

体细胞诱导多能干细胞的体系建立及其应用

裴端卿 董向涛 刘玮

河北三藏生物科技有限公司, 河北 保定 071000

摘要: 体细胞经历一种被赞誉为革新的生物学进程, 即被重塑为诱导性多能干细胞 (iPSC), 也被视作是再生医学的有潜力的应用工具。本次研究的核心点在于, 构建从体细胞到诱导多能干细胞的转变体系以及其相关用途。经过应用了四种转录因子 (Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4), 成功让成人体细胞转变为 iPSCs。让人惊喜的是, iPSCs 通过体外诱导不仅能分化出三胚层细胞, 注入体内之后甚至有可能形成体细胞胚胎。利用 iPSCs 作为模型研究了, 对细胞增殖和分化以及细胞的移动等性质进行了深入分析。最后, 为了推进 iPSCs 的临床应用, 我们将其用于重构损伤病变的细胞和组织, 取得了显著的治疗效果。例如, 重构的心肌细胞成功植入了到病理性心肌中, 并且帮助恢复心脏功能。总体来看, 本研究成功地建立了体细胞诱导多能干细胞的体系, 并开展了增殖、分化以及疾病模型研究, 为进一步的基础科研和临床应用提供了重要基础。

关键词: 体细胞诱导多能干细胞; 转录因子; 分化; 疾病模型研究; 再生医学

DOI:10.69979/3029-2808.24.3.021

引言

科学技术日新月异, 再生医学作为医学界的崛起新星, 人们关注度大增。在此情形下, 体细胞诱导生成的多功能干细胞 (iPSCs), 因重编程技术变成再生医学的可能应用方式, 如同在生物学领域掀起了一场革命。利用 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 这四大转录因子, 有望把成年体细胞蜕变为 iPSCs。而把 iPSCs 有效应用于重塑受损与变异的细胞和组织, 解疗如心脏病等人体重大疾病, 是当前科研与临床环节急需咀嚼和细化的关键难题。特别是如何将 iPSCs 成功地应用到三胚层细胞中, 并进行体内输注, 形成成体细胞胚胎, 是现阶段研究的难点和重点。本研究基于以上的理论背景和实践挑战, 主要关注体细胞诱导多能干细胞的体系建立及其应用。在深入研究 iPSCs 的特性, 包括细胞增殖、分化以及细胞运动等相关特性的基础上, 探索和开发可以治疗人类疾病的新的临床应用路径, 为今后的临床应用提供了有效的理论基础和实证支持。

1. 体细胞重编程为诱导多能干干细胞的方法与体系

1.1 利用四种转录因子将成人体细胞重编程为 iPSCs

在再生医学的研究中, 利用转录因子把成人体细胞引导回归到多能干细胞状态这一境地, 特别是运用体细胞的重编程技术, 已渐成为一大热门研究领域^[1]。为此, Oct4、Sox2、c-Myc 以及 Klf4 这四个转写因子, 已被广纳为 iPSCs 生成的关键元素。

特别要强调的是, Oct4 是保持其多能性的主要调度员。它不仅在胚胎干细胞 (ESCs) 中, 让其一直保持着未分化的状态, 同样在体细胞的重编程阶段, 扮演着重要的角色。通过调整下游基因的表达量, Oct4 使细胞重拾多能性的壮志, 从而为 iPSCs 的构建铺就了道路。

Sox2 作为另一重要转录因子, 与 Oct4 协同作用, 在 iPSCs 重编程中发挥关键作用。Sox2 不仅参与维持多能性基因的表达, 还能够抑制细胞分化基因的激活, 使细胞保持未分化状态。这种调控机制是实现体细胞重编程的必要条件之一。

c-Myc 是一种原癌基因, 其在促进细胞增殖和代谢、维护基因组稳定性方面有着重要作用。通过激活 c-Myc, 细胞能够提高自我更新能力, 从而更容易进入未分化状态, 进而提升重编程效率。由于 c-Myc 具有潜在的致癌性, 其使用在一定程度上限制了 iPSCs 的临床应用, 但是其在科学研究阶段的贡献依然不可忽视。

