

## miRNA-205 过表达载体的构建及其对猪诱导性多能干细胞建系的作用

陈俏羽,赵丽华,陈袁,张曼玲,侯道荣,姜海滨,王俊政,刘曼菱,王晨宇,尤志欢,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:构建 miRNA-205 过表达载体并研究 miRNA-205 对猪诱导多能干细胞系建立的影响。方法:对本实验室已建系的猪 primed 胚胎干细胞、猪内细胞团细胞及猪胎儿成纤维细胞三者之间进行 miRNA 表达谱的分析比较,利用 PCR 扩增 miRNA-205 前体序列,并将其克隆于基础表达载体 pCAGDNA3-hFat1,构建过表达载体 pCAG-miR205。使用脂质体转染技术将该载体转染到已转基因修饰的猪胎儿成纤维细胞(含有鼠源干细胞多能性转录因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc)。利用干细胞培养液诱导培养建立猪诱导性多能干细胞系。通过实时荧光定量 PCR 检测转染前后细胞内 miRNA-205 的表达情况,比较分析 miRNA-205 对猪诱导性多能干细胞的建系效率的影响。**结果:**成功构建了 pCAG-miR205 过表达载体;相较于未转染细胞,转染该载体细胞的 miRNA-205 表达量显著升高( $P < 0.01$ );利用干细胞培养液诱导后培养转染组的诱导性多能干细胞克隆长出率高于未转染细胞组。**结论:**研究表明在细胞水平上过表达 microRNA-205,可提高猪诱导性多能干细胞建系效率;已构建的 miRNA-205 过表达载体将有助于在后续研究中建立稳定表达 miRNA-205 的细胞系,为进一步深入研究 miRNA-205 在干细胞重编程和多能性维持中的作用机制打下基础。

**[关键词]** 猪;miRNA-205;诱导多能干细胞

**[中图分类号]** R329.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)06-713-08

**doi:**10.7655/NYDXBNS20180601

## Construction of miRNA - 205 overexpression vector and its effect on porcine induced pluripotent stem cell establishment

Chen Qiaoyu, Zhao Lihua, Chen Yuan, Zhang Manling, Hou Daorong, Jiang Haibin, Wang Junzheng, Liu Manling, Wang Chenyu, You Zhihuan, Li Rongfeng\*

Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, NMU, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To construct a miRNA-205 overexpression vector and study the effect of miRNA-205 on the establishment of porcine induced pluripotent stem cell lines (iPSCs). **Methods:** We compared miRNA transcriptional profiles between the primed porcine embryonic stem cells (primed PESC), porcine inner cell mass (ICM) and pig fetal fibroblast cells (PEF). The miRNA-205 precursor sequence was amplified by PCR and integrated into the expression vector pCAGDNA3-hFat1 to construct the overexpression vector pCAG-miR205. The expression vector was transfected into porcine fetal fibroblasts containing four mouse derived transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc) by lipofectamine transfection technique. To establish porcine iPSCs, the cells were incubated and cultured in stem cell culture medium. qPCR (real-time quantitative PCR) was used to detect the expression of miRNA-205 in the cells before and after transfection. The inducible effect of miRNA-205 on porcine iPSCs formation was analyzed. **Results:** The recombinant plasmid pCAG-miR205 was constructed. Compared with untransfected cells, the expression level of miRNA-205 in the transfected cells was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the colony number was higher after being induced in stem cell culture medium. **Conclusion:** Over-expression of miRNA-205 at the cellular level can improve the efficiency of porcine induced pluripotent stem cell lineage. The miRNA-205 over-expression vector successfully constructed in this study will help to establish a stable cell line expressing miRNA-205, which laid the foundation for further study on the exact function and mechanism of miRNA-205 on stem cell reprogramming and pluripotency maintenance.

**[Key words]** pig; miRNA-205; induced pluripotent stem cells

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(31371487)

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(06): 713-720]

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

多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)是一类具有自我更新能力、无限传代的细胞。在特定培养条件下,它可定向分化为三胚层细胞。目前所建立的小鼠及人的PSCs具有两种状态:naive和primed<sup>[1]</sup>。其中naive PSCs来源于囊胚期的内细胞团<sup>[2-3]</sup>,而primed PSCs来源于植入后胚胎的外胚层<sup>[4]</sup>。两者都表现为碱性磷酸酶染色阳性,且共同表达一些干细胞多能性转录因子。但是它们的自我更新能力依赖于不同的信号通路,更重要的是naive PSCs具有生殖系嵌合能力<sup>[5]</sup>。大量研究工作致力于建立真正的猪naive胚胎干细胞系,但至今仍未明确维持猪胚胎干细胞特性的信号通路、培养液成分的组成,未实现建立稳定传代、真正的猪胚胎干细胞系。因此人们将注意力转移到对猪诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的研究<sup>[6]</sup>,以此来寻找维持猪干细胞多能性的机制<sup>[7]</sup>。

