

稳定表达红色荧光蛋白的人胚胎干细胞系的建立

胡菲菲¹, 张 伟¹, 欧阳琦², 王荣根¹, 李 泽¹, 王 冠¹, 王 盈¹, 杨海元¹, 戴一凡^{1*}

(¹南京医科大学江苏省异种移植重点实验室, 江苏 南京 211166; ²中南大学生殖与干细胞工程研究所, 湖南 长沙 410078)

[摘要] 目的:建立可以稳定表达红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)的人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)系。方法:优化核转染方法后,将 RFP 表达载体 pEF1 α -DsRed-Express2 导入 hESCs 中。利用碱性磷酸酶染色、RT-PCR、免疫荧光染色和类胚体形等方法,比较核转染前后 hESCs 的干细胞特性。结果:核转染后 hESCs 的碱性磷酸酶染色结果为阳性。核转染前后 hESCs 的 Oct4、Sox2、Klf4、Nanog 基因的表达未出现明显差异。RFP-hESCs 具有三胚层分化潜能,并且可稳定传 30 代以上。结论:成功建立稳定表达红色荧光蛋白的 hESCs,干细胞特性不受 RFP 的影响,可用于后续的实验研究。

[关键词] 人胚胎干细胞;核转染;红色荧光蛋白;类胚体

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)07-868-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160722

Establishment of human embryonic stem cell line stably expressing red fluorescent protein

Hu Feifei¹, Zhang Wei¹, Ouyang Qi², Wang Ronggen¹, Li Ze¹, Wang Guan¹, Wang Ying¹, Yang Haiyuan¹, Dai Yifan^{1*}

(¹Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, NJMU, Nanjing 211166; ²Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha 410078, China)

[Abstract] **Objective:** To establish human embryonic stem cell(hESC)lines labeled with red fluorescent protein(RFP). **Methods:** The RFP expression vector pEF1 α -DsRed-Express2 was transfected into hESCs by optimized nucleofection method. Alkaline phosphatase (AP) staining, RT-PCR, immunofluorescent staining and embryoid body(EB) formation were performed to compare the characteristics of hESCs before and after nucleofection. **Results:** AP staining of RFP-hESCs was positive. The expression of Oct4, Sox2, Klf4 and Nanog of hESCs were no difference before and after nucleofection ($P > 0.05$). RFP-hESCs could differentiate into the three germ layers and could stably passage over 30 generations. **Conclusion:** hESC cell lines stably expressing RFP has been successfully established in this study. RFP does not affect the pluripotency properties of hESCs. The cell lines can be used as seed cells for subsequent research.

[Key words] human embryonic stem cells; nuclear transfection; red fluorescent protein; embryonic body

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07): 868-873]

1998年, Thomson 从内细胞团分离、建立了具有多向分化潜能和自我更新能力的人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)系,为细胞移植治疗、疾病模型建立提供了十分重要的细胞资源^[1-4]。为有效观察和追踪 hESCs 的增殖和分化过程,需对 hESCs 进行标记。目前应用较广的是荧光标记和荧光素酶标记^[5-7],其中研究人员采用最多的

是荧光转基因技术。

红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)是来源于珊瑚纲动物的一类标记物。与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)相比,其激发和发射波长更长、发光效率高、耐光性强、细胞内成像背景低、对多 pH 值耐受力强。RFP 对干细胞活力和完整性影响小,因此可作为较理想的 hESCs 荧光标记物^[8-9]。然而 hESCs 的细胞状态不稳定,培养过程中容易分化,表达外源基因困难^[10-12],目前国内尚无建立稳定表达 RFP 的 hESCs 系的报道。

[基金项目] 江苏省异种移植重点实验室科研经费(BM2012116)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: daiyifan@njmu.edu.cn

本研究通过转染外源基因 RFP,建立了稳定表达 RFP 的 hESCs 细胞系,并通过碱性磷酸酶染色、干细胞特异性因子检测和类胚体形成实验证明了其干细胞特异性因子的表达未受明显影响,并仍具有三胚层分化的潜能。RFP 标记的 hESCs 的建立为后续研究 hESCs 的增殖和分化机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用 hESCs 由中南大学生殖与干细胞研究所惠赠;小鼠胚胎成纤维细胞(MEF,南京大学模式动物所);人胚胎成纤维细胞(HEF,上海拜力生物有限公司)。mTeSRTM1 和 BD Matrigel™(Stem Cell 公

