

建立非基因整合iPSCs体系及提高体外造血分化体系的研究

范 荻 何文茵 宋 兵 牛晓华 欧展辉 陈玉嫦 孙筱放*

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

摘要 诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)在体外可被诱导分化为多种细胞, 该项技术在细胞治疗、药物筛选及疾病研究上具有广阔的前景。体外定向诱导其向造血分化可为临床上使用的造血干细胞提供一种新的来源, 提高iPSCs的造血分化效率将是iPSCs临床前治疗要解决的关键问题。该研究采用非整合型病毒重编程正常人的外周血来源的单个核细胞(peripheral blood-derived mononuclear cells, PBMCs), 诱导生成iPSCs后对其进行体外造血分化实验。结果显示, 通过此种方法进行重编程的iPSCs可稳定传代, 体内外均可向三胚层分化。使用OP9细胞与iPSCs共培养可分化为造血干/祖细胞, 且添加细胞因子可有效提高分化效率。该研究为进一步提高iPSCs造血分化效率提供了重要的实验依据。

关键词 诱导多能干细胞; 重编程; 非整合; 造血分化; 细胞因子

Generation of Non-integrated iPSCs and Optimized Its Hematopoietic Differentiation System *In Vitro*

Fan Di, He Wenyin, Song Bing, Niu Xiaohua, Ou Zhanhui, Chen Yuchang, Sun Xiaofang*

(The Third Hospital Affiliated of Guangzhou Medical University, Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Key Laboratory of Reproduction and Genetics of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou 510150, China)

Abstract Induced pluripotent stem cells (iPSCs) can be differentiated into a various cells, which has broad prospects in the treatment, drug screening and disease study. Differentiated hematopoietic stem cell (HSC) *in vitro* can provide a new source of HSC for the clinical application and improve the efficiency of hematopoietic differentiation from iPSCs. In this study, we reprogramed normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to iPSCs by non viral vector, then differentiated the iPSCs into HSC by co-cultured with OP9 cells. The results showed that the reprogrammed iPSCs could be stably passaged *in vitro* and differentiated into the three germ layers *in vivo*. Co-culture with OP9 cells, the iPSCs can be differentiated into hematopoietic stem/progenitor cells, and added cytokines could increase the differentiation efficiency. This results improving the efficiency of differentiation iPSCs to HSC provides important experimental basis for future application clinically.

Keywords induced pluripotent stem cells; reprogramming; non-integrated; hematopoietic differentiation; cytokines

收稿日期: 2015-09-18 接受日期: 2016-01-11

国家自然科学基金-广东联合基金(批准号: U1132005)和国家自然科学基金(批准号: 31171229)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-81292013, E-mail: xiaofangsun@gzhmu.edu.cn

Received: September 18, 2015 Accepted: January 11, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China-Guangdong Joint Fund (Grant No.U1132005) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31171229)

*Corresponding author. Tel: +86-20-81292013, E-mail: xiaofangsun@gzhmu.edu.cn

网络出版时间: 2016-02-17 17:28:20 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160217.1728.006.html>

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)具有多向分化的潜能, 在体外能被诱导分化成多种三个胚层的细胞, 例如造血细胞、神经前体细胞、心肌细胞和生殖细胞等^[1-3]。同时, 由于iPSCs来源于自体细胞, 应用时不存在伦理问题及免疫排斥等问题, 因此iPSCs成为再生医学的研究热点。

2006年, 日本科学家Yamanaka运用逆转录病毒的方法, 将Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4四个转录因子转入小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)细胞, 诱导生成一种与胚胎干细胞相似的细胞, 将其命名为iPSCs^[4]。2007年, 该实验室利用相似技术成功将人成纤维细胞诱导为iPSCs^[5]。然而, 目前获得的iPSCs大多是通过病毒介导转录因子建立而成, 这样的iPSCs基因组DNA中随机插入病毒的DNA, 存在致癌风险。仙台病毒(Sendai viral vectors, SeVs)是一种单分子负链RNA病毒, 能在宿主细胞质中增殖, 但其遗传物质却不整合到宿主基因组中^[6]。由病毒基因组产生的热敏感SeVs可迅速被重编程的体细胞排除掉, 不会在细胞内残留^[7]。因此, 利用仙台病毒建立的非整合iPSCs系更具有临床应用的安全性和可行性, 经仙台病毒重编程的iPSCs是临床前实验的理想材料。

