完整的小鼠个体<sup>[16]</sup>。目前, iPS 技术已迅速向医学临床应用方面展开, 特别是在病理模型方面进展显著, 已建立了十多种人类疾病模型的 iPS 细胞株<sup>[17-18]</sup>。不过要将 iPS 技术应用于临床, 还存在如诱导效率低和致瘤性等尚待解决的问题<sup>[19]</sup>。

诱导 iPS 细胞产生的技术手段, 主要有如下几种:

### 1.1 采用载体诱导

最初为了使导入的外源基因能在受体细胞内持续表达, 保证 iPS 诱导的成功, 采用了能高效整合的反转录病毒和慢病毒为载体。但是病毒载体在受体细胞基因组中高效随机的整合也使得到的 iPS 细胞具有很高的致瘤性。为了解决这一问题, 又改用基因整合能力低的腺病毒作为载体进行诱导, 虽然诱导效率明显降低, 但最终成功得到了没有病毒整合的 iPS 细胞<sup>[20]</sup>。而日本一研究小组采用普通质粒作为外源因子的导入载体, 也成功诱导得到了 iPS 细胞。但是与前者类似, 诱导所用的时间要加长, 且效率很低<sup>[21]</sup>。上述这些降低病毒副作用的方法, 使 iPS 技术向临床应用迈进了一大步。

以上研究虽然避免了病毒在 iPS 细胞中的整合, 但是极低的诱导效率极大地阻碍了其在实际研究中的应用。对此, 部分研究小组利用 Cre/LoxP 系统<sup>[22-23]</sup>、oriP/EBNA1 载体<sup>[24]</sup>及 piggyBac 转座系统<sup>[25]</sup>等, 将外源基因整合到受体细胞中诱导 iPS, 然后再将外源基因从 iPS 细胞的基因组中切除, 从而得到不含外源基因整合的 iPS 细胞。

此外, 随着研究的深入, 所需的转录因子的数量也越来越少, 最初筛选出的 4 个转录因子为 OSKM 和 OSNL。在随后的诱导研究中发现可省去具有致瘤性的 c-Myc 因子, 虽然对于诱导的时间和效率有一定的影响, 但在很大程度上降低了 iPS 细胞的致瘤性<sup>[26]</sup>。而诱导本身具有一定多能性的成体干细胞, 只需更少的诱导因子就能得到 iPS, 如以神经干细胞为受体细胞进行诱导, 只要转染 *Oct4* 单个基因就能成功得到 iPS 细胞<sup>[27]</sup>。

## 1.2 采用小分子化合物诱导

最初 iPS 细胞诱导的效率只有 0.01% 左右。为了提高诱导效率, 研究者发现在诱导过程中在培养基中添加小分子化合物, 如: 2-丙基戊酸 (Valproic acid, VPA)、5-氮杂胞苷 (5-AZA)、G9a 组蛋白甲基化转移酶抑制剂 (BIX01294)、钙通道激动剂 (BayK8644) 等, 能促进受体细胞的重编程, 显著提高 iPS 的诱导效率<sup>[28-31]</sup>。这些小分子有的是通过抑制基因组甲基化作用, 直接提高受体细胞被诱导的效率; 有的则通过影响特定的信号通路, 使诱导过程中产生的中间过渡型细胞和部分重编程的细胞转化为稳定的完全的多能干细胞。添加小分子化合物的诱导方法, 使一些低效率的诱导技术, 例如蛋白质因子诱导 iPS 的克隆形成率明显提高<sup>[32]</sup>。小分子化合物诱导剂的出现, 对 iPS 技术走向临床应用起到了显著的推动作用。目前, 越来越多的小分子化合物被发掘出来, 2009 年底报道的维生素 C 促进 iPS 细胞形成就是一例<sup>[33]</sup>。人们期待, 将来能够实现完全采用小分子化合物诱导得到的 iPS 细胞。