司,加拿大);DMEM/F12、PBS、青链霉素、胰酶、非必需氨基酸 (NEAA,100×)、胎牛血清、KnockOut™ 血清替代物(KSR)、G418(Gibco 公司,美国);β-巯基乙醇、牛血清白蛋白(BSA)、二甲基亚砷(DMSO)、Accutase 细胞消化液、DAPI(Sigma 公司,美国);丝裂霉素(Wako 公司,日本);反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);Bas I -HF 限制性内切酶(NEB 公司,美国);pEF1α-DsRed-Express2 载体质粒(大连宝生物工程公司);DH5α 感受态和质粒提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);碱性磷酸酶检测试剂盒(Promega 公司,美国);人干细胞 Nucleofector®核转染试剂(Lonza 公司,美国)。细胞免疫荧光抗体来源见表 1。

表 1 细胞免疫荧光抗体

Table 1 Antibodies used in the immunostaining

抗原	一抗	二抗
Oct4	Rabbit anti-Oct3/4 (Santa Cruz 公司,美国)	Phodamine conjugated affinity purified anti-rabbit IgG (RockLand公司,美国)
Nanog	Mouse anti-Nanog (Millipore 公司,美国)	Goat anti-mouse IgG (Life 公司,美国)
Sox2	Mouse anti-Sox2 (Calbiochem 公司,美国)	Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG (Life 公司,美国)
Klf4	Mouse anti-Klf4 (Millipore 公司,美国)	Phodamine conjugated affinity purified anti-rabbit IgG (RockLand公司,美国)
Tra1-60	Mouse anti-Tra1-60 (Millipore 公司,美国)	Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG (Life 公司,美国)
Neurofilament	Mouse anti-Neurofilament (Millipore 公司,美国)	Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG (Life 公司,美国)
Keratin	Mouse anti-Keratin (Millipore 公司,美国)	Goat anti-mouse IgG (Life 公司,美国)
Desmin	Mouse anti-Desmin (Millipore 公司,美国)	Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG (Life 公司,美国)
C-myc	Mouse anti-C-myc(Sigma 公司,美国)	FITC goat anti-mouse IgG(Abcn 公司,美国)

1.2 方法

1.2.1 载体质粒的提取和酶切

挑取含 pEF1α-DsRed-Express2 载体质粒的单克隆菌落于 LB 液体培养液中,于 37℃恒温摇床上 220 r/min,震荡培养 12~14 h。按照质粒抽提试剂盒说明书,提取 pEF1α-DsRed-Express2 质粒,并用 Bas I -HF 37℃酶切进行鉴定。

1.2.2 细胞培养和转染

hESCs 培养于含有 mTeSRTM1 培养液、BD Matrigel™ 预处理的 6 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。待细胞密度达到 70%~80%,按人干细胞核转染试剂盒步骤进行核转染,其中转染条件是由仪器说明书提供的最优 B-16 转染条件。转染 24 h 后换液,用终浓度为 50 μg/mL 的 G418 进行筛选。核转染后 24、48 h,在荧光显微镜下观察红色荧光表达。

1.2.3 碱性磷酸酶染色

分别取传代后第 3 天的 hESCs 和 RFP-hESCs,用碱性磷酸酶作用底物 BCIP/NBT 进行染色。具体操作严格按试剂盒说明书进行。室温放置 30 min 后,两

组细胞克隆逐渐呈蓝紫色,用 PBS 洗涤。在光学显微镜下观察和分析两组细胞碱性磷酸酶染色结果。

1.2.4 RT-PCR

用 TRIzol (Invitrogen 公司,美国)试剂提取 hESCs、RFP-hESCs、HEF 和类胚体细胞的总 RNA, Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度和纯度。按反转录试剂盒说明书,分别合成相应的 cDNA。以 cDNA 为模板,利用干细胞特异性引物和三胚层细胞特异性引物(表 2)进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 7 min;4℃ 保存。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭显色后,用凝胶成像仪拍照并观察和分析结果。

1.2.5 细胞免疫荧光

取生长状态良好的 hESCs、RFP-hESCs 和类胚体细胞,用 4%多聚甲醛固定 10 min,PBS 冲洗干净。用 1% Triton X-100 作用 1 h,10%山羊血清室温封闭 1 h。滴加稀释的干细胞特异性抗体和三胚层细胞特异性抗体(表 2),4℃孵育过夜。PBS 冲洗后,室温避光孵育荧光标记的二抗 1 h。PBS 清洗 2 遍,