与此同时, 本实验选用的体细胞来源为外周血分离的单个核细胞(peripheral blood-derived mononuclear cells, PBMCs), 仅需要3~5 mL外周血即可获得足够用于重编程的体细胞。与以往报道最多的皮肤成纤维细胞作为体细胞来源的方法相比^[8], 整个过程易操作、更加安全且耗时相对较少。此外, 运用小鼠骨髓基质OP9细胞与iPSCs共培养分化体系, 体外定向诱导iPSCs向造血方向分化。文献报道, 即使在未添加任何细胞因子的情况下, 也可产生CD34⁺造血祖细胞^[9]。本实验在分化培养基中添加干细胞因子(stem cell factor, SCF)、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)、骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)、白介素-3(interleukin-3, IL-3)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)因子, 进一步提高造血分化效率, 使其在再生医学领域具有更广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验动物

NOD/SCID免疫缺陷小鼠购自北京维通利华实

验动物技术有限公司。饲养于广州医科大学实验动物中心SPF级无菌室内, 饮用水、饲料等均经过高压灭菌。

1.2 试剂及仪器

实验中所使用的耗材和仪器有: 4孔细胞培养板购自Nunc公司, 35 mm细胞培养皿购自BD公司, 其余耗材均购自Corning公司, 流式细胞仪购自BD公司(AriaIII型), 实时定量PCR仪购自ABI公司(Stepone Plus型)。

使用Invitrogen的仙台病毒重编程试剂盒(A16517)对外周血单个核细胞进行重编程。诱导多能干细胞培养液为: Knockout DMEM培养基(N10829018)、Knockout血清替代培养物(N10828028)、Glutamax(35050061)、MEM NEAA(11140050)、 β -巯基乙醇(21985023)、重组人碱性成纤维细胞生长因子(100-18B)。小鼠骨髓基质OP9细胞培养基为 α -MEM(C8114223)与20%胎牛血清混合, OP9共培养干细胞诱导分化培养基为 α -MEM与10%胎牛血清、100 μ mol/L硫代甘油(thioglycerol, MTG)构成。以上试剂除重组人碱性成纤维细胞生长因子购于PeproTech公司、胎牛血清购于BI公司外, 其他试剂均购于Gibco公司。0.25%胰蛋白酶、0.5 mmol/L EDTA购于Gibco公司、Dispase 0.1 g/mL(10 $\times$)购于Sigma公司。抗体PE-CY7-CD34、APC-CD43购于BD公司。细胞因子SCF、TPO、IL-3、IL-6购于PeproTech公司, BMP4购于R&D公司。

1.3 外周血单个核细胞的分离培养

取5 mL肝素抗凝的正常健康人外周血, 加入等体积的D-PBS并混合均匀。事先在15 mL离心管中加入5 mL淋巴细胞分离液, 将离心管倾斜45°, 沿管壁缓慢加入稀释后的人外周血。然后, 在室温条件下, 2 000 r/min水平离心30~40 min。离心后管内可清晰看到三层细胞: 上层为血浆和D-PBS, 中间层为淋巴细胞分离液, 下层主要是红细胞和粒细胞, 而在上层和中层界面处有以单个核细胞为主的白色云雾狭窄层, 即包括淋巴细胞和单核细胞的单个核细胞, 用1 mL移液器头吸出白膜层, 并加入D-PBS至10 mL, 1 500 r/min离心10 min洗涤细胞至少2次。最后, 细胞计数待用。

1.4 仙台病毒方法建系

使用Invitrogen的仙台病毒重编程试剂盒(A16517)对PBMCs进行细胞重编程, 该试剂盒内包

含四种转录因子Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc。具体过程是:将分离的PBMCs用PBMCs完全培养基调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于24孔板中,37℃、5% CO₂培养箱中孵育4 d后,按说明书加入相应滴度的仙台病毒液;24 h后,1 500 r/min离心10 min,去除病毒液后用新鲜的PBMCs完全培养基(SFM培养基、SCF、Flt-3、IL-3、IL-6)重悬继续培养;3 d后将PBMCs转移至铺有合适密度的饲养层细胞上;4~6 d隔天换液,培养基为去除细胞因子的SFM培养基;第7 d更换为iPSCs培养基,随后根据细胞状态隔天或每天换液;第16 d左右即可出现合适大小的克隆,用于建系和扩增传代。

1.5 iPSCs细胞系传代与维持

挑取胚胎干细胞样克隆,接种于饲养层细胞上。每天观察细胞状态并更换iPSCs培养基,大约5~8 d传代1次。可用机械法将克隆切割成小块,随后,用200 μL 移液器头将小块吹下转移至新的含有饲养层细胞的皿中。或使用酶消化法,加入适量的Dispase,37℃孵育7~10 min,待克隆出现轻微“卷边”时,吸走Dispase后,再加入1 mL新鲜培养基后轻轻吹打iPSCs克隆,使克隆分散成均匀的小块后按照合适的比例分配至新的铺有饲养层细胞的皿中继续培养。

