

人椎间盘髓核来源的诱导多能干细胞 重编程及功能的研究*

吴张松¹⁾ 罗志强¹⁾ 张明裕¹⁾ 廉翠红²⁾ 林欣燕¹⁾ 梁雨虹¹⁾ 顾洪生²⁾ 朱艳霞^{1)**}

(¹⁾ 深圳大学医学部, 深圳 518060; (²⁾ 深圳大学附属第一医院脊柱外科, 深圳 518060)

摘要 椎间盘退变始发于髓核组织, 获得足够有功能的髓核细胞是研究及治疗椎间盘退变的关键。而人诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)不仅为建立疾病模型以研究疾病发生发展机制开辟了道路, 还在再生医学领域展现出了广阔的应用前景。我们首先从椎间盘退变患者微创手术获得的髓核组织内分离髓核细胞, 将携带 OCT3/4、SOX2、KLF4 和 c-MYC 的仙台病毒(Sendai virus, SeV)转染髓核细胞, 重编程获得 iPSC。通过检测多能细胞特异性标志、体内成瘤实验、甲基化及核型分析对所获得的 iPSC 进行鉴定。并以皮肤成纤维细胞来源 iPSC 作为对照, 在二维和三维水凝胶中对 iPSC 进行定向分化, 检测髓核细胞相关蛋白和基因的表达, 比较分析 2 种 iPSC 向髓核细胞的分化效率。结果显示, iPSC 能表达多能细胞特异性标志, 具有正常的二倍体核型, 畸胎瘤实验显示三个胚层的出现。诱导分化后的 iPSC 表达髓核相关基因和蛋白, 在水凝胶中诱导培养后, iPSC 表达更多的髓核相关基因和蛋白。髓核来源的 iPSC 与成纤维细胞来源的 iPSC 相比, 可表达更多的髓核相关基因和蛋白。本研究首次将患者退变髓核细胞重编程成 iPSC, 并在水凝胶内将其诱导分化为髓核样细胞, 为椎间盘退变个体化细胞治疗奠定基础。

关键词 椎间盘退行性疾病, 髓核, 诱导多能干细胞, 重编程, 分化

学科分类号 R3, Q2

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0160

椎间盘髓核组织主要由髓核细胞及 II 型胶原构成, 富含蛋白聚糖, 呈凝胶状, 维持椎间盘的正常形态和静水压力, 承载脊柱运动与关节活动应力从而实现生物学效应。椎间盘退变(disc degenerative disease, DDD)主要从髓核退变开始^[1-2], 伴随 DDD 发生, 髓核组织发生纤维化, 髓核细胞(nucleus pulposus cell, NPC)数量进一步减少, 细胞外基质合成能力下降^[2]。最后髓核向外突出, 引起患者下腰背疼痛。

目前用于髓核再生修复的种子细胞有自体软骨细胞、原代髓核细胞和干细胞^[3-4]。尽管自体原代 NPCs 用于退变椎间盘的修复, 不存在免疫排斥反应, 但由于来源有限, 且体外增殖能力差, 因此很难广泛应用于临床。成体干细胞如间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)虽具有多向分化潜能, 但其分化潜能远弱于胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC), 而 ESC 的伦理问题以及致癌性问题当前仍无法解决, 阻碍其临床研究及应用。

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)是由体细胞重编程而获得的具有与 ESC 类似生物学特性的多能干细胞, 避免了临床应用 ESC 所带来的伦理学问题的同时, 还可为临床患者提供个体化治疗。现已发现, 多种不同组织来源的细胞可以重编程为人 iPSC^[5-7], 并分化成特异性组织类型的细胞, 在动物疾病模型建立、新药研制及细胞治疗等领域展现出了广阔的应用前景。

然而, 疾病组织细胞的获取并非都很容易, 而且重编程的效率受细胞分化状态和年龄影响^[8]。目前需要个性化细胞治疗的大多为老年病患, 其衰老的细胞严重地限制了重编程的效率和保真度, 因此针对老年疾病组织细胞, 寻找一种高效的重编程方

* 国家自然科学基金(81301597)和深圳新兴战略产业发展专项资金(JCYJ20150525092940984/JCYJ20160422090807181)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0755-86671903, E-mail: yanxiazhu@szu.edu.cn

收稿日期: 2017-04-26, 接受日期: 2017-06-19

法是极其重要的。

传统逆转录病毒和慢病毒用于 iPSC 重编程中可能将外源基因插入到宿主细胞基因组中, 从而导致插入突变, 增加了体内成瘤的风险, 其重编程后的 iPSC 在临床应用的安全性还有待商榷^[9-10]。其他用于 iPSC 重编程的载体, 如 mRNA、Episomal 等小分子化合物, 重编程效率极低^[11-13]。仙台病毒 (Sendai virus, SeV) 载体能高效地将外源基因导入多种细胞中, 并重编程获得无外源基因整合的 iPSC^[14-17], 因此, 对于老年病变组织细胞的重编程, SeV 可能是一个较好的载体。

iPSC 具有分化成多种组织细胞的潜能^[17-19], 已有研究通过共培养或添加相关因子诱导 ESC 或 MSC 向 NPC 定向分化^[20-23], 也有研究通过生长因子和低氧培养诱导 iPSC 向 NPC 分化^[24-25]。虽然已报道多种诱导干细胞向髓核细胞分化的方法, 但 iPSC 向 NPC 分化潜能及分化方法还有待进一步研究。

本研究中, 我们使用携带 OCT3/4、SOX2、KLF4 和 c-MYC 基因的 SeV 载体转染退变髓核组织中的 NPC, 并对重编程后髓核来源的 iPSC (NP-iPSC) 进行鉴定。我们还成功地将 iPSC 诱导分化为髓核样细胞, 与成纤维细胞来源的 iPSC (F-iPSC) 相比, NP-iPSC 具有更强的向髓核样细胞分化的潜能。三维水凝胶体系更利于 iPSC 向髓核样细胞分化。NP-iPSC 在 DDD 发病机制的研究和细胞治疗中具有巨大应用前景。

1 方 法

1.1 髓核细胞分离培养

本研究经深圳大学实验动物伦理委员会与医学伦理委员会的许可, 患者已签署知情同意书。从 3 位 DDD 患者 (38~50 岁, Pfirman 等级 6) 微创手术中获取髓核组织, 0.1% 胶原酶和 0.25% 胰蛋白酶 (Invitrogen) 消化 20 min 后, 快速收集消化液并转移至含 10% 胎牛血清 (FBS, Gibco) 的 DMEM-F12 培养基 (Gibco) 中终止消化, 1 500 r/min 离心 10 min 后去上清收集细胞沉淀, 重新加入胰蛋白酶 / 胶原酶混合液对残余组织继续消化。重复上述步骤 2~3 次, 直到髓核组织完全消化。将收集到的细胞悬液混合后接种到 T25 培养瓶中进行培养。

