

两种细胞来源的21-三体综合征诱导 多能干细胞系的建立及比较

杜融 骆玉梅 王鼎 孙筱放 陈耀勇*

(广东省产科重大疾病重点实验室, 广东省高校生殖与遗传重点实验室, 广州医科大学附属第三医院, 广州 510150)

摘要 21-三体综合征是染色体异常导致的疾病, 通过重编程21-三体综合征患儿两种组织来源的细胞成为多能干细胞, 比较两种组织来源的细胞建立21-三体综合征诱导多能干细胞(T21-iPSCs)系的效率, 为进一步研究21-三体综合征发病机制提供细胞模型, 并为选择高效制备T21-iPSCs的组织类型提供理论依据。该实验利用慢病毒介导4种转录因子(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)分别诱导人21-三体综合征的羊水细胞和胎儿皮肤成纤维细胞, 建立诱导多能干细胞系(Trisomy 21 human amniotic fluid induced pluripotent stem cells, T21 hAF-iPSCs; Trisomy 21 human dermal fibroblast induced pluripotent stem cells, T21 hDF-iPSCs), T21 hAF-iPSCs及T21 hDF-iPSCs在蛋白和mRNA水平上均表达人胚胎干细胞的多能性分子标记, 如Oct4、Nanog等, 具有在体外及体内分化三个胚层的能力, 其在培养过程中能维持异常核型并能维持自我更新状态。结果发现, 利用羊水细胞建立T21-iPSCs效率高于皮肤成纤维细胞, 羊水细胞可能是制备T21-iPSCs的理想细胞类型。

关键词 21-三体综合征; 羊水细胞; 人皮肤成纤维细胞; 诱导多能干细胞

Generation and Comparison of Human Down Syndrome-Induced Pluripotent Stem Cells from Two Types of Cells

Du Rong, Luo Yumei, Wang Ding, Sun Xiaofang, Chen Yaoyong*

(Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Key Laboratory of Reproduction and Hereditary of the Universities in Guangdong Province, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China)

Abstract Down syndrome (DS), or Trisomy 21 (T21) syndrome, one of the most common chromosomal abnormalities, is caused by an extra duplication of chromosome 21. The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) is a critical step in understanding the developmental stages of complex chromosomal diseases. In this study, we have generated DS-specific induced pluripotent stem cells from human amniotic fluid-derived cells and dermal fibroblast cells through lentiviral delivery of four human transcription factors (Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc). The DS-iPSCs (Trisomy 21 human amniotic fluid induced pluripotent stem cells, T21 hAF-iPSCs; Trisomy 21 human dermal fibroblast induced pluripotent stem cells, T21 hDF-iPSCs) showed characteristics similar to those of human embryonic stem cells, particularly the morphology and pluripotent-specific transcription-factor (Oct4, Nanog) expression. The pluripotency of DS-iPSCs was also tested *in vitro* and *in vivo*. Embryoid bodies and teratomas were formed and showed the expression of differentiated markers for three germ layers. The DS-iPSCs showed a good

收稿日期: 2014-01-18 接受日期: 2014-03-31

广州市科信局重大项目(批准: 2011Y1-00038)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-81292465, E-mail: ychen@gzhmc.edu.cn

Received: January 18, 2014 Accepted: March 31, 2014

This work was supported by the Major Project of Guangzhou Science and Technological Bureau (Grant No.2011Y1-00038)

*Corresponding author. Tel: +86-20-81292465, Email: ychen@gzhmc.edu.cn

网络出版时间: 2014-06-26 13:44 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0014.html>

self-renewal condition and maintained the karyotypes after long-term culturing *in vitro*. It was found that generation of iPSCs from human amniotic fluid cells were more rapid and efficient than dermal fibroblast cells. Amniotic fluid cells may be a preferred tissue for generating T21-iPSCs.

Key words Down syndrome; amniotic fluid cells; human dermal fibroblast cells; induced pluripotent stem cells

21-三体综合征(唐氏综合征)是常见的引起患儿出生缺陷和智力发育障碍的疾病之一^[1]。由于21号染色体的三体性,导致超过400个基因有三个拷贝,这使得对21-三体综合征患儿智力发育障碍确切机制的阐明成为一大挑战^[2],具体哪些基因起最关键作用还不是很清楚,因此,运用诱导多能干细胞技术建立21-三体综合征细胞模型,成为研究该病的重要手段。诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是通过把4种转录因子(Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc)利用基因表达载体转入成熟细胞,其可转变成未分化状态,具有类似胚胎干细胞的分化潜能^[3],该技术首先由日本科学家山中伸弥于2006年研究成功。iPSCs技术的问世为生命科学研究和人类疾病的治疗带来了希望,多种终末分化的细胞都能被诱导成为iPSCs,目前进行重编程的人类体细胞来源主要是皮肤成纤维细胞、羊水细胞、外周血、淋巴细胞等^[4-7]。不同组织来源的细胞获得iPSCs的效率有很大差异,因此细胞来源的不同是影响重编程效率的一个重要因素^[8-12]。本实验利用Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 4个转录因子组装在同一表达载体的可切除的慢病毒上,分别感染人21-三体综合征的羊水细胞和皮肤成纤维细胞,从而建立21-三体综合征的iPSCs系,并比较两种类型细胞制备iPSCs的效率,为21-三体综合征的体外研究建立理想的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 羊水细胞来自本院确诊怀有21-三体综合征胎儿的孕母所捐赠。皮肤成纤维细胞来自本院住院产妇自愿流产的21-三体综合征患儿。

