

逆转录病毒感染法对 RP 患者人体细胞向 iPS 细胞和 iPS-RPE 细胞诱导分化的研究

田媛媛 蒋超 陈雪 丁思加 徐敏 赵晨

210029 南京医科大学第一附属医院眼科

通信作者:赵晨, Email: dr. zhaochen@gmail. com

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 09. 006

【摘要】 背景 视网膜色素上皮(RPE)细胞移植是目前人类尝试治疗视网膜色素变性(RP)的主要手段。诱导多能干细胞(iPSCs)将成为移植细胞的一个重要来源,人胚胎干细胞(hESC)可以无限期地自我更新和分化,是 RPE 细胞移植的重要供体来源。此外,iPS-RPE 细胞为患者自身细胞成为治疗源组织提供了个性化治疗平台。目的 评估利用逆转录病毒将 *Oct4*、*Sox2*、*c-Myc* 和 *Klf4* 4 种基因导入 RP 患者皮肤成纤维细胞后诱导人 iPSCs 的可行性,并建立将正常人 iPSCs 诱导分化为 RPE 细胞的方法。方法 分别采集基因突变点为 *SNRNP200* p. S1087L 的 RP 患者及无 *SNRNP200* p. S1087L 突变受试者的大腿皮肤组织块约 2 cm×3 cm。采用胰蛋白酶消化和组织块培养法分离纯化得到成纤维细胞并进行传代,取第 3 代细胞用于研究,分别采用形态学和免疫荧光技术对培养细胞进行鉴定。采用含 OCT4、SOX2、C-MYC 和 KLF4 4 种 cDNA 的质粒病毒转染的成纤维细胞,并用 hESC 条件培养液诱导 iPSCs,采用细胞形态学、碱性磷酸酶(AP)染色、干细胞表面多潜能标志物表达对所得到的 iPSCs 和 iPS-RPE 细胞进行鉴定,并通过细胞在 SCID 小鼠的体内种植考察 iPSCs 的成瘤性。采用诱导分化拟胚体(EB)法将不含 *SNRNP200* p. S1087L 突变的 iPSCs 诱导分化为 RPE 细胞,分别采用免疫荧光技术和实时荧光定量 PCR 法检测细胞中特异性蛋白的表达。结果 用皮肤组织块培养的成纤维细胞呈梭形和多角形,光学显微镜下可见细胞间排列紧密,细胞形态和大小趋于一致,细胞中特异性蛋白 Vimentin 表达阳性。经逆转录病毒转染的成纤维细胞培养后第 5~7 天可见小的细胞聚集,细胞形态由梭形变为圆形;培养后 20 d 出现类似 hESC 集落形态的 iPSCs 克隆;培养后 25~30 d 细胞中的标志物 SSEA3、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81 及 Nanog 均呈阳性表达,培养后 12 周形成的 iPSCs 克隆中 AP 染色阳性,接种到 SCID 小鼠体内后形成畸胎瘤。免疫荧光染色显示,诱导分化后 30 d 时 iPS-RPE 细胞中 RPE 细胞特异性标志物 RPE65、闭锁小带蛋白 1(ZO-1)和卵磷脂视黄醇酰基转移酶(LRAT)蛋白均呈阳性表达。结论 利用逆转录病毒将 *Oct4*、*Sox2*、*c-Myc* 和 *Klf4* 4 种基因转入 *SNRNP200* p. S1087L 突变的 RP 患者皮肤成纤维细胞后可以获得 iPSCs,建立的 iPSCs 有 ESCs 的形态和多能分化的特征。采用同样的转染技术可在无 *SNRNP200* p. S1087L 突变的人皮肤成纤维细胞中建立体外高分化、高效能的 iPS-RPE 细胞。

【关键词】 人皮肤成纤维细胞/细胞学; 诱导多潜能干细胞/细胞学; 视网膜色素上皮/细胞学; 视网膜色素变性/治疗; 细胞培养; 细胞分化; 生物标志物

基金项目:江苏高校优势学科建设工程项目(JX10231801)

A pilot study on induction and differentiation of human fibroblasts to iPSC cells and iPS-RPE cells mediated by retrovirus infection Tian Yuanyuan, Jiang Chao, Chen Xue, Ding Sijia, Xu Min, Zhao Chen

Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Zhao Chen, Email: dr. zhaochen@gmail. com

