

HLA – B2704 基因型强直性脊柱炎患者来源的人诱导多能干细胞体系的建立

黄小龙¹, 全仁夫¹, 胡华辉¹, 李伟¹, 李强¹, 邱锐², 孙亚萍³, 杨迪生⁴

(1. 浙江省杭州市萧山区中医院, 浙江 杭州 311201; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 3. 浙江大学, 浙江 杭州 310058; 4. 浙江大学附属第二医院, 浙江 杭州 310009)

摘要 目的:建立人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) – B2704 基因型强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)患者来源的人诱导多能干细胞(human – induced pluripotent stem cells, hiPSCs)体系。**方法:**采用逆转录病毒介导的感染系统把 OCT4、SOX2、c – MYC、KLF4 这 4 个外源转录因子导入 HLA – B2704 基因型 AS 患者的尿液细胞中, 重编程获得 hiPSCs。通过形态观察、碱性磷酸酶染色、免疫荧光染色、内源多能性相关基因检测、体外拟胚体(embryoid bodies, EBs)分化检测、EBs 三胚层基因检测以及畸胎瘤形成实验, 鉴定获得的 hiPSCs。**结果:**病毒感染尿液细胞后第 4 天至第 5 天细胞核质比增大, 第 14 天左右出现克隆, 第 24 天后形成与人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)相似的克隆。碱性磷酸酶染色显示, hiPSCs 和 hESCs – H1 一样, 均被染成紫红色, 呈阳性。免疫荧光染色显示, hESCs 阶段特异性胚胎抗原 4 及 ESCs 转录因子 OCT4、SOX2 均呈阳性。hiPSCs 内源多能性基因 OCT4、SOX2、NANOG 和 REX1 的表达与 H1 内源多能性相关基因的表达比较, 差异均无统计学意义(1.006 ± 0.208 , 1.000 ± 0.340 , $t = 0.038$, $P = 0.972$; 1.061 ± 0.140 , 1.000 ± 0.387 , $t = 0.431$, $P = 0.689$; 1.386 ± 0.354 , 1.000 ± 0.032 , $t = 1.467$, $P = 0.303$; 1.280 ± 0.283 , 1.000 ± 0.013 , $t = 1.398$, $P = 0.235$)。EBs 高表达内胚层基因 AFP、GATA4, 中胚层基因 MEX1、TBX1, 外胚层基因 PAX6、SOX1; EBs 三胚层基因 AFP、GATA4、TBX1、MSX1、PAX6、SOX1 的相对表达量均高于 hiPSCs (60.695 ± 8.746 , 1.000 ± 0.245 , $t = 9.647$, $P = 0.011$; 3.724 ± 0.144 , 1.000 ± 0.417 , $t = 12.136$, $P = 0.007$; 4.224 ± 0.869 , 1.000 ± 0.130 , $t = 4.988$, $P = 0.038$; 684.800 ± 63.326 , 1.000 ± 0.211 , $t = 15.270$, $P = 0.004$; 131.561 ± 15.785 , 1.000 ± 0.232 , $t = 11.700$, $P = 0.007$; 98.507 ± 40.443 , 1.000 ± 0.215 , $t = 16.000$, $P = 0.004$)。hiPSC 体内形成畸胎瘤, HE 染色可见内、中、外 3 个胚层的组织细胞; 其中内胚层为小肠上皮组织细胞, 中胚层为肌肉组织细胞, 外胚层为神经上皮组织细胞。**结论:**采用逆转录病毒介导的感染系统把 OCT4、SOX2、c – MYC、KLF4 这 4 个外源转录因子导入 HLA – B2704 基因型 AS 患者的尿液细胞中, 经过重编程, 可成功建立 HLA – B2704 基因型 AS 患者来源 hiPSCs 体系。

关键词 脊柱炎, 强直性; HLA 抗原; 尿; 诱导多能干细胞

Establishment of human – induced pluripotent stem cells system originated from patients with HLA – B2704 genotypic ankylosing spondylitis

HUANG Xiaolong¹, QUAN Renfu¹, HU Huahui¹, LI Wei¹, LI Qiang¹, QIU Rui², SUN Yaping³, YANG Disheng⁴

1. Xiaoshan Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou 311201, Zhejiang, China

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

3. Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

4. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310009, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To establish the human – induced pluripotent stem cells (hiPSCs) system originated from patients with human leukocyte antigen (HLA) – B2704 genotypic ankylosing spondylitis (AS). **Methods:** Four exogenous transcription factors including OCT4, SOX2, c – MYC and KLF4 were introduced into the urinary cells (UCs) of patients with HLA – B2704 genotypic AS by using retrovirus – mediated infection system, and the infected UCs were reprogrammed for obtaining hiPSCs. The hiPSCs were identified through morphologic observation, alkaline phosphatase staining, immunofluorescence staining, endogenous multipotent related gene detection, embryoid bodies (EBs) differentiation detection, EBs triploblastic gene detection and teratoma formation experiment. **Results:** The nuclear – cytoplasmic ratio

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2014C03031)

