

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-101

## 合成生物学在干细胞工程化改造中的研究进展

蔡冰玉<sup>1,2</sup>, 谭象天<sup>1,2</sup>, 李伟<sup>1,3,4</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院动物研究所, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101; <sup>2</sup> 中国科学院大学, 北京 100049;  
<sup>3</sup> 中国科学院干细胞与再生医学创新研究院, 北京 100101; <sup>4</sup> 北京干细胞与再生医学研究院, 北京 100101)

**摘要:** 多能干细胞具备自我更新能力和多向分化潜能, 其分化衍生的细胞及类器官在再生医学中具有巨大的应用潜力。但是干细胞临床转化仍然存在许多挑战。合成生物学“自上而下”的设计理念, 结合基因编辑以及合成受体在内的强大工具库, 能够赋予细胞新的功能, 实现干细胞工程化改造。在此, 本文总结了多能干细胞的临床应用和干细胞临床转化面临的主要挑战(干细胞分化衍生物的致瘤性、异质性、免疫原性), 以及合成生物学在干细胞工程化改造中的应用(精确控制细胞命运、调控细胞通信、优化类器官结构功能、监测并清除致瘤细胞)。这些合成生物学工具为干细胞工程化改造提供了新的策略和平台, 有望解决干细胞临床应用现存的诸多挑战, 推动再生医学的进一步发展, 实现“器官再生”这一核心目标。

**关键词:** 多能干细胞; 类器官; 合成生物学; 细胞治疗; 干细胞工程化改造

中图分类号: Q81 文献标志码: A

## Advances in synthetic biology for engineering stem cell

CAI Bingyu<sup>1,2</sup>, TAN Xiangtian<sup>1,2</sup>, LI Wei<sup>1,3,4</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; <sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; <sup>3</sup>Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; <sup>4</sup>Beijing Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Pluripotent stem cells are characterized by self-renewal and multi-differentiation potential, which can be used to reverse structurally dysfunctional tissues and organs back to a structurally and functionally intact state of health through repair, replacement, or *in-situ* regeneration of new cells, tissues, and even organs. Cells or multicellular systems derived from pluripotent stem cell differentiation, especially organoids, have great potential for application in regenerative medicine. However, the clinical application of stem cell-related therapies is still in its infancy, and the current challenges to the clinical translation of stem cells include the tumorigenicity, heterogeneity, and immunogenicity of stem cell derivatives. Synthetic biology, with its “top-down” design concept and powerful toolkit including synthetic receptors and gene circuits, allows for the rational assembly of standardized modules. With the rapid development of gene editing technology and the deepening of cell biology research, the engineering object of

收稿日期: 2023-12-01 修回日期: 2024-03-12

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0903800)

引用本文: 蔡冰玉, 谭象天, 李伟. 合成生物学在干细胞工程化改造中的研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(4): 782-794

Citation: CAI Bingyu, TAN Xiangtian, LI Wei. Advances in synthetic biology for engineering stem cell[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(4): 782-794

synthetic biology has shifted from lower model organisms such as *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae* to mammalian cells. On the one hand, “top-down” design strategies can engineer stem cells by giving them new functions, and on the other hand, the acquisition of new phenotypes by stem cells can test known gene functions and improve understanding of cell biology. Therefore, the application of these synthetic biology tools to stem cell engineering provides new strategies and platforms for relevant cell therapies or organ transplantation. It offers potential advantages in precise control of cell fate, regulation of cell communication, optimization of organoid structure and function, and monitoring and elimination of tumorigenic cells. These synthetic biology tools have provided new strategies and platforms for the engineering and reprogramming of stem cells, offering the potential to address current challenges in the clinical application of stem cells. They are expected to drive further advancements in regenerative medicine and ultimately achieve the core goal of regenerative medicine, which is organ regeneration.



**Keywords:** pluripotent stem cell; organoid; synthetic biology; cell therapy; stem cell engineering

## 1 干细胞的发展及应用

### 1.1 干细胞的发展及分类

“干细胞”这一概念最早是由一位俄国组织学

家 Alexander A. Maximow 在血液病大会中提出。随后一项关于辐射的研究表明，骨髓细胞移植能够使致死辐射量下的小鼠免受死亡<sup>[1]</sup>。20世纪60年代，Ernest A. McCulloch 与 James E. Till<sup>[2]</sup> 在接受骨髓移植小鼠的脾脏中发现了具备自我更新能力、

能再生形成多种髓系细胞的造血干细胞。随后，哺乳动物胚胎干细胞系的建立是干细胞领域的另一个里程碑事件。1981年，英国学者 Martin Evans 等<sup>[3]</sup>建立首株小鼠胚胎干细胞系 (embryonic stem cell, ESC)。1998年，James Thomson 等<sup>[4]</sup>成功实现人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 的体外培养，为再生医学的研究奠定了基础。但是人胚胎干细胞的免疫排斥以及细胞来源问题限制了干细胞的发展。2007年，日本学者山中伸弥等<sup>[5]</sup>利用慢病毒向成人成纤维细胞中导入 OCT3/4、SOX2、KLF4 和 c-MYC 诱导体细胞重编程，产生诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC)。iPSC 的建立 在疾病模型的模拟与机制研究、细胞治疗、药物评估等领域内产生了广泛的应用前景。化学重编程诱导多能干细胞 (chemically induced PS, CiPS) 是继“转录因子诱导”之后，一种全新的诱导多能干细胞的制备技术<sup>[6]</sup>。化学小分子重编程能有效规避慢病毒随机整合引发的安全问题，有望成为再生医学治疗中更安全的底层细胞。

根据分化潜能的不同，干细胞可以大致分为四类：全能干细胞 (totipotent stem cell)、多能干细胞 (pluripotent stem cell, PSC)、多能干细胞

(multipotent stem cell)、专能干细胞 (unipotent stem cell)。有性生殖的起始是受精过程，精卵结合产生的受精卵具备全能性，能够发育出体内所有的细胞类型及胚胎外的支持性组织、例如胎盘和脐带。随着卵裂的进行，全能干细胞增殖分化产生由滋养层 (trophoblast) 和内细胞团 (inner cell mass, ICM) 构成的囊胚 (blastocyst)。内细胞团中的上胚层细胞 (epiblast, EPI) 作为一种 pluripotent stem cell，能够分化出完整个体所需的全部细胞类型。随着个体发育进程，PSC 经过一系列细胞命运决定事件，多能性逐渐下降，形成能够分化出特定组织器官中所有细胞类型的 multipotent stem cell，例如造血干细胞。unipotent stem cell 的分化潜能进一步下降，只能向单一方向分化，产生特定的细胞类型 (图 1)。随着发育生物学的深入研究，PSC 体外分化路径逐步成熟，部分干细胞来源的衍生物已经进入临床实验。