表 2 PCR 引物序列
Table 2 Primer sequences of PCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Oct4	CCTCACTTCACTGCCTGTA	CAGGTTTCTTTCCCTAGCT
Sox2	CCCAGCAGACTTCACATGT	CCTCCCATTTCCCTCGTTTT
Rex1	CCCTTCTTGAAGGTTTACAC	TCGCTGAGCTGAAACAAATG
Nanog	TGAACCTCAGCTACAAACAG	TGCTGGTAGGAAGAGTAAAG
Nestin	GCGTTGGAACAGAGGTTGGA	TGGGAGCAAAGATCCAAGAC
β-III Tublin	CAGAGCAAGAACAGCAGCTACTT	GTGAACTCCATCTCGTCCATGCCCTC
Amylase	GGAGAGATACCAACCAGTGA	ACCAGTTGGTGTGTTAGGTTG
Enolase	GAGACAAATCTCGCTAGGTTG	TGGAGACCACAGGATAGTTC
Afp	ATTGGCAAAGCGAAGCTG	GCTGTGGCTGCCATTTTT
Tbx1	AGCGAGAAATATGCCGAGG	TTCGCGAAGGGATTGCT
Pax6	TTGCTTGGGAAATCCGAG	TTCGCGAAGGGATTGCT

加入 DAPI 室温孵育 3 min。避光条件下, 荧光显微镜拍照并观察和分析结果。

1.2.6 类胚体形成实验

悬浮培养:取生长状态良好的 RFP-hESCs, 机械切割细胞克隆, 收集切割后的细胞团块并接种到超低粘附 6 孔板中。在去除碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的人 ES 培养液中培养, 每 2 d 换 1 次培养液, 观察类胚体的形成。

贴壁培养:将悬浮培养形成的拟胚体(EB)转移至含有 mTeSRTM1 培养液、BD Matrigel™ 预处理的 6 孔板中。置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养。每天更换培养基, 镜下观察类胚体形成。

2 结果

2.1 建立 RFP-hESCs 细胞系

根据预实验的结果, 确定转染效率为 (37.27±1.85)% 的 B-16 核转染程序为最佳。在最佳的核转染条件下, pEF1α-DsRed-Express2 载体质粒转染 hESCs, 24 h 后检测到强烈的红色荧光蛋白的表达(图 1)。通过 G418 药物筛选, 得到稳定表达 RFP 的 hESCs。转染后的细胞传到第 45 代(P45), 红色荧光仍然十分强烈(图 2)。说明建立了能够稳定表达 RFP 和连续传代的 RFP-hESCs 细胞系。

2.2 RFP-hESCs 细胞系可有效表达干细胞特异性因子

核转染后 hESCs 的形态与转染前比较, 并没有明显变化。对 hESCs 和 RFP-hESCs 进行碱性磷酸酶染色, 两组细胞的染色结果均为阳性(图 3)。用免疫荧光染色检测 hESCs 和 RFP-hESCs 这两组细胞, 结果显示两组细胞的干细胞特异性蛋白 Nanog、Klf4、Tra1-60、Sox2、c-myc、Oct4 等均为阳性, 其表达水平无明显差别(图 4)。进一步通过 RT-PCR 检测干细

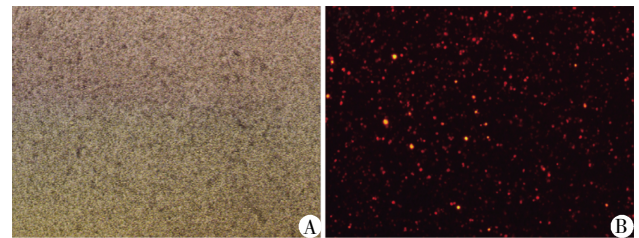


图 1 明视野(A)和暗视野(B)下核转染 24 h 后 hESCs 的形态(×40)

Figure 1 Morphology of hESCs after 24 hours of nucleofection (×40)

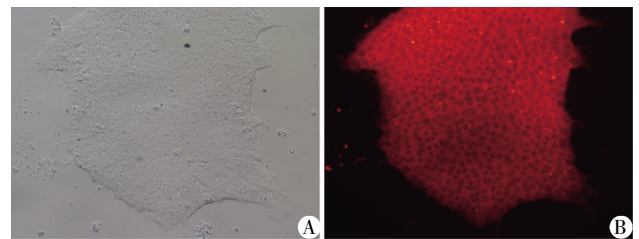


图 2 RFP-hESCs 形态(A)及荧光镜下(B)红色荧光蛋白表达情况(×100)

