

多顺反子质粒重编程人脂肪干细胞为诱导多能干细胞*

曲鑫建 刘天庆** 宋克东 李香琴 葛丹 关水

(大连理工大学干细胞与组织工程研发中心, 大连 116024)

摘要 为建立多顺反子质粒载体转染技术获得人脂肪干细胞(adipose stem cells, ASCs)来源的诱导多能干细胞(induced pluripotency stem cells, iPSCs), 应用 2A 元件连接 Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 四因子基因, 构建为单一开放阅读框的多顺反子质粒载体. 使用该质粒对 ASCs 进行转染及重编程为 iPSC. 采用形态学观察、特异性抗体免疫荧光鉴定、体外拟胚体诱导分化和体内畸胎瘤形成等方法进行鉴定. 结果显示, ASCs 成功重编程为 iPSCs, 具有与人胚胎干细胞相似的形态学及多向分化潜能; 通过拟胚体和畸胎瘤实验证实 iPSCs 能在体内外分化成三胚层细胞; DNA 印迹实验显示质粒载体序列未整合至 iPSCs 基因组中. 因此, 通过多顺反子质粒载体重编程技术成功建立的人 iPSCs 具有多向分化潜能, 可减免发生插入突变和免疫排斥问题, 为 iPSCs 在遗传性或退行性疾病的治疗奠定了实验基础.

关键词 多顺反子质粒载体, 诱导多能干细胞, 人脂肪干细胞

学科分类号 Q813.5, Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00454

诱导多能干细胞(iPSCs)是指通过在分化的体细胞中表达特定的转录因子来诱导其重编程而获得的可不断自我更新和具有多向分化潜能的细胞. 即将 4 个外源转录因子基因 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc (或者 Nanog 和 Lin28) 导入分化的体细胞, 可获得 iPSCs. 该细胞具有形成体内所有类型细胞的特性, 使其在细胞替代治疗、基因治疗和发育生物学研究领域有着广阔的研究及应用前景. 更为重要的是, 针对特定病人自身和特定疾病重编程产生的 iPSCs 对再生医学、医药的发展以及特殊疾病机理的认知都具有重要的意义^[1-3].

随着 iPSCs 领域快速的研究进展, 已经建立了不同的细胞重编程方案, 包括使用反转录病毒载体、四因子的多顺反子慢病毒载体^[4]和可外切的转座子等方法^[5-7]. 由于反转录 / 慢病毒载体及其携带的转基因序列可随机地整合进宿主细胞基因组中, 会导致细胞具有很高的致瘤性. 而可外切的转座子方法(如 Cre/LoxP 重组法)虽可将整合在基因组上的转基因序列移除, 但部分载体序列仍存留在宿主细胞基因组上, 也存在着安全性的问题. 因此, 在转

染细胞的方式上, 非整合转基因的瞬时转染方法为当前所寻求的重编程途径之一.

重编程效率与所选择的细胞类型、使用转录因子种类和数量以及转基因方法密切相关. 虽然小鼠与人的成纤维细胞转入 Oct4 和 Sox2 两个基因即可重编程为 iPSC^[8-9], 但与转入 4 个外源因子比较, 重编程效率大为降低. 此外, 使用人体肝脏细胞和神经前体细胞重编程为 iPSCs 已有报道^[10-11], 但此类细胞不通过损伤性手术很难获得, 况且一些细胞种类(如神经干细胞)比较稀缺, 不能大量采集, 在临床上不能有效地作为候选细胞.

人体脂肪干细胞(adipose stem cells, ASCs)是含有多种前体细胞的异质群体, 很容易通过吸脂手术获得大量的细胞, 这些细胞具有多向分化潜能,

* 国家自然科学基金(31170945)和中央高校基本科研业务费专项资金(DUT11SM04)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0411-84706360, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

收稿日期: 2012-09-14, 接受日期: 2012-11-20

可以向脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞和心肌细胞进行分化^[12-15]。脂肪干细胞具有不同的遗传和表现遗传表达谱, 是一种比终末分化细胞更为理想的重编程细胞来源。在无细胞饲养层条件下, 已有两个研究小组应用 Yamanaka 四因子分别采用反转录病毒载体和慢病毒载体将脂肪干细胞重编程为 iPSCs。与重编程成纤维细胞过程相比, 时程缩短且效率得到提高。但由于使用的是病毒载体, 同样存在着安全性的问题^[16-17]。

本研究采取成年人脂肪干细胞为种子细胞, 采用 2A 元件连接 Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 四因子构建而成的多顺反子质粒载体 (pIRES2-EGFP-4F) 进行转染, 在无细胞饲养层条件下培养, 将 ASCs 诱导成为遗传背景与其来源细胞完全相同的 iPSCs。此方法有望减免发生插入突变和免疫排斥问题, 为临床细胞移植治疗疾病提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

