

猪 naive-like 诱导性多能干细胞系的建立及红色荧光蛋白标记

姜海滨,张曼玲,赵丽华,金永,陈袁,王俊政,陈俏羽,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 211166)

[摘要] **目的:**建立猪 naive-like 诱导性多能干(induced pluripotent stem,iPS)细胞系,并对其进行红色荧光标记,为通过示踪猪 naive iPS 细胞发育和分化的相关研究奠定基础。**方法:**首先利用核转染技术向巴马小型猪胎儿成纤维细胞(porcine embryonic fibroblast,PEF) 中转入鼠源 OCT4、SOX2、KLF4 和 c-MYC 转录因子表达载体 TetO-FUW-OSKM,并同时转入激活表达载体 FUW-M2rtTA,采用白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor,LIF)结合碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)的培养体系进行培养,通过在培养液中添加盐酸多西环素(doxycycline hyclate,DOX) 进行诱导,建立起猪 iPS 细胞系,并对细胞系的多能性进行鉴定。在此基础上,向 iPS 细胞系转入红色荧光蛋白表达载体,对其进行标记,并鉴定被红色荧光标记后的细胞是否仍然具有多能性。**结果:**所建立的 iPS 细胞系克隆呈三维立体生长,可以进行单细胞传代培养至 30 代以上,核型正常,碱性磷酸酶染色呈阳性,表达多种干细胞多能因子,利用 LIF/STAT3 信号通路维持其增殖,体外可分化形成表达三胚层相关基因的类胚体,为猪 naive-like iPS 细胞系。成功对所建立的 iPS 细胞系进行红色荧光标记,碱性磷酸酶染色和免疫荧光染色结果显示被红色荧光标记的 iPS 细胞的多能性依然存在。**结论:**成功建立了稳定表达红色荧光蛋白的猪 naive-like iPS 细胞系。

[关键词] 猪诱导性多能干细胞系;多能性;核转染;红色荧光蛋白

[中图分类号] Q813

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-915-11

doi:10.7655/NYDXBNS20170801

Establishment of porcine naive-like induced pluripotent stem cell line and labelling with red fluorescent protein

Jiang Haibin, Zhang Manling, Zhao Lihua, Jin Yong, Chen Yuan, Wang Junzheng, Chen Qiaoyu, Li Rongfeng*

(Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To establish porcine naive-like induced pluripotent stem (iPS) cell line followed by labelling with the red fluorescent protein via nucleofection. The labelled porcine naive-like iPS cells could be used for tracing their development and differentiation. **Methods:** Firstly, bama miniature pig embryonic fibroblasts (PEF) were nucleofected with TetO-FUW-OSKM (OSKM: mouse derived transcriptional factors OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC) and FUW-M2rtTA vectors. Then, these cells were incubated in the medium with both leukemia inhibitory factor (LIF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), supplemented with doxycycline hyclate. The established iPS cell lines were identified for their pluripotency. Secondly, the iPS cells were nucleofected with pEF1al-pha-DsRed-Express Vector which could express the red fluorescent protein, then the maintenance of pluripotent characters of these labeled cells were analyzed. **Results:** The established iPS showed domed morphology and could survive long-term single-cell passaging (30 passages). They were alkaline-phosphatase positive, maintained a normal karyotype, expressed various pluripotency markers and required LIF/STAT3 signaling pathway for self renewal. The iPS cells could form embryonic bodies(EB), which expressed markers of three germ layers after culture in LIF free medium. The iPS cells were transfected with red fluorescent protein vector successfully and kept showing red fluorescence for 10 passages. The results of alkaline phosphatase staining and immunofluorescence staining suggested that the pluripotency of these cells had not been compromised after red fluorescent protein labelling. **Conclusion:** The red fluorescent protein labeled porcine naive-like iPS cell lines were established successfully.

[Key words] porcine iPS; pluripotency; nucleofection; red fluorescent protein

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):915-925]

[基金项目] 国家自然科学基金(31371487)

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

干细胞是一类具有无限制自我更新能力、同时也可以分化成特定组织的细胞,在细胞发育过程中处于较原始阶段。干细胞可分为成体干细胞(adult stem cells, ASC)和胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)两大类。ESC 一般从早期胚胎中分离获得,具有两种不同状态,一种是外形呈三维立体状的 naive 胚胎干细胞,一种是外形呈扁平状的 primed 胚胎干细胞^[1-2]。Naive 胚胎干细胞被认为是真正的胚胎干细胞,与囊胚的内细胞团相似,通过 LIF 信号通路维持其多能性^[3],具有分化成所有组织细胞的能力,并且具有种间胚胎嵌合能力^[4]。而 primed 胚胎干细胞则类似于胚胎的外胚层,又被称为外胚层胚胎干细胞(epilast stem cells),外形呈单层扁平状,通过 FGF 信号通路维持其多能性,具有分化成部分组织细胞的能力,不能形成嵌合胚胎^[5]。由于 ESC 来源于胚胎,对其研究应用存在着伦理学争论,所以一直以来人们在进行大量研究,试图找到一种方法直接使体细胞重编程为多能干细胞。2006 年日本学者 Yamanaka 率先报道了诱导性多能干(induced pluripotent stem, iPS)细胞,他们将 OCT4、SOX2、KLF4 和 c-MYC (OSKM)4 个转录因子通过慢病毒转入小鼠成纤维细胞中,经过诱导,获得了这种类似于 ESC 的干细胞^[6]。随后,国内外学者陆续在大鼠、人、恒河猴等哺乳动物中,通过向体细胞中转入不同的转录因子组合,经过诱导,建立起了 iPS 细胞系^[7-10]。

猪作为模式生物有其独特的优势,因其在代谢生理、基因组大小和个体大小等方面与人类更为接近,所以猪已经日渐成为人类疾病研究的模型。但是相比较小鼠和人,关于猪 iPS 细胞的研究很少。2009 年,中国学者率先报道了猪 iPS 细胞系的建立^[11],他们利用慢病毒向猪胎儿成纤维细胞中转入人源 OSKM 4 个因子,加入干细胞培养液(DMEM/F12、KSR、NEAA、L-glutamine、 β -mercaptoethanol、DOX),经过诱导,生成了外形呈扁平状,类似于 primed 胚胎干细胞的 iPS 细胞,该细胞碱性磷酸酶染色呈阳性,表达多种干细胞多能因子,具有体外和体内三胚层组织分化的能力。随后,Esteban 与 Ezashi 等^[12-13]也建立起了相似的猪 iPS 细胞系。由此可见,猪 iPS 的初期研究所建立的细胞系均为 primed 状态的多能干细胞系。2010 年, Telugu^[14]通过向培养液中添加白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)和小分子 CHIR99021、PD0325901,获得了外形呈隆起立体状的类似于 naive 胚胎干细胞的 iPS 细胞系,该细胞具有表达多种干细胞多能因子以及形成畸胎瘤

的能力。之后,科学家们通过向细胞内转入不同转录因子组合如 OSKM+Nr5a2、Tbx3^[15-16], OSKM+Nanog、Lin28^[17],并结合不同的培养液,虽然都能获得在某些方面类似于 naive 胚胎干细胞的细胞系,但都无法形成嵌合胎儿,表明这些细胞系还不是真正的 naive iPS 细胞系。

