

限定因子诱导胎猪成纤维细胞重编程 为多能性细胞*

殷慧群^{1)**} 曹鸿国^{1,2)**} 孙雪萍¹⁾ 薛奕杰¹⁾ 张卫琴¹⁾ 黄伟玲¹⁾
陶勇^{1,2)} 刘亚^{1,2)} 李运生^{1,2)} 张运海^{1,2)***} 章孝荣^{1,2)***}

(¹⁾ 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; (²⁾ 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036)

摘要 尝试运用限定因子融合蛋白建立猪的诱导多能性干细胞。试验采用 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 四种限定因子经慢病毒表达载体系统介导感染猪胎儿成纤维细胞, 对表达外源限定因子的猪胎儿成纤维细胞进行培养传代, 逐步分离培养出集落边缘界限清晰的细胞克隆, 细胞集落生长状态稳定、核型正常、碱性磷酸酶检测为阳性, 免疫细胞化学检测显示, Oct4、Nanog、SSEA-1 蛋白表达为阳性, 体内能够分化形成含有三个胚层的畸胎瘤。结果证实分离培养的细胞克隆为猪诱导多能性干细胞, 为进一步完善诱导方案和深入研究应用猪诱导多能性干细胞奠定了基础。

关键词 猪, 诱导多能性干细胞(iPS 细胞), 限定因子融合蛋白

学科分类号 Q813.5, Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00737

2006 年, Takahashi 等^[1]通过导入外源性限定因子 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 使小鼠皮肤成纤维细胞成功转变为具有胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)特性的多能性干细胞, 又称诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞), 四倍体嵌合技术证实了小鼠 iPS 细胞同正常的 ES 细胞一样具有全能性^[2-3]。此后, 人^[4-5]、猴^[6]、大鼠^[7]等方面相关的 iPS 细胞诱导也相继获得成功。在家畜 iPS 细胞诱导方面, 2009 年, Esteban 等^[8-10]通过使用病毒载体介导限定因子诱导出猪的 iPS 细胞。增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)是荧光蛋白家族中常用的一种, 荧光具有高度稳定性, 对于外源限定因子在细胞重编程过程中发挥作用的机制和特点, 外源限定因子和 EGFP 组建的融合蛋白能够有效地检测、追踪和掌握外源限定因子的特点。本次试验尝试使用外源限定因子与 EGFP 构建融合蛋白慢病毒表达载体用于猪 iPS 细胞的诱导, 从而为深入追踪掌握外源限定因子在重构过程中的发生机制和特点及深入研究利用猪 iPS 细胞等相关工作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 限定因子慢病毒表达载体的构建

根据 NCBI 上猪 Sox2(NM 001123197)、c-Myc(NM 001005154)、Klf4(NM 001031782)基因的 mRNA 序列, 设计合成上、下游引物, 引物序列如下: pSox2 上游, 5' TTTAAGCTTGCCACCATGTACAACATGATGGAGAC 3', 下游, 5' AAAGGATCCGGCATGTGAGAGAGAGGCAGTGTAC 3'; pKlf4 上游, 5' TATAAGCTTGCCACCATGGCTGTCAGCGACGCAC 3', 下游, 5' GGCGGATCCGGAAAATGCCTCTTCATGTGTAAGGC 3'; pc-Myc

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2009CB941004), 国家自然科学基金(30800784/c120103)和国家高技术研究发展计划(863)(2008AA101003)资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

章孝荣. Tel: 0551-5785543, E-mail: zxr@ahau.edu.cn

张运海. Tel: 0551-5786357, E-mail: yunhaizhang@ahau.edu.cn

收稿日期: 2009-12-11, 接受日期: 2010-03-23

上游, 5' GCCAAGCTTGCCACCCTGGATTTCCT-TCGGATAG 3', 下游, 5' AAAGGATCCGC-TGGGCAAGAGTTCCGTAGCTG 3'; hOct4 上游, 5' AATGTCGACGCCACCATGGCGGGACACCTG-GCTTC 3', 下游, 5' CGCGGATCCGCTCAGTTT-GAATGCATGGGAGAGC 3'; 载体改造引物上游, 5' AAAGGGCCCGCGGGACTCTGGGGTTTCGTAA-TA 3', 下游, 5' GCGCAATTGTTACTTGTACAG-CTCGTCC 3'