1.2 iPSC 重编程

使用编码 OCT3/4、SOX2、KLF4 和 c-MYC 的 SeV (CytoTune 2.0, Invitrogen) 转染髓核细胞

(NPC, 第 1 代) 5 天后, 用 0.25% 胰蛋白酶收集贴壁生长细胞, 同样用髓核细胞培养基重悬后重新接种于铺有甲基纤维素 (matrigel, BD Biosciences) 的 6 孔板中, 2 天后, 细胞重新接种于包被有甲基纤维素的 10 cm 的培养皿中, 使用含生长因子的 Reproeasy 培养基 (北京赛贝公司) 进行培养。在感染后第 14~28 天根据形态人工挑取 iPS 克隆, 使用含生长因子的 PSceasy 完全培养基 (北京赛贝公司) 在包被有甲基纤维素的培养板上进行培养。来自 3 个病人的 iPSC 都进行了相关鉴定。

1.3 基因蛋白表达分析检测

用 Trizol (Invitrogen) 试剂盒提取第 4 代和第 16 代髓核来源的 iPSC (NP-iPSC) 总 RNA, 使用 Superscript II 逆转录试剂盒 (Invitrogen) 合成 cDNA。实时定量 - 聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 分析基因 OCT4, SOX2, c-MYC 和 KLF4 表达情况, hESC H9 作为对照。内源性和总的 OCT4, SOX2, c-MYC 和 KLF4 基因引物序列见表 1。cDNA 标准品也进行 qRT-PCR 分析, 并与内源性和总的 OCT4, SOX2, c-MYC 和 KLF4 基因表达进行比较。

Table 1 Endogenous and total primer sequences for OCT4, SOX2, c-MYC and KLF4

Target	Sequence (5'→3')	Product sizes/bp
KLF4 Endo	cggacactactactgcctt	192
	gcaactgaaacccaagtcc	
KLF4 Total	tctccaattcgtgacccat	139
	tcgaagtggatagctaggc	
MYC Endo	catccacgaaactttgccca	152
	tctctggcgaagagacttctc	
MYC Total	aacacacaacgtcttgagc	193
	gacttctctgaacaacgcc	
OCT-4 Endo	ctgctgggtctcttctca	120
	catgaggagccagggaagg	
OCT-4 Total	cgagaggattttgagctgc	126
	agtgacgtgacatgaggagc	
SOX2 Endo	tcaggagtgtcaaggcaga	124
	tccctctcttcaaacctcggg	
SOX2 Total	agctcgacagctcatgaa	151
	atggagaaggagggtgaggt	

第 13 代 NP-iPSC 表面特异性蛋白的检测按照免疫细胞化学检测标准方法进行, 所用到的一抗如下: 抗人 TRA-1-60 (StainAlive TRA-1-60, Stemgent), 抗人 TRA-1-81 (StainAlive TRA-1-60,

Stemgent), 抗人 SSEA-4(Santa Cruz Biotechnology), 抗人 NANOG(Abcam), 抗人 OCT3 / 4(Santa Cruz Biotechnology) 和 抗 人 SOX2 (Santa Cruz Biotechnology). 加入荧光二抗的细胞在荧光显微镜下(Zeiss Imager Z1)用 AxioVision 软件进行观察拍照.

1.4 体内畸胎瘤实验

为检测 NP-iPSC 在体内的多能性, 我们将 NP-iPS 细胞悬液注射到非肥胖性糖尿病重症联合免疫缺陷 (nonobese diabetic severe combined

immunodeficient, NOD-SCID)小鼠背部皮下, 15 w 后切除肿瘤组织, 10%福尔马林固定, 冷冻切片, 并进行苏木精 & 伊红(H&E)染色, 镜下观察并拍照.

1.5 基因组测序

按照 MethylCode™ 亚硫酸氢盐转化试剂盒 (Methyl Code Bisulfite Conversion Kit)说明书处理 NP-iPSC, Oct4 和 Nanog 基因启动子引物如表 2. 将 PCR 产物插入到 pMD18-T(Takara)载体中, 任意挑选 5~6 个克隆用 M13 正向和反向引物对进行基因组测序.

Table 2 The PCR primers for Oct4 and Nanog promoters

Primer name		Sequence(5'→3')	Product size/bp
OCT4-1	F	GGATGTTATTAAGATGAAGATAGTTGG	406
	R	CCTAAACTCCCCTTCAAAATCTATT	
OCT4-2	F	TAGTTGGGATGTGTAGAGTTTGAGA	260
	R	TAAACCAAAACAATCCTTCTACTCC	
NANOG	F	GGAGTAGAGTGTAGAGGAGAATGAGTTA	331
	R	CTAACTCTTTAACTTCTTCCCAAATC	

1.6 核型分析

第 16 代 NP-iPSC 用秋水仙素(终浓度 0.07 g/L, Sigma-Aldrich)处理 4 h 后离心, 然后用 10 ml KCl 溶液(75 mmol/L)重悬, 冷甲醇:冰醋酸(3:1)溶液固定, 重复 3 次. 固定液冲洗细胞 2 次, 然后将细胞置于预冷的载玻片上. 用于染色体分析的载玻片干燥后用 0.0025%胰蛋白酶处理 5 min, 然后吉姆萨(Giemsa, 1:10, Sigma-Aldrich)溶液染色 5~10 min. 核型从每个克隆系中 2 个细胞产生.

1.7 iPSC 向髓核样细胞分化

成纤维细胞来源的 iPSC(F-iPSC)通过上述同样的方法进行重编程和鉴定^[26]. 将 NP-iPSC 分化为髓核样细胞过程中, 以 F-iPSC 为对照. 收集高浓度 (1×10⁷ cells/ml)的 iPSCs 悬液, 并将其滴种到包被有甲基纤维素的培养板中心, 贴壁 1 h 后, 加入髓核分化培养基(高糖 DMEM, 10 μg/L TGF-β1, 100 nmol/L 地塞米松, 50 mg/L 抗坏血酸 2- 磷酸盐, 1% ITS, 100 U/ml 青霉素和 100 g/L 链霉素, 均购自 Life Technologies)进行诱导培养, 每 3 天换液 1 次. 加入含 10% FBS 的高糖 DMEM 的 iPSC 作为对照(未分化组). 分化 21 天后进行如下检测.

