

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.01.021

## 两种重编程系统诱导人牙源性多潜能干细胞的对比研究\*

谭小兵<sup>1</sup>, 徐静舒<sup>1</sup>, 孙贵虎<sup>2</sup>, 宋俊呈<sup>2</sup>, 戴青原<sup>2△</sup>

(1. 云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院口腔内科, 昆明 650032;

2. 昆明医科大学第一附属医院心内科, 昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 对比研究两种人牙源性多潜能干细胞重编程体系的特点。**方法** 分别利用 STEMCCA 慢病毒/饲养层和仙台病毒/基质胶两种重编程系统, 将人根尖乳头干细胞重编程为 iPS 细胞, 比较两种方法的诱导效率、诱导工作量、iPS 细胞非整倍体核型比例、外源性基因消除难易程度等情况。**结果** STEMCCA 重编程体系需要制备饲养层细胞 MEF, 重编程效率约为 0.1%, 后期经 Cre-Loxp 酶切技术可得到无外源性转录基因的 iPS 细胞。仙台病毒重编程体系为无饲养层培养, 基质胶制备方便、标准统一, 重编程效率约为 0.7%, 明显高于 STEMCCA 系统 ( $P < 0.05$ ), 外源性病毒和转录基因经自然传代后逐渐消除。**结论** 与 STEMCCA 系统相比, 仙台病毒/基质胶体系更适于人牙源性 iPS 细胞的诱导。

**[关键词]** 多潜能干细胞; 乳头; 干细胞; 慢病毒属; 人诱导性多潜能干细胞; 根尖乳头干细胞; 重编程; 仙台病毒

**[中图分类号]** R781

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)01-0091-03

### A comparative study of two reprogramming systems for inducing pluripotent stem cells from human dental origin\*

Tan Xiaobing<sup>1</sup>, Xu Jingshu<sup>1</sup>, Sun Guihu<sup>2</sup>, Song Juncheng<sup>2</sup>, Dai Qingyuan<sup>2△</sup>

(1. Department of Cariology and Endodontics, Yunnan Provincial First People's Hospital/Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To comparatively study the features of two reprogramming systems of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from human dental origin. **Methods** Two kinds of reprogramming system, i. e. STEMCCA lentivirus /feed layer and Sendai virus /matrigel were used to induce human stem cells from apical papilla(SCAP) into iPSCs, respectively. The induction efficiencies, workload of generating iPSCs, aneuploidy karyotype ratio, complexities of eliminating exogenous transcription factors and specific markers expression were compared between these two systems. **Results** The STEMCCA reprogramming system required to prepare the feeder cell MEF. The reprogramming efficiency was 0.1%. Transcription gene-free iPSCs cells were obtained by the Cre-loxp enzyme digestion technique at the later stage. Sendai virus reprogramming system was feeder-free and the preparation of matrigel was quite simple with unified standard. The reprogramming efficiency was 0.7%, which was much higher than that of STEMCCA system ( $P < 0.05$ ). The exogenous virus and transgenes could be gradually eliminated after several passages of natural subclone. **Conclusion** The Sendai virus/matrigel reprogramming system is much more applicable for the induction of iPSCs from dental origin than the STEMCCA system.

**[Key words]** pluripotent stem cells; nipples; stem cells; lentivirus; human induced pluripotent stem cells; stem cells from apical papilla; reprogramming; sendai virus

自从 2007 年首次报道人多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)以来,人们已成功将多种终末分化体细胞重编程为 iPS 细胞<sup>[1-5]</sup>。iPS 细胞能分化为所有三胚层细胞,在组织再生、疾病模型、个性化治疗等方面具有巨大的应用前景。由于诱导 iPS 细胞时会利用外源性转录因子和载体,有可能在宿主体内形成肿瘤,成为制约 iPS 细胞应用于组织再生的一个瓶颈。目前有多种方法可以用来诱导体细胞重编程为 iPS 细胞,也有学者使用非染色体结合性诱导方法以降低外源性转录基因插入宿主染色体而致瘤的风险,包括质粒、cre-loxp 酶切除、蛋白转运技术等<sup>[6-9]</sup>。饲养层的选择也是 iPS 细胞必须考虑的一个安全性问题。本研究采用两种重编程体系,即