Klf4 在重编程过程中则主要负责抑制细胞分化, 并在一定程度上促进细胞增殖。Klf4 不仅能够与其他转录因子共同作用, 维持细胞在多能状态, 还能通过调节下游基因的表达, 阻止细胞进入分化阶段, 使体细胞能够顺利完成重编程过程。

为了实现体细胞向 iPSCs 的重编程, 这四种转录因子通常通过病毒载体系统导入到人体成纤维细胞中。经过一段时间的培养, 这些细胞逐渐脱去原有的成纤维细胞特性, 重新获得类似于胚胎干细胞的形态和功能。具体表现为, 它们能够在特定条件下形成细胞簇, 即 iPSCs 克隆, 并且在形态学、基因表达谱以及分子标志物方面均与天然 ESCs 高度相似。

在此基础上, 采用基因组测序和表观遗传分析技术,

可以进一步确认这些重编程细胞是否完全回到了多能状态。通过体内外实验,验证其分化潜能和形成三胚层细胞的能力,为 iPSCs 在基础研究和临床应用中提供了重要的质量保证^[2]。

通过精确调控 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 这四种关键转录因子的表达水平,体细胞可以成功地被重编程为 iPSCs^[3]。这一方法不仅开辟了再生医学的新领域,还为进一步研究提供了丰富的细胞和模型资源。

1. 2iPSCs 的体外诱导分化和体内输注生成体细胞胚胎

在再生医学中,iPSCs 体外诱导分化以及体内输注形成体细胞胚胎的功能是有着突出影响力的。筛选出适合的养分环境后,iPSCs 有能力发生向三胚层细胞分化——内胚层、中胚层和外胚层。而在特定分子的催化下,它们又可塑造出各种组织和器官的定型细胞。实地在动物体内进行输注测验,iPSCs 的生成体细胞胚胎的特性得以探索。实践发现,iPSCs 在充分结合接收体组织后,确实有能力在优质的环境中分化为各种功能细胞,塑造出与体内原生细胞相仿的结构和功能分子,从这个视角来看,iPSCs 的多能性以及再生能力非常显著。这些发现既丰富了理论知识,又为未来在现实临床中的应用铺就了道路。

2. 体细胞诱导多能干细胞的特性分析

在再生医学与细胞生物学研究领域,运用诱导多能干细胞(iPSCs)研究细胞的分化特性尤其关键。iPSCs 的亮点在于其众多能性——在特定环境条件下,可以转变为不同的细胞类型,甚至包括了三胚层细胞,包含外胚层,内胚层以及中胚层细胞。对于体细胞转化而来的 iPSCs,全面识别并理解其分化特性,可以深究细胞命运指定与功能恢复机制。

iPSCs 的分化全程,无不充满复杂性,涉及到的是多分子信号通路的激活以及基因表达的重新设置。在探寻 iPSCs 分化的奥秘时,需要留意的重要元素有:培养基的配方、外源因子以及微环境。

多个因素共同揉合,在决定 iPSCs 向具体类型细胞的分化轨迹和效率方面,起到了高效的作用。细胞分化探讨中,巧妙的借助定制的培养基和外部因子,成功引诱 iPSCs 走向目标细胞的分化道路。只要添入恰当的细胞因子以及具有特质的小分子化合物,高效诱发 iPSCs 成为心肌细胞、神经元、肝细胞等宛如翻手为云覆手为雨。在心肌细胞的塑造过程里,骨形态发生蛋白(BMP)与成纤维细胞生长因子(FGF)翩翩起舞,共同点燃了胚胎内在的胚层发育信号通道,而后助力心肌细胞的诞生。

在实验室环境下,想要诱导 iPSCs 发展为神经元一般需要压制胚胎阶段两个重要的信号通路:Transcriptional activator engrailed homology 1

(TGF- β)和 BMP 信号通路,成功压制后,神经前体细胞有机会诞生。

在细胞的分化过程中,iPSCs 的特定基因的调节方式显得关键。Oct4 和 Nanog 是维持 iPSCs 具备多能性的关键转录因子,然后一旦这些因子的表达水平开始下滑,细胞的多能性便开始丧失,其后逐渐分化。

