

iPSCs 的潜在致瘤性及降低致瘤性方法的研究进展

张丽萍, 杨冠恒, 张敬之

1 上海交通大学附属儿童医院 上海市儿童医院 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040

2 卫生部医学胚胎与分子生物学重点实验室 上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 上海 200040

张丽萍, 杨冠恒, 张敬之. iPSCs 的潜在致瘤性及降低致瘤性方法的研究进展. 生物工程学报, 2015, 31(9): 1279–1288.

Zhang LP, Yang GH, Zhang JZ. Progress in the tumorigenic potential of iPSCs and methods to reduce it. Chin J Biotech, 2015, 31(9): 1279–1288.

摘要: 自从 2006 年山中伸弥成功地将小鼠皮肤成纤维细胞重编程为诱导性多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPSCs), iPSCs 已成为科学家们研究的热点之一。而 iPSCs 在为基础研究和再生医学提供了无限可能的同时, 相关争论焦点也随之产生, 如 iPSCs 有可能导致肿瘤已成为其在临床应用前需要进一步证实、面对和解决的问题。目前已经有相关研究人员对 iPSCs 是否具有潜在致瘤性进行了探索。研究表明, iPSCs 基因表达谱与癌细胞基因表达谱具有交集, 重编程过程中积累了基因损伤, 以及在培养过程中的基因突变都是其致瘤性产生的原因之一。研究人员目前已经找到很多减少 iPSCs 致瘤性的方法, 比如优化促重编程因子、筛选表达载体、筛选细胞株等。文中对 iPSCs 致瘤可能性的原因和如何消除其致瘤性进行了综述。

关键词: iPSCs, 致瘤性, 安全性

Received: October 29, 2014; **Accepted:** December 10, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81271690), Open Research Project of Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus (No. SHKLD-KF-1201).

Corresponding author: Jingzhi Zhang. Tel: +81-21-62472308; Fax: +86-21-62475476; E-mail: jzhang38@hotmail.com

国家自然科学基金 (No. 81271690), 上海市糖尿病重点实验室开放课题 (No. SHKLD-KF-1201) 资助。

网络出版时间: 2015-02-27

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150227.1142.008.html>

Progress in the tumorigenic potential of iPSCs and methods to reduce it

Liping Zhang, Guanheng Yang, and Jingzhi Zhang

1 Shanghai Institute of Medical Genetics, Children's Hospital of Shanghai, Children's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China

2 Key Laboratory of Embryo Molecular Biology, Ministry of Health & Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China

Abstract: Since Yamanaka successfully reprogrammed murine fibroblasts into iPSCs in 2006, iPSCs technology has drawn much attention worldwide. Although iPSCs provides tremendous possibilities for both basic research and regenerative medicine, it has meanwhile potential risks, e.g. tumorigenicity. Scientists, therefore, have made efforts in clarifying the mechanism of the cause for iPSCs tumorigenicity and the way how to reduce the risk. The results of some researches reveal some of tumorigenic factors, e.g. the partial similarity of gene expression profiles between cancer cells and iPSCs, the accumulation of the genetic damages in the course of reprogramming process, and mutation in the cellular culture. As a consequence, numerous methods for reducing iPSCs tumorigenicity have been explored, such as minimized use of the reprogramming factors at the controlled manner, and the selection of the expression vector or parental cells. In this paper, the cause of iPSCs tumorigenicity and the current achievements on preventing iPSCs tumorigenesis are reviewed.

