

建立稳定表达猪 LIF 蛋白的小鼠 STO 细胞系

陈 袁,赵丽华,杨 宁,张曼玲,金 永,侯道荣,吴兆强,李艳如,姜海滨,李荣凤*

(南京医科大学江苏省异种移植重点实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:在 STO 小鼠成纤维细胞中表达猪白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF),并尝试使用其作为饲养层培养大鼠诱导多能性干细胞(iPS 细胞)。方法:通过脂质体转染的技术,将已构建的猪 LIF 基因真核表达载体 pCAG-pLIF 转染至小鼠 STO 细胞中,获得能够稳定表达猪 LIF 的转基因 STO 细胞(STO-pLIF 细胞)。通过 RT-PCR、qPCR、Western blot 等方法检测 STO-pLIF 细胞中猪 LIF 基因的表达量,选择高效表达猪 LIF 的 STO-pLIF 细胞作为饲养层,培养大鼠 iPS 细胞。通过生长曲线检测、碱性磷酸酶染色、干细胞多能因子的 RT-PCR 和免疫荧光染色等方法,检验 STO-pLIF 细胞饲养层在大鼠 iPS 细胞培养方面的功能。结果:STO-pLIF 细胞中 LIF RNA 和蛋白表达水平平均上调($P < 0.05$),而该细胞系作为饲养层所培养的大鼠 iPS 细胞在形态、多能性因子表达方面更接近于传统培养的大鼠 iPS 细胞,与无外源添加 LIF 所培养的大鼠 iPS 存在差异($P < 0.05$)。结论:成功获得了稳定表达猪 LIF 基因的 STO-pLIF 细胞,并证明该细胞作为饲养层在大鼠 iPS 细胞培养中具有一定优势。

[关键词] 猪白血病抑制因子;小鼠 STO 细胞;饲养层细胞;大鼠 iPS 细胞

[中图分类号] Q813

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-897-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20160801

Establishment of STO cell lines expressing porcine leukemia inhibitory factor

Chen Yuan, Zhao Lihua, Yang Ning, Zhang Manling, Jin Yong, Hou Daorong, Wu Zhaoqiang, Li Yanru, Jiang Haibin, Li Rongfeng*

(Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the STO cell lines expressing the recombinant porcine leukemia inhibitory factor(LIF)and try to culture the rat induced pluripotency stem cells (riPSCs)with the established STO-pLIF cells as the feeder layer. **Methods:** We established the stable STO cell lines (STO-pLIF cells) which express LIF gene effectively by lipofectin transfection with the pig LIF eukaryotic expression vector pCAG-pLIF. The expression level of the inserted exogenous LIF gene was tested by RT-PCR, qPCR and Western blot. The cell lines which expressed pig LIF efficiently were used as the feeder cells to culture the riPSCs. Besides the RT-PCR testing the pluripotency factors, we also undertook the growth curve and the alkaline phosphates expressions detection as well as the immunocytofluorescent to identify the pluripotency of the riPSCs. **Results:** The expression level of the inserted exogenous LIF gene of the STO-pLIF cell lines was higher than that of the STO ($P < 0.05$), and the riPSCs cultured with the STO-pLIF were close to the traditional riPSCs, and had difference with the riPSCs cultured with the N2B27 without LIF($P < 0.05$). **Conclusion:** The stable STO cell lines effectively expressing porcine recombinant porcine leukemia inhibitory factor were established successfully and these cells can maintain the pluripotency and self renew of riPSCs as the feeder cells.

[Keywords] porcine leukemia inhibitory factor; STO cells; feeder cells; rat induced pluripotency stem cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 897-904]

白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)因能诱导白血病细胞株 M1 细胞向正常细胞分化而得名,属于白介素-6 家族,是一种多功能的分泌性蛋白^[1]。LIF 蛋白通过与其受体结合,形成 LIFR

和 GP-130^[2-3]异源二聚体,激活 STAT3 信号通路,使其磷酸化^[4-5],从而进一步激活下游转录因子的表达。经 LIF 磷酸化的 STAT3 通路能够有效抑制胚胎干细胞分化^[6],维持其未分化状态,保持其全能性。

猪作为研究人类多种疾病的生物模型,在体型和代谢等方面都与人类相似,是当前比较理想的模式动物。对于猪胚胎干细胞的研究最早始于 1990

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31371487)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:lirf01@126.com

年^[7]。2009 年,科学家又将胚胎干细胞分为 naive 胚胎干细胞和 primed 胚胎干细胞^[8]。建立真正的胚胎干细胞系,拥有一个安全稳定且高效的培养体系尤其重要,尽管目前已有部分 naive 猪胚胎干细胞建系成功^[9-10],然而要获得真正能够达到生殖系嵌合的猪 naive 胚胎干细胞系仍需继续探索。真正的猪 naive 胚胎干细胞建系困难的原因之一可能是尚未使用猪源的 LIF 蛋白辅助猪胚胎干细胞的培养,尽管氨基酸比对结果显示人、小鼠的 LIF 基因与猪 LIF 基因的同源性高达 87% 和 78%^[11],但是我们推测由于种系来源不同,猪 LIF 蛋白可能在抑制猪 naive 胚胎干细胞分化、维持其全能性方面具有更优效果。以往研究中普遍使用的饲养层细胞主要有小鼠胚胎成纤维细胞(MEF 细胞)^[12]和 SIM 小鼠成纤维细胞耐硫代鸟嘌呤和耐鸟苯苷亚系(STO 细胞)^[13]。作为饲养层细胞,MEF 细胞生长速度慢且使用代次受限,而 STO 细胞作为饲养层可在体外长期培养,生长速度快且能大量扩培,使用更加方便,是目前用于培养多种动物干细胞及杂交瘤细胞的主要细胞系。然而尽管 STO 细胞系有少量鼠源 LIF 分泌,但仍不足以维持干细胞的未分化状态还需外源添加,故建立猪 naive 胚胎干细胞急需探索一种新型高效的饲养层细胞系。