1.6 细胞核型分析

将建系的iPSCs常规传代,取对数生长期细胞加入终浓度为0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的秋水仙素使细胞阻滞于中期。37℃孵育3 h后,用0.25%的胰蛋白酶将其消化为单细胞。加入3~4滴新鲜配制的低渗液(0.4%枸橼酸钠:0.4% KCl=1:1),37℃水浴6 min后,加入新鲜配制的固定液(冰醋酸:甲醇=3:1)进行预固定,1 000 r/min离心5 min后,去掉上清,再加入1 mL固定液,固定40 min后再离心。用几滴固定液吹匀处理的细胞后进行滴片。Giemsa染色,进行染色体显带分析。

1.7 iPSCs干性鉴定

1.7.1 iPSCs表面标志物表达的鉴定 将建系的iPSCs传到预先铺好饲养层细胞的4孔板中,然后在第2~4 d将培养基吸走,加入4%多聚甲醛(PFA),4℃固定过夜。用D-PBS将固定的细胞清洗3次,每次10 min。用0.5% Triton X-100透膜10 min, D-PBS清洗3次,每次10 min。用5%的BSA室温封闭1 h。按比例加入一抗(SSEA-3、Tra-1-60、Sox2),4℃孵育过夜。24 h

后弃去一抗,用D-PBS清洗3次,每次10 min,再加入二抗,室温避光染色2 h。弃去二抗后用D-PBS清洗3次,每次10 min。然后,DAPI复染核10 min。弃去DAPI后加入D-PBS,置于荧光显微镜下观察拍照。

1.7.2 体外拟胚体自由分化实验 将建系的iPSCs在体视显微镜下用1 mL注射器将iPSCs克隆机械切割成小块,将切割下的小块收集到15 mL离心管,待其自然沉降后用EB培养基重悬,接种于低吸附皿中。37℃、5% CO₂培养箱孵育7~10 d后,将EBs转移到铺有明胶的4孔板中,用EB培养基继续贴壁培养7 d后进行免疫荧光染色。一抗选择AFP、SMA、Nestin,具体方法如上所述,然后置于荧光显微镜下观察拍照。

1.7.3 体内分化畸胎瘤形成实验 选择未分化的iPSCs,将约 $(1\sim2) \times 10^6$ 细胞重悬于200 μL 明胶中,注入6~8周龄雄性免疫缺陷NOD/SCID小鼠的皮下腹股沟处。6周后观察畸胎瘤的形成情况,待肿瘤长至合适大小后,取出肿瘤并用4%多聚甲醛固定过夜。常规石蜡包埋切片,HE染色观察三个胚层的组织和细胞。

1.8 iPSCs的体外造血分化实验

OP9细胞在100 mm培养皿中培养至过密状态,然后将iPSCs转接至OP9细胞上。首先,将OP9培养基换为诱导细胞分化培养基,此处将区分实验组和对照组。即对照组中,分化培养基为 α -MEM与10%胎牛血清、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硫代甘油(MTG)。而在实验组中,培养基中添加SCF、TPO、BMP4、IL-3、IL-6因子。将干细胞用PBS洗涤2遍后加入Dispase消化7 min,待克隆的边界出现轻微卷缩后吸走Dispase,再加入2 mL DMEM/F12,与饲养层细胞共培养的iPSCs细胞用1 mL枪头吹打,将克隆吹散至均匀块状移至15 mL离心管待自然沉降3 min后,弃上清后再加入1 mL新鲜分化培养基,轻轻吹打均匀后转移至OP9细胞皿中。在37℃、5% CO₂的培养箱中培养1 d后,第2 d全部换液将死细胞及未贴壁细胞去除。之后隔天对半换液以提高分化效率。在第10 d收取细胞,进行后续实验。

1.9 流式细胞仪检测造血分化效率

用PBS洗涤共培养第10 d的细胞2遍后,先用1 mg/mL的胶原酶IV消化20 min,再用0.25%的胰蛋白酶消化15~20 min,然后中止消化。吹打细胞呈单细胞悬液。收集细胞到15 mL离心管中,1 000 r/min

离心5 min, 丢弃上清后用1 mL含2%血清的流式缓冲液重悬, 再用无菌细胞筛网(100 μm)过滤1次, 加入抗体CD34-PE-CY7、CD43-APC, 4 °C孵育30 min后, 用流式缓冲液清洗。然后以5×10⁶/mL的密度重悬细胞, 使用流式细胞仪AriaIII检测, FACSDiva软件分析其分化效率。