红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)作为一种示踪蛋白被广泛应用于干细胞的标记,尤其在指示啮齿类和灵长类 naive 干细胞形成嵌合胎儿的过程中发挥了重要作用^[18-19]。但荧光标记的啮齿类 ESC 多数通过荧光蛋白转基因胚胎建立而来,直接对 ESC 进行荧光标记受基因转染方法和所采用荧光蛋白表达载体及启动子种类的制约,致使干细胞的荧光蛋白标记较为困难。由于到目前为止,真正的猪 naive 干细胞尚未成功建系,所以对猪干细胞进行荧光蛋白标记的研究少之又少。Nucleofection 核转染技术是一种可以对不同类型的细胞(如神经元、免疫细胞、干细胞等)^[20]进行转染的电转技术。因其操作的方便性和较高的转染效率,已经被广泛地应用于转基因细胞的制备。本研究通过核转染技术向猪胎儿成纤维细胞中转入鼠源 OCT4、SOX2、KLF4 及 c-MYC 4 个转录因子表达载体,采用 LIF 结合碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的培养体系进行培养^[21],建立起猪 naive-like iPS 细胞系;在此基础上向 iPS 细胞中转入 EF1 α 启动子引导的红色荧光表达载体 pEF1 α -DsRed-Express2 Vector,鉴定被红色荧光标记后的 iPS 细胞的多能性,探讨红色荧光蛋白标记对干细胞的影响,为以后通过红色荧光示踪猪 naive iPS 来研究细胞发育和分化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试剂包括高糖 DMEM (1 \times), KnockOutTMDMEM (1 \times), DMEM-F12(1:1)(1 \times), Neurobasal Medium, FBS, KnockOutTMSR, MEM NEAA(100 \times), 2-Mercaptoethanol, Pen Strep, N-2 Supplement, B-27 Supplement, 0.25% Trypsin-EDTA (1 \times), bFGF (Gibco 公司, 美国); BSA, L-glutamine, L-ascorbic acid, CHIR99021, PD0325901, DMSO (Sigma 公司, 美国); SB431542, doxycycline hyclate (TOCRIS 公司, 英国); mouse LIF (Millipore 公司, 德国)。

巴马猪胎儿成纤维细胞(PEF)与小鼠胎儿成纤维细胞(MEF)均为本实验室保存;含 TetO-FUW-OS-

KM(OSKM)质粒的菌株和含 FUW-M2rtTA(M2rtTA)质粒的菌株 (Addgene 公司, 美国), pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector (大连宝生物公司)。

PCR 仪 (ABI 公司, 美国), 荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司, 瑞士), 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 美国), 高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 德国), 细胞培养箱 (Thermo 公司, 美国), 生物倒置显微镜 (Olympus 公司, 日本), 荧光显微镜 (Nikon 公司, 日本), 核转仪 (Lonza 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 PEF 中转入 OSKM 与 M2rtTA 质粒

分别过夜培养含有 TetO-FUW-OSKM 质粒和 FUW-M2rtTA 质粒的大肠杆菌 100 mL, 使用无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒并测定质粒浓度。限制性内切酶 *Fsp I* 分别对质粒进行过夜酶切, 之后各取 20 μ L 酶切质粒与原质粒进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定质粒是否被切开。确定质粒经酶切线性化后, 采用乙醇沉淀法回收质粒, 存于 -20°C 备用。

解冻原代 PEF 于 1 个 60 mm 皿中, 24 h 后观察, 当细胞达到 80%~90% 汇合度时, 用 0.05% 胰酶将细胞消化成单细胞, 加入成纤维细胞培养液 (84% 高糖 DMEM、15% FBS 及 1% Pen Strep) 终止消化后, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 并用 DPBS 洗 1 遍。按照试剂盒 Amaxa™ Basic Nucleofector™ Kit Primary Fibroblasts (Lonza 公司, 美国) 中操作说明配制核转液, 使用核转仪将线性化的 TetO-FUW-OSKM (4 μ g) 和 FUW-M2rtTA (4 μ g) 共同转入 PEF 中。利用 FUW-M2rtTA 质粒中的 zeocin 抗性基因, 筛选出具有抗药性的单克隆细胞株。之后分别提取各细胞株基因组 DNA, 通过 PCR 鉴定 OSKM 与 M2 是否同时转入细胞中, 引物序列、退火温度及产物大小如表 1 所示。

1.2.2 iPS 的诱导

饲养层细胞准备: 解冻代次不高于 P4 代的 MEF 于培养皿中培养, 当细胞达到 95% 汇合时, 用终浓度为 10 μ g/mL 的丝裂霉素-C 处理细胞 2.5~3.0 h, 之后将细胞用 0.05% 胰酶消化, 细胞培养液终止消化并离心, 用细胞培养液将细胞重悬并计数, 按每孔 1.0×10^5 个细胞加入到 0.1% 明胶预处理 30 min 的 4 孔板中, 38.5°C 、5% CO_2 培养。

iPS 诱导: 解冻经 PCR 鉴定的 OSKM 与 M2rtTA 载体双阳性细胞株于 4 孔板中, 当细胞达到 95% 汇合度时, 用 0.05% 胰酶消化细胞, 细胞培养液终止消化并离心, 弃掉培养液, 用干细胞培养液 (40%

KnockOut™ DMEM, 10% KnockOut™ SR, 24% DMEM/F12, 24% Neurobasal Medium, 0.5% N-2 Supplement, 1% B-27 Supplement, 0.125 μ g/mL BSA, 2.5 μ g/mL insulin, 1 μ mol/L L-Glutamin, 0.05 μ mol/L 2-Mercaptoethanol, 0.5% NEAA, 1% Pen Strep, 3 μ mol/L CHIR99021, 1 μ mol/L PD0325901, 2 μ mol/L SB431542, 2 000 UI/mL LIF, 16 ng/mL bFGF, 50 ng/mL VC 及 2 μ g/mL DOX) 将细胞重悬并计数, 之后按 4 孔板每个孔 1.5×10^4 个细胞加入到提前 1 d 准备好的饲养层中, 38.5°C 、5% CO_2 培养。3 d 后换液并观察有无克隆长出, 之后每天换液并观察。当有克隆长出后, 先用机械法传代, 之后改为胰酶单细胞传代。

1.2.3 iPS 细胞多能性鉴定

碱性磷酸酶染色: 对传代培养的 iPS 克隆进行碱性磷酸酶染色, 初步鉴定其是否具有多能性。使用 Alkaline Phosphatase Detection Kit (Millipore 公司, 德国), 按照说明书中的步骤进行操作。染色完毕后, 将细胞放置于倒置显微镜下进行拍照。

细胞核型分析: 向培养的 iPS 细胞中加入 0.02 μ g/mL 秋水仙胺, 培养箱中培养 1 h 后取出, 0.25% 胰酶进行消化, 培养液终止消化后将细胞吹打成单个细胞, 1 000 r/min 离心 3 min 弃上清, 加入 37°C 预热的 0.56% KCl 低渗液 2 mL, 轻轻吹打将细胞混匀, 37°C 水浴 30 min, 1 000 r/min 离心 3 min 并弃上清, 加入 2 mL 固定液 (甲醇:冰醋酸=3:1), 将细胞沉淀轻轻弹起, 之后再加入 2 mL 固定液并将细胞吹匀, 室温静置 40 min。1 000 r/min 离心 3 min 弃上清, 加入 2 mL 固定液室温静置 20 min, 1 000 r/min 离心 3 min, 弃掉多余液体, 剩下约 200 μ L, 将细胞吹匀, 在 70~80 cm 距离处将细胞滴到载玻片上, 室温放置过夜。按照 Giemsa:水=1:10 的比例配制染色液并染色 20 min, 之后将染色液用水冲洗, 室温放置待水分蒸干。油镜下观察细胞核型。