Keywords: iPSCs, tumorigenicity, safety

肿瘤是指机体在各种致癌因素作用下, 局部组织细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控, 导致其克隆性异常增生而形成的病变。其最重要的特点是异常的无限扩增能力。胚胎干细胞 (Embryonic stem cell, ES) 是早期胚胎 (原肠胚期之前) 或原始性腺中分离出来的一类细胞, 它具有无限增殖、自我更新和多向分化的特性。而 iPSCs 是指由体细胞重编程而得到的类似胚胎干细胞的一种细胞类型, 在形态、基因和蛋白表达、表观遗传修饰状态、细胞倍增能力、类胚体和畸形瘤生成能力、分化能力等方面都与 ES 相似。iPSCs 性状虽与 ES 部分相同, 但其多能性和无限扩增能力是通过外界因素的诱导而产生出来的, 这个过程中会对细胞的基因组产生何种影响尚未清楚。

自从 2006 年山中伸弥实验小组利用逆转录病毒载体将 *oct4*、*sox2*、*klf4* 和 *c-myc* 共同转入小鼠成纤维细胞中, 获得了在形态学、相关多能性基因表达、表观遗传修饰状态等方面与 ES 极为相似的 iPSCs^[1]。iPSCs 在一定程度上有望解决异体细胞治疗的免疫排斥问题, 规避 ES 来源的伦理问题, 为再生医学提供了无限的潜在可能性。用病人自身的 iPSCs 进行疾病治疗将会彻底改变细胞治疗方法^[2]。另外 iPSCs 可以被用来研究疾病发病的分子机制, 研发新型药物, 评估药物的安全性和治疗效果。但是在 iPSCs 应用于临床治疗前, 科学家们还需要解决很多潜在的风险。其中, iPSCs 是否具有致瘤性是个需要严谨面对并进一步验证的问题。有实验数据显示, 将由 iPSCs 分化得来的成体细胞导入

到小鼠体内,只要细胞混合物中含有 20 个以上未分化的细胞,就会导致肿瘤的产生^[3]。但也有些研究表明 iPSCs 是安全可靠的。Xu 等将与血友病小鼠模型关系密切的近亲系 C57BL/6 小鼠尾尖细胞经重编程得到的 iPSCs 诱导分化为内皮前体细胞,然后移植到患有血友病小鼠的肝脏中,使病鼠出血不止的症状得到有效改善,并且未发现伴有其他异常症状^[4]。

iPSCs 的潜在致癌性已经引起了很多研究者的关注,目前由于无法进行人 iPSCs 的嵌合体制备,有关 iPSCs 致癌性问题的研究大多是参考小鼠或其他哺乳类动物的实验结果。本文就 iPSCs 产生致癌性的潜在原因和降低其致癌性的方法进行简述。

1 iPSCs 潜在致癌性的原因

在由体细胞重编程为 iPSCs 及后续的传代培养过程中,诸多因素可能使细胞发生致癌性,比如说由于转染时对细胞的损伤和外源性基因的随机插入、重编程过程中的染色体损伤、不完全重编程细胞的混杂、细胞分化过程完成后多能性基因未能及时沉默、细胞培养过程中的突变基因的积累等^[5]。

1.1 重编程过程中积累了基因损伤

山中伸弥进一步的研究发现,抑癌基因 *p53* 的沉默会增加重编程的效率^[6],在 *p53* 一过性下调的情况下,重编程的效率会有增高。从功能上来讲,*p53* 能够对原癌基因的激活(或者说抑癌基因的失活)作出反应,进而诱导失控的细胞凋亡^[7]。对于那些 DNA 损伤的细胞(包括端粒比较短, DNA 的修复存在先天缺陷等),细胞中

p53 的表达会阻止细胞的重编程。但是一旦 *p53* 的表达被干扰以后,即使该细胞存在着很大的基因缺陷,甚至是染色体畸变,也能有很高的重编程效率^[8]。这些研究表明体细胞经重编程后对 DNA 损伤的耐受性相对增加,使 iPSCs 有可能积累了较多的基因损伤,这就有可能使 iPSCs 在体内外分化过程中发生肿瘤,使 iPSCs 应用的安全风险增加。