通讯作者: 全仁夫 E-mail: quanrenfu@126.com

increased at the 4th and 5th day after UCs were infected by virus. The clone appeared at the 14th day and it was similar to human embryonic stem cells (hESCs) at the 24th day. The result of alkaline phosphatase staining showed that both hiPSCs and hESCs - H1 were presented with prunosus positive staining. The result of immunofluorescent staining showed that the stage specific embryonic antigen 4 (SSEA4) of hESCs and the transcription factor of ESCs including OCT4 and SOX2 presented with positive staining. There was no statistical difference in the expression of endogenous multipotent related gene including OCT4, SOX2, NANOG and REX1 between hiPSCs and hiPSCs - H1 (1.006 ± 0.208 vs 1.000 ± 0.340 , $t = 0.038$, $P = 0.972$; 1.061 ± 0.140 vs 1.000 ± 0.387 , $t = 0.431$, $P = 0.689$; 1.386 ± 0.354 , 1.000 ± 0.032 , $t = 1.467$, $P = 0.303$; 1.280 ± 0.283 vs 1.000 ± 0.013 , $t = 1.398$, $P = 0.235$). High expressions of endodermal genes including AFP and GATA4, mesodermal genes including MEX1 and TBX1 and ectodermal genes including PAX6 and SOX1 were found in EBs. The relative expression levels of triploblastic genes including AFP, GATA4, TBX1, MSX1, PAX6 and SOX1 were higher in EBs compared to hiPSCs (60.695 ± 8.746 vs 1.000 ± 0.245 , $t = 9.647$, $P = 0.011$; 3.724 ± 0.144 vs 1.000 ± 0.417 , $t = 12.136$, $P = 0.007$; 4.224 ± 0.869 vs 1.000 ± 0.130 , $t = 4.988$, $P = 0.038$; 684.800 ± 63.326 vs 1.000 ± 0.211 , $t = 15.270$, $P = 0.004$; 131.561 ± 15.785 vs 1.000 ± 0.232 , $t = 11.700$, $P = 0.007$; 98.507 ± 40.443 vs 1.000 ± 0.215 , $t = 16.000$, $P = 0.004$). Teratoma appeared in hiPSC. Small intestine epithelial histocytes, muscular histocytes and neuroepithelial histocytes were found respectively in endoderm, mesoderm and ectoderm of teratoma through HE staining. **Conclusion:** The hiPSCs system originated from patients with HLA - B2704 genotypic AS can be successfully established through introducing four exogenous transcription factors including OCT4, SOX2, c - MYC and KLF4 into UCs of patients with HLA - B2704 genotypic AS by using retrovirus - mediated infection system and reprogramming the UCs.

Key words spondylitis; ankylosing; HLA antigens; urine; induced pluripotent stem cells

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种慢性自身免疫性骨关节病, 发病以侵犯骶髂关节和脊柱为主, 后期可导致患者中轴关节竹节样变、畸形, 严重影响患者的生存质量^[1]。目前有关其发病机制尚不明确, 学术界一致认为遗传因素是其发病的主要因素之一。有研究已证实人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) - B27 基因与 AS 的发病有密切关系^[2]。HLA - B27 具有多态性, 不同 HLA - B27 亚型对 AS 的遗传易感性有不同的影响, 而在我国 HLA - B2704 与 AS 的关联性最强^[3]。从基因水平了解不同易感基因亚型对 AS 发病机制的研究有重要意义。

人诱导多能干细胞 (human - induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 是把特定的转录因子导入体细胞中重编程而来, 其表达与人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 的表达相似, 具有相同的基因和蛋白, 有很强的自我更新和多向分化能力。hiPSCs 的这种“返老还童”能力及其无胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 应用的伦理问题限制的优势, 使其为研究遗传疾病的机制提供了一个非常有效便捷的途径。目前已有多种疾病的特异性诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 疾病模型被建立^[4-5]。本研究采用逆转录病毒介导的感染系统, 选取经典的“OCT4 + SOX2 + KLF4 + c - MYC”4

个外源转录因子组合导入 HLA - B2704 基因型 AS 患者的尿液细胞 (urinary cells, UCs) 中, 建立 AS 患者特异性 hiPSCs 模型, 旨在为 AS 的致病机制及药物筛选提供良好的模型, 以期今后更好地指导 AS 的临床治疗。

1 材料和仪器

1.1 实验标本和动物 AS 患者外周血液 5 mL 和尿液 200 mL (来源于浙江省杭州市萧山区中医院的住院患者); 4 ~ 6 周非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷 (nonobese diabetes/severe combined immunodeficiency, NOD/SCID) 雄性小鼠 (上海斯莱克实验动物有限责任公司)。实验方案经医院伦理委员会审查通过。

1.2 实验质粒和细胞 pMX - hu - SOX2、pMX - hu - OCT4、pMX - hu - c - MYC、pMX - hu - KLF4、pMX - GFP、PCL - ECO 包装质粒, hESCs 细胞系 H1, 293T 细胞 (均由浙江大学严庆丰教授惠赠)。

1.3 实验试剂和仪器 胎牛血清、dulbecco 改良 eagle 培养基 (dulbecco modified eagle medium, DMEM)/F12、明胶 (Gibco 公司), Matrigel、StemLight™ Pluripotency Antibody Kit (Merck Millipore 公司), mTeSR1 培养基 (stem cell 公司), 肾上皮细胞培养基 (renal epithelial cell growth medium, REGM) (Lonza 公司), Accutase 酶、Dispease 分散酶 (Sigma 公司), Real - Time Quality PCR Kit、RNA 反转录 RNAiso Reagent Kit、

Universal Genomic DNA Extraction Kit、2xPCR Mix (Takala 公司), 1300-A2 型生物安全柜、3100 型二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技公司), 倒置荧光显微镜(尼康公司), 离心机、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (Eppendorf 公司), 凝胶成像仪、酶标仪(厦门宝特科技公司), 电泳仪(安玛西亚中国有限公司)。

2 方法

2.1 培养基的配制 UCs 培养基: 50% 成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEF) 培养基 + 50% REGM; 拟胚体 (embryoid bodies, EBs) 培养基: DMEM/F12 + 20% 血清替代物 + 1% 非必须氨基酸 + 1% GlutaMaX + 10 $\mu\text{mol } \beta$ -巯基乙醇。