RT-PCR 及 RT-qPCR 鉴定多能因子表达: 使用 TRIzol 法提取 iPS 细胞、PEF 及 MEF 的总 RNA, 使用 Hi Script II Q RT Super Mix for qPCR (+gDNA Wiper) (南京诺唯赞生物科技有限公司) 试剂盒并参照说明书中的操作步骤将 RNA 反转录为 cDNA。之后配制如下反应体系 (20 μ L): 2 \times Taq Master Mix (Dye Plus) (南京诺唯赞生物科技有限公司) 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 cDNA (10 ng/ μ L) 1 μ L 以及 ddH₂O 7 μ L, 最后放入到 PCR 仪中进行 PCR 反应, 鉴定干细胞内多能因子的表达情况。提取各 iPS 细胞系中的总 RNA 并反转录为 cDNA,

之后配制如下反应体系 (33 μL): $2\times\text{ChamQ SYBR qPCR Master Mix}$ (南京诺唯赞生物科技有限公司) 16.5 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.5 μL , 模板 cDNA (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 3 μL 以及 ddH₂O 10.5 μL , 最后按每孔 10 μL 将反应液分装置 96 孔板中, 进行 qPCR 反应, 比较不同 iPS 细胞系中外源 OCT4、SOX2、KLF4 及 c-MYC 的表达差异。引物序列、退火温度及产物片段大小如表 1 所示。

表 1 引物序列, 退火温度及产物大小

Table 1 Name of primer sequences, annealing temperature, products size

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	产物大小 (bp)
OSKM	F:GAGGGAGACCGAGGAGTTCAA R:GCAGCGTATCCACATAGCGTAA	57	2 743
M2rtTA	F:GGGGAGGCTAACTGAGGC R:GCTGACAGGTGGTGGCAAT	58	1 307
mOCT4	F:GGCTAAGCTTCCAAGGGCCTCCAGG R:TCCACCTTCTCCAATTCACGG	58	267
mSOX2	F:GGAGGAGGCAACGCCACGGC R:GGCCAGCAAGCCTCCGGGAA	58	338
mKLF4	F:TACGACCTGGCGGCACGGTG R:GGTGGCCAGATTCTCGGCTG	58	346
mc-MYC	F:AGGTCCGAGTCCGGGCTCATCT R:ATCTGGTCACGCAGGGCAAAA	58	316
pSOX2	F:GGTGCCAACTCTACTGCTGCGGCG R:GTGTACTTATCCTTCTTCATGAGC	62	313
pKLF4	F:CAGCCCAGCACCCAAGGCCATAG R:AAGCCAAAACCCAAAACCCCAAT	62	243
pc-MYC	F:ACTAAGAGAAAGTAAGGAAGAAGG R:AAAAAAGATGCTAAGCATAAAAA	54	219
LIN28	F:AAACGCAGATCCAAAGGAGA R:GCTCAATTCTGAGCCTCTGG	54	386
TFCP2L1	F:GAAGATGTCCCGCGATGATCTGCT R:CGTGGTAGCCGTCATTGCTTTCAG	66	401
NCSTN	F:CCAGAGCACCTTCAGCATCAACCCA R:GCCCTTCTCCATATCGTAGACCATT	62	342
OSTEON-ECTIN	F:TGCTGAGGAAGCCGAGGAGGAGGTG R:GGAGTCCAGGCAGGGGGGATGTAT	62	300
NEUROD	F:AGGAGCACGAGGCAGACAAGAAGGA R:CAGGTTGCTGGTGGTTGGGATAAG	62	454
β -actin	F:CATGCCATTGTGATGGACT R:ACGGATGTCAACGTCAACT	58	260

细胞免疫荧光染色:弃掉 iPS 细胞培养液, PBS 洗 1 遍, 5 min, 用 4%多聚甲醛固定 10 min, 之后 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。染 OCT4、SOX2 及 NANOG 等蛋白的细胞需要用 1%Triton 室温通透 1 h, 之后再 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。使用 10%的山羊血清室温封闭 1 h, 之后移除封闭液, 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。一抗溶于 10%山羊血清中, 比例为 1:100, 一抗信息如表 2 所示。过夜之后, 移除一抗, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 避光加二抗, 二抗溶于 10%山羊血清中, 比例为 1:1 000, 二抗信息如表 2 所示, 室温避光孵育 1 h 后, 移除二抗。向细胞中加入适量 Fluoroshield™ with DAPI (Sigma 公司, 美国), 荧光显微镜下观察染色结果。

1.2.4 Western blot 鉴定蛋白表达

胰酶消化 iPS 细胞系及 PEF 成单细胞并计数, 分别取出 2.0×10^6 个细胞, PBS 洗 1 遍, 1 500 r/min 离心 5 min 后去上清, 加入含有 1%PMSF 的 RIPA 裂解液, 充分混匀, 冰上静置 5 min, 之后使用高速冷冻离心机以最大转速 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 40 min, 取上清, 并采用 BCA 法测定所提取的蛋白浓度。分别取出 100 μg 蛋白, 用 PBS 补齐至 60 μL , 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 \times) 15 μL , 96 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中煮 5 min 使其变性, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。配制 10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 分别取 20 μL 煮过的蛋白进行电泳。电泳结束后, 采用湿转法, 将蛋白转入到 PVDF 膜上。之后用 5%的脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一抗 (表 2), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 TBST 将膜洗 3 遍, 每遍 5 min, 之后加入二抗 (表 2), 室温孵育 90 min, TBST 将膜洗 3 遍, 每遍 5 min, 之后加入适量 Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific 公司, 美国) 显色液, 于凝胶成像系统中曝光拍照。

1.2.5 iPS 分化能力鉴定

传代培养 3 d 后的细胞, 采用机械法将细胞从饲养层上分离, 并将其放入悬滴 (30 μL /滴) 中培养, 每天换液 1 次, 培养液为普通成纤维细胞培养液与干细胞培养液 1:1 混合。培养 1 周左右, 可见有类胚体形成。利用 TRIzol 法提取类胚体总 RNA, 并进行 RT-PCR, 鉴定内、中、外三胚层相关基因 NCSTN、OSTEONECTIN 和 NEUROD 的表达情况。引物序列、退火温度及产物片段大小如表 1 所示。

1.2.6 向 iPS 细胞中转入红荧光质粒

培养含有红色荧光蛋白表达载体 pEF1al-pha-DsRed-Express2 Vector 的大肠杆菌 100 mL, 使用质粒大提试剂盒提取质粒, 并用限制性内切酶