从猪囊胚中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增出猪限定基因 cDNA, 人 Oct4 的 DNA 序列直接从人 Oct4 基因中扩增获取, 经限制性内切酶酶切, 与逆转录病毒载体 pLEGFP-N1 连接, 构建出逆转录病毒融合蛋白表达载体. 从重构的逆转录病毒融合蛋白表达载体中扩增出 CMV 启动子连同限定基因及 EGFP 基因, 同时通过酶切从 pLL3.7 质粒中移除 U6 启动子、CMV 启动子和 GFP 序列, 最后把重组逆转录病毒载体中扩增的启动子和限定基因融合蛋白序列与酶切后的 pLL3.7 进行重组, 构建出慢病毒限定基因融合蛋白重构表达载体(图 1).

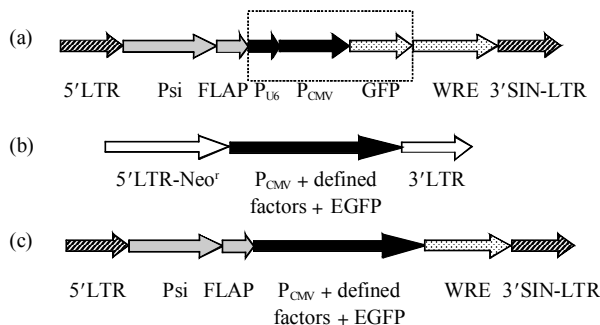


Fig. 1 The schematic diagram of modified pLL-3.7 for reprogramming experiments

(a) Vector map of pLL3.7, which was modified by removing the U6 promoter, CMV promoter and GFP. (b) Vector map of pLEGFP-N1 cloned to reprogramming factors. (c) Vector map of modified pLL3.7 for the reprogramming.

1.2 猪胎儿成纤维细胞的诱导

取妊娠约 60 天左右杜洛克 - 长白 - 大约克三元杂交猪胎儿, 采用组织块培养法建立猪胎儿成纤维细胞系, 培养液为含有 10%胎牛血清(Hyclone 公司)的高糖 DMEM(Hyclone 公司). 采用磷酸钙法转染四因子质粒 PLL-hOCT4/pSOX2/pMYC/pKLF4 和包装组分 pMDLg、pRSV REV 和 pVSVg 到 293T 细胞, 12~16 h 后换新鲜培养液, 病毒包装 48 h

后收集病毒液, 经超滤浓缩后添加到猪胎儿成纤维细胞培养板内, 细胞密度为 1×10^5 /孔, 培养液为含终浓度 10 mg/L Polybrene(Sigma 公司)和 10%胎牛血清的高糖 DMEM, 病毒感染后第 3 天更换干细胞培养液, 培养液为含 1000 U/ml LIF (Chemicon 公司)、4 μ g/L bFGF(Sigma 公司)及 15%胎牛血清(Hyclone 公司)的高糖 DMEM(Hyclone 公司), 细胞形态出现集落变化后, Dispase II (Roche 公司)消化后接种到 12.5 天小鼠胎儿成纤维细胞饲养层上, 添加干细胞培养液在 37.5°C、5% CO₂ 饱和湿度下进行培养.

1.3 猪诱导细胞的鉴定

1.3.1 RT-PCR 检测. 应用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)处理猪 iPS 细胞, 然后提取细胞总 RNA, 按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书合成 cDNA. 鉴定引物扩增相应基因, Klf4、c-Myc 引物序列同 1.1 中相应载体构建引物, 其余引物序列如下: pOct4 上游, 5' TATAAGCTTGCCACCATG GC-GGGACACCTGGCTT 3', 下游, 5' AAAG GA-TCCGCGTTTGAATGCATGGGGGAGCCC 3'; pNanog 上游, 5' CTTCTCGAGGCCACCATGAGT-GTGGATCCAGCTT 3', 下游, 5' GCGAAGCTT-CATATCTTCAGGCTGTATGTTC 3'; GAPDH 上游, 5' TTGGTATCGTGGAAGGACTCTA 3', 下游, 5' TGTCATATTTGGCAGGTT 3'.

1.3.2 核型分析. 0.1 mg/L 秋水仙素(Sigma 公司)处理猪 iPS 细胞 2.5 h, 胰酶消化并重悬于 0.075 mol/L KCl, 37°C 孵育 25 min, 固定液(甲醇:冰醋酸 = 3:1)固定 10 min, 离心固定重复 3 次. 收获细胞, 滴片, Gimsa 染色, 空气干燥, 封片. 显微镜下观察及应用相关软件分析染色体配对.