一般来说,iPSCs是通过外源转录因子(如Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc等)转染PEF,诱导过表达而获得多能性。除转录因子以外,miRNA也是潜在的多能干细胞诱导因子。miRNA是长度为20~22个核苷酸高度保守的非编码RNA,在高等真核生物的转录后基因调控中起主要作用<sup>[8]</sup>。miRNA参与许多疾病的发病、细胞周期和细胞凋亡的调节等,决定不同的信号通路,对干细胞重编程、多能性维持和分化也起关键作用。Jouneau等<sup>[9]</sup>研究发现miRNA簇如miRNA-302-367簇和miRNA-290-295簇对于维持小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)的多能性及自我更新非常重要。Naive和Primed干细胞具有不同的miRNA表达谱<sup>[7]</sup>。miRNA表达变化引发人胚胎干细胞向Naive转化<sup>[3]</sup>。除了在胚胎干细胞中的作用,miRNA对诱导性多能干细胞多能性的维持和重编程的效率也有重要影响。miRNA-302-367簇加快鼠、人以及猪诱导多能干细胞的重新编程过程,从而使诱导效率提高<sup>[10-12]</sup>。甚至在没有干细胞多能性转录因子OSKM(Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc)的作用下,仅仅通过转染miRNA-200c、miRNA-302s和miRNA-369s家族miRNAs就可高效重编程人和鼠的成纤维细胞,将其诱导为PSCs<sup>[13]</sup>。

细胞核重编程是一个以起始、成熟和稳定阶段为特征的多步骤过程,而间充质向上皮转化(mesenchymal-to-epithelial transition, MET)则是重编程过程中的第1个障碍<sup>[14]</sup>。Samavarchi-Tehrani等<sup>[15]</sup>证明miRNA205和miRNA200家族可以促进间充质向上

皮转化,和外源OSKM 4种干细胞多能性转录因子一起作用可加速重编程初期的进程。naive胚胎干细胞表达谱接近与囊胚的内细胞团,而primed胚胎干细胞表达谱接近于植入后胚胎的外胚层<sup>[1]</sup>。据此,将本实验组之前研究中已建立的猪primed胚胎干细胞(primed embryonic stem cells, primed PESC)的miRNA表达谱与猪体外受精胚胎的内细胞团(inner cell mass, ICM)、猪胎儿成纤维细胞(porcine embryonic fibroblast, PEF)的miRNA表达谱进行分析比较,发现相比于ICM团中miRNA-205的表达量,primed PESC中miRNA-205表达量明显下调,其表达量更接近于PEF<sup>[16]</sup>。因此,本研究尝试构建miRNA-205过表达载体,并在细胞水平上过表达miRNA-205,以期优化猪iPSCs的建系条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

主要试剂包括高糖DMEM(1×)、KnockOut™ DMEM(1×)、DMEM-/F12(1:1)(1×)、Neurobasal Medium、FBS、KnockOut™ SR、MEM NEAA(100×)、2-Mercaptoethanol、Pen Strep、N-2 Supplement、B-27 Supplement、0.25% Trypsin-EDTA(1×)、bFGF、G418(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);Pre-miRNA™ miRNA Precursor(Thermo公司,美国);丝裂霉素(Wako公司,日本);Nucleofector™ Kits for Primary Fibroblasts(Amaxa公司,德国);pMD18-T vector、各种限制性内切酶、EX Taq、DNA凝胶回收试剂盒、DNA连接试剂盒、各种DNA marker、RNA提取试剂盒RNAisoPlus、Recombinant DNase I(RNase-free)试剂盒和反转录试剂盒High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit等(大连宝生物工程有限公司);SYBR® PremixEx Taq™(Tli RNase H Plus)试剂盒(Roche公司,德国);TIANamp Genomic DNA kit、质粒小量及大量提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);Wizard® Genomic DNA Purification Kit(Promega公司,美国);Quant Qrt-PCR(SYBR Green I)Kit及miRNAacute miRNA isolation kit(北京天根生化科技有限公司)。

大白猪胚胎成纤维细胞(PEF)、小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)为本实验室取材、制备;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); pCAGDNA3-hFat1质粒为本实验室保存,菌株DH5 $\alpha$ 购自天根生化科技有限公司。

定量PCR仪(Roche公司,美国);PCR仪(ABI公司,美国);细胞培养箱(Thermo公司,美国);高速冷冻离心机(Eppendorf公司,德国);荧光倒置显微镜(Nikon公司,日本);凝胶成像仪(Bio-Rad公司,美国);核转染仪(Amaxa公司,德国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 miRNA表达谱分析

用不同方法收集 primed PESC、猪体外受精胚胎的 ICM 以及 PEF。① primed PESC: 在体视显微镜下用 1 mL 注射器针头将 primed ESCs 切割成尽量小的团块,之后用 0.25% 胰酶消化的方法收集。② 猪体外受精胚胎的 ICM: 通过体外受精获得第 6 天囊胚,经链霉菌蛋白酶处理去除透明带后,将去掉透明带的囊胚于发育培养液中洗涤 3 遍,移入用 PBS 按 1:5 稀释后的一抗 rp(anti-pig serum antibody produced in rabbit)中洗涤 3 遍并处理 30 min,干细胞培养液中洗涤 3 遍后,移入 1:10 稀释后的二抗 GS(豚鼠血清)中洗涤 3 遍并处理 30 min,最后在发育培养液中洗涤 3 遍后,用口吸管将去除滋养层细胞的 ICM 小心移入 RNA 提取液中。③ PEF: 解冻第 3 代 PEF 于 6 孔板,第 2 天换液 DMEM+15% FBS,待细胞长到 90% 汇合度后,用 0.05% 胰酶消化的方法收集与 ICM 细胞数量基本一致的 PEF,用 PBS 洗涤 1 遍后移入 RNA 提取液中。

