

• 基础研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.19.004

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240708.0952.006\(2024-07-10\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240708.0952.006(2024-07-10))GPx4 在体细胞重编程为干细胞中的作用研究^{*}杨 洋¹, 林厦华¹, 杨君怡¹, 郑 茵¹, 李鹏东¹, 欧阳资章¹, 赵国军¹, 廖宝剑^{1,2△}

(1. 广州医科大学附属清远医院/清远市人民医院, 广东清远 511518;

2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510530)

[摘要] **目的** 探究谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPx4) 对小鼠体细胞重编程的影响。**方法** 为了比较 OG2 小鼠胚胎成纤维(MEFs)细胞(MEFs 组)与小鼠胚胎干细胞(mESCs, mESCs 组)中 GPx4 的表达, 利用转录组测序技术和 Western blot 确定细胞内 GPx4 的表达水平; 为了验证 GPx4 对体细胞重编程效率的影响, 将 GPx4 基因完整的开放阅读框序列以及其硒代半胱氨酸插入序列(SECIS)连接到反转录病毒载体 pMXs 上, 构建过表达质粒 pMXs-GPx4。合成靶向 GPx4 的短发夹 RNA(shRNA)并连接到 pSUPER 载体上, 构建 GPx4 shRNA1 和 GPx4 shRNA2 来敲低 GPx4 的表达。将上述质粒及对应的对照质粒与 pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、pMXs-Oct4 共转染到 MEFs 细胞中进行重编程诱导, 得到 pMXs GPx4 组、pMXs 空载对照(pMXs NC)组、GPx4 shRNA1 组、GPx4 shRNA2 组、pSUPER 空载对照(pSUPER NC)组。实时荧光定量 PCR 检测 GPx4 基因及多功能性标记基因 Rex1、Sox2、Dppa3、Sall4、Oct4、Nanog 表达; 免疫荧光染色检测诱导性多能干细胞(iPSC), 多能干细胞碱性磷酸酶染色检测 iPSC 克隆生成数量; Western blot 检测 GPx4 蛋白表达。**结果** mESCs 组中 GPx4 mRNA 及蛋白表达水平高于 MEFs 组; 与 pMXs NC 组比较, pMXs GPx4 组细胞内 GPx4 mRNA 表达水平明显升高; 与 pSUPER NC 组比较, GPx4 shRNA1 组和 GPx4 shRNA2 组中 GPx4 mRNA 和蛋白表达水平下降($P < 0.05$); pMXs GPx4 组 iPSC 克隆数高于 pMXs NC 组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); GPx4 shRNA1 组和 GPx4 shRNA2 组的 iPSC 克隆数均明显低于 pSUPER NC 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。完成重编程后, 各组生成的 iPSC 与原始 MEFs 细胞比较, 各多能性标记基因 Rex1、Sox2、Dppa3、Sall4、Oct4、Nanog 表达水平均升高。**结论** 敲低 GPx4 可抑制体细胞重编程效率, 其生成的诱导性多能干细胞具有正常的多能基因表达能力。

[关键词] 体细胞重编程; 谷胱甘肽过氧化物酶 4; 干细胞多能性; 诱导性多能干细胞; 细胞命运调控**[中图分类号]** R329.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2024)19-2898-09Role of GPx4 in somatic cells reprogramming into stem cells^{*}YANG Yang¹, LIN Xiahua¹, YANG Junyi¹, ZHENG Yin¹, LI Pengdong¹,OUYANG Zizhang¹, ZHAO Guojun¹, LIAO Baojian^{1,2△}

(1. Affiliated Qingyuan Hospital, Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China; 2. Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510530, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of the glutathione peroxidase 4 (GPx4) on mouse somatic cell reprogramming. **Methods** To compare the expressions of GPx4 in OG2 mouse embryonic fibroblast (OG2-MEF) cells (MEFs group) and mouse embryonic stem cells (mESC, mESCs group), the expression level of intracellular GPx4 was determined by transcriptome sequencing technique and Western blot. To verify the effect of GPx4 on the efficiency of the somatic cells reprogramming, the complete open reading frame sequence of GPx4 gene and its selenocysteine insertion sequence (SECIS) were connected to the retroviral vector pMXs for constructing the overexpressed plasmid pMXs-GPx4. Gpx4-targeting short hairpin RNA (shRNA)

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金项目(2024A1515013168)。 [△] 通信作者, E-mail: Liaobaojian@gzhmu.edu.cn。

was synthesized and connected to pSUPER vector, GPx4 shRNA1 and GPx4 shRNA2 were constructed to knockdown GPx4 expression. The above plasmids were co-transfected with pMXs-Sox2, pMXs-Klf4 and pMXs-Oct4 into MEF cells for reprogramming induction to obtain the pMXs no-load control group (pMXs NC), pMXs GPx4 group, pSUPER no-load control group (pSUPER NC), GPx4 shRNA1 group and GPx4 shRNA2 group. The expressions of GPx4 gene and multifunctional marker genes Rex1, Sox2, Dppa3, Sall4, Oct4 and Nanog were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The induced pluripotent stem cells (iPSC) were detected by immunofluorescence staining; the number of iPSC clones generation was detected by alkaline phosphatase staining of pluripotent stem cells; the GPx4 protein expression was detected by Western blot. **Results** The mRNA and protein expression of GPx4 in the mESCs group was higher than that in the MEFs group; compared with the pMXs NC group, the expression level of GPx4 mRNA in the pMXs GPx4 group was significantly increased; compared with the pSUPER NC group, the GPx4 mRNA and protein levels in the GPx4 shRNA1 group and GPx4 shRNA2 group were decreased ($P < 0.05$); the iPSC clone number in the pMXs GPx4 group was higher than that in the pMXs NC group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The number of iPSC clones in the GPx4 shRNA1 group and GPx4 shRNA2 group was significantly lower than that in the pSUPER NC group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). After completing the reprogramming, compared with the original MEF cells, the expression levels of various pluripotent marker genes Rex1, Sox2, Dppa3, Sall4, Oct4 and Nanog in the generated iPSC of each group were increased. **Conclusion** GPx4 knockdown could inhibit the efficiency of somatic cell reprogramming, its generated induced pluripotent stem cells have the normal pluripotent gene expression ability.