1.3.3 免疫荧光检测. 细胞经 4%多聚甲醛固定, 1%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 30 min, 添加一抗为兔抗 Oct4(Abcam 公司)、山羊抗 Nanog(R&D 公司)、鼠抗 SSEA-1(Chemicon 公司)、鼠抗 SSEA-3 (R&D 公司)、鼠抗 SSEA-4 (R&D 公司)、鼠抗 TRA-1-60 (Chemicon 公司)、鼠抗 TRA-1-81 (Chemicon 公司), 按 1:200 稀释后 4°C 孵育过夜. PBS 洗 3 次, CY3 红色荧光标记的二抗按 1:200 稀释后室温避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 用 1 mg/L 的 DAPI(Roche 公司)进行细胞核染色 1 min 后荧光镜下观察结果.

1.3.4 碱性磷酸酶染色. 用 4%多聚甲醛固定细胞, 添加碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染液进

行染色, 以胞浆着色为红棕色或咖啡色颗粒为阳性。

1.3.5 体内分化检测. Dispase II 消化猪 iPS 细胞, 无血清 DMEM 重悬细胞后注射到免疫缺陷鼠 (BALB/C-nu) 背侧皮下, 注射 8 周后处死裸鼠, 取肿瘤组织 4% 多聚甲醛固定后进行苏木精伊红染色。

2 结 果

2.1 猪 iPS 细胞的建立

磷酸钙法包装的限定因子慢病毒感染猪胎儿成纤维细胞, 在干细胞培养液培养 6~7 天后, 猪胎儿成纤维细胞的形态开始发生改变, 少量猪胎儿成纤维细胞逐渐由长梭形转变成圆球形, 呈聚集性生长。Dispase II 消化的圆球形细胞在饲养层细胞上, 用含 1 000 U/ml LIF 和 4 μ g/L bFGF 的干细胞培养液培养条件下, 在感染后第 15~16 天, 边界明显的集落状细胞克隆逐渐形成。高倍显微镜下集落中的单个细胞呈现细胞核较大、核质比例较高。在 1:4 传代的情况下, 细胞克隆大约每隔 3~4 天传代一次, 细胞集落生长传代稳定(图 2)。对传至第 13 代的猪 iPS 细胞进行核型分析显示, 猪 iPS 细胞染色体数为 38, XY 正常核型(图 3)。

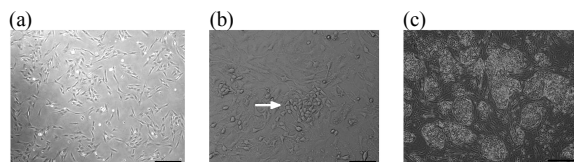


Fig. 2 Visible morphology change in the process of cell reprogramming

(a) A phase contrast image of PEFs. (b) A phase contrast image of visible morphology changed cells began to emerge 6 days after 2 rounds viral infection. (c) A representative iPS colony after serial passage resembling ESCs.



Fig. 3 A representative metaphase spread of iPS cells

2.2 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测限定因子融合蛋白诱导的猪 iPS 细胞相关多能性基因的表达, 猪 iPS 细胞表达 Oct4、c-Myc、Klf4 和 Nanog 基因, 相同条件下猪胎儿成纤维细胞表达 Nanog 基因, 不表达 Oct4、c-Myc、Klf4 等相关基因(图 4)。

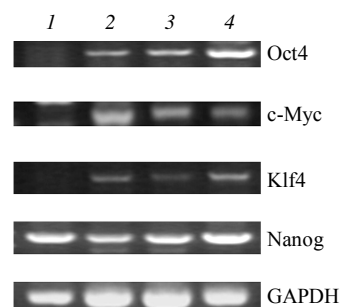


Fig. 4 RT-PCR analysis for expression of pluripotency genes

1: PEFs; 2~3: Pig iPS cells; 4: Mouse ES cells.