因此,本研究旨在通过脂质体转染技术,将已构建的猪 LIF 真核表达载体,转染至小鼠 STO 细胞中,并经过药物筛选获得能够稳定表达重组猪 LIF 的 STO 饲养层细胞(STO-pLIF 细胞)。然后,利用 STO-pLIF 饲养层培养大鼠多能性干细胞(iPS 细胞),验证其在干细胞培养中的功能,从而为建立真正的猪 naive 胚胎干细胞的培养体系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

高糖 DMEM、DMEM/F12、Neurobasal、N2、B27 培养液,磷酸盐缓冲液(PBS),青链霉素,0.25% Trypsin-EDTA, G418, Lipofectamine 2000 (Gibco 公司,美国); HRP 标记的羊抗小鼠 IgG (H+L) 二抗(Thermo 公司,美国);胎牛血清(SV30087, Hyclone 公司,美国);胰岛素(Roche 公司,瑞士);L-谷氨酰胺,2-巯基乙醇,牛血清白蛋白(BSA), Gelatin, DMSO, PD0325901, CHIR99021, Monoclonal Anti- α -Tubulin antibody produced in mouse (Sigma 公司,美国);丝裂霉素(134-07911, Wako 公司,日本);鼠源白血病抑制因子 mLIF 和碱性磷酸酶检测试剂盒(SCR004, Millipore 公司,

美国);Taq Master Mix(南京 Vazyme 公司);各种限制性内切酶, EX Taq, DNA marker, RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus, Recombinant DNase I (RNase-free) 试剂盒和 High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit 等(大连宝生物公司);质粒小量及大量提取试剂盒(北京天根公司);Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega 公司,美国);LIF (sc-48575, Santa Cruz 公司,美国);Potent ECL Kit (P1425, 杭州联科生物公司);OCT4 抗体(Santa Cruz 公司,美国);Nanog 抗体(Merck Millipore 公司,德国);SOX2 抗体(Calbiochem 公司,德国);羊抗兔 IgG FITC 抗体,羊抗鼠 IgG FITC 抗体(Abcam 公司,英国)。细胞培养箱(NU-4250E, Thermo 公司,美国),荧光定量 PCR 仪(Light-Cycler96, Roche 公司,瑞士),高速冷冻离心机(5417R, Eppendorf 公司,德国),显微镜(eclipse, Nikon 公司,日本),凝胶成像仪(Bio-Red 公司,美国),流式细胞仪(BD 公司,美国)。MEF 细胞、大鼠心肌成纤维细胞(REF 细胞)和 pCAG-LIF 质粒为本实验室自主制备或构建,小鼠 STO 细胞(中国科学院细胞所),菌株 DH5 α (北京天根公司)。

1.2 方法

1.2.1 稳定表达猪 LIF 基因的 STO 细胞系的建立

将 pCAG-LIF 质粒转化至菌株 DH5 α 中,并使用无内毒素质粒大提试剂盒(DP117),按照说明书提取重组 LIF 表达载体质粒 pCAG-pLIF;使用 *Bgl* II 限制性内切酶,按照说明书对提取的 pCAG-LIF 质粒进行线性化,取 1 μ L 酶切后的 pCAG-LIF 质粒进行琼脂糖凝胶电泳,确认质粒已经被完全线性化,再利用乙醇沉淀法对剩余线性化质粒进行沉淀回收,使用分光光度计检测质粒浓度和纯度,储存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

利用 Lipofectamine 2000 基因转染试剂盒,用纯化后的线性化重组表达载体转染小鼠 STO 细胞。按照 1×10^5 个/皿的细胞量接种于 10 cm 培养皿中,同时以未经转染的 STO 细胞为阴性对照,培养 24 h 后进行 G418 药物筛选。以初始药物浓度 500 μ g/mL G418 筛选 7~8 d,待阴性对照组中细胞被完全杀死后,药物浓度降至 200 μ g/mL 维持筛选 2~3 d;待皿中单个细胞克隆均长至含 200~300 个细胞时,利用细胞铲去除培养皿中杂细胞,并利用 0.05% 胰蛋白酶消化收集多克隆细胞,命名为 STO-pLIF 细胞,并对来源于各培养皿的细胞分别编号。将细胞传代至 10 cm 细胞培养皿中培养,待细胞汇合度达到 90% 左右时,利用 0.05% 的胰蛋白酶消化收集细胞,取少

量细胞继续传代培养,以供检测猪 LIF RNA 水平及 LIF 蛋白表达水平 (STO-pLIF 细胞系转染后均继续培养 3 代),其余冻存备用。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 STO-pLIF 细胞中猪 LIF RNA 表达水平