Figure 2 Morphology of hESCs and red fluorescent protein expression of RFP-hESCs(×100)

胞特异性表达基因, hESCs 和 RFP-hESCs 两组细胞均可表达 Oct4、Nanog、Sox2、Rex1 等因子(图 5)。以上结果均显示 RFP-hESCs 细胞系具有干细胞特性, 而且通过核转染技术导入外源基因 RFP 后不影响干细胞的特性。

2.3 RFP-hESCs 有三胚层分化潜能

RFP-hESCs 进行体外分化, 悬浮培养第 8 天, 可见细胞聚集成团, 呈边缘清晰的球形(图 6A)。EB 细胞贴壁培养第 3 天, 镜下可见 EB 细胞分化为神经元细胞(图 6B)。通过 RT-PCR 检测三胚层细胞特异性表达基因, Afp、Amylase、Tbx1、Enolase 和 Pax6 在 RFP-hESCs 分化来源的 EB 中有特异性基因表达

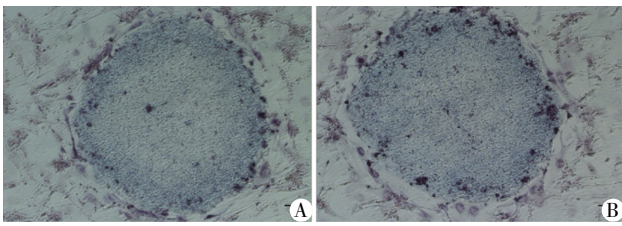


图 3 核转染前(A)与核转染后(B)人胚胎干细胞碱性磷酸酶染色($\times 100$)

Figure 3 Alkaline phosphatase staining of hESCs before and after nucleofection($\times 100$)

(图 6C)。进一步做免疫荧光染色,RFP-hESCs 形成的 EB 细胞中有三胚层特异性蛋白 Desmin、Cytokeratin 和 Neurofilament 的表达(图 6D)。核转染前后 hESCs 形成类胚体的时间也没有明显差别,均在悬浮培养第 2 周左右形成类胚体。这些结果均表明 RFP-hESCs 细胞系具有三胚层分化的潜能,说明通过核转染技术导入外源基因 RFP 后不影响干细胞的分化潜能。