## 1.2 多能干细胞 PSC 的应用

具备多谱系分化潜能的 PSC 在再生医学中表现出极佳的应用前景。PSC 通过修复、替换甚至原

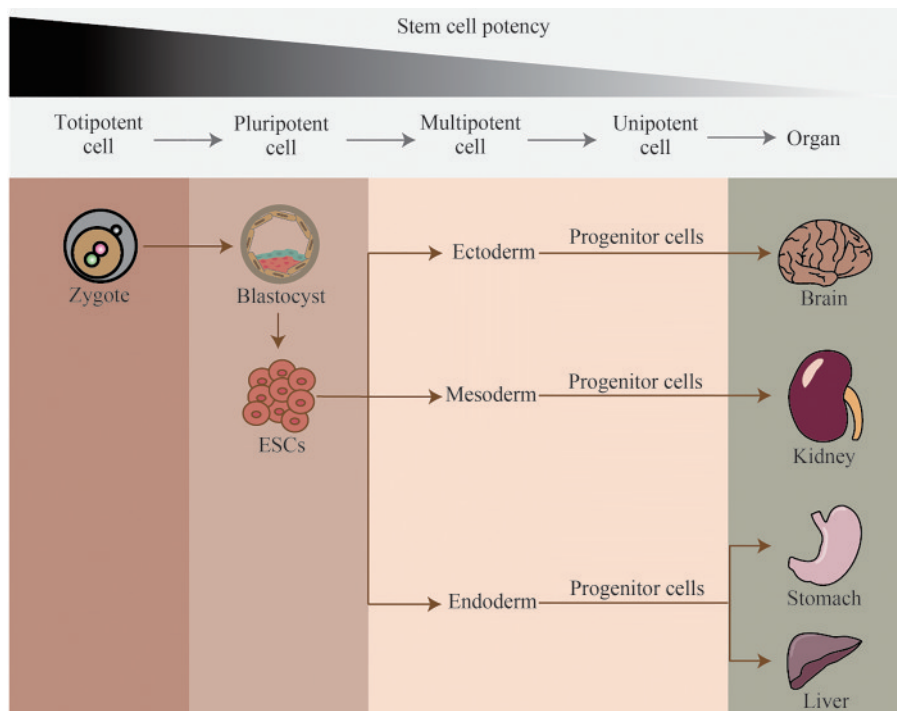


图 1 干细胞分类及分化

Fig. 1 Classification and differentiation of stem cells

位再生产生新的细胞、组织甚至器官，将结构功能失调的组织器官逆转为结构功能完整的健康状态。目前，基于多能干细胞的再生医学研究主要包含PSC分化来源的细胞以及PSC分化来源的组织器官。2010年，Geron公司使用hPSC来源的少突胶质细胞祖细胞治疗脊髓损伤（NCT01217008），这是使用hPSC治疗脊髓损伤的首批临床试验之一。随后，Steven Schwartz等<sup>[7]</sup>使用hPSC来源的视网膜色素上皮细胞（retinal pigment epithelium, RPE）治疗Stargardt黄斑营养不良（NCT01345006），该试验随后扩展为两个开放的I/II期研究，进一步证明了移植的功能性RPE可以改善患者视力并且没有严重的不良反应。此外，第一个使用iPSC来源的RPE细胞治疗年龄相关性黄斑变性的临床试验于2014年开展<sup>[8]</sup>。但是由于存在发生肿瘤的风险，该试验于2015年停止。随后两项使用hPSC来源心肌细胞的临床试验证明了该方法的安全性（jRCT2052190081, NCT02057900）。2017年，中国科学家领导了首个基于hESC来源多巴胺能神经元治疗帕金森的I/II a期临床研究（NCT03119636）。此研究评估了hESC来源的神经前体细胞脑内移植的安全性和有效性。此外，Melton的研究团队<sup>[9]</sup>在体外成功分化出hESC来源的能够产生胰岛素的胰岛β细胞，这为I型糖尿病的治疗提供了新的方案。2021年，生物科技公司Vertex Pharmaceuticals表明接受iPSC来源胰岛细胞移植的一名I型糖尿病患者在治疗后的90天，胰岛细胞功能逐渐恢复。除胰岛β细胞外，PSC体外分化来源的造血干细胞、肝细胞也有望在多种疾病治疗中发挥作用。

类器官（organoid）是由PSC或祖细胞进行体外3D培养形成的组织类似物，与器官拥有类似的空间组织结构并能够重现部分生物学功能。类器官的构建过程依赖于干细胞的分化潜能及细胞间的自组装能力，是PSC在再生医学中的重要应用之一。研究发现Lgr5<sup>+</sup>肠道干细胞能够在体外增殖并自组装形成具有隐窝-绒毛结构的3D-小肠组织，这是类器官领域的重大突破<sup>[10]</sup>。随后，基于ESC来源的小肠类器官、结肠类器官的体外分化方案也逐步建立<sup>[11]</sup>。2014年，McCracken等<sup>[12]</sup>构建的胃脏类器官不仅含有Lgr5<sup>+</sup>细胞、胃窦黏膜细胞以及多种内分泌细胞，而且能够形成原始胃腺样组

织结构。除此之外，由PSC或成体祖细胞来源的大脑类器官、肝脏类器官、肾脏类器官、胰腺类器官、心脏类器官、肺脏类器官体外分化体系也逐步建立<sup>[13-19]</sup>，为疾病模拟、药物筛选、发育机制研究提供了新的研究方法。随着系统生物学研究的逐步深入，机体多组织器官之间的互动交流也逐渐突显出其重要性。但是目前为止，对器官发生过程中多器官之间协同相互作用的研究少之又少。2019年的一项研究发现，从hPSC分化出来的前后肠道球体之间的边界相互作用能够体外再现肝胆胰类器官的早期形态发生事件<sup>[20]</sup>。这为研究相互作用、相互连接的复杂多器官系统提供了可能。截至目前，虽然有许多干细胞药物的临床试验已经开展并为患者带来福音，但现有的体外分化方案仍存在许多亟待解决的问题。

### 1.3 干细胞临床转化的挑战

#### 1.3.1 致瘤性

自我更新能力是干细胞重要的特性之一，无限增殖潜能能为细胞治疗提供大量的种子细胞，但是这种特性是把双刃剑，细胞在移植后继续扩增，容易导致肿瘤产生。c-Myc是人类癌症中最常见的突变基因之一。最初人们认为c-Myc作为诱导体细胞重编程的四因子之一，是iPSC产生致瘤性的重要原因。但是后续研究表明即使不激活c-Myc，iPSC分化诱导产生的神经干细胞移植免疫缺陷小鼠后仍然存在很强的致瘤性，且致瘤概率远高于胚胎干细胞<sup>[21]</sup>。除了重编程因子驱动的致瘤性外，干细胞产生致瘤性的另一原因是染色体异常排列，2011年的一项研究表明，hESC和hiPSC的长期培养过程中会出现1、12、17和20号染色体变异<sup>[22]</sup>。此外，在iPSC重编程过程中，病毒载体的使用会增加基因组整合的风险。相较之下，化学小分子诱导的重编程可以规避基因组整合的风险，提高细胞治疗的安全性。