[Key words] somatic cell reprogramming; glutathione peroxidase 4; stem cell pluripotency; induced pluripotent stem cells; cell fate determination

2006 年、2007 年 TAKAHASHI 等^[1-2]建立了体细胞重编程体系,成功获得诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)。2022 年, GUAN 等^[3]利用小分子化合物将体细胞重编程为多潜能干细胞,这种细胞被称为化合物诱导性多能干细胞(chemically induced pluripotent stem cells, CiPSC),后续又有研究者用同样的方法制备了 CiPSC^[4-5]。研究者们一直致力于寻找新型高效的重编程方法,为再生医学和诱导多能干细胞的机制研究提供高质量细胞来源及崭新的细胞模型。研究表明,谷胱甘肽能够通过维持八聚体结合转录因子 4(octamer-binding transcription factor 4, Oct4)水平来保持干细胞多能性^[6]。此外谷胱甘肽代谢是逆转骨骼肌干细胞衰老的可及靶点,这个发现确定了干细胞衰老的新机制^[7]。说明谷胱甘肽及其代谢通路在干细胞多能性维持及抗衰老过程中均发挥一定功能。谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPx4)是一个含硒元素的蛋白。随着研究的不断深入,GPx4 越来越多的功能被发现,例如参与多种细胞信号转导通路、保护线粒体三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)免受氧化应激的影响及抑制线粒体凋亡的发生^[8-9],这提示 GPx4 与生命调控息息相关。本研究通

过过表达和敲低 GPx4,探讨其对重编程的影响,旨在为 GPx4 对干细胞多能性维持的重要意义提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、质粒、菌株

OG2 小鼠胚胎成纤维(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)细胞、Plat-E 细胞、小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESCs)由中国科学院广州生物医药与健康研究院刘晶研究员赠予。pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、pMXs-Oct4 质粒购自美国 Addgene 公司。pMXs-GPx4 过表达质粒及其空白对照及 GPx4 敲低质粒及其空载对照由本实验室构建。

1.1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基(货号:C11995500BT)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; 货号:10091148)、非必需氨基酸(货号:11140050)、谷丙氨酸二肽添加剂(GlutaMax, 货号:35050061)、丙酮酸钠(货号:11360070)、 β -巯基乙醇(货号:21985023)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF, 货号:A35933)、杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate buffer saline, DPBS, 货号:14190144)均购自美国 Gibco 公司; TR-

Izol(货号:15596026)购自美国 Thermo Fisher 公司;多能干细胞碱性磷酸酶染色试剂盒(货号:C3206)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR(货号:R333-01)、Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(货号:Q712-03)、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(货号:P505-d2)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;GPx4 抗体(货号:ab125066)购自美国 Abcam 公司;Oct4 抗体(货号:sc-5279)购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; β -actin 抗体(货号:GB15003)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;EEF1A 抗体(货号:DF6156)购自江苏莱科生物研究中心有限公司。荧光二抗(货号:#8890S)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)溶液(货号:C0065)购自北京索莱宝科技有限公司。抗荧光衰减封片剂(货号:BL701A)购自北京兰杰柯科技有限公司。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MEFs 和 Plat-E 细胞培养在由高糖 DMEM 基础培养基+10%FBS+1%非必需氨基酸+1%谷氨酰胺构成的培养基中。胚胎干细胞培养于 mES 培养基(高糖 DMEM 基础培养基+15%FBS+1%非必需氨基酸+1% GlutaMax+1%丙酮酸钠+0.1 mmol/L 的 β -巯基乙醇+LIF)。

1.2.2 构建 pMXs-GPx4 过表达质粒

在 NCBI 上检索获得 GPx4 的全长 mRNA 序列。提取 mESCs 的 RNA,反转录后作为扩增模板使用。PCR 扩增得到的目的片段经过琼脂糖凝胶电泳后回收。随后通过同源重组将 GPx4 基因完整的开放阅读框序列以及其硒代半胱氨酸插入序列(selenocysteine insertion sequence element, SECIS)元件及目的片段连接到 pMXs 载体上,得到 pMXs-GPx4 过表达质粒。GPx4 扩增引物序列,正向:5'-tagctagtttaattaaggatccATG AGC TGG GGC CGT-3';反向:5'-tttgtagtccatggtacgcgtCGG CAG GGA TGC ACG CCA GGT-3'。

1.2.3 构建 GPx4 短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)

将用于敲低 GPx4 的两个 shRNA 干扰序列 5'-CTCA TGA AGG TCT GCC TGA AA -3' 和 5'-GAC GTA AAC TAC ACT CAG CTA -3' 克隆到

pSUPER 载体中,得到 GPx4 shRNA1 和 GPx4 shRNA2 质粒。

1.2.4 慢病毒包装

将 Plat-E 细胞分盘,24 h 后细胞密度大约为 80% 时即可转染。使用聚乙烯亚胺(polyethylenimine L, PEI)完成转染,按照说明书制备 PEI-DNA 混合物,在形成混合物过程中,移除细胞生长培养基,每个皿中加入 10 mL 新鲜预热的完全培养基,将 PEI-DNA 混合物加入细胞中,轻轻混匀。于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,10 h 后换掉转染试剂与培养基。分别在 48 h 和 72 h 收集病毒,并使用 0.45 μ m 滤器过滤。