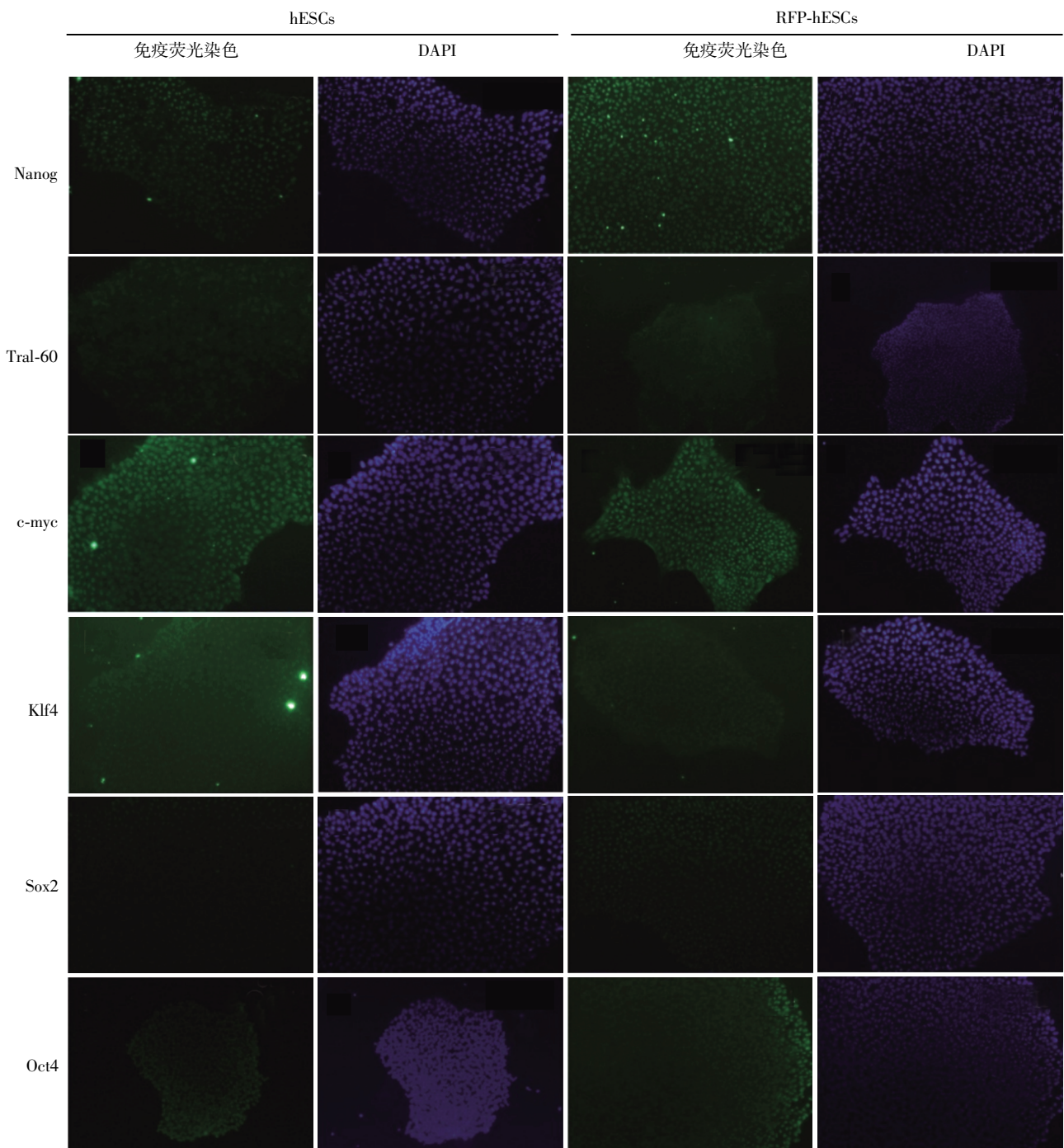


图 4 核转染前后细胞特异性免疫荧光检测($\times 100$)

Figure 4 Immunostaining of ESC markers of RFP-hESCs before and after nucleofection($\times 100$)