## 1.3 采用蛋白质分子诱导

为了避免病毒和外源基因对得到的 iPS 细胞产生的影响, 研究者直接采用以上 4 个转录因子的蛋白质对受体细胞进行诱导<sup>[32,34]</sup>。但是由于蛋白质在细胞内不稳定, 不能持续作用, 因此需要对受体细胞进行多次的蛋白处理。Zhou 等采用隔天多次将受体细胞与外源蛋白进行共培养的方法, 通过特定的信号转导肽将其运送至受体细胞核内发挥作用, 通过 4 轮蛋白因子的处理, 再结合 VPA 的辅助, 才最终成功诱导得到 iPS 克隆<sup>[32]</sup>。而 Kim 等则采用稳定表达四因子融合蛋白的 HK293 细胞的裂解产物诱导人成纤维细胞, 可最初连续 6 d 的诱导处理却引起受体细胞的死亡; 随后通过 16 h 的蛋白诱导处理与新鲜培养液培养 6 d 相结合, 进行反复 6 轮诱导之后才最终得到了 iPS 克隆<sup>[34]</sup>。与之前的实验相似, 蛋白质分子诱导 iPS 细胞的效率极低, 且所需时间很长。因此, 这种方法还需要进一步地探索才有可能在实验中广泛应用。其中特别要解决的问题, 一个是体外大量制备高纯度的蛋白因子, 另一个是使

蛋白因子有效地转运进入细胞内。这两个问题的解决将会使这一方法得到有效的应用。

## 1.4 采用 siRNA 诱导

与小分子化合物诱导相类似, 在四因子诱导的基础上加入对 RNA 翻译水平起特定调控作用的 siRNA 也同样能提高 iPS 的诱导效率, 如 *p53* 基因的 siRNA、*Utl1* 基因的 cDNA、*Wnt3a* 等。研究发现, 它们均可以通过影响与细胞分化和多能性维持相关的一些信号通路, 从而促进诱导过程中受体细胞的重编程, 提高 iPS 诱导效率, 或替代某些诱导因子的使用<sup>[36-37]</sup>。目前, 采用这一方法诱导 iPS 的报道还不太多, 研究人员还在寻找更多有效的 siRNA 干扰片段。

## 2 iPS 细胞诱导培养体系

iPS 细胞的诱导培养就是将分化的受体细胞重编程为多能细胞的过程。进行 iPS 细胞诱导主要涉及以下几个技术要点:

### 2.1 受体细胞的选择

iPS 技术虽然在不同物种的多种细胞上都取得了成功, 但是不同的受体细胞、不同的细胞状态及其传代代数, 对于诱导的效率, 甚至诱导是否能取得成功都有一定的影响。因此, 在实验之初需准备符合要求的受体细胞。

最初, 研究者以胎鼠和成年小鼠的成纤维细胞为受体细胞进行 iPS 诱导, 虽然最终都得到了 iPS 细胞, 但是采用胎儿细胞进行的诱导效率明显要高一些<sup>[7]</sup>。这可能是由于胎儿细胞增殖活力强, 并且甲基化程度较低, 易于重编程。

随后, 以小鼠肝脏细胞、胃表皮细胞、胰腺  $\beta$  细胞, 甚至成熟的 B 淋巴细胞作为受体细胞进行 iPS 诱导也都取得了成功<sup>[38-40]</sup>, 这充分说明了 iPS 技术的普遍适用性, 也证明了各类体细胞都具有被重编程为多能性细胞的潜能。研究发现不同类型细胞来源的 iPS 细胞具有不同的特点, 如肝脏细胞和胃上皮细胞来源的 iPS 细胞其基因组不易被病毒整合, 具有较低的致瘤性<sup>[38]</sup>, 更适合于医学研究的需要。Aasen 等也发现以角质细胞作为受体细胞可显著提

高 iPS 的诱导效率,并能降低病毒在受体细胞基因组上的整合<sup>[41]</sup>。另外,神经干细胞本身表达较高的内源性 Sox2 等因子,当采用 Oct4 一个因子时,也能产生较高效率的 iPS 细胞。因此,神经干细胞可以作为理想的受体细胞<sup>[42-43]</sup>。

不同受体细胞对于诱导效率的差异至今仍没有确切的解释,但是从 iPS 诱导的过程可以认为,这可能是由于不同受体细胞间的表观遗传修饰的差异引起的。不同细胞基因组的甲基化和乙酰化程度各不相同,诱导重编程过程中开启外源基因表达的要求也不一样,如诱导过程中添加甲基化酶抑制剂可以明显提高诱导的效率。同时,有的受体细胞自身

也表达部分的诱导因子,这不仅可以减少外源基因的使用数量,同时也减轻了重编程的负担,进而可以得到较高的 iPS 诱导效率,且减少诱导的时间,例如神经干细胞诱导为 iPS 细胞。

