

·基础研究·

Brugada综合征患者诱导性多能干细胞系的建立

赵乾皓¹, 卢明放², 唐双柏¹, 权力^{1*}, 成建定^{1*}

(1.中山大学中山医学院法医病理学教研室,广东 广州 510080;2.柳州市公安局城中分局刑侦综合大队,广西 柳州 545001)

摘要:【目的】利用 Brugada 综合征患者尿液细胞构建诱导性多能干细胞系(iPSC)。【方法】通过携带有 OCT4、SOX2、KLF4 和 C-MYC 四个转录因子的逆转录病毒感染人尿液细胞,将其诱导成人胚胎干细胞(ESC)样的克隆。根据人胚胎干细胞特性对获得的克隆进行以下鉴定:克隆形态、碱性磷酸酶(AP)活性、多能性基因的表达、核型及体内外分化能力等。【结果】诱导获得的 iPSC 克隆在细胞形态、多能性基因的表达与人胚胎干细胞相似。此外 iPSC 克隆体外悬浮培养形成拟胚胎(EB)并能够分化成 3 个胚层;移植到免疫缺陷鼠体内能够形成向 3 个胚层分化的畸胎瘤。【结论】成功建立了 Brugada 综合征患者 iPSC 细胞系,为 Brugada 综合征的发病机制研究和临床药物筛选提供了良好的细胞模型。

关键词: Brugada 综合征;尿液细胞;诱导性多能干细胞

中图分类号:R541

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2015)04-0526-05

Establishment of An Induced Pluripotent Stem Cell Line from A Patient with Brugada Syndrome

ZHAO Qian-hao¹, LU Ming-fang², TANG Shuang-bo¹, QUAN Li^{1*}, CHENG Jian-ding^{1*}

(1. Department of Forensic Pathology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Liuzhou Public Security Bureau, Liuzhou 545001, China)

Corresponding to: CHENG Jian-ding, E-mail: quanli@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】To establish an induced pluripotent stem cell(iPSC) line from the urinary cell of a patient with Brugada syndrome (BrS). 【Methods】Human urinary cells infected with retrovirus mixture containing OCT4, SOX2, KLF4, and C-MYC genes were induced into ESC-like colonies. The iPSC generated were analyzed for ESC markers: colony morphology, alkaline phosphatase activity, the expression pattern of ESC-marker genes, karyotype and differentiation ability. 【Results】The iPSC generated was similar to ESC in morphology, ESC-marker genes expression and karyotype. Embryoid body-mediated in vitro differentiation of iPSC can form all the 3 germ layers. Subcutaneous injection of iPSC into NOD-SCID mice resulted in teratomas containing tissues from all the 3 germ layers. 【Conclusion】The BrS patient-specific iPSC cell line was successfully established. It was a serviceable model to study the pathogenesis of BrS and develop drug screening assays.

Key words: Brugada syndrome; urinary cells; induced pluripotent stem cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(4):526-530]

1991年,Brugada 兄弟首先报道提出 Brugada 综合征(Brugada syndrome, BrS)。BrS 多见于 35 ~ 40 岁青壮年男性,BrS 病人均无器质性心脏病,心电图上呈现右胸前 V1-V3 导联的持续性 ST 段抬高,右束支传导阻滞。BrS 病例表现为多形性室性

心动过速而导致心跳停止反复发作,进而导致心室颤动。BrS 猝死常发生于夜间睡眠或静息状态时,被认为是青壮年猝死综合征的主要原因之一^[1]。BrS 被认为是一种离子通道疾病,目前已发现 10 个 BrS 可能的致病基因,这些致病基因包括编码

收稿日期:2015-03-27

基金项目:国家自然科学基金(81172901,81430046)

作者简介:赵乾皓,博士研究生,研究方向:心源性猝死,E-mail:spongezhao@163.com; * 通信作者:成建定,博士,教授,博士生导师,E-mail:chengjd@mail.sysu.edu.cn