用试剂盒 miRNAacute miRNA isolation kit,按照说明书的操作步骤分别对 primed PESC、猪体外受精胚胎的 ICM 和 PEF 进行 Total RNA 的提取。利用 miRNAacute miRNA cDNA First-Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒,对提取的 miRNA 3' 末端进行加 poly(A)处理。之后将 poly(A)修饰的 miRNA 进行逆转录反应。并送交上海欧易生物有限公司进行 miRNA 表达谱分析。

### 1.2.2 miRNA-205 过表达载体的构建

准备细胞数量约为  $1 \times 10^7$  个的 PEF,使用 TI-ANamp Genomic DNA kit,按照说明书进行细胞基因组 DNA 的提取。使用紫外分光光度计检测基因组 DNA 的浓度,并于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

根据 GenBank 中猪 miRNA-205 的基因组序列信息,设计并合成 miRNA-205 前体的扩增引物 R 和 L,引物序列如下:上游引物 R 为 5' - TTTG-GATCCCTCGTGGTTTTTAACCCCTTGT - 3',下游

引物 L 为 5' - AACGGATCCCGTGTCTCTT-GTCCTTCATTCC - 3' (下划线部分为 BamH I 内切酶酶切位点)。以猪基因组 DNA 为模板,用 Ex Taq 高保真酶 PCR 扩增包含 miRNA-205 的前体片段,PCR 反应总体系为 50  $\mu\text{L}$ ,包括 2 $\times$ Taq Master Mix 23  $\mu\text{L}$ ,上游引物 R 2  $\mu\text{L}$ ,下游引物 L 2  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 4  $\mu\text{L}$ ,ddH $_2\text{O}$  19  $\mu\text{L}$ 。反应条件如下:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,61  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。通过琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,利用凝胶成像仪观察和照相记录,并使用 Wizard SV Geland PCR Clean-Up System 试剂盒进行胶回收,具体步骤按说明书进行。

将 miRNA-205 前体片段胶回收产物与克隆载体 pMD18T-vector 以摩尔数 4:1 的比例按说明书进行操作,16  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接;连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑单克隆菌落,命名为 pMD18T-miR205,送上海金斯瑞公司进行基因测序。测序结果与 GenBank 中猪 miRNA-205 前体基因序列进行基因比对,测序比对结果正确的 pMD18T-miR205 质粒用于下一步实验。

将测序正确的 pMD18T-miR205 质粒与基础表达载体 pCAGDNA3-hFat1 分别用 BamH I 进行酶切,并回收长 340 bp 的猪 miRNA-205 前体片段和长 6 828 bp 的线性化 pCAGDNA3 载体片段;按照 miRNA-205 前体片段与 pCAGDNA3 摩尔比为 4:1 的比例,经 T4 DNA 连接酶进行 16  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接。连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑单克隆菌落扩培并提取质粒。使用限制性内切酶 Hind III 和 BamH I 进行酶切鉴定,挑选酶切结果正确的质粒,送上海金斯瑞公司进行基因测序;将测序结果与预测的过表达载体序列进行比对,比对结果一致的正确质粒即为猪 miRNA-205 过表达载体,命名为 pCAG-miR205。

### 1.2.3 稳定表达 OSKM 的 PEF 细胞系的建立

利用无内毒素质粒大提试剂盒,分别提取猪 miRNA-205 过表达载体 pCAG-miR205 质粒、TetO-FUW-OSKM 质粒和 FUW-M2rtTA 质粒,具体步骤按照说明书进行操作。pCAG-miR205 质粒储存  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,留待备用。使用限制性内切酶 Fsp I 分别对 TetO-FUW-OSKM 质粒和 FUW-M2rtTA 质粒进行酶切,通过琼脂糖凝胶电泳检测质粒是否被完全线性化。采用乙醇沉淀法回收线性化质粒,存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

利用核转染的方法建立稳定表达 OSKM 的 PEF 细胞系。于转染前解冻培养 PEF,铺于 60 mm 细胞培养皿中,使用成分为 85% DMEM+10% FBS+1% Pen Strep 的细胞培养液培养于 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$  培养