由于取材和培养简便,原代成纤维细胞仍然是 iPS 诱导中最常用的受体细胞。同时,为了确保受体细胞的增殖活力,尽可能使用低代数(3~5代)的原代细胞进行诱导<sup>[44]</sup>。不同类型受体细胞用于 iPS 诱导的结果见表 1。

## 2.2 诱导培养条件

诱导 iPS 细胞的主要培养操作流程见图 1,具体分为以下几个步骤完成:

表 1 用于 iPS 诱导的受体细胞类型

Table 1 Recipient cells used in iPS cell induction

Recipient cell type	Transcription factors	Additional factors	Efficiency	References
Adult mouse fibroblasts	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	-	0.01%	[7, 11, 45]
	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	VPA	2%-3%	[35]
	Proteins of Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	VPA	< 0.001%	[32, 34]
Adult mouse fibroblasts	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	-	0.01%	[7, 45]
	Oct4, Sox2, Klf4	-	< 0.001%	[26]
Mouse B lymphocytes	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	C/EBP $\alpha$	3.0%	[39]
Adult mouse stomach cells	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	-	ND	[38]
Adult mouse liver cells	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	-	ND	[38]
Mouse pancreatic beta cells	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	-	0.1%-0.2%	[40]
Mouse hematopoietic lineage	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	-	ND	[45]
Mouse mesenchymal stem cells	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	-	ND	[45]
Mouse keratinocytes	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	-	ND	[45]
Mouse neural progenitors	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	-	< 3.6%	[31, 43]
	Oct4, Klf4	-	> 0.1%	[42]
	Oct4	-	0.014%	[27]
Human embryonic fibroblasts	Oct4, Sox2, Klf4,c-Myc	Y-27632	< 0.05%	[46]
	Oct4, Sox2, Nanog, Line28	-	< 0.01%	[47]
Newborn fibroblasts	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, SV40 large T	Y-27632	0.02%	[46]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Line28	-	0.1%-0.2%	[48]
	Oct4, Sox2, Klf4	VPA	1.0%	[31]
	Oct4, Sox2, Klf4	-	< 0.001%	[26]
	Oct4, Sox2	VPA	< 0.01%	[31]
Human mesenchymal stem cell	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, SV40 large T	Y-27632	< 0.01%	[46]
Human ES-derived fibroblasts	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, SV40 large T	Y-27632	0.25%	[46]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	Y-27632	0.1%	[46]
Human keratinocytes	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	-	> 1%	[41]

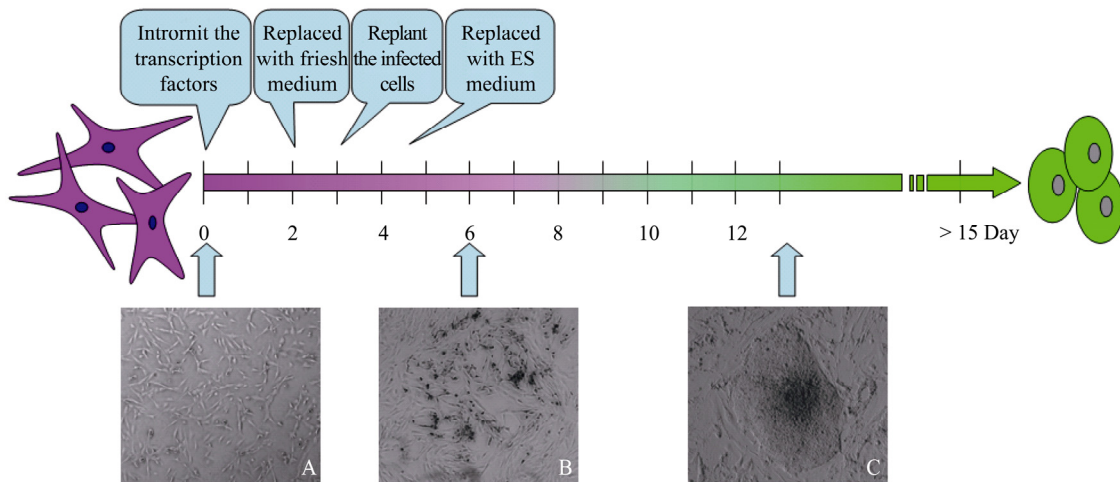


图 1 猪 iPS 细胞诱导培养时间流程

Fig. 1 The procedure of reprogramming porcine somatic cells to iPS cells. (A) The morphology of the porcine fibroblasts before virus infection. (B) The morphology of porcine fibroblasts changed after 6 days after virus infection. (C) The ES-like colony of the porcine iPS 13 days after virus infection.