使用 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus, 按照说明书分别对细胞数量基本一致的 STO-pLIF 细胞和野生型 STO 细胞进行总 RNA 的提取。然后,利用重组 DNase I (RNase-free) 去除总 RNA 中可能存在的 DNA,防止后续实验中 DNA 的干扰。使用紫外分光光度计检测总 RNA 浓度和吸光度值,样品保存于 -80℃ 备用。分别以 STO-pLIF 细胞和野生型 STO 细胞总 RNA 为模板,按照 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行反转录,获得各自的 cDNA。分别以 STO-pLIF 细胞和野生型 STO 细胞的 cDNA 为模板,以 pLIF5 和 pLIF3 为上下游引物,进行 PCR 反应扩增猪 LIF 基因的 cDNA 片段。以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并用凝胶成像仪照相记录。GAPDH 为对照,上下游引物分别为 GAPDH5 和 GAPDH3,具体引物序列见表 1。

分别以 STO-pLIF 细胞和野生型 STO 细胞的 cDNA 为模板,使用 SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒,按照说明书在荧光定量 PCR 仪 Roche LightCycler96 上进行 qPCR 检测 (具体引物见表 1)。反应结束后,通过扩增曲线和熔解曲线结果,制备标准曲线,并计算猪 LIF RNA 的表达量。

表 1 PCR 反应的引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR amplification

引物	序列(5'→3')
pLIF5	TCCGGATCCGCCCTCTGGAGTTCAGCCATAATG
pLIF3	AGGGGATCCGGTCTAGGGGACCTTCCATCTAGA
GAPDH5	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG
GAPDH3	TCCTGGAGGCCATGTAGGCCAT

1.2.3 STO-pLIF 细胞中猪 LIF 蛋白的检测

利用 Western blot 检测 STO-pLIF 细胞中表达猪 LIF 蛋白的情况,具体方法如下:分别提取 STO-pLIF 细胞和野生型 STO 细胞总蛋白,使用酶标仪检测蛋白浓度,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(x5)后煮沸 5 min,分装后于 -20℃ 保存备用。分别取 STO-pLIF 和野生型 STO 细胞的 20 μg 蛋白上样于 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,80 V 电泳 30 min 后,将电压调至 100 V 继续电泳 1 h。电泳结束后,将凝胶与甲醇激活后的 PVDF 膜一起装至电泳槽内,加入

转膜液,100 V 电泳 1.5 h,整个电泳过程在冰浴条件下进行。转膜结束后,取出 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 封闭 1 h,然后分别以 LIF (1:500) 和 tublin (1:5 000) 孵育一抗,4℃ 过夜。再用 TBS-T 洗膜 3 遍,每遍 10 min。分别以 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h。TBS-T 洗膜 3 遍,每遍 10 min。将 Potent ECL Kit 中 ECL 发光液的 A 液和 B 液按说明书要求的比例混合,将混合液滴加到 PVDF 膜上。擦干多余发光液后,于 Bio-Rad 凝胶成像仪上显影并拍照记录。

1.2.4 制备 STO-pLIF 细胞饲养层培养大鼠 iPS 细胞

将冻存的 MEF、STO、STO-pLIF 细胞分别解冻至 10 cm 培养皿中,置于 37.5℃ 5%CO₂ 培养箱中培养至汇合度 90% 左右时,用含丝裂霉素 10 ng/mL 的培养液处理 2.5 h。由于 MEF 细胞体积较大,故消化细胞后,MEF 和 STO 细胞分别以 1.1×10⁵ 个/孔和 1.75×10⁵ 个/孔的密度铺于预处理的 4 孔板(0.1% 明胶处理 30 min)中,置于 37.5℃ 5%CO₂ 培养箱中培养过夜,使其贴壁。

1.2.5 大鼠 iPS 细胞的培养及生长曲线的检测

配制大鼠 iPS 细胞的 2 种培养液,即 N2B27 培养液(含鼠源白血病抑制因子,mLIF)和 N2B27(-) 培养液(不含 mLIF)。N2B27 培养液的成分为 48.13% DMEM/F12、48.13% Neurobasal、0.5% N2、1% B27、1% L-Glutamine、1% Penicillin/Streptomycin、0.1% Insulin、0.1% β-mercaptoethanol、0.002 5% BSA、0.02% PD0325901 和 0.01% CHIR99021 和 0.01% mLIF,N2B27(-) 培养液的成分为 48.13% DMEM/F12、48.13% Neurobasal、0.5% N2、1% B27、1% L-Glutamine、1% Penicillin/Streptomycin、0.1% Insulin、0.1% β-mercaptoethanol、0.002 5% BSA、0.02% PD0325901、0.01% CHIR99021。复苏大鼠 iPS 细胞,以 750 个/孔的细胞量,分别将其接种于以下 3 种不同培养体系的 24 孔板中。①阴性对照组:野生型 STO 细胞作为饲养层,使用不含 mLIF 的 N2B27(-) 培养液;②实验组:STO-pLIF 细胞作为饲养层,使用不含 mLIF 的 N2B27(-) 培养液;③阳性对照组:MEF 细胞作为饲养层,使用含 mLIF 的 N2B27 培养液。每天更换相应的干细胞培养液,并观察细胞状态,于倒置显微镜下拍照记录;同时,每天利用 0.05% 胰蛋白酶分别消化收集 3 种不同培养体系中的大鼠 iPS 细胞,使用流式细胞仪检测大鼠 iPS 细胞数量变化,并绘制生长曲线图。

