



动物细胞全能性的研究

丁硕, 张琦, 刘战民, 黄俊逸*

上海大学生命科学学院, 上海 200444

* 联系人, E-mail: jy-huang@shu.edu.cn

收稿日期: 2011-06-13; 接受日期: 2012-05-23

上海市教育委员会创新项目(批准号: 11YZ18)和上海市教育委员会分子生理学重点学科建设项目(批准号: J50108)资助

doi: 10.1360/052011-390

摘要 在植物细胞全能性研究的基础上引出动物细胞全能性这一热点研究课题. 介绍了动物细胞全能性的表现, 分析了细胞全能性表现程度差异的原因, 最后对动物细胞全能性的广泛应用及存在的问题进行探讨, 并对细胞命运及其调控进行了展望.

关键词

动物细胞全能性
干细胞
iPS 细胞
基因表达调控
细胞命运

被誉为“植物组织培养之父”的德国著名植物生理学家和植物学家哈伯兰特(Haberlandt), 在 Schleiden 和 Schwann 的细胞学说的推动下, 于 1902 年提出了植物细胞具有全能性的理论. 此后, 经各国科学家近百年的辛勤探索, 最终发现几乎所有植物的根、茎、叶、花、果实和种子等不同器官、组织都能被离体培养, 并发育成新的植株^[1]. 成功的例子不胜枚举^[2-4], 其中, 最重要的是在 1958 年, 由美国植物学家斯图尔德(Steward)等人用胡萝卜根韧皮部的细胞进行培养, 得到了完整植株, 并开花结实, 首次证实了哈伯兰特在 50 多年前关于细胞全能性的预言. 近年来, 离体培养已在烟草、水稻、小麦、玉米、番茄、辣椒、草莓、苹果等多种植物上获得成功, 种类达到 160 多种. 此外, 植物细胞的分化是一个无限过程, 即能在已分化的枝叶上不断生成新的枝叶^[4], 这点也进一步体现了植物细胞的全能性.

细胞全能性是指在多细胞生物体中, 每个细胞都有发育成为完整个体所需的全套遗传物质, 因而具有发育成完整新个体的潜能. 那么动物细胞是否具有全能性呢? 答案是肯定的, 然而由于受诸多因素的影响, 动物细胞较难表现出全能性. 本文试对动

物细胞的全能性表现、影响全能性表现的因素及其分子机制等进行简述.

1 动物细胞全能性的表现

1.1 低等动物组织及细胞的全能性

低等动物, 如拟菊海鞘、水螅等可像酵母一样进行出芽生殖. 涡虫、水螅、海参等的组织块可再生形成完整的个体^[5], 切断的水蛭也能再生成新的个体. 再生能力与低等动物组织的低分化状态有关. 其主要表现为: (i) 组织中可能存在众多全能性细胞, 如涡虫的 Neoblast、海绵的原细胞等, 这些细胞还可能与无性生殖有关; (ii) 组织中的特定体细胞受伤时能够重新去分化并持续分裂^[6], 这点类似植物的脱分化. 由此可见, 许多低等动物和植物一样, 除生殖细胞外, 其组织已表现出全能性, 这点主要体现在无性生殖及其再生上.

1.2 高等动物细胞的全能性

高等动物组织的全能性比低等动物低得多, 但

也不同程度地有所表现,如火蜥蜴失去四肢后,能迅速长出新的肢体;另外,硬骨鱼的鱼鳍、人的皮肤、肝等也可再生.其原因可能与高等动物中不同程度地表现出全能性的细胞有关,如人的干细胞等;也可能与体细胞有限的去分化有关,如火蜥蜴体细胞去分化所形成的“芽基”^[6].

(1) 生殖细胞的全能性. 在自然界中,不同物种及其性状之所以得以保存,正是因为生殖细胞(多为雌配子)具有全能性.受精作用使雌、雄配子结合并表现出全能性,发育成完整个体,这与受精作用引发的转录组重建有关^[7,8].然而,受精似乎只是充分条件,某些动物如蜜蜂可进行孤雌生殖,银鲫可进行雌核生殖^[9]等.

体内、体外分化实验的结果^[10]表明,原始生殖细胞(primordial germ cells, PGC)也表现出部分全能性,可分化成为精原细胞和卵原细胞.其体外诱导的细胞系为胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EG),可于嵌合体中生成胚胎细胞系^[11].

(2) 干细胞的全能性. 干细胞是一类能够自我更新和具有多向分化潜能的细胞,通常分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)和成体干细胞(adult stem cells, ASC)^[12].

胚胎干细胞主要来源于早期胚胎(桑葚胚、囊胚)^[13,14],其特征为核大、质少、细胞界限明显,体外培养成集落生长,碱性磷酸酶染色法染色呈棕红色^[15].类似的细胞还有胚胎生殖细胞和胚胎癌细胞(embryonic carcinoma cells, ECC).胚胎干细胞可在体外条件下传代并建立稳定的细胞系,从而被诱导生成新生组织,用以研究外源基因在发育中的作用^[16,17],并在诸如对视网膜修复^[18]、某些神经元再生^[19]及肺损伤修复^[20]等诸多治疗研究中有潜在的应用价值.1981年,Evans和Kaufman^[21]首次从小鼠胚囊中分离得到胚胎干细胞.此后,人们又成功分离得到了其他动物,如人^[22]、猴^[23]、大鼠^[24]、山羊^[25]等的胚胎干细胞.

