

本文引用:任佩佩,樊晋宇,郭鑫鑫,等.用精神分裂症患者皮肤成纤维细胞构建诱导性多潜能干细胞模型[J].新乡医学院学报,2016,33(7):572-576. DOI:10.7683/xyxyxb.2016.07.006.

【基础研究】

用精神分裂症患者皮肤成纤维细胞构建诱导性多潜能干细胞模型

任佩佩, 樊晋宇, 郭鑫鑫, 原志庆, 林俊堂, 丰慧根

(新乡医学院生命科学技术学院,河南省干细胞与生物治疗工程研究中心,河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 将精神分裂症患者来源的人皮肤成纤维细胞(HDF)重编程为诱导性多潜能干细胞(iPSCs),为精神分裂症患者建立 iPSCs 模型。**方法** 采用聚合酶链反应技术从 pEP4E02SEM2K 质粒上扩增 2 条目的片段: *OCT4-IRES2-SOX2* 和 *C-MYC-IRES2-KLF4*,将其连接到慢病毒载体 pLVX-IRES-mCherry 上。构建成功的质粒通过磷酸钙转染法转染 293T 细胞包装病毒,检测病毒活力后感染患者皮肤成纤维细胞,将其去分化为诱导性多潜能干细胞,并检测其多能性。**结果** 测序表明重组慢病毒载体构建成功,并制备了具有良好感染活力的重组慢病毒。将含 4 种重编程因子的慢病毒颗粒感染 1 例精神分裂症患者的 HDF 后,HDF 的形态逐步发生变化,最终形成典型的 iPSCs 克隆。**结论** 成功将 1 例精神分裂症患者成纤维细胞重编程为 iPSCs,为以后建立更多精神分裂症疾病模型奠定基础。

关键词: 诱导性多潜能干细胞;精神分裂症;人皮肤成纤维细胞;细胞模型

中图分类号: R749.3;Q819 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2016)07-0572-05

Construction of induced pluripotent stem cells model with human dermal fibroblasts of patients with schizophrenia

REN Pei-pei, FAN Jin-yu, GUO Xin-xin, YUAN Zhi-qing, LIN Jun-tang, FENG Hui-gen

(College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University; Stem Cell and Biological Treatment Engineering Research Center of Henan, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To reprogrammed the human dermal fibroblasts(HDF) which derived from schizophrenia patient into the induced pluripotent stem cells(iPSCs), and establish a iPSCs model for patient with schizophrenia. **Methods** Two fragments of *OCT4-IRES2-SOX2* and *C-MYC-IRES2-KLF4* were amplified from the plasmid of pEP4E02SEM2K by polymerase chain reaction method and the two fragments were connected to the lentiviral vector pLVX-IRES-mCherry. The successfully constructed plasmid were transfected 293T cells by calcium phosphate transfection to package virus. The vitality of virus was detected and then infected the HDF of schizophrenia. Finally, HDF was reprogrammed into the iPSCs and their pluripotentiality was examined. **Results** The sequencing results showed that the recombinant lentiviral vectors were constructed successfully and the recombinant virus with good infection activity. HDF cells from a schizophrenia patient were reprogrammed into iPSCs successfully by 4 kinds of reprogramming factors, and the morphology of HDF cells changed gradually, and ultimately formed a typical iPSCs clone. **Conclusion** The fibroblasts of one schizophrenia patient was reprogramed into iPSCs successfully, which can lay the foundation for the establishment of more schizophrenia model in the future.