1.2.6 大鼠 iPS 细胞的碱性磷酸酶染色

上述 3 种培养体系培养大鼠 iPS 细胞 3 代后, 利用碱性磷酸酶检测试剂盒对培养至第 5 天的大鼠 iPS 细胞进行碱性磷酸酶染色, 具体步骤按说明书进行操作。染色完毕后, 于倒置显微镜上观察染色结果并拍照记录。

1.2.7 大鼠 iPS 细胞的干细胞多能性因子检测

RT-PCR 检测: 分别使用上述 3 种培养体系于 6 孔板中培养大鼠 iPS 细胞 3 代后, 分别收集 3 种不同培养体系中所培养 iPS 细胞, 以及数量大致相当的大鼠 REF 细胞, 按照说明书分别对其进行总

RNA 的提取。分别以 3 种培养体系中大鼠 iPS 细胞及 REF 细胞总 RNA 为模板, 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行反转录, 获得各自的 cDNA。然后, 以 3 种体系培养的 iPS 的 cDNA 为模板, 分别扩增大鼠多能性因子 OCT4、SOX2 及 Nanog, 以 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并用凝胶成像仪照相记录。GAPDH 设为阳性对照, 上下游引物分 GAPDH5 和 rGAPDH3, 具体引物序列见表 2。

免疫荧光染色: 分别使用上述 3 种培养体系培养

表 2 RT-PCR 反应的引物序列
Table 2 Primer sequences of RT-PCR amplification

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
riPS OCT4	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC	TCTTTCCACCAGGCCCCCGGC
riPS SOX2	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATCC
riPS Nanog	GCCCTGAGAAGAAAGAAGAG	CGTACTGCCCCATACTGGAA
riPS GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTTC

大鼠 iPS 细胞 3 代后, 对培养至第 5 天的大鼠 iPS 细胞进行免疫荧光染色实验。分别去除各组的培养液, 用 DPBS 清洗 3 遍, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min; 再用 PBS 洗 3 遍, 每遍 5 min; 之后用 1% Triton-X-100 通透 1 h; 再用 PBS 洗 3 遍, 每遍 5 min; 用 10% 羊血清封闭液封闭 1 h 后, 加入用封闭液 1:200 稀释的一抗, 4℃ 过夜孵育。第 2 天移除一抗, 用 PBS 洗 3 遍, 每遍 5 min; 避光加用封闭液 1:400 稀释的二抗, 室温避光孵育; 1 h 后, 避光移除二抗, 用 PBS 洗 2 遍, 每遍 5 min; 之后加入用封闭液 1:100 稀释 DAPI, 室温孵育 3 min; 移除 DAPI 后, 用 PBS 洗 1 遍; 5 min 后加抗淬灭剂 DABCO Anti-fate, 于倒置荧光显微镜下观察染色情况并拍照记录。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计软件, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定表达猪 LIF 基因的 STO 细胞系的建立

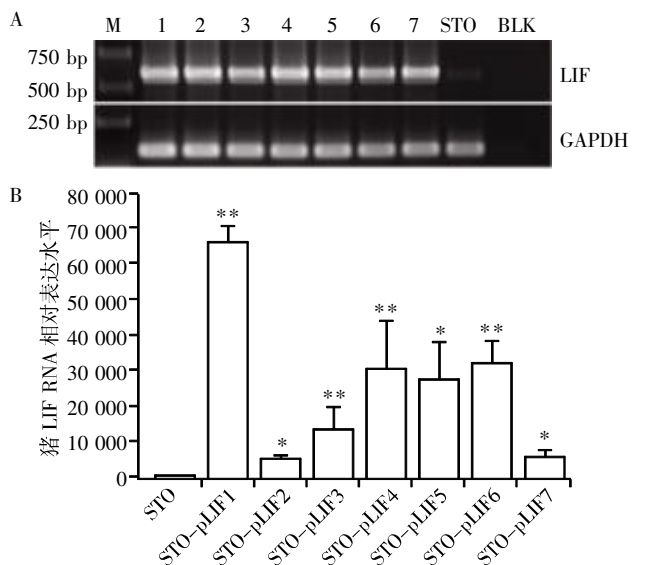
2.1.1 重组猪 LIF RNA 的表达

通过脂质体转染, 将重组表达载体 pCAG-pLIF 转染至 STO 细胞, 用 G418 进行筛选 10~11 d 后, 共获得 7 个细胞系。以 STO-LIF 细胞及野生型 STO 细胞 cDNA 为模板, 分别进行 RT-PCR 和 qPCR。结果显示其中 7 个细胞系均能稳定且高效表达猪 LIF 基

因(图 1)。

2.1.2 重组猪 LIF 蛋白的表达

提取 STO-pLIF 细胞和野生型 STO 细胞的总蛋白, 测定蛋白浓度。以野生型 STO 细胞的总蛋白为阴

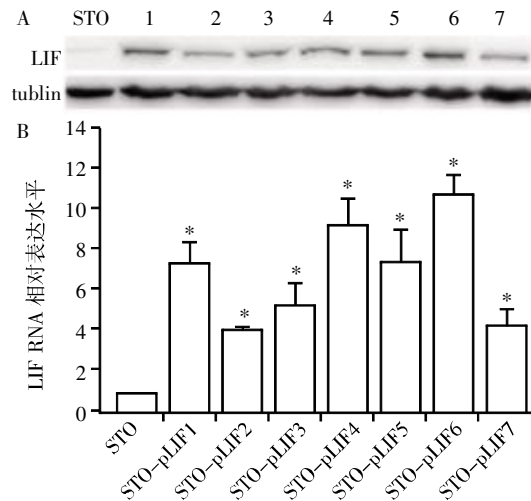


A: 7 个 STO-pLIF 细胞株的 RT-PCR 结果, M: DL 2000 DNA Marker; 1~7: 经药物筛选 STO-pLIF 细胞株; STO: 阴性对照; BLK: 空白对照。B: 7 个 STO-pLIF 细胞株的 qPCR 结果, 与野生型 STO 细胞相比, 7 个 STO-pLIF 细胞中猪 LIF RNA 表达水平较高, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 1 猪 LIF 基因在 STO 和 STO-pLIF 细胞中的 mRNA 表达水平