1.8 免疫组织化学染色

进行免疫组织化学染色之前, 未分化和已分化

的 iPSC 以及作为阳性对照的髓核细胞用预冷的丙酮 4℃固定 30 min, PBS 冲洗 3 次、10%的羊血清封闭 20 min, 一抗(抗 II 型胶原抗体、抗蛋白聚糖抗体、抗 CD24 抗体、Abcam) 4℃孵育过夜, PBS 冲洗 3 次, 辣根过氧化物酶标记的二抗(Invitrogen)室温孵育 2 h, PBS 冲洗细胞, DAB 成像. 为检测细胞所分泌的黏多糖, 分化后的细胞用 4%的多聚甲醛(pH 7.4, Sigma-Aldrich)固定后进行甲苯胺蓝染色. IX-71 荧光显微镜下观察拍照(Olympus, 日本).

1.9 特异性蛋白表达的检测

收集分化后 iPSC, 加入 0.05 mol/L Tris 盐酸缓冲液(pH 8.0, 包含 0.15 mol/L 氯化钠, 0.02%叠氮化钠, 0.1% SDS, 1% NP-40, 11 mg/L 抑肽酶和 0.1 mol/L 苯基甲基磺酰氟 PMSF, 所有试剂购自 Sigma)进行裂解, 髓核细胞作为阳性对照. 细胞裂解液于 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min. 100 μg 总蛋白样品和预染的蛋白质标准品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜, 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入封闭液适当稀释的一抗(抗 II 型胶原抗体、抗蛋白聚糖抗体、抗 CD24 抗体, 1:1 000, Abcam) 4℃孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗(Invitrogen)室温孵育 1 h, ECL

检测免疫反应性蛋白, LAS-3000 化学发光成像分析系统进行成像分析.

1.10 mRNA 表达水平的检测

分化后 iPSC 和髓核细胞的总 RNA 用 Trizol (Invitrogen) 试剂进行提取, 按照第一链 cDNA 试剂盒 (Takara) 说明书逆转录合成 cDNA. 使用 Quantitect SYBR Green PCR 试剂盒 (Takara) 进行实时定量聚合酶链反应 (qPCR) 分析, β -actin 作为内参.

1.11 NP-iPSC 在水凝胶中分化

因为髓核细胞更适于在三维环境内生长, 所以我们在壳聚糖-透明质酸水凝胶中分化 NP-iPSC. 首先将 1 ml 含 2% 壳聚糖和 2% 透明质酸混合液与 2×10^6 NP-iPSC 混匀, 接种于 24 孔板中, 37°C 下形成细胞-水凝胶复合物, PSCeasy 培养基培养 1 周后, 更换为髓核诱导培养基培养 21 天. 24 孔板中培养的相同数量的 NP-iPSC 作为对照. 经 21 天分化后进行甲苯胺蓝染色、免疫组织化学染色及实时定量 PCR 检测.

1.12 统计学分析

数据结果都是以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)形式展示的. 运用多因素方差分析比较不同组间差异 (ANOVA). 当 ANOVA 检验显示出显著性差异, 且组与组之间没有相互作用时, 每个时间点和位点之间的差异通过事后比较检验 (post hoc test). $P < 0.05$ 为有显著性差异. 所有的数据都用 SPSS15.0 分析软件进行分析.

2 结 果

2.1 髓核细胞重编程为 iPSC

通过编码 OCT3/4、SOX2、KLF4 和 c-MYC 基因的 SeV 感染髓核细胞并重编程为 iPSC 的流程图如图 1 所示 (图 1a). SeV 感染第 7 天后, 开始出现小的松散的克隆, 但并不具有典型的 ESC 形态特征. 转染后 14~28 天之间, 挑取与 ESC 形态相似的结构紧密的克隆, 将其接种到包被甲基纤维素的培养皿中传代培养.

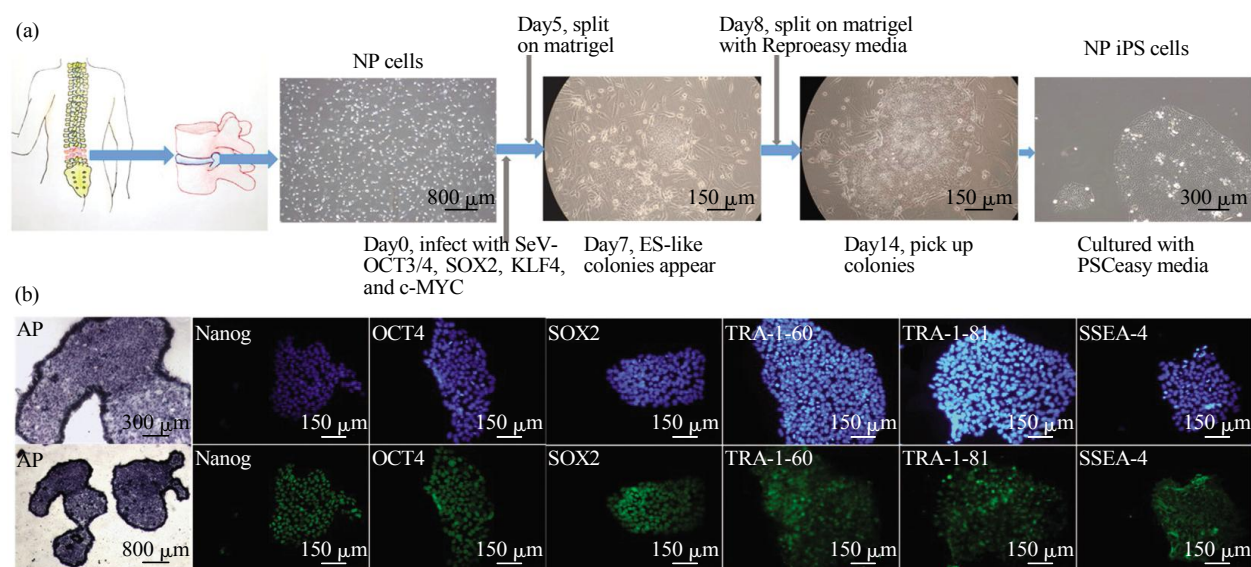


Fig. 1 Overview of the NP-iPSC generation protocol and immunostaining of specific markers

(a) NPCs transduced with SeV expressing human *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC*. NPC derived iPSC colonies emerge at 14~28 days after NP cell transduction. (b) Staining of Alkaline phosphatase (AP) and pluripotency markers (NANOG, OCT3/4, SOX2, TRA-1-60, TRA-1-81 and SSEA-4) in induced cell colonies.