【Abstract】 **Background** Retinal pigment epithelium (RPE) cell transplantation is the primary means of human trial for the treatment of retinal degeneration. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) will become an important source for cell transplantation. In addition, iPS-RPE cells may provide a personalized treatment platform for the patient's own cells treatment. **Objective** This study was to evaluate the feasibility of human fibroblasts differentiate toward iPSCs from retinitis pigmentosa (RP) patients and toward iPS-RPE cells from non-RP individual by retroviral transfection of *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* and *KLF4* genes. **Methods** Human thigh skin tissues were obtained from a RP

patient with hotspot mutation of *SNRNP200* p. S1087L and individual without *SNRNP200* p. S1087L mutation, respectively, with the size 2 cm×3 cm. Human dermal fibroblasts were isolated and cultured by trypsin digestion and explant method. The fibroblasts were transfected by a series of retrovirus and cultured by human embryonic cell-conditioned medium to generate and induce iPSCs, and then the iPSCs were identified by morphology, alkaline phosphatase (AP) staining and immunofluorescence assay of specific markers of pluripotent stem cells. iPSCs suspension were injected into SCID mouse to observe the tumorigenesis. The iPSCs from non-RP subject were induced to differentiate toward iPS-RPE cells by embryonic body (EB) inducing method, and iPS-RPE cells were identified by detecting the expression of RPE65, zonula occludens protein 1 (ZO-1) and lecithin retinol acyltransferase (LRAT).

Results Cultured human dermal fibroblasts showed fusiform or polygon shape and intercellular close arrangement, and Vimentin was positively expressed in the cells. Small cell colonies were harvested 5–7 days after infected by retroviruses, and the morphology changed from spindle into round mass. The hESC-like iPSCs clones appeared 20 days after cultivation, and the positive expressions of hESC-specific surface antigens including SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 and Nanog were found in the cells 25–30 days after cultivation, and the positive staining of AP was obtained 12 weeks after cultivation. A teratoma was formed at the injection site of iPSCs suspension in SCID mouse. Immunofluorescence technique showed that RPE cell-specific proteins including RPE65, ZO-1 and LRAT proteins were positively expressed in iPS-RPE cells at 30 days after differentiation. **Conclusions** Mutation *SNRNP200* p. S1087L of RP patient-specific iPSCs can be induced from human dermal fibroblast by retrovirus infection method. The function and morphology of the iPSCs were similar to hESCs. Human iPSCs cell line generated from the dermal fibroblasts of non-RP individuals can differentiate into iPS-RPE cells.

[Key words] Dermal fibroblasts, human/cytology; induced pluripotent stem cells/cytology; Retinal pigment epithelium cells/cytology; Retinitis pigmentosa/therapy; Cells, cultured; Cell differentiation; Biomarkers

Fund program: Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (JX10231801)

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是以视网膜感光细胞和视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 功能受损所致的退行性病变, 是临床常见的遗传性视网膜疾病 (hereditary retinal disease, HRD), 其临床特征是夜盲、进行性视野缩小、视网膜成骨细胞样色素沉着和光感受器功能障碍, 目前尚无有效方法阻止或逆转此病的进展。近年来已尝试应用基因疗法和细胞移植法治疗视网膜变性疾病, 其主要策略是 RPE 细胞移植, 但如何获取数量充足、排斥性和成瘤性低的 RPE 细胞是主要问题。研究表明, 人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 因具有全能分化特性以及无限增殖能力而被认为是治疗视网膜变性疾病安全和有效的方法^[1], 但存在伦理问题和免疫排斥问题。诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 是自体来源细胞, iPS 细胞移植可避免伦理问题和免疫排斥问题。研究表明, iPSCs 能体外诱导分化成人光感受器样细胞和 RPE 样细胞, 并能表达光感受器细胞和 RPE 细胞的特异蛋白^[2-3]。近年来的临床试验表明, iPSCs 诱导分化的 RPE 细胞移植后可改善多数视网膜变性患者的视力^[1,4]。我们先前对 4 个常染色体显性遗传性 RP (autosomal dominant retinitis pigmentosa, ADRP) 家系的研究表明, *SNRNP200* p. S1087L 基因突变是这些家系 RP 的热