表 2 一抗、二抗信息

Table 2 Information of primary antibody and secondary antibody

名称	一抗	二抗
OCT4	Rabbit anti-OCT3/4 (Santa Cruz Biotechnology, 美国)	Goat anti-Rabbit IgG Rhodamine (Rockland 公司, 美国)
SOX2	Mouse anti-SOX2 (Calbiochem, 德国)	Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 546(Life Technology 公司, 美国)
KLF4	Rabbit anti-KLF4 (Sigma, 美国)	Goat anti-Rabbit IgG Rhodamine (Rockland 公司, 美国)
NANOG	Rabbit anti-NANOG(Santa Cruz Biotechnology, 美国)	Goat anti-Rabbit IgG Rhodamine (Rockland 公司, 美国)
SSEA-1	Mouse anti-SSEA-1(Santa Cruz Biotechnology, 美国)	Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 546(Life Technology 公司, 美国)
TRA-1-81	Mouse anti-TRA-1-81(Millipore, 德国)	Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 546(Life Technology 公司, 美国)
p-STAT3	Rabbit anti-P-STAT3(Cell Signalling, 美国)	Goat anti-Rabbit IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国)
STAT3	Rabbit anti-STAT3(Cell Signalling, 美国)	Goat anti-Rabbit IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国)
β -actin	Mouse anti- β -ACTIN(Santa Cruz Biotechnology, 美国)	Goat anti-Mouse IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国)

Fsp I 于 37 °C 酶切过夜。酶切后,分别取 800 ng 酶切质粒与原质粒进行琼脂糖凝胶电泳,鉴定质粒是否被切开。之后用乙醇沉淀法将酶切后质粒进行浓缩,测定质粒浓度。按照之前转染成纤维细胞的方法使用 Amasa™ Human Stem Cell Nucleofactor™ Kit 1(Lonza 公司,美国)试剂盒通过核转仪将 3 μ g 的线性 pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector 质粒转入到 1.5×10^6 个猪 iPS 细胞,之后将细胞接到饲养层上继续培养。24 h 后换液,并在荧光倒置显微镜下观察 iPS 细胞中红色荧光蛋白的表达情况。

1.2.7 转后 iPS 细胞多能性鉴定

碱性磷酸酶染色:对转过红色荧光蛋白的 iPS 克隆进行碱性磷酸酶染色,初步鉴定其是否具有多能性。

RT-qPCR 鉴定多能基因表达:提取 pips-b 及转完红色荧光后的 pips-b 细胞的总 RNA,将其反转录为 cDNA 通过 qPCR 比较 2 种细胞中 mOCT4、mSOX2、mKLF4、mc-MYC、pSOX2 及 pKLF 等基因表达差异。

免疫荧光染色:对 iPS 细胞进行免疫荧光染色,观察在转完红色荧光蛋白后其 OCT4、SOX2 及 NANOG 等多能因子的表达情况。染色方法同 1.2.3,一抗信息如表 2 所示,OCT4 与 NANOG 二抗为 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (ABclonal 公司,美国),SOX2 二抗为 Goat Anti-Mouse IgG & IgM Antibody(Millipore 公司,德国),染色完成后于荧光显微镜下观察结果。

1.3 统计学方法

部分数据采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。用 *t* 检验进行统计学比较, $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 获得转 OSKM 与 M2rtTA 质粒的细胞株

过夜培养分别含有 OSKM 和 M2rtTA 质粒的大肠杆菌 100 mL,采用无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒,提取的质粒浓度分别为 248.5 ng/ μ L 和 1 022.0 ng/ μ L。之后各取 24 μ g 的 OSKM 和 M2rtTA 质粒,用限制性内切酶 *Fsp I* 在 37 °C 进行酶切过夜。第 2 天取酶切之后的质粒 20 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳,电泳结果如图 1A 所示,环状 OSKM 质粒和 M2rtTA 质粒已被切开,且质粒大小正确。之后通过乙醇沉淀法将所获得的线性质粒回收,测得的浓度分别为 801.8 ng/ μ L 和 834.3 ng/ μ L。

2.2 OSKM 质粒与 M2rtTA 质粒共同转染巴马猪胎儿成纤维细胞

原代巴马猪胎儿成纤维细胞培养 24 h 后,观察到细胞状态良好且达到了 95% 汇合度。此时将细胞消化成单个细胞,采用 Lonza 核转染试剂盒将 OSKM 质粒及 M2rtTA 质粒共同转入 1.0×10^6 个巴马猪细胞中。之后,利用 M2rtTA 质粒上的 zeosin 抗性对细胞进行筛选,并用未转染 PEF 作为阴性对照。期间每天观察细胞状态,随着天数增加,细胞死亡数量也在增加,表明阴性细胞在不断死亡。药筛 8 d 后,耐药性克隆长出,如图 1B 所示,克隆成规则的圆形,细胞排列紧密。之后将长出的克隆传代冻存,并留取部分细胞做 OSKM 和 M2rtTA 质粒的 PCR 鉴定。本研究共挑取了 92 个克隆,经过 PCR 鉴定,有 40 个克隆为 OSKM 和 M2rtTA 双阳性,部分结果如图 1C 所示,其中 P-O-M-03 与 P-O-M-04 号细胞株为同时转入了 OSKM 和 M2rtTA 2 个质粒。

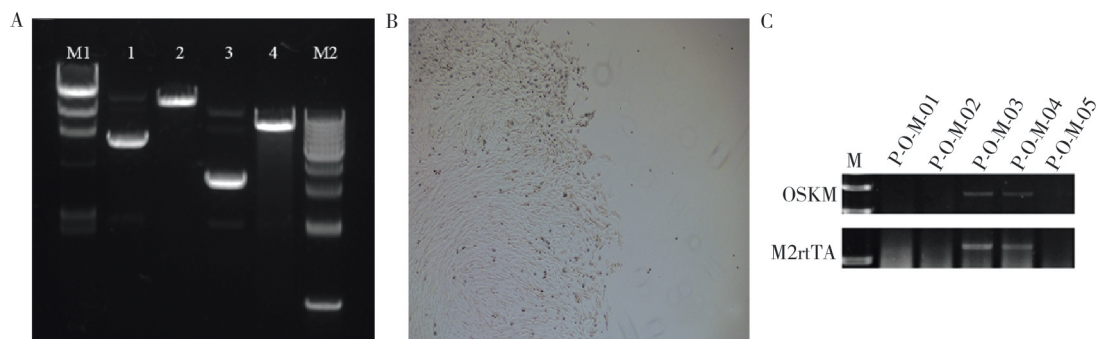
2.3 PEF 诱导为 iPS

将同时转入 OSKM 和 M2rtTA 质粒的细胞株接

入到饲养层细胞上, 培养 8 d 后, 可见 iPS 克隆形成, 如图 2A、D 所示, 将其分别命名为 pips-a 和 pips-b。长出的克隆经传代培养后表现出 2 种形态, pips-a 略微呈扁平状(图 2B), 而 pips-b 则更具有立体感(图 2E)。2 种细胞都可以进行单细胞传代培养, 3 d 进行 1 次传代, 可传至 30 代以上。之后对细胞进行核型分析, 2 个细胞系核型均正常, 为 38 条染色体, pips-b 细胞系核型结果见图 2C。碱性磷酸酶染色结果显示, 2 个细胞系均呈阳性, pips-b 细胞染色结果见图 2F。