2.2 iPSC 的鉴定

三个病人髓核组织来源的 iPSC 都进行了鉴定, 结果没有显著性差异, 本文结果中只显示其中一个 NP-iPSC 的鉴定结果. 为检测 NP-iPSC 的干性, 免疫荧光染色结果显示, NP-iPSC 表达 ES 细胞特有的分子标记 TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-4、

OCT4、SOX2 和 NANOG, 且碱性磷酸酶染色阳性 (图 1b). 为检测 NP-iPSC 中外源基因的残留, 实时定量 PCR 分析表明第 4 代后的 NP-iPSC 外源基因已被沉默 (图 2a). ESC 一个很重要的特性就是关键调节因子 Oct4 和 Nanog 启动子区域低的甲基化水平, ESC 特异性基因 DNA 甲基化水平可能与 iPS

重编程的效率密切相关. 亚硫酸氢盐测序分析显示 NP-iPSC 内源性 Oct4 和 Nanog 启动子区域未被甲基化, 而 hESC H9 和髓核细胞呈现高的甲基化水平(图 2b). NP-iPSC 传代 20 代后, 仍保持正常核型(46; XX 或 XY)(图 2c). 为证明 NP-iPSC 的多能

性, 我们将 NP-iPSC 注射到 NOD/SCID 裸鼠皮下, 15 周后从裸鼠皮下取出肿瘤组织, 并进行组织切片和 HE 染色, 结果显示畸胎瘤具有三胚层结构, 如外胚层的神经管, 内胚层的内分泌腺以及中胚层的软骨组织(图 2d).

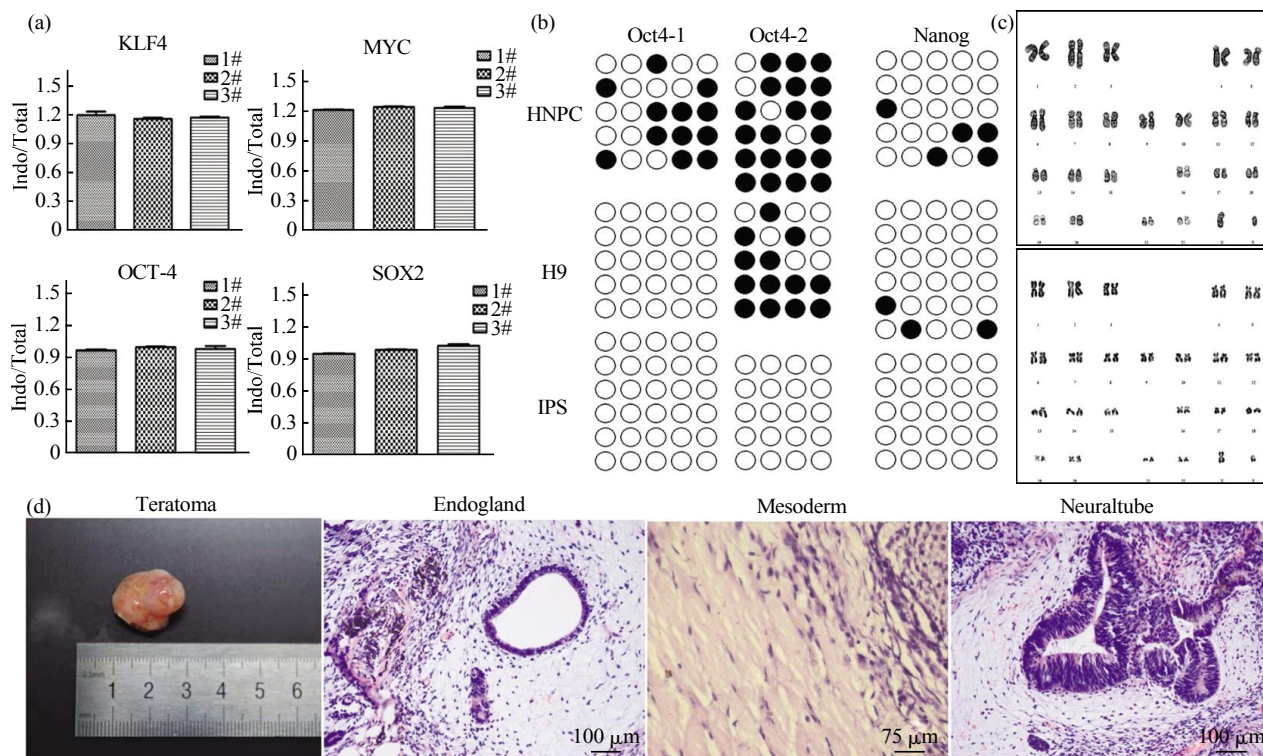


Fig. 2 Characterization of iPS colonies generated from NPCs

(a) Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of endogenous and total genes in induced colonies. 1# and 2# represent NPC-derived iPSCs P4 and P16, 3# represent H9 P38. (b) DNA methylation analysis in the promoters of Oct4 and Nanog by bisulfite sequencing. Human NP and H9 cells were used as controls. (c) Karyotyping analysis of a representative colony. (d) Hematoxylin and eosin (HE) staining of teratomas derived from NP-derived iPSCs.

2.3 iPSC 分化为髓核样细胞

高浓度 iPSC 接种到包被甲基纤维素的培养皿中形成细胞团块(图 3). 分化后通过甲苯胺蓝染色检测细胞团块中所分泌髓核细胞外基质糖胺聚糖(GAGs)的表达(图 3). 结果表明: 与普通培养基相比较, 髓核诱导培养基可诱导 iPSC 合成更多的 GAGs, 而与 F-iPSC 相比, NP-iPSC 可合成更多的 GAGs. 免疫荧光染色显示, 髓核诱导培养基可诱导 iPSC 产生更多 II 型胶原、蛋白聚糖和 CD24, 而 NP-iPSC 分化后可产生更多的 II 型胶原、蛋白聚糖和 CD24(图 3). 两种染色结果基本一致. 有意思的是, 未分化的 NP-iPSC 经长时间培养后也表达少量 GAGs、II 型胶原、蛋白聚糖和 CD24, 表明 NP-iPSC 具有更强的髓核细胞分化潜能.