1.1.2 试剂 含高糖的DMEM培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclone),DMEM/F12 GlutaMAX (Invitrogen),血清替代物(KnockOut serum replacement, KSR, Invitrogen),左旋谷氨酰胺(L-Glutamine, Invitro-

gen),非必需氨基酸(non-essential amino acid, Invitrogen),青霉素(penicillin, Sigma),链霉素(streptomycin, Sigma), β -巯基乙醇(2-Mercaptoethanol, Invitrogen),碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF, Invitrogen),0.05%胰酶(Trypsin, Sigma),羊水培养基 AminoMAX-TM-II(GIBCO),Lipofectamine LTX(Invitrogen),Polybrene(Millipore),丝裂霉素(mitomycinC, Sigma),一抗:小鼠抗人Oct4、Sox2、Nanog、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、Tuj-1、AFP、SMA(Sigma),二抗:Alexa Fluor系列染料(Invitrogen),DAPI稀释液(Roche),Triton X-100(Sigma),秋水仙素(Colcemid, Invitrogen),Dispase(Invitrogen),吉姆萨染液(Giemsa, Invitrogen),Trizol reagent(Invitrogen),Prime Script RT reagent kit with gDNA Eraser(TaKaRa),SYBR Premix Ex TaqTMII(TaKaRa)。

1.1.3 仪器 光学倒置显微镜(Nikon),荧光倒置显微镜(Nikon),共聚焦显微镜(Nikon),StepOne Real-Time PCR System(Applied Biosystems)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 羊水细胞获取:抽取羊水10 mL,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入3 mL羊水培养基重悬,接种于25 mL培养瓶中。37 °C、5% CO₂条件下培养,第5 d可观察到有较好的梭形细胞克隆。更换培养基,3 d后用0.05%胰酶消化传代并扩增培养羊水细胞。

胎儿皮肤成纤维细胞获取:经过其父母双方的知情同意,无菌条件下取流产胎儿上臂内侧面积为1 cm×1 cm大小的皮肤,放入含50 U/mL青霉素和50 μ g/mL链霉素的6 mL培养液中。分离去除皮下结缔组织后尽量剪碎,0.25%胰酶37 °C消化30 min,消化后吸管吹打,1 000 r/min离心4 min,沉淀用人成纤维细胞培养液培养,3~6 d可见细胞长出。

饲养层细胞(feeder cells)来源于13.5 d的昆明鼠胚胎成纤维细胞,取第2代或第3代细胞,经10 ng/mL丝裂霉素灭活处理2 h,使其失去增殖能力,消化后取1×10⁶细胞均匀铺在直径100 mm的培养皿上,作为饲

养层细胞使用。

1.2.2 T21 hAF-iPSCs及T21 hDF-iPSCs的诱导建立及初步鉴定 本研究所用的慢病毒Stemgent® Re-programming Lentivirus Set: Human OKSM购自美国Stemgent公司。向有 1×10^5 羊水细胞及 1×10^5 皮肤成纤维细胞(病毒感染前8 h置备)的6孔板中,分别加入10 μ L慢病毒液,然后加入polybrene(终浓度为8 μ g/mL),同时使用GFP作为对照。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养。24 h后弃病毒液,换新鲜培养液,重复感染一次,24 h后换液。在荧光显微镜下观察病毒转染效率。

经慢病毒感染的人21-三体羊水细胞及皮肤成纤维细胞,在第4 d分别接种到饲养层细胞上,加入诱导多能干细胞培养液进行培养。一段时间后挑选形态较好的克隆,用机械法将单个克隆分离成3~5个细胞团块,种至新的饲养层细胞上。每4~6 d可将T21 hAF-iPSCs及T21 hDF-iPSCs集落用机械法分割成4~6个细胞团块,进行iPSCs传代。每个iPSCs样本提取总RNA, RT-PCR后电泳观察内源性及总体全能性基因表达情况, qRT-PCR检测2种全能性相关基因的表达情况,每个样品以GAPDH为内参。

1.2.3 碱性磷酸酶染色及免疫荧光染色鉴定T21-iPSCs的多能性 碱性磷酸酶染色: iPSCs用4%的多聚甲醛室温固定20 min,加入碱性磷酸酶染色液,避光4 $^{\circ}$ C过夜后光镜观察。

免疫荧光染色: iPSCs用4%的多聚甲醛室温固定20 min;胞浆分子标记检测组加入0.1% Triton X-100室温处理20 min,胞膜分子标记检测组加入PBS;1%山羊血清封闭30 min;1%山羊血清稀释一抗,置4 $^{\circ}$ C湿盒内孵育过夜;二抗室温避光孵育2 h;DAPI稀释液染核10 min,共聚焦显微镜下观察拍照。