Figure 1 Expression level of mRNA of porcine LIF genes in STO and STO-pLIF cells

性对照,样品上样量为 20 μg ,进行 Western blot。实验结果表明,两组样品在相对分子量约 37 kDa 处均有 LIF 条带表达,但野生型 STO 弱表达而 STO-pLIF 细胞系表达增强,说明野生型 STO 本身有少量 LIF 表达,但转染组 STO-pLIF 细胞与未转染 STO 细胞相比,重组 LIF 表达量有显著差异 ($P < 0.01$,图 2)。



A: LIF 表达的 Western blot 分析; B: LIF 蛋白表达水平的定量分析,与野生型 STO 细胞相比,7 个 STO-pLIF 细胞株中猪 LIF 表达水平较高, $*P < 0.01 (n=3)$ 。

图 2 Western blot 检测猪 LIF 蛋白在 STO 和 STO-pLIF 细胞中的表达水平

Figure 2 Western blot analysis of pLIF expressed in STO and STO-pLIF cells

2.2 大鼠 iPS 细胞的培养及生长曲线

分别以 3 种不同的培养体系培养大鼠 iPS 细胞 3 代后(图 3A),阴性对照组细胞趋向于扁平,且其细胞形态更接近于体细胞,而实验组和阳性对照组无明显差异,均呈球状立体悬浮生长。由于所使用的大鼠 iPS 自身标记有绿色荧光蛋白,3 种不同培养条件下的大鼠 iPS 均表达绿色荧光蛋白,但实验组和阳性对照组绿色荧光相对于阴性对照组更强。利用 iPS 本身表达绿色荧光这一特性,使用流式细胞仪计数的方

法,绘制细胞生长曲线(图 3B),实验组与阳性对照组大鼠 iPS 细胞生长速度接近,快于阴性对照组。故 STO-pLIF 作为饲养层,其对于所培养干细胞生长速度及维持干细胞形态方面的作用与 MEF 饲养层+外源添加 mLIF 相似,明显优于无外源添加 LIF 的野生型 STO 饲养层。

2.3 大鼠 iPS 细胞碱性磷酸酶染色

分别以 3 种不同的培养体系培养大鼠 iPS 细胞,在培养 3 代后的第 5 天时,分别对其进行碱性磷酸酶染色(图 4),显示阴性对照组 STO 饲养层细胞及不含鼠源 LIF 的大鼠干细胞培养液 N2B27(-) 培养体系中的干细胞呈现分化状态,干细胞失去正常形态,碱性磷酸酶染色弱阳性,而其余两组培养体系中的干细胞形态正常,碱性磷酸酶染色阳性,

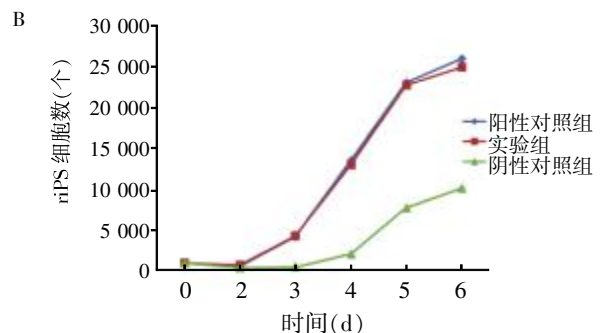
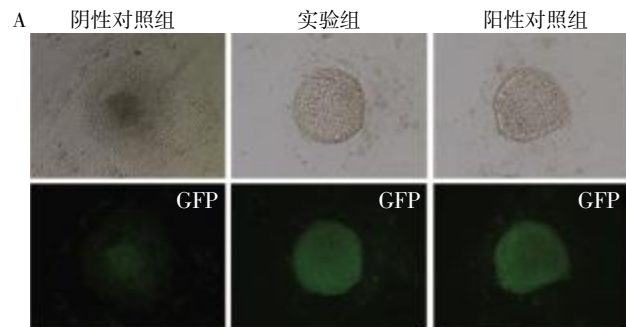
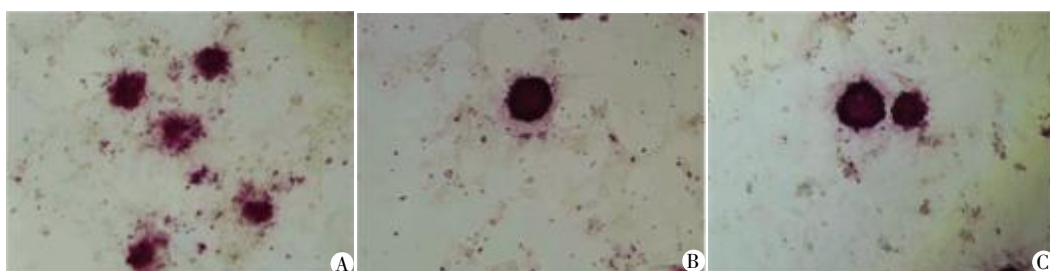