#### 1.3.2 异质性

PSC作为种子细胞，为多种疾病的治疗提供了可能。但是干细胞体外分化衍生物的高度异质性严重影响了细胞治疗的安全性。造成这一现象的原因之一是PSC品系之间存在很强的异质性，

Osafune 等<sup>[23]</sup>利用 17 个 hESC 细胞系进行体外分化,发现不同品系之间谱系特异性基因的表达水平差异大于 100 倍,这导致不同品系之间具备不同的分化倾向。克隆之间表达模式不同也是干细胞异质性强的原因之一。Todd S. Macfarlan 等<sup>[24]</sup>研究发现诱导多能干细胞以及小鼠内细胞团中分离出的胚胎干细胞中,存在少量克隆与 2 细胞期的胚胎表达模式相似,它们具有更高的分化潜能。除此之外,由于长期体外培养或基因操作导致细胞间基因、蛋白表达水平变化进一步加剧了干细胞及其衍生物的异质性。

### 1.3.3 免疫排斥

免疫排斥是由于供体移植物与受体之间的人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 不匹配产生的特异性免疫应答反应,是干细胞临床应用的另一挑战。除了 HLA 不匹配外,由于 ESC 长期体外培养产生的免疫抗原、基因组突变导致的非典型抗原形成均可能诱发免疫排斥的产生。因此,由患者自身细胞诱导产生的 iPSC 为干细胞的临床应用提供了前所未有的机会。但是 2011 年的一项研究发现向 C57/BL6 (B6) 小鼠 MEF 细胞中无整合导入 Oct4、Sox2、Myc、Klf4 四因子能够实现 MEF 细胞重编程,而这些 MEF 来源的 iPSC 皮下移植到同基因的 B6 小鼠后存在免疫排斥<sup>[25]</sup>。这种自体 iPSC 的免疫原性产生原因可能是基因突变。随后,Deuse 等<sup>[26]</sup>的研究表明线粒体中的突变或许是自体 iPSC 新抗原表位的潜在来源。

### 1.3.4 功能不全

PSC 体外分化产物功能不全主要体现在两方面:多能干细胞来源的细胞或器官发育成熟度不足及移植物无法与体内细胞、环境建立通信联系。在 3D 培养体系中,现阶段分化的类器官通常缺乏关键的组织特化细胞类型或其他谱系细胞类型(如血管、神经、免疫等),因此仅能部分重现天然器官的细胞类型和组织结构复杂度,从而影响组织器官的发育成熟度。目前,PSC 分化所得的大部分细胞或类器官的复杂度更接近胎儿表型<sup>[27]</sup>。例如,虽然目前有多种 ESC、iPSC 分化肝细胞的方案,但多组学数据分析显示 PSC 来源的肝细胞在白蛋白、细胞色素等表达量上更接近于胎肝状态,而非成体肝脏状态<sup>[28]</sup>。此外,研究表明由

hESC 来源心肌细胞表达转录因子显现出不成熟的分化表型,仅有少数研究报道长期培养超 250 天的大脑类器官在基因表达模式上呈现出生后水平<sup>[29]</sup>。除此之外,干细胞衍生物移植后出现无法与周围环境、相邻细胞建立联系,导致移植物无法发挥正常生理功能。例如体外分化神经元能否在体形成神经回路或与肌肉组织形成“神经肌肉接头”是其发挥功能的关键。因此,开发新的培养条件和基因改造策略、改善细胞分化成熟度、增强细胞功能已经成为干细胞研究的热点问题。

## 2 合成生物学在干细胞中的应用

合成生物学的设计理念是利用自上而下的方法对生物系统进行设计和改造,为调控复杂的、可编程的细胞行为提供了新的思路和解决方案。随着基因编辑技术的飞速发展和细胞生物学研究的不断深入,合成生物学的工程化对象已从大肠杆菌、酿酒酵母等低等模式生物转向哺乳动物细胞。因此,合成生物学在哺乳动物干细胞工程化改造中有广阔的应用前景。“设计-合成-检测-学习”的循环流程是合成生物学的核心理念。首先,基于多组学数据分析和计算机辅助的方法设计构建人工回路来精确调控 PSC 及其衍生物的状态和功能。其次,多种生物学检测方法确认干细胞及其衍生物的细胞命运。最后,利用机器学习进行迭代优化实现合成生物学在干细胞工程化改造中的应用。一方面这种自上而下的设计策略可以赋予干细胞新的功能,实现干细胞工程化改造;另一方面干细胞获得新的表型也能检验已知基因功能、提高细胞生物学的理解和认知。干细胞工程化改造所涉及的技术和策略总结于表 1。

### 2.1 干细胞工程化改造技术

干细胞的工程化改造可利用基因编辑、合成受体等先进的生物技术从三个模块进行设计:感知模块(输入)、处理模块(过程)和响应模块(输出)。细胞可以通过合成受体或其他传感分子感知复杂环境中的外源性和内源性刺激,然后由人工基因回路或内源性调控网络进行信号处理,

表1 合成生物学在干细胞中的应用

Table 1 Applications of synthetic biology in stem cells

工程化干细胞改造技术						
基因编辑技术				合成受体		
条件性基因敲除系统	ZFN系统	TALEN系统	CRISPR/Cas系统	合成传感器 +	天然传感器 +	合成传感器 +
				天然致动器	合成致动器	合成致动器
				CARs、SyCyR	Tango、ChaCha	synNotch、SNIPR、MESA
工程化干细胞改造策略						
细胞命运决定		细胞通信		类器官结构功能优化	强化细胞治疗功能	监测并消除致瘤细胞

最终产生符合目标需求的响应，在时空维度实现对细胞的行为调控<sup>[30-32]</sup>。

### 2.1.1 基因编辑技术

干细胞的工程化改造对于目标基因的编辑或修饰等操作有巨大的需求，因此基因编辑技术尤为重要。目前，应用最为广泛的技术主要包括条件性基因敲除系统、锌指核酸内切酶（ZFN）技术<sup>[33]</sup>、转录激活剂样效应核酸酶（TALEN）技术<sup>[34]</sup>和成簇规律间隔的短回文重复序列（CRISPR/Cas）技术<sup>[35]</sup>等。

#### （1）条件性基因敲除系统

条件性基因敲除是将基因在特定组织、细胞或时间进程中敲除，在时间和空间上进行更加明确、精准的靶点修饰。目前应用最多的条件性敲除系统是来自于噬菌体的Cre/LoxP系统<sup>[36]</sup>，Cre重组酶能特异性识别LoxP序列并催化识别位点之间的序列特异性重组。20世纪90年代，Bradley等<sup>[37-38]</sup>利用Cre/LoxP系统在小鼠上实现了对大片段染色体的改造。

#### （2）锌指核酸内切酶（ZFN）技术

锌指核酸内切酶是人工构建的融合蛋白，由可与DNA靶序列特异性结合的多聚锌指蛋白和可切割DNA双链的II S型限制性核酸内切酶Fok I两部分构成，是最早出现的基因编辑技术。两个ZFN靶向特定DNA序列，Fok I单体在靶点形成活性二聚体并进行特异性切割，通过双链修复过程中发生的突变或基因置换实现基因编辑。2012年，Rivenbark等<sup>[39]</sup>通过锌指蛋白与DNA甲基转移酶DNMT3a融合，对乳腺癌细胞中Maspin和SOX2基因的启动子区域进行了甲基化修饰，实现了长期稳定的基因表达下调。