1.10 体外分化集落形成实验

将分选的CD34⁺细胞计数, 用注射器以甲基纤维素培养基重悬细胞以达到10⁵/mL的密度。置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养14 d。期间避免晃动培养皿, 以防集落形态变散。该实验用于评价造血干细胞体外分化能力, 可向红细胞系(erythroid, E)、巨噬细胞系(macrophage, M)、粒细胞系(granulocyte, G)、巨噬细胞-粒细胞系(granulocyte/macrophage, GM)和包含粒细胞/红细胞/巨噬细胞/巨核细胞系的多能性克隆(granulocyte/erythroid/macrophage/megakaryocyte, GEMM)五种不同的方向终末分化, 第14 d根据克隆的典型形态拍照。

1.11 RNA的提取及实时定量PCR检测

将分别共培养2、4、6、8、10 d的细胞筛除鼠源性OP9细胞, 收集分化的iPSCs并利用Trizol法提取RNA, 测RNA浓度并定量1 μg进行逆转录合成cDNA, 再稀释10倍。根据试剂盒说明书, 使用SYBR-Green qPCR Super Mix-UDG with ROX Kit进行荧光定量PCR。以β-actin为内参, 检测Sox2、GATA-2、RUNX1、CD34、CD43的动态表达水平。反应体系如下: 将稀释后的cDNA, 吸取2 μL样本, 分别加入10 μmol/L的上游和下游引物各1 μL, 再加10 μL SYBR Green Mix, 用水补足体积至20 μL。反应条件为: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火1 min, 此过程循环40次, 并在各循环的退火阶段收集荧光信号。通过ABI StepOne™ V2.2.2进行数据分析。所用引物的序列信息见表1。

2 结果

2.1 诱导多能干细胞的形态

将添加了病毒的PBMCs置于饲养层细胞共培养, 第8 d, PBMCs开始出现局域性增殖。第16 d开始挑取典型形态的克隆进行传代及扩增。每天镜下观察克隆并将分化部分刮出, 使细胞呈特征性的巢状集落生长, 镜下观察, 克隆有明显的边界, 形态平整。内部细胞结构紧密, 核质比高, 有明显核仁(图1A)。

表1 β-actin、OCT4、CD34、CD43、GATA-2、RUNX1的引物序列

Table 1 Primer sequences of β-actin, OCT4, CD34, CD43, GATA-2 and RUNX1

基因	引物序列(5'→3')
Gene	Primer sequence (5'→3')
β-actin	F: CCT GGG CAT GGA GTC CTG TG R: TCT TCA TTG TGT CTG GGT GCC
OCT4	F: GAA GGT ATT CAG CCA AAC GA R: GGC CGC AGC TTA CAC AT
CD34	F: TGC CCT GAG TCA ATT TCA CTT C R: CAA CTC TGT CTT GGC GTC AGT
CD43	F: AGG AGC TGA AGT CTG GGT C R: CAG CCT CAC TAT TCA CCG AC
GATA-2	F: TTC AAT CAC CTC GAC TCG C R: GCT GTG CAA CAA GTG TGG
RUNX1	F: CTG CCC ATC GCT TTC AAG GT R: GCC GAG TAG TTT TCA TCA TTG CC

2.2 细胞核型分析结果

对第5代和第25代的iPSCs进行染色体G带分析, 结果显示, 均为正常的二倍体核型46, XY(图1B), 说明该株iPSCs较稳定, 未见染色体变异。

2.3 诱导多能干细胞的干性鉴定

2.3.1 iPSCs表面标志物表达的鉴定 免疫荧光染色显示, 特异性胚胎抗原SSEA-3和肿瘤相关因子TRA-1-81以及多能性标志物核抗原Oct4表达阳性(图2A~图2C)。

2.3.2 iPSCs拟胚体自由分化实验 将贴壁生长的拟胚体进行免疫荧光染色, 内胚层AFP、中胚层SMA、外胚层Nestin均表达阳性(图2D~图2F), 证明所建立iPSCs系可向三胚层分化。

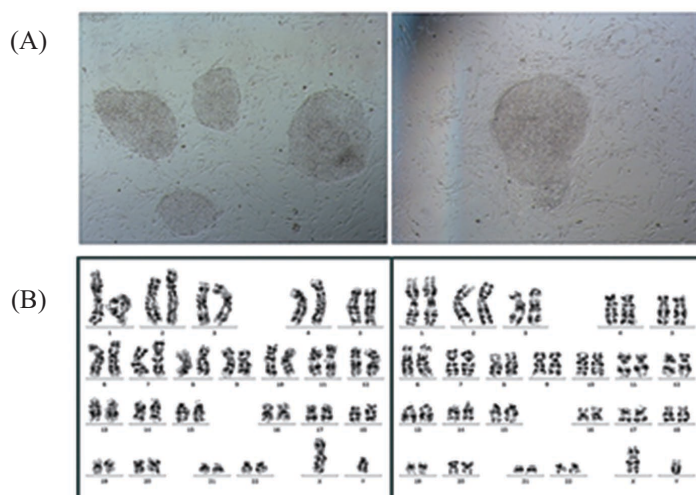
2.3.3 畸胎瘤实验 将未分化的iPSCs注射到NOD/SCID小鼠腹股沟处, 约第8周发现腹股沟处出现肿瘤, HE染色结果表明, 所形成的肿瘤可向三个胚层分化(图2G~图2I)。