图 3 不同培养条件下大鼠 iPS 细胞的形态(A, $\times 200$)和生长曲线(B)

Figure 3 Growing status(A, $\times 200$) and growth curve(B) of the riPS cells under different culture conditions



A: 阴性对照组; B: 实验组; C: 阳性对照组。

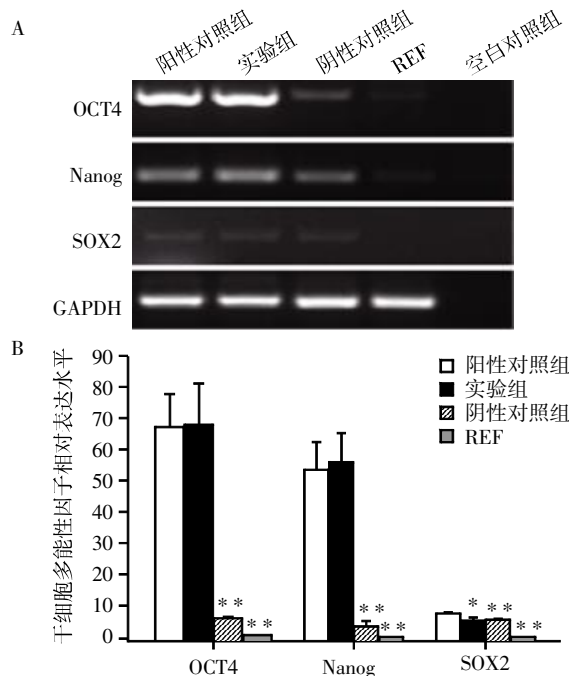
图 4 不同培养体系大鼠 iPS 细胞碱性磷酸酶染色($\times 100$)

Figure 4 Alkaline phosphates expression of riPS cells in different culture systems($\times 100$)

故 STO-pLIF 细胞作为饲养层与 MEF 配合普通大鼠干细胞培养液作用相似,均可以维持大鼠 iPS 细胞全能性及未分化状态。

2.4 大鼠 iPS 细胞的干细胞多能性因子检测

分别以 3 种不同的培养体系培养大鼠 iPS 细胞,对培养 3 代后第 5 天相同数量的大鼠 iPS 细胞提取总 RNA,经过反转录后分别以其 cDNA 为模板,大鼠 REF 细胞为阴性对照,对 OCT4、Nanog、SOX2 等多能性因子进行扩增(图 5),发现相对于实验组和阳性对照组,阴性对照多能性因子的表达量更趋近于阴性对照 REF,而实验组和阳性对照组的表达量相近,与阴性对照组存在显著差异。



A: RT-PCR 检测不同培养条件下大鼠 iPS 的多能性因子; B: 不同培养条件下大鼠 iPS 的多能性因子的相对表达水平,与阳性对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 5 不同培养条件下大鼠 iPS 细胞多能性因子的 RT-PCR 检测

Figure 5 RT-PCR of pluripotency factors in iPSCs under different culture conditions

2.5 大鼠 iPS 细胞干细胞多能性因子的免疫荧光染色

解冻的大鼠 iPS 细胞于上述 3 组培养体系培养 3 代后,于培养第 5 天对培养的各组长鼠 iPS 细胞进行细胞免疫荧光染色(图 6),发现阴性对照组基本检测不到 OCT4、SOX2、Nanog 等干细胞多能因子的表达;实验组和阳性对照组大鼠 iPS 细胞均能表达 OCT4、SOX2、Nanog 等干细胞多能因子,且表达情况无显著差异。