（3）转录激活因子样效应核酸酶（TALEN）技术

与锌指酶类似，TALEN也是人工构建的融合蛋白，由来自于植物致病菌黄单胞杆菌的TALE蛋白和核酸酶Fok I融合形成。TALE的中央重复结构域片段长34~35个氨基酸，12和13位氨基酸是可变序列，与不同碱基有特异的对应关系，可与靶DNA序列特异性结合，在锚定位点切割DNA，创造双链断裂。2013年，Konermann等<sup>[40]</sup>利用TALEN技术，通过光敏蛋白CRY2与TALE融合，开发了光诱导的双杂交转录效应物系统LITE，在小鼠神经元细胞中成功实现了可逆的内源基因表达及染色质表观修饰调控。

（4）成簇规律间隔的短回文重复序列（CRISPR/Cas）技术 CRISPR/Cas系统是细菌的一种抵抗外源病毒的获得性免疫防御机制。外来的短核苷酸序列整合到CRISPR位点后转录加工成crRNA和tracrRNA，用于识别特异的DNA序列，与核酸酶Cas融合后，实现对靶序列的切割。目前已发现大量不同类型的CRISPR/Cas系统，根据Cas蛋白分类和干扰复合体特性，将其分为2个大类，共6种类型，其中Class 1包含了Type I、III和IV，Class 2包含了Type II、Type V和Type VI。Type I和III均通过多个Cas蛋白组成的复合体来发挥干扰作用，Type II、V、VI是通过单个Cas蛋白来发挥干扰作用。与ZFN和TALEN相比，CRISPR/Cas系统操作简单且高效特异，因此在基因动态过程的调控以及细胞命运的操纵中被广泛应用。

Cas9蛋白的HNH、Ruv C结构域分别切割DNA目标链和非目标链，导致双链断裂，当这两个核酸酶结构域同时发生突变处于失活状态时，Cas9蛋白会失去剪切DNA的能力，但仍然能在sgRNA的引导下与DNA特异性结合，这种核酸酶失活的Cas9蛋白被称为dCas9蛋白。将dCas蛋白与不同效应物融合进行工程化改造，可以实现序

列特异性基因组调控，衍生出基因沉默及激活工具：CRISPRi（CRISPR interference）和 CRISPRa（CRISPR activation），已被广泛应用于基因调控、基因组成像、表观遗传调控等方面。

CRISPRi即CRISPR干扰技术，其中dCas9可以通过空间位阻单独阻断RNA聚合酶（RNA polymerase, RNAP）的转录延伸，从而抑制转录。CRISPRi系统中sgRNA引导的基因沉默具有高度特异性，且可以被诱导和逆转。Kearns等<sup>[41]</sup>利用CRISPRi系统抑制了*OCT4*基因和*NANOG*基因的表达，从而影响了人胚胎干细胞的多能性。单一dCas9的CRISPRi抑制转录效率较低，将其与抑制转录的复合物相结合可以增强CRISPRi对基因表达的沉默效果，Gilbert等<sup>[42]</sup>将dCas9和抑制转录的KRAB结构域融合，可以有效抑制细胞转录。

CRISPRa是一种能激活内源性基因转录表达的系统，通过招募RNAP或转录因子上调基因转录水平，常用系统包括SAM<sup>[43]</sup>、Sun Tag<sup>[44]</sup>、VPR<sup>[45]</sup>等。例如Kearns等<sup>[41]</sup>利用dCas9-VP64系统上调人胚胎干细胞中*SOX17*基因的表达，促进内胚层的分化；Liu等<sup>[44]</sup>使用dCas9-Sun Tag-VP64激活内源性Oct4和Sox2，触发细胞重编程，诱导产生多

功能干细胞。

此外，dCas9可以通过类似调控靶向基因转录的方式，招募表观遗传修饰域来改变其靶向DNA位点的表观遗传标记，从而导致相关基因表达的变化。例如，在脆性X染色体综合征病人的iPSC中，Liu等<sup>[46]</sup>利用dCas9-Tet1融合蛋白在分裂细胞中有效靶向去甲基化，激活了*FMRP*基因的转录表达，激活作用能够持续至少2周且未检测到明显的脱靶作用。

### 2.1.2 合成受体

天然受体是一类能够识别、处理和响应环境信息的蛋白质。基于合成生物学的发展和对天然受体的理解，研究人员已经能够对受体进行解构和重建，利用来自天然或人工合成的成分对合成受体进行合理的工程改造，重新设计细胞的输入输出关系，赋予细胞可定制的功能<sup>[47-48]</sup>。对于功能性合成受体，至少有两个模块：一个是与输入信号特异性结合的传感器（sensor）；另一个是将传感器活性信号转导为功能输出的致动器（actuator）（图2）。根据合成组分不同，合成受体可以分为三种类型：合成传感器和天然致动器、天然传感器和合成致动器、合成传感器和合成致动器<sup>[47]</sup>。

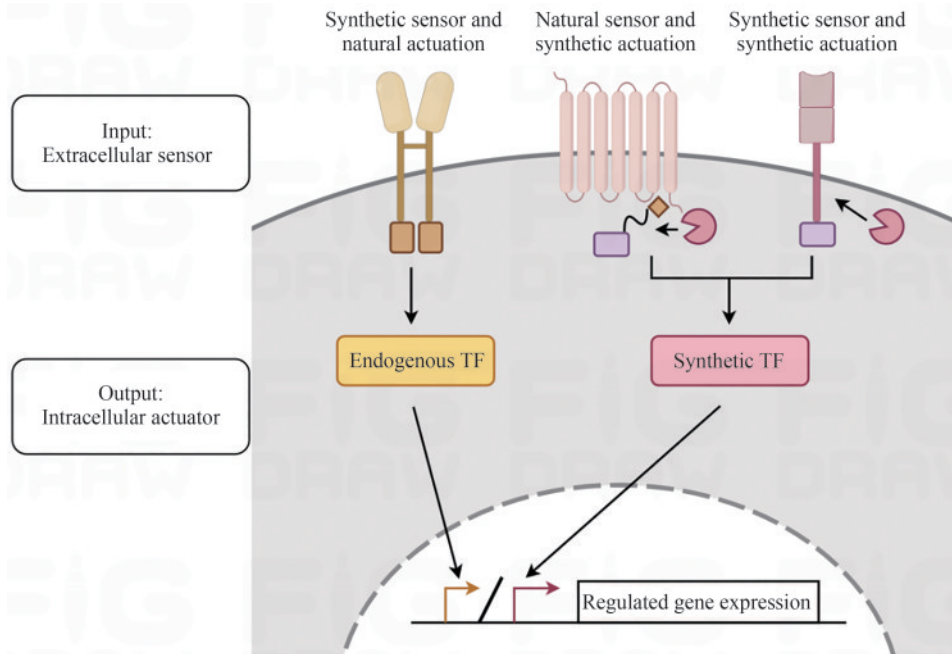


图2 合成受体的通用操作元件

（本图利用 Fig Draw 绘图工具绘制）

Fig. 2 Generalized operational components of synthetic receptors

（This figure was drawn by Fig Draw）

### (1) 具有合成传感器和天然致动器的受体

具有合成传感器和天然致动器的受体依赖胞内天然机制驱动细胞识别定制的输出信号并激活内源性遗传调控网络来调节细胞功能。因此，可以通过定向进化、定点诱变或用其他结构域（包括纳米抗体和单链抗体）替换来设计合成细胞外感应器。