1.2 iPSCs 基因表达谱与肿瘤细胞相似

人们通常通过向体细胞中导入多种转录因子,来激活重编程从而制备 iPSCs。在最早的四因子诱导体系中,*c-myc* 已被证实是一个原癌基因,可通过调控下游靶细胞促进细胞增殖和转化,导入 *c-myc* 基因可使嵌合体小鼠的肿瘤发生率高达 20%。而其他因子,如 *Nanog* 蛋白是肺癌诊断标志物和治疗靶点^[9]; *oct4* 主要在 ES、生殖干细胞及多种肿瘤细胞中表达^[10]; *klf4* 的 C 末端有 3 个串联的锌指序列,这些序列在目标基因 *Nanog* 的激活中起着关键作用, *klf4* 同时也是 *Nanog* 的调控因子,这些研究结果表明 iPSCs 和肿瘤具有相关基因表达调控的交集。

Ghosh 小组对比分析了人 iPSCs 和同源肝细胞、血管内皮细胞和初级神经嵴细胞等的基因表达谱,并将它们与 5 种不同来源的肿瘤细胞转录物作比较。他们得出的结论是肿瘤细胞和 iPSCs 的基因表达谱有很大程度的重叠,相比之下,原始体细胞和肿瘤细胞的表达重叠就很小, qRT-PCR 的结果也支持了这一结论^[11]。经过 qRT-PCR 测定了几种常见的肿瘤基因在由 hiPSC 和 hESC 分化而来的杂内皮细胞中以及正常组织细胞中(人脐静脉内皮细胞株中)的表

达, 如 *tnc*、*vcan*、*pcolce*、*klaa1199*、*fos*、*sema5a*、*sna12*、*serpine2*、*col6a2* 和 *thbs1* 等, 它们在由 hiPSC 分化而来的内皮细胞中的表达量明显较高, Western blotting 的分析结果也支持这一点。这些结果说明 iPSCs 分化之后仍然具有致瘤倾向。

另外, 维持 iPSCs 多能性的基因与肿瘤形成过程中的相关基因有交集。这些交集基因赋予了细胞高速度增殖、逃逸自我更新和 DNA 修复检验点等能力。Ben-Porath 等^[12]研究了肿瘤细胞与 iPSCs 多能性维持的相关基因的表达关系, 以及与 *myc* 基因家族为中心的基因调控网络的关系, 他们发现肿瘤细胞的侵袭性的降低与细胞分化相关基因的表达上调有关。Kim 等^[13]等利用生物素标记技术探测细胞内蛋白质与蛋白质以及蛋白质与 DNA 之间的结合, 他们发现 *myc* 基因家族的转录网络在肿瘤和 iPSCs 等都起着重要的作用。在由 iPSCs 产生的嵌合体小鼠中, 由于 *myc* 基因家族在供体细胞中的表达, 因此更易产生肿瘤^[14-15]。*Myc* 家族中的 3 个成员, *c-myc*、*n-myc* 和 *l-myc*, 相比于其他两个, *l-myc* 在诱导 iPSCs 时能降低其致瘤性, 且诱导效率更高^[16], 这就为增加 iPSCs 的安全性提供了一个新的方法。

除了 *myc* 信号转导通路的网络, ES 和 iPSCs 中其他的多能性基因也被证明在肿瘤细胞呈高表达状态。例如, 体细胞中 *oct4* 的异位激活会引起细胞的增殖不正常而发生癌变^[17]; Lee 等证明了 Nanog 在肝癌中的 CD24+ 肿瘤干细胞的自我更新中起着重要的作用^[18]; 在乳腺癌细胞中 *klf4* 能够促进 *p53* 介导的 DNA 修复检验点的解偶联^[19]; 在完成重编程后的细胞克隆中 *c-myc* 和