点致病突变^[5], 但是目前尚未发现关于 *SNRNP200* p. S1087L 基因突变患者建立皮肤成纤维细胞转化 iPSCs 以及后续的研究报道。本研究中建立 *SNRNP200* p. S1087L 基因突变患者及正常人的皮肤成纤维细胞向 iPSCs 转化的方法和正常人 iPSCs 向 RPE 细胞分化的方法, 为相关疾病的发病机制研究、治疗药物研发及细胞移植疗法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与实验动物 293T 细胞、小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEF) (上海斯丹赛生物技术有限公司); SCID 小鼠, 雌性各 2 只 (饲养于南京大学模式动物中心)。收集 1 例 *SNRNP200* p. S1087L 基因突变 RP 患者和 1 名正常人大腿皮肤。本研究经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准 (审批号: 2015-SRFA-086), 受试者知情同意并签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗溶液、质量分数 0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); I 型胶原酶、CKI-7、SB-431542 (美国 Sigma 公司); 抗兔 Vimentin 抗体 (1:1 000) (美国 CST 公司); Knockout 血清替代物、非必需氨基酸、L-谷氨酰

胺、 β -巯基乙醇、IV 型胶原酶、Trizol、引物(美国 Invitrogen 公司);碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(美国 RD 公司);质量分数 0.1% 明胶(德国 Millipore 公司);Matrigel 胶(美国 BD 公司);逆转录试剂盒(日本 TAKARA 公司);Q-PCR 试剂(瑞士 Roche 公司);pMx-huOCT4、pMx-huSOX2、pMx-huKLF4、pMx-huMYC、pMx-GFP、pCL-包装质粒、抗 TRA-60、抗 TRA-81、抗 SSEA4、抗 SSEA3、抗 Nanog 一抗(上海斯丹赛生物技术有限公司);鼠抗 RPE65 一抗(1:100, 抗体编号:MAB542, 美国 Millipore 公司);兔抗闭锁小带蛋白(zonula occludens protein 1, ZO-1)一抗(1:100, 抗体编号:40-2200, 美国 Invitrogen 公司);抗兔卵磷脂视黄醇酰基转移酶(lecithin retinol acyltransferase, LRAT)一抗(1:100, 抗体编号:ab166784, 美国 Abcam 公司);抗兔(1:5 000)或抗小鼠(1:5 000)荧光标记二抗(美国 CLLAB 公司)。

1.2 方法

1.2.1 iPSCs 的构建

1.2.1.1 皮肤体细胞的分离、培养及鉴定 术中取 RP 患者及正常人大腿内侧部皮肤,切除的皮肤组织约 2 cm \times 3 cm,反复用含青链霉素的 PBS 漂洗后去除脂肪组织、结缔组织及皮下血管,将组织剪成 0.5 cm \times 1.5 cm 的长条,放入离心管,加入 2 mg/ml II 型胶原酶消化液,4 $^{\circ}$ C 消化过夜,去除组织块的表皮,分离真皮,添加质量分数 0.25% 胰蛋白酶反复吹打消化,然后用含血清的 DMEM/F12 培养基清洗,1 000 g 离心 8 min,弃上清,按 1 \times 10⁵/ml 的浓度加入体积分数 10% 牛血清 DMEM/F12 培养液进行培养,待细胞贴壁后根据细胞的生长情况进行传代,取第 3 代细胞用于实验。将成纤维细胞接种至含有载玻片的培养板中,待细胞密度长至 80% 后,分别用预冷的 PBS 冲洗 5 min,然后用质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗过后,用质量分数 0.5% Triton 孵育 15 min。质量分数 1% BSA 室温封闭 1 h, PBS 冲洗 5 min 后,加入稀释好的一抗,于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。加入稀释好的对应的荧光二抗(1:1 000),常温避光孵育 1 h。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,后加入 phalloidin(1:40)进行室温避光染色 30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,再加 DAPI 染料(1:1 000)对细胞核进行染色,室温避光孵育 5 min,漂洗 5 min 后用荧光抗淬灭剂封片,荧光显微镜下观察成纤维细胞内 Vimentin 蛋白的表达。

1.2.1.2 iPSCs 的获得 用含 Oct4、SOX2、C-MYC 和 KLF4 4 种 cDNA 的慢病毒质粒转染 293T 细胞,收集含病毒上清液,用 0.45 μ m 滤膜过滤后备用。MEF 饲

养层的铺被加入足量基质胶均匀铺到 6 孔板底面,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱 30 min,取出后加入 2 ml 成纤维细胞完全培养基,37 $^{\circ}$ C 预孵育 10 min 以上,从液氮中取出 CF-1MEF 细胞,迅速 37 $^{\circ}$ C 水浴中解冻,取适量饲养层细胞加入备好的 6 孔板,混匀。以感染复数为 10:1 的比例用病毒对培养的成纤维细胞进行悬浮感染。病毒感染 24 h 后,将感染的细胞消化下来,铺到事先准备好的 CF-1MEF 上 48 h,将 10% DMEM 培养液换成 hESCs 培养液培养细胞,隔日换液 1 次,培养第 12 天更换为条件培养液:hESCs 正常培养液=1:1 的混合液,培养第 20 天可挑取克隆。