1.2.4 T21-iPSCs核型分析 选择T21 hAF-iPSCs及T21 hDF-iPSCs两个株系第10代细胞进行染色体核型分析。0.25 μ g/mL秋水仙素处理细胞4 h后消化并收集,用低渗液重悬细胞,置37 $^{\circ}$ C水浴箱中20 min,加入1 mL固定液(冰醋酸:甲醇=1:3),37 $^{\circ}$ C水浴3 min,离心弃上清;加入8 mL固定液,吸打均匀,37 $^{\circ}$ C水浴30 min;重复固定一次;用500 μ L固定液重悬细胞,将1~2滴细胞悬液滴于湿冷的载玻片上,过火后置于65 $^{\circ}$ C干燥箱中过夜。第2 d用37 $^{\circ}$ C预热的0.25%胰酶消化20 s左右,10%吉姆萨染液染5 min,水洗后风干,对染色体进行分析。

1.2.5 T21-iPSCs体外拟胚体的形成和分化 未分化的T21 hAF-iPSCs及T21 hDF-iPSCs克隆经1 mg/mL的dispase消化成细胞团,离心后用拟胚体(embryonic body, EB)分化培养液重悬,接种在Petri培养皿中,隔2 d换液,7 d后可见EB形成,光学倒置显微镜下观察。为诱导iPSCs进一步分化,将胚体转移到1%明胶包被的培养皿中继续培养,1周后行免疫荧光染色,共聚焦显微镜下观察拍照。分别采用抗Tuj-1抗体(外胚层)、抗AFP抗体(内胚层)、抗SMA抗体(中胚层)鉴定胚体中三胚层来源细胞。同时收集贴壁细胞进行RT-PCR,检测内胚层GATA4和AFP、中胚层RUNX1和外胚层NCAM基因的表达。

1.2.6 T21-iPSCs体内畸胎瘤的形成 收集T21 hAF-iPSCs及T21 hDF-iPSCs各约 1×10^7 细胞用DMEM基础培养液重悬至500 μ L,皮下注射免疫缺陷性(severe combined immune deficiency, SCID)小鼠后腿内侧皮下。观察畸胎瘤生长情况,10周后出现2 cm左右大小的畸胎瘤,取出后用4% PFA固定过夜。取部分组织作石蜡切片和常规HE染色,光学倒置显微镜下观察有无三胚层组织结构形成并拍照。

2 结果

2.1 慢病毒诱导21-三体综合征羊水细胞、皮肤成纤维细胞产生iPSCs

荧光显微镜下观察感染病毒后的羊水细胞和皮肤成纤维细胞GFP表达情况,结果显示,有90%以上的GFP阳性。两次病毒感染后将细胞转移到准备好的饲养层细胞上,在每个10 cm培养皿中分别接种约 1×10^5 感染后的两种类型细胞。每日观察并换液,5~7 d后,羊水细胞出现了胚胎干细胞样的克隆,而皮肤成纤维细胞在13~15 d出现胚胎干细胞样克隆。分别用机械法将克隆在显微镜下切开,挑取至12孔板的一个孔内,每个克隆接种到一个孔内(记作第1代, P1),羊水和皮肤成纤维细胞来源的iPSCs分别记为T21 hAF-iPSCs及T21 hDF-iPSCs。

1×10^5 羊水细胞在病毒感染后25 d碱性磷酸酶染色,得到285个阳性克隆,效率为0.285%。 1×10^5 皮肤成纤维细胞在病毒感染后25 d用碱性磷酸酶染色,得到27个克隆,效率为0.027%。应用SPSS 13.0统计学软件进行数据处理,用 χ^2 检验比较两种细胞诱导效率,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。经 χ^2 检验 $P < 0.05$,羊水细胞与皮肤成纤维细胞之间具有显著

差异, 利用羊水细胞制备iPSCs的效率显著高于皮肤成纤维细胞, 需要的时间大大缩短(表1)。

2.2 T21-iPSCs与人胚胎干细胞具有相似的特性

2.2.1 T21-iPSCs细胞形态与hESCs细胞相似

经病毒感染的T21羊水细胞接种于饲养层上后, 6 d出现克隆样细胞, 而经病毒感染的T21皮肤成纤维细胞在接种于饲养层上后, 15 d出现克隆样细胞。其细胞生长特征与胚胎干细胞相似, 细胞团内部分细胞紧密排列, 边界明显, 具有较大的核质比例。T21 hDF-iPSCs细胞团内细胞排列较T21 hAF-iPSCs更紧密。将细胞排列紧密且边界清晰的克隆用机械法传代至4孔板内, 1孔为一个株系。挑取T21 hAF-iPSCs

5个克隆, 其中3个可以稳定传代, 挑取T21 hDF-iPSCs 6个克隆, 其中3个可以稳定传代, 每3~4 d传代一次。细胞在传代过程中始终保持较高的核浆比例, 核仁明显, 细胞呈单层紧密排列(图1)。