STEMCCA 慢病毒+小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)和仙台病毒+基质胶,将人根尖乳头干细胞(stem cells from apical papilla, SCAP)诱导为 iPS 细胞,从多方面比较两种方法,为建立安全有效的 iPS 细胞及进一步研究提供实验数据和指导。

### 1 材料与方法

**1.1 材料**  $\alpha$ -MEM 培养基, DMEM 培养基, DMEM-F12 培养基,血清替代品, 2.5 g/L 胰蛋白酶, 0.25 mmol/L 二乙胺四乙酸(EDTA), 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)均购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;70  $\mu$ m 细胞过滤网、基质胶(生长因子减少型)购自美国 BD 公司;总 RNA 提取

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360161);云南省教育厅基金资助项目(2015Y153)。 作者简介:谭小兵(1974-),副主任医师,硕士,主要从事干细胞在牙髓再生方面研究。  $\Delta$  通信作者, E-mail: dqy0823@163.com。

试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; c-DNA 合成试剂盒、iTaQ DNA 聚合酶、dNTP 混合物购自美国 BIO-RAD 公司; STEM-CCA Lentivirus Reprogramming Kits 试剂盒购自美国 Millipore 公司; Hela Monster transfection reagent 试剂盒购自美国 Mirus 公司; CytoTune iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit 试剂盒购自美国 Life 公司, 重编程培养基、PSC-easy 培养基购自北京赛贝生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 人 SCAP 原代分离 收集云南省第一人民医院口腔颌面外科因阻生需要拔除的下颌第三磨牙 (<20 岁), 按照 Sonoyama 等<sup>[10]</sup> 方法进行细胞培养。

1.2.2 MEF 的制备 按照本课题组之前研究方法进行制备<sup>[11]</sup>。

1.2.3 主要培养基组成 (1)MEF 培养基: DMEM+10% 胎牛血清+1%L-谷氨酰胺+1%青/链霉素+1%非必需氨基酸; (2)SCAP 培养基:  $\alpha$ -MEM+10%胎牛血清+1%L-谷氨酰胺+1%青/链霉素; (3)iPS 培养基(用于 H9 和 iPS 细胞的培养): DMEM-F12+20%血清替代品+1%非必需氨基酸+1%L-谷氨酰胺+0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇+4 ng/mL bFGF。

1.2.4 两种重编程体系

1.2.4.1 方法 1 STEMCCA 慢病毒体系参照本课题组方法进行<sup>[12]</sup>; 转染前一天人 SCAP 细胞铺板, 当天细胞 50% 融合, 加入适量 STEMCCA 慢病毒和聚凝胺 (5  $\mu$ g/mL) 混合物进行转染, 24 h 后换为 MEF 培养液。第 4 天收集已转染细胞, 转移到 MEF 覆盖的培养板上。第 2 天换为 iPS 培养基, 隔日换液, 两周内可观察到小克隆出现。克隆成熟时, “十字法” 分离克隆, 转移到新培养板内 (MEF 覆盖) 继续培养, 每日换液。切除转录基因: 挑选第 2 代克隆, 转移到抗嘌呤霉素 MEF 上培养。细胞 60% 融合时, 将培养液换为加有 2.5  $\mu$ g pHAGE2-Cre-IRES-PuroR 质粒 DNA, 7.5  $\mu$ L Trans IT Hela 试剂, 5.0  $\mu$ L MONSTER 试剂的 iPS 培养基, 24 h 后换为 iPS 培养基再处理 6 h, 接着用含有嘌呤霉素 (1.2  $\mu$ g/mL) iPS 培养基处理细胞, 48 h 后再换为 iPS 培养基。所有克隆开始会慢慢死去, 2~4 d 后克隆重新出现, 逐渐长大后 “十字法” 分离挑选, 转移到新的培养板内 (MEF 覆盖) 正常培养。提取细胞克隆的基因组 DNA, PCR 扩增目的片段、凝胶电泳, 明确外源性 hSTEMCCA 是否已无表达。STEMCCA 慢病毒重编程及切除过程见图 1。