1.2.1.3 iPSCs 的培养 iPSCs 传代前先复苏好 MEF 细胞,当 iPSCs 生长到密度为 70%~80% 时,用 1 mg/ml IV 型胶原酶进行消化,然后用 iPSCs 培养基进行培养。

1.2.2 正常人的 iPS-RPE 细胞的体外分化 按照文献[6]的方法诱导分化拟胚体(embryonic body, EB)。

1.2.2.1 悬浮培养 取正常人 iPSCs 进行悬浮培养,当 iPSCs 生长至密度为 80% 时进行消化和克隆,用移液枪轻轻吹打贴壁的 iPSCs,室温下静置,吸去上清培养液,得到细胞团块后转移至没有黏附性的培养皿中进行悬浮培养。待细胞团块培养 3 d 后更换为不含 bFGF 的培养液,同时加入浓度为 5 μ mol/L 的 CKI-7 和 SB-431542 进行诱导分化。隔日换液 1 次, iPSCs 细胞团块逐步形成球状 EB。

1.2.2.2 贴壁培养 iPSCs 悬浮培养约 7 d 可见 EB 向 RPE 细胞分化, EB 生长 15 d 后收集 EB 团,按适当密度将其接种在用 Matrigel 胶处理过的培养皿中进行贴壁培养。培养基为 iPSCs 分化培养液,隔日换液 1 次,培养 30 d 后观察细胞形态。

1.2.3 iPSCs 的鉴定

1.2.3.1 碱性磷酸酶染色 PBS 清洗细胞,弃去 PBS,用 4% 多聚甲醛固定 2 min,吸去固定液, TBST 液清洗,添加碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)显色液,避光孵育 5 min,吸出反应液, TBST 液清洗,保存于 PBS 中,光学显微镜下观察并照相。

1.2.3.2 免疫荧光法检测干细胞表面标志物的表达

细胞固定在 4% 多聚甲醛中,室温放置 30 min,检测 Oct4、Nanog 或 Rex1 等核蛋白时将细胞在无水乙醇中浸泡 2 次,每次 20 min。检测 SSEA 和 Tra 等膜蛋白无需在无水乙醇中浸泡。吸干溶液, PBS 漂洗,再用抗体稀释液(0.2% BSA 和 0.1% TritonX-100 溶于 PBS)漂洗 2 次,用封闭液(含 1% BSA + 4% 血清 + 0.4% TritonX-100 的 PBS 溶液)封闭细胞,加入相应的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;用 PBST(0.1% TritonX-100)洗涤细胞

3~5 次;避光条件下加入相应二抗,室温下孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次;加入 DAPI 对细胞核染色,室温放置 5 min, PBS 漂洗, 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, PBS 洗涤, 光学显微镜下观察并拍照。

1.2.3.3 iPSCs 在小鼠体内的成瘤分化 将由患者体细胞诱导获得的 iPSCs 悬液接种到 SCID 小鼠后腿腹股沟皮下, 12 周后麻醉处死小鼠并摘取注射部位肿块, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm 厚切片, 行苏木精-伊红染色, 观察小鼠体内瘤组织的形态和结构, 光学显微镜下观察并拍照。

1.2.4 iPS-RPE 细胞的鉴定 免疫荧光技术观察 iPS-RPE 细胞中特异性蛋白的表达。将 iPS-RPE 细胞接种于载玻片上置于 12 孔板中培养 30 d, 用预冷的 PBS 冲洗 5 min, 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, PBS 漂洗, 再用 0.5% Triton 通透 15 min, 1% BSA 封闭 30 min, PBS 漂洗, 分别添加相应的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 冲洗 3~5 次, 每次 5 min, 避光条件下滴加相应的荧光二抗, 室温下避光孵育 1 h。PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 DAPI 对细胞核进行染色, 室温放置 5 min, 漂洗, 用荧光抗淬灭剂封片, 荧光显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 培养的皮肤成纤维细胞的形态及鉴定

皮肤组织块在培养的第 3 天可见细胞自组织块周围游出, 第 4 天贴壁生长, 传至第 3 代的细胞呈梭形或多边形, 细胞形状类似于上皮细胞。光学显微镜下可见细胞间排列紧密, 细胞形态和大小趋于一致(图 1)。免疫荧光检测显示, 培养的皮肤成纤维细胞中特异性蛋白 Vimentin 表达阳性, 证实为成纤维细胞(图 2)。