2.4 髓核特异性蛋白和基因表达的定量分析

Western blot 结果与免疫组化染色结果一致. 髓核诱导培养基可诱导 iPSC 表达更多 II 型胶原和蛋白聚糖; 对于未分化的 iPSC, NP-iPSC 也表达少量髓核细胞外基质, 但 F-iPSC 经长时间培养也未见髓核细胞外基质的表达, NP-iPSC 分化后特异性蛋白表达水平与髓核细胞相比没有显著性差异. 实时定量 PCR 测量结果表明, 髓核诱导培养基可诱导 iPSC 表达更多 collagen II、aggrecan、CD24、KRT18 和 Basp1, NP-iPSC 分化后这些基因的表达水平与髓核细胞表达水平没有显著性差异(图 4). 所有结果显示, NP-iPSC 比 F-iPSC 具有更强的向髓核细胞分化的潜能.

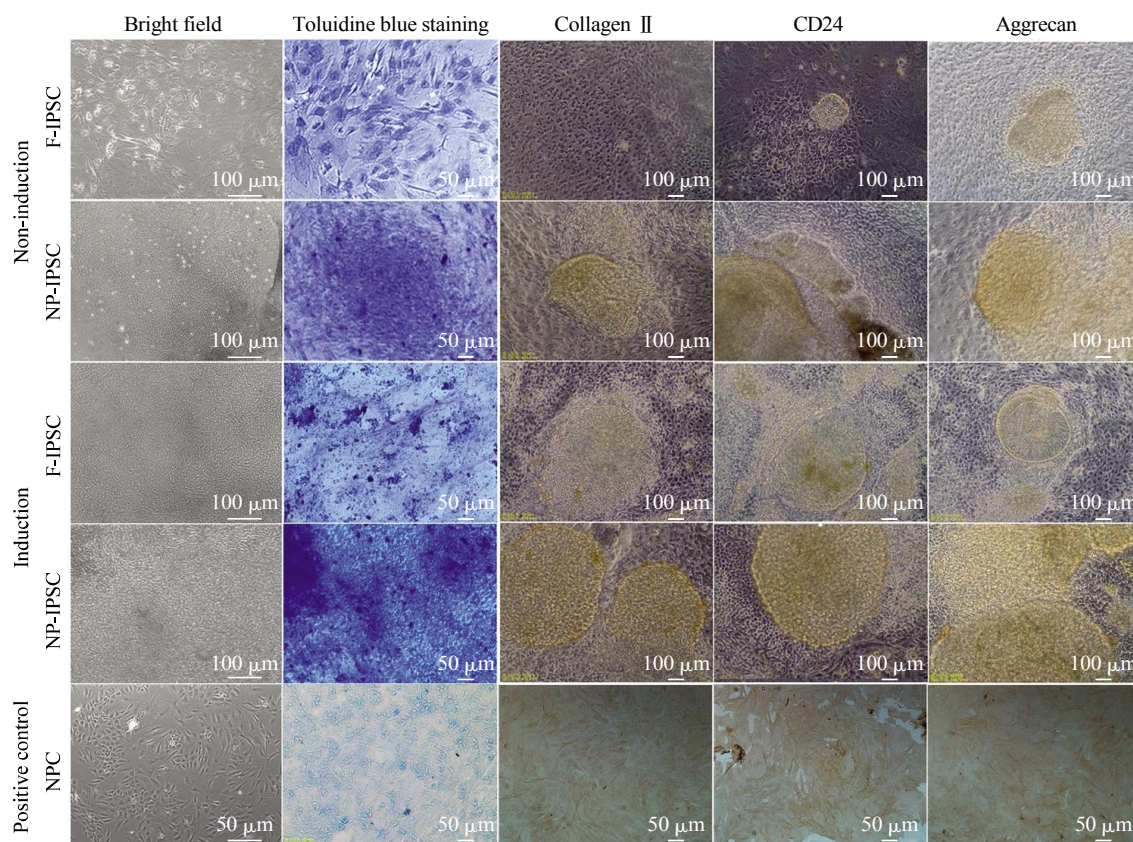


Fig. 3 Differentiation analysis of iPSCs

Brightfield image showing the morphology of iPSCs 3 weeks post differentiation. Toluidine blue staining of glycosaminoglycans in representative iPSC cell clusters. Immunostaining of iPSC cell cultures for the presence of collagen II, aggrecan, and CD24. NP cells were used as positive control. Regions of positive staining are shown as brown. F-iPS: fibroblast derived iPSC cells; NP-iPS: NP cells derived iPSC cells; NPC: NP cells; Induction: iPSCs induced with NP differentiation media; Non-induction: iPSCs cultured without NP differentiation media.

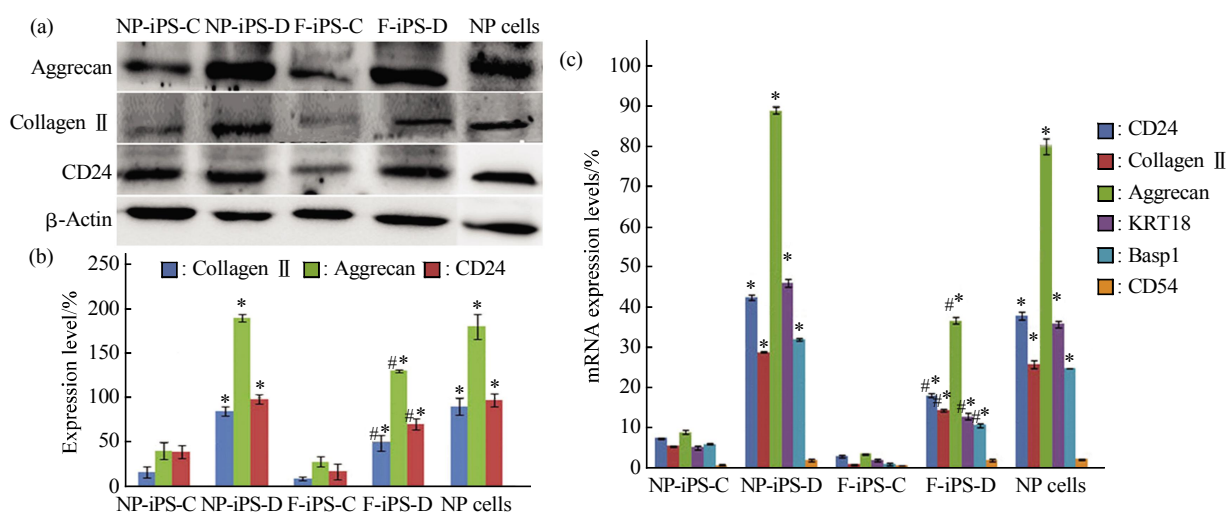


Fig. 4 Quantitative analysis of NP specific proteins and genes

Protein expressions of collagen II, aggrecan and CD24 were analyzed by Western blotting. Quantitative analysis was did for collagen II, aggrecan, CD24, KRT18, Basp1 and CD54 gene expression in micromass-cultured iPSCs after 3 weeks differentiation. * $P < 0.01$, compared with undifferentiation group; # $P < 0.05$, compared with NP cells. F-iPS-C: fibroblast derived iPSC cells without differentiation; F-iPS-D: fibroblast derived iPSC cells cultured with NP differentiation media; NP-iPS-C: NP cells derived iPSC cells without differentiation; NP-iPS-D: NP cells derived iPSC cells cultured with NP differentiation media.