2.4 iPSCs体外造血分化实验

将未分化的iPSCs接种于OP9细胞上。OP9细胞呈梭形(图3A), 3~4 d即可长满皿底, 保证OP9细胞状态良好, 可提高分化效率。随着共培养的时间延长, OP9细胞逐渐老化, 而iPSCs也逐渐分化(图3B和图3C)。

2.5 流式细胞术检测造血分化效率

本实验室使用的OP9导入GFP标签蛋白, 呈FITC阳性, 可以此对人源性iPSCs与鼠源性OP9实现区分。对FITC阴性的细胞进一步划分出CD34⁺部分

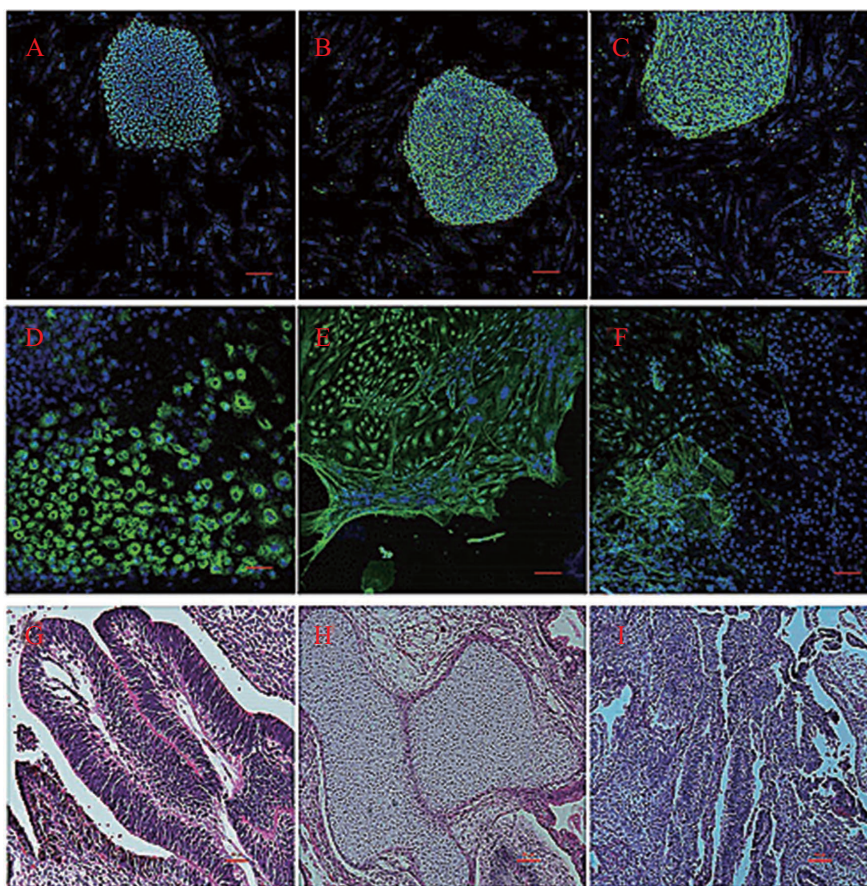


A: iPSCs具有ES样形态特征; B: 核型分析结果。

A: iPSCs derived from demonstrated a typical human ES cell-like morphology; B: karyotype analysis.

图1 重编程细胞的形态及稳定性

Fig.1 The morphology and stability of reprogrammed cells



A: 免疫荧光检测iPSCs特异性多能性基因*Oct4*的表达; B: 免疫荧光检测iPSCs特异性多能性基因*SSEA-3*的表达; C: 免疫荧光检测iPSCs特异性多能性基因*Tra-1-81*的表达; D: 体外自由分化实验后, 内胚层AFP的表达; E: 体外自由分化实验后, 中胚层表达SMA的表达; F: 体外自由分化实验后, 外胚层表达NESTIN的表达; G: iPSCs所形成的畸胎瘤, 组织切片后HE染色见腺体(内胚层); H: iPSCs所形成的畸胎瘤, 组织切片后HE染色见软骨(中胚层); I: iPSCs所形成的畸胎瘤, 组织切片后HE染色见表皮细胞(外胚层)。标尺=100 μ m。

A: iPSCs highly expressed *Oct4*; B: iPSCs highly expressed *SSEA-3*; C: iPSCs highly expressed *Tra-1-81*; D: through differentiation *in vitro* experiment, the endoderm expression of AFP; E: through differentiation *in vitro* experiment, the mesoderm expression of SMA; F: through differentiation *in vitro* experiment, the ectoderm expression of NESTIN; G: iPSC steratoma formed after HE staining reflected gland (endoderm); H: iPSCs steratoma formed after HE staining reflected cartilage (mesoderm); I: iPSCs steratoma formed after HE staining reflected epidermal cells (ectoderm). Scale bars=100 μ m.