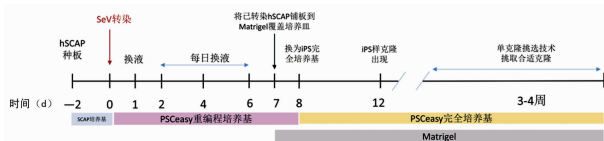


图 1 STEMCCA 慢病毒重编程、基因切除简图

1.2.4.2 方法 2 仙台病毒诱导体系: 转染前两天, 将第 3 代人 SCAP 铺到 6 孔板内 (1 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔), 常规培养。转染当天 (第 0 天), 将适量 SeV 溶解到 70  $\mu$ L SCAP 培养基内开始转染, 1 天后 (第 1 天) 再加入 130  $\mu$ L SCAP 培养基, 第 2 天换新鲜含 SeV 培养液继续转染。第 3 天将已转染细胞转移到基质胶覆盖 6 孔板内, 重编程培养基继续培养, 3 周左右可观察到克隆出现。克隆成熟时, “十字法” 分割克隆, 转移到新培养板内 (基质胶覆盖), PSC-easy 培养基 (含 10  $\mu$ mol/L Y27632) 继续培

养。提取第 0、10 及 14 代 iPS 克隆总 RNA, 逆转录为 cDNA, PCR 扩增目的片段、凝胶电泳, 明确外源性病毒序列和转录基因是否已消除。仙台病毒重编程过程见图 2。

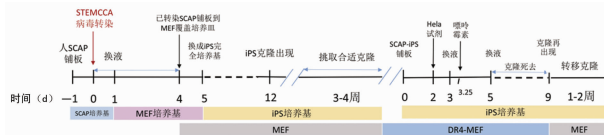


图 2 仙台病毒重编程过程简图

1.2.5 两种重编程系统的比较

1.2.5.1 iPS 细胞克隆形态 观察 iPS 克隆在不同体系底物上的生长情况 (人胚胎干细胞 H9 为标准对照)。

1.2.5.2 重编程效率 确定精确的重编程效率非常复杂, 出现克隆数占重编程体细胞数量的比例是一个重要参数。计算公式: 重编程效率 = 克隆数/体细胞数量  $\times$  100%, 重复 3 次, 取平均值。

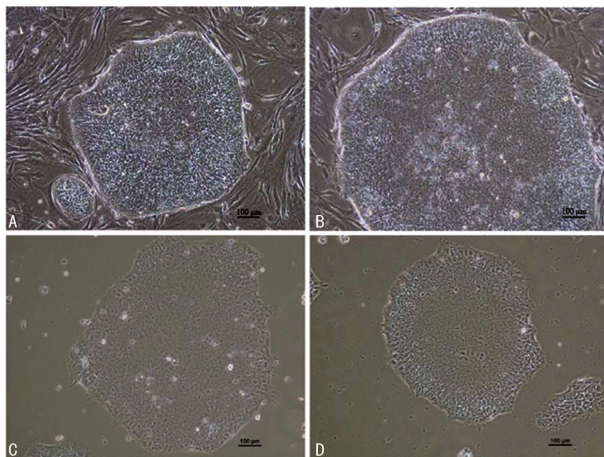
1.2.5.3 重编程时间 包括准备时间 (培养基、饲养层细胞的制备), 从目标细胞铺板到 iPS 克隆可以挑取所需时间。重复 3 次, 取平均值。