2.5 NP-iPSC 在水凝胶中分化

细胞 - 水凝胶复合物分化 21 天后进行冷冻切片, 切片经甲苯胺蓝染色显示, 与二维孔板中细胞相比, 分化后细胞 - 水凝胶复合物有更多 GAGs 沉积(图 5a); 实时定量 PCR 检测结果也表明水凝胶中细胞表达更多 collagen II、aggrecan、CD24、KRT18 和 Basp1 基因; 免疫细胞化学结果也显示水凝胶中细胞分化后高表达 II 型胶原和 CD24 (图 6)。红色荧光显示 II 型胶原和 CD24 染色阳性, 细胞核经 DAPI 染色显示蓝色荧光。

3 讨 论

iPSC 的出现无疑为生物医学领域建立了一个新的方法, 然而在过去 10 年里, iPSC 重编程技术已通过改进转录因子组合^[27, 11]、转染载体^[12-13, 28]或重编程细胞类型^[5-7]而得到很大的改进, 探寻一种简单高效且无外源基因和病毒整合的患者特异性

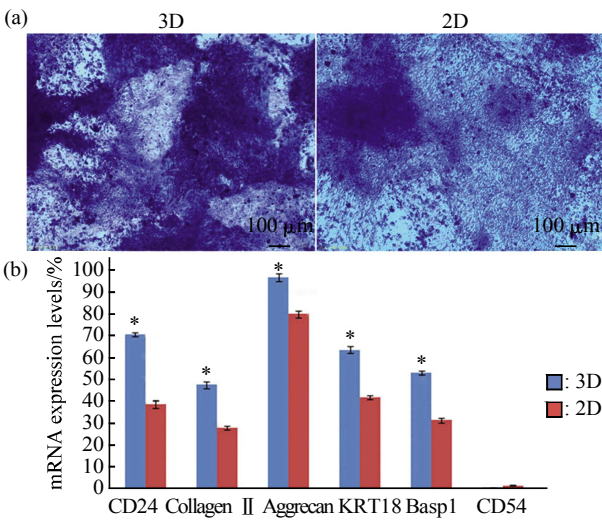


Fig. 5 Differentiation analysis of iPSCs in hydrogel
Toluidine blue staining of glycosaminoglycans in hydrogel and culture plate. Quantitative analysis was performed for collagen II , aggrecan, CD24, KRT18, Basp1 and CD54 gene expression in in hydrogel and culture plate, *compared with cells in culture plate. 2D: iPSCs differentiated in culture plate, 3D: iPSCs differentiated in hydrogel.

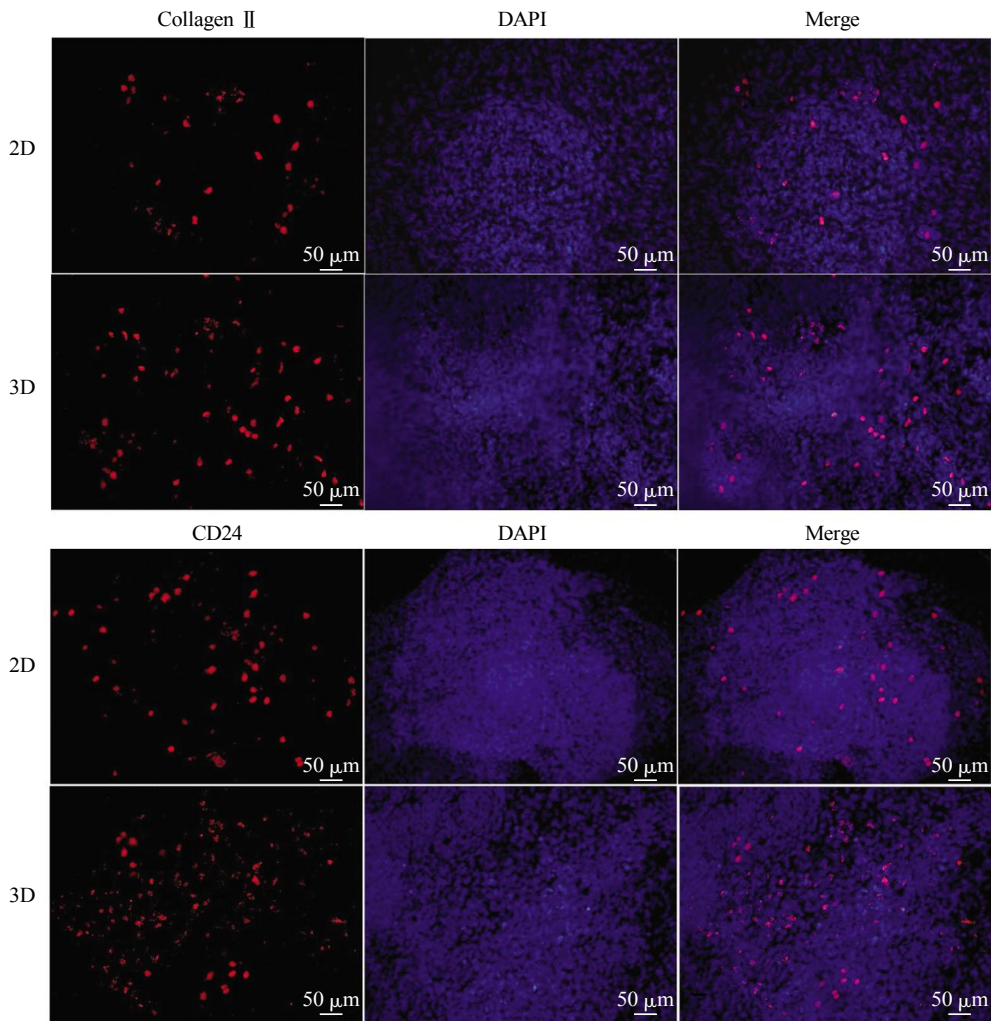


Fig. 6 Immunofluorescence analysis of iPSC differentiation in hydrogel

Immunofluorescence staining of iPSCs for the presence of collagen II and CD24. Positive staining is shown by red fluorescence, blue fluorescence is for the nucleus. 2D: iPSCs differentiated in culture plate, 3D: iPSCs differentiated in hydrogel.