碱性磷酸酶检测试剂盒 (Alkaline Phosphatase Detection Kit, No.SCR004) 购自 Millipore 公司; 抗体: Oct4 (1:50, #886906, Abcam)、Nanog (1:100, #885871, Abcam)、TRA-1-60 (1:100, #sc-21705, Santa Cruz)、SSEA-4 (1:100, #sc-21704, Santa Cruz)、AFP (1:100, #sc-51506, Santa Cruz)、GFAP (1:100, #sc-9065, Santa Cruz) 和 BMP-2 (1:100, KG22178-2, KeyGen); 羊抗鼠二抗 IgM-PE (1:100, #sc-3768, Santa Cru) 和羊抗兔二抗 IgG-PE (1:100, #sc-3739, Santa Cruz); 反转录试剂盒 (PrimeScript Reverse Transcriptase, #D2680s) 购自 TaKaRa 公司, SYBR-Green PCR Master mix (#K0221, Fermentas)。

质粒载体 pIRES2-AcGFP1-Oct4-T2A-Sox2-P2A-KLF4-E2A-cMyc (pIRES2-GFP-4F) 由本实验室构建保存。

1.2 分离细胞

取约 500 mg 脂肪组织, 无钙镁 Hank's 液冲洗后剪碎脂肪组织, 移入 50 ml 离心管中, 加入 2 倍体积 0.25% 胰蛋白酶和 0.1% 胶原酶 (*v/v* 1:1) 混合液, 37℃ 恒温摇床振荡消化 20 min。此时液面分为 3 层, 吸出下层液体移入含完全培养基 (10% 胎牛血清+高糖 DMEM) 的离心管中终止消化。将收集到的液体 1 500 r/min 离心 10 min, 去除悬浮的脂肪细胞和脂滴, 去上清, 向细胞沉淀中加入含 10%

胎牛血清 DMEM 重悬细胞, 移入培养瓶中, 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育, 每 2~3 天换液。细胞达到 100% 融合时, 用 0.25% 胰酶和 0.04% EDTA (1:1) 消化传代。脂肪组织标本由大连医科大学第二附属医院提供, 患者对实验知情同意, 并经医院伦理委员会批准。

1.3 质粒转染 ASCs

转染前 1 天, 将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化, 制成单细胞悬液后接种于 6 孔板内, 每孔接种细胞数为 1.5×10^5 。第 2 天待细胞生长汇合 80% 时开始转染, 按磷酸钙法操作。转染 48 h 后在荧光显微镜下观察转染结果, 初步确定 EGFP 融合蛋白的细胞定位。在第一次转染后第 4 天进行第二次转染, 细胞长满孔板后传代培养, 更换培养基。

1.4 碱性磷酸酶染色

人 iPSCs 培养传代, 进行碱性磷酸酶检测 (AP 染色): 弃去培养基, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 遍, 加入固定液 4% 多聚甲醛固定 2 min, 用 Rinse 缓冲液洗 2 遍, 加入 AP 染液 (固红紫溶液: 萘酚 AS-BI 磷酸溶液: 水=2:1:1), 避光放置 15 min, 吸去染液, 用 Rinse 缓冲液洗 3 遍, 加入 PBS, 倒置显微镜下观察。

1.5 细胞免疫荧光检测

生长在培养板上的细胞克隆先用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 然后用 PBS 洗涤 2 次, 用含有 10% 正常山羊血清的 PBS 在室温下封闭 30 min, 0.1% Triton X-100 破膜 15 min, 含有 5% 非离子活性剂 Tween20 的 PBS 溶液用于洗涤细胞及稀释抗体。细胞在 4℃ 下与一抗孵育过夜后, 用 PBS-T 清洗 3 次, 再与相应二抗室温下避光孵育 40 min, 用 PBS-T 清洗 3 次, Hoechst33324 (1:500, Invitrogen 公司) 染细胞核, 借助细胞免疫荧光, 检测细胞标志蛋白质表达情况。荧光显微镜 (Olympus AS-70 microscope) 采集图像, 应用软件 Image-Pro Plus Software。

1.6 定量 PCR

使用 TRIzol 裂解液将细胞裂解, 用反转录试剂盒逆转录合成 cDNA, 调整 cDNA 浓度, 在下列条件下加入特定引物 (表 1)。通过定量 PCR 检测外源基因和内源基因表达情况: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环。采用 RotorGen 分析数据。