2.3 AP 染色

AP 在早期胚胎的干细胞中有较高表达, 而在已分化的细胞中活性明显降低, 甚至不表达, AP 的表达是一种 ES 细胞及相关干细胞的重要特征之一。AP 染色结果显示限定因子融合蛋白诱导的猪 iPS 细胞 AP 表达为强阳性(图 5a)。

2.4 细胞免疫荧光检测

细胞免疫荧光检测显示, 诱导培养的猪 iPS 细胞表达 Oct4、Nanog、SSEA-1 蛋白(图 5b~d), 对于 Oct4 蛋白的表达检测, 携带外源限定因子的细胞在整个细胞克隆中呈现 Oct4 蛋白强表达, EGFP 为强表达的细胞则 Oct4 蛋白检测为强阳性, EGFP 表达较弱或沉寂的细胞则 Oct4 蛋白表达水平呈现一般阳性(图 5c), 在相同条件下, Nanog 蛋白的表达水平在细胞集落中表达 EGFP 或不表达 EGFP 的细胞之间没有差异。SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 等蛋白质未见表达。

2.5 畸胎瘤实验

取限定因子融合蛋白诱导的猪 iPS 细胞在 BALB/C 裸鼠皮下 8 周后形成的畸胎瘤, HE 染色结果显示在畸胎瘤组织内存在神经、肌肉、腺体、软骨等三个胚层来源的细胞和组织(图 6)。

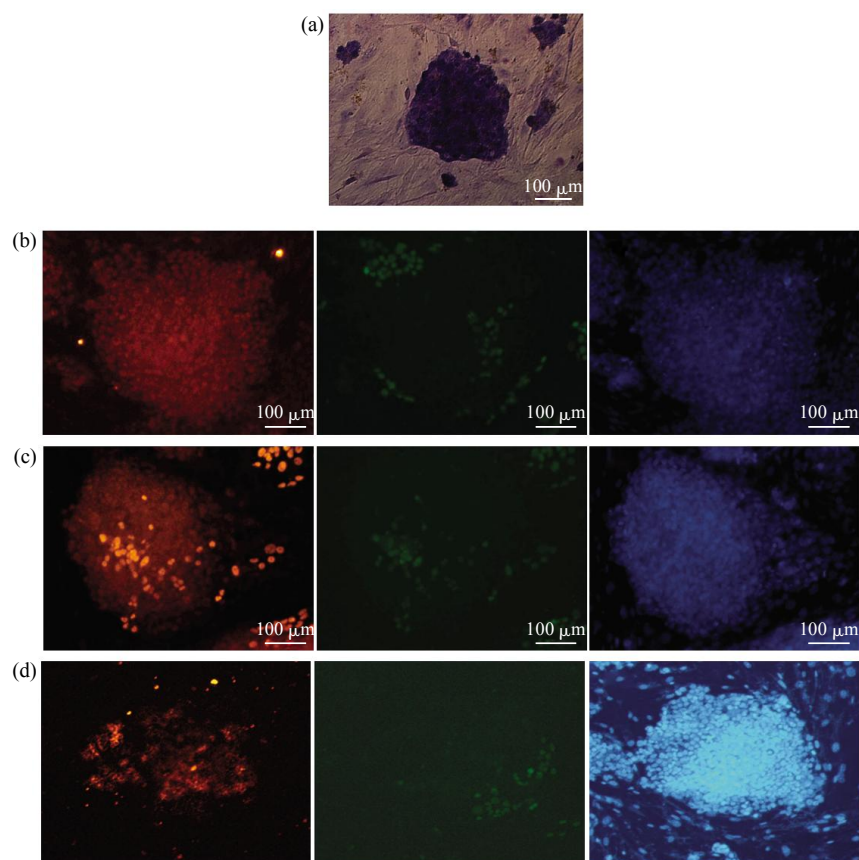


Fig. 5 Pig iPS cells express pluripotency markers

The pig iPS colonies stained positive for alkaline phosphatase (a). The immunofluorescence staining of pluripotent markers Nanog (b), Oct4 (c), and SSEA-1 (d) in iPS colonies. Specific localization to nuclei was confirmed by staining with DAPI (blue).

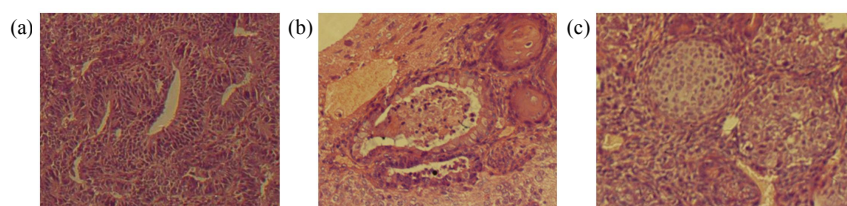


Fig. 6 Pig iPS cells are pluripotent

Hematoxylin-eosin staining of teratomas showed it was composed of various types of tissues, including neural-like tissue (a, ectoderm), gut-like tissue (b, endoderm), cartilage-like tissue (c, mesoderm).