Key words: induced pluripotent stem cells; schizophrenia; human dermal fibroblasts; cell model

精神分裂症(schizophrenia, SZ)于1908年4月24日由Blueler医生在一次会议报告中正式提出^[1],全世界约有1%的人口受其影响^[2],多发于青少年青春后期或成年早期^[3],是一类由遗传、环境及其他因素共同导致的疾病^[4]。SZ是一种复杂的

异质性精神类障碍,临床上分为阳性症状(妄想、幻觉等)、阴性症状(淡漠、快感缺失等)和认知功能损伤(注意力、工作记忆下降等)^[5-6]。确诊的患者中有10%的人有自杀倾向和药物滥用风险^[7],再加上缺乏医疗照顾等原因,导致平均寿命缩短12~15 a。SZ虽然发病率不高,但其后果极其严重,给家庭和社会增加了很大负担^[8]。然而,由于缺乏精确的疾病模型,SZ的发病机制研究仍然非常滞后^[4,9-11]。

诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是一种从成熟体细胞重编程为胚胎干细胞样的细胞,具有自我更新和分化为其他类型细胞的能力。2006年,日本科学家TAKAHASHI等^[12]首次

DOI:10.7683/xyxyxb.2016.07.006

收稿日期:2016-03-28

基金项目:河南省干细胞与生物治疗工程研究中心科研项目(编号:210188);河南省高等学校重点科研计划项目(编号:16A180012)。

作者简介:任佩佩(1990-),女,河南焦作人,硕士研究生在读,研究方向:诱导性多潜能干细胞在精神分裂症中的应用。

通信作者:丰慧根(1963-),男,河南新乡人,硕士,教授,研究方向:干细胞与生物治疗和细胞工程制药;E-mail: fenghui@xxmu.edu.cn。

将小鼠成纤维细胞重编程为 iPSCs,之后,iPSCs 技术逐渐成为研究神经发育的重要工具。iPSCs 诱导分化为各类神经细胞,为从体外研究供体神经细胞的分子事件以及研究神经发育过程提供了基础。目前,iPSCs 也在 SZ 中发挥了重要作用,尤其是从 iPSCs 诱导形成的各类神经细胞模型,不仅在研究 SZ 的发病机制、诊断和治疗中有重要意义,也在 SZ 的药物研发中有广阔的应用前景^[13]。本研究通过构建 iPSCs 诱导相关的慢病毒载体,成功将 1 例 SZ 患者的人皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblasts,HDF)重编程得到 iPSCs,为以后建立 SZ 模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 293T 细胞购自中国科学院细胞库,HDF 细胞由河南省精神病院提供,小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblasts,MEF)由本实验室制备,质粒 pEP4EO2SEM2K 购于美国 Addgene 公司,慢病毒包装系统 pLVX-IRES-mCherry、pMD2. G 和 pSPAX2 质粒购于美国 Clontech 公司,其中载体质粒 pLVX-IRES-mCherry 表达红色荧光。

1.2 试剂及仪器 达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)(高糖)购于美国 Hyclone 公司,敲除型 DMEM、胎牛血清、血清替代物、GlutaMax、非必需氨基酸、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、 β -巯基乙醇购于美国 Gibco 公司, $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶、青链霉素、丝裂霉素 C 购于美国 Genview 公司,NANOG 抗体、SSEA4 抗体购于英国 Abcam 公司,限制性内切酶购于日本 TaKaRa 公司,倒置荧光显微镜购于日本 Nikon 公司,生物安全柜购于上海 Heal Force 公司,Nanodrop2000 购于美国 Thermo 公司,Gel Extraction Kit、Cycle-Pure Kit 试剂盒购于美国 Omega 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 293T 细胞培养基为高糖 DMEM + 体积分数 10% 胎牛血清 + 体积分数 1% 双抗;HDF 细胞培养基为高糖 DMEM + 体积分数 10% 胎牛血清 + 体积分数 1% 双抗;MEF 细胞培养基为高糖 DMEM + 体积分数 10% 胎牛血清 + 体积分数 1% 双抗,使用前,将 MEF 细胞传至细胞培养皿,待细胞汇合度大于 90% 时,用含丝裂霉素 C($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的培养基处理 2.5 h 后,弃去培养基用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)洗涤 3 遍,换上新鲜培养基,供后期实验使用;iPSCs 诱导培养基:敲除型 DMEM + 体积分数 20% 的血清替代物 + $1 \times \text{Glu-}$