嵌合抗原受体（CAR）是最著名的一类合成受体系统，它通过用胞外抗原识别结构域替换天然配体结合结构域，并保留受体细胞内信号转导结构域来重新连接T细胞信号通路（TCR），人工诱导T细胞识别、杀死具有指定细胞表面抗原的肿瘤细胞，目前已被美国食品和药物管理局（FDA）批准用于CAR-T细胞治疗<sup>[49-50]</sup>。另一个例子是合成细胞因子受体（SyCyR），这种受体可以识别定制的小分子或蛋白质（如高亲和力GFP-和mCherry-纳米抗体），并进一步调控细胞行为，如迁移、细胞凋亡和胞吐作用等<sup>[51-53]</sup>。在2018年，Fussenegger团队<sup>[54]</sup>建立了一个广义细胞外分子传感器（GEMS）平台来编程细胞行为。GEMS包含来自抗体片段的定制配体结合结构域和IL6RB、VEGFR2或FGFR1的细胞内信号转导结构域。这些受体可以感知合成偶氮染料、尼古丁、多肽标签和前列腺特异性抗原的输入。

### (2) 具有天然传感器和合成致动器的受体

这种类型的受体可以通过天然配体激活替代的信号转导途径，例如Tango<sup>[55]</sup>、ChaCha<sup>[56]</sup>等。Tango受体具有天然的细胞外感应结构域和人工细胞内结构域，胞内结构域由合成转录因子连接arrestin-TEV蛋白酶系统组成。Tango的胞外域传感识别相应配体后激活蛋白酶的磷酸化，释放细胞内合成的转录因子，从而调节基因的表达。ChaCha通过GPCR将dCas9与各种细胞外信号（合成化合物、分裂素、趋化因子、脂肪酸和激素）偶联。当受体与配体结合后，激活的GPCR引发蛋白酶水解并释放dCas9，游离的dCas9进入细胞核并发挥相应的生物学功能<sup>[56]</sup>。

### (3) 具有合成传感器和合成致动器的受体

合成传感器和合成致动器两者兼有的合成受体能够更好地对输入和输出模块进行设计，在不破坏内源性途径的情况下执行新功能，例如synNotch<sup>[57]</sup>、SNIPR<sup>[58]</sup>、MESA<sup>[59]</sup>。Lim及其同

事<sup>[57]</sup>在2016年利用Notch受体的跨膜核心调控结构域、细胞外单链抗体的配体结合结构域以及细胞内致动器结构域，构建了synNotch受体系统，用于感知细胞间接触。当合成受体与另一个细胞膜表面的配体结合时，配体-受体相互作用会产生拉力暴露蛋白酶切割位点，跨膜核心结构域被蛋白酶切割释放转录因子。最近，Roybal及其同事<sup>[58]</sup>对synNotch的细胞外传感器域、跨膜结构域、细胞内近膜域和致动器域结构进行了系统化、模块化的改进。改进后的synNotch系统被称为合成膜内蛋白水解受体（SNIPR），能够增强配体的诱导信号。同时，SNIPR可以实现完全人源化，最大限度地降低免疫排斥的风险，可用于对临床应用的干细胞进行编程。模块化细胞外传感器结构（MESA）系统被开发用于检测细胞外可溶性配体，例如mCherry和CD4。MESA包含两种跨膜蛋白，配体结合后，MESA二聚化并触发细胞内蛋白水解反式切割反应以释放转录因子<sup>[59]</sup>。目前，部分合成生物学元件已被用于干细胞的工程化改造，这为拓展干细胞临床治疗提供了可能。

## 2.2 干细胞工程化改造策略

合成生物学的设计理论、工具元件为干细胞的工程化改造提供了新的方向。目前有许多研究表明合成受体、人工合成基因回路能够实现细胞通信、优化类器官结构功能、清除致瘤细胞。这为解决干细胞治疗存在的致瘤性、异质性、免疫排斥、功能不全等问题提供了可能。

### 2.2.1 细胞命运决定

合成生物学“设计-合成-检测-学习”的核心理念已被用于干细胞的体外分化。hPSC能够分化为各种细胞类型，包括难以从人体组织获得或体外增殖能力有限的细胞。因此，在细胞治疗中hPSC被认为是构建各种类型细胞库的重要来源。然而传统的分化策略大都通过向干细胞培养基中添加一系列生长因子和小分子混合物来促进形态发生，该方法培养得到的细胞存在功能不成熟、效率低和异质性等局限性，无法应用于临床试验，且成本高昂，消耗资源，需投入大量时间。因此，通过合成基因回路精确控制细胞命运决定

对于获得高效、高纯度的靶细胞，促进其临床应用和批量生产具有重要意义。

合成受体 *SynNotch* 系统导入干细胞可以在体内或体外监测和调控发育过程中细胞之间的相互作用，从而决定细胞命运。2022年，Malaguti等<sup>[60]</sup>用小鼠胚胎干细胞系建立了克隆模块化 *SynNotch* 多能细胞系 (SynNPL)，当接收细胞被激活时，神经元分化因子 *neurogennin1* 开始表达，诱导接收细胞分化为神经元。与化学小分子诱导不同，合成受体的加入有助于实现干细胞的在体分化。此外，2017年，Fussenegger团队<sup>[61]</sup>设计了一种合成谱系调控网络，利用香草酸剂量依赖性信号级联和基因开关来模拟体内胰腺发育过程中 *Ngn3* (OFF-ON-OFF)、*Pdx* (ON-OFF-ON) 和 *Maf* (OFF-ON) 的表达模式。该网络能调控这三种转录因子在 hiPSC 来源的胰腺祖细胞中正确表达，并最终将祖细胞分化为葡萄糖敏感的胰岛  $\beta$  样细胞。与传统小分子混合物诱导的分化相比，这些胰岛  $\beta$  样细胞在葡萄糖刺激后表现出与人胰岛更相似的胰岛素释放动力学，表明使用合成基因回路建立决定细胞命运的巨大潜力。

此外，人工智能为评估、改进细胞分化策略提供了一个新的平台。例如，CellNet能够评估分化细胞与目标细胞之间基因调控网络 (gene regulatory network, GRN) 的相似性，根据分化细胞和目标细胞基因调控网络的差异以及转录因子在该网络中的重要程度，挑选出需要优化的目的基因<sup>[62]</sup>，这为细胞分化方案的改进提供了迭代优化的平台。合成生物学结合人工智能的“设计-合成-检测-学习”理念有望成为研究细胞分化的新范式。