oct4 的未完全沉默或者重新激活, 能使细胞增殖加快和抑制分化^[20], 进而增加癌变的可能性。

进一步的研究发现, iPSCs 中存在着部分与肿瘤信号通路相关的 miRNA。Malchenko 等^[21]将两个 iPS 细胞系的 365 个 miRNA 和 4 个人的 ES 细胞系进行表达谱分析, 结果显示 iPSCs 中有 10 个与肿瘤信号通路相关的 miRNA 高表达, 这说明 iPS 细胞和肿瘤细胞有着很多的相似性, 另有实验显示某些与 ES 相关的转录调节因子在肿瘤细胞也高表达^[22]。我们推测无论是肿瘤细胞、iPSCs 还是 ES 细胞都具有高速度增殖和自我更新的特点, 促进其高速度增殖和自我更新的基因可能会有很大程度的重叠, 只是 ES 有着较多的在肿瘤细胞中不表达的抑制增殖过度的调节基因的表达, 而在诱导产生 iPSCs 的过程中, 激活了促进其高速度增殖和自我更新的基因, 部分 iPSCs 可能没有相应地激活抑制其过度增殖的相关调控基因的表达。

1.3 iPSCs 培养过程中的突变积累

除了以上两个原因之外, 细胞培养体系对于细胞质量的维持至关重要。利用 iPSCs 进行疾病的治疗前, 需要在体外大量扩增 iPSCs, 这个过程需要传很多代。虽然有相关研究表明, 随着传代次数的增加, 染色体状态会趋于稳定^[23]。但最近的一些研究表明, 部分多能干细胞存在着 DNA 损伤修复的缺陷, 甚至还会出现细胞周期停止的现象^[24]。尽管 iPSCs 可能会通过细胞凋亡来对 DNA 损伤作出反应, 但有小部分细胞却仍能存活下来, 维持着遗传突变的同时继续增殖^[25]。这使多能干细胞在长期的培养过程中衍变成一些异常的细胞, 包括染色体易位、大规模的重复和丢失以及点突变等^[26], 这些细胞

有可能在后续增殖过程中发生癌变。

2 降低 iPSCs 致瘤性的方法

作为 iPSCs 在临床上应用的一大阻碍, iPSCs 的潜在致瘤性已经引起了研究者的关注, 他们试图寻找各种方法来降低可能性, 其中包括重编程因子的筛选、载体类型的选择、维持抑癌基因的表达, 如 *p53* 等。

2.1 促重编程因子的筛选

首先, 研究人员试图通过减少重编程因子来降低 iPSCs 致瘤的风险。Wernig^[27] 研究小组利用 *oct4*、*sox2* 和 *klf4* 将小鼠成纤维细胞成功重编程为 iPSCs, 说明 *c-Myc* 基因并非 iPSCs 诱导过程中所必需的。Huangfu 研究小组通过添加组蛋白脱乙酰基酶抑制剂丙戊酸 (Valproic acid, VPA), 仅使用两个转录基因 *oct4* 和 *sox2* 成功地建立了人的 iPSC 细胞系^[28]。Kim 研究小组用内源性表达 *sox2* 和 *c-myc* 的小鼠神经干细胞, 只导入两种转录基因 (*oct4* 和 *klf4* 或者 *oct4* 和 *c-myc*) 就将其诱导为 iPSCs^[29]。近期, 他们只用 *oct4* 便将神经细胞诱导为 iPSCs^[30]。他们的实验提示在选用诱导因子的时候可以充分利用特定组织细胞内源性的转录因子以减少外源基因的导入, 进而降低肿瘤的发生率。但是, 这类组织细胞在临床上的获取受到严格的限制。外源转录因子并不是越少越好, 减少外源转录因子以降低肿瘤发生率的代价就是重编程效率的降低。

在诱导过程结束以后, 及时地关闭外源性诱导因子的表达, 是降低 iPSCs 致瘤风险另一种技术手段。有研究者将 4 种重组蛋白 (*Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *c-Myc*) 与穿膜肽融合, 将人的成

纤维细胞重编程为稳定的 iPSCs^[31]。该方法减少了使用病毒载体、基因转染等潜在的风险, 并且有可能在未来为 iPSCs 的再生医学应用提供一种安全的细胞制备方法。Yakubov 研究小组利用相关 mRNA 来制备人的 iPSCs^[32]。他们将体外转录的 *oct4*、*sox2*、*klf4* 和 *c-myc* 的 mRNA 导入体细胞中, 至少 70% 的细胞中都有这 4 种蛋白质的表达和核定位。他们经过连续 5 次的转染来维持其蛋白的表达, 最终诱导出 iPSCs。