$\text{taMax} + 1 \times \text{非必需氨基酸} + 0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ bFGF} + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \beta\text{-巯基乙醇}$ 。

1.3.2 慢病毒载体构建 iPSCs 诱导实验中常用 4 个重编程因子病毒的混合物侵染细胞,病毒制备较多,且 4 种病毒共转染的效率会降低。本实验为了减少重组重编程因子慢病毒的种类,减少工作量,分别将 *OCT4* 和 *SOX2*,*C-MYC* 和 *KLF4* 通过 IRES2 序列拼接到一起,构建到慢病毒载体 pLVX 上。以质粒 pEP4EO2SEM2K 为模板,将基因组合 *OCT4* 和 *SOX2*,以及 *KLF4* 和 *C-MYC* 分别扩增并构建于慢病毒载体 pLVX-IRES-mCherry(以下简称 pLVX)的多克隆位点。扩增 *OCT4* 和 *SOX2* 的上游引物为 5'-CCGGAATTCATGGCGGGACACCTG-3',下游引物为 5'-CGCGGATCCTCACATGTGTGAGAGG-3',下划线处为酶切位点序列 *EcoR* I 和 *Bam*H I。*KLF4* 和 *C-MYC* 的上游引物为 5'-CGGACTAGTATGCCCTCAACGTTAGCT-3',下游引物为 5'-CGCGGATCCTTAAAAATGCCTCTTCATGTG-3',下划线处为酶切位点 *Spe* I 和 *Bam*H I。引物由北京金唯智公司合成。基因扩增的条件均一样,即 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 、2 min 预变性, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 s 变性, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 s 退火, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 、3 min 延伸,重复该循环 30 次;随后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 min,并降温至 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 。用 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳,按照 OMEGA 胶回收试剂盒说明书,将扩增的目的片段回收。用酶切连接方法分别将基因组合 *OCT4/SOX2* 和 *KLF4/C-MYC* 插入载体 pLVX 相应的酶切位点,分别构建成质粒 pLVX-*OCT4*-IRES2-SOX2 和 pLVX-*KLF4*-IRES2-C-MYC。并用测序方法检验构建的质粒是否正确。

1.3.3 重组慢病毒包装 转染前 24 h,将 1×10^6 个对数期的 293T 细胞接种于 75 cm^2 的细胞培养瓶,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度条件下培养,待细胞汇合度为 60% ~ 70% 时,按文献[14]所描述的磷酸钙法分别将质粒组合 pLVX-*OCT4*-IRES2-SOX2、pSPAX2、pMD2. G 与 pLVX-*KLF4*-IRES2-C-MYC、pSPAX2、pMD2. G 转染到不同瓶的 293T 中,然后置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度条件下培养 8 ~ 16 h,去掉培养基,用 PBS 洗涤 2 次,换新鲜培养基。转染 48 h 后收集病毒, 75 cm^2 的培养瓶离心,超滤浓缩至 $500 \mu\text{L}$ 。病毒侵染效率检测:分别取 2、5、10、20 μL 浓缩病毒在 24 孔板中侵染 3×10^5 个 293T 细胞,36 h 后在荧光显微镜下观察红色荧光的表达情况,确定最佳的侵染病毒量。

1.3.4 从患者 HDF 细胞诱导 iPSCs 在重组病毒侵染前 1 d,将 HDF 细胞传至 25 cm^2 细胞培养瓶,

在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。第 2 天, 侵染前换新鲜培养基, 2 种重组慢病毒各取 500 μL 加入 HDF 细胞。24 h 后换新鲜培养基, 36 h 后观察红色荧光的表达情况。48 h 后, 将这些 HDF 细胞转至丝裂霉素 C 处理好的饲养层细胞 MEF 上, 更换为 iPSCs 诱导培养基, 此后每 2 d 换 1 次新鲜培养基。每天在荧光显微镜下观察带荧光细胞的形态变化, 待有诱导克隆形成时, 将其挑出, 用 0.25 g · L⁻¹ 的胰蛋白酶消化, 转至新饲养层细胞继续培养。重复这个过程, 直到形成纯净的单细胞克隆。