1.2.5 细胞转染

过滤后的病毒上清液中加入终浓度为 8 μ g/mL 的聚凝胺,颠倒混匀病毒,促进病毒感染效率。加入各种病毒上清液到 MEFs 细胞中。病毒感染 24 h 后收集病毒并再次感染细胞。第二次感染结束后更换新鲜培养基并记为重编程第 0 天(D0)。

1.2.6 细胞分组

为了解 MEFs 细胞与 mESCs 中 GPx4 表达的不同,取 MEFs 细胞与 mESCs,分为 MEFs 组和 mESCs 组。为验证 GPx4 对体细胞重编程效率的影响, pMXs-GPx4 过表达质粒及其空载对照质粒, GPx4 shRNA1、GPx4 shRNA2 及其空载对照质粒分别与 pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、pMXs-Oct4 共转染到 MEFs 细胞中进行重编程诱导,转染 pMXs-Sox2、pMXs-Klf4 和 pMXs-Oct4 可沉默体细胞基因并启动多能基因的表达。得到 pMXs GPx4 组、pMXs 空载对照(pMXs NC)组、GPx4 shRNA1 组、GPx4 shRNA2 组、pSUPER 空载对照(pSUPER NC)组。

1.2.7 转录组测序

收集小鼠样本 8 例,其中 MEFs 细胞收集 3 例, mESCs 细胞收集 5 例。提取 RNA 后送广州序科码生物技术有限责任公司进行测序。定量分析完成后,得到所有样本的基因表达水平矩阵,进行基因差异表达显著性分析。

1.2.8 碱性磷酸酶染色

使用多能干细胞碱性磷酸酶显色试剂盒对 iPSC 进行鉴定。将 24 孔板中的细胞用 4%多聚甲醛固定 15 min,并用 PBS 洗涤。洗涤后每孔中加入 500 μ L 染色工作液,室温下避光孵育 30 min。去除染色工作液,用 PBS 洗涤 1~2 次即可终止显色反应。

1.2.9 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测

收集细胞,加入 1 mL TRIzol,按照试剂说明书提

取细胞总 RNA。使用 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 试剂盒,取 1 μ g RNA 作为反转录模板合成 cDNA。按照 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行 qPCR 反应,设置反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s;变性 95 $^{\circ}$ C 10 s,退火、延伸 60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。qPCR 引物序列见表 1。

1.2.10 Western blot

收集 MEFs 细胞、mESCs,加入含 1%蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白。收集 pSUPER NC 组、GPx4 shRNA1 组和 GPx4 shRNA2 组的细胞,提取总蛋白。使用 BCA 试剂盒进行

蛋白定量;按照实验需要将蛋白样品加入加样孔中,约 10~15 μ g/孔,并在左边加样孔中加入 2 μ L 蛋白 Marker;以 160 V 进行电泳 30 min,直至溴酚蓝迁移至底部;设置 0.4 A 35 min 转膜。待蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上后,5%牛血清清蛋白(BSA)封闭 2 h,TBST 洗膜,加入配制好的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后加入对应二抗,室温孵育 1 h。回收二抗并洗膜 3 次。在条带正面滴加约 100 μ L 配制好的增强型化学发光液(enhanced chemiluminescence,ECL),在化学发光成像系统中根据具体情况适当调整曝光时间,拍照,保存图片。

表 1 qPCR 检测引物序列

基因	方向	序列(5'-3')	产物大小(bp)
GAPDH	正向	AGG TTG TCT CCT GCG ACT TCA	184
	反向	TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC	
GPx4	正向	GAT GGA GCC CAT TCC TGA ACC	185
	反向	CCC TGT ACT TAT CCA GGC AGA	
Rex1	正向	CCC TCG ACA GAC TGA CCC TAA	112
	反向	TCG GGG CTA ATC TCA CTT TCAT	
Sox2	正向	AGG GCT GGG AGA AAG AAG AG	94
	反向	CCG CGA TTG TTG TGA TTA GT	
Dappa3	正向	TGT GGA GAA CAA GAG TGA	127
	反向	CTC AAT CCG AAC AAG TCT T	
Sall4	正向	CCC TGG GAA CTG CGA TGA AG	111
	反向	TCA GAG AGA CTA AAG AAC TCG GC	
Oct4	正向	CGG AAG AGA AAG CGA ACT AGC	108
	反向	ATT GGC GAT GTG AGT GAT CTG	
Nanog	正向	AAA TCC CTT CCC TCG CCA TC	96
	反向	GCG TTC CCA GAA TTC GAT GC	

1.2.11 免疫荧光染色

将细胞接种到预先放置有细胞爬片的培养皿中,待细胞长到合适状态,PBS 洗两遍,随后 4%多聚甲醛固定 15 min。洗涤后使用 0.1%Triton X-100 孵育 15 min。洗涤两次后用 1% BSA 溶液封闭 30 min。Oct4 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤 3 次后加入对应二抗室温避光孵育 2 h。洗涤两次后加 DAPI 染色 5 min。最后滴加封片剂一滴封片,荧光共聚焦显微镜拍照。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism6.0 软件对数据进行统计学分析,各组实验独立重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学