### 2.2.1 外源转录因子导入

iPS 诱导的起始是将外源基因或者外源基因的表达产物导入受体细胞内, 使其在受体细胞内启动早期胚胎基因组的转录表达。所用的外源基因以 OSKM 为主, 同时增加 Nanog 和 line28 将有助于提高诱导效率<sup>[47]</sup>。

常规的操作是通过病毒载体携带外源基因转染受体细胞, 转染时间为 24~48 h, 可进行第 2 次转染以提高转染效率。为了保证转染效率, 病毒的滴度要求达到  $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  以上, 病毒转染的当天为诱导 0 d。转染后撤去病毒液, 用新鲜的受体细胞培养液继续培养 24~72 h<sup>[44,48]</sup>。然后将转染的细胞铺于 MEF 或 SNL 细胞饲养层上, 在六孔板上细胞的密度为每孔  $5 \times 10^4$  个细胞。生长 24 h 后, 换上 ES 培养液继续培养。但也有人认为, 病毒转染后的细胞不更换新鲜培养液, 直接消化后接于明胶铺底的培养板上可以提高诱导效率, 且不需要饲养层的支持, 这也是诱导过程中认为不需要饲养层的唯一报道<sup>[31]</sup>。对此, 本实验室在研究中发现以上两种处理之间的差异并不显著, 在较短时间内的诱导并不依赖饲养层细胞的支持。对于神经干细胞等能在较短时间内诱导出现 iPS 集落的受体细胞, 可以在病毒转染后直接换上 ES 培养液, 而不进行消化重铺, 在出现集落之后再集落单独接种于饲养层上, 进行下一步

的传代诱导培养<sup>[43]</sup>。

采用逆转录病毒或慢病毒进行诱导<sup>[7,47]</sup>, 会导致 iPS 细胞具有较高的致瘤性, 为此可利用普通的质粒或不整合的腺病毒等作为外源基因的导入载体。鉴于质粒转染效率低, 持续表达时间短, 因此需要反复多次对受体细胞进行转染<sup>[20-21]</sup>。如用质粒进行外源基因的导入, 研究者将 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 三个基因整合到一个载体上, 实现其共表达。转染时将该质粒载体与带有 c-Myc 的质粒载体共转染, 或者反复交替地分别单独转染, 转染要分别进行 3 轮以上, 持续 1 周左右, 从而实现外源基因的高效导入和持续表达, 但最后得到 iPS 克隆的效率不到 0.001%。

同时, 外源基因对受体细胞的诱导重编程似乎不局限于同一物种内, 异源转录因子同样可以诱导受体细胞成为 iPS 细胞<sup>[14]</sup>。可能由于多能性转录因子在不同物种之间具有很高的保守性, 可以调控异种受体细胞基因的表达, 从而启动重编程过程。这在早期异种动物核移植的研究中也可以印证, 但是由于孕期的差异, 个体发育特异性和核质相容等差异, 至今未能成功得到异种克隆动物。

2009 年初, 有两个研究小组分别用四因子表达的重组蛋白诱导小鼠和人成纤维细胞成为 iPS 细胞。研究者将 4 种蛋白质因子带上信号肽, 将其添加到培养基中与受体细胞共培养 12 h, 然后换上新鲜培

养液培养 36 h, 再添加蛋白质因子, 依次重复 4 轮, 需 9 d 左右。然后将细胞重铺到饲养层上继续培养, 并且在诱导培养液中添加甲基化酶抑制剂 VPA<sup>[32]</sup>。而另一研究小组则对受体细胞进行 7 d 一次的蛋白处理, 并且反复诱导 6 轮, 最后才得到 iPS 细胞<sup>[34]</sup>。与质粒诱导的方法相类似, 采用蛋白因子诱导 iPS 的效率很低, 小于 0.001%, 且时间约为病毒诱导的 2 倍左右。