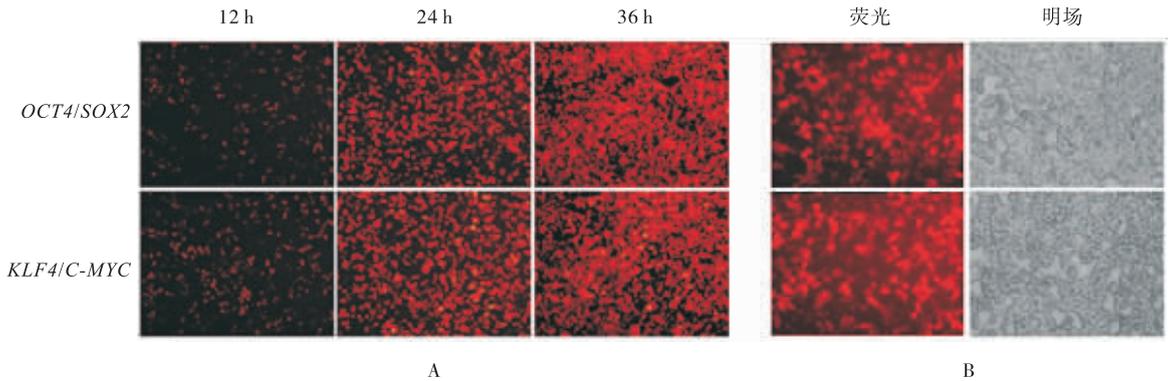
1.3.5 反转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 及 Western blotting 鉴定诱导克隆多能性标志基因 将诱导克隆挑出, 用 0.25 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化后转移到新的饲养层细胞上, 继续培养, 重复此过程, 直至形成单克隆后, 进行鉴定。提取诱导克隆、饲养层 MEF 细胞的 mRNA, 反转录为 cDNA 后, 用 PCR 方法以 GADPH 作为内参对其插入的外源性基因 (*OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*C-MYC*) 和多能性基因 (*Endo-OCT4*、*Endo-SOX2*、*Endo-KLF4*、*hREX1*、*NANOG*、*PAX6*) 进行检测, 扩增条件为 94 ℃、2 min 预变性, 94 ℃、30 s 变性, 58 ℃、30 s 退火, 72 ℃、40 s 延伸, 重复该循环 40 次; 随后 72 ℃ 延伸 5 min, 并降温至 4 ℃。扩增结果用 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳进行检测。从诱导克隆、患者 HDF 细胞提取蛋白, 用 West-

ern blotting 技术先后经过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)、转膜、封闭、孵育一抗过夜、孵育二抗、显影等过程对其多能性蛋白 NANOG 和 SSEA4 进行检测。

2 结果

2.1 重编程因子的慢病毒质粒构建 从 pEP4EO2SEM2K 质粒上扩增出目的片段, *OCT4/SOX2* 大小为 2 716 bp, *C-MYC/KLF4* 大小为 3 408 bp, PCR 结果和预期基本一致。酶切连接后通过 DH5α 转化, 挑取单克隆提取质粒, 进行双酶切。pLVX-*OCT4*-IRES2-*SOX2* 质粒用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切, pLVX-*C-MYC*-IRES2-*KLF4* 质粒用 *Spe* I 和 *Bam*H I 双酶切, 酶切结果进行琼脂糖凝胶电泳, 结果和预期条带大小基本一致。将酶切正确的质粒送金唯智测序, 测序结果显示序列完全正确。