1.2.5.4 外源性基因消除 比较两种方法得到的 iPS 细胞外源性重编程基因消除的时间和复杂程度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料用率表示, 组间采用  $\chi^2$  检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ , 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种系统得到的重编程 iPS 克隆形态 两种方法得到的 iPS 克隆在不同底物上状态良好, 具有典型的胚胎干细胞样形态: 圆形克隆, 有清晰边界线, 克隆内部细胞核大, 有一个或几个核仁, 胞质少, 结构简单、排列致密整齐, 见图 3。



A: hSCAP-iPS (P15,  $\times$ 100); B: H9 (P54,  $\times$ 100) 生长于 MEF; C: hSCAP-iPS (P15,  $\times$ 100); D: H9 (P54,  $\times$ 100) 生长于基质胶。

图 3 不同底物人 SCAP-iPS 细胞生长情况

2.2 两种系统的重编程效率比较 人 SCAP 重编程前细胞数量大约为  $1 \times 10^4$ , 重编程后方法 1 得到 10 个克隆, 重编程效率为 0.1%; 方法 2 共得到约 70 个克隆, 重编程效率为 0.7%, 明显高于方法 1 ( $P<0.05$ ), 见图 4。

2.3 两种系统的重编程时间比较 方法 1 准备时间 3.0 h,

MEF 铺板过夜 12.0 h, 丝裂霉素处理时间 2.0 h, 总计 17.0 h, 重编程第 28 天克隆长大可以挑选扩增, 同时后期酶切除、嘌呤霉素筛选等也增加了处理时间。方法 2 准备时间 3.5 h, 重编程第 26 天时克隆长大可以挑选扩增 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

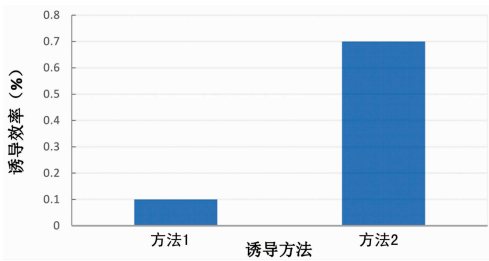


图 4 两种方法重编程效率比较

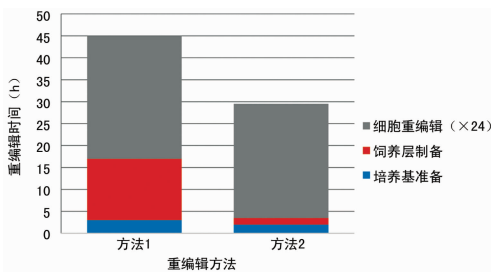


图 5 两种方法重编程时间比较

**2.4 两种系统的重编程效果比较** 方法 1 得到的 iPS 克隆先用嘌呤霉素处理 48 h, 此间所有克隆会慢慢消失, 2~3 d 后重新出现的克隆为外源性基因可能已被切除的 iPS 克隆<sup>[4]</sup>。方法 2 得到的 iPS 克隆体外正常扩增培养数代后外源性基因及病毒序列即消除, RT-PCR 结果也证实无外源性基因及病毒序列的表达, 见图 6。

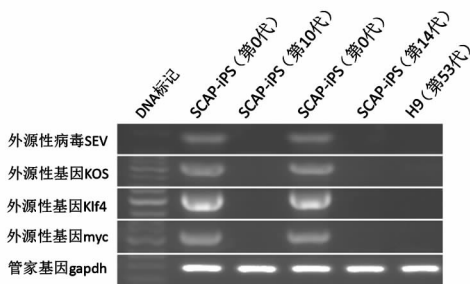


图 6 无病毒、无转录基因人 SCAP-iPS 细胞

### 3 讨论

提高重编程效率, 减少外源性因素的影响, 提高临床安全性是目前 iPS 细胞领域的研究热点, 主要包括饲养层的选择和诱导方法的改进。自从 iPS 细胞产生以来, 为了支持其能理想生长并长期维持未分化状态, 同时获得安全性能高的 iPS 细胞, 其培养条件经历了从饲养层细胞到无饲养层的演变, 重编程方法也由结合性逐渐进展到非结合性诱导<sup>[13-14]</sup>。