2.2.2 T21-iPSCs碱性磷酸酶阳性及免疫荧光染色表达多种hESCs细胞标记

通过AKP的检测, 结合形态学和免疫细胞化学的观察, 可鉴定iPSCs, 判断其是否具有全能性。本实验建立的21-三体综合征iPSCs, 碱性磷酸酶染色成阳性(图2A), 羊水细胞在病毒感染25 d出现克隆数比皮肤成纤维细胞来源的更多。免疫荧光染色表达多种iPSCs多能性标记(图2B)。AKP、Oct4、Nanog、TRA-1-60、SSEA-4染

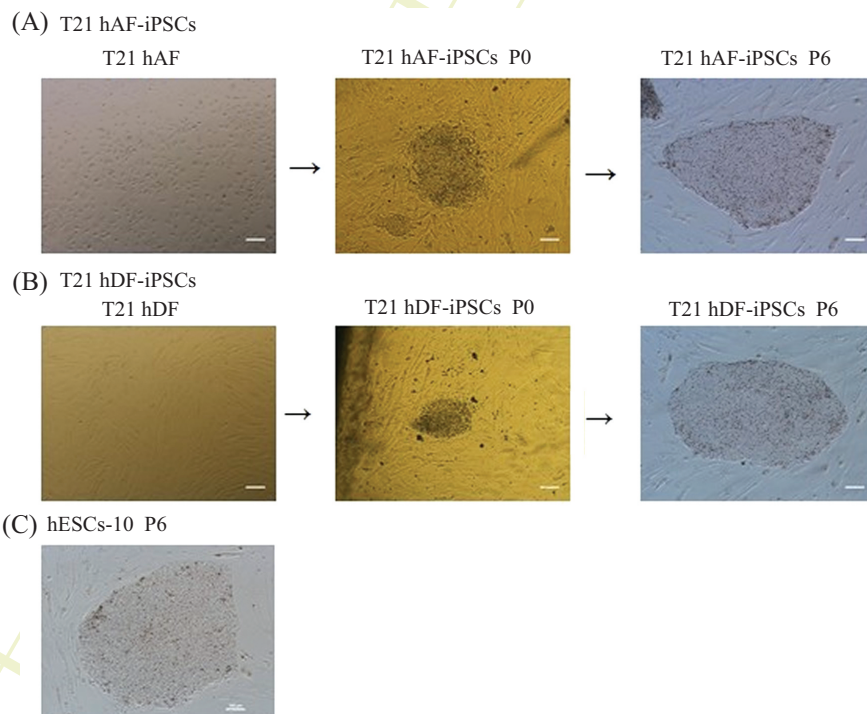
表1 两种细胞来源生成iPSCs的效率比较

Table 1 The efficiency of generation of iPSCs from different tissue cells

细胞类型 Cell type	ES样克隆出现时间(天) Time of ES-like clones emerge (d)	AP染色阳性率(%) AP staining positive efficiency (%)
Amniotic fluid cells	5~7	0.285
Dermal fibroblast cells	13~15	0.027*

羊水细胞与皮肤成纤维细胞之间具有显著差异, 经 χ^2 检验, $*P<0.05$, 与羊水细胞比较。

The efficiency of generation of iPSCs from amniotic fluid cells and dermal fibroblast cells was significant. $*P<0.05$ vs amniotic fluid cells.

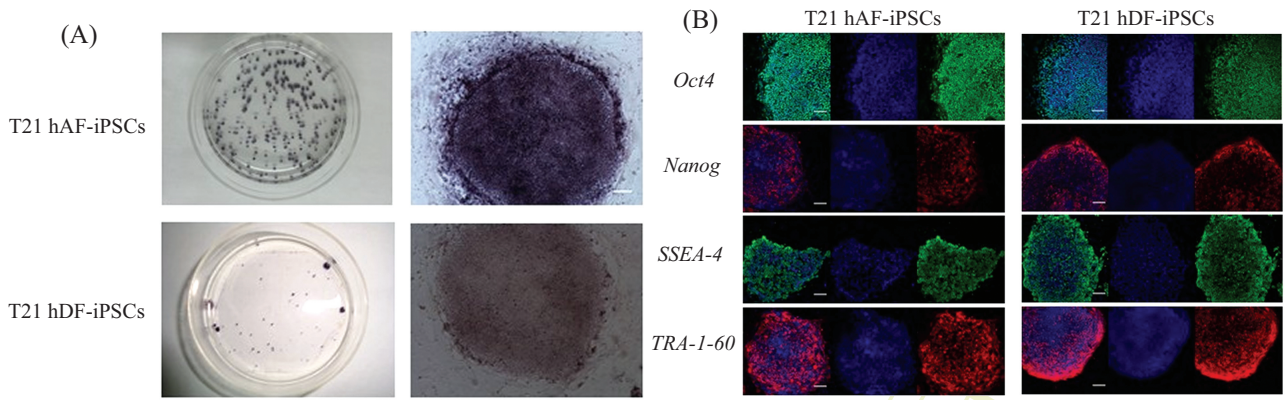


A: 一株羊水细胞来源的诱导多能干细胞, 羊水细胞形态(左), 原代羊水诱导多能干细胞(中), 第6代羊水诱导多能干细胞(右); B: 一株皮肤成纤维细胞来源的诱导多能干细胞, 皮肤成纤维细胞形态(左), 原代皮肤成纤维细胞诱导多能干细胞(中), 第6代皮肤成纤维细胞诱导多能干细胞(右); C: 人胚胎干细胞形态。标尺=100 μm 。