iPSC 重编程方法具有重要意义。成体细胞重编程 iPSC 后不仅可为慢性复杂性疾病(例如 DDD)发病机制研究提供细胞模型,也为临床细胞治疗提供可靠的细胞来源。目前,大多数研究都集中在患者正常组织细胞重编程,如皮肤成纤维细胞、血液和脐带血^[5,7,29]。而对于 DDD 患者,退变髓核组织很容易通过微创手术获得,因此髓核细胞是 iPSC 重编程的一个很好的细胞来源,重编程后的 iPSC 可用于 DDD 发病机制的研究和再生治疗。

本研究中,我们利用 SeV 通过一种简单有效的方法成功地将髓核细胞重编程为无外源基因整合的 iPSC。SeV 是一种不整合入宿主并能自我清除的重编程病毒载体,无基因毒性,能高效感染多种细胞^[10]。从退变髓核组织分离得到的髓核细胞增殖能力弱,我们前期采用逆转录病毒或慢病毒转染髓核细胞,仅可见 1~2 个阳性克隆,而且外源基因的不完全沉默也可能影响后续 iPSC 的分化^[30]。由于 SeV 转染效率高且无外源基因整合等优势,因此我们将其作为髓核细胞重编程的载体。重编程后的 iPSC 表现出多能性特征,并表达多能性相关基因和蛋白,具有正常核型。

将病人成体细胞重编程为 iPSC 并将其分化为特定组织类型的细胞,为人类疾病的研究提供了一个重要的细胞模型。为了运用病人特异性 iPSC 来研究 DDD,我们将 iPSC 分化为髓核样细胞。目前可用于诱导 iPSC 分化为髓核样细胞的方法并不多,Chen 等^[21]在缺氧条件下用天然髓核组织培养基将 CD24⁺ 的 iPSC 在无生长因子的条件下分化为髓核样细胞。Liu 等^[22]利用转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)将小鼠 iPSC 分化为功能性的髓核细胞。这两种方法都能诱导髓核细胞特异性表面标记物的表达和髓核功能特征的出现。我们前期工作用 TGF- $\beta 1$ 诱导 F-iPSC 分化为软骨样细胞来治疗大鼠骨关节炎^[26],在本研究中,通过髓核诱导培养基将 iPSC 分化为髓核样细胞,发现 NP-iPSC 相对于 F-iPSC 具有更强的髓核分化能力。iPSC 在包被甲基纤维素的培养皿中,分化过程中维持聚集的细胞团块样形态,甲基纤维素形成的固体软基质可能有利于髓核细胞生长^[31],因而促进 iPSC 向髓核样细胞的分化。

iPSC 是否分化为髓核样细胞主要是通过检测髓核细胞特异性标记和细胞合成 GAGs、II 型胶原和蛋白聚糖的能力。II 型胶原和蛋白聚糖是髓核细胞产生的关键分子^[32]。骨科研究学会认为正常髓核的标记应该是稳定表达 HIF-1、Glut-1、aggrecan/

collagen、Shh、KRT18、CA12、Basp1 和 CD24^[33]。CD24 作为髓核前体细胞的标记,也在脊索细胞内表达^[34-35],因此可作为髓核发生早期的表型标记。CD54 在年轻的髓核组织内只有微量表达,但在老年髓核组织内高表达,CD54 可能是椎间盘退变炎症相关的分子标记^[36],也可用作椎间盘发展中炎症微环境的分子标记。检测结果显示,除了 CD54,其他所有髓核相关的基因在分化后都呈高表达,表明在 iPSC 分化为髓核样细胞的过程中没有炎症反应的发生。在分化后的 iPSC 中髓核样特征的表达模式和细胞团样形态特征与天然人髓核组织非常类似。通过我们所建立的分化体系,NP-iPSC 和 F-iPSC 都表现出髓核样细胞特征。有趣的是未分化的 NP-iPSC 也表达少量 GAGs 和髓核细胞标记物,这可能由于髓核细胞在重编程为 iPSC 过程中保留了部分髓核细胞特征的记忆,从而使 NP-iPSC 具有强的髓核细胞分化潜能。在我们的分化体系中,甲基纤维素所形成的固体软基质和生长因子的结合对促进 iPSC 向髓核细胞分化是非常重要的。

4 总 结

我们成功地通过 SeV 将 DDD 患者髓核细胞重编程为 iPSC,而这一 iPSC 可能保留了部分髓核特性的记忆,而这一记忆可能使 iPSC 更易于向髓核细胞分化,三维水凝胶分化体系可促进 iPSC 向髓核样细胞分化。因此,DDD 患者髓核组织来源的 iPSC 既可作为研究 DDD 发病机制的细胞模型,也可作为临床细胞治疗的一个较好的细胞来源。

参 考 文 献

- [1] Zhang Y, Xiong C, Chan C, *et al.* Changes in nucleus pulposus cell pools in “Healer” mice for the repair of intervertebral disc degeneration. *Global Spine J*, 2015, **05**(S01): e004
- [2] Kim D H, Martin J T, Elliott D M, *et al.* Phenotypic stability, matrix elaboration and functional maturation of nucleus pulposus cells encapsulated in photocrosslinkable hyaluronic acid hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 2015, **12**: 21-29
- [3] Oehme D, Goldschlager T, Ghosh P, *et al.* Cell-based therapies used to treat lumbar degenerative disc disease: a systematic review of animal studies and human clinical trials. *Stem Cell International*, 2015, **2015**(946031): 1-16
- [4] Lv F, Leung V, Cheung K. Cell-based therapies for degenerative disc diseases. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 2016, **26**(3): 182-188
- [5] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, **131**(5): 861-872