Table 1 Primer sequences for the Real time PCR

Gene	Sense	Anti-sense
Endogenes		
Oct4 (NM_002701)	5' ACTCCTGCTTCGCCCTCA 3'	5' TCGGATTTCGCCTTCTCG 3'
Sox2 (NM_003106)	5' TCGCAGCCGCTTAGCCTCGT 3'	5' AACAGCCCGGACCGCGTCAA 3'
Klf4 (NM_004235)	5' GACTCACCAAGCACCATC 3'	5' CAGCCAGAAAGCACTACAA 3'
c-Myc (NM_002467)	5' CCTCATCTTCTTGTTCTCCT 3'	5' ACAGCGTCTGCT CCACCT 3'
Transgenous		
Oct4	5' GAAGGATGTGGTCCGAG 3'	5' CTTCTGGGCTCAGTTTG 3'
Sox2	5' GCTCCATGGGTTCCGGTCAA 3'	5' ATGGTTAGAAAGACTTCCTCT 3'
Klf4	5' ATCCCGGCCCGATGGCTGTCAGC 3'	5' ATAATTAGTACACTGGTAGC 3'
c-Myc	5' TGTGAGAGCAACCCA 3'	5' TCTCCCGAAGGGAGAA 3'

引物设计：在构建载体过程中，所采用的 4 个转录因子基因为非全长基因序列。根据序列差异区段设计内源基因 PCR 引物。质粒载体中 4 个外源基因被 3 个 2A 序列隔开，在外源基因 PCR 引物设计中，引入部分 2A 序列，以此来区别内源基因与外源基因表达差异性。

1.7 DNA 印迹分析

首先，*Bam*H I 酶切质粒载体。根据设计的特异性引物，采用 PCR 法扩增 Klf4 和 Sox2 基因片段并进行纯化作为合成生物素标记探针模板。分别裂解 iPSCs 和 ASCs 获取基因组 DNA 进行纯化，各取 5 μ g DNA 用 *Bam*H I 酶切消化过夜。接下来，将消化的基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶分离，变性后虹吸印迹法转移 DNA 从凝胶到有阳离子的尼龙膜上，紫外灯下交联 2 min 后 55℃ 下预杂交 6 h，再加入探针不断摇动孵育杂交过夜。最后，进行洗膜和检测，DAB 显色。

1.8 畸胎瘤形成

人 iPSCs 用胶原酶消化离心后，稍微吹打，接种到 6 周龄的雌性裸鼠的背部皮下，之后观察是否有肿块生长。待肿块直径达 1 cm 时，处死小鼠，摘除肿块将其置于 10% 多聚甲醛中固定，石蜡包埋切片，苏木精伊红(hematoxylin eosin, HE)染色，显微镜下观察 3 个胚层的形成情况，进行照相分析。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

1.9 体外分化能力检测

拟胚体(EB)形成：生长旺盛的 iPSCs 消化后，稍微沉淀，将沉淀物传代至 6 孔板上，用不含 bFGF 的培养基悬浮培养。培养 7 天后将形成的 EBs 转入 0.1% 明胶处理的培养瓶内，分别采用不同培养基进行培养。a. 采用添加 bFGF (20 μ g/L) 和 EGF (20 μ g/L) 的 N2B27 培养基向外胚层细胞诱导；b. 采用添加 50 mg/L vitamin C, 10 mmol/L β -磷酸甘油, 10 nmol/L vitamin D 的低糖 -DMEM 培养 2 周，向中胚层细胞诱导；c. 添加 100 μ g/L activin- α 的 DMEM 培养基贴壁培养 2 周，观察其向内胚层细胞类型分化现象。

1.10 统计分析

定量 -PCR 检测结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，并经平均数差异显著性 *t* 检验。实验数据采用统计学分析软件 SPSS17.0 处理，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 携带四转录因子的质粒载体转染 ASCs

拷贝的 Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 基因序列以 T2A、P2A 和 E2A 元件进行连接，插入 pIRES2 质粒载体中，形成以 CMV 为启动子的单一开放阅读框(图 1a)。2A 元件具有翻译后在自身特异位点上自我剪切功能，因此，构建的开放阅读框在转录翻译后，4 个因子在 2A 元件自我剪切后释放出来，达到一个质粒载体表达 4 个基因的目的。内部核糖

体进入位点(IRES)是 mRNA 分子内(而非 5'端)可被核糖体识别并启动翻译的一种顺式元件, 具有使下游基因表达的功能, 处于下游的标记分子 GFP 的表达状态可以简单反映出上游的基因表达状态。

将脂肪干细胞传代至第 6 代时, 对 ASCs 细胞进行转染操作, 以转染当天计为 iPSCs 诱导第 1 天。转染前的细胞形态为细长纤维状(图 1b); 转染 48 h 后, 在荧光显微镜下(40 倍)观察 GFP 表达情况(图 1b, c), 约有 50% 的细胞均发强弱不同的绿色荧光, 表明质粒转染细胞后进行了瞬时表达。为达到更高转染效率, 细胞培养 4 天后进行第二次转染。2 天后待细胞长满后, 传代培养, 更换细胞培养基。