A: one iPSCs line derived from a down syndrome (DS)-amniotic fluid cells. Morphology of the DS-amniotic fluid cells (left), T21 hAF-iPSCs before picking the colony (middle), and at passage 6 (right); B: one iPSCs line derived from a DS-dermal fibroblast cells. Morphology of the DS-dermal fibroblast cells (left), T21 hDF-iPSCs before picking the colony (middle), and at passage 6 (right); C: the morphology of hESCs. Scale bars=100 μm .

图1 重编程细胞与人胚胎干细胞在形态上相似

Fig.1 The reprogramming cells showed a similar morphology to hESCs

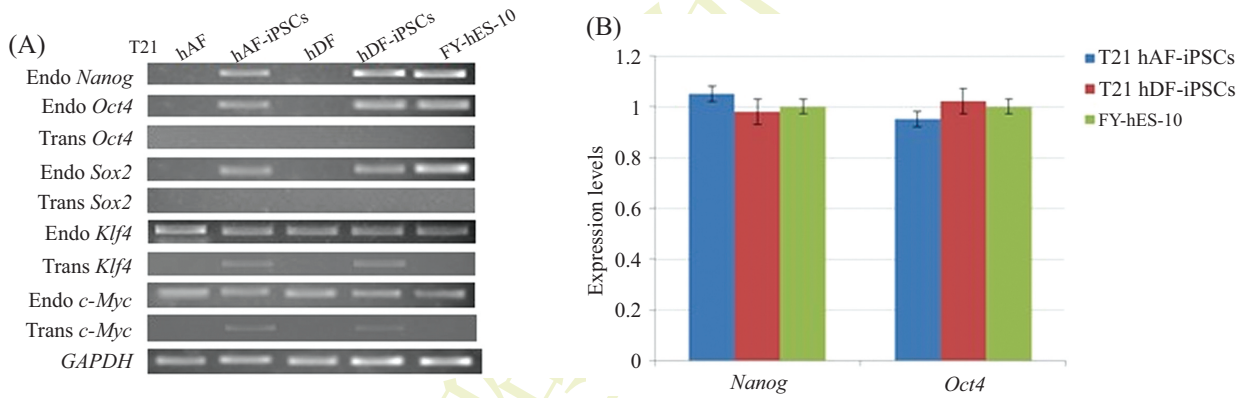


A: T21-iPSCs碱性磷酸酶染色阳性; B: T21-iPSCs表达特异性多能性基因*Oct4*、*Nanog*、*SSEA-4*和*TRA-1-60*, 免疫荧光染色均为阳性。标尺=100 μm。

A: T21-iPSCs expressed alkaline phosphatase; B: as shown by the immunostaining results, the cells expressed pluripotency markers, including *Oct4*, *Nanog*, *SSEA-4* and *TRA-1-60*. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars=100 μm.

图2 21-三体综合征诱导多能干细胞的特征

Fig.2 Characterization of T21-iPSCs



A: RT-PCR鉴定*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和*c-Myc*在hAF、hDF、T21-iPSCs和hESCs中的表达, *GAPDH*作为内参基因; B: qPCR鉴定T21-iPSCs与FY-hES-10的多能性基因*Oct4*和*Nanog*的表达, 在T21-iPSCs与FY-hES-10中*Oct4*和*Nanog*基因表达无明显差异。数据用mean±S.E.M.表示, n=3。

A: RT-PCR revealed the expression levels of *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc* in hAF, hDF, T21-iPSCs and hESCs. *GAPDH* was used as the reference gene; B: the total gene-expression levels of *Oct4* and *Nanog* were determined by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction in T21-iPSCs and FY-hES-10. The differences in the expression levels of T21-iPSCs and FY-hES-10 were not significant. The results were reported as mean±S.E.M. (n=3).