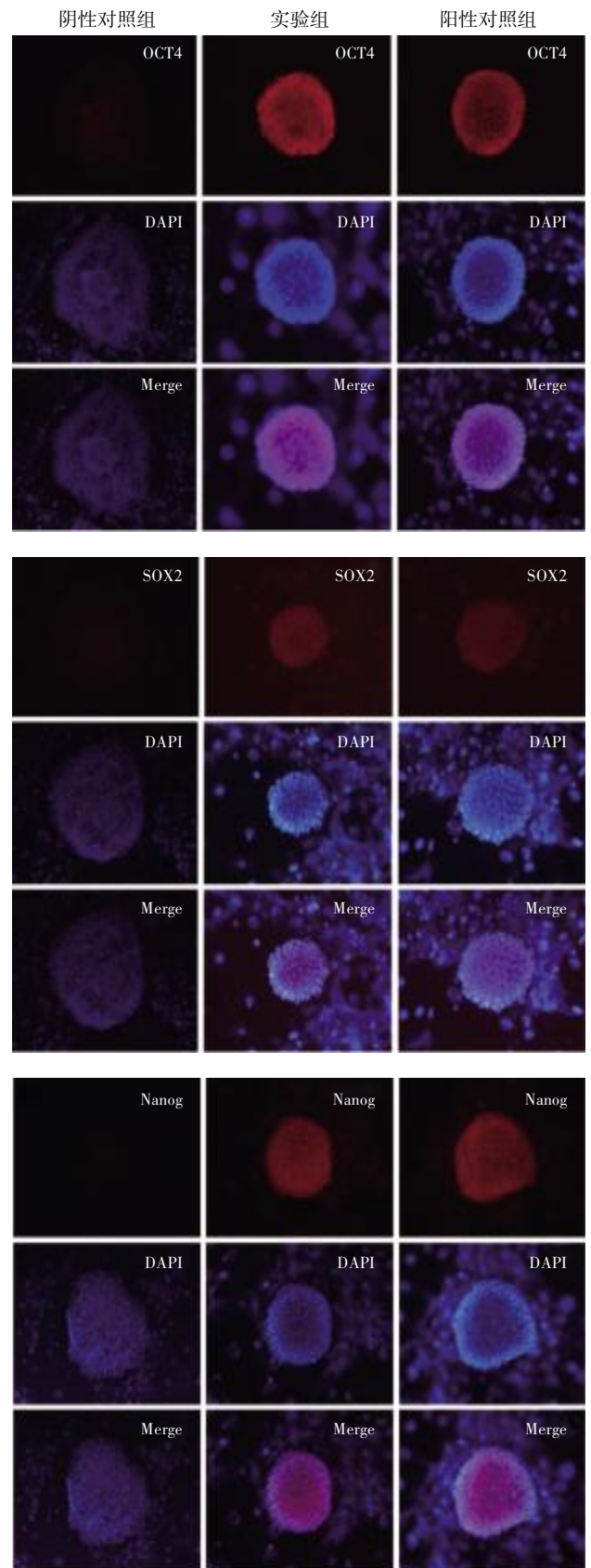


图 6 不同培养系统中大鼠 iPS 细胞多能因子的免疫荧光检测 ($\times 200$)

Figure 6 Immunostaining of pluripotent markers of iPSC in different culture systems ($\times 200$)

3 讨 论

由于在代谢生理、个体及器官大小方面,猪都与人类极为相似,故猪是研究人类疾病及器官移植的极好模型,而猪 naive 胚胎干细胞的成功建系将更有利于相应疾病模型的建立,为下一步的临床研究打下基础。真正的猪 naive 胚胎干细胞相较于 primed 胚胎干细胞更加接近于小鼠的胚胎干细胞,形态上更加立体,可消化成单个细胞传代。在体外条件下可以保持未分化状态并无限传代,而在体内能够进行生殖系嵌合。另外,naive 类型的胚胎干细胞主要依赖于 BMP4 和 LIF/STAT3 信号通路维持自我更新、抑制分化及维持全能性。目前,大鼠、小鼠均已成功建立起 naive 胚胎干细胞系^[14-15],科学家也已经通过诱导方式培养出近似于小鼠胚胎干细胞的 LIF 依赖的猪 iPS 细胞系^[16],但培养体系中外源添加的 LIF 仍为人源,且尚未建立起真正的猪 naive 胚胎干细胞系,这可能与猪相关的信号通路机制尚未研究清楚及未使用猪源 LIF 蛋白而外源添加人源 LIF 蛋白培养等多方面因素有关。

LIF 属于 IL-6 家族,是一种分泌性蛋白,其在多种组织和细胞中均有表达,但不足以维持干细胞的全能性,保持其未分化状态^[17]。本研究通过 RT-PCR、qPCR 和 Western blot 等检测证实,LIF 基因在野生型 STO 细胞中有少量表达,然而通过脂质体转染技术获得的高效表达 LIF 基因的 STO-pLIF 细胞系中猪 LIF 表达量显著升高。同时,LIF 作为一种高度糖基化的蛋白,其分子量可从 20 kDa 到 67 kDa 不等。本研究蛋白免疫印迹显示,重组猪 LIF 大约 37 kDa,与文献报道结果相符,该结果可能由于 LIF 部分糖基化所致。原核表达系统难以对其进行糖基化修饰,然而 LIF 是一种分泌型蛋白,虽然糖基化和非糖基化形式都有生物学活性,但其大部分分泌到细胞外起作用。这再次证明,本实验室建立的转染真核表达载体 pCAG-pLIF 的 STO 细胞系在稳定表达猪 LIF 蛋白后,使其正确地进行了糖基化修饰。

为了排除人源或鼠源 LIF 对于猪 naive 胚胎干细胞所造成的不良影响,本研究采用了实验室已构建的猪 LIF 基因真核表达载体 pCAG-pLIF^[18],载体包含 CAG 启动子启动表达的猪 LIF 基因序列和 PGK 启动子启动表达的新霉素抗性基因。其猪 LIF 基因序列来源于大白猪胚胎成纤维细胞 cDNA,以往研究中将其转染到猪胎儿成纤维细胞,并获得了稳定高效表达重组猪 LIF 蛋白的猪胚胎成纤维细胞

系。然而,由于以猪胚胎成纤维细胞为饲养层在猪 naive 胚胎干细胞的培养中并不占明显优势,传统的猪 primed 胚胎干细胞多以小鼠 STO 细胞作为饲养层。STO 细胞是一种含硫代鸟嘌呤和鸟嘌呤抗性的小鼠胚胎成纤维细胞系,作为饲养层能够分泌干细胞生长因子维持干细胞多能性,在目前胚胎干细胞培养和建系的过程中应用较为广泛。为了能够同时满足以 STO 细胞为饲养层并发挥猪源 LIF 作用的要求,我们尝试将猪 LIF 基因真核表达载体 pCAG-pLIF 转染至小鼠 STO 细胞中,并获得了稳定高效表达重组猪 LIF 蛋白的 STO-pLIF 细胞系;随后,以 STO-pLIF 细胞作为饲养层,培养现有的大鼠 iPS 细胞来验证其功能,以期望 STO-pLIF 细胞能够作为猪 naive 胚胎干细胞的饲养层发挥作用,从而避免现有的鼠源或人源 LIF 对其造成潜在的不良影响,为建立起真正 naive 胚胎干细胞系的培养系统提供可能。