意义。

2 结 果

2.1 GPx4 在 mESCs 中高表达

收集 MEFs 细胞及 mESCs 进行转录组测序,结果显示 GPx4 基因在两者间均有表达,但在 mESCs 组中表达水平高于 MEFs 组(图 1A)。为验证测序结果,随后在转录水平及蛋白水平检测 MEFs 组和 mESCs 组中 GPx4 的表达。由于 MEFs 细胞和 mESCs 两种细胞的细胞结构与细胞代谢活动不同,此处使用 EEF1A 作为 Western bolt 的内参。结果显示,GPx4 mRNA 及蛋白在 mESCs 组中的表达水平高于 MEFs 组(图 1B、C)。GPX4 是一种硒蛋白,在其

mRNA 序列的 3′ 非翻译区域上存在 SECIS 元件。SECIS 元件的存在使得本来作为终止密码子的 UGA 编码为硒代半胱氨酸。本研究设计的 shRNA 靶点分别位于 GPx4 的 CDS 区及 SECIS 元件上(图 1D)。收集已经转染 shRNA 的 MEFs 细胞,在转录水平及翻译水平检测 GPx4 的表达水平,结果显示,GPx4 shRNA1 组和 GPx4 shRNA2 组 GPx4 mRNA 及蛋白表达水平较 pSUPER NC 组下降($P<0.05$),见图 1E、F。

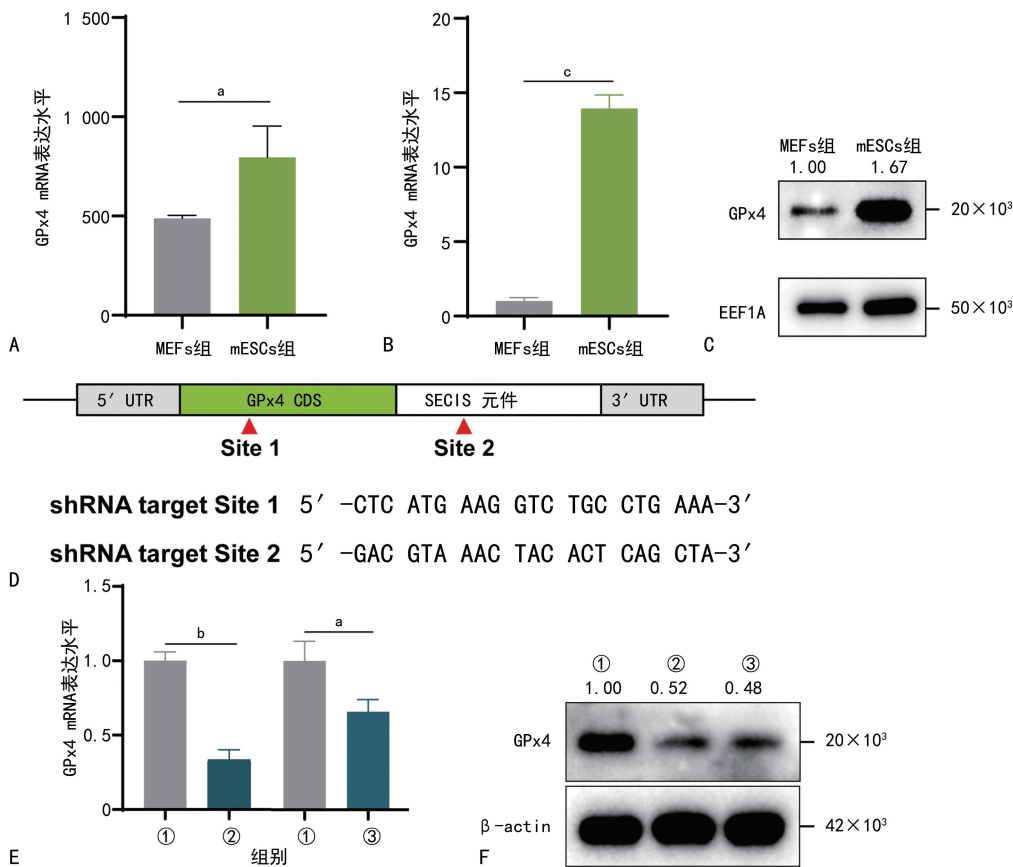
2.2 GPx4 影响体细胞重编程

本研究假设高表达的 GPx4 有利于小鼠体细胞重编程的发生。转染第 9 天 qPCR 结果显示,与 pMXs NC 组比较,pMXs GPx4 组中 GPx4 mRNA 表达水平提升约 2 000 倍以上,差异有统计学意义($P<0.001$),见图 2A。与 pMXs NC 组比较,pMXs GPx4 组生成的 iPSC 大小相仿且都能够发出绿色荧光,见图 2B。碱性磷酸酶染色结果显示,两组生成的 iPSC 克隆数相似,pMXs GPx4 组重编程效率略高于 pMXs NC 组,但差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2C、D。

根据测序结果显示,虽然 MEFs 组中 GPx4 mRNA 表达水平低于 mESCs 组,但是也有一定的表达,此时增加 GPx4 的表达可能无法对重编程效率提升起到显著效果。因此,本研究在重编程过程中对 GPx4 进行敲低。转染第 9 天,与 pSUPER NC 组比较,GPx4 shRNA1 组和 GPx4 shRNA2 组生成的绿色荧光 iPSC 克隆数较少,见图 3A。此外碱性磷酸酶染色结果也显示敲低 GPx4 后 GPx4 shRNA1 组和 GPx4 shRNA2 组生成的 iPSC 克隆数低于 pSUPER NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3B、C。