- [6] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 2008, **321**(5889): 699–702
- [7] Nishishita N, Takenaka C, Fusaki N, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *J Stem Cells*, 2011, **6**(3): 101–108
- [8] Seki T, Yuasa S, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. *Nature Protocols*, 2012, **7**(4): 718–728
- [9] Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte J C. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a lacarte. *Nat Rev Genet*, 2011, **12**(4): 231–242
- [10] Chen I P, Fukuda K, Fusaki N, *et al.* Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. *Cellular Reprogramming*, 2013, **15**(6): 503–513
- [11] Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, *et al.* New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. *Plos One*, 2014, **9**(12): e113052
- [12] Requena J, Palomo A B, Sal M F, *et al.* The future challenges for the clinical application of reprogrammed cells. *Human Genet Embryol*, 2014, **4**(1): 1–4
- [13] Itoh M, Kawagoe S, Okano H J, *et al.* Integration-free T cell-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a healthy individual: WT-iPSC2. *Stem Cell Research*, 2016, **17**(1): 19–21
- [14] Morita A, Soga K, Nakayama H, *et al.* Neuronal differentiation of human iPS cells induced by baicalin via regulation of bHLH gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, **465**(3): 458–463
- [15] Aikawa N, Suzuki Y, Takaba K. A Simple protocol for the myocardial differentiation of human iPS cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2015, **38**(7): 1070–1075
- [16] Tasnim F, Phan D, Toh Y C, *et al.* Cost-effective differentiation of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells using small molecules. *Biomaterials*, 2015, **70**(2015): 115–125
- [17] Stoyanov J V, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, *et al.* Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells. *European Cells & Materials*, 2010, **21** (1): 533–547
- [18] Hu X, Zhou Y, Zheng X, *et al.* Differentiation of menstrual blood-derived stem cells toward nucleus pulposus-like cells in a coculture system with nucleus pulposus cells. *Spine*, 2014, **39**(9): 754–760
- [19] Zhou X, Tao Y, Wang J, *et al.* Roles of FGF-2 and TGF-beta/FGF-2 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards nucleus pulposus-like phenotype. *Growth Factors*, 2014, **33**(1): 1–8
- [20] Zhou X, Tao Y, Liang C, *et al.* BMP3 alone and together with TGF- β promote the differentiation of human mesenchymal stem cells into a nucleus pulposus-like phenotype. *International Journal of Molecular Science*, 2015, **16**(9): 20344–20359
- [21] Chen J, Lee E J, Jing L, *et al.* Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) into nucleus pulposus-like cells *in vitro*. *PLoS One*, 2013, **8**(9): e75548
- [22] Liu K, Chen Z, Luo X W, *et al.* Determination of the potential of induced pluripotent stem cells to differentiate into mouse nucleus pulposus cells *in vitro*. *Genetics and Molecular Research*, 2015, **14**(4): 12394–12405
- [23] Heng J C, Feng B, Han J, *et al.* The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, 2010, **6**(2): 167–174
- [24] Hou P, Li Y, Zhang X, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 2013, **341**(6146): 651–654
- [25] Warren L, Manos P D, Ahfeldt T, *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(5): 618–630
- [26] Zhu Y, Wu X, Liang Y, *et al.* Repair of cartilage defects in osteoarthritis rats with induced pluripotent stem cell derived chondrocytes. *BMC Biotechnol*, 2016, **16**(1): 78–88
- [27] Park H Y, Noh E H, Chung H M, *et al.* Efficient generation of virus-free iPS cells using liposomal magnetofection. *PLoS One*, 2012, **7**(9): e45812
- [28] Lieu P T. Reprogramming of human fibroblasts with non-integrating RNA virus on feeder-free or xeno-free conditions. *Methods in Molecular Biology*, 2015, **1330**: 47–54
- [29] Quintanabustamante O, Segovia J C. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell from peripheral blood mononuclear cells by sendai reprogramming vectors. *Methods in Molecular Biology*, 2016, **1353**: 1–11
- [30] Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(6): 595–605
- [31] Gilchrist C L, Darling E M, Chen J, *et al.* Extracellular matrix ligand stiffness modulate immature nucleus pulposus cell-cell interactions. *PLoS One*, 2011, **6**(11): e27170
- [32] Lin Y, Yue B, Xiang H, *et al.* Survivin is expressed in degenerated nucleus pulposus cells and is involved in proliferation and the prevention of apoptosis *in vitro*. *Molecular Medicine Reports*, 2016, **13**(1): 1026–1032
- [33] Risbud M V, Schoepflin Z R, Mwale F, *et al.* Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting. *J Orthop Res*, 2015, **33**: 283–293
- [34] McCann M R, Tamplin O J, Rossant J, *et al.* Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse: implications for intervertebral disc development. *Dis Model J Mech*, 2012, **5**(1): 73–82
- [35] Maier J A, Lo Y, Harfe B D. Foxa1 and Foxa2 are required for formation of the intervertebral discs. *PLoS One*, 2013, **8**(1): e55528
- [36] Tang X, Jing L, Richardson W J, *et al.* Identifying molecular phenotype of nucleus pulposus cells in human intervertebral disc with aging and degeneration. *J Orthop Res*, 2016, **34**(8): 1316–1326

Generation and Functional Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells From Human Intervertebral Disc Nucleus Pulposus Cells*

WU Zhang-Song¹⁾, LUO Zhi-Qiang¹⁾, ZHANG Ming-Yu¹⁾, LIAN Cui-Hong²⁾,
LIN Xin-Yan¹⁾, LIANG Yu-Hong¹⁾, GU Hong-Sheng²⁾, ZHU Yan-Xia^{1)**}

¹⁾ Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

²⁾ Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract Intervertebral disc degeneration is believed to originate in the nucleus pulposus (NP) region, it is important to obtain greater numbers of active NP cells for the study and therapy of disc degenerative disease (DDD). Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) are a powerful tool for modeling human development and disease, as well as for their potential applications in regenerative medicine. We isolated NP cells from DDD patients with our improved method, and reprogramed primary NP cells into iPSCs with Sendai virus vectors encoding 4 factors. Successful reprogramming of iPSCs was verified by specific surface markers and teratoma, and differentiation of iPSCs into NP-like cells was performed in culture plate and hydrogel, with skin fibroblast derived-iPSC used as control. It was demonstrated that iPSCs derived from NP cells were featured with normal karyotype, and showed expression of pluripotency markers and were able to form teratoma in nude mice. NP induction of iPSCs resulted in their expression of NP cell specific matrix proteins and related genes. NP derived-iPSCs without induction also showed a basal level of expression of some NP-like phenotype characteristics. What's more, NP derived-iPSCs prefer to differentiate into NP-like cells in hydrogel rather than in culture plate. This is the first protocol for generation of iPSCs from NP cells of DDD patients, and we successfully differentiated this iPSCs into NP-like cells in hydrogel. This method opens a window in the treatment of DDD by using patient-specific NP cells in a relatively simple and straight forward manner.

Key words disc degenerative disease, nucleus pulposus, induced pluripotent stem cell, reprogram, differentiation
DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0160

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81301597) and Shenzhen Special Funds for the Emerging Strategic Industry Development(JCYJ20150525092940984/ JCYJ20160422090807181).

**Corresponding author.

Tel: 86-755-86671903, E-mail: yanxiazhu@szu.edu.cn

Received: April 26, 2017 Accepted: June 19, 2017