作为最早的饲养层细胞, MEF 可分泌多种必需生长因子和胞外基质等以支持 iPS 细胞的生长, 但其分泌成分不明, MEF 及其产物对 iPS 细胞可能是病原菌的来源<sup>[15]</sup>, 影响 iPS 细胞的生长及安全性。STEMCCA 重编程系统与目标细胞 DNA 的结合最小化, 可减少 DNA 插入突变和病毒再激活, 后期利用 Cre/LoxP 将外源性转录基因切除, 得到安全性更高的

iPS 细胞。本课题组<sup>[12]</sup>、Sommer 等<sup>[16]</sup> 成功利用 STEMCCA 重编程系统得到 iPS 细胞, 但外源性转录基因切除后宿主 DNA 仍有部分残留, 临床安全性能不足。基质胶主要由层粘连蛋白、IV 型胶原、生长因子等组成, 可以为 iPS 细胞生长提供理想支持, 是目前最为常用的培养底物<sup>[13]</sup>。Seki 等<sup>[17]</sup>、Soares 等<sup>[18]</sup> 的研究证实仙台病毒重编程系统为 RNA 病毒, 不会结合到宿主细胞基因组内, 转录基因表达效率高, 病毒及转录基因随着 iPS 细胞的传代扩增, 易于从目标细胞中消除, 临床安全性能高。

尽管已有多项研究证实 STEMCCA/MEF 系统与仙台病毒/基质胶系统均可诱导人皮肤成纤维细胞得到 iPS 细胞, 但这两种系统对人牙源性细胞的重编程效果未见报道。本研究利用这两种重编程体系将人 SCAP 诱导为 iPS 细胞, 得到的 iPS 克隆均具有典型胚胎干细胞形态。STEMCCA 重编程体系诱导时间较长, 重编程效率低, 后期还要切除外源性基因, 操作繁琐, 不可控因素较多, 难以统一标准。仙台病毒重编程体系重编程效率高、时间短, 外源性转录基因和病毒也易于去除, 同时基质胶制备方便、标准统一, 易于操控。

综上所述, 与 STEMCCA/MEF 体系相比, 仙台病毒/基质胶系统更适于诱导人 SCAP 重编程为 iPS 细胞, 为后期 iPS 细胞用于牙髓再生和干细胞移植治疗等提供可靠的重编程方法。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Takahashi K, Okita K, Nakagawa MA. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures[J]. Nat Protoc, 2007, 2(12): 3081-3089.
- [4] Montes R, Romero T, Cabrera S, et al. Generation and characterization of the human iPSC line PBMC1-iPS4F1 from adult peripheral blood mononuclear cells [J]. Stem Cell Res, 2015, 15(3): 614-617.
- [5] 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.
- [6] Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 678-684.
- [7] Dowey SN, Huang X, Chou BK, et al. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression[J]. Nat Protoc, 2012, 7(11): 2013-2021.
- [8] Merling RK, Sweeney CL, Choi U, et al. Transgene-free iPSCs generated from small volume peripheral blood non-mobilized CD34<sup>+</sup> cells[J]. Blood, 2013, 121(14): e98-107.
- [9] Zhou HY, Wu SL, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. Cell

Stem Cell, 2009, 4(5): 381-384.