### 2.2.2 细胞通信

细胞通信在生长发育、免疫应答、组织器官的功能维持中都发挥重要作用。随着合成生物学的发展，多种细胞通信系统应运而生。目前，使用最广泛的合成受体 *SynNotch* 系统可用于操纵细胞接触介导的细胞间通信。该系统由发送细胞和接收细胞构成，发送细胞表面表达特异性抗原作为配体，接收细胞表面表达相应的 *SynNotch* 受体<sup>[57, 63]</sup>。基于天然 *Notch* 通路的信号传递机制，当发送细胞与接收细胞接触时，受体细胞的 *SynNotch* 受体会识别相应的抗原，并介导细胞内转录因子

结构域的切割，启动目的基因的表达。

2022年，Zhou团队<sup>[64]</sup>将心肌细胞作为 *SynNotch* 信号发送细胞、内皮细胞作为 *SynNotch* 信号接收细胞，分别构建了心肌细胞特异性表达 *SynNotch* 配体的工具小鼠 *Tnnt2-mGFP*，以及内皮细胞特异表达 *SynNotch* 受体的工具小鼠 *Cdh5- $\alpha$ GFP-N-tTA*。当心肌细胞与内皮细胞相互接触时，*SynNotch* 信号通路激活报告基因 *LacZ* 的表达，证明该技术可在体内将细胞接触信息转变为遗传信号，且同样适用于其他组织中细胞相互作用的研究。2022年，Michael B. Elowitz团队<sup>[65]</sup>在哺乳动物细胞中构建了受生长素调控的细胞通信系统。工程化改造细胞通过响应局部环境中生长素信号感知细胞种群密度，实现细胞密度的自我控制。此外，该文作者引入 *iCasp9* 自杀系统，使部分对生长素不敏感的细胞发生凋亡，减少在长期定向筛选压力下产生的细胞逃逸反应。这种细胞种群感应控制系统有助于提高干细胞治疗的可控性和安全性。

### 2.2.3 类器官结构功能优化

类器官在疾病模拟和药物筛选中具有极大的应用前景。在生理情况下，器官功能也取决于相应的器官结构。例如，小肠黏膜表面的皱襞、绒毛和微绒毛极大增加了小肠表面积，提高小肠消化吸收能力。因此，如何实现类器官的复杂结构仍是类器官研究领域的热点问题。合成生物学的发展为类器官培养提供了更多的工具。例如，利用 *SynNotch* 受体系统可以实现特定的空间排列：通过叠加不同的 *SynNotch* 受体系统，可以在2D或3D培养中实现同心圆<sup>[57]</sup>、同心球以及非对称<sup>[63]</sup>的分层结构。随后，多种可调控细胞间黏附分子表达的工具已被开发，包括 *SynNotch-cadherin*、*helixCAM* 和 *SynCAM* 等<sup>[63, 66-67]</sup>。通过加载黏附分子元件实现可控的细胞重排为类器官结构优化提供了新的方向。

影响类器官功能的另一问题是异质性。在合成生物学领域，许多合成细胞分类器已被证明可用于检测和纯化特定细胞类型。2015年，Miki等<sup>[68]</sup>建立了合成 miRNA 开关，能够在 hPSC 分化过程中分离出所需的细胞类型。目前已经有适用于分离多种细胞类型的 miRNA 开关，包括心肌细

胞的 miR-1208a 和 miR-499a-5p、内皮细胞的 miR-126、肝细胞的 miR-122-5p、胰岛素生成细胞的 miR-375 等。这种以 miRNA 作为信号输入的基因线路平台已经被广泛应用到细胞分化、干细胞分选等问题上。合成受体调控的黏附分子元件以及 miRNA 开关为类器官结构功能优化提供了新的思路。

#### 2.2.4 强化细胞治疗功能

CAR 系统是一类重要的合成受体系统，已广泛应用于 T 细胞、NK 细胞和巨噬细胞等免疫细胞，其中 CAR-T 细胞已被 FDA 批准用于细胞治疗<sup>[50]</sup>。在过去的几十年里，CAR 不断发展并逐渐成熟，在治疗安全性和有效性方面不断提高。组成型的 CAR-T 容易产生细胞因子释放综合征，因此，在 CAR 上添加蛋白降解系统，利用小分子调控 CAR-T 细胞活性提高其可控性、安全性<sup>[69]</sup>。此外，在 T 细胞中加载逻辑门线路提高其抗肿瘤效率及安全性。例如 CD19/CD20 和 CD19/CD22 双特异性 CAR 已被证明能够防止 B 细胞淋巴瘤的抗原逃逸<sup>[70-71]</sup>。但原代免疫细胞来源有限、难以工程化、价格昂贵等问题阻碍了其在肿瘤治疗中的应用。PSC 分化技术和合成 CAR 系统相结合为解决这些挑战提供了新的策略。例如，对 iPSC 分化得到的 NK 细胞进行工程化改造，开发了 CAR-iNK 细胞，可用作癌症免疫治疗的标准化产品<sup>[72]</sup>。

CAR-T 是利用合成生物学方法增强细胞功能的成功案例。与游离的免疫细胞不同，干细胞来源的 RPE、神经元等大多数移植物需要在体定植才能发挥其生物学功能。如何利用合成受体或基因线路增强移植物的定植能力是干细胞治疗领域一直备受关注的问题。

#### 2.2.5 监测并消除致瘤细胞

未分化的 PSC 和祖细胞具有潜在致瘤性，为保证细胞治疗的安全性，可以对 PSC 进行工程化改造来实时动态监测并有效清除致瘤细胞。iPSC 衍生的神经干细胞具有治疗脊髓损伤的潜力，但在 NOD/SCID 小鼠的移植实验中发现它们会导致肿瘤发生。为了解决这一问题，研究人员报道了基于自杀基因 *Caspase9* 和 *HSVtk* 设计的故障安全系统<sup>[73-74]</sup>。通过给 NOD/SCID 小鼠注射小分子 CID (AP20817) 诱导 *Caspase9* 表达，该系统能有效清除 iPSC 来源的肿瘤细胞，但是其他 iPSC 来源的终末分化细胞中也会发生细胞凋亡<sup>[73]</sup>。与 *Caspase9*/

CID 系统不同，甘昔洛韦 (GCV) 在 HSVtk 的作用下生成三磷酸 GCV，能够阻断 DNA 合成，进而产生细胞毒性。在脊髓损伤小鼠模型移植实验中通过药物诱导启动自杀基因的表达，HSVtk/GCV 系统可以选择性地消除增殖的致瘤细胞，阻止移植细胞的致瘤性转化，并保留成熟的神经细胞，维持对运动功能的改善<sup>[74]</sup>。干细胞加载人工合成元件动态监测并清除致瘤细胞有助于提高干细胞治疗的安全性，推进干细胞的临床应用。