2.2 表达载体的筛选

在早期重编程的过程中, 常用逆转录病毒载体作为导入系统将所携带的重编程因子随机整合入细胞基因组中。其整合位点是相对随机的, 因此有可能引起插入性突变。例如激活原癌基因或者灭活抑癌基因。Stadtfeld 等利用非整合型腺病毒载体, 将成纤维细胞和肝细胞成功地重编程为 iPSCs^[33]。但是由于腺病毒载体介导得到 iPSCs 的效率很低, 且此过程中由肝细胞得到的 iPSCs 多为 4 倍体, 需通过繁琐的亚克隆细胞建系及筛选, 这无疑增加了工作量且细胞质量不能保证, 因此不适合于临床应用。

山中伸弥的进一步研究发现用质粒的瞬时转染可以消除外源基因的整合与重组^[34]。他们向小鼠胚胎成纤维细胞 (Mouse embryo fibroblast, MEF) 中重复转染两组表达质粒, 一组质粒含有重编程因子 *oct4*、*sox2* 和 *klf4* 的 cDNA, 另外一组则是含有 *c-myc* 的 cDNA, 从而将 MEF 重编程为 iPSCs, 通过 Southern blotting 验证后未发现外源基因的整合。

Park 小组报道了用脂质体磁性转染方法 (Liposome magnetofection, LMF) 将 MEF 重编程为 iPSCs^[35]。此方法用不同浓度的磁性纳米颗

粒的 DNA (pCX-Oct4-2A-Klf4-2A-Sox2 和 pCX-cMyc) 脂质球经一次或两次转染, 所获得的 iPSCs 通过透射电子显微镜观测, 脂质球颗粒在转染 36 h 后, 在胞内数量急剧减少, 8 次传代之后消失。

Yu 等利用 oriP/EBNA1 (Epstein-Barr nuclear antigen-1) 核附加型质粒载体将重编程因子瞬时转染至体细胞内, 避免了外源性基因的整合, 并且在细胞传代过程中撤掉药物筛选, 从而逐步稀释并最终去除质粒^[36]。无论是蛋白质还是 mRNA, 这两种方法都不会引起外源基因的插入性突变, 有资料显示, 经反转录病毒载体介导感染、脂质体转染、转座子和蛋白转入等重编程方法, 导入重编程因子后的 mRNA 促进重编程的效率比其他方法要高很多^[37-38], 理论上不会对 iPSCs 以及后续的细胞分化产生影响, 同时有效地保证了细胞应用的安全性。

2.3 促重编程化学小分子的筛选

与其他促编程因子相比, 小分子促进细胞重编程更具有优势, 因为它们可以渗透入细胞且不具有明显的免疫原性, 更易合成和保存, 另外, 小分子诱导重编程的过程成本更低且易标准化^[39]。邓宏魁课题组发现在 *sox2*、*klf4* 和 *c-myc* 存在的情况下, 毛喉素、2-甲基-5-羟色胺能够代替 *oct4* 诱导小鼠胚胎成纤维细胞的重编程。该研究小组还报道了一种将多种小分子化合物“VC6T” [VPA, CHIR99021 (CHIR), 616452, Tranylcypromine] 联合 *oct4* 单个外源基因导入实现小鼠体细胞重编程的方法^[40]。另外, 他们又通过在 MEF 中转入由 *oct4* 启动子启动 GFP 表达的质粒系统 (*oct4* promoter-driven GFP expression, OG), 利用启动 GFP 表达对 10 000