图2 PBMCs来源的iPSCs的特征

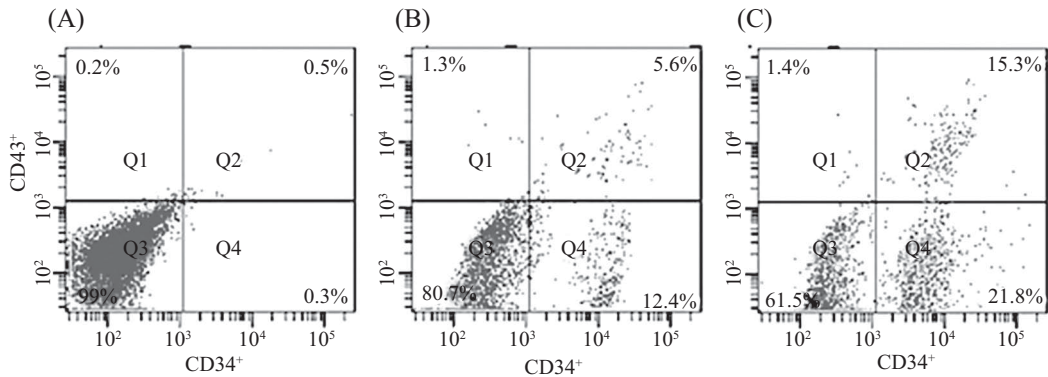
Fig.2 Characterization of iPSCs derived from PBMCs



A: OP9 cell morphology; B: iPSCs were seeded in OP9 cells at D2; C: iPSCs were seeded in OP9 cells at D10.

图3 体外造血分化实验

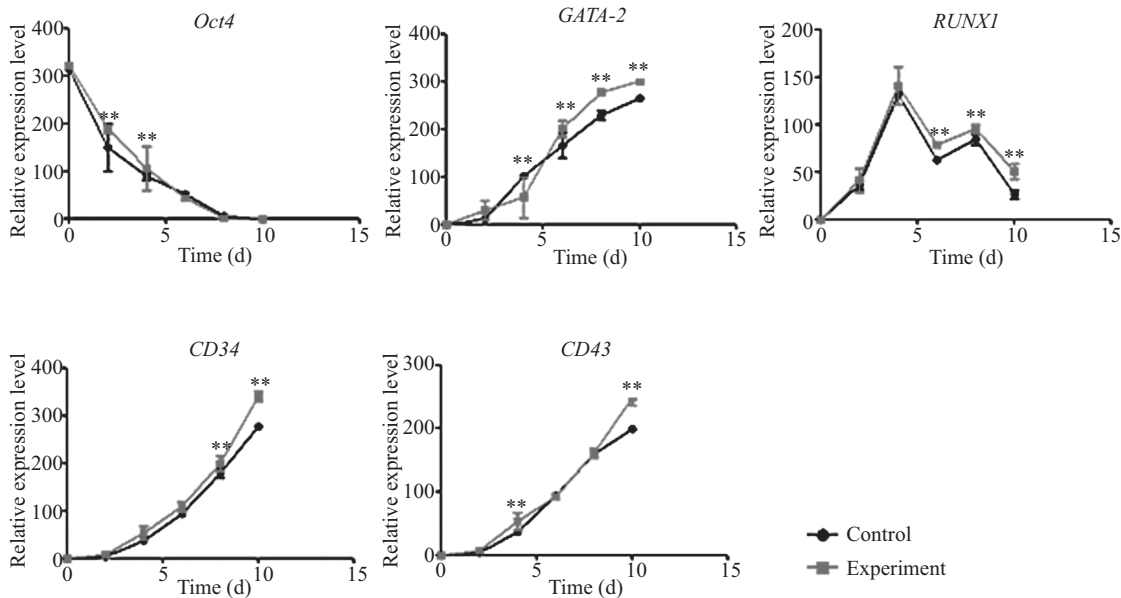
Fig.3 Hematopoietic differentiation experiments *in vitro*



A: 阴性组; B: 对照组; C: 实验组。
A: negative group; B: control group; C: the experimental group.