箱中;待细胞汇合度达90%时,用0.05%胰蛋白酶将细胞消化成单细胞,加入培养液终止消化后,回收细胞于15 mL离心管中,1 500 r/min离心5 min,弃上清,并用DPBS洗1遍。按照Amaxa Basic Nucleofector Kit试剂盒(Lonza公司,美国)中操作说明配制核转液,进行细胞转染。利用U016转染程序将线性化的TetO-FUW-OSKM(4  $\mu\text{g}$ )和FUW-M2rtTA(4  $\mu\text{g}$ )转染至 $1 \times 10^6$ 个PEF中,具体操作步骤按说明书进行。转染后将细胞平均铺到10 cm培养皿中继续培养48 h。利用FUW-M2rtTA质粒中的zeocin抗性基因,加入300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的zeocin进行药物筛选。3 d后每日换液,到第9天,得到规则紧密的圆形克隆,阴性细胞充分剔除。用0.05%胰蛋白酶消化收集多克隆细胞,命名为OSKM多克隆细胞,冻存备用。

#### 1.2.4 OSKM多克隆细胞中过表达miRNA-205

培养OSKM多克隆细胞至对数生长期并将其接种于6孔板(每孔 $4 \times 10^5$ 个细胞),待细胞贴壁后将培养液更换为OptiMEM培养液。根据表1所列各组分,用OptiMEM培养液分别稀释miRNA-205-precursor(商业购买的一种miRNA-205前体物质)、pCAG-miRNA-205质粒和Lipofectamine 2000脂质体,室温孵育5 min;然后以相应比例分别混合各组液体,室温孵育20 min后,将孵育好的混合物分别加入细胞培养体系中,轻轻晃动,使其均匀分布。于培养24 h后,收集各组转染后的OSKM多克隆细胞。

利用miRNAacute miRNA isolation kit试剂盒,按照说明书的操作步骤。阴性对照组为未转染过表达载体pCAG-miRNA-205质粒的OSKM多克隆细胞,命名为OSKM多克隆细胞;阳性对照组为转染miRNA-205-precursor的OSKM多克隆细胞,命名为pmiRNA-205-oskm细胞;实验组为转染pCAG-pmiRNA-205质粒的OSKM多克隆细胞,命名为pCAG-miRNA-205-oskm细胞。之后对以上各组转染24 h后的细胞分别进行total RNA提取。然后用miRNAacute miRNA cDNA First-Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒对miRNA 3'末端进行加poly(A)处理及逆转录反应。同时设计并合成miRNA-205的荧光定量PCR(qPCR)引物序列miRNA-U6: 5'-CAAGGATGACACGAAAATTCG-3'和miRNA-205: 5'-TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG-3'。然后分别对以上各组细胞进行qPCR分析。

#### 1.2.5 猪iPS细胞的诱导和效率比较

为猪iPS细胞建系准备饲养层细胞:解冻第3~4代的MEF接种于10 cm培养皿中,当细胞汇合度

达到90%时,用细胞培养液稀释终浓度为10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丝裂霉素-C,处理细胞2.5~3.0 h,之后用0.05%胰蛋白酶消化细胞,待消化为单细胞后,用细胞培养液终止消化并离心收集,用细胞培养液将细胞重悬并计数,以每孔 $4.0 \times 10^5$ 个细胞的密度接种于事先用0.1%明胶孵育30 min的6孔板中,于38.5  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中过夜培养,细胞贴壁后可作为饲养层。

将OSKM多克隆细胞、pmiRNA-205-oskm细胞、pCAG-miR205-oskm细胞分别以每孔 $4 \times 10^4$ 个细胞的密度接种于含饲养层的6孔板中,使用干细胞培养液诱导培养猪iPS细胞,干细胞培养液成分包括40% KnockOut DMEM、10% KnockOut SR、24% DMEM/F12、24% Neurobasal Medium、0.5% N-2 Supplement、1% B-27 Supplement、0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin、1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  L-Glutamin、0.05  $\mu\text{mol}/\text{L}$  2-Mercaptoethanol、0.5% NEAA、1% Pen Strep、3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  CHIR99021、1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  PD0325901、2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  SB431542、2 000 UI/mL LIF、16 ng/mL bFGF、50 ng/mL VC和2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DOX。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,统计克隆长出率。

#### 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, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miRNA表达谱分析的比较结果

比较primed PESC、猪体外受精胚胎的ICM和PEF的miRNA表达谱,共挑选出4个miRNA在猪体外受精胚胎的ICM中高表达,而在primed PESC和PEF中的表达量明显下调(表1)。其中,miRNA-205的差异倍数最大,且差异极显著( $P < 0.01$ )。

### 2.2 miRNA-205过表达载体的构建

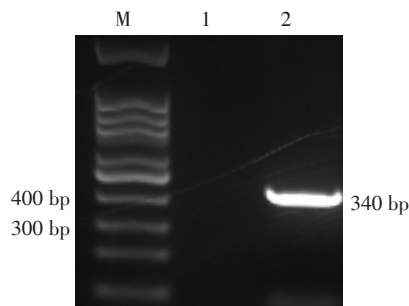
利用PCR在猪基因组DNA中扩增miRNA-205前体序列,序列长度为340 bp,电泳结果显示该序列长度与预期相符(图1),克隆至pMD18T-vector获得pMD18T-miR205;通过基因测序和序列比对,比对结果显示所扩增miRNA-205前体序列与GenBank中报道的序列一致,一致性达100%(图2),可用于后续实验。