2.2 iPSCs 的诱导及向 RPE 细胞分化的情况

2.2.1 皮肤成纤维细胞来源的 iPSCs 细胞克隆及正常人 iPSCs 向 RPE 细胞分化后的形态变化 慢病毒为载体的过表达质粒感染人皮肤成纤维细胞并消化接种在 MEF 细胞上培养 3 d 后可见干细胞克隆形态的细胞出现, iPSCs 细胞克隆球隆起, 边界清晰, 细胞间排列致密。正常人 iPSCs 克隆球继续悬浮培养 7 d 后, 细胞团块形成 EB, EB 团块中出现黑色素。继续贴壁分化培养后, 光学显微镜下可见 iPSCs 诱导分化为 iPS-RPE 细胞(图 3)。

2.2.2 iPSCs 的生物学特性 iPSCs 中染色为强阳性, 光学显微镜下可见克隆细胞中出现密集的紫黑色颗粒, 周围的饲养层细胞未染色(图 4A)。细胞中 ESCs 特异性表面抗原 Oct4、SSEA3、TRA1-60、TRA1-81

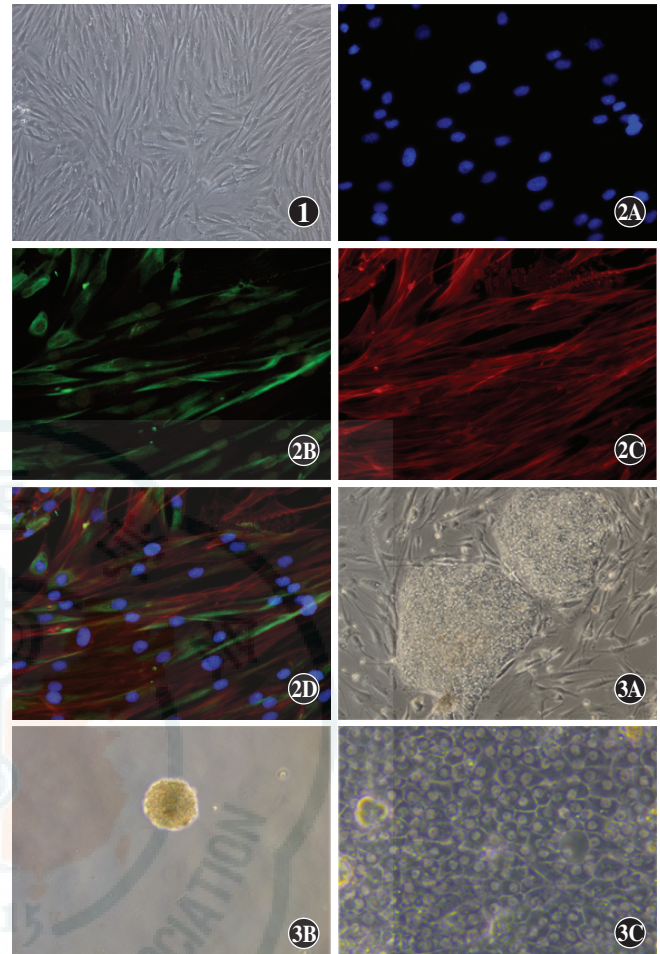


图 1 培养的人皮肤成纤维细胞($\times 100$) 第 3 代细胞呈梭形, 排列规则, 大小和形状一致 图 2 培养的成纤维细胞的鉴定($\times 400$) A: 细胞核呈蓝色荧光(DAPI) B: 培养的皮肤成纤维细胞中 Vimentin 蛋白呈阳性反应, 为绿色荧光(FITC) C: 细胞骨架呈红色荧光(Phalloidin) D: A、B、C 的叠加图 图 3 光学显微镜下 iPS-RPE 细胞的分化过程($\times 400$) A: iPSCs 在 MEF 上生长的细胞呈卵圆形克隆球 B: EB 悬浮培养 7 d 后形成带有色素的球状体 C: EB 贴壁培养 1 个月形成 iPS-RPE 细胞形态, 出现多边形 RPE 细胞

呈强阳性表达; 细胞中 Oct4、SSEA3、TRA1-60、TRA1-81 呈强阳性表达, 而 SSEA3 呈微弱阳性表达, 表明 iPSCs 具有胚胎干细胞特性(图 4B)。