图4 流式细胞术检测两组造血分化效率的差异

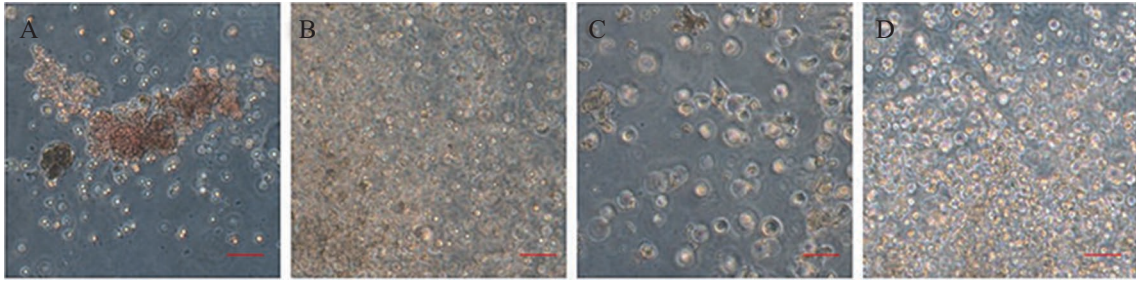
Fig.4 Analysis of differentiated cells by FACS



β -actin为内参基因, 使用未分化的iPSCs作为对照。结果用均数 $\pm$ 标准差表示, $**P<0.01$, 与对照组比较。
Gene expression levels were normalized to the standard calibrator, the housekeeping gene β -actin and the mean expression in the undifferentiated iPSCs. Results are shown as mean $\pm$ S.D., $**P<0.01$ compared with control group.

图5 实时定量PCR分析两组造血相关基因表达水平差异

Fig.5 Analyses of hematopoiesis-associated gene expression by qPCR



A: 红细胞系; B: 粒细胞系; C: 巨噬细胞系; D: 巨噬-粒细胞系。标尺=100 μm 。

A: CFU-E; B: CFU-G; C: CFU-M; D: CFU-GM. Scale bars=100 μm .

图6 镜下的克隆形成形态

Fig.6 Morphology of CFC types

和CD43⁺部分, 对比两组的双阳性率, 可见实验组即添加细胞因子组双阳性细胞率明显上升(图4)。

2.6 实时定量PCR结果

与对应培养体系中未经诱导的iPSCs相比, 随着与OP9共培养的时间延长, 细胞中多能性标志基因*Oct4*的表达受明显抑制; 造血特异性基因*GATA-2*、*CD34*、*CD43*的表达显著上调, *RUNX1*呈波动性趋势, 而特异性基因*CD34*和*CD43*表达明显高于对照组也证明添加造血因子可以提高体外造血分化能力(图5)。

2.7 集落形成实验结果

共培养14 d左右可以形成包括红细胞系(erythroid, E)、粒细胞系(granulocyte, G)和巨噬细胞系(macrophage, M)在内的各种集落, 证明与OP9共培养的iPSCs分化而成的造血干细胞具有体外分化的能力(图6)。

3 讨论

通过特定的转录因子可以将终末分化的体细胞重编程为iPSCs, 建立的人iPSCs在很多方面与人胚胎干细胞有相似性^[5,10]。iPSCs技术的发展为再生医学研究提供了新的供体来源, 又因为iPSCs的供体细胞来源于自身体细胞, 所以可以有效地避免胚胎干细胞涉及的伦理及免疫排斥问题。这些都有望促使iPSCs成为现代医学的一类全新有效的治疗手段^[11]。

目前, 人iPSCs主要来源于皮肤成纤维细胞、羊水细胞、表皮角质细胞等^[12-15]。但这些来源的细胞从取材到培养需经过几个阶段才能获得足够的细胞用于重编程, 而且有研究报道, 只有前几代的细胞才能保证有效的重编程^[8]。同时, 文献报道, 从不同组织来源的体细胞重编程的iPSCs由于保留了供体来源的表观遗传信息, 所以在分化过程中更具

有向该供体细胞类型分化的潜质^[16-17], 外周血来源的iPSCs比成纤维细胞来源的iPSCs更容易向造血方向分化^[18]。因此, 血细胞成为利用iPSCs治疗血液系统疾病的理想供体资源。本研究选用的体细胞来源为外周血分离的单个核细胞, 仅需5 mL外周血即可获得足够用于重编程的体细胞, 且获取过程简单、安全、高效^[19]。本次建立的诱导多能干细胞利用非基因整合法仙台病毒建系, 该方法建立的iPSCs细胞基因组DNA中不随机插入病毒DNA, 降低致癌风险, 与基因整合方法相比, 具有基因组稳定性及干细胞安全性等优势。