心脏钠离子通道 α 亚基的结构基因,也有编码 β 亚基和调节因子的调节基因,它们分别是:SCN5A、GPD1-L、CACNA1c、CACNB2、SCN1B、KCNE3、SCN3B、MOG1、KCNE5、KCND3^[2]。2006年,Yamanaka从24种与细胞多能性相关的候选基因中筛选出了4个转录因子(Oct4/Sox2/Klf4/C-Myc,OSKM),并通过逆转录病毒载体将这四个因子导入到小鼠成纤维细胞中,获得的新细胞具有和小鼠胚胎干细胞类似的多能性,将其命名为诱导性多能干细胞^[3]。近年来,诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells,iPSC)的研究取得了突破性的进展。通过质粒转化诱导^[4-5]、蛋白直接诱导^[6-7]、mRNA 转化诱导^[8],均可成功诱导获得 iPSC,非病毒非整合的诱导方式使 iPSC 安全性大大提高,增加了临床应用的可能性。中国科学院广州生物医药与健康研究院成功将来源于人体尿液的尿液细胞重编程为 iPSC^[9],为 iPSC 的细胞来源提供了新的思路。本研究通过逆转录病毒体系感染病人尿液细胞,建立了 BrS 病人特异性的 iPSC 细胞系,为 BrS 的机制研究及药物筛查奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

标本尿液细胞来源于中山大学附属第一医院 BrS 患者的尿液。经患者本人同意及中山大学中山医学院伦理委员会批准后提取标本(批准号 2014 年第 5 号)。实验试剂:DPBS、青霉素/链霉素、高糖 DMEM、DMEM/F12、2.5 g/L 胰酶、胎牛血清、血清替代物(knockout serum replacement, KSR)、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、Trizol 等均购自 Life Tech 公司。重组人成纤维生长因子(bFGF)购自 Peprotech 公司。0.1%明胶、Valproic Acid(VPA)等购自 Millipore 公司。Polybrene 购自 Sigma 公司。Matrigel 购自 BD 公司。mTeSR1 培养基购自 StemCell 公司。REGM 培养基购自 Lonza 公司。CaCl₂、HBS、灭菌水等为自制。AP 染色试剂盒购于碧云天。RT-PCR 试剂盒购于 TAKARA。RT-qPCR 试剂盒购于 BIO-RAD。

1.2 尿液细胞的收集、培养

收集病人中段尿 150 ~ 200 mL 于预先装有 5 mL 青霉素/链霉素的收尿瓶中,离心去上清后用 REGM 培养基重悬后,铺于预先用 0.1%明胶包被

好的六孔板中,置于 37 °C 培养箱中,3 ~ 6 d 后可观察到原代尿液细胞(urinary cell, UC)或克隆。当原代培养细胞的克隆扩大,内部细胞融合至一定程度时即可传代^[9]。

1.3 人 iPSC 细胞系建立

制备携带 OSKM 基因的逆转录病毒及病毒感染尿液细胞以将其诱导为 iPSC。尿液细胞传代至 P2-P4 时,以每孔 6×10^4 个细胞的密度接种到六孔板上,用 293T 细胞包被的携带 OSKM 基因的逆转录病毒感染尿液细胞,感染两次,每次 12 h,同时添加 Polybrene 以提高感染效率。感染后 4 ~ 5 d,当细胞出现核质比增大、聚集等明显变化时,将细胞用 0.25 g/L 胰酶消化,并以每盘 5×10^4 个细胞的密度接种于铺有饲养层细胞的 100 mm 培养皿中。此时培养基为人胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)培养基(DMEM/F12+20% KSR+bFGF+L-谷氨酰胺+非必需氨基酸+ β -巯基乙醇)每天换液。感染后第 6 天,更换培养基为 ESC 培养基+VPA,直至感染后第 12 天。从感染后第 16 天起,可以观察到与 ESC 形态类似的克隆出现。感染后第 22 天后,可机械分离并挑取克隆至 Matrigel 包被的培养板中,用 mTeSR1 培养。

1.4 人 iPSC 细胞系鉴定

①碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染色。AP 染色吸除培养基,用 DPBS 润洗 2 遍;40 g/L 多聚甲醛溶液室温固定 2 min;吸除固定液, TBST 润洗 2 遍;AP buffer 室温平衡 5 min;加入 AP 显色液室温避光显色 15 min;吸除显色液, DPBS 润洗 2 遍,用适量 DPBS 盖住细胞,显微镜下观察并拍照。②Real time-qPCR 分析源于病人尿液细胞的 iPSC 上多能性相关基因的表达情况。采用 Trizol 法提取 ESC、iPSC 和人尿液细胞的总 RNA,并用 RT-qPCR 检测本课题建立的 iPSC 上 OCT4、SOX2、NANOG、REX1 基因的内源表达量(表 1)。③人 iPSC 核型分析。将处于对数生长期的 iPSC 用秋水仙素处理 120 min 后,交由中国科学院广州生物医药与健康研究院完成。④源于尿液细胞的 iPSC 体外分化能力检测。将处于对数生长期的 iPSC 经 Dispase 消化后接种到低粘附的六孔板中,用不含 bFGF 的 ESC 培养基悬浮培养 8 d 后将形成的拟胚体(embryoid body, EB)转移到 Matrigel 包被的六孔板中贴壁培养 8 d。收集培养 16 d 的 EB,并用 Trizol 法提取总 RNA,并用 RT-qPCR 检