3 讨 论

Oct4、Sox2、Klf4 和 Myc 四个限定因子目前已经成功诱导出小鼠^[1-3]、人^[4-5]、大鼠^[7]、猪^[8-10]等的 iPS 细胞，并且使用来源于小鼠或人的四个限定因子也能够使其他物种的细胞转变成 iPS 细胞^[8-10]，证实了介于不同物种之间四个限定因子具有高度的

保守性。在本次试验中使用了来源于人的 Oct4 基因，人与猪的 Oct4 基因序列之间有 90.2%的同源性，其他三个限定因子均来源于猪，四个限定因子融合蛋白的组合能够成功诱导出猪的 iPS 细胞，从而证实了四个限定因子融合蛋白在家畜 iPS 细胞诱导方面具有可行性。慢病毒载体作为一类重组逆转录病毒载体在转基因生产中具有方便、快捷、高效

和稳定转染等优点, 目前已成为一种重要的基因转移工具被广泛应用于基因导入细胞分子生物学研究领域, 病毒能够利用自身组分将外源基因整合入宿主细胞基因组 DNA 中, 从而使外源基因随着宿主细胞的分裂增殖和传代而稳定表达. 在本次试验中利用慢病毒介导外源限定因子与 EGFP 的融合蛋白成功诱导出猪的 iPS 细胞, 证实了融合蛋白中的 EGFP 不影响体细胞重编程过程, 从而为限定因子融合蛋白在追踪掌握外源限定因子在重构过程中的发生机制特点等方面的应用奠定了基础. 2009 年 Zhou 等^[11]和 Kim 等^[12]通过采用携带细胞穿膜肽的外源限定因子成功诱导出小鼠和人的 iPS 细胞, 由于慢病毒携带外源基因的随机稳定整合会带来潜在的细胞癌化畸变等危害, 因此根据慢病毒介导外源限定因子 EGFP 融合蛋白的试验结果, 构建携带细胞穿膜肽外源限定因子的融合蛋白用于猪 iPS 细胞的诱导, 将会为猪 iPS 细胞的安全应用奠定基础.

通过外源限定因子融合蛋白追踪发现, 外源限定因子在猪 iPS 细胞集落中大多数处于不表达或低水平表达, 少数细胞则处于高表达状态, 说明了体细胞完全重编程形成 iPS 细胞后外源基因不表达, 不完全重编程的体细胞外源基因仍处于高表达状态, Zhao 等^[13]用 EGFP 作为荧光标记诱导人的 iPS 细胞中发现, EGFP 表达的沉寂预示着 iPS 细胞的完全重编程, EGFP 的表达显示 iPS 细胞尚处于不完全重编程. Yu 等^[14]通过基因芯片检测发现完全重构的人 iPS 细胞与人 ES 细胞 Oct4 的表达水平一致. Maherali 等^[15]采用外源限定因子的诱导表达时证实了小鼠 iPS 细胞形成后外源限定因子的表达不为 iPS 细胞的生长所必需. 众多的研究结果显示了 iPS 细胞形成后激活的内源性多能性基因足以维持干细胞的生长发育, 外源性限定因子在 iPS 细胞中处于沉寂状态. Wu 等^[10]诱导产生的猪 iPS 细胞在形态和分子标记的表达等方面与人 ES 细胞非常相似, 表达 SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-60 和 Tra-1-81 等分子标记, 不表达 SSEA-1. 而 Ezashi 等^[9]建立的猪 iPS 细胞表达 SSEA-1, 不表达 SSEA-3 和 SSEA-4. 我们通过导入人 Oct4、猪 Sox2、Klf4 和 c-Myc 等四个限定因子诱导产生的猪 iPS 细胞, 与 Ezashi 等^[9]报道的结果相似, 可表达 SSEA-1, 不表达 SSEA-3 和 SSEA-4. 不同小组诱导产生的 iPS 细胞特征不完全一致, 这可能与不同实验室采用的诱导方案及诱导产生 iPS 细胞重编程的程度不同有关. Chin 等^[16]研究发现, 通过比较不同代数人 iPS