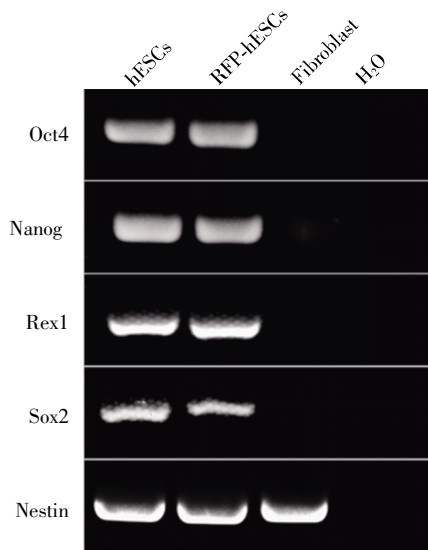
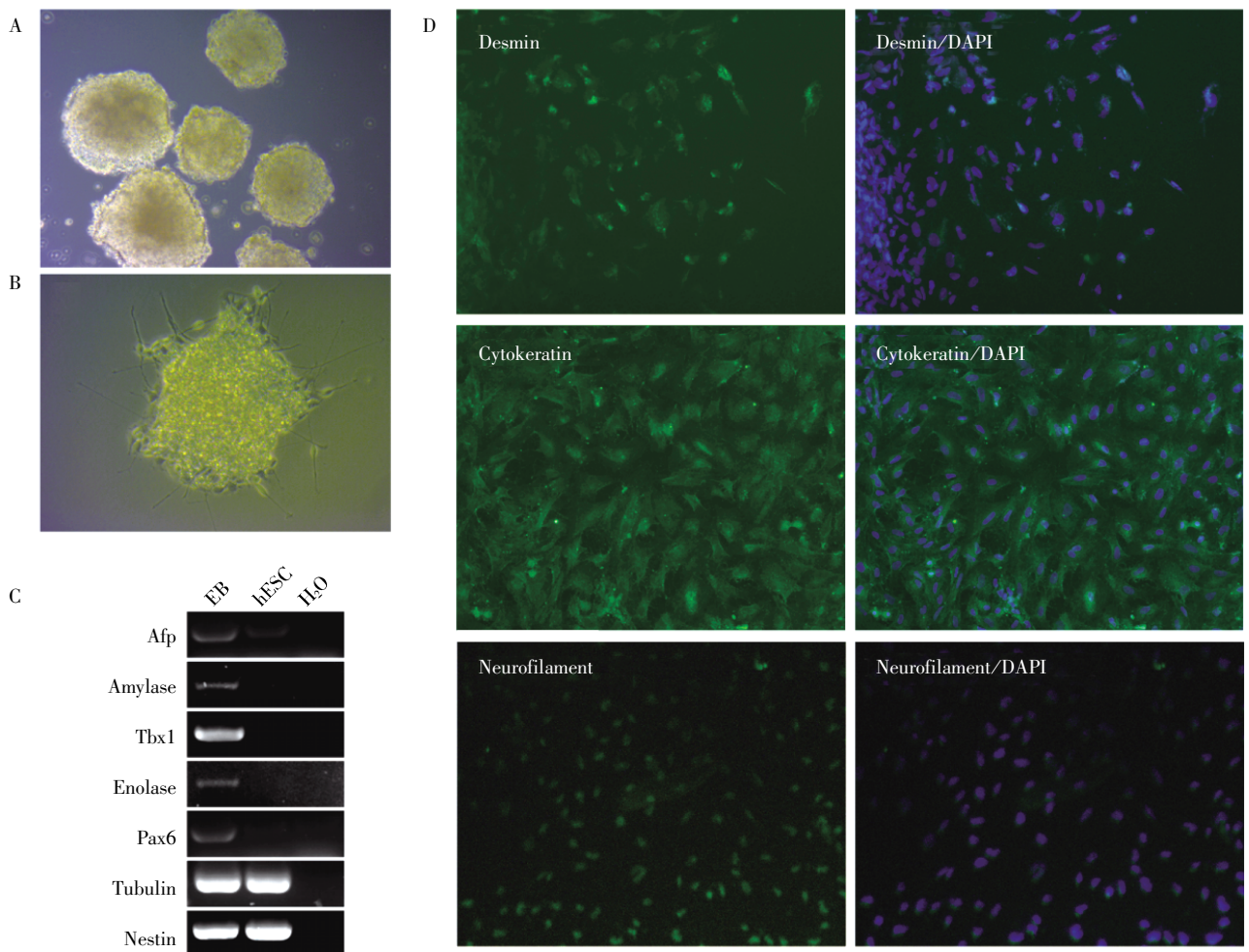


图 5 RT-PCR 检测核转染前后干细胞特异性基因表达
Figure 5 RT-PCR analysis of ESC marker genes of RFP-hESCs before and after nucleofection

3 讨论

hESCs 在再生医学和疾病模型研究中有巨大前景,自发现以来一直是医学研究的热点。建立荧光标记的 hESCs 无疑将推动其增殖和分化的研究。Matz 等^[13]于 1999 年在珊瑚虫中分离出 RFP,被广泛用于标记各种类型细胞,可以与 GFP 在示踪细胞过程中起到互补作用。本研究通过转染 pEF1 α -DsRed-Express2 载体,获得了表达 RFP 的 hESCs,并建立了可以在体外稳定培养 30 代以上的 RFP-hESCs 细胞系。这与 pEF1 α 启动子可有效启动外源基因 RFP 在 hESCs 的稳定表达有关。在此之前,本课题组曾选用 CMV 启动子对 hESCs 进行 RFP 标记,由于转染后启动子沉默或外源基因不能整合到目的细胞的基因组中,导致其表达效率很低。在后续实验中需进一步探讨外源基因转染效率。Hohenstein 等^[14]发



A: RFP-hESCs 分化的类胚体,悬浮培养 8 d ($\times 100$); B: RFP-hESCs 分化的类胚体,贴壁培养 3 d ($\times 100$); C: RT-PCR 检测 RFP-hESCs 形成 EB 三胚层特异性基因表达; D: 细胞免疫荧光检测 RFP-hESCs 形成 EB 三胚层分化情况 ($\times 200$)。