图3 21-三体综合征诱导多能干细胞表达相关多能性基因

Fig.3 The induced pluripotent stem cells of DS express pluripotent-associated genes

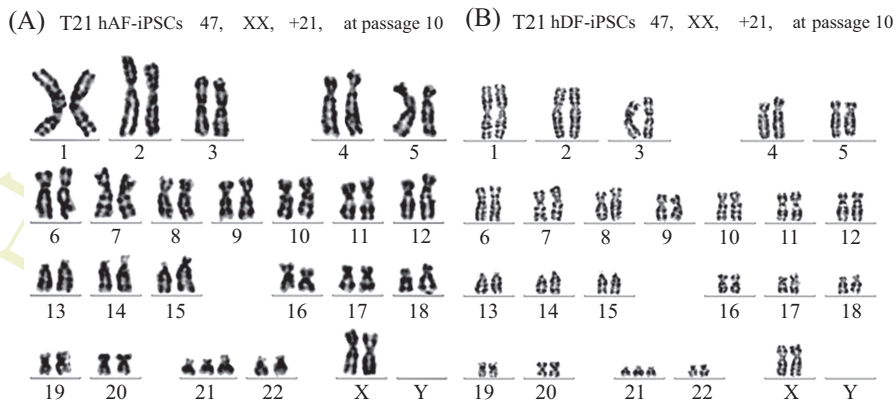
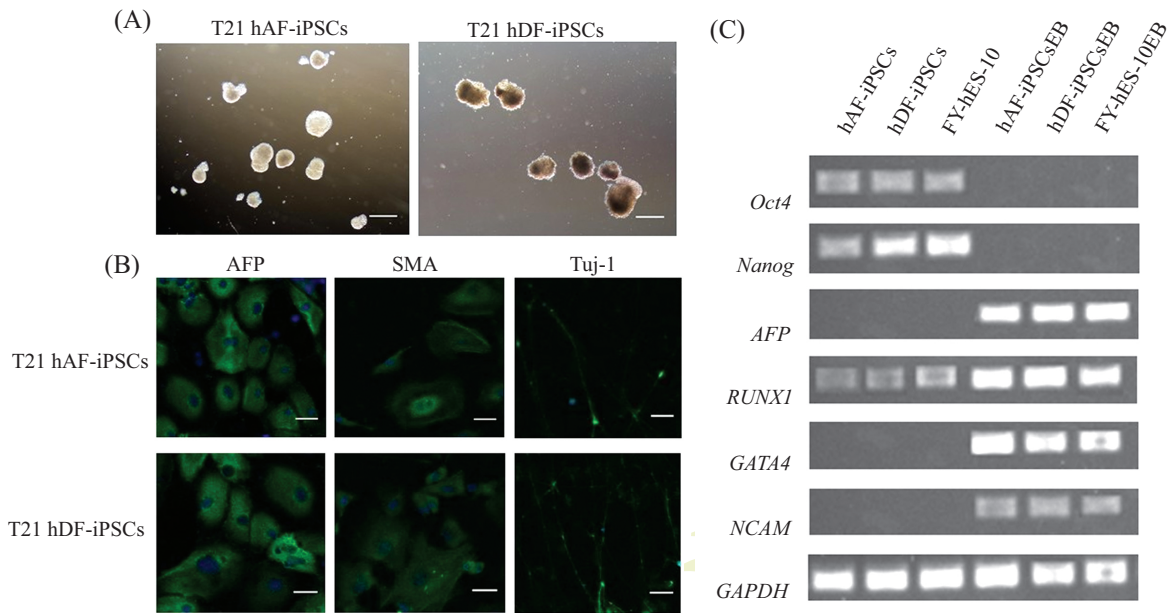


图4 T21 hAF-iPSCs与T21 hDF-iPSCs的异常核型

Fig.4 The karyotypes of T21 hAF-iPSCs and T21 hDF-iPSCs

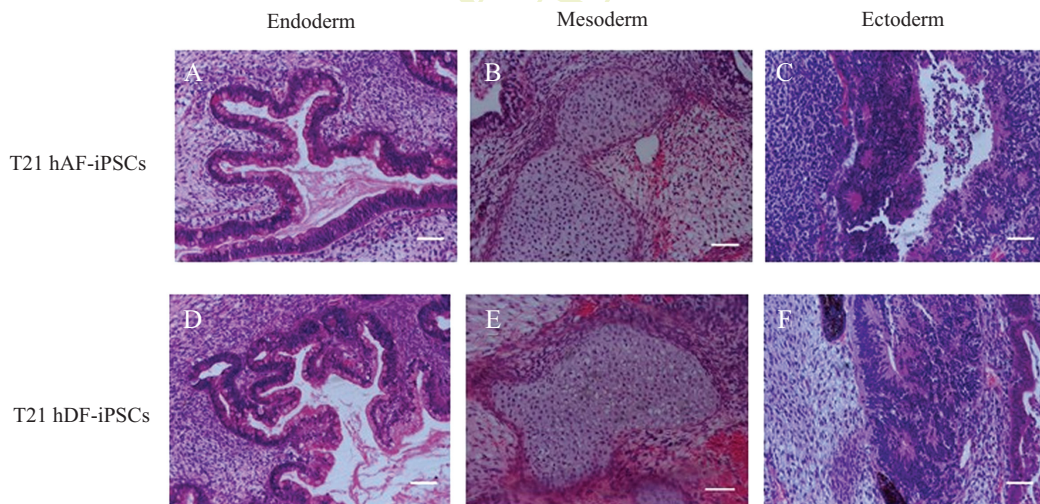


A: T21-iPSCs形成拟胚体, 标尺=100 μm; B: 拟胚体进一步分化, 内胚层表达AFP, 中胚层表达SMA, 外胚层表达Tuj1, 免疫荧光染色均为阳性, 标尺=100 μm; C: RT-PCR鉴定拟胚体三胚层标志基因*GATA4*、*AFP*、*RUNX1*、*NCAM*、*GAPDH*作为内参基因。