利用限制性内切酶酶切和连接获得3个重组质粒pCAG-miRNA-205(A、B和C),利用限制性内切酶BamH I和Hind III分别酶切和电泳鉴定重组质粒pCAG-miRNA-205,酶切结果显示重组质粒pCAG-

表1 miRNA 表达分析结果  
Table1 miRNA expression analysis

Transcript ID	ICM	PESCs	PEF	差异值1	差异值2	差异值3
ssc-miRNA-205	10.522 38	1.769 887	1.932 803	473.547	385.230	0.893 217
ssc-miRNA-885-3p	8.049 236	5.314 823	5.397 931	5.746	6.282	0.944 021
ssc-miRNA-3613	6.552 838	3.018 229	3.836 179	7.892	6.573	0.567 247
ssc-miRNA-128	5.912 659	2.553 592	7.303 912	8.486	0.381	0.037 154

差异值1:miRNA 在 ICM 和 primed PESC 中表达量之间的差异倍数;差异值2:miRNA 在 ICM 和 PEF 中表达量之间的差异倍数;差异值3:miRNA 在 primed PESCs 和 PEF 中表达量之间的差异倍数。



M: DNA marker 100 bp; 1: 空白对照 (ddH<sub>2</sub>O); 2: PCR 扩增的 miRNA-205 前体序列。

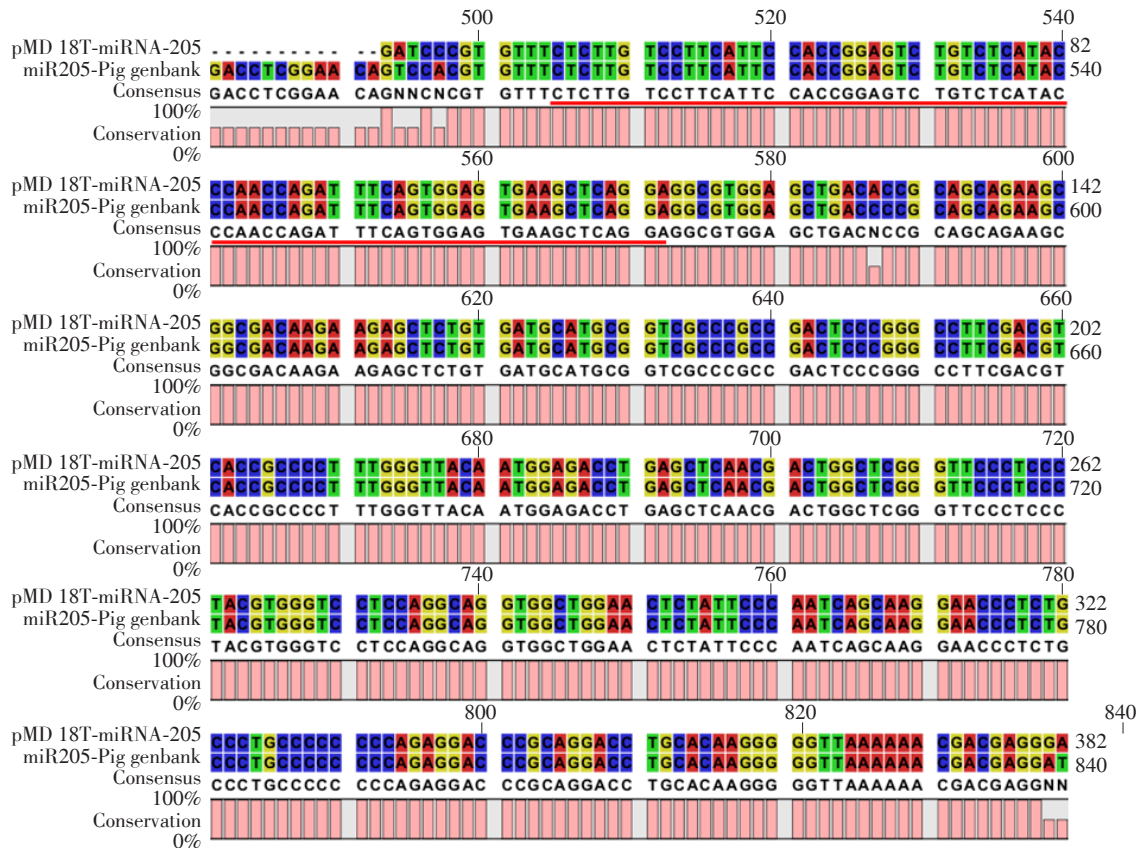
图1 PCR 扩增 miRNA-205 前体序列的电泳图

Figure 1 PCR amplification of miRNA-205 precursor sequence

miRNA-205C 为正确连接后质粒,即 *Hind* III 酶切后片段长度为 7 168 bp, *Bam*H I 酶切后片段长度为 6 828 bp 的线性化 pCAGDNA3 载体片段和 340 bp 的 miRNA-205 前体片段(图3)。对重组质粒 pCAG-miRNA-205C 进行基因测序,测序结果与预测的过表达载体序列进行比对,证明 miRNA-205 前体片段连接到 pCAGDNA3 载体片段中的方向正确(图4),即 miRNA-205 过表达载体构建成功。