### 3 挑战与展望

干细胞来源的细胞治疗和类器官系统推动了再生医学的研究进展。但是距离干细胞大规模临床应用还有许多挑战，例如移植物中未分化干细胞的致瘤性、免疫原性、异质性以及移植物成熟度不足导致的功能不全。合成生物学利用“自上而下”的设计理念对生物系统进行设计和改造，为调控复杂的、可编程的细胞行为提供了新的思路和解决方案。随着细胞生物学研究的不断深入，合成生物学的工程化对象已从低等模式生物转向哺乳动物细胞。目前，越来越多的研究表明合成生物学的策略方法为解决干细胞治疗存在的致瘤性、异质性、免疫排斥、功能不全等问题提供了可能。例如，通过 miRNA 开关、自杀基因报告系统消除移植物中未分化细胞，降低致瘤风险；利用合成受体调控的黏附分子元件实现类器官结构功能优化；利用内置分化线路实现多谱系细胞命运的控制。

“设计-合成-检测-学习”是合成生物学的核心理念，在干细胞工程化改造中已经取得一些进展。例如 CellNet 是一种基于基因调控网络构建的“检测”“学习”平台，能为现有的细胞分化方案进行打分并给出优化策略。人工智能的加入为干细胞工程化改造提供了助力，但是该领域的研究仍然存在较多不足。随着系统生物学和人工智能 (AI) 技术的快速发展，单基因或多基因扰动模型解析、预测基因调控网络对细胞命运的影响，为干细胞工程化改造提供了新策略。来自不同组织器官的大量组学数据为 AI 模型预测、解析细胞状态转变过程中的关键转录因子提供了机会。除了单细胞命运解析外，破译多细胞之间互作有助于理解发

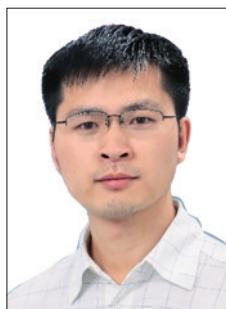
育过程中多细胞自组装及器官不对称发育事件, 有利于构建结构完整、功能成熟的类器官。越来越多研究表明细胞外基质除了提供支撑保护作用外, 在细胞生长发育、器官功能成熟中发挥重要作用。例如细胞外基质硬度改变能够诱导细胞发生系列级联反应, 促进再生修复以及干细胞分化。心脏细胞外基质是维持心脏正常结构功能的重要因素。心肌受损打破细胞外基质合成与降解的平衡、导致心脏结构重塑是心力衰竭的一个关键病理特征。因此, 利用“输入、处理、输出”的人工合成基因回路对细胞外基质进行精密控制、促进细胞与环境间响应互作, 有利于类器官的功能成熟。最终通过破译多细胞之间、细胞和微环境之间基因调控网络, 结合合成生物学“设计-合成-检测-学习”设计理念与新型的工程化改造技术, 实现再生医学的核心目标: 器官再生。

### 参 考 文 献

- [1] JACOBSON L O, SIMMONS E L, MARKS E K, et al. Recovery from radiation injury[J]. *Science*, 1951, 113(2940): 510-511.
- [2] TILL J E, MCCULLOCH E A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells[J]. *Radiation Research*, 1961, 14: 213-222.
- [3] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156.
- [4] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-1147.
- [5] 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.
- [6] GUAN J Y, WANG G, WANG J L, et al. Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2022, 605(7909): 325-331.
- [7] SCHWARTZ S D, REGILLO C D, LAM B L, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies[J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 509-516.
- [8] KAMA O H, MANDAI M, OKAMOTO S, et al. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(2): 205-218.
- [9] PAGLIUCA F W, MILLMAN J R, GÜRTLER M, et al. Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells *in vitro*[J]. *Cell*, 2014, 159(2): 428-439.
- [10] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265.
- [11] SPENCE J R, MAYHEW C N, RANKIN S A, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*[J]. *Nature*, 2011, 470(7332): 105-109.
- [12] MCCracken K W, CATÁ E M, CRAWFORD C M, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids[J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 400-404.
- [13] MONZEL A S, SMITS L M, HEMMER K, et al. Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(5): 1144-1154.
- [14] MUGURUMA K, NISHIYAMA A, KAWAKAMI H, et al. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(4): 537-550.
- [15] DYE B R, HILL D R, FERGUSON M A, et al. *In vitro* generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids[J]. *eLife*, 2015, 4: e05098.
- [16] CAMP J G, SEKINE K, GERBER T, et al. Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency[J]. *Nature*, 2017, 546(7659): 533-538.
- [17] TAKEBE T, SEKINE K, ENOMURA M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 481-484.
- [18] TAKASATO M, ER P X, BECROFT M, et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney[J]. *Nature Cell Biology*, 2014, 16(1): 118-126.
- [19] TAKEBE T, ENOMURA M, YOSHIZAWA E, et al. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues *via* mesenchymal cell-driven condensation[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(5): 556-565.
- [20] KOIKE H, IWASAWA K, OUCHI R, et al. Modelling human hepato-biliary-pancreatic organogenesis from the foregut-midgut boundary[J]. *Nature*, 2019, 574(7776): 112-116.
- [21] MIURA K, OKADA Y, AOI T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(8): 743-745.
- [22] The International Stem Cell Initiative. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(12): 1132-1144.
- [23] OSAFUNE K, CARON L, BOROWIAK M, et al. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26