多种化学小分子进行筛选, 选出了 For-skolin (FSK) 等 *oct4* “替代物”^[39]。随后, 研究人员利用 VPA、CHIR99021、616452 等 7 种化合物组合的混合物, 将重编程效率提高至 0.2%, 与目前常用的建立 iPSC 细胞的技术相当。他们将这种诱导来的多能干细胞命名为“化合物诱导性多能干细胞” (Chemically induced pluripotent stem cells, CiPSCs)。通过体内实验, CiPSCs 可生成所有重要的细胞类型, 包括肝脏、心脏、脑、皮肤和肌肉等。目前, 该研究小组已利用这种 CiPSCs 培育出了多只健康小鼠, 证实了 CiPSCs 具有与胚胎干细胞同样的分化发育的能力。

Kang 小组利用氧甾酮和嘌呤胺处理小鼠星形胶质细胞, 然后在白血病抑制因子存在的情况下, 对其用 MEK/ERK 和 GSK3 通路抑制因子进行处理, 即可得到与 mESC 基因表达谱和分化能力都相似的“化合物诱导性多能干细胞类似细胞” (Chemically induced pluripotent stem cell-like cells, ciPSLCs)^[41]。此外, 胡文涛等发现在转录因子 *oct4* 和 *klf* 存在的情况下, 利用正丁酸钠、A-83-01、CHIR99021 和 Y-2763 等可以将 MEFs 重编程为 iPSCs^[42]。

研究人员还发现, CYT296 在 250 nmol/L 时, 能够提高 *oct4*、*sox2*、*klf4* 和 *c-myc* 四因子介导的 MEFs 重编程^[43]。他们推理 CYT296 可能是通过扰乱染色质凝集为重编程创造更有利的环境, 从而促进这一过程。并且他们的后续实验验证了这个推论, 这就为研究者们提供了一个新的进行重编程的方法——用小分子扰乱染色质的凝集。

研究人员用化合物对小鼠普通体细胞进行重编程, 减少了促转录因子的个数, 是降低

iPSCs 致瘤性的一个好方法。

2.4 降低 iPSCs 致瘤性的其他方法

Aoi 等^[44]用成年小鼠肝脏细胞、胃表皮细胞以及胚胎成纤维细胞诱导得到的 iPSCs 进行嵌合体小鼠的制备。成纤维细胞来源的 iPSCs 的嵌合体小鼠, 在 30 周时约有 30% 的小鼠产生了肿瘤, 而鼠肝脏细胞、胃表皮细胞来源的 iPSCs 的嵌合体小鼠并未发现肿瘤。这可能是由于不同的供体细胞在重编程之前细胞所处的环境不一样; 细胞内的基因表达不一样; 在重编程过程中受内外源性因子的调控, 开启或关闭的基因的差异性所致。因此, 在临床应用 iPSCs 治疗时, 选择适当的供体细胞种类, 可降低其致瘤性, 提高 iPSCs 的安全性。另外, 还要考虑供体细胞的取材难易和伦理限制等因素。目前, 人类皮肤成纤维细胞的获取较为方便和可行^[38]。另外, 由于血细胞和尿液脱落细胞容易获得, 且不会对供体造成伤害, 也成为许多研究者制备 iPSCs 的优选细胞来源。所以, 在选取细胞时要综合考虑多方面的因素。

降低成瘤风险的另一种方法是在 iPSCs 形成后, 将外源基因去除。目前主要有两个删除系统: Cre/LoxP 重组系统和 PiggyBac 转座子系统。Cre/LoxP 介导的基因删除会导致一段载体片段留在插入位点上, 虽然降低了成瘤风险, 但仍无法避免插入突变^[45]。相比 Cre/LoxP 重组系统, PiggyBac 转座子系统可完全除去外源插入的 DNA 序列, 使基因组复原, 降低了 iPSCs 的致瘤性^[46]。

Marión 等^[47]发现, 通过限制重编程来降低鼠源 iPSCs 的基因重组, 能够提高 *p53* 介导的 DNA 损伤应答。Menendez 等^[48]通过增加抑癌