2.2 HLA-B2704 基因的测定 按外周血 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, RT-PCR 扩增目的基因 HLA-B27, 上游引物 (F) 为 GGTC CAAG ACGA GGAG GTTC, 下游引物 (R) 为 CGTG GGAC AGGA GGAA TTAG。凝胶电泳确定条带, 即 HLA-B27 阳性, 通过对 PCR 产物测序明确 HLA-B27 的亚型(杭州擎科生物技术有限公司)。

2.3 hiPSCs 的诱导

2.3.1 饲养层细胞的制备 取 13.5 d 的孕鼠胚胎(前期实验制备冻存), 消化分离培养获得小鼠胚胎 MEF, 取第 3 代 MEF, 用丝裂霉素 C 处理完成饲养层细胞制备, 分装、液氮冻存备用。

2.3.2 UCs 的获取 将 AS 患者尿液平均分装到 50 mL 的离心管中, 室温下用离心机离心 10 min (转速 1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径 18 cm); 吸弃上清, 用含双抗的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗 2 遍; UCs 培养基重悬沉淀后, 将细胞接种于 6 孔板的一个孔中, 注意接种前预先铺被 0.1% 的明胶; 将其置于细胞培养箱中培养 3 d 后换液, 然后隔天换液, 6~10 d 左右会有克隆长出, 待长到合适密度, 用 0.25% 胰酶消化传代、冻存备用。

2.3.3 hiPSCs 的克隆 分别将 pMX-hu-SOX2、pMX-hu-OCT4、pMX-hu-KLF4 和 pMX-hu-c-MYC 这 4 种病毒用 PCL-ECO 质粒包装好后, 通过磷酸钙转染的方式将其转入 293T 细胞内; 收集 48 h 和 72 h 的病毒上清, 用 0.45 μm 滤膜过滤后, 将 4 种病毒液按 1:1:1:1 比例混合后感染 UCs, 并加入终浓度为 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚凝胺提高感染效率, 每次感染 12 h 后换成 UCs 培养基培养; 感染后第 4 天至第 5 天细胞出现聚集、核质比增大等变化时, 消化细胞, 取 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个细胞传到饲养层细胞上培养, 然后换 mTesR1 培养基培养, 每天换液, 直至克隆开始出现。

2.4 hiPSCs 的鉴定

2.4.1 碱性磷酸酶染色 吸出细胞培养液, 用 PBS 洗 2~3 遍, 4% 多聚甲醛固定 1~2 min; 吸出固定液, 用 PBS 洗 2 遍, 再用 Tris Buffered Saline with Tween-20 缓冲液洗 2 遍; 加入足量的染色剂使染液充分覆盖孔底, 室温避光孵育 15~20 min; 吸弃染色液, 用 PBS 洗 1 遍, 显微镜下观察、拍照。

2.4.2 免疫荧光染色 细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗 3 遍; 0.2% Triton-X100 室温通透 30 min, PBS 洗 3 遍; 3% BSA 室温封闭 1~2 h 后, 加一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS 洗 3 遍; 加二抗, 室温避光孵育 1~2 h; 加入终浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚, 室温避光放置 5 min; 封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

2.4.3 hiPSCs 内源多能性相关基因检测 采用 Trizol 法提取总 RNA, 酶标仪测 RNA 的 OD 值; 用 TaKaRa 反转录试剂盒将 1 μg 的 RNA 逆转录为 cDNA, 按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Kit 说明书操作, PCR 扩增目的基因, 其中引物序列见表 1; 以 GAPDH 为内参基因, 并采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组间的基因表达差异 (Ct 值为每个反应管内的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数)。

表 1 人诱导多能干细胞内源多能性相关基因引物

| 基因 | 上游引物 | 下游引物 |
|-------|----------------------|-----------------------|
| OCT4 | CCTCACTTCACTGCACTGTA | CAGGTTTTCTTCCCTAGCT |
| SOX2 | CCCAGCAGACTTCACATGT | CCTCCCATTTCCCTCGTTTT |
| NANOG | TGAACCTCAGCTACAAACAG | TGCTGCTAGGAAGAGCTAAAG |
| REX1 | TCGCTGAGCTGAAACAAATG | TCGCTGAGCTGAAACAAATG |
| GAPDH | ATTGCCCTCAACGACCACT | ATGAGGTCCACCACCCTGT |

2.4.4 EBs 分化及其三胚层基因检测 hiPSCs 在 6 孔培养板中长至 90% 时,用 dispase 酶消化法消化细胞,DMEM/F12 洗 1 遍;加入 EBs 培养基,用机械法呈“井”字形刮下细胞,将其转移至低黏附培养瓶中悬浮培养;补充培养液至 5 mL,在 37 ℃ 条件下将其置入

5% 的 CO₂ 培养箱中培养,每天换液;7 d 后将其接种至铺有明胶的培养板上,使其贴壁生长,培养基不变,每 2 d 换液;细胞在培养板中长满时收集细胞,采用 Trizol 法提取总 RNA,实时荧光定量 PCR 检测 EBs 内、中、外 3 个胚层基因的表达,EBs 三胚层基因引物见表 2。