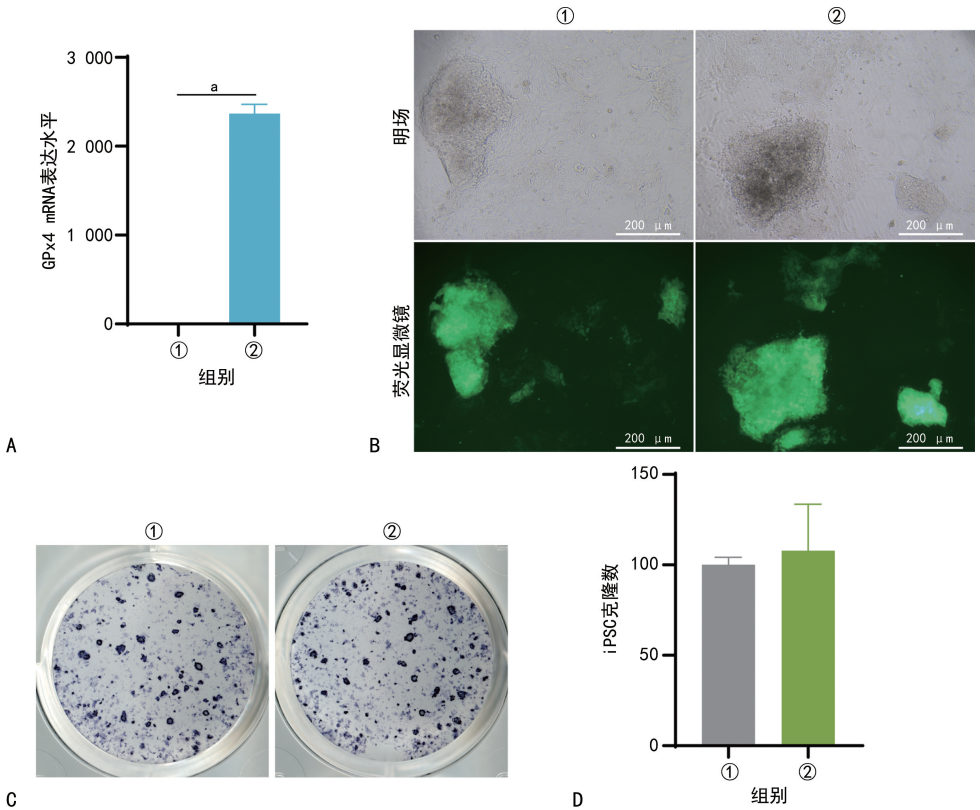
2.3 iPSC 鉴定

收集各组完成重编程的 iPSC 进行 qPCR 检测。与 MEFs 组比较,各组多能性标记基因 Rex1、Sox2、Dappa3、Sall4、Oct4 和 Nanog 表达水平均上升,见图 4A。此外免疫荧光染色可见 pMXs GPx4 组、GPx4 shRNA1 组、GPx4 shRNA2 组干细胞标记物 Oct4 的表达也较 MEFs 组升高,见图 4B。



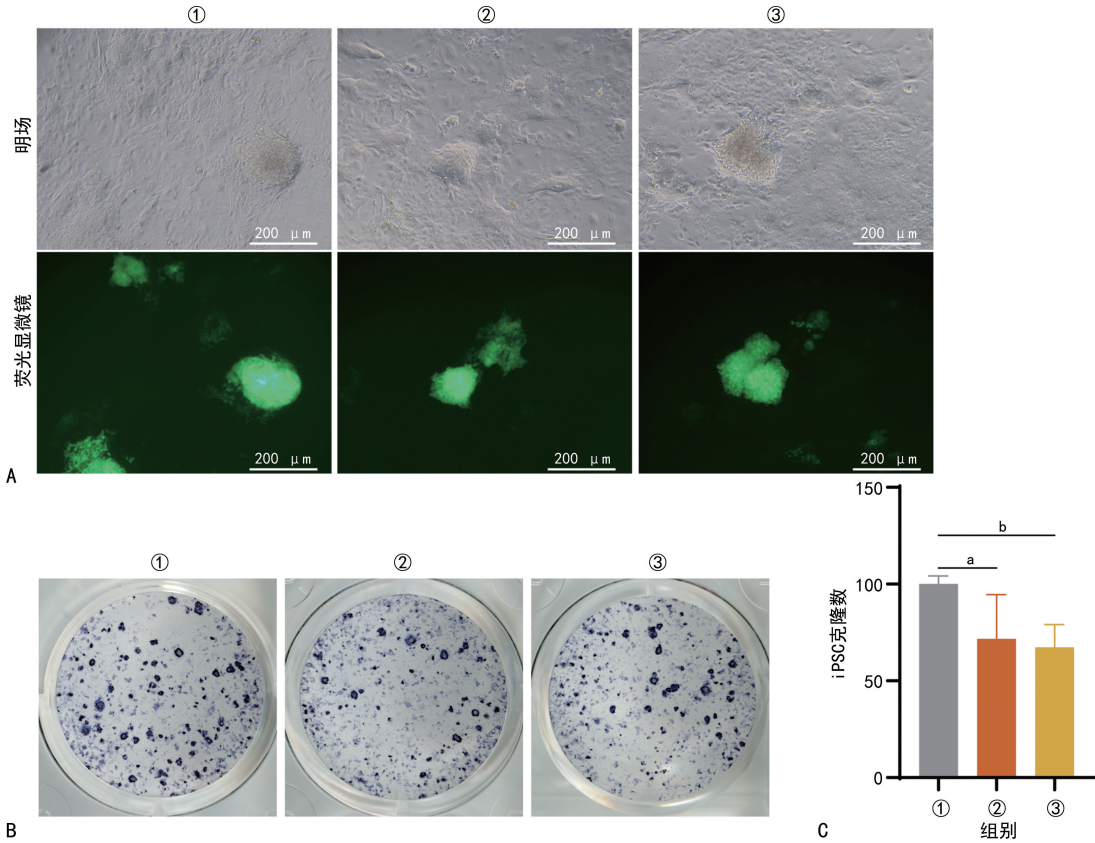
A:转录组测序分析 MEFs 组和 mESCs 组中 GPx4 mRNA 的表达水平;B;qPCR 检测 MEFs 组和 mESCs 组中 GPx4 mRNA 的表达水平;C:Western blot 验证 MEFs 组和 mESCs 组中 GPx4 表达水平,将 MEFs 组 GPx4 表达水平定义为 1.00,则 mESCs 组中 GPx4 表达水平为 1.67;D:GPx4 结构及 shRNA 靶点位置示意图;E;qPCR 检测 shRNA 敲低 GPx4 基因的效果;F:Western blot 检测 GPX4 敲低效果。将 pSUPER NC 组中 GPx4 表达水平定义为 1.00,则 GPx4 shRNA1 组中 GPx4 表达水平为 0.52,GPx4 shRNA2 组中 GPx4 表达水平为 0.48。①:pSUPER NC 组;②:pSUPER shRNA1 组;③:pSUPER shRNA2 组。^a: $P<0.05$;^b: $P<0.01$;^c: $P<0.001$ 。