许多成体组织中也含有干细胞,即成体干细胞.例如,骨髓中含有间叶干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)和造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC)^[26];大脑和脊髓中含有神经干细胞^[27];肺中含有肺干细胞^[28];甚至成体卵巢中含有雌性生殖干细胞,可分化成卵母细胞^[21]等.成体干细胞全能性的表现程度不如胚胎干细胞完全,通常只具有单一分化潜能.但某些成体干细胞也能形成多种细胞,如皮肤

中的成体干细胞能分化成神经细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞,甚至生殖细胞^[29,30],即可能存在横向分化.因此,成体干细胞有望用于疾病的治疗^[30,31].

(3) 肿瘤干细胞的全能性. 肿瘤是因致癌因素而导致的突变单细胞及其无限增生的克隆的总称,其形成过程需要致癌因素的不断累积.肿瘤细胞一般具有3个特征:永生性、迁移性和失去接触抑制,并且其代谢旺盛,对生长因子需求低以及凋亡抑制等.有研究^[32]表明,多数肿瘤^[33~35]中存在少量类似于正常干细胞,如自我更新能力、超强增殖能力、不定向分化能力,但不具备分化成正常细胞的能力等^[36,37]的肿瘤细胞,并且这些细胞是肿瘤生长^[38]和转移^[39]的主要因素,这类细胞被称为肿瘤干细胞(tumor stem cell, TSC).肿瘤干细胞主要来源于:(i)正常干细胞癌变,因致癌因素导致其分化受阻,停留在当前分化阶段,但仍自我更新,从而使许多基因突变得以保留,并不断积累,最终导致肿瘤干细胞的形成,即干细胞分化阻滞假说^[40~42],如白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC)便是由造血干细胞的突变所形成的^[43].(ii)正常细胞癌变并去分化,即正常细胞的分化基因由于致癌因素而被抑制,使得细胞永生并表现出某些干细胞的特征,从而使得突变得以保留积累,导致肿瘤干细胞的形成,即分化基因阻抑假说.这一假说已在胶质瘤和肉瘤细胞研究中得到了证实^[44].(iii)某些癌细胞与正常干细胞的融合.由于融合而导致染色体数目的改变,从而导致突变得以保留积累.这点已在白血病骨髓移植患者身上得到验证^[45].

肿瘤干细胞在肿瘤未分化状态中起重要作用.在临床医学中癌细胞分化程度常被用来评定肿瘤的恶性程度的高低^[46,47],其中未分化肿瘤恶性程度最高.因此,未分化状态的维持就成为联系表现全能性与导致恶性肿瘤的“纽带”,如胚胎癌细胞的未分化状态使之既有多向分化潜能又有癌细胞的特征.

2 细胞重编程后表现或部分表现出的全能性

随着科学技术的发展,通过重编程,人们能够使已分化的细胞重新表现或部分表现出全能性.所谓重编程,是指使已分化的细胞在特定诱导条件下回到去分化状态的过程.

2.1 常规重编程诱导细胞所表现的全能性

常规重编程有以下 3 种方式, 即: (i) 利用核移植技术诱导, 即将待诱导的体细胞的细胞核移植入去核卵母细胞或干细胞中, 使之表现出全能性^[48], 如将乳腺细胞核移植入去核卵母细胞中便得到了克隆羊; (ii) 利用细胞融合技术诱导, 即将待诱导的体细胞与干细胞或卵母细胞融合^[49], 使之表现或部分表现出全能性, 如分泌抗体的浆细胞与骨髓瘤细胞融合后产生的杂交瘤细胞可持续分裂并分泌抗体; (iii) 利用诱导物诱导, 即将卵母细胞、干细胞、癌细胞的胞质或胞外物质加入待诱导细胞, 使之表现或部分表现出全能性^[48,49], 如利用血清及饲养细胞培养并诱导细胞等。

2.2 限定因子诱导细胞所表现出的全能性

限定因子诱导法^[50,51], 即向待诱导细胞中加入限定因子(如信号分子、转录因子、表观遗传修饰因子等), 使之表现或部分表现出全能性, 诱导后的细胞即为诱导多能性干细胞, 简称 iPS 细胞(induced pluripotency stem cells, iPS cells). 与常规诱导方法相比, 该方法的重编程因素较明确和可控。

iPS 细胞是由日本科学家 Yamanaka 小组^[52]于 2006 年 8 月利用转录因子 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 首次成功诱导小鼠尾尖纤维细胞而得到的。随后, Yamanaka^[53], Jaenisch^[54]和 Scholer^[55]小组分别利用不同的转录因子组合诱导包括鼠成纤维细胞、鼠神经细胞等多种细胞, 成功获得了 iPS 细胞。2008 年 7 月, Melton 小组^[56]用去乙酰化抑制剂 VPA 提高了 iPS 细胞的诱导效率, Mikkelsen 等人^[57]利用促去甲基化因子 5-Aza 提高了 iPS 细胞的产生效率, 从而证明表观遗传调控在 iPS 诱导中的作用。2009 年 3 月, Yamanaka 小组^[58]、Nary 小组和 Kaji 小组^[59,60]采用质粒和转座子取代病毒载体成功制备了鼠 iPS 细胞, 并将外源基因移除以免产生致癌风险, 从理论和实践上证明了诱导过程只需外源转录因子的瞬时作用。2009 年 8 月, 我国科学家周琪^[61]利用 iPS 细胞通过四倍体胚囊注射得到存活并有生殖能力的小鼠, 首次证明了 iPS 细胞具有全能性, 这一发现被誉为是继胚胎干细胞之后生命的第二颗“全能种子”。随后皮肤细胞^[62]、血细胞^[63]、内皮细胞^[64]、羊水细胞^[65]等大量细胞被诱导成为 iPS 细胞, 诱导方法也在不断改进, 如仅利用信