表 2 拟胚体三胚层基因引物

| 基因 | 上游引物 | 下游引物 |
|-------|----------------------|----------------------|
| AFP | ATTGGCAAAGCGAAGCTG | GCTGTGGCTGCCATTTTT |
| GATA4 | CAGAAAACGGAAGCCCAA | TTGCTGGAGTTGCTGGAAG |
| TBX1 | AGCGAGAAATATGCCGAGG | TTCCGGAAGGGATTGCT |
| MSX1 | CTCCGCAAACACAAGACGAA | GTAGTCTCTTTGCCTTGGCG |
| PAX6 | TTGCTTGGGAAATCCGAG | TGCCCGTTCAACATCCTT |
| SOX1 | TTTCCCCTCGCTTTCTCA | TGCAGGCTGAATTCCGTT |

2.4.5 畸胎瘤形成实验 待 hiPSCs 在一个直径 10 cm 的细胞培养盘里长满后用 Accutase 酶将其消化下来,收集到 1.5 mL 的离心管中;用 DMEM/F12 稀释的 Matrigel (Matrigel: DMEM/F12 = 1:2) 重悬,不少于 300 μL;加入 10 μL 的 Y37632 后,用 1 mL 注射器将其注入到 NOD/SCID 小鼠后腿的肌肉中;移植 8 ~ 10 周后,颈椎脱臼处死小鼠,取出肿瘤,石蜡包埋,做组织切片,HE 染色观察。

2.5 数据统计学分析 采用 SPSS18.0 统计软件对所得数据进行统计学分析,hiPSCs 内源多能性相关基因表达与 H1 内源多能性相关基因表达的比较以及 hiPSCs 分化前后三胚层基因相对表达量的比较均采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 AS 患者 HLA - B27 基因及其基因亚型鉴定结果 以 AS 患者 blood - cDNA 和 iPSC - cDNA 为模板,凝胶成像仪下可见清晰条带,且大小一致;以正常

人 Ctrl - iPSC 和 ESC - H1 细胞 cDNA 作为阴性对照,凝胶成像仪下未见条带(图 1)。AS 患者 cDNA 的 PCR 产物测序显示,AS 患者为 HLA - B2704 基因型。

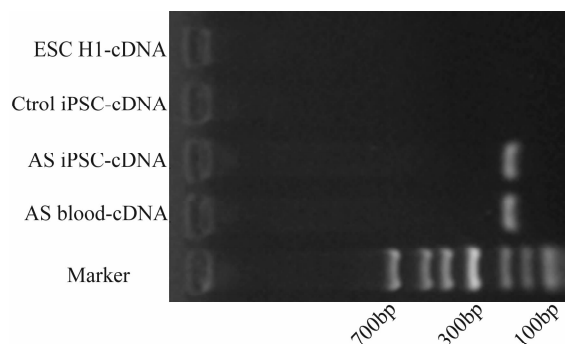
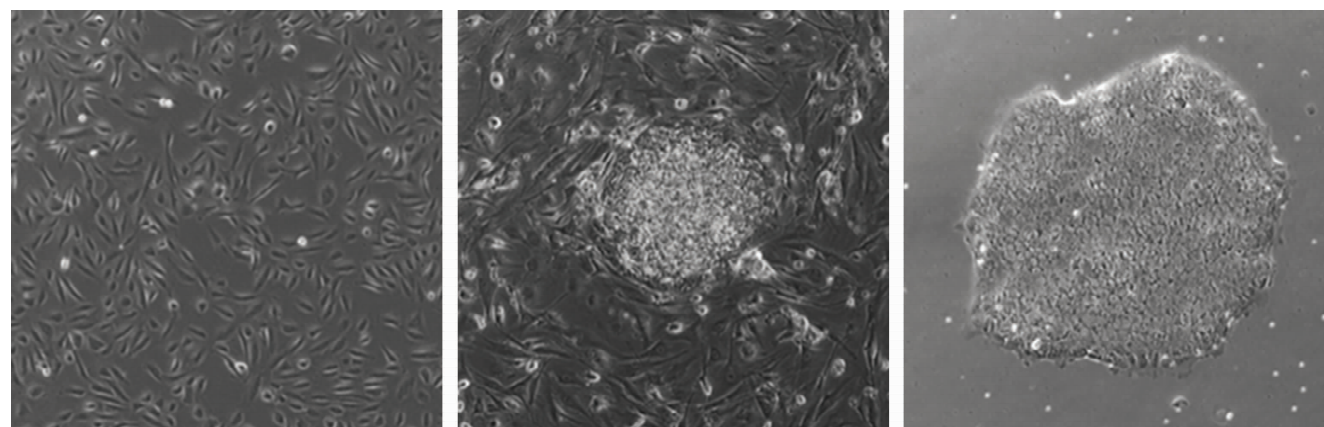


图 1 人类白细胞抗原 B27 基因凝胶成像图

3.2 hiPSCs 克隆形成的观察结果 病毒感染 UCs 后第 4 天至第 5 天细胞核质比增大[图 2(1)],第 14 天左右出现克隆[图 2(2)],第 24 天后形成与 hESCs 相似的克隆[图 2(3)]。



(1)病毒感染尿液细胞

(2)饲养层上形成的人诱导多能干细胞克隆

(3)Matrigel上生长的人诱导多能干细胞克隆

图 2 人诱导多能干细胞克隆(×100)

3.3 hiPSCs 的鉴定结果

3.3.1 碱性磷酸酶染色结果 hiPSCs 和 hESCs - H1 一样, 均被染成紫红色, 呈阳性。见图 3。

3.3.2 免疫荧光染色结果 hESCs 阶段特异性胚胎抗原 4 (stage specific embryonic antigen 4, SSEA4) 及 ESCs 转录因子 OCT4、SOX2 均呈阳性(图 4)。