2.2 重编程因子慢病毒的制备与转染效率检测 重组质粒和包装质粒共转染 12 h, 能观察到开始表达红色荧光, 24 h 荧光逐渐变多变亮, 红色荧光越多表明转染效率越高, 36 h 表达红色荧光的细胞达约 70%, 足以满足实验要求 (图 1A)。转染 48 h 后收集病毒, 按梯度取一部分病毒加入事先准备好的 24 孔板中测病毒活力, 36 h 后在荧光显微镜下观察红色荧光表达量, 检测病毒活力, 确定侵染目的细胞所需病毒量 (图 1B, 只显示 20 μL 侵染效果图), 结果显示取 20 μL 浓缩病毒液的侵染效率均可达到 90%。



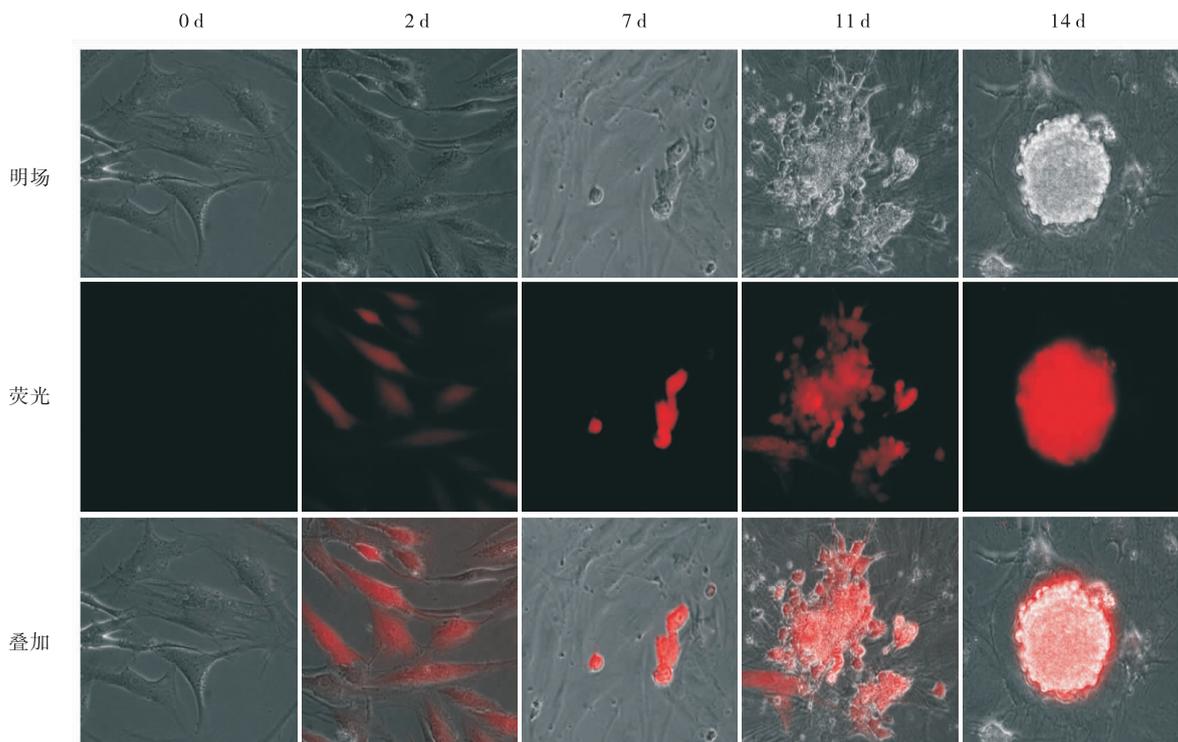
A: 慢病毒包装中, 磷酸钙转染 12、24、36 h 后的红色荧光表达情况; B: 离心超滤浓缩后的病毒侵染 293T 细胞 36 h 后的红色荧光表达结果。

图 1 重组慢病毒的包装及侵染效率检测

Fig. 1 Lentivirus preparation and infection activity evaluation for recombinant lentiviruses