2.3 iPSCs 细胞悬液接种后小鼠体内变化

iPSCs 细胞悬液接种到 SCID 小鼠体内约 1 个月可见注射部位有肿块形成。接种后 12 周, 组织病理学检查可见瘤组织为内胚层、中胚层和外胚层的细胞, 证实为畸胎瘤(图 5)。

2.4 正常人皮肤成纤维细胞诱导分化的 iPS-RPE 细胞中 RPE 细胞特异标志物的表达

免疫荧光技术检测显示, 细胞分化 1 个月时 iPS-RPE 细胞中 RPE 细胞特异标志物 RPE65 呈阳性表达; ZO-1 蛋白表达阳性, 呈绿色荧光, 且可见 LRAT 蛋白呈阳性表达(图 6)。

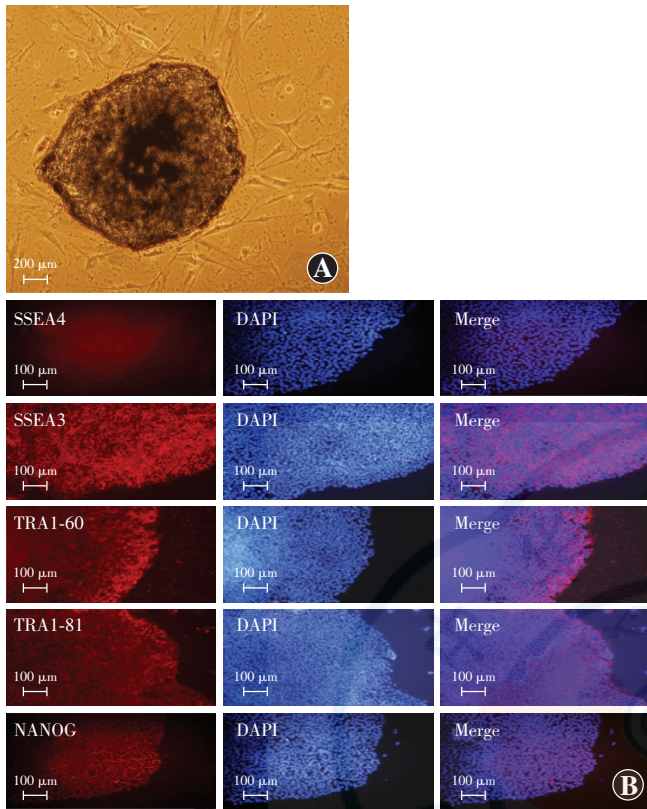


图 4 诱导 iPSCs 的鉴定 A: 诱导 iPSCs 的 AP 染色阳性 (标尺 = 200 μm) B: 诱导 iPSCs 中各细胞表面标志物均呈阳性表达, 呈红色荧光, 细胞核 DAPI 蓝染 (标尺 = 100 μm, ×20)

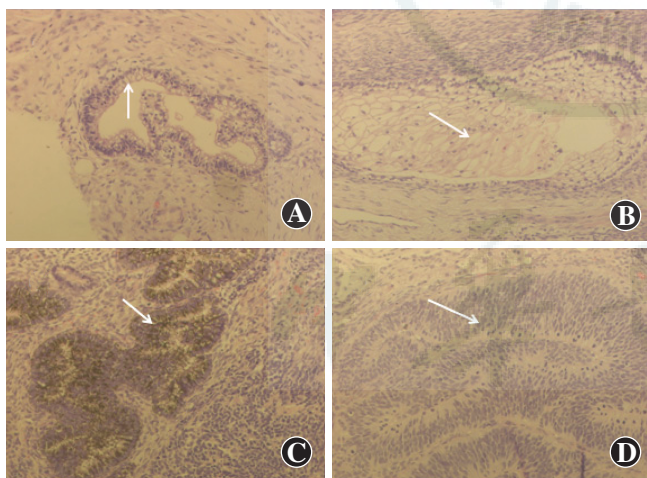


图 5 小鼠注射部位瘤组织的组织病理学检查 (HE 标尺 = 200 μm) A: 内胚层来源的肠上皮组织 (箭头) B: 中胚层来源的脂肪组织 (箭头) C: 外胚层来源的黑色素细胞 (箭头) D: 外胚层来源的神经管上皮组织 (箭头)

3 讨论

目前对 RP 尚无有效的治疗方法, 但 PRE 细胞移植有望给 RP 患者带来福音。目前最有前景的种子细胞来源是 ESCs, 但由于伦理问题的制约和免疫排斥问题, ESCs 的临床应用受到限制, 而利用人体皮肤成纤