### 2.3 稳定表达 OSKM 的 PEF 细胞系的建立

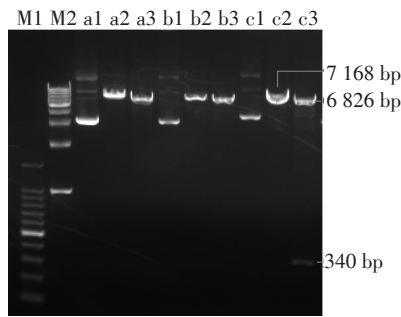
采用无内毒素质粒大提试剂盒分别提取 TetO-FUW-OSKM 质粒和 FUW-M2rtTA 质粒,质粒浓度分别为 248.5 ng/μL 和 1 022.0 ng/μL。限制性内



红线标出部分为 pMD18T-miR205 中包含的 miRNA-205 前体序列。

图2 pMD18T-miR205 测序结果与 Genbank 报道序列的比对图

Figure 2 Comparison of pMD18T-miR205 sequencing results with GenBank reported sequences



M1:100 bp DNA Marker;M2:1 kb DNA Ladder; a1,b1,c1:pCAG-miRNA-205 原质粒;a2,b2,c2: *Bam*H I 酶切之后;a3, b3,c3: *Hind*III 酶切之后。

图3 酶切鉴定重组质粒 pCAG-miRNA-205  
Figure 3 Digestion identification of recombinant plasmid pCAG-miRNA-205

切酶 *Fsp* I 分别线性化 TetO-FUW-OSKM 质粒和 FUW-M2rtTA 质粒,电泳结果显示质粒长度正确,酶切完全(图5)。利用核转染的方法将两个质粒共转染到 PEF 中,并通过 zeocin 抗性筛选获得 OSKM 多克隆细胞(图6)。

#### 2.4 OSKM 多克隆细胞中过表达 miRNA-205

通过脂质体转染的方法获得了空白对照组(OSKM 多克隆细胞)、阳性对照组(pmiRNA-205-oskm 细胞)和实验组(pCAG-miR205-oskm 细胞)3组细胞,对3组细胞进行 qPCR 检测,结果表明:以 OSKM 多克隆细胞的 miRNA-205 表达量为基准,pmiRNA-205-oskm 细胞和 pCAG-miR205-oskm 细胞的 miRNA-205 表达量均显著升高,即在 pCAG-miR205-oskm

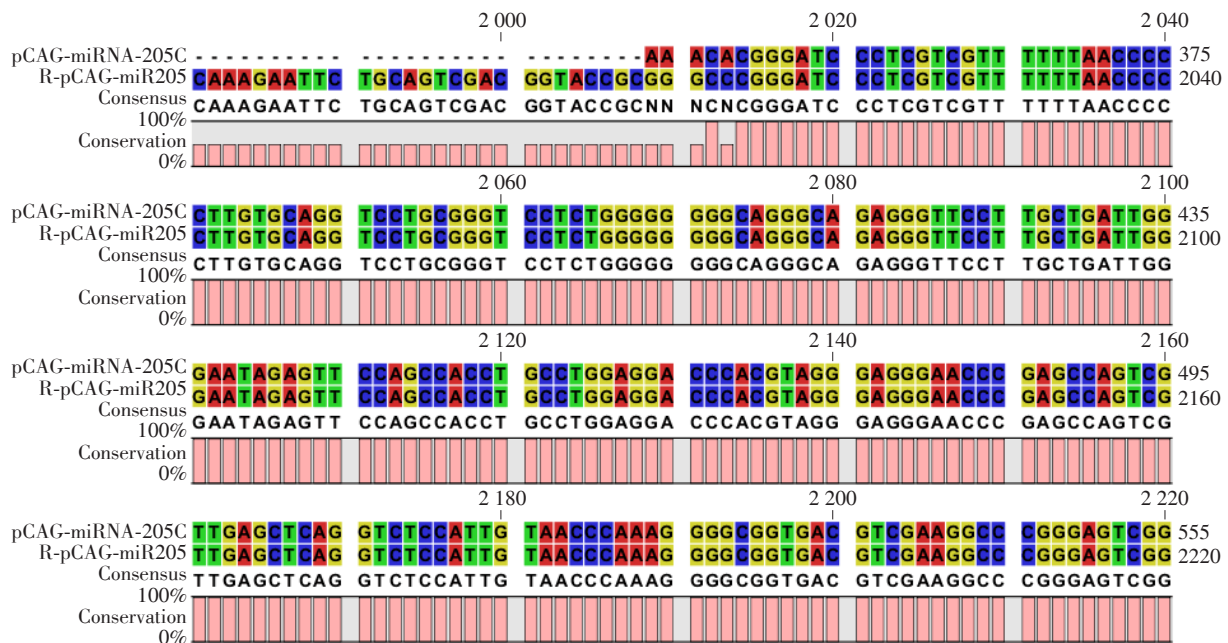


图4 pCAG-miRNA-205C 测序结果与 GenBank 报道序列的比对图

Figure 4 Comparison of pCAG-miRNA-205C sequencing results with GenBank reporter sequences