- [10] Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study [J]. J Endod, 2008, 34(2): 166-171.
- [11] 谭小兵, George TH. 人胚胎干细胞和诱导性多功能干细胞饲养层细胞的制备方法 [J]. 国际口腔医学杂志, 2014, 41(3): 268-271.
- [12] Zou XY, Yang HY, Yu Z, et al. Establishment of transgene-free induced pluripotent stem cells reprogrammed from human stem cells of apical papilla for neural differentiation [J]. Stem Cell Res Ther, 2012, 3(5): 43.
- [13] Villa-Diaz LG, Ross AM, Lahann J, et al. Concise review: the evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings [J]. Stem Cells, 2013, 31(1): 1-7.
- [14] Ji P, Manupipatpong S, Xie N, et al. Induced pluripotent stem cells: generation strategy and epigenetic mystery behind reprogramming [J]. Stem Cells Int, 2016; 8415010.

- [15] Ghasemi-Dehkordi P, Allahbakhshian-Farsani M, Abdian N, et al. Comparison between the cultures of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) on feeder-and serum-free system (Matrigel matrix), MEF and HDF feeder cell lines [J]. J Cell Commun Signal, 2015, 9(3): 233-246.
- [16] Sommer AG, Rozelle SS, Sullivan S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from peripheral blood using the STEMCCA lentiviral vector [J]. J Vis Exp, 2012 (68): 4327.
- [17] 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 [J]. Nat Protoc, 2012, 7(4): 718-728.
- [18] Soares FA, Pedersen RA, Vallier L. Generation of human induced pluripotent stem cells from peripheral blood mononuclear cells using sendai virus [J]. Methods Mol Biol, 2015(1357): 23-31.

(收稿日期: 2016-07-26 修回日期: 2016-09-27)

(上接第 89 页)

- [30] 薛海英. 白介素-2 联合顺铂局部治疗恶性胸腔积液临床观察 [J]. 中国医药导报, 2009, 6(1): 57-58.
- [31] 岳顺, 周磊磊, 秦晓冰. 经导管持续闭式引流联合大剂量 IL-2 和顺铂治疗肺癌恶性胸腔积液疗效观察 [J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(11): 1465-1466.
- [32] 纪荣浪, 汪庆华, 林镇慧, 等. 顺铂联合白介素-2 治疗恶性胸腔积液的疗效观察 [J]. 海南医学院学报, 2009, 15(2): 154-155, 157.
- [33] 王峻峰, 袁挺, 唐明星, 等. 白细胞介素-2 联合顺铂经中心静脉导管治疗恶性胸腔积液 41 例临床分析 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2010, 13(4): 540-541.
- [34] 皮家新. 顺铂联合白介素-2 治疗恶性胸腔积液的疗效观察 [J]. 实用癌症杂志, 2011, 26(5): 512.
- [35] 邱艳, 周晓蕾, 吴志强, 等. 顺铂联合白介素-2 治疗恶性胸腔积液的疗效观察 [J]. 河南医学研究, 2011, 20(3): 283-285.
- [36] 戴明, 竺家刚, 朱海骋. 置管引流并注入白介素-2 联合顺铂治疗恶性胸腔积液疗效分析 [J]. 实用癌症杂志, 2011, 26(2): 181-183.

- [37] 赫丽杰, 于秋菊, 王梓瑛. 人重组白介素 2 联合顺铂治疗恶性胸腔积液的临床疗效观察 [J]. 中国药师, 2014, 17(10): 1698-1699.
- [38] 江海兵, 汪征兵, 徐大林. 置管引流灌注白介素-2 联合顺铂治疗恶性胸腔积液临床疗效观察 [J]. 安徽医学, 2014, 35(7): 943-945.
- [39] Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors [J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(6): 673-684.
- [40] Yawen Z, Runmei L, Feng W, et al. A meta-analysis of adoptive immunotherapy combined with chemo/Radiotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer [J]. Chin J Cancer Bio, 2013, 20(4): 461-467.
- [41] Zhu YX, Chen C, Huang JA. The expression of PD-1 on CD8<sup>+</sup> T cells in malignant pleural effusion of lung cancer and its biological significance [J]. Tumor, 2010, 30(9): 778-781.

(收稿日期: 2016-07-22 修回日期: 2016-09-27)

## 《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象), 作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准, 并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。

《重庆医学》编辑部