本文利用外周血PBMCs为原材料的iPSCs用作研究造血分化体系的细胞。在对照组中仅使用常规报道的分化培养基^[20], 而实验组中添加SCF、TPO、BMP4、IL-3、IL-6因子。干细胞因子(SCF)是一种通过锚定并且表达与所有HSC表面的酪氨酸受体c-kit而发挥作用的因子, c-kit的表达将引起造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)扩增数量增多^[21]。血小板生成素(TPO)被认为是巨核细胞系特异性生长因子, 属于特异性作用细胞因子, 可以维持巨核细胞增殖、分化、成熟及形成有功能的血小板等。骨形态发生蛋白4(BMP4)能够激活Wnt3a和上调Cdx和Hox基因, 诱导腹侧后面中胚层的形成, 进一步促进中胚层直接向造血方向分化^[22]。白介素-3(IL-3)被称为肥大细胞生长因子, 主要由激活的T淋巴细胞产生, 能够刺激多能造血干细胞的增殖与分化^[23]。白介素-6(IL-6)是一类多功能细胞因子, 可以诱导细胞增殖分化等。综上所述, 所添加的因子均对造血干细胞生成起正向调节作用。联合使用因子组合使造血分化效率提高且效率高于单独使用某因子。

结合本文结果分析, 流式细胞术分析发现, 对照组CD34⁺和CD43⁺双阳性率为5.6%; 而在实验组中

双阳性率上升至15.3%, 分化效率明显上调, 说明添加了正向调节因子可诱导iPSCs向造血干细胞分化。实时定量PCR结果也显示相同的趋势, 即实验组中造血特异基因*CD34*、*CD43*的表达明显上调。以上结果说明, iPSCs与OP9细胞共培养可向造血方向分化, 且在分化培养基中添加适当的细胞因子可有效提高造血分化效率。

本研究以人iPSCs为研究对象, 建立了以外周血单个核细胞的非基因整合iPSCs体系, 并探讨了细胞因子对iPSCs体外定向分化为造血干细胞的正向调节作用。结果证实, 利用外周血单个核细胞建立稳定的iPSCs可以向造血干/祖细胞分化, 通过培养基添加因子的调整可以提高其分化效率。本研究为进一步提高iPSCs造血分化效率提供了有价值的理论与实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 2 Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321(5893): 1218-21.
- 3 Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, Butylkova Y, Heydarkhan-Hagvall S, Gekas C, *et al.* Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 2008; 26(6): 1537-46.
- 4 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.
- 5 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 6 Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, *et al.* A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J Virol* 2000; 74(14): 6564-9.
- 7 Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; 85(8): 348-62.
- 8 Ye L, Muench MO, Fusaki N, Beyer AI, Wang J, Qi Z, *et al.* Blood cell-derived induced pluripotent stem cells free of reprogramming factors generated by Sendai viral vectors. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(8): 558-66.
- 9 Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: Efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2005; 105(2): 617-26.
- 10 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.
- 11 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-3.
- 12 杜 融, 骆玉梅, 王 鼎, 孙筱放, 陈耀勇. 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. *中国细胞生物学学报* (Du Rong, Luo Yumei, Wang Ding, Sun Xiaofang, Chen Yaoyong. Generation and comparison of human Down syndrome-induced pluripotent stem cells from types of cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(7): 884-91.
- 13 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.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9(1): 17-23.
- 17 Nukaya D, Minami K, Hoshikawa R, Yokoi N, Seino S. Preferential gene expression and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse pancreas. *Genes Cells* 2015; 20(5): 367-81.
- 18 Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, *et al.* Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29(12): 1117-9.
- 19 汪文君, 邢 文, 白 洁, 刘淑平, 许 静, 纪光臻, 等. 真性红细胞增多症诱导性多能干细胞株的建立. *中国细胞生物学学报* (Wang Wenjun, Xing Wen, Bai Jie, Liu Shuping, Xu Jing, Ji Guangzhen, *et al.* Establishment of iPSC lines from a polycythemia vera patient. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(5): 648-54.
- 20 Vodyanik MA, Thomson JA, Slukvin II. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood* 2006; 108(6): 2095-105.
- 21 Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(4): 1502-6.
- 22 Lengerke C, Schmitt S, Bowman TV, Jang IH, Maouche-Chretien L, McKinney-Freeman S, *et al.* BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the Cdx-Hox pathway. *Cell Stem Cell* 2008; 2(1): 72-82.
- 23 Robin C, Ottersbach K, Durand C, Peeters M, Vanes L, Tybulewicz V, *et al.* An unexpected role for IL-3 in the embryonic development of hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 2006; 11(2): 171-80.