细胞和人 ES 细胞的基因表达图谱, 结果显示代数高的 iPS 细胞(第 54~61 代)比代数低的 iPS 细胞(第 5~9 代)更接近于 ES 细胞. 由此可见, 诱导产生的 iPS 细胞在持续的培养过程中有可能逐步完善细胞重编程. 在我们的实验过程中, 猪 iPS 细胞的各项鉴定实验采用的是第 10~13 代 iPS 细胞, 属于代数比较低的 iPS 细胞, 也可能存在部分细胞重编程不完全. 对于这种不同研究小组诱导产生的猪 iPS 细胞系特征差异的原因机制不清楚, 可能与不同的猪 iPS 细胞系的重编程程度不同有关.

使用外源限定因子融合蛋白慢病毒表达载体成功用于猪 iPS 细胞的诱导, 为深入追踪掌握外源限定因子在重编程过程中的发生机制和特点及深入研究利用猪 iPS 细胞等相关工作奠定了基础.

参 考 文 献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, **126**(4): 663-676
- [2] Kang L, Wang J, Zhang Y, *et al.* iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, **5**(2): 135-138
- [3] Zhao X Y, Li W, Lv Z, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, **461**(7260): 86-90
- [4] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, **131**(5): 861-872
- [5] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, **318**(5858): 1917-1920
- [6] Liu H, Zhu F, Yong J, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(6): 587-590
- [7] Liao J, Cui C, Chen S, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(1): 11-15
- [8] Esteban M A, Xu J, Yang J, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from *Tibetan miniature pig*. *J Biol Chem*, 2009, **284**(26): 17634-17640
- [9] Ezashi T, Telugu B P, Alexenko A P, *et al.* Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(27): 10993-10998
- [10] Wu Z, Chen J, Ren J, *et al.* Generation of pig-induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, 2009, **1**(1): 46-54
- [11] Zhou H, Wu S, Joo J Y, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(5): 381-384
- [12] Kim D, Kim C H, Moon J I, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(6): 472-476

- [13] Zhao Y, Yin X, Qin H, *et al.* Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(5): 475–479
- [14] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, **324**(5928): 797–801
- [15] Maherali N, Sridharan R, Xie W, *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**(1): 55–70
- [16] Chin M H, Mason M J, Xie W, *et al.* Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*, 2009, **5**(1): 111–123

Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Porcine Fibroblasts*

YIN Hui-Qun^{1)**}, CAO Hong-Guo^{1,2)**}, SUN Xue-Ping¹⁾, XUE Yi-Jie¹⁾, ZHANG Wei-Qin¹⁾, HUANG Wei-Ling¹⁾,
TAO Yong^{1,2)}, LIU Ya^{1,2)}, LI Yun-Sheng^{1,2)}, ZHANG Yun-Hai^{1,2)***}, ZHANG Xiao-Rong^{1,2)***}

¹⁾ Anhui Agricultural University, College of Animal Science and Technology, Hefei 230036, China;

²⁾ Local Animal Genetic Resources Conservation and Bio-Breeding Laboratory of Anhui Province, Hefei 230036, China)

Abstract In order to establish pig induced pluripotent stem cells (iPS) with defined factor fusion protein, four defined factors genes Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4 were delivered into porcine fetal fibroblasts by lentiviral transfection. The porcine fetal fibroblasts expressed exogenous defined factor genes were sub-cultured, and the clear-cut cell clones were gradually isolated. The cell colonies grew at similar rates and stability, exhibited normal karyotype, and expressed alkaline phosphatase, Oct4, Nanog and SSEA1. And these cells could differentiate into various kinds of tissue in teratomas. The results confirmed that the isolated cell clones were iPS cells. This would greatly facilitate the further improvement of the induction protocol and in-depth study and application of pig iPS cells.

Key words pig, induced pluripotent stem cells (iPS), defined factor fusion protein

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00737

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2009CB941004), The National Natural Science Foundation of China(30800784/c120103) and Hi-Tech Research and Development Program(2008AA101003).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

ZHANG Xiao-Rong. Tel: 86-551-5785543, E-mail: zxr@ahau.edu.cn

ZHANG Yun-Hai. Tel: 86-551-5786357, E-mail: yunhaizhang@ahau.edu.cn

Received: December 11, 2009 Accepted: March 23, 2010