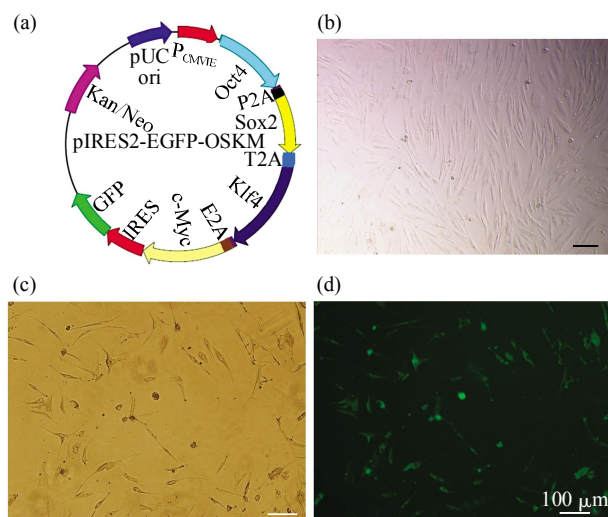


Fig. 1 Generation of a polycistronic plasmid expression vector for ASCs transfection

(a) Schematic representation of plasmid vector and 2A-linked fusion gene (OSKM). Four defined transcription factor (Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc) were fused in-frame *via* 2A sequences. (b) Morphology of ASCs in 6th passages. (c) and (d) Comparative representation of GFP expression in hASCs after transfection of OSKM-plasmid 48 h. Phase contrast (c), GFP positive fluorescence (d).

2.2 iPSC 的建立及其多能性检测

转染后第 3 周对转染的细胞进行观察, 可见边界清楚的集落状细胞克隆逐渐形成, 细胞排列紧密, 高倍显微镜下形态学观察集落中的单个细胞呈

圆形或短梭形, 体积较小, 核质比例较高(图 2a, b)。转染后第 4 周, 发现集落细胞增殖旺盛、致密, GFP 荧光下表现更加明显清晰(图 2c), 选取形态最像 ES 细胞样的克隆, 通过物理传代的方式将其扩增。

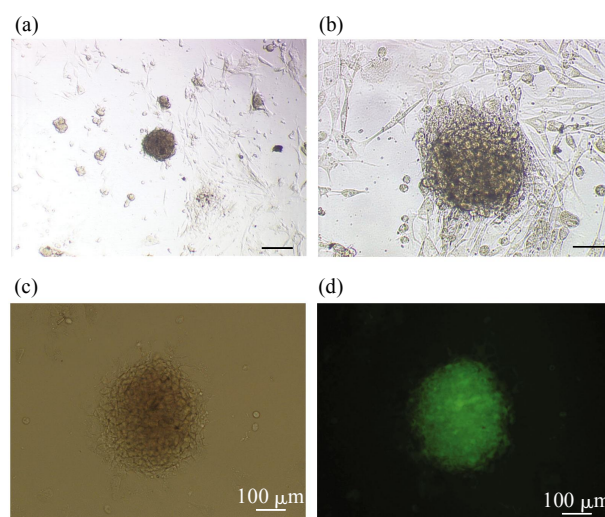


Fig. 2 Morphology of cell colonies forming and GFP expression

(a) Morphological changes in forming cell clones after ASCs transfected 3 weeks. (b) Morphology of generated cell clone after ASCs transfected 4 weeks. (c) The morphology of ASCs derived cell clones in phase contrast. (d) GFP positive colonies were observed.

经 2 次传代后, 检测细胞克隆是否表达多能性标记。AP 的表达是一种 ES 细胞及其相关干细胞的重要特征之一。AP 染色发现, 对照组 ASCs 以胞浆着色为浅棕红色的 AP 弱阳性呈现, 表明 ASCs 也有 AP 活性这一特征(图 3a)。比较之下, 细胞集落以胞浆着色为红棕色或咖啡色颗粒呈阳性, 表明重编程的细胞具有较高的 AP 活性(图 3b)。

借助细胞免疫荧光技术, 检测人细胞克隆是否能够表达 Oct4、Nanog、TRA-1-60 和 SSEA4 4 种 hES 细胞标志性蛋白质。通过观察, 发现这 4 种细胞标记在细胞克隆上均得到表达。外源标记基因 GFP 在细胞克隆中也为阳性表达。因此, 该细胞克隆确为 iPS 细胞。