2.3 SZ 患者 HDF 诱导 iPSCs 把经过侵染活力检测的病毒 *OCT4/SOX2* 和 *C-MYC/KLF4* 各取 500 μL 加入 3 × 10⁶ 个 HDF 细胞中, 侵染 HDF 第 2 天, 有 70% 左右的细胞表达红色荧光。第 7 天已经能明显观察到细胞逐渐缩短, 第 11 天细胞形态发生明显变化, 已逐渐变成圆形, 第 14 天已经能观察到类球形诱导克隆 (SZ-iPSCs) 出现 (图 2)。

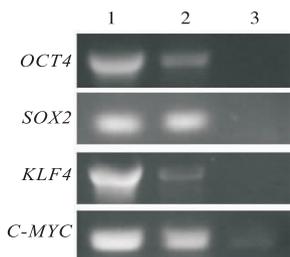
2.4 SZ-iPSCs 的鉴定 RNA 水平鉴定结果显示, 诱导克隆既表达插入的外源重编程因子 *OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*C-MYC* (图 3), 同时也表达多能性标记基因 *Endo-OCT4*、*Endo-SOX2*、*Endo-KLF4*、*hREX1*、*NANOG*、*PAX6* (图 4)。蛋白水平检测结果显示, 诱导的克隆表达 NANOG 和 SSEA4 (图 5 和图 6), 说明诱导的克隆为 iPSCs。



0 d:HDF 细胞病毒侵染前的状态;2 d:病毒侵染第2天 70% HDF 细胞表达红色荧光;7 d:已经能观察到细胞形态发生变化;11 d:细胞形态已经明显发生变化;14 d:诱导克隆形成。

图2 iPSCs 诱导过程中 HDFs 细胞的形态变化

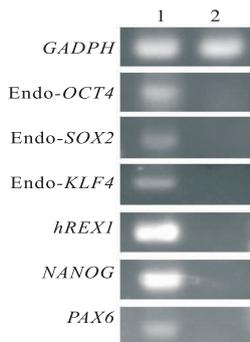
Fig.2 Morphological changes of HDFs during iPSCs reprogramming



1:质粒外源重编程因子扩增结果;2:诱导克隆外源重编程因子扩增结果;3:饲养层 MEF 细胞多能性基因扩增结果。

图3 RT-PCR 检测诱导克隆插入的外源基因表达情况

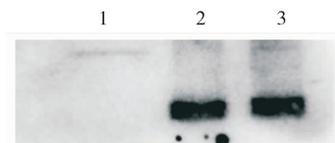
Fig.3 Expression of exogenous gene of induced clones detected by RT-PCR



1:诱导克隆多能性标记基因表达情况;2:饲养层 MEF 细胞多能性基因表达情况。

图4 RT-PCR 检测诱导克隆多能性标记基因表达情况

Fig.4 Expression of pluripotent specific genes of induced clones detected by RT-PCR



1:HDF 细胞 NANOG 表达情况;2:诱导 1 号克隆 NANOG 表达情况;3:诱导 2 号克隆 NANOG 表达情况。

图5 Western blotting 检测诱导克隆中 NANOG 表达情况

Fig.5 Detection the NANOG expression in induced cloning by Western blotting



1:HDF 细胞 SSEA4 表达情况;2:1 号诱导克隆 SSEA4 表达情况;3:2 号诱导克隆 SSEA4 表达情况。

图6 Western blotting 检测诱导克隆中 SSEA4 表达情况

Fig.6 Detection the SSEA4 expression in induced cloning by Western blotting

3 讨论

SZ 是严重威胁人类健康的精神疾病,因其无客观的表型,由复杂的遗传和环境相互作用导致,从患者获取神经元困难,且无合适的疾病模型等原因,至今仍不了解其患病机制,导致该疾病无法根治^[15]。SZ 具有高度遗传性,多发于青少年时期,对个人、家