测 EB 中外、中、内 3 个胚层的特异性基因的表达情况(表 2)。⑤源于尿液细胞的 iPSC 体内分化能力检测。将处于对数生长期的 iPSC 经 Dispase 消化后制备为 iPSC 悬液,并将其与 Matrigel 混匀,注射到 NOD/SCID 小鼠腹股沟皮下,9~12 周后处死小鼠,摘取畸胎瘤制备石蜡组织切片,对切片进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin stain, HE)染色。

表 1 RT-qPCR 检测多能性基因用引物

Table 1 Primers for RT-qPCR detection of pluripotent gene expression		
Gene	Primer sequence (5' to 3')	Product of PCR/bp
OCT4	F: CTGGGTTGATCCTCGGACCT	243
	R: CCATCGGAGTTGCTCTCCA	
SOX2	F: GCCGAGTGGAACTTTTGTCTG	155
	R: GGCAGCGTGTACTTATCCTTCT	
NANOG	F: TTTGTGGGCCTGAAGAAAACCT	116
	R: AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG	
REX1	F: AGAAACGGGCAAGACAAGAC	116
	R: GCTGACAGGTTCTATTTCCGC	

2 结 果

2.1 病人尿液细胞在体外重编程为 iPSC

病人尿液细胞在体外重编程为 iPSC 的过程

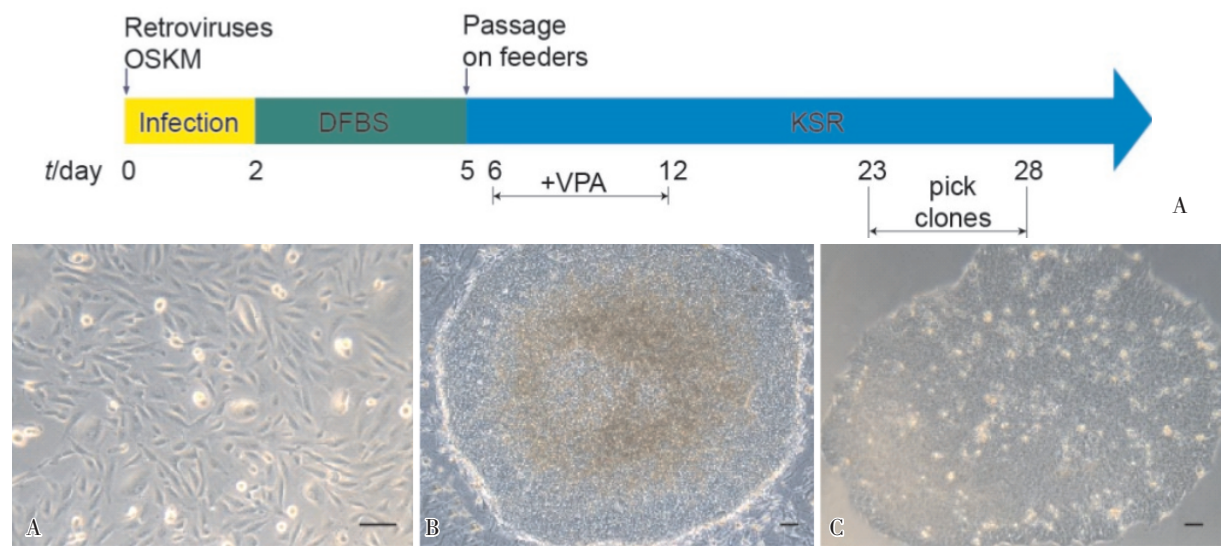
表 2 RT-qPCR 检测 iPSC 体外分化形成 EB 的三胚层特异性引物

Table 2 Primers for RT-qPCR detection of specific gene expression of iPSC-derived EB 3 germ layers		
Gene	Primer sequence (5' to 3')	Product of PCR/bp
GATA4	F: CGACACCCCAATCTCGATATG	117
	R: GTTGACAGATAGTGACCCGT	
ACTC1	F: TCCCATCGAGCATGGTATCAT	238
	R: GGTACGGCCAGAAGCATACA	
PAX6	F: TGGGCAGGTATTACGAGACTG	111
	R: ACTCCGCTTATACTGGGCTA	
SOX1	F: CAGTACAGCCCCATCTCCAAC	287
	R: GCGGGCAAGTACATGCTGA	