### 2.2.2 诱导后受体细胞的培养

由于诱导 iPS 细胞的过程较长, 所以, 在外源因子导入细胞后, 掌握好对被诱导的受体细胞进行长期的体外培养至关重要。将导入外源基因或其表达产物后的受体细胞接于饲养层后, 第 2 天换成相应的 ES 细胞培养液, 之后每隔 24~48 h 换液, 直至 ES 样克隆出现, 该过程一般需要 15~20 d<sup>[44,48]</sup>。有报道称, 诱导时间至少需要在 10 d 以上, 不然产生的 iPS 细胞可能不具有完全的多能性<sup>[49]</sup>。但更多的研究显示, 克隆出现的时间与受体细胞的年龄和转染因子的数量有关。一般胎儿细胞要比成体细胞出现克隆早, 上皮样细胞所需的诱导时间要比成纤维细胞短一些, 而以神经干细胞为受体细胞则仅仅只需要 3~5 d 就可以出现大量的 ES 样克隆<sup>[43]</sup>。本实验室用猪成纤维细胞为受体细胞诱导猪 iPS (图 1), 在攻毒后 4 d, 受体细胞的生长速度明显加快, 6 d 左右受体细胞会发生明显的形态改变并出现极小的 ES 样克隆, 至 13~15 d, 克隆已长到 100~200  $\mu\text{m}$  大小, 可以对其进行传代培养。而导入较多的转录因子, 如导入 6 个转录因子 (OSKMNL), 同样可以缩短克隆出现的时间, 并提高诱导的效率<sup>[50-51]</sup>。此外, 在诱导培养过程中添加甲基化酶抑制剂等小分子化合物也可以提高诱导的效率, 缩短诱导时间<sup>[35]</sup>。

受体细胞在导入了外源基因后会明显加快增殖速度, 4~6 d 之后则会发生明显的形态改变<sup>[14]</sup>。在诱导过程中发现, 受体细胞往往会在 ES 样克隆出现之前便已长满整个培养皿, 这时需要对其进行传代, 尽管有报道称诱导过程中传代会影响诱导的效率<sup>[31]</sup>, 但是不及时传代将会导致受体细胞大量死亡。在连续传代过程中, 应尽量采用 IV 型胶原酶进行细胞消化, 这样可以除去传代过程中饲养层的干扰<sup>[48]</sup>。

为了便于诱导和筛选, 受体细胞可以带上筛选标记或报告基因。早期的 iPS 诱导均采用了抗性筛选, 即将新霉素基因 (*neo*) 插入到 *Fbx15* 等胚胎干细胞特异表达基因的启动子后面, 并在诱导过程中添加 G418 进行筛选, 最后得到 ES 样的多能性细胞<sup>[7]</sup>。后来, 研究认为 iPS 诱导是一个渐进的过程, 而多能性基因表达的开启需要一定的时间, 在诱导时利用药物筛选可能会杀死部分潜在的重编程细胞, 从而降低了诱导效率。因此, 以后都改用由 *Oct4* 或 *Nanog* 启动子驱动的绿色荧光蛋白 (GFP) 作为报告基因<sup>[35,39]</sup>, 因为以 *Oct4* 和 *Nanog* 多能性基因筛选得到的 iPS 细胞较 *Fbx15* 筛选得到的 iPS 细胞更接近 ES 细胞<sup>[11]</sup>。

从以上不同的诱导方法中可以看出, 外源因子对受体细胞重编程的诱导并不依赖于外源基因对受体细胞基因组的整合, 也不依赖于外源基因本身。只要能够促进受体细胞在复制过程中开启多能性基因的表达即可。而且受体细胞的诱导重编程是一个循序渐进的过程, 需要大约 10~15 个细胞倍增时间。由于逆转录病毒和慢病毒可在受体细胞内持续表达, 因此以其为载体才有较高的诱导效率。而普通质粒, 尤其是蛋白质的诱导, 对受体细胞的诱导作用均是瞬时性的, 因此才需要反复多次的转染或共培养, 从而达到维持一定时间的诱导的目的。且诱导的效率也明显要低得多, 需要更长的诱导时间<sup>[32,34]</sup>。