号分子 ltr^[66]、饲养层细胞等诱导^[67], 特别是 Frederick 等人^[68]发现, 利用 miRNA 可极大地提高 iPS 细胞的诱导效率。

iPS 细胞因其取材容易而在细胞分化和去分化、药物治疗模型的建立等方面有着广泛的应用, 特别是其取材能够做到个性化, 从而避免了其他干细胞可能产生的免疫排斥问题及伦理道德问题, 更具备针对诸如镰刀形细胞贫血^[69]、帕金森疾病^[70]、眼部疾病^[71]等的临床治疗的潜力。

综上所述, 动物细胞或多或少地表现出了全能性(图 1)。例如, 低等动物普遍具有再生能力, 甚至有某种蠕虫可以不断再生, 从而做到“永生”^[72]。高等动物细胞随着进化, 其功能逐渐趋向于专一、明确, 以具有单向或多向分化潜能的细胞代替全能性细胞。另外, 高等动物仅存的少量全能性细胞几乎都来自胚胎。可见, 低等动物类似于高等动物的胚胎阶段。通常, 高等动物体细胞很难自发去分化, 需借助重编程, 而肿瘤细胞似乎处于二者之间, 可以自发地去分化^[73]。

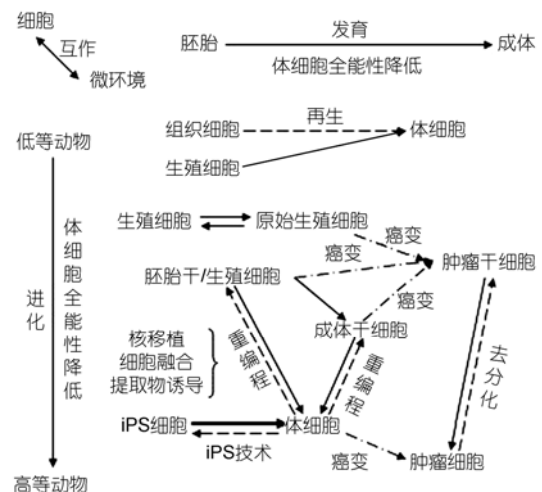


图 1 动物细胞全能性表现图谱

那么, 全能性细胞是如何在维持全能性和启动分化间作出“明智”选择的呢? 而细胞分化与去分化的调控及其机制又是什么?

3 细胞全能性表现的分子机制及影响因素

3.1 细胞全能性表现的分子机制

在真核生物中, 细胞全能性的表现主要受来自

染色体水平、转录水平及转录后水平的调控。

(1) 染色体水平上的调控机制。染色体水平上的调控有 2 种方式, 即通过表观遗传修饰调控和通过改变染色体结构加以调控。(i) 表观遗传修饰的调控。这方面包括 DNA 的甲基化/去甲基化和组蛋白的修饰等。表观遗传修饰或其招募的功能分子改变了 DNA 本身与转录因子的亲和性, 从而影响转录及转录后水平^[74-76]。其主要特点是能够大面积开关基因的表达, 从而参与诸如细胞未分化状态的维持和定向分化^[77]等细胞状态的转变, 如去甲基化和促乙酰化能够极大提高 iPS 细胞的诱导效率; 突变 DNA 甲基化转移酶(DNA methylation transferase, DNMT)使小鼠胚胎干细胞长时间保持未分化状态, 阻止了关键转录因子 Oct4, Nanog 等大量基因及相关非编码 RNA 的启动子的甲基化^[78]。Lee 等人^[79]证明, 组蛋白修饰在胚胎干细胞向分化状态的转变中起重要作用。Dirk Schübeler 实验室^[80]发现, 转录因子以某种方式导致不同类型细胞低甲基化区域(low methylated regions, LMRs)差异变大, 从而控制细胞的命运。(ii) 染色体结构变化的调控, 即改变异染色质化程度及 DNA 的构象, 从而改变 DNA 与相关蛋白因子的亲和性。其对基因表达的调控也是大面积的。

此外, 细胞中存在大量非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA), 因其可同时结合核酸和蛋白质, 作为接头与功能分子组成核酸蛋白复合体, 可参与从染色体水平到转录后水平等多个层次上的调控, 并且它们之间也可以相互调控。可见, 非编码 RNA 是细胞全能性调控机制的核心环节之一。在染色体水平上, 小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)可借助 KTF1 招募 RdDM 参与 DNA 的甲基化^[74,75]; PIWI 相互作用 RNA(PIWI interacting RNA, piRNA)^[76]能够参与生殖细胞异染色质的形成。有证据^[81-83]表明, 微小 RNA(microRNA, miRNA)也能在一定程度上促进 DNA 的甲基化, 如 miR-29, miR-165/166, miR-290 等都可直接或间接调控 DNMT。

(2) 转录水平上的调控机制。转录水平上的调控可分为直接调控和间接调控。(i) 直接调控, 即直接调控转录因子(转录因子、转录调节因子、共调节因子)的表达量, 从而调控基因的表达量。例如, 增加转录因子 Oct4, Sox2 和 Nanog 的剂量有利于细胞未分化状态的维持, 三者均存在反馈调节, 并且也可以互相调节。Oct4 属于 POU 家族, 其与 Sox2 协同调控