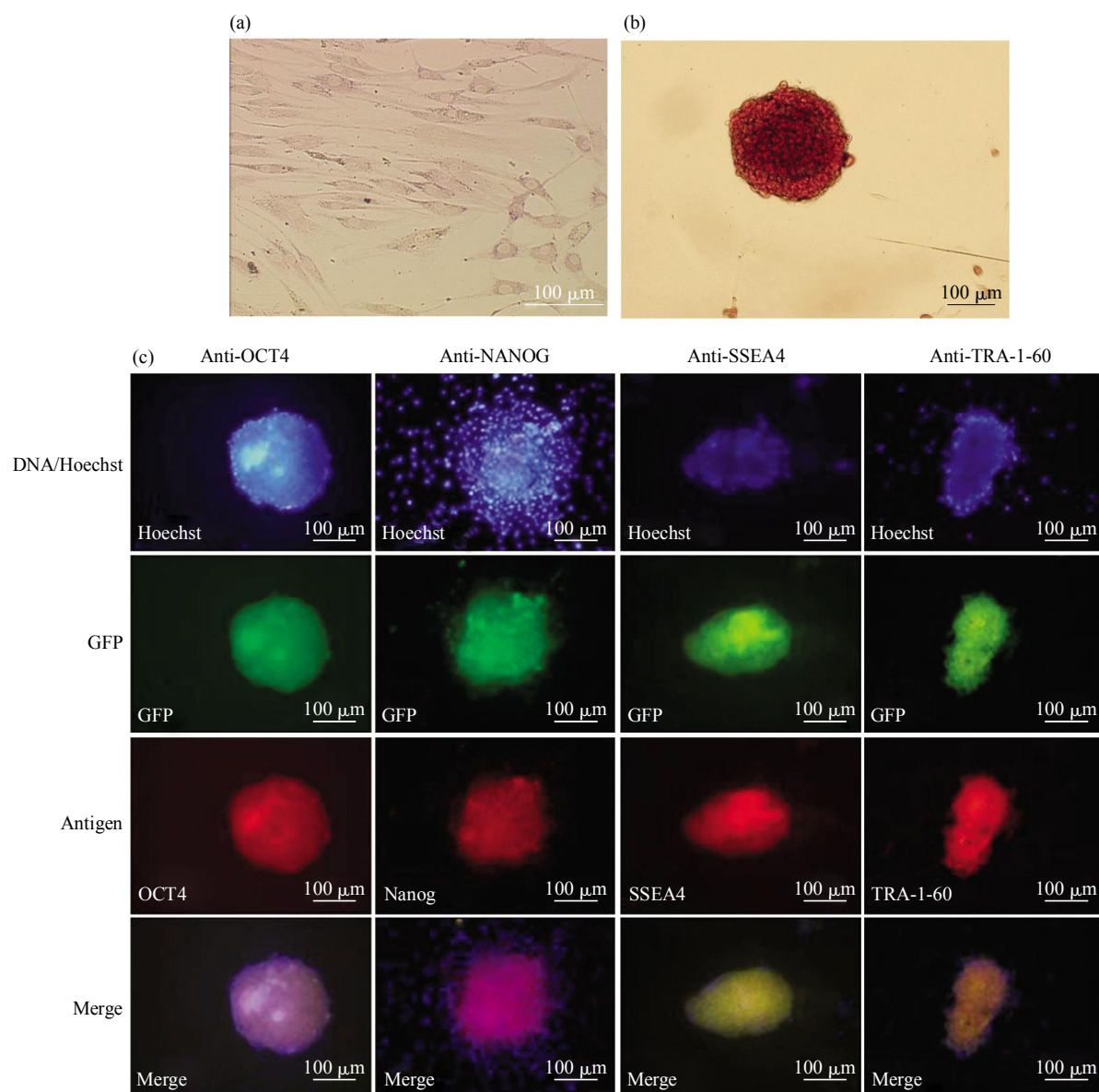


Fig. 3 Generated iPSCs expressed pluripotent markers

(a) Alkaline phosphatase staining of the ASCs indicated weak AP activity of these cells. (b) The AP staining of the early clones derived from OSKM-induced iPSCs showed strong AP activity. (c) Human ES cell-specific surface antigen staining of iPSCs. Immunofluorescent staining demonstrated that the iPSCs were positive for OCT4, NANOG, SSEA-4, and TRA-1-60 (red), Hoechst (blue), and merger.

2.3 多能性基因表达与核型分析

为检测内源和外源基因的表达状态, 提取第2代和第5代细胞克隆的mRNA进行检测. 定量PCR检测结果显示, 第2代细胞内源性四因子中, *Klf4* 基因呈高表达状态, 其他三基因表达较低(图4a). 在第5代细胞克隆中, 内源性四基因呈高表达状态, 而外源性基因均呈现低表达、基本沉默状态(图4b). 选取第5代iPSC按照细胞核型分析标

准步骤进行操作、分析, 结果iPSC核型未见异常(图4c). 为检测pIRES2-GFP-4F质粒载体序列是否融入iPS细胞基因组, 分别提取ASCs和3个iPS细胞系(iPS1、iPS2、iPS3)的基因组DNA, 经限制性内切酶 *Bam*H I 酶切, 后采用 *Sox2* 和 *Klf4* 的cDNA探针进行DNA印迹(Southern blot)分析, 结果显示, 3个iPS细胞系基因组均未检测出有质粒载体序列融合(图4d).