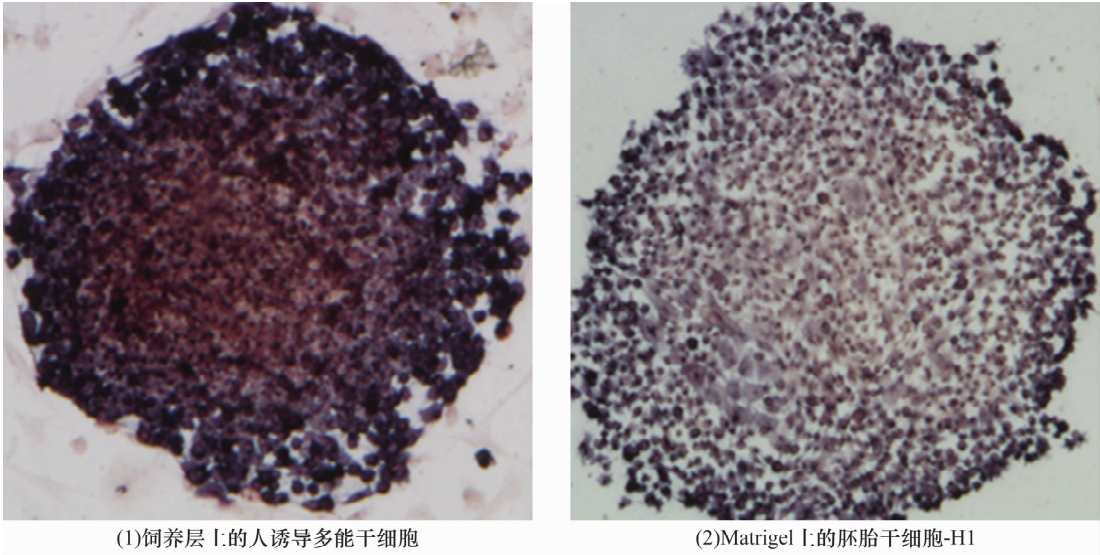


图 3 人诱导多能干细胞和胚胎干细胞 - H1 碱性磷酸酶染色结果 (× 100)

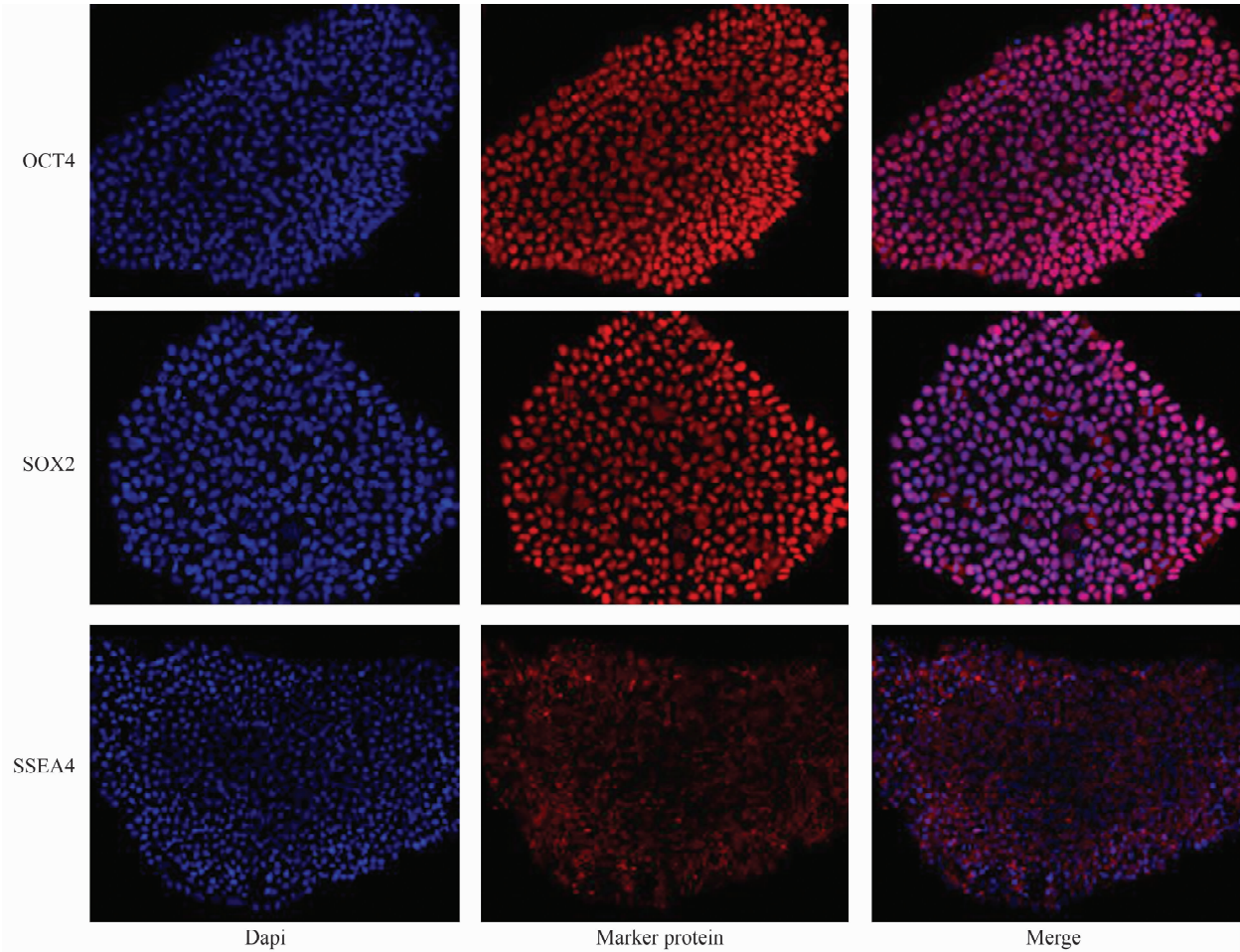


图 4 人诱导多能干细胞免疫荧光染色结果 (× 200)