### 2.2.3 iPS 细胞的传代培养

当原代的 iPS 克隆长到 100~200  $\mu\text{m}$  时, 需要对 iPS 克隆进行传代, 接种到新的饲养层上进行增殖培养。早期传代时, 主要采用机械法, 将克隆单个挑取, 分别消化, 再接种到铺有饲养层细胞的 96 孔板中。等继代克隆传至 5~6 代之后, 便可以采用 IV 型胶原酶消化法对其进行传代培养。从 96 孔板开始, 依次逐渐放大扩增直到接种在 60 mm 培养皿上。在得到足够细胞量之后将其分别冻存, 这样可以保证 iPS 细胞遗传背景的一致性。本实验室经过 3 次传代将单个克隆的 iPS 细胞传代至六孔板中, 待其长满之后便将其部分冻存, 之后消化传代的方法基本与 ES 细胞培养方法相同。挑取较好的克隆之后剩下的

细胞克隆通过碱性磷酸酶 (AP) 染色, 计数, 计算诱导的效率。

如果受体细胞有 GFP 等筛选的报告基因, 那么可以直接挑取 GFP 阳性克隆。也有报道通过流式技术将诱导一定时间的 GFP 阳性细胞先筛选富集, 再进行传代培养<sup>[43]</sup>。但是如果诱导的时间较短, 有可能 GFP 的报告基因要在传代之后才慢慢呈现阳性, 而克隆的形态也会在传代过程中慢慢变得更为典型<sup>[10]</sup>。

此外, 诱导过程中还会产生较多不具有多能性的 ES 样克隆, 这类细胞在形态上与多能性 iPS 细胞相类似, 同样呈集落样生长, 增殖很快。但该类细胞 AP 检测大多呈阴性, 内源多能性基因表达较低, 甚至不表达, 而 c-Myc 等致瘤基因则表达很高。这可能与外源基因的导入和整合的随机性有关, 部分因子的缺失或表达的不一致, 引起受体重编程的不完全所致<sup>[10]</sup>。

### 2.3 iPS 细胞的表现遗传学检测

诱导得到的 iPS 细胞一般要以相应物种的 ES 细胞为参照标准, 从分子、细胞和动物个体水平对其进行系统的检测。包括其多能性细胞特异的标志基因的表达情况, 向 3 个胚层分化的潜能和自我更新能力, 此外还涉及外源基因的沉默, 及 iPS 明确的遗传背景。

#### 2.3.1 分子水平

在分子水平上, iPS 细胞中导入的外源基因表达水平要随着重编程的完成逐渐降低或沉默, 内源的多能性基因表达激活, 基因的选择以 ES 细胞表达的特异性标志为参照。如通过 RT-PCR 检测 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Rex1*、*SSEA1*、*SSEA3*、*SSEA4*、*Tra-1-60*、*Tra-1-81* 等基因的表达情况<sup>[7,13]</sup>。且此类基因在不同物种间的表达不完全相同, 如小鼠的 iPS 一般 *SSEA1* 呈阳性, *SSEA3*、*SSEA4* 呈阴性。而人的 iPS 细胞则正好与之相反, *SSEA1* 为阴性, *SSEA3* 和 *SSEA4* 为阳性<sup>[52]</sup>。此外, 为了明确 iPS 细胞的永生能力, 还需检测其端粒酶活性。

iPS 细胞由体细胞诱导而来, 故还涉及检测其遗传背景的问题, 需通过微卫星技术进行指纹鉴定, 要求与受体细胞一致。如受体细胞内整合有 GFP 等

报告基因, 则亦可以作为其遗传背景的有力证据<sup>[7]</sup>。同时, 还需检测 iPS 细胞中内源的多能性基因启动子的甲基化水平, 如 *Oct4* 和 *Nanog* 是最常用的检测对象。这些基因的启动子在成体细胞中是高度甲基化的, 而在诱导为 iPS 细胞后则去甲基化, 与相应的 ES 细胞相一致, 这也是内源多能性基因表达开启的检测指标之一<sup>[7]</sup>。

此外, 还需检测 iPS 细胞整体的基因表达水平, 一般采用基因芯片进行检测。之前的研究显示, iPS 细胞的基因表达谱与诱导前的受体细胞明显不同, 而与 ES 细胞相类似。特别是部分多能细胞中特异表达的基因, 在 iPS 细胞中的表达几乎与 ES 细胞相同<sup>[53]</sup>。但是, 不同批次的 iPS 细胞, 甚至同一批次的不同克隆之间, 其基因图谱均有一定的差异。因为多能性诱导是极其复杂的重编程过程, 外源基因导入的随机性及其表达之间的差异, 诱导时间的长短, 均会引起最后产生的 iPS 克隆的具体性质及整体基因表达谱上的差异<sup>[10]</sup>。