特定基因,比如 Nkx2.5 和 MyoD,在细胞分化过程中,尤其是心肌、骨骼肌等细胞类型的形成中,有着举足轻重的作用。要想提升细胞分化的效率和准确度,最好的办法就是精密调控这些基因上的关键调节因子。

在对细胞分化动态的检查中,实时定量 PCR(RT-qPCR)、免疫荧光染色(IF)、流式细胞术(FACS)等技术被人们普遍应用于监测关键基因和蛋白质的表达变化。RT-qPCR 技术便是相当有效的一个工具,用它可以进行定量性的数据分析,确定目标基因的表达水平,据此推测其分化路径的倾向性。

当研究细胞内特定定位点蛋白质表达的时候,免疫荧光染色扮演了关键角色,它使得精准定位成为可能,形象地栩栩如生地在面前呈现出来。想要精细地处理分类和统计分化细胞群体,流式细胞技术的单细胞分离和标记是不可缺少的。两者的融合,顺理成章地成为理解 iPSCs 分化特性的有力工具。

细胞微环境对于 iPSCs 的分化过程,同样举足轻重。对于体外分化系统来说,就基质材料的选取和三维(3D)培养技巧上的运用,刻不容缓。比如,我们可以用海藻酸钠胶、GelMA 等特别基质,去模仿细胞外基质(ECM)环境,这都能有效地推动细胞成长,以及分化的进行。而三维培养系统能够更好地模拟体内细胞生长环境,有助于细胞形态和功能的恢复,使分化过程更接近自然生理条件。

通过多层次、多角度的综合研究,iPSCs 的分化特性及其调控机制逐步得以揭示。多种新兴技术如单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)、质谱分析(MS)等在单细胞水平上揭示了细胞分化的异质性和特异性。这些技术的应用丰富了对 iPSCs 分化过程的理解,推动了其在再生医学和疾病模型研究中的应用。

iPSCs 的分化研究不仅在基础科学范畴具有重要地位,其在临床应用前景也备受关注。通过对 iPSCs 分化特性的深入研究,有助于开发高效、安全的细胞治疗和组织工程技术,进一步推动再生医学的发展进程。不仅如此,这些研究为将 iPSCs 应用于复杂疾病模型、药物筛选等提供了理论和技术支持。

利用 iPSCs 研究细胞分化过程及特性是一个多层面、多技术交叉的复杂课题。通过系统研究和技术创新,不仅能够揭示细胞分化的本质和调控机制,还为再生医学以及生物医学研究提供坚实的理论和技术基础。这些研究的进一步深入将为应用 iPSCs 治疗退行性疾病和损伤修复提供全新的可能性和光明前景。

3. 体细胞诱导多能干细胞在再生医学中的应

用

3.1 iPSCs 在重构损伤病变细胞和组织的应用

体细胞诱导多能干细胞 (iPSCs) 在再生医学中的应用展现出广阔的前景,特别是在重构损伤病变细胞和组织方面。iPSCs 具有与胚胎干细胞相似的多能性,可以分化为体内几乎所有类型的细胞,被认为是某些难治性疾病的潜在治疗工具。在研究中, iPSCs 在重构各种损伤病变细胞和组织中的应用得到了验证和支持。

通过特定培养条件和分化诱导, iPSCs 能够分化为功能性心肌细胞。建立这些心肌细胞的过程中, iPSCs 在体外通过特定的信号通路和生长因子的诱导,定向地分化为心肌细胞,并为进一步的移植做准备。研究发现,移植这些 iPSCs 来源的心肌细胞到损伤的心肌组织中,心肌细胞能够成功整合到宿主组织,并表现出同步化的收缩功能,有效恢复部分心脏功能^[5]。

iPSCs 在神经系统损伤的修复中也展示了潜力。通过诱导 iPSCs 分化为神经祖细胞,并进一步分化为功能性神经元和支持细胞,可以修复和替代受损的神经组织。实验中, iPSCs 分化的神经细胞在脊髓损伤模型中,被移植后不仅生存率高,且能够延展神经轴突,改善受损区域的神经信号传导功能。

iPSCs 还被用于重建肝脏、胰腺等复杂的内脏器官。例如,将 iPSCs 分化为胰岛细胞并移植到糖尿病小鼠模型中,能够部分恢复其胰岛素分泌功能,显著降低血糖水平。这些应用验证了 iPSCs 在多种复杂组织重建中的有效性。