图 6 RFP-hESCs 类胚体形成检测

Figure 6 *In vitro* embryoid bodies formation by RFP-hESCs

现添加神经生长因子(NTs)能够使 CMV 启动子有效驱动干细胞中 GFP 的表达。这提示可以在后续实验中添加小分子物质来提高外源基因的转染效率。

本研究通过碱性磷酸酶染色和细胞免疫荧光实验,证明了通过核转导入外源基因 RFP 对干细胞因子的表达没有明显影响。RFP-hESCs 类胚体形成实验表明 RFP-hESCs 具有干细胞多向分化潜能,并且核转染前后干细胞形成类胚体的时间没有明显差异,进一步表明了核转染 RFP 标记过程未影响其分化潜能。RFP-hESCs 可体外分化成神经细胞,为细胞治疗的研究提供了细胞资源。

综上所述,本研究通过核转染技术获得了稳定表达 RFP 的转基因 hESCs,通过碱性磷酸酶染色、干细胞多能性因子检测和类胚体形成证明了其具有多能性,该细胞系可用于后续的实验研究。

[参考文献]

[1] Thomson JA,Itskovitz-Eldor J,Shapiro SS,et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science,1998,282(5391):1145-1147

[2] Strulovici Y,Leopold PL,O'connor TP,et al. Human embryonic stem cells and gene therapy[J]. Mol Ther,2007,15(5):850-866

[3] Hartman ME,Dai DF,Laflamme MA. Human pluripotent stem cells:Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair[J]. Adv Drug Deliv Rev,2016,96:3-17

[4] Seah YF,El Farran CA,Warrier T,et al. Induced pluripotency and gene editing in disease modelling:perspectives and challenges[J]. Int J Mol Sci,2015,16(12):28614-

28634

[5] Cao F,Xie X,Gollan T,et al. Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells [J]. Mol Imaging Biol,2010,12(1):15-24

[6] Liew CG,Draper JS,Walsh J,et al. Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells[J]. Stem Cells,2007,25(6):1521-1528

[7] 蔡柳洪,周灿权,张 滨. 荧光素酶标记转基因人胚胎干细胞的活体观察[J]. 中山大学学报(医学科学版),2009,30(2):174-178

[8] 樊晋宇,崔宗强,张先恩. 红色荧光蛋白的光谱多样性及体外分子进化[J]. 生物化学与生物物理进展,2008,35(10):1112-1120

[9] 郝丽梅,李唐棣,梅兴国. 红色荧光蛋白的研究进展[J]. 国外医学:药学分册,2006,33(2):131-133,136

[10] Lerou PH,Daley GQ. Therapeutic potential of embryonic stem cells[J]. Blood Rev,2005,19(6):321-331

[11] Kobayashi N,Rivas-Carrillo JD,Soto-Gutierrez A,et al. Gene delivery to embryonic stem cells[J]. Birth Defects Res C Embryo Today,2005,75(1):10-18

[12] Yates F,Daley GQ. Progress and prospects:gene transfer into embryonic stem cells[J]. Gene Ther,2006,13(20):1431-1439

[13] Matz MV,Fradkov AF,Labas YA,et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species[J]. Nat Biotechnol,1999,17(10):969-973

[14] Hohenstein KA,Pyle AD,Chern JY,et al. Nucleofection mediates high-efficiency stable gene knockdown and transgene expression in human embryonic stem cells[J]. Stem Cells,2008,26(6):1436-1443

[收稿日期] 2016-03-20

(上接第 857 页)

cases[J]. Prenat Diagn,2000,20(3):224-228

[5] 李秋明,廖 灿,马小燕,等. 超声引导经腹脐血管穿刺术的应用 1490 例分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2002,10(6):64-65

[6] 马小燕,李秋明,关步云. 超声引导下经皮脐静脉穿刺术的应用[J]. 实用妇产科杂志,2003,19(4):250-251

[7] Buscaglia M,Ghisoni L,Bellotti M,et al. Percutaneous umbilical blood sampling:indication changes and procedure loss rate in a nine years' experience[J]. Fetal Diagn

Ther,1996,11(2):106-113

[8] 陈 铮,顾京红,黄亚娟. 283 例脐血管穿刺诊断胎儿染色体异常临床分析[J]. 实用妇产科杂志,2010,26(1):30-32

[9] 余金泉,方 群. 羊水过多和过少与染色体异常关系的研究[J]. 现代生物医学进展,2006,6(11):74-75,81

[10] 高风云,吴青青. 肠管回声增强与妊娠结局的相关性分析[J]. 中国妇产科临床杂志,2012,13(3):207-208

[收稿日期] 2015-07-27