- (3): 313-315.
- [24] MACFARLAN T S, GIFFORD W D, DRISCOLL S, et al. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity[J]. *Nature*, 2012, 487(7405): 57-63.
- [25] ZHAO T B, ZHANG Z N, RONG Z L, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2011, 474(7350): 212-215.
- [26] DEUSE T, HU X M, AGBOR-ENOH S, et al. *De novo* mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(10): 1137-1144.
- [27] CAMP J G, BADSHA F, FLORIO M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(51): 15672-15677.
- [28] BAXTER M, WITHEY S, HARRISON S, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes[J]. *Journal of Hepatology*, 2015, 62(3): 581-589.
- [29] GORDON A, YOON S J, TRAN S S, et al. Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions[J]. *Nature Neuroscience*, 2021, 24(3): 331-342.
- [30] KITADA T, DIANDRETH B, TEAGUE B, et al. Programming gene and engineered-cell therapies with synthetic biology[J]. *Science*, 2018, 359(6376): eaad1067.
- [31] TOLLE F, STÜCHELI P, FUSSENEGGER M. Genetic circuitry for personalized human cell therapy[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 59: 31-38.
- [32] MANSOURI M, FUSSENEGGER M. Therapeutic cell engineering: designing programmable synthetic genetic circuits in mammalian cells[J]. *Protein & Cell*, 2022, 13(7): 476-489.
- [33] KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [34] CHRISTIAN M, CERMAK T, DOYLE E L, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases[J]. *Genetics*, 2010, 186(2): 757-761.
- [35] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [36] STRICKLETT P K, NELSON R D, KOHAN D E. Site-specific recombination using an epitope tagged bacteriophage P1 Cre recombinase[J]. *Gene*, 1998, 215(2): 415-423.
- [37] RAMÍREZ-SOLIS R, LIU P, BRADLEY A. Chromosome engineering in mice[J]. *Nature*, 1995, 378(6558): 720-724.
- [38] SU H, WANG X, BRADLEY A. Nested chromosomal deletions induced with retroviral vectors in mice[J]. *Nature Genetics*, 2000, 24(1): 92-95.
- [39] RIVENBARK A G, STOLZENBURG S, BELTRAN A S, et al. Epigenetic reprogramming of cancer cells *via* targeted DNA methylation[J]. *Epigenetics*, 2012, 7(4): 350-360.
- [40] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states[J]. *Nature*, 2013, 500(7463): 472-476.
- [41] KEARNS N A, GENGA R M, ENUAMEH M S, et al. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells[J]. *Development*, 2014, 141(1): 219-223.
- [42] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451.
- [43] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex[J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588.
- [44] LIU P, CHEN M, LIU Y X, et al. CRISPR-based chromatin remodeling of the endogenous *Oct4* or *Sox2* locus enables reprogramming to pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(2): 252-261. e4.
- [45] CHAVEZ A, SCHEIMAN J, VORA S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 326-328.
- [46] LIU X S, WU H, KRZISCH M, et al. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the *FMR1* gene[J]. *Cell*, 2018, 172(5): 979-992. e6.
- [47] MANHAS J, EDELSTEIN H I, LEONARD J N, et al. The evolution of synthetic receptor systems[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18(3): 244-255.
- [48] BRENNER J, CHO J H, WONG W W. Synthetic biology: sensing with modular receptors[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(2): 131-132.
- [49] LABANIEH L, MACKALL C L. CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation[J]. *Nature*, 2023, 614(7949): 635-648.
- [50] CAPPELL K M, KOCHENDERFER J N. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2023, 20(6): 359-371.
- [51] ENGELOWSKI E, SCHNEIDER A, FRANKE M, et al. Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2034.
- [52] ISHIZUKA S, LAI C Y, OTSU M, et al. Designing motif-engineered receptors to elucidate signaling molecules important for proliferation of hematopoietic stem cells[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(7): 1709-1714.
- [53] MOSSNER S, KUCHNER M, FAZEL MODARES N, et al. Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10 receptor 2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130[J]. *The Journal of Biological*

- Chemistry, 2020, 295(35): 12378-12397.
- [54] SCHELLER L, STRITTMATTER T, FUCHS D, et al. Generalized extracellular molecule sensor platform for programming cellular behavior[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(7): 723-729.
- [55] KROEZE W K, SASSANO M F, HUANG X P, et al. PRESTO-Tango as an open-source resource for interrogation of the druggable human GPCRome[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(5): 362-369.
- [56] KIPNISS N H, DINGAL P C D P, ABBOTT T R, et al. Engineering cell sensing and responses using a GPCR-coupled CRISPR-Cas system[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2212.
- [57] MORSUT L, ROYBAL K T, XIONG X, et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic Notch receptors[J]. *Cell*, 2016, 164(4): 780-791.
- [58] ZHU I, LIU R, GARCIA J M, et al. Modular design of synthetic receptors for programmed gene regulation in cell therapies[J]. *Cell*, 2022, 185(8): 1431-1443. e16.
- [59] DARINGER N M, DUDEK R M, SCHWARZ K A, et al. Modular extracellular sensor architecture for engineering mammalian cell-based devices[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(12): 892-902.
- [60] MALAGUTI M, PORTERO MIGUELES R, ANNOH J, et al. SynPL: Synthetic Notch pluripotent cell lines to monitor and manipulate cell interactions *in vitro* and *in vivo*[J]. *Development*, 2022, 149(12): dev200226.
- [61] SAXENA P, BOJAR D, ZULEWSKI H, et al. Generation of glucose-sensitive insulin-secreting beta-like cells from human embryonic stem cells by incorporating a synthetic lineage-control network[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 259: 39-45.
- [62] CAHAN P, LI H, MORRIS S A, et al. CellNet: network biology applied to stem cell engineering[J]. *Cell*, 2014, 158(4): 903-915.
- [63] TODA S, BLAUCH L R, TANG S K Y, et al. Programming self-organizing multicellular structures with synthetic cell-cell signaling[J]. *Science*, 2018, 361(6398): 156-162.
- [64] ZHANG S H, ZHAO H, LIU Z X, et al. Monitoring of cell-cell communication and contact history in mammals[J]. *Science*, 2022, 378(6623): eabo5503.
- [65] MA Y T, BUDDE M W, MAYALU M N, et al. Synthetic mammalian signaling circuits for robust cell population control [J]. *Cell*, 2022, 185(6): 967-979. e12.
- [66] CHAO G, WANNIER T M, GUTIERREZ C, et al. helixCAM: a platform for programmable cellular assembly in bacteria and human cells[J]. *Cell*, 2022, 185(19): 3551-3567. e39.
- [67] STEVENS A J, HARRIS A R, GERDTS J, et al. Programming multicellular assembly with synthetic cell adhesion molecules [J]. *Nature*, 2023, 614(7946): 144-152.
- [68] MIKI K, ENDO K, TAKAHASHI S, et al. Efficient detection and purification of cell populations using synthetic microRNA switches[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(6): 699-711.
- [69] JUILLERAT A, TKACH D, BUSSE B W, et al. Modulation of chimeric antigen receptor surface expression by a small molecule switch[J]. *BMC Biotechnology*, 2019, 19(1): 44.
- [70] ZAH E, LIN M Y, SILVA-BENEDICT A, et al. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells[J]. *Cancer Immunology Research*, 2016, 4(6): 498-508.
- [71] FRY T J, SHAH N N, ORENTAS R J, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(1): 20-28.
- [72] STRATI P, BACHANOVA V, GOODMAN A, et al. Preliminary results of a phase I trial of FT516, an off-the-shelf natural killer (NK) cell therapy derived from a clonal master induced pluripotent stem cell (iPSC) line expressing high-affinity, non-cleavable CD16 (hnCD16), in patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) B-cell lymphoma (BCL) [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2021, 39(15\_suppl): 7541.
- [73] ITAKURA G, KAWABATA S, ANDO M, et al. Fail-safe system against potential tumorigenicity after transplantation of iPSC derivatives[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(3): 673-684.
- [74] KOJIMA K, MIYOSHI H, NAGOSHI N, et al. Selective ablation of tumorigenic cells following human induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cell transplantation in spinal cord injury[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2019, 8(3): 260-270.



**通讯作者:** 李伟(1982—),男,研究员,博士生导师。研究方向为结合基因工程、细胞工程和合成生物学等手段建立新的基因工程技术和细胞/动物模型。  
E-mail: liwei@ioz.ac.cn



**第一作者:** 蔡冰玉(1997—),女,博士研究生。研究方向为再生医学,合成生物学。  
E-mail: m18739087500@163.com