#### 2.3.2 细胞水平

细胞水平需检测的是 iPS 的多向分化潜能和体外自我更新的能力。所得到的 iPS 细胞首先形态上要与 ES 细胞相类似, 具体表现为细胞呈集落样生长、集落致密且边缘整齐、细胞形态较小、核质比高、增殖迅速、倍增时间短、能够长期传代。iPS 细胞经 AP 染色鉴定, 要求呈阳性, 还需进行多种转录因子及细胞表面标志的免疫荧光染色及流式细胞技术的分选, 如: *Oct4*、*Nanog*、*SSEA1*、*SSEA3* 等。完全重编程的 iPS 细胞应具有体外分化潜能, 能够分化为各个胚层的不同类型的细胞, 如外胚层的神经细胞、上皮细胞、软骨细胞等; 中胚层的肌肉细胞、脂肪细胞等; 内胚层的肝细胞、胰岛细胞等。此外, 还需检测 iPS 细胞的核型情况, 由于外源基因整合的随机性, 使诱导得到的 iPS 细胞会有较高比例的核型异常, 那些核型异常的 iPS 细胞, 应予以剔除。

#### 2.3.3 动物水平

除了要在分子和细胞水平上对 iPS 细胞进行严格的检测之外, 还要求在动物体内进行其多向分化能力的检验。首先要求对 iPS 细胞在免疫缺陷鼠 (如

SCID Beige 小鼠) 体内进行成瘤实验。将  $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  iPS 细胞注射到裸鼠的皮下, 经过一段时间的生长, 来观察皮下畸胎瘤形成的变化。根据动物来源的不同, iPS 细胞成瘤时间也不尽相同, 如小鼠的 iPS 细胞约在 1 个月左右能成瘤, 但是猪的 iPS 细胞需要 1~3 个月时间才能成瘤<sup>[54]</sup>。取出的瘤组织, 经切片检测其是否发育出 3 个胚层的各种组织。同时, 在条件及伦理道德允许的情况下, 还应将 iPS 细胞在相应物种上进行嵌合体实验, 要求后代能够真正实现生殖系嵌合<sup>[11]</sup>。但与 ES 细胞类似, 由于伦理道德等问题的限制, 这一指标至今仍只在小鼠上获得成功。最近有研究报道, 小鼠 iPS 细胞通过与四倍体囊胚嵌合, 成功生下具有正常生殖能力的完全由 iPS 细胞发育而来的小鼠, 这充分说明了 iPS 细胞具有发育为完整个体的能力<sup>[16]</sup>。

### 3 展望

iPS 技术的诞生将干细胞研究推进到了一个新的高度, 极大丰富了干细胞的研究内容。在过去 3 年里, iPS 技术发展迅速, 先后已在小鼠、人、猕猴、大鼠和猪中取得了成功。而且早期 iPS 技术上遇到的难题和困扰, 如病毒载体、致瘤基因、诱导效率、iPS 全能性等都一一得到了解决。特别是在小鼠和人上的 iPS 研究日益深入, 诱导的方法也不断得到优化, 动物机体组织的各种细胞均可被诱导为 iPS 细胞。由于 iPS 细胞具有与 ES 细胞相类似的特性和功能, 尽管还不能完全代替 ES 细胞, 但是其成功地绕开了免疫排斥问题和伦理道德问题的困扰, 是再生医学理想的种子细胞, 也可作为临床药物筛选细胞模型和人类疾病治疗细胞模型。此外, 由于 iPS 细胞可在体外长期稳定地传代培养, 是转基因技术中理想的种子细胞, 用作基因打靶受体细胞, 在转基因动物的生产上有着广阔的应用前景。特别是对于至今仍没有 ES 细胞建系的物种, iPS 细胞有可能成为其 ES 的代替细胞应用于科学研究和生产实际。

当然, 目前 iPS 技术还不是十分完善, 对于诱导的机理也没有完全研究清楚, 尤其是诱导过程中产生的大量类 iPS 细胞或不完全重编程细胞的干扰, 使得真正具有全能性的 iPS 难以被很快筛选得