图 1 GPx4 在 MEFs 和 mESCs 中的表达



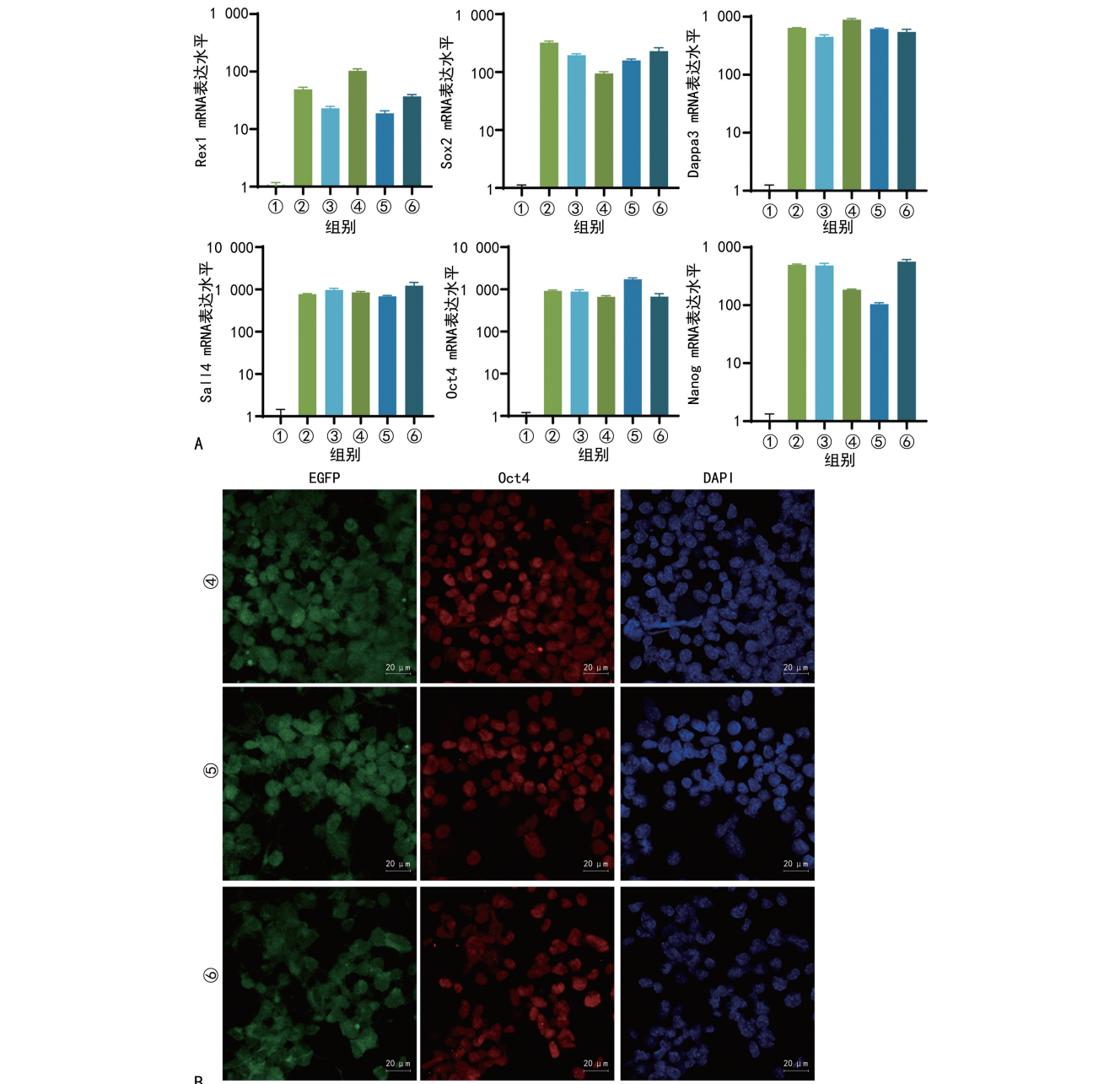
A:qPCR 检测 GPx4 mRNA 表达水平分析图;B:荧光染色检测 iPSC;C:碱性磷酸酶染色检测 iPSC 克隆;D:碱性磷酸酶染色统计分析图。
①:pMXs NC 组;②:pMXs GPx4 组。^a: $P<0.001$ 。