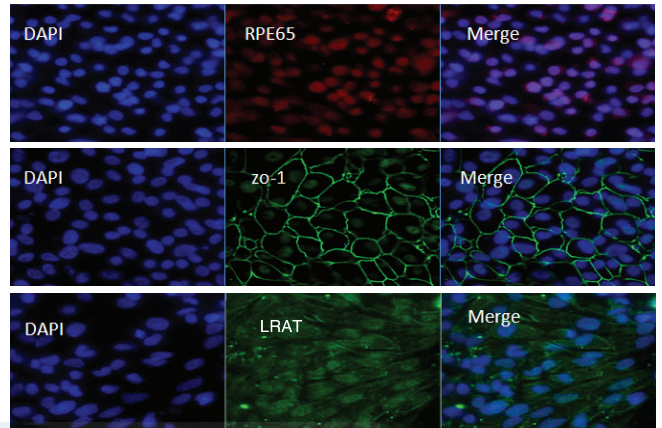


图 6 荧光显微镜下 iPSC-RPE 细胞内特异性蛋白的表达 (×400) 正常人皮肤成纤维细胞诱导的 iPSC-RPE 细胞中 RPE65 和 ZO-1、LRAT 蛋白呈阳性表达, 分别呈红色荧光和绿色荧光 RPE: 视网膜色素上皮

维细胞诱导的人 iPSCs 由于获取方法较为简单和稳定, 且其在技术难度和伦理方面的制约比其他方法更少^[7-8], 因此为干细胞移植治疗 RP 提供了新的思路和方法。人体皮肤成纤维细胞诱导出 iPSCs 的方法是由自体体细胞引入 ESCs 转录因子而成, 不涉及伦理限制和排斥反应带来的问题, 故已成为细胞移植的新来源。研究表明, iPSC-RPE 细胞同样表达原代 RPE 细胞的重要分子标志物, 并具有原代 RPE 细胞的特性, 此外, iPSC-RPE 细胞来自患者自身的体细胞, 其作为治疗源组织有望成为个性化治疗平台^[1,4,9]。

本研究中将取自人体皮肤的体细胞诱导分化成为 iPSCs, 研究对象是基因突变 *SNRNP200* p. S1087L 的 RP 患者。*SNRNP200* p. S1087L 是本课题组首次发现并确定的致病基因, 而 *SNRNP200* 基因参与了前体信使 RNA (pre-messenger RNA 或 pre-mRNA) 的剪接^[10], *SNRNP200* 剪接基因的缺陷在 ADRP 病因学中发挥重要作用。

人皮肤成纤维细胞位于真皮层, 具有较强的分裂和增生能力, 适应性强、易培养、性状稳定、细胞来源充足且取材方便简单, 故本研究中选择人皮肤成纤维细胞作为诱导体细胞, 并用病毒感染法以诱导 iPSCs。本研究中发现, RP 患者皮肤成纤维细胞生长速度较正常人明显缓慢, 而 RP 患者与正常人的主要区别在于患者存在 *SNRNP200* p. S1087L 基因突变点。皮肤成纤维细胞的生长速率缓慢是否与 *SNRNP200* p. S1087L 突变有关, *SNRNP200* p. S1087L 是否除了影响前体信使 RNA 的剪接外还影响细胞的生长等均有待于进一步验证。本研究中还发现, iPSCs 在诱导早期克隆不完全、细胞松散、边界不清、增生速度快且容易分化, 但随着诱导时间的延长, 可逐渐出现具备典型 ESCs 细

胞克隆的 iPSCs。克隆的 iPSCs AP 染色阳性,并能够表达特异性细胞标志物,证明本研究中获得的 iPSCs 具有 ESCs 特性。由于 RP 患者的皮肤成纤维细胞的取材是在一定组织创伤的基础上,因此这些细胞非常珍贵,故本研究中也同时采用了正常人的皮肤成纤维细胞以诱导和分化出 iPS-RPE 细胞,以期探索成熟的研究方法,同时为减少患者的组织创伤、充分利用细胞、提高细胞转化成功率奠定实验基础。本研究中在所得到的正常人 iPSCs 分化 1 个月时能够表达 RPE 细胞的特异标志物 RPE65、ZO-1 和 LRAT。RPE65、ZO-1 和 LRAT 是 RPE 细胞在分化到一定阶段才表达出现的,从而证明了 iPSCs 可以向 RPE 细胞分化。蒋超等^[11]的研究也表明,随着时间的延长,iPS-RPE 细胞中 BEST1、catenin、MerTK 等特异性基因 mRNA 和蛋白水平显著提高。