此外,通过使用 STO-pLIF 细胞作为饲养层培养大鼠 iPS 细胞,对其进行相关的多能性分析可以发现,经过多次传代,作为阴性对照的 STO 细胞所培养的大鼠 iPS 细胞逐渐分化,趋近于体细胞,失去其三维立体的球形形态,在生长速度和形态上明显落后于 STO-pLIF 细胞培养的实验组和传统 MEF 细胞配合 mLIF 培养液的阳性对照。在阴性对照组中,碱性磷酸酶染色显示大鼠 iPS 细胞不着色,已基本失去干性;通过 RT-PCR 和免疫荧光染色检测干细胞多能因子的表达情况,发现 OCT4、SOX2、Nanog 的表达均较弱。相反,实验组所培养的大鼠 iPS 细胞无论在生长速度和三维立体形态或是多能性方面都显著优于阴性对照组,且与阳性对照组无明显差异。这进一步证实,在 MEF+mLIF 和 STO-LIF 培养条件下,大鼠 iPS 细胞能够维持其多能性因子的表达;而在野生型 STO 作为饲养层,且无外源添加 mLIF 的培养条件下,iPS 细胞的特性更接近于体细胞;STO-pLIF 饲养层在功能上与 MEF 饲养层结合 mLIF 相似,而优于无外源添加的野生型 STO 饲养层。

综上所述,本研究证明转染猪 LIF 基因到小鼠 STO 细胞能够获得稳定高效分泌重组猪 LIF 蛋白的 STO-LIF 细胞系,在不添加其他外源 LIF 的条件下,以其作为饲养层可以维持大鼠 iPS 细胞未分化状态。该细胞系的成功构建可能为下一步培养和建立真正的猪 naive 胚胎干细胞提供更为优化的培养条件,亦可为后续实验消除潜在不利因素。但是,由于所用饲养层为鼠源,在后续实验中可能会存在潜在

鼠源成分污染风险,所以仍需要更加安全而高效的饲养层替代细胞。另外,通过 qPCR 可以发现,不同的细胞系其 mRNA 中 LIF 的表达量均有明显提高,但仍然有所差异,作为饲养层可能会由于 LIF 蛋白浓度波动对胚胎干细胞产生不良影响。因此,在后续研究中,还需对 STO-pLIF 细胞的 LIF 表达量进行进一步调整和优化,或者尝试通过其他方法人工合成高纯度的猪源 LIF 蛋白,并且在猪 naive 胚胎干细胞培养方面做进一步验证。

[参考文献]

- [1] Haines BP, Voyle RB, Pelton TA, et al. Complex conserved organization of the mammalian leukemia inhibitory factor gene; regulated expression of intracellular and extracellular cytokines[J]. *J Immunol*, 1999, 162(8):4637-4646
- [2] Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, et al. The IL-6 signal transducer, gp130; an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor[J]. *Science*, 1992, 255(5050):1434-1437
- [3] Zhang XG, Gu JJ, Lu ZY, et al. Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130[J]. *J Exp Med*, 1994, 179(4):1337-1342
- [4] Jenab S, Morris PL. Testicular leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor mediate phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT)-3 and STAT-1 and induce c-fos transcription and activator protein-1 activation in rat Sertoli but not germ cells[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(4):1883-1890
- [5] Lowe C, Gillespie GA, Pike JW. Leukemia inhibitory factor as a mediator of JAK/STAT activation in murine osteoblasts[J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(11):1644-1650
- [6] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides[J]. *Nature*, 1988, 336(6200):688-690
- [7] Strojek RM, Reed MA, Hoover JL, et al. A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts[J]. *Theriogenology*, 1990, 33(4):901-913
- [8] Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6):487-492
- [9] Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, et al. Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(3):473-482
- [10] Telugu BP, Ezashi T, Roberts RM. Porcine induced pluripotent stem cells analogous to naive and primed embryonic stem cells of the mouse[J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(11-12):1703-1711
- [11] Willson TA, Metcalf D, Gough NM. Cross-species comparison of the sequence of the leukaemia inhibitory factor gene and its protein[J]. *Eur J Biochem*, 1992, 204(1):21-30
- [12] Tomishima M. Conditioning pluripotent stem cell media with mouse embryonic fibroblasts (MEF-CM) [M]. Cambridge (MA): StemBook, 2008
- [13] Park SP, Lee YJ, Lee KS, et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(3):676-684
- [14] Hirabayashi M, Kato M, Kobayashi T, et al. Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate in germline chimerae at high efficiency [J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(2):94
- [15] Ueda S, Kawamata M, Teratani T, et al. Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7):e2800
- [16] Telugu BP, Ezashi T, Sinha S, et al. Leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent, pluripotent stem cells established from inner cell mass of porcine embryos [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(33):28948-28953
- [17] Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, et al. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency [J]. *Proc Natl Acad USA*, 1999, 96(6):2846-2851
- [18] 杨宁, 赵丽华, 张曼玲, 等. 建立高效表达猪 LIF 的猪胚胎成纤维细胞系[J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(7):936-945

[收稿日期] 2016-02-27