2.4 iPS 细胞 RT-PCR 及 qPCR 结果

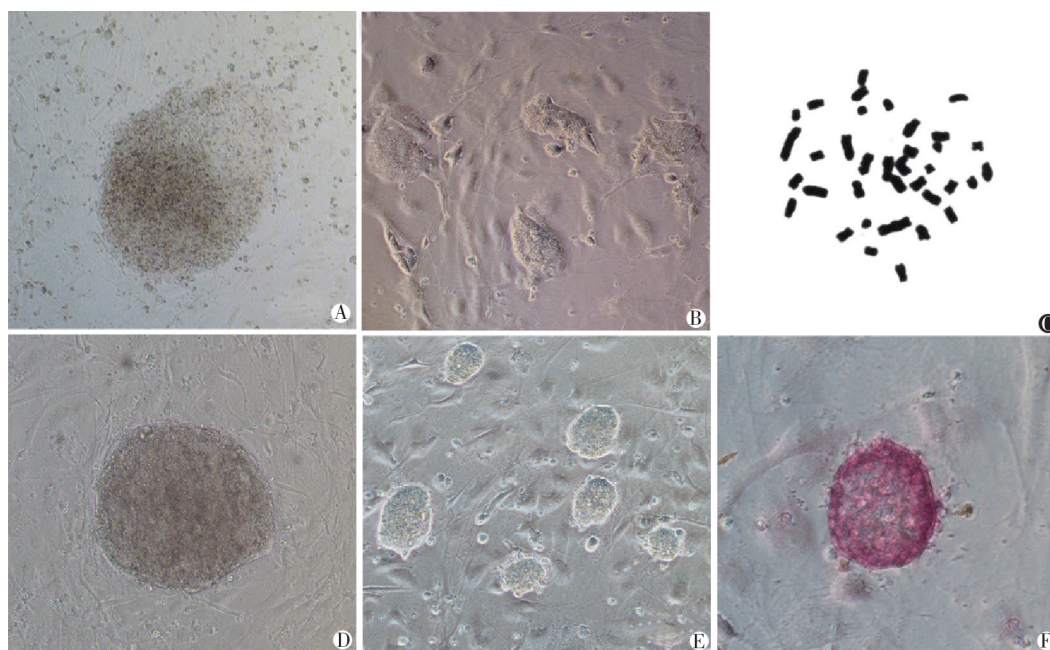
TRIzol 法提取 pips-a、pips-b、PEF 及 MEF 细胞总 RNA 后, 进行 RT-PCR 鉴定, 结果如图 3A 所示。2 个细胞系均表达外源 OCT4、SOX2、KLF4 及 c-MYC 4 个多能因子, 且内源 SOX2、KLF4 及 c-MYC 也有表达, 同时还表达 LIN28 和 TFPC2L1 等基因, 这表明所建立的 iPS 细胞系具有多能性。通过 qPCR 比较两个细胞系外源 OCT4、SOX2、KLF4 及 c-MYC 的表达差异, 可以发现 pips-b 的外源基因表达量明显高于 pips-a, 结果如图 3B 所示。



A: M1 为 λ -Hind III digest DNA Marker, M2 为 1 kb DNA Ladder, 1 为 OSKM 原质粒, 2 为 OSKM 酶切之后, 3 为 M2rtTA 原质粒, 4 为 M2rtTA 酶切后质粒; B: 细胞克隆图片($\times 40$); C: 转基因细胞株 PCR 鉴定结果, M 为 1 kb DNA Ladder。

图 1 获得转 OSKM 与 M2rtTA 质粒的细胞株

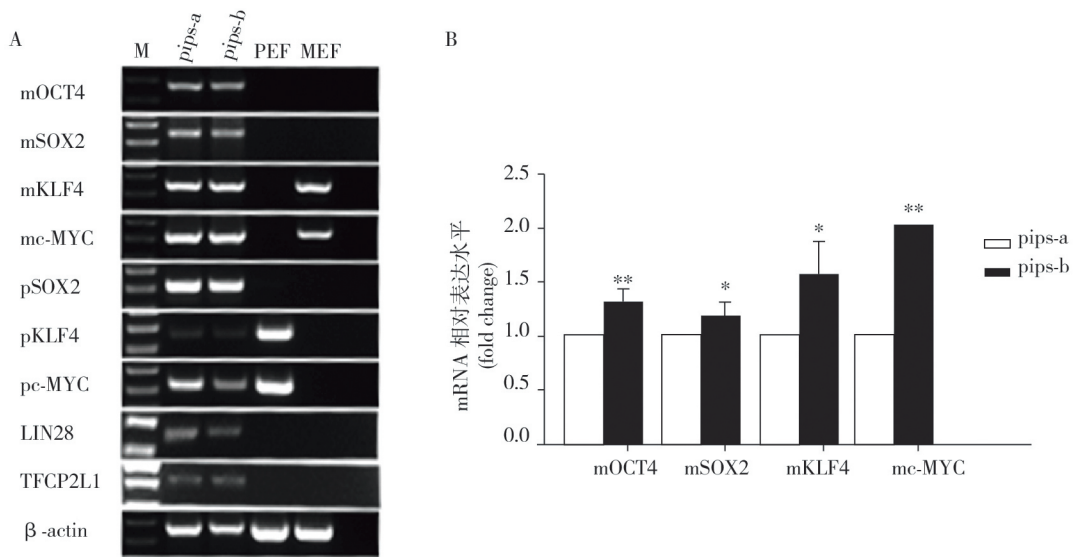
Figure 1 Obtainment of cell lines with OSKM and M2rtTA nucleofected



A: pips-a 细胞克隆长出图($\times 100$); B: pips-a 细胞传代培养图($\times 100$); C: pips-b 核型结果图($\times 1\ 000$); D: pips-b 细胞克隆长出图($\times 100$); E: pips-b 细胞传代培养图($\times 100$); F: pips-b 细胞碱性磷酸酶染色图($\times 200$)。

图 2 猪 iPS 细胞传代培养、核型分析和碱性磷酸酶染色

Figure 2 Cell culture, karyotype analysis and AP staining of porcine iPS



A:RT-PCR 鉴定结果,其中 M 为 100 bp DNA Ladder,mOCT4、mSOX2、mKLF4、mc-MYC 为外源的 4 个多能因子,pSOX2、pKLF4、pc-MYC 为内源的多能因子;B:外源多能因子表达 qPCR 结果,与 pips-a 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 3 pips-a 与 pips-b 多能因子表达 RT-PCR 及 qPCR 鉴定结果

Figure3 Results of pluripotency factors RT-PCR and qPCR of pips-a and pips-b

2.5 iPS 细胞多能因子表达鉴定

对 pips-b 细胞进行免疫荧光染色,结果如图 4 所示,pips-b 表达 OCT4、SOX2、KLF4、NANOG、

SSEA-1 与 TRA-1-81 等多能因子。同时,通过 Western bolt 实验进一步验证了 pips-b 细胞中多能因子 OCT4、SOX2 及 SSEA-1 的表达,结果如图 5A 所示。