细胞中成功过表达 miRNA-205(图7A)。

#### 2.5 miRNA-205 在猪 iPS 细胞建系中的作用

分别利用空白对照组(OSKM 多克隆细胞)、阳性对照组(pmiRNA-205-oskm 细胞)和实验组(pCAG-miR205-oskm 细胞)诱导培养猪 iPS 细胞。培养 5 d 后,观察到阳性对照组和实验组均可见 iPS 细胞克隆形成,其克隆形态接近 naive 状态的克隆形态,为多层、立体克隆。且传代到第 2 代时仍能保持类 naive 的克隆形态;而空白对照组直到第 7 天才出现 iPS 细胞克隆(图7B),其克隆形态接近 primed 状态的克隆形态,为扁平克隆。对细胞克隆数和诱导培养时间进行统计分析(图7C)。结果表明,过表达

miRNA-205 可有效提高 iPS 细胞建系过程中细胞克隆的长出率。

### 3 讨论

目前为止,真正的猪胚胎干细胞系仍未成功建立。4种干细胞多能性转录因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 诱导产生的猪 iPSCs 成为研究热点<sup>[17-18]</sup>,以期通过对猪 iPS 细胞的信号通路、miRNA 及转录因子调控等的研究找到猪胚胎干细胞建系方法<sup>[19]</sup>。细胞重编程是指在特定条件下将体细胞逆转到多能性状态。这个过程被分为 3 个阶段:启动、成熟和稳定<sup>[20]</sup>。研究表明 miRNA 通过调节这 3 个阶段来调



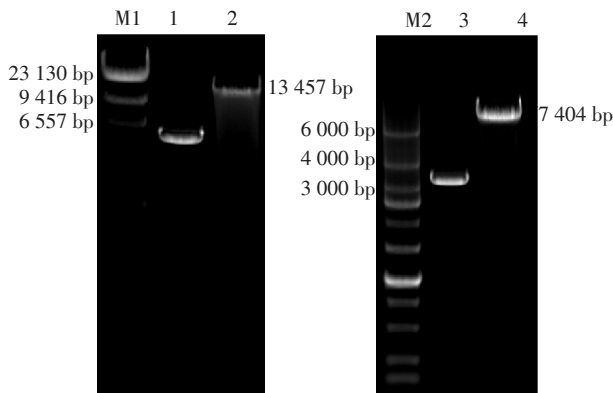


图5 酶切线性化 TetO-FUW-OSKM 质粒和 FUW-M2rtTA 质粒的电泳图

Figure5 Electrophoresis of enzymatic digestion TetO-FUW-OSKM plasmid and FUW-M2rtTA plasmid

控 iPSCs 的形成。其中启动阶段经历间充质向上皮过渡的过程,即 MET。miRNA205 和 miRNA-200 家族(miRNA-200b 和 miRNA-200c)、miRNA-106a-363 和 miRNA-302-367 簇、以及 miRNA-93/106b,可以在 iPSCs 细胞重编程过程中促进 MET 过程、增强重编程效率<sup>[21]</sup>。

Zhang 等<sup>[18]</sup>通过比较类人胚胎干细胞猪诱导多

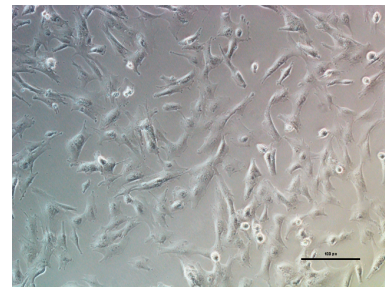


图6 OSKM 多克隆细胞(×100)  
Figure 6 OSKM polyclonal cells(×100)

能性干细胞和类鼠胚胎干细胞猪诱导多能性干细胞之间的 miRNA 表达差异,来研究 iPSCs 多能性维持机制。而在本研究中,对在本实验室已建立的猪 primed PSCs、PEF 与猪体外受精胚胎的 ICM 进行 miRNA 表达谱分析比较。这里 ICM 是被认为具有全能性,各方面更加接近 naive 胚胎干细胞。因此,得到的结果更加接近与猪 primed 和 naive 状态胚胎干细胞中 miRNA 的表达差异。根据 miRNA 表达谱分析结果,设计和构建了 miRNA-205 过表达载体,并验证了其在猪 iPS 细胞中的作用。研究发现在诱导表达 1~8 d 期间,阳性对照组和实验组克隆长出的速度高于空白对照组。这可能是由于过表达的 miRNA-205 加速了细胞的重编程过程。