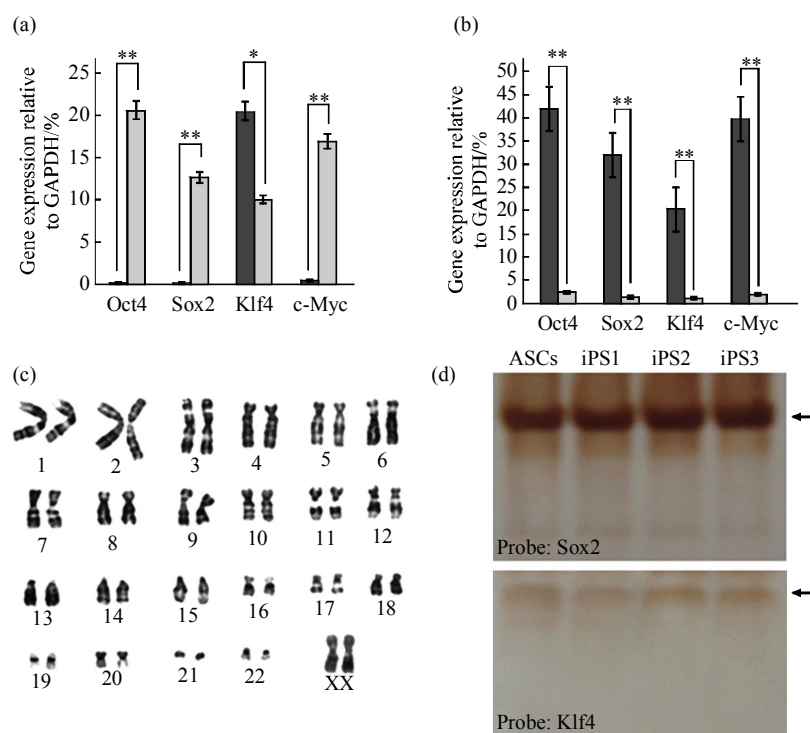


Fig. 4 Generated iPSCs expressed pluripotent marker genes and did not contain plasmid vector integration

(a) RT-qPCR analyzed the expression levels of exogenous and endogenous defined factors in passage 2 iPSCs, relative to GAPDH (100%) expression. (b) RT-qPCR analysis of the expression level of the exogenous and endogenous TFs in passage 5 iPSCs, relative to GAPDH (100%) expression. ■: Endo; □: Exo. (c) Karyotype of generated iPSCs was normal 46 XX. (d) Southern blot analysis of plasmid integration in iPSC lines genomics. ASCs (as control) and iPSCs DNA was digested with *Bam*H I. Hybridization of the same molecular mass fragment using Sox2 and klf4 probes indicated the absence of plasmid sequence insertion.

2.4 iPSC 在体内、体外分化实验

转染后第 8 周, 对 iPS 细胞克隆进行体外诱导分化. 悬浮培养 iPS 细胞克隆诱导形成的拟胚体 8 天(图 5a), 再进行贴壁培养并分别对其诱导分化. 观察发现, 细胞形态发生变化的同时, 也分别表达 3 个胚层细胞的标志分子: 外胚层标志蛋白 GFAP(图 5b)、中胚层标志蛋白 BMP2(图 5c)和内胚层标志分子 AFP(图 5d), 验证了 iPS 细胞体外分化的多样性. 收取 iPSC 接种到 6 周龄雌性裸鼠的背部皮下, 观察到有肿块生成(图 5e), 待生长 8 周后肿块直径达 1 cm 时, 摘除肿块做切片进行 HE 染色. 畸胎瘤成型实验也证实了这些 iPSC 均具备分化成为 3 个胚层: 外胚层(图 5f)、中胚层(图 5g)、内胚层(图 5h)的能力.

3 讨 论

采用 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 4 种限定因子构建的多顺反子质粒载体转染 ASCs 诱导为

iPSC, 与采用慢病毒载体与反转录病毒载体相比较, 质粒 DNA 整合至宿主染色体组的概率极小, 导致突变的几率降低, 安全性相应提高^[18].

pIRES2-EGFP-4F 质粒载体同时携带有 4 种限定因子, 与一个载体只携带一种或两种基因而言, 可减少使用质粒载体的数量. 为保证四基因都得到表达, 使用 3 个 2A 元件连接 4 个限定因子基因, 在翻译后由于 2A 序列自我剪切, 释放 4 种基因翻译而来的多肽链, 达到一个质粒载体携带四基因的目的. 质粒载体只能在表达 SV40 大 T 抗原的真核细胞中复制, 因此, ASCs 在转染后未加 G418 筛选下培养, 质粒在转染后可随细胞的不断分裂增殖逐渐减少或丢失, 外源基因也因此沉默. 此方法, 在转染操作上相对简单, 安全性得到了提高.