靶基因 *FGF4*, *UTF1*, *Fbx15*, *Nanog*, *Lin28* 等^[84,85], 从而维持细胞干性。最新研究^[85]表明, *Oct4* 还可通过 *Nanog* 抑制 *gata6* 的表达, 进而阻碍下游基因 *gata4* 的表达, 维持细胞干性^[86,87]。另外, 增加转录因子 Klf4 的表达量能够启动 iNOS 和 P21 并抑制 P53^[88,89], 从而抑制细胞分化。(ii) 间接调控, 即调控转录因子活性, 包括转录因子的磷酸化/去磷酸化、聚合(同聚化/异聚化)/解离、招募、配体调节等^[90]。该调控主要由相关信号通路完成, 如在 NF- κ B 信号通路中, 受体-配体结合后通过一系列反应使蛋白激酶 C(protein kinase C)磷酸化, PKC 进一步使 I κ B 磷酸化, 从而解除对转录因子 NF- κ B 的抑制, 启动细胞周期蛋白 D1, 促使神经干细胞增殖^[91]。在 Calcineurin-NFAT 信号通路中, 转录因子 NFAT 去磷酸化, 启动下游基因 *src* 的表达, 促进胚胎干细胞分化^[92]。在 Notch 信号通路中, 受体与配体结合后发生 2 次蛋白水解事件, 从而释放 Notch 受体胞内的 Ncd, Ncd 与 DNA 结合蛋白 CLS 一起转录靶基因 *Hes* 和 *Hey*, 从而抑制间叶干细胞分化^[93]。此外, 还有 TGF β , Erk/MAPK, Wnt, AMPK, SHH 等信号通路都会影响细胞的分化/去分化、增殖/凋亡等。

转录水平的调控是细胞全能性调控机制的核心环节之一, 因为转录因子的靶基因的功能可以涉及从染色体水平到转录后水平等多个层次的调控。另外, 转录因子本身也存在相互调控及自身反馈调控, 并且可以协同/拮抗调控靶基因, 从而使得调控更为精细。此外, 也有人报道^[94], 转录因子 Tbx3 有两种截然相反的调控方向。

(3) 转录后水平上的调控机制。该水平是通过选择性剪接、RNA 编辑、翻译的增强/抑制、翻译后修饰以及蛋白活性的改变, 包括磷酸化/去磷酸化、聚合(同聚化/异聚化)/解离等, 来调控相关基因的表达或它的活性。其中, 最重要的是 miRNA 对靶基因翻译的增强/抑制, 该调控中两者的关系有“一对多”、“多对一”、“多对多”3 种。例如, miRNA-296, miR-145, miR-470, miR-134 抑制转录因子 Oct4, Sox2, Klf4 和 Nanog 的表达, 从而有利于细胞分化^[83]。而 miR-34 同时抑制细胞周期蛋白 D1, E2, 转录因子 E2F3 等, 从而抑制细胞的生长与增殖^[95]。Let-7 通过抑制 Ras 等诸多基因抑制干细胞的去分化状态^[96]。

尽管真核细胞全能性的表现受 3 种不同水平的调控, 但不同水平的调控又相互交叉、相互影响, 从

而构成了一个以转录因子及非编码 RNA 的反馈调控、相互调控及协同/拮抗调控为中心, 横跨多个层次的立体调控网络(图 2).

3.2 影响细胞全能性表现的因素

影响细胞全能性表现的因素可分为自身因素和环境因素. (i) 自身因素指细胞自身状态的影响, 包括染色质的活化程度、转录组、蛋白组的状态等. 此外, 自身因素还包括细胞所处的生长期^[97]、细胞周期及细胞的种类、年龄、来源等参数. (ii) 环境因素, 即细胞微环境的影响, 包括胞外信号分子、表观遗传修饰分子、分泌型非编码 RNA 和周边细胞的旁分泌及接触作用等的影响^[98,99]. 环境因素主要通过直接或经信号转导途径对内源基因进行表观遗传修饰或激活/抑制相关转录因子及非编码 RNA 的表达, 从而改变细胞转录组、蛋白组的状态.

自身因素与环境因素可以在一定条件下互相影响. 例如, 环境因素可以影响内源转录因子的状态, 从而改变自身因素; 细胞自身也可以通过旁分泌效应影响周围细胞, 进而改变环境因素.

事实上, 动物细胞全能性的表现, 正是基于上述 2 个因素而引起的在多个水平上调控基因的表达. 例如, 常规重编程中利用的卵母细胞质中就含有相关转录因子, 表观遗传修饰分子等; 在 iPS 细胞的诱导中对不同宿主细胞使用不同诱导方法就是基于自身因素的考虑; 在导入转录因子的同时添加信号分子、表观遗传修饰分子和非编码 RNA 就是基于多个水平调控的综合运用.

3.3 细胞全能性的表现程度

影响细胞全能性表现的因素及其互作过程较为

复杂, 其结果如图 2 所示. 正是这些复杂的相互作用致使细胞全能性表现的程度不同, 按其高低可分为全能性细胞、多能性细胞和专能性细胞^[50]. 此外, 还存在完全不表现全能性的终末分化细胞. 全能性细胞指能够生成完整新个体的细胞, 如受精卵等. 多能性细胞指能够分化成多种组织器官但不能形成完整个体的细胞. 专能性细胞(也称单能性细胞)指能够专一分化成某一类型细胞的细胞.