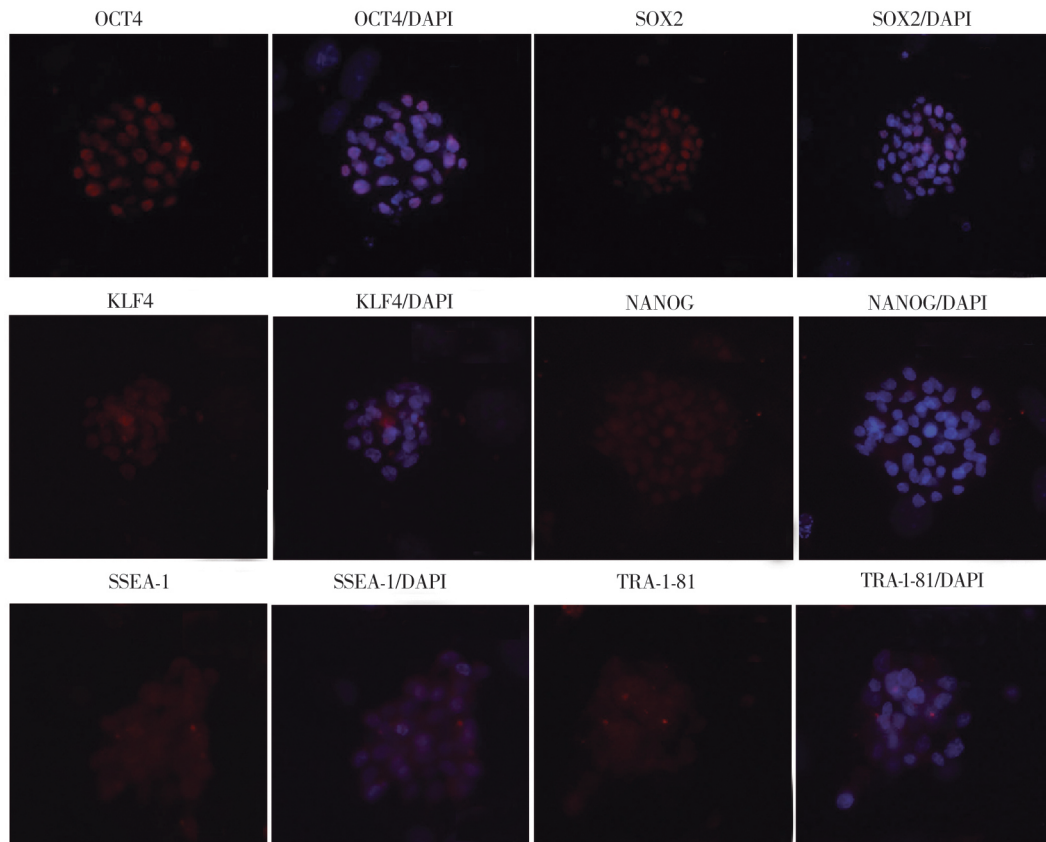


图 4 pips-b 免疫荧光染色($\times 200$)

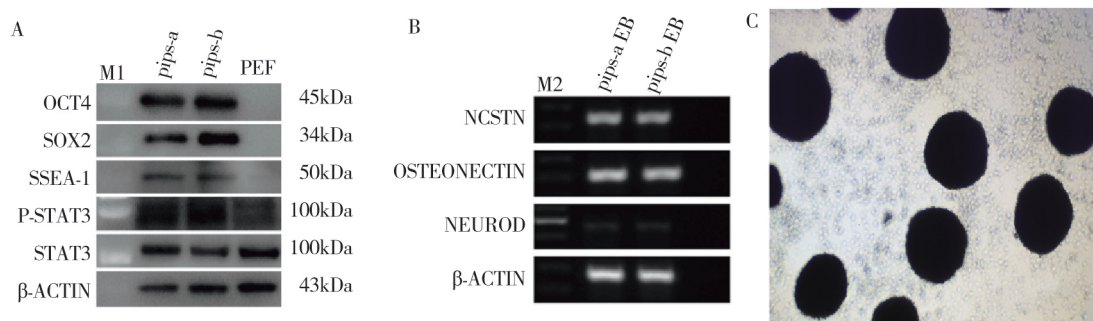
Figure 4 Immunofluorescence staining of pips-b($\times 200$)

2.6 iPS 细胞信号通路鉴定结果

已有研究表明,naive 干细胞利用 LIF/STAT3 细胞通路维持其自我更新,其标志为 STAT3 蛋白磷酸化。因此,提取 2 个细胞系的总蛋白,进行了 Western-blot 实验,结果如图 5A 所示,2 个细胞系的 STAT3 蛋白都有被磷酸化。因此可以推断,建立的 iPS 细胞通过 LIF/STAT3 信号通路维持自我更新,类似于小鼠胚胎干细胞。

2.7 iPS 细胞体外分化为类胚体及三胚层基因 RT-PCR 鉴定结果

iPS 细胞经悬滴培养 7 d 后,可见类胚体形成,如图 5C 所示。之后提取类胚体总 RNA,进行反转录 PCR,鉴定三胚层基因表达情况(图 5B),2 个细胞系体外分化为类胚体后均有三胚层相关基因表达,即 NCSTN、OSTEONECTIN 及 NEUROD。



A:pips-a,pips-b 及 PEF Western blot 结果,M1 为 Prestained Protein Ladder; B: 类胚体 RT-PCR 鉴定三胚层基因表达,M2 为 100 bp DNA Ladder,NCSTN 为内胚层 marker,OSTEONECTIN 为中胚层 marker,NEUROD 为外胚层 marker;C:pips-b 细胞类胚体($\times 40$)。

图 5 iPS Western blot 鉴定结果及体外分化实验结果

Figure 5 Results of Western blot and in vitro differentiation of iPS

2.8 向 iPS 细胞中转入红色荧光蛋白表达载体

过夜培养含有 pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector 质粒的大肠杆菌 100 mL,使用无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒,测得浓度为 522 ng/ μ L。将质粒用限制性内切酶 *Fsp* I 过夜酶切,酶切之后取 20 μ L 酶切质粒与原质粒进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图 6A 所示,可见质粒已被切开。之后使用核转试剂盒,向 pips-b 细胞中转入线性质粒 3 μ g 并继续培养,3 d 后,可见到细胞克隆形态与之前类似,如图 6B 所示。经紫外光激发可发出红色荧光,如图 6C 所示。之后对红色荧光克隆进行碱性磷酸酶染色,结果呈阳性,表明转入红色荧光蛋白表达载体后对细胞特性并没有明显影响。

2.9 红色荧光蛋白标记后 iPS 细胞多能性的鉴定结果

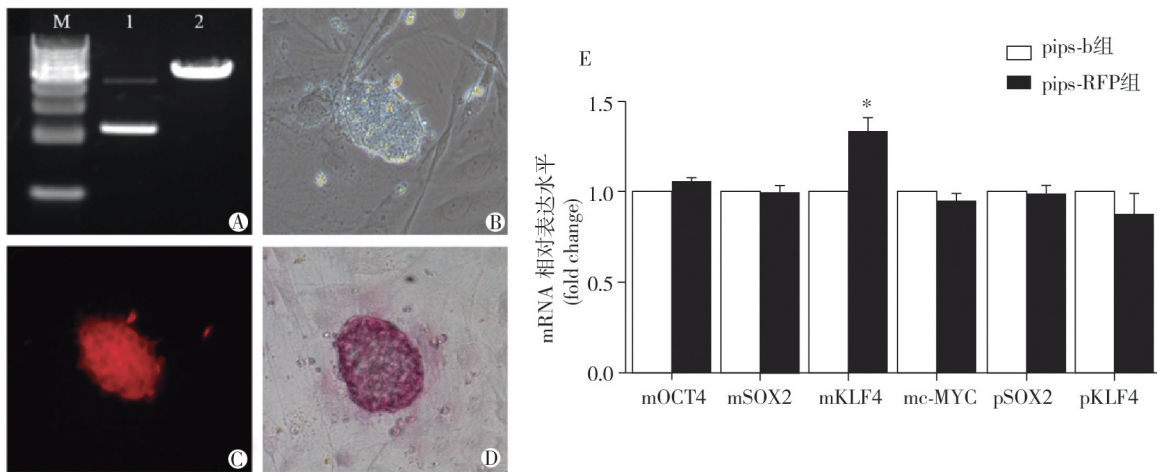
通过荧光定量 PCR 比较了 pips-b 细胞以及红色荧光蛋白表达阳性干细胞中外源多能因子 mOCT4、mSOX2、mKLF4、mc-MYC 以及内源多能因子 pSOX2、pKLF4 的表达差异,发现转入红色荧光蛋白后没有显著影响 pips-b 细胞上述多能因子的表达。为了进一步确定转入红色荧光蛋白表达载体后对干细胞多能性没有影响,对细胞进行了免疫荧光染色,结果如图 7 所示。可见细胞仍然表达 OCT4、