A: embryo bodies (EBs) were formed by the T21-iPSCs. Scale bars=100 μm; B: immunostaining showing expression of the three lineages marker Tuj1 (ectoderm), SMA (mesoderm) and AFP (endoderm) in T21-iPSCs clones from two independent iPSCs derivation subjected to EBs differentiation. Scale bars=100 μm; C: RT-PCR analyses of lineage markers that represented the three germ layers, *GATA4* (endoderm), *AFP* (endoderm), *RUNX1* (mesoderm), and *NCAM* (ectoderm). *GAPDH* was used as the reference gene.

图5 21-三体综合征诱导多能干细胞体外分化

Fig.5 The induced pluripotent stem cells of DS maintain pluripotency *in vitro*



A、D: 腺体组织(内胚层); B、E: 软骨组织(中胚层); C、F: 神经管样结构(外胚层)。标尺=100 μm。

A,D: glandular epithelium; B,E: cartilage; C,F: neuroepithelium. Scale bars=100 μm.

图6 21-三体综合征诱导多能干细胞体内分化

Fig.6 The induced pluripotent stem cells of DS maintain pluripotency *in vivo*

色结果表明, T21-iPSCs细胞具有与胚胎干细胞相似的特性。

2.2.3 基因的表达分析 T21-iPSCs与正常人胚胎干细胞FY-hES-10及来源细胞比较内源性RNA水平(图3A), 结果发现, 建立的2个iPSCs系与胚胎干细胞

相同, 均表达内源性的*Nanog*、*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*, 来源细胞微弱表达*Klf4*和*c-Myc*。对于四种外源基因, hAF-iPSCs及hDF-iPSCs外源性基因几乎已沉默。iPSCs的内源多能性基因已经被激活(如*Nanog*、*Oct4*), 与正常人ES细胞表达水平相似(图3B)。内源

多能性基因被激活及外源病毒导入基因沉默是成功重编程细胞成为诱导多能干细胞的标志。

2.3 T21-iPSCs核型分析

分别取T21 hAF-iPSCs及T21 hDF-iPSCs第10代细胞进行染色体核型分析(图4)。T21 hAF-iPSCs及T21 hDF-iPSCs经长期培养传代仍能维持21-三体异常核型。

2.4 T21-iPSCs体外的分化

为检测T21-iPSCs在体外的分化能力,将EBs在petri细菌培养皿中悬浮培养(图5A),7 d后,将EBs接种在0.1%明胶包被的培养皿中,继续培养7 d。贴壁细胞染色结果显示,内胚层细胞AFP染色阳性,中胚层细胞SMA染色阳性,外胚层细胞Tuj-1染色阳性(图5B),说明诱导多能干细胞具有分化成三个胚层细胞的潜能。两种细胞来源的诱导多能干细胞,分化效率和结果无明显差异。提取EBs的RNA,行RT-PCR后分析三胚层基因的表达情况。结果发现,两组iPSCs分化形成的EBs均可表达内胚层*GATA4*和*AFP*、中胚层*RUNX1*和外胚层*NCAM*基因,而未分化的iPSCs只表达*Oct4*、*Nanog*、*RUNX1*弱表达,不表达*GATA4*、*AFP*和*NCAM*基因(图5C)。

2.5 T21-iPSCs体内的分化

将iPSCs注射入严重联合免疫缺陷性(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠的皮下,约4周后出现畸胎瘤。接种6周后将SCID小鼠处死,取出畸胎瘤,瘤体直径3~4 cm。经石蜡切片、HE染色后,镜下观察可见三个胚层来源的细胞类型,包括腺上皮(内胚层)、软骨组织(中胚层)和神经管样结构(外胚层),说明21-三体综合征iPSCs具有体外多种分化潜能。

3 讨论

因21-三体综合征基因表达的复杂性和个体差异的多样性,21-三体综合征患者临床表现在个体之间存在很大差异,使研究其发病机制成为一项挑战。21-三体综合征胚胎干细胞研究的发展,为药物筛查和基因功能的研究提供了大量的细胞资源^[13],但考虑到伦理的质疑并不能被广泛应用。iPSCs研究的成功,避免了胚胎干细胞和核移植干细胞研究及应用中面临的伦理学问题和免疫排斥问题。