4 前景与展望

4.1 动物细胞全能性的应用与存在的问题

动物细胞的全能性, 特别是 iPS 细胞的诱导之所以成为研究的一大热点, 是因为该技术具有极其重要的应用价值, 即在发育机制及其影响因素、基因功能研究、疾病发生机制及药物功效的研究、细胞代替治疗等方面有广泛应用, 特别是在疾病的治疗方面有远大的应用前景. 例如, Kee 等人^[100]已成功利用 iPS 细胞诱导成人工生殖细胞, 为生育问题的解决带来了福音; Maria 等人^[101]利用 iPS 细胞培育出视网膜细胞, 为老年性黄斑病变的治疗奠定了基础; 德州大学健康科学中心的研究人员^[102]已在第一期临床试验上利用患者骨髓干细胞有效、安全地治疗了创伤性脑损伤; 骨髓间叶干细胞在心血管疾病的治疗上也取得了可喜的成绩^[103]; 造血干细胞已成功应用于白血病的治疗^[104]; 另外, 各种来源的干细胞在糖尿病的治疗上也具有广阔的前景^[105]. 目前, 动物实验及前期的临床试验表明, 动物细胞全能性在血液疾病、脑部疾病、视觉疾病、心脏疾病、肾脏疾病等多种疾病的治疗上都有潜在的应用价值.

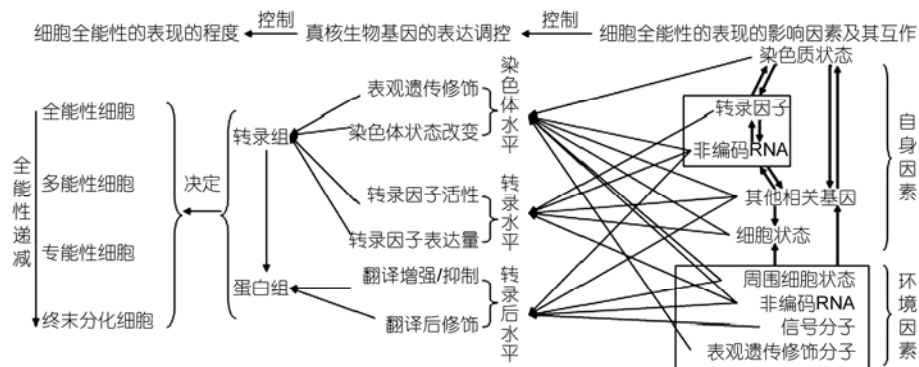


图 2 细胞全能性表现的分子机制及影响因素

尽管细胞全能性理论的应用已经看到了曙光,但也存在诸多问题和亟待突破的瓶颈,如动物细胞全能性表现的分子机制及可控性问题基本没有解决;iPS 细胞在诱导过程中存在癌变的可能性,而且它容易产生一系列基因多样性的细胞系,也可能产生疾病易感个体的细胞系;而胚胎干细胞在治疗中又存在伦理性的争议及免疫排斥的可能性。目前,重编程及干细胞的培养还存在成本普遍较高、制备效率很低、周期较长等一系列问题。

那么,如何安全地制备全能性或多能性细胞?如何有效、快速地诱导全能性细胞或多能性细胞分化,以便应用于特定的治疗?这便需要人们更深入地认识细胞的分化、去分化及其调控的机理。

4.2 细胞命运的控制

事实上,分化与去分化仅仅是细胞的一种命运。谁掌握了通过环境因素和自身因素来控制基因表达的理论,谁就可以控制细胞的命运。为进一步理解这一概念,1957年,Waddington^[106]从分化潜能的角度提出了细胞命运的模型,即把分化潜能作为当前细胞状态向其他状态转化的能力大小的度量。

分化潜能是细胞的自身因素,与细胞基因的表达谱有关。分化潜能随着分化程度增加而降低,如异染色质化,DNA 大规模甲基化等处理就降低了细胞的分化潜能,使之处于终末分化状态;而重编程则能重新给予细胞更高的分化潜能。然而,分化潜能只是潜在的能力,想要真正利用它,还需要一条路径或一道闸门,即分化与去分化途径,它能够使细胞从去分化状态转变成特定的分化状态。iPS 细胞保留了宿主

细胞的痕迹,这一点证明了分化与去分化途径的存在^[107]。因此,需要将细胞分化/去分化过程划分为不同阶段,并根据相应因素设计分化与去分化途径,从而改变细胞的状态。此外,细胞也同样存在癌变的潜能和癌变/去癌变途径。由此,可设法降低细胞的癌变潜能,从而阻止细胞癌变;对于已癌变的细胞,可尝试设计去癌变途径。此外,不同的途径或许可以达到相同的目的;不同细胞命运的某些途径可能存在交汇点。

对各种因素的控制,归根到底是对基因表达的控制,故需对转录及转录后调控、表观遗传修饰和信号转导等多方面理论有更深刻的理解,特别是通过信号转导途径控制基因表达可以做到无遗传修饰、无外源物质进入细胞,从而使诱导及其表达更加精准和安全。同样,RNA 干扰技术也具有很大的潜力,而微环境对细胞命运的重要性不言而喻,创造特殊的微环境可能成为控制细胞命运的“奇招”。若将单个细胞作为一个系统看待,iPS 技术借助外因对该系统的平衡造成扰动,使其向另一个状态转变并趋于稳定。尽管目前来看,iPS 技术对细胞去分化的途径设计有待改进,如易使细胞基因畸变甚至癌变^[108]、诱导效率不高以及分化效率较胚胎干细胞低^[109]等,但其开创了控制细胞命运之先河,不仅对细胞全能性理论研究有深远的影响,而且也为进一步研究细胞的分化/去分化和癌变/去癌变等途径,进而控制细胞命运奠定了理论和实践基础。