图 2 过表达 GPx4 不影响 MEFs 重编程效率



A:荧光染色检测 iPSC;B:碱性磷酸酶染色检测 iPSC 克隆;C:碱性磷酸酶染色统计分析图。①:pSUPER NC 组;②:GPx4 shRNA1 组;③:GPx4 shRNA2 组。^a: $P<0.05$;^b: $P<0.01$ 。

图 3 敲低 GPx4 抑制 MEFs 重编程效率



A:qPCR 检测多能性标记基因 mRNA 表达水平分析图;B:免疫荧光染色检测 iPSC。①:MEFs 组;②:pMXs NC 组;③:pSUPER NC 组;④:pMXs GPx4 组;⑤:GPx4 shRNA1 组;⑥:GPx4 shRNA2 组。

图 4 过表达或敲低 GPx4 产生的诱导性多能干细胞的鉴定

3 讨 论

在干细胞与再生医学研究领域,与 ESCs 取自废弃胚胎的复杂伦理考量比较,iPSC 直接从体细胞中诱导生成,不仅简化了获取过程,还巧妙地规避了潜在的伦理争议,从而展现出更高的可行性和接受度。iPSC 为难治性疾病、损伤及退行性疾病的细胞疗法提供了前所未有的机会。例如,患者来源的 iPSC 在基因突变被纠正后可以分化为特定的功能细胞类型用于治疗软骨发育不全等多种疾病^[10-12]。iPSC 能够被用于构建神经退行性疾病(如帕金森综合征、肌萎缩侧索硬化等)及其他疾病模型^[13-15],便于科学家研究该类疾病的机制从而找到更有效的治疗方法。在中国临床试验注册中心网站上能够检索到患者来源的

iPSC 被用来进行个体化的药物筛选试验(注册号:ChiCTR2000034277、ChiCTR2300069332),其靶向筛选效果有利于实现相关疾病的精准医疗。尽管 iPSC 具有巨大的应用潜能,但仍有一些重要问题有待解决,包括其固有的致癌性、异质性等^[16]。重编程过程不仅可以产生完全重编程的 iPSC,还可以产生部分重编程的细胞,这些细胞可能具有不同的分化潜能^[17-18]。因此,在临床应用之前需要对 iPSC 进行严谨的安全性评估。对重编程机制的进一步研究有助于开发新方法,有利于产生更安全的 iPSC,并且对于细胞治疗的实际应用具有重要指导意义。已进入多个临床试验并被批准为淋巴瘤疗法的嵌合抗原受体 T(CAR-T)细胞,近期有研究证实,通过自分泌 IL-10

使其代谢增强,细胞用量可降低为原标准的 5%,并有效防止实体瘤肿瘤微环境中的 CAR-T 细胞耗竭,在小鼠肿瘤模型中观察到明显的抗肿瘤效果,可迅速清除实体瘤^[19]。

过量的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)诱导干细胞自噬增强从而损害干细胞活力^[20]。为了消除 ROS 的毒性作用,胚胎干细胞具有较强的抗氧化防御能力^[21-22]。干细胞的各种抗氧化机制已被表征^[23-24]。过氧化氢和有机过氧化物的清除机制对生命存活至关重要,前者清除具有多种代谢途径,但后者的清除途径非常有限,因此,可以清除脂质过氧化氢的 GPx4 非常关键。敲除 GPx4 后小鼠发育的胚胎第 8 天死亡^[25]。当 GPx4 失活后,小鼠在原肠胚形成之后就会停止发育^[26]。这些结果提示 GPx4 在调控胚胎发育和细胞存活过程中起到重要作用。为了研究 GPx4 在重编程过程中发挥什么样的作用,本研究设计在诱导过程中过表达 GPx4。结果显示,重编程效率有一定幅度提升,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。作者推测,由于本实验所采取的重编程体系自身效率已经处于比较高的水平^[27],GPx4 对于重编程可能具有的促进作用或许被掩盖。当进一步分析 GPx4 敲低后的重编程结果,GPx4 表达降低以后重编程效率明显下降。这一结果表明,在诱导过程中 GPx4 的缺少会抑制 iPSC 产生。综合 GPx4 过表达与敲低的实验结果,可以认为 GPx4 参与了重编程,并且在重编程中发挥了重要作用。但本研究存在一定局限性,过表达 GPx4 对重编程效率提升并不明显,其原因除了上述提及的诱导体系以外,还可能是由于在 MEFs 细胞中本身就存在有一定量的 GPx4 本底表达足以支持 iPSC 的产生,正如作者之前的测序结果所示。最近,LIU 等^[28]在《Science》杂志上揭示了线粒体中谷胱甘肽(glutathione,GSH)平衡的反馈调节机制,动态调节 GSH 的转运蛋白水平,实现 GPx4 和 GSH 的协同调控。本研究发现 GPx4 的缺失不利于重编程过程中多能性的获取,其特殊的谷胱甘肽代谢酶身份为干细胞获得及细胞命运调控及应用研究提供了新视角。