SOX2 及 NANOG 等多能因子。

上述多能因子表达的荧光定量 PCR 和免疫荧光染色检测结果可以证明,干细胞经红色荧光蛋白标记后,其多能性依然存在。

3 讨论

本研究通过向巴马小型猪胎儿成纤维细胞中导入诱导表达载体 TetO-FUW-OSKM 和 FUW-M2rtTA 2 个质粒,经过 DOX 诱导,成功建立起了猪 iPS 细胞系。该细胞系克隆外形呈三维立体状,并可以经过单细胞传代,类似于小鼠胚胎干细胞。经过 RT-PCR 和免疫荧光染色鉴定,所建立的 iPS 细胞系表达 OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、SSEA-1 及 TRA-1-81 等多种干细胞多能因子,其中 SSEA-1 为小鼠 naive 胚胎干细胞标志因子,而 TRA-1-81 为人或其他灵长类动物 naive 胚胎干细胞标志因子^[18-19]。对 iPS 细胞系进行信号通路鉴定,Western blot 结果显示,干细胞中 STAT3 蛋白发生磷酸化,生成 p-STAT3 蛋白,这表明所建立的 iPS 细胞系通过 LIF 信号通路维持自我更新^[22],类似于小鼠及人的 naive 胚胎干细胞。iPS 细胞系经体外悬滴培养,可形成类胚体,经 RT-PCR 鉴定,可发现类胚体表达三胚层相关基因,证明所建立的 iPS 细胞系具有体外分化能力^[21]。综上所述,所



A: pEF1alpha-DsRed-Express2 Vector 酶切图, M 为 1 kb DNA Ladder, 1 为原质粒, 2 为酶切后质粒; B: 转完红色荧光后克隆图($\times 200$); C: 克隆红色荧光($\times 200$); D: 细胞碱性磷酸酶染色图($\times 200$); E: 转红色荧光蛋白后的干细胞 pips-RFP 与未转染红色荧光蛋白干细胞 pips-b 内外源基因表达差异比较, 与 pisp-b 组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 iPS 细胞转入红色荧光蛋白及鉴定结果

Figure 6 The iPS cells were nucleofected with red fluorescent and results of identification

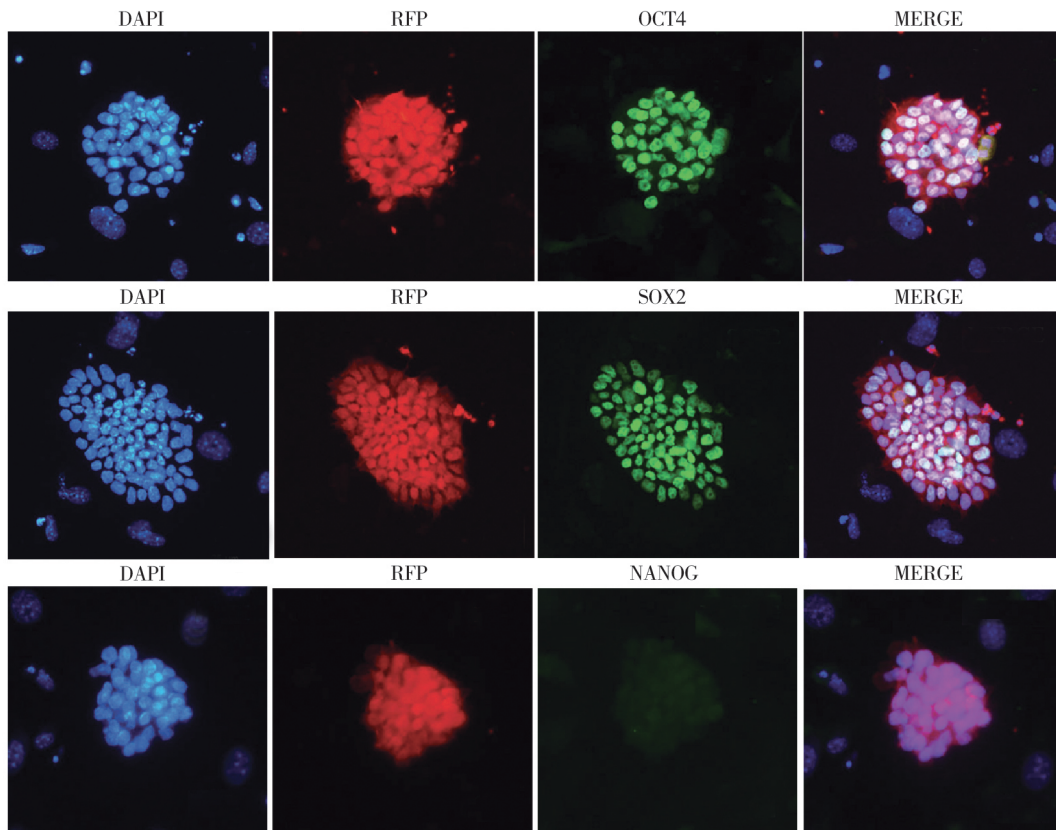


图 7 iPS 被红色荧光标记后免疫荧光染色结果($\times 200$)

Figure7 Results of immunofluorescence staining of iPS with RFP($\times 200$)

建立 iPS 细胞系在一些方面类似于 naive 胚胎干细胞, 为 naive-like iPS 细胞系。

之前所建立的猪 iPS 细胞系^[16-19], 都是利用逆

转录病毒或慢病毒向体细胞内导入多能因子再经过诱导建立, 而本研究直接将 OCT4、SOX2、KLF4 及 c-MYC 4 个因子表达载体通过核转的方式导入到猪

胎儿成纤维细胞中,经 DOX 诱导,建立起猪 naive-like iPS 细胞系。与之前方法相比,该方法不需要涉及与病毒相关的实验操作,对人与周围环境更加安全。同时该方法更加省时,操作更加方便。

以往研究表明,胚胎干细胞具有 naive 和 primed 的两种状态。一般认为 naive 胚胎干细胞具有三维立体形态,可以进行单细胞传代,并具有胚胎嵌合能力;而 primed 胚胎干细胞外形则呈扁平状,通过机械法进行细胞传代,不具有胚胎生殖系嵌合能力^[23]。本研究通过相同的诱导方法,但建立起的 2 个干细胞系外形有所差异,pips-a 外形更扁平,而 pips-b 的外形则更立体些。但两种细胞都可以进行单细胞传代,并且 RT-PCR、Western 等鉴定未发现 2 种细胞有其他方面的差异。不过通过 qPCR 鉴定 2 个细胞系内外源 OCT4、SOX2、KLF4 及 c-MYC 的表达情况,发现 pips-b 的表达水平更高,由此推断可能是因为诱导出 pips-b 的转基因细胞株中 OSKM 质粒拷贝数更高,所以才导致了这种现象。可见,即便使用相同的诱导方法,所建立的细胞系也会存在差异。