图 3 总结了细胞的命运及改变细胞命运的方法与手段。要想真正掌握细胞的命运就必须结合实验手段与生物信息学手段,用以处理庞大而复杂的

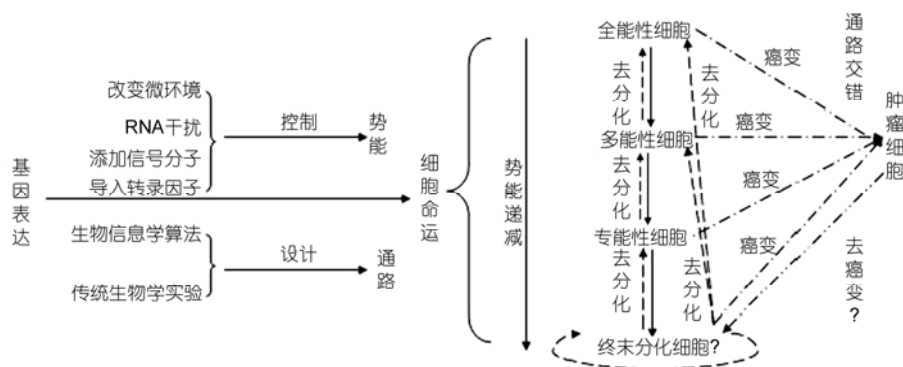


图 3 细胞命运及其控制

数据并从中寻找规律, 如对于干细胞分化因子的预测^[110]等等. 如今, 除 iPS 细胞外, 对细胞命运的控制已有很多可喜的成果, 如皮肤细胞已经可以直接

转化为神经细胞而无需去分化^[111], iPS 细胞可被诱导形成肿瘤干细胞, 从而更有利于肿瘤干细胞的研究^[112]等.

参考文献

- 张慎, 郭陶然, 邓志瑞, 等. 植物开放式组织培养的研究进展. 安徽农业科学, 2010, 26: 14281–14284
- 肖尊安. 植物细胞的全能性. 生物学通报, 2006, 41: 1–3
- Morel G. Producing virus-free cymbidiums. Am Orch Soc Bull, 1960, 29: 495–497
- 朱至清. 植物细胞工程的理论基础: 细胞全能性学说. 植物细胞工程与分子育种研究, 2002, 3–13
- 马克学, 陈广文, 徐存拴, 等. 干细胞——起源不同调控相似. 解剖学报, 2008, 39: 444–446
- 丁晓燕, 李双伟. 组织再生研究进展. 第二军医大学学报, 2005, 26: 233–236
- 关娜, 徐燕宁, 张庆华, 等. 体细胞核重编程中表观遗传学的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35: 496–501
- Geraldine S, Robert E. Pathway to totipotency: Lessons from germ cells. Cell, 2006, 127: 891–904
- 张彩霞, 颜忠诚. 生物的繁殖类型. 生物学教学, 2007, 32: 70–71
- 张国境, 史小林. 组织工程新来源——原始生殖细胞. 生物学通报, 2005, 40: 6–7
- David A, Loebel F, Catherine M, et al. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. Dev Biol, 2003, 264: 1–14
- 温宏升. 胚胎干细胞、成体干细胞的基础研究及应用. 国外医学生物医学工程分册, 2004, 27: 157–160
- 李凌松, 王莉. 胚胎干细胞. 生命科学, 2006, 4: 318–322
- 林晓斌, 许建衡. 胚胎干细胞的特性及其应用. 汕头大学医学院学报, 2004, 17: 248–250
- 何兰花. 干细胞的研究进展及其应用. 黑龙江动物繁殖, 2002, 10: 10–13
- Liu W Q, Yin Y F, Long X L, et al. Derivation and characterization of human embryonic stem cell lines from poor quality embryos. J Genet Genomics, 2009, 36: 229–239
- Paris D B, Stout T A. Equine embryos and embryonic stem cells: Defining reliable markers of pluripotency. Theriogenology, 2010, 74: 516–24
- Amar M S, David R, Timothy C, et al. Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: A Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. Cell Stem Cell, 2012, 10: 312–326
- Ma L X, Hu B Y, Liu Y, et al. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice. Cell Stem Cell, 2012, 10: 455–464
- Tyler A L, Laertis I, Finn H, et al. Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. Cell Stem Cell, 2012, 10: 398–411
- Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature, 1981, 292: 154–156
- Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Sharpio S, et al. Embryo stem lines derived from human blastocysts. Science, 1998, 282: 1145–1147
- Hirofumi S, Norio N. Generation and characterization of monkey embryonic stem cells. Embryonic Stem Cell Protocols, 2006, 329: 80–89
- Shinobu U, Masaki K, Takumi T, et al. Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats. PLoS ONE, 2008, 3: e2800
- Behboodi E, Bondareva A, Begin I, et al. Establishment of goat embryonic stem cells from *in vivo* produced blastocyst-stage embryos. Mol Reprod Dev, 2011, 78: 202–211
- Diana C, Jonas F. Differentiation potential of adult stem cells. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11: 575–580
- Westerlund U, Moe M C, Varghese M, et al. Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture. Exp Cell Res, 2003, 289: 378–383
- Jan K, Marcello R, Sean R, et al. Evidence for human lung stem cells. N Engl J Med, 2011, 364: 1795–1806
- Zou K, Yuan Y, Yang Z J, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. Nat Cell Biol, 2009, 11: 631–636
- Yoko K, Yasuo Y, Tsuyoshi T, et al. Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor-h (TGF-h) facilitates cell growth. Exp Cell Res, 2004, 295: 194–203
- Ting A E, Mays R W, Frey M R, et al. Therapeutic pathways of adult stem cell repair. Crit Rev Oncol/Hematol, 2008, 65: 81–93
- Marx J. Mutant stem cells may seed cancer. Science, 2003, 301: 1308–1310
- Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat

- Med, 1997, 3: 730–737
- 34 Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983–3988
- 35 Ignatova T N, Kukekov V G, Laywell E D, et al. Human cortical glial tumors contain neural stem like cells express in gastroglial and neuronal markers *in vitro*. *Glia*, 2002, 39: 193–206
- 36 Kamstrup M R, Gniadecki R, Skovgaard G L. Putative cancer stem cells in cutaneous malignancies. *Exp Dermatol*, 2007, 16: 297–301
- 37 Jordan C T. The leukemic stem cell. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007, 20: 13–18
- 38 Priscilla N K, Aleksandar D, Jerry M, et al. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*, 2007, 20: 337
- 39 Wang Z, Ouyang G L. Periostin: A bridge between cancer stem cells and their metastatic niche. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 111–112
- 40 Anna M, Francisco M B. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 511–524
- 41 Prasad K N, Hovland A R, Nahreini P, et al. Differentiation genes: are they primary targets for human carcinogenesis. *Exp Biol Med*, 2001, 226: 805–813
- 42 Ding S, Schultz P G. A role for chemistry in stem cell biology. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 833–840
- 43 Matheny, Gary J S, Masayuki I, et al. Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 129–140
- 44 Gomez-Vidal J A, Campos J, Marchal J A, et al. Actual targets in cytodifferentiation cancer therapy. *Curr Top Med Chem*, 2004, 4: 175–202
- 45 Yilmaz Y, Lazova R, Qumsiyeh M, et al. Donor Y chromosome in renal carcinoma cells of a female BMT recipient: visualization of putative BMT-tumor hybrids by FISH. *Bone Marrow Transplant*, 2005, 35: 1021–1024
- 46 Bell D R, Zant G V. Stem cells, aging and cancer: inevitabilities and outcomes. *Oncogen*, 2004, 23: 7290–7296
- 47 Beachy P A, Karhadkar S S. Mending and malignancy. *Nature*, 2004, 431: 420–413
- 48 习佳飞, 岳文, 裴雪涛. 细胞重编程与表观遗传学调控. *生命科学*, 2009, 21: 357–362
- 49 张卫琴, 曹鸿国, 张运海. 体细胞重编程为多能干细胞的研究进展. *生命科学*, 2009, 21: 86–91
- 50 Rudolf J, Richard Y. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 2008, 132: 567–582
- 51 陈凌懿, 刘林. 诱导性多潜能干细胞(iPS)的研究现状和展望. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2009, 39: 621–635
- 52 Kazutoshi T, Shinya Y. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 53 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotech*, 2008, 26: 101–106
- 54 Wernig M, Meissner A, Cassady J P, et al. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 10–12
- 55 Kim J B, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, 454: 646–650
- 56 Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotech*, 2008, 26: 795–797
- 57 Mikkelsen T S, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454: 49–55
- 58 Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, 322: 949–953
- 59 Woltjen K, Michael I P, Mohseni P, et al. Piggy Bac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458: 766–770
- 60 Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, 458: 771–775
- 61 Zhao X Y, Li L, Liu Z, et al. iPS cells Produce viable mice through tetraploid complementation near. *Nature*, 2009, 461: 86–90
- 62 Zhu S Y, Li W L, Zhou H Y, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*, 2012, 7: 651–655
- 63 Shinya Y. Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible. *Cell Stem Cell*, 2011, 7: 1–2
- 64 Pai-Jiun H, Men-Luh Y, Zhong-De L, et al. Endogenous Klf4 expression in human fetal endothelial cells allows for reprogramming to pluripotency with just Oct3/4 and Sox2—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30: 1905–1907
- 65 Li C L, Zhou J M, Shi G L, et al. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol*