如图 1A 所示,病人尿液细胞形态向 ESC 克隆样形态转变的过程如图 1B、图 1C、图 1D 所示。用携带 OSKM 基因的逆转录病毒感染尿液细胞,感染后 4~5 d 可以见到部分尿液细胞核质比明显增大,形态由梭形变为圆形并聚集,病毒感染后 16 d 起,可以见到 ESC 样克隆出现。感染后第 22 天后,克隆足够大时,机械分离并挑取克隆至 Matrigel 包被的培养板中,用 mTeSR1 培养传代,获得稳定的 BrS 患者特异性 iPSC 细胞系。

2.2 病人尿液细胞重编程的 iPSC 的鉴定

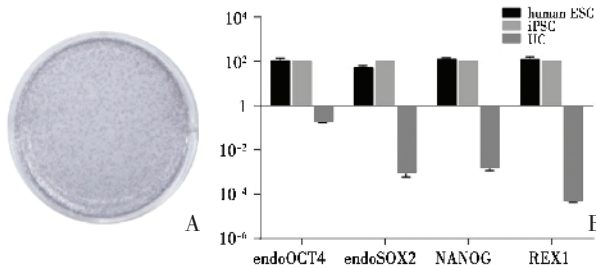
AP 染色挑取的 iPSC 克隆中未分化的克隆



A: Schematic representation of our iPSC generation protocol including windows of treatment valproic acid; B: Phase contrast capture of the urinary cells cultured in REGM medium at passage 1(200 ×); C: Phase contrast capture of the candidate iPSC colony before picked 27 days after 1st infection(100 ×); D:Phase contrast captures of human iPSC derived from urinary cells grown on Matrigel layers (200 ×)

图 1 尿液细胞重编程为 iPSC
Fig.1 Generation of iPSC colonies from urinary cells

AP染色结果为阳性,克隆呈紫红色(图 2A)。RT-qPCR 检测显示,iPSC 的内源性多能性相关基因的相对表达量明显高于尿液细胞,与 ESC 相似(图 2B)。



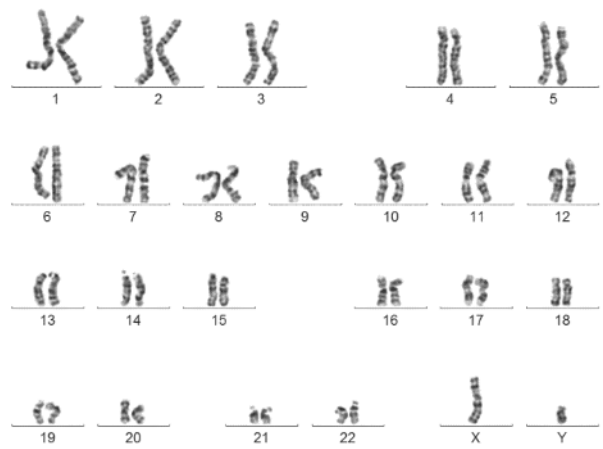
A: The iPSC colonies were all proved alkaline phosphatase positive;
B: The iPSC lines showed reactivation of the endogenous pluripotency-related genes OCT4, SOX2, NANOG and REX1, with similar levels of expression seen in human ESC, analysed by RT-qPCR, urinary cells were used as a negative control.

图2 尿液细胞来源的 iPSC 的多能性检测

Fig.2 The pluripotency detection of urinary cell-derived iPSC

核型鉴定核型鉴定结果显示 iPSC 的核型与正常人细胞核型一致(图 3)。

体内、外分化能力检测:iPSC 在体外通过悬浮培养有形成 EB 的能力,贴壁培养后发生分化,并能表达外、中、内三胚层的标志性基因,RT-qPCR 鉴定结果见图 4A。将 $2 \sim 3 \times 10^6$ 的 iPSC 注射到 NOD-SCID 小鼠的腹股沟皮下,约注射后 4 周可观察到隆起的肿块,注射后 9~12 周处死小鼠,摘取畸胎瘤,组织切片苏木精-伊红染色,镜下可见



The selected iPSC line showed the normal number of chromosomes (23 pairs).