Dapi 为细胞核, Marker protein 为标志蛋白, Merge 为 Dapi 和 Marker protein 图层的合并

3.3.3 hiPSCs 内源多能性相关基因表达量检测结果

hiPSCs 内源多能性基因 OCT4、SOX2、NANOG 和

REX1 的表达与 H1 内源多能性相关基因的表达比较,差异均无统计学意义(表 3)。

表 3 hiPSCs 内源多能性相关基因表达与 H1 内源多能性相关基因表达的比较 $\bar{x} \pm s$

| 组别 | OCT4 | SOX2 | NANOG | REX1 |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| H1 ¹⁾ | 1.000 ± 0.340 | 1.000 ± 0.387 | 1.000 ± 0.032 | 1.000 ± 0.013 |
| hiPSCs ²⁾ | 1.006 ± 0.208 | 1.061 ± 0.140 | 1.386 ± 0.354 | 1.280 ± 0.283 |
| <i>t</i> 值 | 0.038 | 0.431 | 1.467 | 1.398 |
| <i>P</i> 值 | 0.972 | 0.689 | 0.303 | 0.235 |

1) 人诱导多能干细胞细胞系 H1; 2) 人诱导多能干细胞

3.3.4 EBs 分化及三胚层基因相对表达量检测结果
体外 hiPSCs 悬浮培养形成 EBs 球, EBs 贴壁后分化成形态各异的细胞(图 5)。EBs 高表达内胚层基因 AFP、GATA4, 中胚层基因 MEX1、TBX1, 外胚层基因 PAX6、SOX1; EBs 三胚层基因 AFP、GATA4、TBX1、MSX1、PAX6 和 SOX1 的相对表达量均高于 hiPSCs(表 4)。

3.3.5 畸胎瘤染色结果 hiPSC 体内形成畸胎瘤, HE 染色可见内、中、外 3 个胚层的组织细胞; 其中内胚层为小肠上皮组织细胞[图 6(1)], 中胚层为肌肉组织细胞[图 6(2)], 外胚层为神经上皮组织细胞[图 6(3)]。

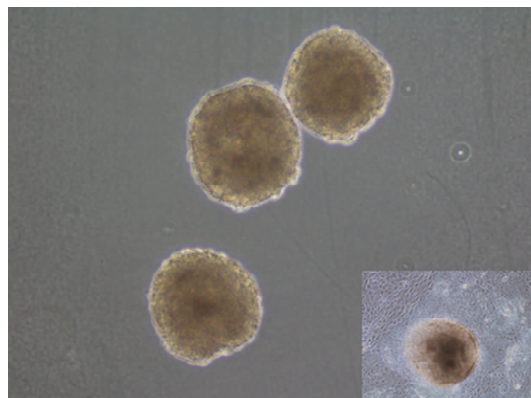


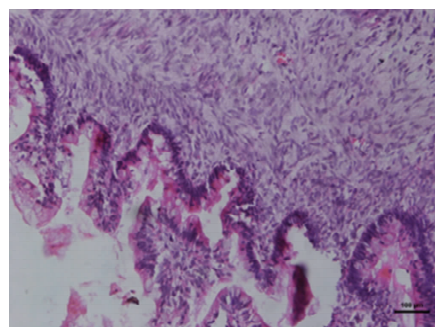
图 5 拟胚体分化情况 (×100)

图片右下角显示拟胚体贴壁第 7 天分化情况

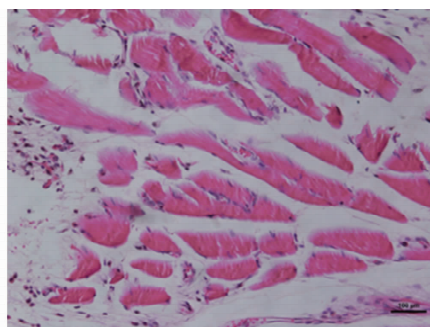
表 4 hiPSCs 分化前后三胚层基因相对表达量比较 $\bar{x} \pm s$

| 组别 | AFP | GATA4 | TBX1 | MSX1 | PAX6 | SOX1 |
|----------------------|----------------|---------------|---------------|------------------|------------------|-----------------|
| hiPSCs ¹⁾ | 1.000 ± 0.245 | 1.000 ± 0.417 | 1.000 ± 0.130 | 1.000 ± 0.211 | 1.000 ± 0.232 | 1.000 ± 0.215 |
| EBs ²⁾ | 60.695 ± 8.746 | 3.724 ± 0.144 | 4.224 ± 0.869 | 684.800 ± 63.326 | 131.561 ± 15.785 | 98.507 ± 40.443 |
| <i>t</i> 值 | 9.647 | 12.136 | 4.988 | 15.270 | 11.700 | 16.000 |
| <i>P</i> 值 | 0.011 | 0.007 | 0.038 | 0.004 | 0.007 | 0.004 |

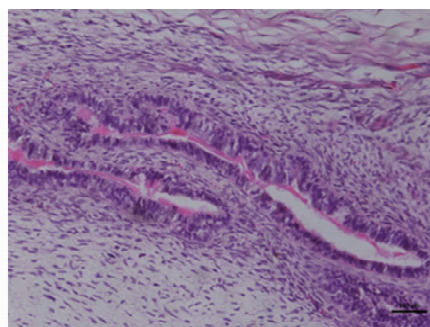
1) 人诱导多能干细胞; 2) 体外拟胚体



(1) 内胚层



(2) 中胚层



(3) 外胚层

图 6 畸胎瘤 HE 染色结果 (×100)