基因拷贝数来提高鼠源 iPSCs 的安全性, 从而降低肿瘤发生风险。体内和体外分化实验表明, 增加了一个拷贝的 *p53* 或者 *Ink4a/ARF* 的 iPSCs, 可以使分化细胞持久正常。在畸胎瘤形成过程中上调 *p53* 的表达, iPSCs 能分化成正常的 3 个胚层的组织细胞, 而肿瘤细胞的发生率明显降低。另外他们还发现这些 iPSCs 与正常的 iPSCs 相比对抗癌药物更加敏感。

3 展望

iPSCs 最诱人的前景是将其定向诱导分化为特定的组织细胞, 以用于疾病的治疗。目前在小鼠水平上已经有了诸多研究成果。Xu 等^[49]将 iPSCs 诱导分化为内皮前体细胞, 然后将其移植至血友病小鼠的肝脏后, 出血不止的症状得到了有效改善。Hanna 等^[50]通过电穿孔将人正常 β 蛋白基因导入 iPSCs, 随后将 iPSCs 定向分化为造血祖细胞 (Hematopoietic progenitor cells, HPs), 将 HPs 移植入雄性 $H\beta^s/H\beta^s$ 小鼠中, HPs 能有效地改善镰刀形红细胞贫血症状。在临床应用方面, 目前较为成功的案例是日本理化研究所发育生物学中心用 iPSCs 进行视网膜疾病的临床前实验, 可能有望几年后在临床开展自体骨髓干细胞治疗。

我们曾利用嵌合体小鼠模型证实, iPSCs 在体内能有效地分化为血细胞, 其所携带的外源性 β 珠蛋白表达增加约 20% 以上就能改善 β 654 地贫的症状, 并且这些嵌合体小鼠没有其他异常症状, 这就为 iPSCs 的临床应用提供了可行性参考^[51]。我们认为, 一过性地表达诱导基因, 然后在细胞重编程完成以后及时清除诱导基因是一个比较好的方式。另外, 在 iPSCs 中引入

自杀机制,一旦 iPSCs 发生癌变之后能诱导启动细胞凋亡,也是一种提高 iPSCs 安全性的好方法。

虽然我们对 iPSCs 的潜在致瘤性的原因还没有完全研究清楚,但是随着诱导方法、培养条件、定向分化等技术的进一步优化,相信 iPSCs 将会更加安全、可靠、有效地被运用于临床细胞治疗中。

REFERENCES

- [1] 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.
- [2] Menendez S, Camus S, Izpisua Belmonte JC. Guardian of reprogramming. *Cell Cycl*, 2010, 9(19): 3887–3891.
- [3] Menendez S, Camus S, Herreria A, et al. Increased dosage of tumor suppressors limits the tumorigenicity of iPS cells without affecting their pluripotency. *Aging cell*, 2012, 11(1): 41–50.
- [4] Xu D, Alipio Z, Fink LM, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2009, 106(3): 808–813.
- [5] Lee AS, Tang C, Rao MS, et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med*, 2013, 19(8): 998–1004.
- [6] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the *p53*–*p21* pathway. *Nature*, 2009, 460(7259): 1132–1135.
- [7] Puzio-Kuter AM, Levine AJ. Stem cell biology meets *p53*. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(10): 914–915.
- [8] Marión RM, Strati K, Li H, et al. A *p53*-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*, 2009, 460(7259): 1149–1153.
- [9] Li LD. Expression and clinical significance of eight stem-cell-associated markers in lung cancer[D]. Guilin: Guilin Medical University, 2013 (in Chinese).
李劳冬. 八个干细胞相关标志物在肺癌中的表达及其临床意义[D]. 桂林: 桂林医学院, 2013.
- [10] Huang L, Gao F, Zhang S. Role of *oct4* in the tumorigenesis and development. *Int J Pathol Clin Med*, 2013, 33(1): 78–81 (in Chinese).
黄灵, 郜峰, 张声. *oct4* 在肿瘤发生发展中的作用. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(1): 78–81.
- [11] Ghosh Z, Huang M, Hu S, et al. Dissecting the oncogenic and tumorigenic potential of differentiated human induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells. *Cancer Res*, 2011, 71(14): 5030–5039.
- [12] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genetics*, 2008, 40(5): 499–507.
- [13] Kim J, Woo AJ, Chu J, et al. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell*, 2010, 143(2): 313–324.
- [14] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, 448(7151): 313–317.
- [15] Markoulaki S, Hanna J, Beard C, et al. Transgenic mice with defined combinations of drug-inducible reprogramming factors. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(2): 169–171.
- [16] Nakagawa M, Yamanaka S. *Stem Cells and Cancer Stem Cells*. Berlin: Springer Netherlands, 2012: 79–85.
- [17] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*, 2005, 121(3): 465–477.
- [18] Lee TKW, Cheung VCH, Ng IOL. Liver tumor-initiating cells as a therapeutic target for

- hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 2013, 338(1): 101–109.
- [19] Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of *p53* that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(11): 1074–1082.
- [20] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454(7200): 49–55.
- [21] Malchenko S, Galat V, Seftor EA, et al. Cancer hallmarks in induced pluripotent cells: new insights. *J Cellular Physiol*, 2010, 225(2): 390–393.
- [22] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genetics*, 2008, 40(5): 499–507.
- [23] Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med*, 2009, 15(5): 577–583.
- [24] Hyka - Nospikel N, Desmarais J, Gokhale PJ, et al. Deficient DNA damage response and cell cycle checkpoints lead to accumulation of point mutations in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2012, 30(9): 1901–1910.
- [25] Desmarais JA, Hoffmann MJ, Bingham G, et al. Human embryonic stem cells fail to activate CHK1 and commit to apoptosis in response to DNA replication stress. *Stem Cells*, 2012, 30(7): 1385–1393.
- [26] Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(4): 521–531.
- [27] Wernig M, Meissner A, Cassady JP, et al. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 10–12.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, 136(3): 411–419.
- [31] 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.
- [32] Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, et al. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(1): 189–193.
- [33] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, 322(5903): 945–949.
- [34] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, 322(5903): 949–953.
- [35] Park HY, Noh EH, Chung HM, et al. Efficient generation of virus-free iPS cells using liposomal magnetofection. *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e45812.
- [36] 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.
- [37] Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(5): 618–630.
- [38] Martins AM, Vunjak-Novakovic G, Reis RL. The Current Status of iPS Cells in Cardiac Research and Their Potential for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev Reports*, 2014, 10(2): 177–190.
- [39] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by

- small-molecule compounds. *Science*, 2013, 341(6146): 651–654.
- [40] Li Y, Zhang Q, Yin X, et al. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, oct4, and small molecules. *Cell Res*, 2010, 21(1): 196–204.
- [41] Kang PJ, Moon JH, Yoon BS, et al. Reprogramming of mouse somatic cells into pluripotent stem-like cells using a combination of small molecules. *Biomaterials*, 2014, 35(26): 7336–7345.
- [42] Hu W, Yan Q, Fang Y, et al. Transient folate deprivation in combination with small-molecule compounds facilitates the generation of somatic cell-derived pluripotent stem cells in mice. *J Huazhong Univ Sci Technol: Med Sci*, 2014, 34: 151–156.
- [43] Wei X, Chen Y, Xu Y, et al. Small molecule compound induces chromatin de-condensation and facilitates induced pluripotent stem cell generation. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6: 409–420.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766–770.
- [47] Marión RM, Strati K, Li H, et al. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*, 2009, 460(7259): 1149–1153.
- [48] Menendez S, Camus S, Herreria A, et al. Increased dosage of tumor suppressors limits the tumorigenicity of iPS cells without affecting their pluripotency. *Aging Cell*, 2012, 11(1): 41–50.
- [49] Xu D, Alipio Z, Fink LM, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(3): 808–813.
- [50] 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.
- [51] Yang G, Shi W, Hu X, et al. Therapeutic effects of induced pluripotent stem cells in chimeric mice with β -thalassemia. *Haematologica*, 2014, 99(8): 1304–1311.

(本文责编 郝丽芳)