红色荧光蛋白是一种被广泛应用于多能干细胞标记的报告蛋白,而关于荧光标记 iPS 细胞的研究非常少。本研究通过向 pips-b 导入 EF1 α 启动子引导的红色荧光蛋白表达载体 pEF1 α -DsRed-Express2 Vector,成功对 iPS 细胞进行标记,细胞可以稳定表达红色荧光蛋白。对转红色荧光后细胞进行碱性磷酸酶染色,发现细胞仍然可以着色。qPCR 比较红色荧光蛋白基因转染前后细胞中部分内外源多能基因的表达差异,发现向 pips-b 细胞中转入红色荧光蛋白并不会对其基因表达产生显著影响。之后,对表达红色荧光蛋白细胞进行免疫荧光染色鉴定,结果显示细胞仍然表达 OCT4、SOX2 和 NANOG 等多能因子。由此我们可以推断,对研究所建立的猪 naive-like iPS 细胞进行基因修饰,并不对干细胞多能性造成影响。

综上所述,本研究表明,可以通过利用核转技术向猪胎儿成纤维细胞中导入传统 OSKM 4 因子表达载体的方法经诱导建立起猪 naive-like iPS 细胞系。向所建立细胞系中转入红色荧光蛋白表达载体,可以成功对干细胞进行红色荧光标记,并且干细胞的多能性不会发生明显改变,由此可以证明猪 iPS 细胞系可以通过基因修饰而继续保持其多能性,所建立的荧光标记的猪 naive-like iPS 细胞可用来研究干细胞的生长发育和分化,同时,所建立起来的 iPS 细胞系也可用于进行连续的基因编辑。

[参考文献]

- [1] Nichols J, Smith A. The origin and identity of embryonic stem cells[J]. *Development*, 2011, 138(1):3-8
- [2] Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 487-492
- [3] Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2013, 504(7479):282-286
- [4] Ware CB, Nelson AM, Mecham B, et al. Derivation of naive human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(12):4484-4489
- [5] Illich DJ, Zhang M, Ursu A, et al. Distinct signaling requirements for the establishment of ESC pluripotency in late-stage EpiSCs [J]. *Cell Reports*, 2016, 15 (4): 787-800
- [6] 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
- [7] Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1):11-15
- [8] Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1):16-19
- [9] 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
- [10] Liu H, Zhu F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6):587-590
- [11] Wu Z, Chen J, Ren J, et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system[J]. *J Mole Cell Biol*, 2009, 1(1):46-54
- [12] Esteban MA, Xu J, Yang J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(26):17634-17640
- [13] Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(27):10993-10998
- [14] 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 Bio*, 2010, 54 (11-12):1703-1711
- [15] Wang J, Gu Q, Hao J, et al. Tbx3 and Nr5 α 2 play important roles in pig pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Rev and Rep*, 2013, 9(5):700-708
- [16] Wang J, Wei R, Bou G, et al. Tbx3 and Nr5 α 2 improve the viability of porcine induced pluripotent stem cells after dissociation into single cells by inhibiting

- RHO-ROCK-MLC signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2015,456(3):743-749
- [17] Fukuda T, Tani T, Haraguchi S, et al. Expression of six proteins causes reprogramming of porcine fibroblasts into induced pluripotent stem cells with both active X chromosomes[J]. *J Cell Biochem*,2017,118(3):1-17
- [18] Fang R, Liu K, Zhao Y, et al. Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts[J]. *Cell Stem Cell*,2014,15(4):488-496
- [19] Chen Y, Niu Y, Li Y, et al. Generation of cynomolgus monkey chimeric fetuses using embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*,2015,17(1):116-124
- [20] Martinet W, Schrijvers DM, Kockx MM. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells[J]. *Biotechnol Lett*,2003,25(13):1025-1029
- [21] Gu Q, Hao J, Zhao XY, et al. Rapid conversion of human ESCs into mouse ESC-like pluripotent state by optimizing culture conditions[J]. *Protein Cell*,2012,3(1):71-79
- [22] Hirai H, Karian P, Kikyo N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor[J]. *Biochem J*,2011,438(1):11-23
- [23] Duggal G, Warrier S, Ghimire S, et al. Alternative routes to induce naive pluripotency in human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*,2015,33(9):2686-2698

[收稿日期] 2017-01-03



2017 年全年龄阶段新公式在中国人群中的验证

雍珍珠¹, 李 芬^{1,2}, 赵卫红¹

(¹南京医科大学第一附属医院, 江苏 南京 210029; ²山东省青岛市第八人民医院, 山东 青岛 266000)

2017 年 Pottel 等^[1]开发了基于胱抑素 C(cystatin C, Cys)和基于血清肌酐(serum creatinine, SCr)联合 Cys 的 2 个全年龄阶段新公式 (full age spectrum equation, FAS) FASCys 和 FASCombi, 用于评估肾小球滤过率。在欧洲人群中的验证发现其准确性优于或在某些情况下等于美国慢性肾脏病流行病学合作工作组(chronic kidney disease epidemiology collaboration, CKD-EPI)公式, 但在中国人群, 尤其在中国老年人群中的适用性尚未得到验证。

本课题组探讨 2 个 FAS 公式在中国 4 个中心 1 184 名患者中的适用性并与指南推荐的 2012 年 2 个 CKD-EPI 公式 (基于 Cys 公式, CKD-EPICys; 基于 SCr 联合 Cys 公式, CKD-EPISCr-Cys) 进行了比较。研究发现: FASCombi 公式在总人群中偏差最小 (median bias, -287)、精确性最高 (the inter-quartile range of difference, IQR, 19.01)、准确性最好 (the proportion of estimated GFR within 30% of referenced GFR, P30, 74.16%)。FASCys 公式与 CKD-EPISCr-Cys 公式的适用性相近 (median bias, -5.17 vs. -4.0; IQR, 21.01 vs. 20.18; P30, 70.10% vs. 70.35%, $P>0.5$), 均优于 CKD-EPICys 公式。在中国年轻人、轻度肾损伤的人群中 FASCombi 公式与 CKD-EPISCr-Cys 公

式表现相当 ($P>0.05$), 优于 2 个基于 Cys 公式。而在中国老年人群中, FASCombi 公式与 FASCys、CKD-EPISCr-Cys 及 CKD-EPICys 公式相比, 偏差相对较小 (median bias, -8.09 vs. -9.63, -7.52, -11.04, $P<0.05$)、精确性最高 (IQR, 15.18 vs. 16.32, 15.22, 16.63)、准确性最好 (P30, 70.37% vs. 64.33%, 63.35%, 54.58%, $P<0.05$), 仅 FASCombi 的 P30 达到 70%。

FASCombi 公式在总人群中偏差小、精确性及准确性高, 尤其在中国老年人群中的准确性明显高于 CKD-EPI 公式。而 FASCys 公式则与 CKD-EPISCr-Cys 公式表现相当或略逊, 但优于 CKD-EPICys 公式。在 FAS 公式原理及模式的基础上改良更合适于中国人群, 尤其更适用于中国老年人群的公式, 有望更准确地评估中国老年人群的肾功能。

[参考文献]

- [1] Pottel H, Delanaye P, Schaeffner E, et al. Estimating glomerular filtration rate for the full age spectrum from serum creatinine and cystatin C [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(3): 497-507

[收稿日期] 2017-07-02