综上所述,本研究成功构建 miRNA-205 过表达载体,并在细胞水平上过表达 miRNA-205,从而提

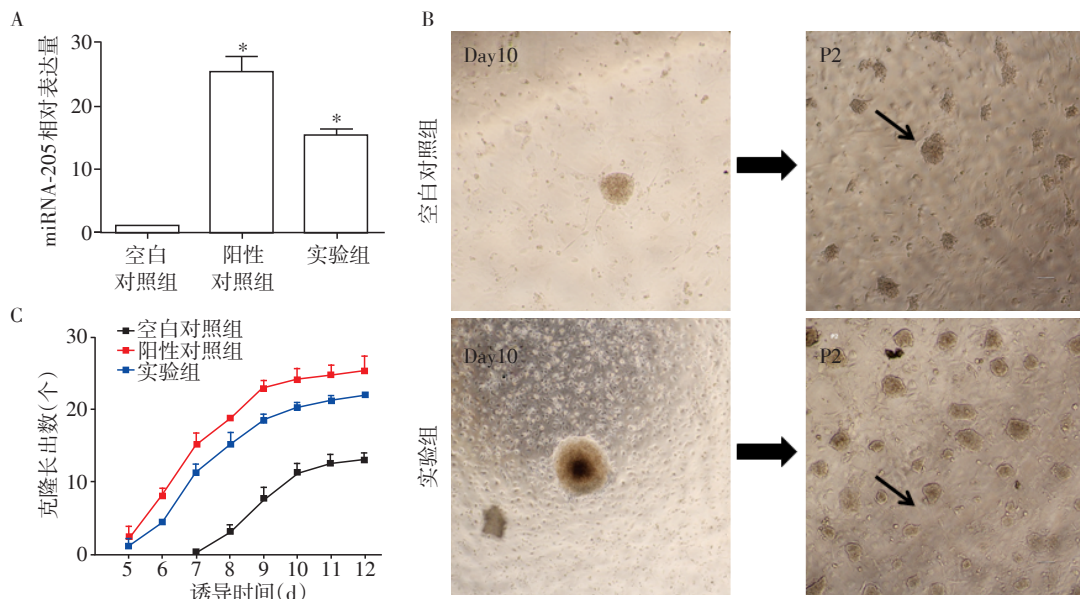


图7 OSKM 多克隆细胞中过表达 miRNA-205

Figure 7 Overexpression of miRNA-205 in OSKM polyclonal cells

高猪 iPSCs 建系效率。本研究采用脂质体瞬时转染,但是瞬时转染细胞系只能表达 1~4 d,随着时间延长,转染质粒会因细胞减数分裂而慢慢丢失。建立稳定转染细胞系、筛选出长时表达的细胞克隆,使外源 miRNA205 的表达持续,有助于深入研究 miRNA205 对干细胞重编程和多能性维持的作用及机制。

## [参考文献]

- [1] Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6):487-492
- [2] Chan YS, Göke J, Ng JH, et al. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6):663-675
- [3] Ware CB, Nelson AM, Mecham B, et al. Derivation of naive human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(12):4484-4489
- [4] Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos [J]. *Nature*, 2007, 448(7150):191-195
- [5] Hackett JA, Surani MA. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(4):416-430
- [6] Liao YJ, Chen YS, Lee JX, et al. Effects of Klf4 and c-Myc knockdown on pluripotency maintenance in porcine induced pluripotent stem cell [J]. *Cell J*, 2018, 19(4):640-646
- [7] Zhang S, Xie Y, Cao H, et al. Common microRNA-mRNA interactions exist among distinct porcine iPSC lines independent of their metastable pluripotent states [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8):e3027
- [8] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431(7006):350-355
- [9] Jouneau A, Ciaudo C, Sismeiro O, et al. Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles [J]. *RNA*, 2012, 18(2):253-264
- [10] Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(5):443-448
- [11] Ma K, Song G, An X, et al. miRNAs promote generation of porcine-induced pluripotent stem cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 389(1-2):209-218
- [12] Lin SL, Chang DC, Lin CH, et al. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(3):1054-1065
- [13] Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6):633-638
- [14] Plath K, Lowry WE. Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(4):253-265
- [15] Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1):64-77
- [16] Hou DR, Jin Y, Nie XW, et al. Derivation of porcine embryonic stem-like cells from *in vitro*-produced blastocyst-stage embryos [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25838
- [17] Park JK, Kim HS, Uh KJ, et al. Primed pluripotent cell lines derived from various embryonic origins and somatic cells in pig [J]. *PLoS One*, 2013; 8(1):e52481
- [18] Gao Y, Guo Y, Duan A, et al. Optimization of culture conditions for maintaining porcine induced pluripotent stem cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(1):1-11
- [19] Ma K, Song G, An X, et al. miRNAs promote generation of porcine-induced pluripotent stem cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 389(1-2):209-218
- [20] David L, Polo JM. Phases of reprogramming [J]. *Stem Cell Res*, 2014, 12(3):754-761
- [21] Li Z, Yang CS, Nakashima K, et al. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation [J]. *EMBO J*, 2011, 30(5):823-834
- [22] Zhang W, Zhong L, Wang J, et al. Distinct microRNA expression signatures of porcine induced pluripotent stem cells under mouse and human ESC culture conditions [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7):e0158655

[收稿日期] 2017-10-19