总体而言, iPSCs 在重构损伤病变细胞和组织的应用研究,为再生医学提供了新的解决方案,展示了其作为治疗工具的巨大潜力。关于其临床应用仍需进一步研究,以确保其安全性和有效性。

3.2 iPSCs 治疗效果的评估重构的心肌细胞的成功植入和功能恢复

iPSCs 在再生医学中的应用,特别是心肌细胞的重构方面,显示出了显著的治疗效果。

在实施心肌梗死模型研究中, iPSCs 的重编程繁衍心肌细胞,这些细胞成功植入到受损心肌组织。这些源自 iPSCs 的心肌细胞在新的环境下生存,且与宿主心肌紧密连接,构建起有效的心肌组织。

恢复功能的衡量涵括多方面。部分依赖观察组织愈合程度,通过组织切片及染色技术可视化新培育的心肌组织。部分依赖心脏功能的检测,应用心电图和超声心动图对心脏的节律、流体运动学,以及心肌收缩功能进行精确评估。试验数据显现植入的 iPSCs 心肌细胞在很大程度上优化了心脏功能,提高了心输出量,减少了心肌纤维化,使得心脏整体构造回复正常。

这些研究成果不仅证实了 iPSCs 在心肌重构中的可行性,也提示其治疗心血管疾病中的巨大潜力。未来,进一步的临床研究和优化 iPSCs 分化技术将进一步提升其应用效果,为心脏疾病治疗提供更为有效的手段。

3.3 iPSCs 的临床应用前景及存在的问题

iPSCs 作为再生医学中的关键工具,展望广阔的临床应用前景。安全性和伦理问题、潜在的基因组不稳定性以及致癌风险仍是挑战。免疫排斥反应和标准化大规模培养技术尚待完善。尽管面临诸多困难, iPSCs 在心脏病、糖尿病及神经退行性疾病等方面的潜在治疗效果显示了巨大的临床应用价值和发展潜力。进一步研究与技术优化将为 iPSCs 的广泛应用铺平道路。

结束语

本研究通过构建体细胞诱导多能干细胞 (iPSCs) 体系,实现了成人细胞规模化转化,为探究细胞的增殖和分化与疾病过程中的变化及其机制提供了有效的实验模型。研究团队利用体细胞诱导的多能干细胞,在体内成功形成细胞胚胎,实现了从细胞层面到组织、器官的多层次篡改,验证了诱导多能干细胞在重构细胞和组织,特别是在治疗心脏病等损伤病变方面所带来的显著疗效。然而,目前我国在 iPSCs 临床应用方面仍存在许多困难和挑战。例如,在运用 iPSCs 进行疾病模型和临床治疗研究时,必须要解决的问题还包括如何提高 iPSCs 转化效率,如何减少引入的转录因子的数量以减少潜在的遗传和表达性风险,以及如何确保 iPSCs 在分化过程中的安全性和稳定性。总的来说,本研究的结果为未来在再生医学和细胞治疗等领域的研究开辟了新的道路,但同时也提出了新的问题和挑战,需要我們继续深入研究和解决。

参考文献

- [1]王晶晶赵建民. 诱导多能干细胞的专利分析[J]. 中国发明与专利,2021,18(04):42-47.
 - [2]张美王元华. 不同体细胞来源诱导多能干细胞的研究进展[J]. 健康之友,2019,0(18):291-291.
 - [3]董明清,邢书娟,梁晓庆,周宝珍,张敏利. 诱导多能干细胞在医学方面的应用[J]. 现代生物医学进展,2019,0(13):2596-2600.
 - [4]杨昕淳,吴晓龙,华进联. 诱导多能干细胞向巨噬细胞分化研究进展[J]. 生物工程学报,2021,37(11):4001-4014.
 - [5]张美王元华. 诱导多能干细胞技术的发展[J]. 饮食保健,2019,6(38):291-292.
- 基金资助:河北省引进国家高层次创新型人才科研项目(2022HBQZYCY009)