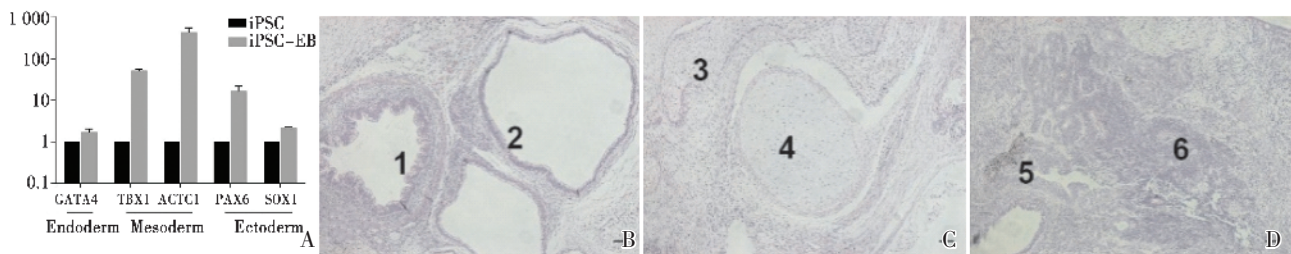
图3 来源于尿液分离细胞的人 iPSC 细胞核型

Fig.3 The karyotype of urinary cell-derived iPSC

上皮组织、软骨组织、神经组织等三胚层结构(图 4B、4C、4D)。

3 讨论

BrS 发病多见于东南亚 35~40 岁青壮年男性,其猝死常发生于夜间睡眠或静息状态时,被认为是青壮年猝死综合征的主要原因之一。目前各种体外细胞模型及体内动物模型已经被用来研究 BrS 的发病机制,然而 BrS 病因复杂,目前仅有约 30% 的病例是有致病性的遗传突变造成的^[10-11]。现有的细胞及动物模型仅能从已发现的一个或多个基因的遗传突变多病例进行研究,无法还原病人特异性的病理生理环境。



A: The iPSC-derived EB contained derivatives of the 3 germ layers as assessed by RT-qPCR analysis of specific markers; B, C, D: The iPSC-generated teratoma differentiated into multiple derivatives of the 3 germ layers. Mark 1 indicates gastrointestinal-like epithelium (endoderm), 2 respiratory-like epithelium (endoderm), 3 adipose tissue (mesoderm), 4 cartilage tissue (mesoderm), 5 pigment epithelium (ectoderm), 6 neural tissue (ectoderm). Scale bar corresponds to 100 μm . $\times 100$

图4 尿液细胞来源的 iPSC 分化形成拟胚体(Embryoidbody, EB)及畸胎瘤

Fig.4 Embryoid body (EB)-mediated differentiation and teratoma generation of urinary cell derived iPSC

本研究用来诱导人多能干细胞的供体细胞为从人尿液中分离得到的细胞^[9],这些细胞主要来自于肾小管上皮^[12]。皮肤成纤维细胞是最早用来诱导人多能干细胞的成体细胞^[13],尿液细胞与之相比,取材方便、无创,且病人配合度较高。另外由于尿液细胞主要来自于肾小管上皮,辐射暴露较成纤维细胞更小,所以由尿液细胞诱导的人多能干细胞携带有体细胞突变及染色体拷贝数异常的概率也更低^[14-15]。本研究利用BrS患者的尿液细胞获得的iPSC具有患者特异性,保留了个体原有的遗传信息,且具有自我更新及多向分化潜能。因此,我们建立的BrS患者特异性iPSC细胞系可为BrS的发病机制研究及临床药物筛查研究提供良好的细胞模型,为BrS的治疗带来了新的希望和契机。

参考文献

- [1] Vatta M, Dumaine R, Varghese G, et al. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome[J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(3):337-345.
- [2] Crotti L, Marcou CA, Tester DJ, et al. Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1- through BrS12-susceptibility genes in a cohort of unrelated patients referred for Brugada syndrome genetic testing: implications for genetic testing [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(15): 1410-1418.
- [3] 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.
- [4] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 949-953.
- [5] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences[J]. *Science*, 2009, 324(5928): 797-801.
- [6] Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 472-476.
- [7] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(5): 381-384.
- [8] Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(4): 376-388.
- [9] Zhou T, Benda C, Duzinger S, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from urine[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(7): 1221-1228.
- [10] Antzelevitch C. Brugada syndrome [J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2006, 29(10): 1130-1159.
- [11] Benito B, Sarkozy A, Mont L, et al. Gender differences in clinical manifestations of Brugada syndrome[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(19): 1567-1573.
- [12] Inoue CN, Sunagawa N, Morimoto T, et al. Reconstruction of tubular structures in three-dimensional collagen gel culture using proximal tubular epithelial cells voided in human urine[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, 39(8-9): 364-367.
- [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] Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency[J]. *Nature*, 2011, 471(7336): 58-62.
- [15] Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2011, 471(7336): 63-67.

(编辑 孙慧兰)