本实验建立了两种细胞(羊水细胞及皮肤成纤维细胞)来源的21-三体综合征诱导多能干细胞系,

发现两种细胞来源的疾病模型的诱导多能干细胞能顺利完成重编程且均具有全能性及自我更新能力。2009年,我国报道了非疾病来源的羊水细胞重编程为iPSCs的效率高于皮肤成纤维细胞^[8],本实验在21-三体综合征来源细胞的重编程过程中也存在该现象。羊水细胞在病毒感染后5~7 d就可以出现人胚胎干细胞样克隆,而皮肤成纤维细胞需要13~15 d。同时实验结果也显示,羊水细胞重编程iPSCs的效率比皮肤成纤维细胞高出10~20倍。因此,利用羊水细胞制备iPSCs比皮肤成纤维细胞更具优势:首先,羊水细胞来源丰富,羊水细胞可来源于产前诊断孕妇抽取的羊水,此途径获取的细胞数量多,且不会对机体产生过重且不必要的伤害;其次,此技术在未来临床发展中,若通过利用iPSCs技术获得羊水细胞重编程后的胎儿特异性iPSCs,从而建立特异性疾病模型,可尝试在体外对其进行修复遗传突变基因,获得胎儿正常的iPSCs,这就使利用iPSCs技术在产前对疾病胎儿进行宫内治疗^[14]成为可能。

虽然诱导多能干细胞未来发展的可能性多种多样,但仍存在很多弊端。由于外源基因的导入,iPSCs均有很高的产生肿瘤的风险^[15],本研究采用的慢病毒载体是把四个转录因子组装在同一表达载体的可切除载体,通过表达Cre酶可以切除iPSCs中的外源基因,得到无外源基因插入的iPSCs系,从而大大降低产生肿瘤的风险,但仍不能完全去除外源序列。2009年,美国科学家首次通过非基因改造的方法实现体细胞重编程,利用体外表达四种转录因子的重组蛋白结合应用组蛋白去乙酰化酶抑制剂,成功建立了小鼠和人的iPSCs系。虽然此种方法大大降低了iPSCs肿瘤发生率,但是存在重编程效率低和所需时间长等问题^[16-17]。提高诱导多能干细胞技术诱导效率的途径包括改进诱导方法、在诱导体系中加入化学物质、调控特定基因表达、改善培养环境等^[18-22]。如今,纳米技术的不断发展及其在细胞生物领域的应用为转染效率的提高和对细胞的动态观察带来了福音,Ruan等^[23]利用第五代聚酰胺树状大分子改性磁性纳米颗粒(Generation 5.0 polyamidoamine dendrimer-modified magnetic nanoparticles)将目的基因转入293T细胞,该方法比利用脂质体转染方法能将更多的目的基因转入细胞,并且包装出的病毒具有更高的效价。该实验同时利用荧光磁性纳米颗粒(fluorescent magnetic nanoparticles)对诱导

多能干细胞进行标记, 这样就更有利于在体外甚至体内对细胞进行观察研究。纳米材料作为干细胞基因转染的载体近年来得到了高度重视。与病毒相比, 非病毒载体具有低毒、外源基因整合机率低以及制备方法简便等优势^[24], 但在纳米材料作为生物分子的载体用于干细胞的诱导及分化过程中, 还需考虑其本身对细胞的毒性影响, 同时其进入细胞的机制还有待进一步研究。

目前, 诱导多能干细胞的研究发展突飞猛进, 在未来的发展中, 找到更合适的能被高效诱导且更适宜应用于临床的细胞类型, 以及如何利用诱导多能干细胞针对特异疾病进行更安全和有效的细胞治疗, 是该领域在临床应用前亟待解决的问题。

参考文献 (References)

- Olsen LE, Richtsmeier JT, Lwszl J, Reeves RH. A chromosome 21 critical region does not cause specific down syndrome phenotypes. *Science* 2004; 306(5696): 687-90.
- Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerweh S, *et al.* Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(11): 4997-5001.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134(5): 877-86.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009; 136(5): 964-77.
- Li C, Zhou J, Shi G, Ma Y, Yang Y, Gu J, *et al.* Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet* 2009; 18(22): 4340-9.
- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1276-84.
- Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, *et al.* Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(37): 15720-5.
- Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, Maetzel D, Hanna J, Sommer CA, *et al.* Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 7(1): 20-4.
- Cai J, Li W, Su H, Qin D, Yang J, Zhu F, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem* 2011; 285(15): 11227-34.
- Biancotti JC, Narwani K, Buehler N, Mandefro B, Golan-Lev T, Yanuka O, *et al.* Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes. *Stem Cells* 2010; 28(9): 1530-40.
- Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(24): 9826-30.
- Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, *et al.* Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009; 27(8): 743-5.
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 472-6.
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 381-4.
- Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 340-5.
- Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008; 26(7): 795-7.
- Lin T, Ambasadhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, *et al.* A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 2009; 6(11): 805-8.
- Kunisato A, Wakatsuki M, Kodama Y, Shinba H, Ishida I, Nagao K. Generation of induced pluripotent stem cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells. *Stem Cells Dev* 2010; 19(2): 229-38.
- Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5(3): 237-41.
- Jing Ruan, Jie Shen, Zheng Wang, Jiajia Ji, Hua Song, Kan Wang, *et al.* Efficient preparation and labeling of human induced pluripotent stem cells by nanotechnology. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 425-35.
- Santos JL, Oramas E, Pêgo AP, Granja PL, Tomás H. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using PAMAM dendrimers as gene delivery vectors. *J Control Release* 2009; 134(2): 141-8.