- Genet, 2009, 18: 4340–4349
- 66 Christa B, Chen H H, Jose M P, et al. A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 535–546
- 67 Li C L, Yu H Y, Ma Y, et al. Germline-competent mouse-induced pluripotent stem cell lines generated on human fibroblasts without exogenous leukemia inhibitory factor. *PLoS ONE*, 2009, 4: e6724
- 68 Frederick A, Chinmay M, Denise J, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 376–388
- 69 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: 1920–1923
- 70 Wernig M, Zhao J P, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 5856–5861
- 71 Jason S M, Sara E H, Kyle A W, et al. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem cell*, 2011, 29: 1206–1218
- 72 Thomas C J, Ruman R, Farah J, et al. Telomere maintenance and telomerase activity are differentially regulated in asexual and sexual worms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 4209–4214
- 73 Christine L C, Ines B, Christina S, et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 7950–7955
- 74 He X J, Hsu Y F, Zhu S H, et al. An effector of RNA-directed DNA methylation in arabidopsis is an Argonaute 4- and RNA-binding protein. *Cell*, 2009, 137: 498–508
- 75 苏玉, 王溪, 朱卫国. DNA 甲基转移酶的表达调控及主要生物学功能. *遗传*, 2009, 31: 1087–1093
- 76 黄守均, 朱大海. 非编码 RNA 与动物发育. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2009, 39: 21–30
- 77 Tsuji-Takayama K, Inoue T, Ijiri Y, et al. Demethylating agent 5-Azaeytidine reverses differentiation of embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323: 86–90
- 78 Li J Y, Pu M T, Hirasawa R, et al. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 8748–8759
- 79 Lee E R, McCool K W, Murdoch F E, et al. Dynamic changes in histone H3 phosphoacetylation during early embryonic stem cell differentiation are directly mediated by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 via activation of MAPK pathways. *J Biol Chem*, 2006, 281: 21162–21172
- 80 Stadler M B, Murr R, Burger L, et al. DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature*, 2011, 480: 490–495
- 81 Chuang J C, Jones P A. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*, 2007, 61: 24–29
- 82 Lasse S, Tabea H, Philipp B, et al. MicroRNAs control *de novo* DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 3: 259–267
- 83 Sunil K M, Angie R. Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Dev Biol*, 2010, 344: 16–25
- 84 Tokuzawa Y, Kaiho E, Maruyama M, et al. Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 2699–2708
- 85 Rodda D J, Chew J L, Lim L H, et al. Transcriptional regulation of nanog by Oct4 and Sox2. *J Biol Chem*, 2005, 280: 24731–24737
- 86 Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, 113: 643–655
- 87 Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 2003, 113: 631–642
- 88 Li Y, McClintick J, Zhong L, et al. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, 2005, 105: 635–637
- 89 金志刚, 刘莉, 谢治慧. 干细胞命运决定的分子调控网络. *生命科学*, 2007, 19: 364–371
- 90 王亚馥, 戴灼华. *遗传学*. 北京: 高等教育出版社, 1999. 264–284
- 91 Ferguson K L, Callaghan S M. The Rb-CDK 4/6 signaling pathway is critical in neural precursor cell cycle regulation. *J Biol Chem*, 2000, 275: 33593–33600
- 92 Li X, Zhu L L, Yang A, et al. Calcineurin-NFAT signaling critically regulates early lineage specification in mouse embryonic stem cells

- and embryos. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 46–58
- 93 Grogan S P, Olee T, Hiraoka K, et al. Repression of chondro-genesis through binding of notch signaling proteins HES-1 and HEY-1 to N-box domains in the COL2A1 enhancer sit. *Arthritis Rheumat*, 2008, 58: 2754–2763
- 94 Lu R, Yang A, Jin Y. Dual functions of T-Box 3 (Tbx3) in the control of self-renewal and extra embryonic endoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2011, 286: 8425–8436
- 95 Li N, Fu H, Tie Y, et al. miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*, 2009, 275: 44–53
- 96 Collin M, Robert L, Robert B. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2010, 463: 621–626
- 97 Zhang E M, Li X M, Zhang S F, et al. Cell cycle synchronization of embryonic stem cells: effect of serum deprivation on the differentiation of embryonic bodies *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333: 1171–1177
- 98 Chou Y F, Chen H H, Maureen E, et al. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell*, 2008, 135: 449–461
- 99 Li D, Zhou J X, Wang L, et al. Integrated biochemical and mechanical signals regulate multifaceted human embryonic stem cell functions. *J Cell Biol*, 2010, 191: 631–644
- 100 Kehkooi K, Vanessa T A, Martha F, et al. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature*, 2009, 462: 222–225
- 101 Maria K, Niaz S, Nady G. Human iPS-Derived retinal pigment epithelium (RPE) cells exhibit ion transport, membrane potential, polarized VEGF secretion and gene expression pattern similar to native RPE. *Stem Cells*, 2011, 29: 825–835
- 102 Cox C S, Baumgartner J E, Harting M T, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for severe traumatic brain injury in children. *Neurosurgery*, 2011, 68: 588–600
- 103 王彤, 黄子通. 骨髓间充质干细胞与心血管疾病. *中国急救医学*, 2008, 28: 645–648
- 104 Woltjen K, Michael I P, Mohseni P, et al. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458: 766–770
- 105 那春鑫, 王彦红, 王麟, 等. 干细胞治疗糖尿病的研究进展. *生物医学工程进展*, 2010, 31: 110–112
- 106 Shinya Y. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature*, 2009, 460: 49–52
- 107 Wolfrum K, Wang Y, Prigione A, et al. The large principle of cellular reprogramming: lost, acquired and retained gene expression in foreskin and amniotic fluid-derived human iPS cells. *PLoS ONE*, 2010, 5: e13703
- 108 Louise C L, Igor U, Ileana S, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 2010, 7, 8: 106–118
- 109 Matthias S, Effie A, Hidenori A, et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, 465: 175–181
- 110 Fu J P, Wang Y K, Yang M T, et al. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Meth*, 2010, 7: 733–736
- 111 Shi Y C, Peter K, James S, et al. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci*, 2012, 15: 477–486
- 112 Chen L, Tomonari K, Li Y J, et al. A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*, 2012, 7: e33544

Advance in Animal Cell Totipotency

DING Shuo, ZHANG Qi, LIU ZhanMing & HUANG JunYi

School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China

This review discusses the hot issue—research of animal cell totipotency based on the achievement of plant cell totipotency. The performance of animal cell totipotency is introduced first, and then the reasons why different cells show different degrees of animal cell totipotency are analyzed. Finally, extensive applications and existing problems of animal cell totipotency are discussed, and animal cell fate and its control are also reviewed.

animal cell totipotency, stem cells, iPS cells, regulation of gene expression, cell fate

doi: 10.1360/052011-390