本研究中观察了 RP 患者皮肤成纤维细胞诱导 iPSCs 及正常人 iPSCs 成功分化为 RPE 细胞过程,有望为 RP 患者 iPSCs 向 RPE 细胞的分化以及 RP 的干细胞疗法提供一定的依据,为研究视网膜疾病的发生和发展及其个体化治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9967) : 509 - 516. DOI:10.1016/S0140-6736(14)61376-3.
- [2] Hiram Y, Osakada F, Takahashi K, et al. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 458 (3) : 126-131. DOI:10.1016/j.neulet.2009.04.035.
- [3] Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, et al. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (10) : 2427-2434. DOI:10.1002/stem.189.
- [4] Song WK, Park KM, Kim HJ, et al. Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients [J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4 (5) : 860-872. DOI:10.1016/j.stemcr.2015.04.005.
- [5] 陈雪,高翔,赵堪兴,等. 目标序列捕获测序发现视网膜色素变性的热点突变 SNRNP200 p. S1087L 及其新临床表型 [J]. *中华眼科杂志*, 2013, 49 (12) : 1104 - 1110. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2013.12.009.
- [6] Chen X, Gao X, Zhao KX, et al. Targeted sequencing identifies a hotspot mutation SNRNP200 p. S1087L correlates with novel phenotypes in retinitis pigmentosa [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2013, 49 (12) : 1104-1110. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2013.12.009.
- [7] Osakada F, Jin ZB, Hirami Y, et al. *In vitro* differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122 (17) : 3169-3179. DOI:10.1242/jcs.050393.
- [8] 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.
- [9] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318 (5858) : 1917-1920.
- [10] Bassuk AG, Zheng A, Li Y, et al. Precision medicine: genetic repair of retinitis pigmentosa in patient-derived stem cells [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 19969 [2015-11-04]. <http://www.nature.com/articles/srep19969>. DOI:10.1038/srep19969.
- [11] Zhao C, Bellur DL, Lu S, et al. Autosomal-dominant retinitis pigmentosa caused by a mutation in SNRNP200, a gene required for unwinding of U4/U6 snRNAs [J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 85 (5) : 617-627. DOI:10.1016/j.ajhg.2009.09.020.
- [12] 蒋超,石厚霞,丁思加,等. mTOR 信号通路在 iPS 定向分化 RPE 细胞中的调控机制研究 [J]. *中华细胞与干细胞杂志:电子版*, 2014, (1) : 36-43. DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2014.01.006.
- [13] Jiang C, Shi HX, Ding SJ, et al. The mechanism of mTOR signaling pathway in the regulation of differentiation of iPS into retinal pigment epithelial cells [J]. *Chin J Cell Stem Cell*, 2014, (1) : 36-43. DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2014.01.006.

(收稿日期:2016-01-21)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

消息

《眼肿瘤眼眶病病例精粹》一书出版发行

《眼肿瘤眼眶病病例精粹》由马建民、尹卫靖教授主编,人民卫生出版社出版全书收集了 6 年在北京同仁医院眼科中心诊治的 46 例临床罕见和较为经典的眼眶肿瘤与眼眶相关疾病的病历资料,以病例报道的形式辑录成书,详细介绍了每个病例的病史、临床表现、影像学检查、特殊检验、组织学检查和免疫组织化学检测结果、诊断和鉴别诊断及治疗过程,系统总结不同眼眶肿瘤疾病诊疗经验,这些疾病的本质和预后,有较高的学术价值和实用价值。

全书撰写 30 余万字,提供相应的影像学和病例图片 360 余,图文并茂,内容翔实,论述规范,可读性强,可作为各级眼科医师和医学学生的参考书。

《眼肿瘤眼眶病病例精粹》一书在国各大新华书店、医药专业书店、人民卫生出版社天猫旗舰店、京东网、当当网、卓越亚马逊网均有销售,读者也可登录人民卫生出版社网站 (<http://www.pmph.com>) 购买,或与人民卫生出版社销售部联系购书联系电话:010-59787226,13910068535,邮购地址:北京市朝阳区潘家园南里 19 号,邮政编码:100021。读者也可与北京同仁医院同仁眼科中心马建民联系购书,地址:北京市东城区东交民巷 1 号北京同仁医院眼科中心,邮政编码:100730。

(马建民)