庭和社会均有严重的影响,降低人们的生活质量^[4]。

近年来,越来越多的研究者关注SZ疾病模型的建立,iPSCs技术及其定向诱导分化技术的出现,为研究SZ带来新的曙光。过去的10 a中,iPSCs技术的出现对于建立疾病模型是一个令人兴奋的消息,2011年,第1次用iPSCs技术为SZ患者建立细胞模型^[15]。此后,使用该技术为SZ建立细胞模型对其发病机制的研究已经取得如下进展:患者iPSCs来源的神经元连接减少、神经突触数量减少、神经突触蛋白PSD95表达水平下调;患者iPSCs来源的神经元Wnt信号通路、cAMP信号通路和谷氨酸受体相关基因表达改变;患者iPSCs来源的神经祖细胞细胞骨架和氧化应激性异常等^[6,16]。自2011年第1次为SZ建立模型以来,越来越多的实验开始利用iPSCs技术为SZ患者建立疾病模型。从患者的HDF细胞或者毛囊角质细胞出发,去分化为iPSCs,进一步将其诱导分化为谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元、 γ -氨基丁酸能神经元等神经细胞和胶质细胞,建立SZ患者的细胞模型,对其形态学、转录组、蛋白质、突触传导、迁移、分化等进行研究,已经取得很大进展^[13]。

本实验通过构建iPSCs诱导相关的慢病毒载体,成功将SZ患者HDF细胞重编程为iPSCs,成功为1例SZ患者建立了iPSCs模型,这为以后建立更多SZ模型,研究其发病机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] KUHN R. Eugen Bleuler's concepts of psychopathology[J]. *History Psychiatry*,2004,15(59 pt 3):361-366.
- [2] VAN OS J, RUTTEN B P, POULTON R. Gene-environment interactions in schizophrenia;review of epidemiological findings and future directions[J]. *Schizophr Bull*,2008,34(6):1066-1082.
- [3] INSEL T R. Rethinking schizophrenia[J]. *Nature*,2010,468(7321):187-193.
- [4] 刘保成,贺光,贺林.精神分裂症的基因组学研究进展[J]. *国际遗传学杂志*,2010,33(6):334-339.
- [5] CARBON M, CORRELL C U. Thinking and acting beyond the positive;the role of the cognitive and negative symptoms in schizophrenia[J]. *CNS Spectr*,2014,19(Suppl 1):35-53.
- [6] JONES C A, WATSON D J, FONE K C. Animal models of schizophrenia[J]. *Br J Pharmacol*,2011,164(4):1162-1194.
- [7] MODAI S, SHOMRON N. Molecular risk factors for schizophrenia[J]. *Trends Mol Med*,2016,22(3):242-253.
- [8] VAN OS J, KAPUR S. Schizophrenia[J]. *Lancet*,2009,374(9690):635-645.
- [9] KALMAN S, GARBETT K A, JANKA Z, et al. Human dermal fibroblasts in psychiatry research[J]. *Neuroscience*,2016,320:105-121.
- [10] SCHMIDT M J, HORVATH S, EBERT P, et al. Modulation of behavioral networks by selective interneuronal inactivation[J]. *Mol Psychiatry*,2014,19(5):580-587.
- [11] SAINI C, BROWN S A, DIBNER C. Human peripheral clocks: applications for studying circadian phenotypes in physiology and pathophysiology[J]. *Front Neurol*,2015,6:95.
- [12] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*,2006,126(4):663-676.
- [13] JACOBS B M. A dangerous method? The use of induced pluripotent stem cells as a model for schizophrenia[J]. *Schizophr Res*,2015,168(1/2):563-568.
- [14] KINGSTON R E, CHEN C A, ROSE J K. Calcium phosphate transfection[M]. *Curr Protoc Cell Biol*,2003,Chapter 9;Unit 9-1.
- [15] WATMUFF B, BERKOVITCH S S, HUANG J H, et al. Disease signatures for schizophrenia and bipolar disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells[J]. *Mol Cell Neurosci*,2016,73:96-103.
- [16] KIM S, KIM M K, OH D, et al. Induced pluripotent stem cells as a novel tool in psychiatric research[J]. *Psychiatry Investig*,2016,13(1):8-17.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)