细胞类型与重编程的效率、动力学以及所采用的转基因方式密切相关^[19-20]. 选取合适的细胞种类进行重编程需要考虑几个因素: a. 选择重编程因子的种类和快速有效的转基因方式因细胞类型不同

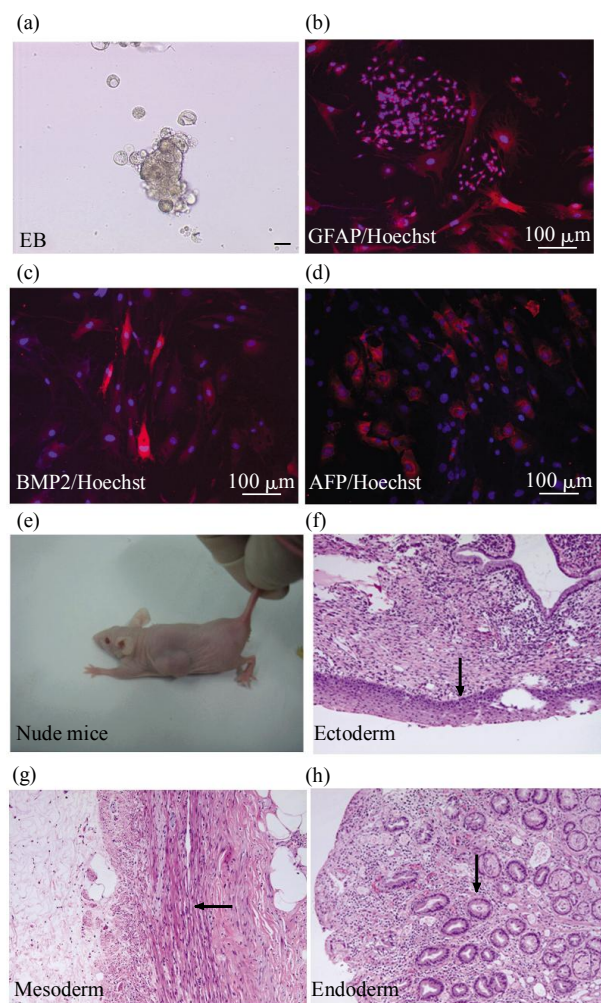


Fig. 5 ASCs-derived-iPSCs exhibit pluripotency
in vitro and *in vivo*

(a) Phase-contrast images of embryoid bodies (EBs) generated from iPSC clones in suspension culture. EB was formed in suspension culture 3 days. (b) Immunofluorescence staining of differentiated cells derived from iPSCs with antibodies specific for lineage-specific markers: GFAP (ectoderm marker), (c) BMP2 (mesoderm marker) and (d) AFP (endoderm marker). (e) Images of teratoma formation in nude mice. (f) HE staining of the teratoma formed by iPSCs. Teratoma formed all three embryonic germ layers including ectoderm tissues (stratified squamous epithelial), (g) Mesoderm tissue (muscle), and (h) endoderm tissue (gland).

而异。b. 易获取和易重编程的细胞类型。c. 细胞的时龄和细胞的组织来源。另外，在易受到 DNA 损伤的细胞，例如皮肤细胞，容易受到紫外线照射引起突变，不适宜作为临床应用。所以，所需细胞最好易得、来源充分、无遗传畸变以及易于瞬时转染进行重编程操作^[21-22]。

ASCs 具有多向分化潜能，除了表达碱性磷酸酶活性之外，还高表达 KLF4 蛋白。KLF4 被认为与染色体重塑起到重要作用，而染色体重塑是成体细胞向多能细胞的重编程过程中的限定性因素^[23-24]。因此认为，ASCs 比终末分化细胞在表观遗传调控方式上具有优越性，更易诱导成 iPSC^[17]。最近研究发现，ASCs 可分泌多种细胞生长因子，不但包括血管内皮生长因子(VEGF)、转移生长因子(TGFβ)、fibronectin-1、vitronectin，还能分泌维持未分化状态重要的 2 种因子 bFGF 和 LIF^[25-26]。ASCs 的这些特性，有利于在无饲养层细胞状态下进行重编程。

本实验结果表明：携带限定因子(Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc)的多顺反子质粒载体转染 ASCs，可在无饲养层细胞条件下将其重编程为 iPSC，重编程效率为 0.006%~0.01%。iPSCs 具有类似人 ES 细胞特性，在体内外有分化三胚层细胞的能力，并且，无质粒载体序列插入/整合 iPS 基因组中，有望解决插入突变和免疫排斥两个难点，为细胞移植治疗疾病奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Zou J Z, Sweeney C L, Chou B K, *et al.* Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood*, 2011, **117**(21): 5561-5572
- [2] Zhang F, Citra F, Wang D. Prospects of induced pluripotent stem cell technology in regenerative medicine. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2011, **17**(2): 115-124
- [3] Zhang D H, Jiang W, Liu M, *et al.* Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Research*, 2009, **19**(4): 429-438
- [4] Shao L J, Feng W, Sun Y, *et al.* Generation of iPS cells using defined factors linked *via* the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame. *Cell Research*, 2009, **19**(3): 296-306
- [5] Stadtdeld M, Nagaya M, Utikal J, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, **322**(5903): 945-949
- [6] Kaji K, Norrby K, Paca A, *et al.* Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, **458**(7239): 771-775
- [7] Marion R M, Strati K, Li H, *et al.* A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*, 2009, **460**(7259): 1149-U1119
- [8] Kim J B, Zaehres H, Wu G, *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, **454**(7204): 646-U54
- [9] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, *et al.* Induction of pluripotent

- stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology*, 2008, **26**(11): 1269–1275
- [10] Liu T, Wang Y J, Tai G P, *et al.* Could co-transplantation of iPS cells derived hepatocytes and MSCs cure end-stage liver disease?. *Cell Biology International*, 2009, **33**(11): 1180–1183
- [11] Ryan D, Watts C, Liu P. Human induced pluripotent stem (Ips) cell derived neural stem cells in malignant glioma. An autologous trojan horse in therapeutics delivery. *Neuro-Oncology*, 2011, **13**: 10
- [12] Gruber H E, Somayaji S, Riley F, *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. *Biotechnic & Histochemistry*, 2012, **87**(4): 303–311
- [13] Mizuno H, Tobita M, Uysal A. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 2012, **30**(5): 804–810
- [14] Qu C Q, Zhang G H, Zhang L J, *et al.* Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2007, **43**(2): 95–100
- [15] Chou B K, Mali P, Huang X S, *et al.* Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Research*, 2011, **21**(3): 518–529
- [16] Sun N, Panetta N J, M.Gupta D, *et al.* Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(37): 15720–15725
- [17] Sugii S, Kida Y, Kawamura T, *et al.* Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **107**(8): 3558–3563
- [18] Okita K, Matsumura Y, Sato Y, *et al.* A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*, 2011, **8**(5): 409–U452
- [19] Huang J J, Wang F, Okuka M, *et al.* Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells. *Cell Research*, 2011, **21**(5): 779–792
- [20] Pei D Q. The magic continues for the iPS strategy. *Cell Res*, 2008, **18**(2): 221–223
- [21] 殷慧群, 曹鸿国, 孙雪萍, 等. 限定因子诱导胎猪成纤维细胞重编程为多能性细胞. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(6): 607–612
- Yin H Q, Cao H G, Sun X P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(6): 607–612
- [22] Cui C, Rao L J, Cheng L Z, *et al.* Generation and application of human iPS cells. *Chin Sci Bull*, 2009, **54**(1): 9–13
- [23] Schuetz A, Nana D, Rose C, *et al.* The structure of the Klf4 DNA-binding domain links to self-renewal and macrophage differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, **68**(18): 3121–3131
- [24] Tang Y, Lin C J, Tian X C. Functionality and transduction condition evaluation of recombinant Klf4 for improved reprogramming of iPS cells. *Cellular Reprogramming*, 2011, **13**(2): 99–112
- [25] Jeffreu M G, Mark E N. Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) in regenerative medicine: pharmaceutical applications. *Current Pharmaceutical Design*, 2011, **17**(4): 332–339
- [26] Marconi S, Castiglione G, Turano E, *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Eng Part A*, 2012, **18**(11–12): 1264–1272

Reprogramming of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells to Induced Pluripotent Stem Cells Using a Polycistronic Plasmid*

QU Xin-Jian, LIU Tian-Qing**, SONG Ke-Dong, LI Xiang-Qin, GE Dan, GUAN Shui

(Dalian R&D Center for Stem Cell and Tissue Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract In order to establish a polycistronic plasmid delivery system that reprogram human adipose stem cells (ASCs) into induced pluripotency stem cells (iPSCs), a polycistronic plasmid vector was constructed in which defined factors were fused in-frame into a single open reading frame *via* self-cleaving 2A sequences. The iPSCs were generated at 3~4 weeks after ASCs have been transiently transfected with the polycistronic plasmid. Then, the iPSCs were identified subsequently *via* the morphological observation, immunofluorescence with specific antigen, embryoid body formation *in vitro* and teratoma formation *in vivo*. The results demonstrated that the characteristics of these generated iPSCs resembled embryonic stem cells (ESCs) in terms of the expression of pluripotent markers, and the ability to differentiate into the three embryonic germ layers *in vitro* by embryoid body generation together with *in vivo* by teratoma formation after injection into immunodeficient mice. Remarkably, Southern blot revealed that the human iPSCs were not integrated with plasmid DNA sequence. Therefore, hASCs derived iPSCs has the pluripotency using polycistronic plasmid method, which provides a useful platform for the further study of hereditary or degenerative disease therapies with the potential to bypass both the insertional mutagenesis and immune rejection barriers.

Key words polycistronic plasmid vector, iPSCs cells, human adipose-derived stem cells

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00454

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31170945) and The Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (DUT11SM04).

**Corresponding author.

Tel: 86-411-84706360, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

Received: September 14, 2012 Accepted: November 20, 2012