4 讨 论

AS 是一种遗传因素为主的多基因复杂的慢性自身免疫性疾病^[6]。在我国有超过 400 万人患有 AS, 目前有关其发病机制尚未明确。学术界广泛认为该病是遗传因素和环境因素相互作用的结果, 尤其是遗传因素, 可以确定与该病有着密切关系, 其对 AS 的易

感率超过 90%^[7]。有研究提示 AS 是一种具有高度遗传倾向的复杂的多基因遗传疾病^[8]。1973 年, Brewerton 等人首次发现 HLA - B27 与 AS 的发生有着密切的关系, 之后随着全基因组关联研究的深入, 越来越多与 AS 相关的非主要组织相容性复合体遗传易感基因被发现, 如白细胞介素 23^[9]、内质网氨基酸

酶 1^[10]、转录信号转导子与激活因子 3^[11] 等。但 HLA - B27 是迄今为止发现的与 AS 关联性最强的基因,在 AS 患者中 HLA - B27 阳性患者超过 90%^[12]。HLA - B27 是人类 6 号染色体短臂上 MHC - I 类分子 B 位点上的等位基因,全长约 3.4 kb,由 7 个内含子和 8 个外显子组成。HLA - B27 基因具有多态性,截止目前为止,已有 159 个 B27 亚型被发现,包括 B2701 ~ B2721、B2723 ~ B27160。B27 基因亚型人群分布存在地域差异,B2702 多见于地中海人群,B2706 存在于东南亚人群,B2705 多见于白种人和美洲印第安人,而在我国,以 B2704 最为常见。在这些亚型当中,与 AS 发病相关的基因亚型有 B2702、B2703、B2704、B2705、B2706、B2707、B2708、B2710、B2714、B2715 和 B2719,其中 B2704 是与 AS 关联性最强的亚型。

2006 年,日本京都大学山中伸弥教授首次把 OCT4、SOX2、KLF4、c - MYC 4 个转录因子导入小鼠的 MEF 中,得到了具有与胚胎干细胞类似生物学特性的克隆团样细胞,把它称之为 iPSCs^[13]。iPSCs 是从已分化或分化成熟的体细胞诱导而来,可以把分化成熟的终末细胞变回到最初具有强大自我更新和分化潜能的状态,并且可以保留原来重编程细胞基因组的完整性,这使其在细胞替代治疗、药物筛选和疾病机制研究上有广泛的应用前景。因 iPSCs 的表达与 ESCs 具有相同的基因和蛋白有很强的自我更新和多向分化能力,因此鉴定 iPSCs 可以参照 ESCs 的鉴定标准。ESCs 具有较高的碱性磷酸酶活性,可以表达 ESCs 特异性蛋白,在体内外均具有多向的分化能力等,而鉴定 iPSCs 诱导成功的关键是在动物体内可以形成畸胎瘤。故而本研究采用碱性磷酸酶染色法、免疫荧光染色法、检测 hiPSCs 内源多能性相关基因、检测 EBs 三胚层基因和畸胎瘤实验来鉴定 hiPSCs。本实验结果显示,hiPSCs 经碱性磷酸酶染色后,与 ESCs - H1 一样,均被染成紫红色,呈阳性,这说明诱导获得的 hiPSCs 同 ESCs 一样具有高的碱性磷酸酶活性;hESCs SSEA4 及 ESCs 转录因子 OCT4、SOX2 均呈阳性,说明 hiPSCs 表达与 ESCs 表达相同。hiPSCs 内源多能性基因 OCT4、SOX2、NANOG 和 REX1 的表达与 H1 比较,差异均无统计学意义,说明 hiPSCs 可以表达与胚胎干细胞相似的特异多能性基因;EBs 三胚层基因 AFP、GATA4、TBX1、MSX1、PAX6 和 SOX1 的相对表

达量均高于 hiPSCs,表明 hiPSCs 在体外具有多向分化能力;畸胎瘤染色结果也表明,hiPSCs 在体内有多潜能的分化能力。

hiPSCs^[14]、不同组织来源的重编程细胞^[15]、不同的诱导方式^[16-17]、不同因子的组合^[18] 这样一个“鸡尾酒”的诱导方式均可以建立起 iPSCs 体系^[19]。本研究采用“磷酸钙转染 + 逆转录病毒 + ‘OSKM’ + UCs”的组合建立了 AS 患者来源 hiPSCs 体系。磷酸钙转染是利用细胞内吞作用将形成的磷酸钙 - DNA 复合体导入细胞内的一种转染方法,相对于其他转染方法,具有成本低、获取方便的优点;逆转录病毒属于 RNA 病毒,它可以将外源基因整合到细胞基因组 DNA 中,永久稳定的表达,效率高;“OSKM”四因子组合是 Yamanaka 最初从上百个转录因子中选取的 4 个因子,虽然现在有各种因子的组合方式可以成功诱导出 iPSCs,但四因子组合是最经典的也是应用最成熟的诱导 iPSCs 的方式,其诱导成功率也相对较高。2011 年,中国科学院广州生物医药与健康研究院成功将人的 UCs 诱导成 hiPSCs^[20]。UCs 相对于其他细胞具有获取方便、样本可重复收取、获取无创等优点;此外,UCs 还具有一定的体外扩增能力且培养条件也相对简单。