到。但是相信随着研究的不断深入, iPS 技术将会更加成熟, iPS 细胞将会在生命科学领域发挥更大的作用。

### REFERENCES

- [1] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**(5819): 154-156.
- [2] Kastenberg ZJ, Odorico JS. Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells. *Transplant Rev (Orlando)*, 2008, **22**(3): 215-222.
- [3] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**(6619): 810-813.
- [4] Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2007, **450**(7169): 497-502.
- [5] Cowan CA, Atienza J, Melton DA, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005, **309**(5739): 1369-1373.
- [6] Tada M, Takahama Y, Abe K, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Curr Biol*, 2001, **11**(19): 1553-1558.
- [7] 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.
- [8] Marius W, Alexander M, Ruth F, et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 2007, **448**(7151): 318-124.
- [9] Nimet M, Rupa S, Wei X, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**(1): 55-70.
- [10] Alexander M, Marius W, Rudolf J. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(10): 1177-1181.
- [11] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, **448**(7151): 313-317.
- [12] Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(1): 11-15.
- [13] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, **131**(5): 861-872.
- [14] Wu Z, Chen J, Ren J, et al. Generation of pig-induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol*



- Cell Biol*, 2009, **1**(1): 46–54.
- [15] Liu H, Zhu F, Yong J, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(6): 587–590.
- [16] Zhao X, Li W, Lv Z, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, **461**(7260): 86–90.
- [17] Park IH, Arora N, Huo H, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, **134**(5): 877–886.
- [18] Ebert AD, Yu J, Rose FF, *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, **457**(7227): 277–280.
- [19] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, **318**(5858): 1920–1923.
- [20] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, **322**(5903): 945–949.
- [21] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, *et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, **322**(5903): 949–953.
- [22] Kaji K, Norrby K, Paca A, *et al.* Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, **458**(7239): 771–775.
- [23] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009, **136**(5): 964–977.
- [24] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, **324**(5928): 797–801.
- [25] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, **458**(7239): 766–770.
- [26] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(1): 101–106.
- [27] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, **136**(3): 411–419.
- [28] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, **454**(7200): 49–55.
- [29] Shi Y, Desponts C, Do JT, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(5): 568–574.
- [30] Shi Y, Do JT, Desponts C, *et al.* A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, **2**(6): 525–528.
- [31] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(11): 1269–1275.
- [32] Zhou H, Wu S, Joo JY, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(5): 381–384.
- [33] Esteban MA, Wang T, Qin B, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009. doi: 10.1016/j.stem.2009.12.001
- [34] Kim D, Kim CH, Moon JI, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(6): 472–476.
- [35] Huangfu D, Maehr R, Guo W, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(7): 795–797.
- [36] Marson A, Levine SS, Cole MF, *et al.* Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 2008, **134**(3): 521–533.
- [37] Zhao Y, Yin X, Qin H, *et al.* Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(5): 475–479.
- [38] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 2008, **321**(5889): 699–702.
- [39] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, *et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, **133**(2): 250–264.
- [40] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 2008, **18**(12): 890–894.
- [41] Aasen T, Raya A, Barrero MJ, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(11): 1276–1284.
- [42] Kim JB, Zaehres H, Wu G, *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, **454**(7204): 646–650.
- [43] Silva J, Barrandon O, Nichols J, *et al.* Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol*, 2008, **6**(10): e253.
- [44] Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*,

- 2007, **2**(12): 3081–3089.
- [45] Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, *et al.* A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(8): 916–924.
- [46] Park IH, Zhao R, West JA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, **451**(7175): 141–146.
- [47] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, **318**(5858): 1917–1920.
- [48] Park IH, Lerou PH, Zhao R, *et al.* Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2008, **3**(7): 1180–1186.
- [49] Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, *et al.* Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*, 2008, **2**(3): 230–240.
- [50] Mali P, Ye Z, Hommond HH, *et al.* Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells*, 2008, **26**(8): 1998–2005.
- [51] Liao J, Wu Z, Wang Y, *et al.* Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res*, 2008, **18**(5): 600–603.
- [52] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282**(5391): 1145–1147.
- [53] Mohamadnejad M, Swenson ES. Induced pluripotent cells mimicking human embryonic stem cells. *Arch Iran Med*, 2008, **11**(1): 125–128.
- [54] Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, *et al.* Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(27): 10993–10998.

### 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论（不用单列标题书写）。目的 (Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法 (Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results)：本文最后得出的结果（实验数据部分）。结论 (Conclusions)：如为基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如为应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的（如DNA、ATP等），或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。