参考文献

- [1] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4):663-676.
- [2] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5):861-872.
- [3] GUAN J, WANG G, WANG J, et al. Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2022, 605(7909):325-331.
- [4] WANG G, WANG Y, LYU Y, et al. Chemical-induced epigenome resetting for regeneration program activation in human cells[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(6):112547.
- [5] WANG J, SUN S, DENG H. Chemical reprogramming for cell fate manipulation: methods, applications, and perspectives[J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(9):1130-1147.
- [6] XIN Y, WANG Y, ZHONG L, et al. Slc25a36 modulates pluripotency of mouse embryonic stem cells by regulating mitochondrial function and glutathione level[J]. *Biochem J*, 2019, 476(11):1585-1604.
- [7] BENJAMIN D I, BRETT J O, BOTH P, et al. Multiomics reveals glutathione metabolism as a driver of bimodality during stem cell aging[J]. *Cell Metab*, 2023, 35(3):472-486.
- [8] DING Y, CHEN X, LIU C, et al. Identification of a small molecule as inducer of ferroptosis and apoptosis through ubiquitination of GPX4 in triple negative breast cancer cells[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1):19.
- [9] AZUMA K, KOUMURA T, IWAMOTO R, et al. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 is indispensable for photoreceptor development and survival in mice[J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(4):101824.
- [10] SELVARAJ S, DHOKE N R, KILEY J, et al. Gene correction of LGMD2A patient-specific iPSCs for the development of targeted autologous cell therapy[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(12):2147-2157.
- [11] SUMER S A, HOFFMANN S, LAUE S, et al. Precise correction of heterozygous SHOX2 Mutations in hiPSCs derived from patients with atrial fibrillation via genome editing and sib selection[J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 15(4):999-1013.
- [12] ZOU H, GUAN M, LI Y, et al. Targeted gene correction and functional recovery in achondroplasia patient-derived iPSCs[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):485.
- [13] BOSE A, PETSKE G A, STUDER L. Induced pluripotent stem cells: a tool for modeling Parkinson's disease[J]. *Trends Neurosci*, 2022, 45(8):608-620.

- [14] OKANO H, MORIMOTO S. iPSC-based disease modeling and drug discovery in cardinal neurodegenerative disorders [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(2): 189-208.
- [15] KARAGIANNIS P, TAKAHASHI K, SAITO M, et al. Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 79-114.
- [16] YOKOBAYASHI S, YABUTA Y, NAKAGAWA M, et al. Inherent genomic properties underlie the epigenomic heterogeneity of human induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(5): 109909.
- [17] EDWARDS M M, WANG N, MASSEY D J, et al. Incomplete reprogramming of DNA replication timing in induced pluripotent stem cells [J]. *BioRxiv*, 2023, 2023, 544654.
- [18] GALIAKBEROVA A A, BROVKINA O I, KO-NDRATYEV N V, et al. Different iPSC-derived neural stem cells shows various spectrums of spontaneous differentiation during long term cultivation [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1037902.
- [19] ZHAO Y, CHEN J, ANDREATTA M, et al. IL-10-expressing CAR T cells resist dysfunction and mediate durable clearance of solid tumors and metastases [J/OL]. *Nat Biotechnol*. (2024-02-02) [2024-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38168996/>
- [20] PRAKASH R, FAUZIA E, SIDDIQUI A J, et al. Oxidative stress-induced autophagy compromises stem cell viability [J]. *Stem Cells*, 2022, 40(5): 468-478.
- [21] SARETZKI G, ARMSTRONG L, LEAKE A, et al. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(6): 962-971.
- [22] PARRINELLO S, SAMPER E, KRTOLICA A, et al. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(8): 741-747.
- [23] WANG K, ZHANG T, DONG Q, et al. Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(3): e537.
- [24] GHAFARI S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(11): 1923-1940.
- [25] MULLER F L, LUSTGARTEN M S, JANG Y, et al. Trends in oxidative aging theories [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(4): 477-503.
- [26] BRÜTSCH S H, WANG C C, LI L, et al. Expression of inactive glutathione peroxidase 4 leads to embryonic lethality, and inactivation of the Alox15 gene does not rescue such knock-in mice [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(4): 281-293.
- [27] CHEN J, LIU J, CHEN Y, et al. Rational optimization of reprogramming culture conditions for the generation of induced pluripotent stem cells with ultra-high efficiency and fast kinetics [J]. *Cell Res*, 2011, 21(6): 884-894.
- [28] LIU Y, LIU S, TOMAR A, et al. Autoregulatory control of mitochondrial glutathione homeostasis [J]. *Science*, 2023, 382(6672): 820-828.

(收稿日期: 2024-03-26 修回日期: 2024-07-12)

(编辑: 姚雪)

(上接第 2897 页)

- [25] WANG Y, XIAO J, LIN X, et al. A self-assembled G-quadruplex/hemin DNAzyme-driven DNA walker strategy for sensitive and rapid detection of lead ions based on rolling circle amplification [J]. *Biosensors*, 2023, 13(8): 761.
- [26] XUE Y, WANG Y, FENG S, et al. A dual-amplification mode and Cu-based metal-organic frameworks mediated electrochemical biosensor for sensitive detection of microRNA [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 202: 113992.
- [27] HOU J, ZHU S, ZHAO Z, et al. Programming cell communications with pH-responsive DNA nanodevices [J]. *Chem Commun*, 2021, 5737: 4536-4539.
- [28] FAN Z, ZHAO X, DONG Y, et al. Protein-free, ultrasensitive miRNA analysis based on an entropy-driven catalytic reaction switched on a smart-responsive DNAzyme dual-walker amplification strategy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 223: 931-938.

(收稿日期: 2024-02-28 修回日期: 2024-06-28)

(编辑: 袁皓伟)