本研究结果显示,采用逆转录病毒介导的感染系统把 OCT4、SOX2、c - MYC、KLF4 这 4 个外源转录因子导入 HLA - B2704 基因型 AS 患者的尿液细胞中,经过重编程,可成功建立 HLA - B2704 基因型 AS 患者来源 hiPSCs 体系。这将为 AS 的发病机制研究及药物筛选建立可行的细胞模型。

5 参考文献

- [1] SIEPER J, BRAUN J, KAY J, et al. Sarilumab for the treatment of ankylosing spondylitis: results of a Phase II, randomised, double - blind, placebo - controlled study (ALIGN) [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(6): 1051 - 1057.
- [2] OMAIR MA, ALDURAIBI FK, BEDAIWI MK, et al. Prevalence of HLA - B27 in the general population and in patients with axial spondyloarthritis in Saudi Arabia [J]. Clinical Rheumatology, 2017, 36(7): 1537 - 1543.
- [3] 白世杰, 托娅, 张宝平, 等. 强直性脊柱炎及其相关基因 HLA - B27 检验的研究现状 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(3): 2016 - 210.
- [4] KOUJI Y, KIDO T, ITO T, et al. An in vitro human liver model by iPSC - Derived parenchymal and non - parenchy-

- mal cells[J]. Stem Cell Reports, 2017, 9(2): 490–498.
- [5] MARCATILI M, MARSONER F, DAGOSTINO AA, et al. Establishment of an induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a patient with Clozapine – responder Schizophrenia[J]. Stem Cell Res, 2016, 17(3): 630–633.
- [6] BROWN MA, KENNA T, WORDSWORTH BP. Genetics of ankylosing spondylitis – insights into pathogenesis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(2): 81–91.
- [7] TAM LS, GU J, YU D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(7): 399–405.
- [8] BROWN MA, LAVAL SH, BROPHY S, et al. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis[J]. Ann Rheum Dis, 2000, 59(11): 883–886.
- [9] KRAGSTRUP TW, ANDERSEN MN, SCHITZCHRISTENSEN B, et al. Increased IL – 20 and IL – 24 target osteoblasts and synovial monocytes in spondyloarthritis[J]. Clin Exp Immunol, 2017, 189(3): 342–351.
- [10] TAKEUCHI M, OMBRELLO MJ, KIRINO Y, et al. A single endoplasmic reticulum aminopeptidase – 1 protein allotype is a strong risk factor for Behçet's disease in HLA – B(*star)51 carriers[J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(12): 2208–2211.
- [11] CHEN C, ZHANG X, WANG Y. Analysis of JAK2 and STAT3 polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis in Chinese Han population[J]. Clinical Immunology, 2010, 136(3): 442–446.
- [12] AKKOC N, YARKAN H, KENAR G. Ankylosing spondylitis: HLA – B*27 – positive versus HLA – B*27 – negative disease[J]. Curr Rheumatol Rep, 2017, 19(5): 322–328.
- [13] 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.
- [14] YU JY, VODYANIK MA, SMUGA – OTTO KA, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858): 1917–1920.
- [15] AASEN T, RAYA A, BARRERO MJ, et al. Efficient and rapid Generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(11): 1276–1284.
- [16] STADTFELD M, NAGAYA M, UTIKAL J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration[J]. Science, 2008, 322(593): 945–949.
- [17] HWANG GH, PARK SM, HAN HJ, et al. Purification of small molecule – induced cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells using a reporter system[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(12): 3384–3395.
- [18] SHI Y, DO JT, DESPONTIS C, et al. A combined chemical and genetic approach for the Generation of induced pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(6): 525–528.
- [19] LIAO J, WU Z, WANG Y, et al. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors[J]. Cell Res, 2008, 18(5): 600–603.
- [20] ZHOU T, BENDA C, DUNZINGER S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples[J]. Nat Protoc, 2012, 7(12): 2080–2089.

(2017-08-11 收稿 2017-09-26 修回)

(上接第 10 页)

- [25] 朱孝芹, 孙大勇. 改善疾病的骨关节炎治疗药物研究进展[J]. 承德医学院学报, 2010, 27(4): 421–424.
- [26] 郭倩, 田成旺, 任涛, 等. 中药药效物质基础研究进展[J]. 世界科学技术 – 中医药现代化, 2015, 17(3): 648–654.
- [27] 徐筱杰. 中药复方的计算机模拟研究[J]. 化学进展, 1999, 19(2): 202–203.
- [28] 许海玉, 黄璐琦, 卢鹏, 等. 基于体内 ADME 过程和网络药理学的中药现代研究思路[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 142–145.
- [29] 柯志鹏, 张新庄, 丁玥, 等. 利用网络药理学方法研究芪桂痛风片的药效物质基础与分子作用机制[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2837–2842.
- [30] LI L, ZHANG XH, LIU GR, et al. Isoquercitrin suppresses the expression of histamine and pro – inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF – κ B in human KU812 cells[J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(6): 407–412.
- [31] HO JN, LEE YH, LEE YD, et al. Inhibitory effect of Aucubin isolated from Eucommia ulmoides against UVB – induced matrix metalloproteinase – 1 production in human skin fibroblasts[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(11): 2227–2231.
- [32] 徐炎, 李学军. 多靶点药物治疗及药物发现[J]. 药学报, 2009, 44(3): 226–230.
- [33] 郑春松, 林珠灿, 许惠风, 等. 透骨消痛胶囊治疗骨性关节炎的多向药理学研究[J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(1): 43–47.
- [34] 刘献祥, 李西海, 周江涛. 改良 Hulth 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(12): 1104–1108.

(2017-07-02 收稿 2017-11-01 修回)