

· 基础研究 ·

人诱导多能干细胞与人胚胎干细胞分化过程中 Oct4/Nanog 基因表达的比较*

杜丽丽^{1,2} 林 戈^{1,2} 卢光琇^{1,2,Δ}

(1 中南大学生殖与干细胞工程研究所 湖南 长沙 410078 2 人类干细胞国家工程研究中心 湖南 长沙 410078)

摘要 目的:比较通过慢病毒方法获得的人诱导多能性干细胞(iPSCs)与人胚胎干细胞(hESCs)分化过程中全能性基因 Oct4、Nanog 的表达变化。方法:收集分化不同时间点的拟胚体(EBs)检测三胚层分化基因以及全能性基因 Oct4/Nanog 的表达,并通过畸胎瘤组织切片的荧光染色分析 Oct4 的表达。结果:iPSCs 获得的 EB 中内外三胚层分化基因表达的出现明显晚于 hESCs 来源的 EB。不同于 hESCs,iPSCs 悬浮培养获得的 EBs 在体外培养 18 天未见内源性 Oct4、Nanog 基因表达的下调。未分化的 iPSCs 注射严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠培养 10 周后获得的畸胎瘤中仍存在 Oct4 阳性的细胞,但 iPS-#2 中明显少于 iPS-#5。结论:通过慢病毒方法获得的 iPSCs 虽然具有向三胚层分化的能力,但在分化过程中仍维持较高水平的全能性基因 Oct4、Nanog 的表达。

关键词 诱导性多能干细胞;胚胎干细胞;分化;拟胚体;畸胎瘤

中图分类号:Q75、Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)01-1-04

Comparison of Human Induced Pluripotent Stem Cells and Oct4/Nanog Gene Expression in Human Embryonic Stem Cell Differentiation*

DU Li-li^{1,2}, LIN Ge^{1,2}, LU Guang-xiu^{1,2,Δ}

(1 Institute of Reproductive & Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha 410078;

2 National Engineering Research Center of Human Stem Cells, Changsha 410078, China)

ABSTRACT Objective: To compare the expression of pluripotency gene Oct4/Nanog in the differentiated human induced pluripotent stem cells (iPSCs) and embryonic stem cells (ESCs). **Methods:** The RNA of embryoid bodies (EBs) derived from undifferentiated human iPSCs and hESCs at different time of differentiation were collected. The gene expression related to three-layer differentiation and pluripotency gene Oct4/Nanog was detected by RT-PCR. The Oct4 positive cells in the teratoma derived from both human iPSCs and hESCs were detected by immunofluorescence staining. **Results:** The expression of endoderm and ectoderm related gene in the EBs derived from iPSCs was later than that derived from hESCs. The expression of Oct4 and Nanog was still existence in D18 EBs derived from undifferentiated human iPSCs. The Oct4 positive cells were detected in iPSCs derived-teratoma. **Conclusion:** Although the iPSCs can differentiate into three-layer cells, the higher expression of pluripotency gene Oct4/Nanog was maintained in the differentiated iPSCs generated by lentivirus infection than hES.

Key words: Induced pluripotent stem cells; Embryonic stem cells; Differentiation; Embryoid bodies (EBs); Teratoma

Chinese Library Classification: Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-1-04

前言

2006 年日本的 Yamanaka 等把与胚胎干细胞全能性相关的 4 个基因转入小鼠的成纤维细胞,将成体细胞诱导成为具有多种分化潜能的细胞,称为“诱导多能干细胞”(induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[1]。2007 年 11 月 Yamanaka K 和 Yu J 等两个实验室用人类皮肤成纤维细胞也培育出了人类 iPSCs^[2,3]。这一技术性突破提供了获得病人自身细胞来源的多能干细胞的体外培养途径,不但避免了自身免疫排斥问题,而且不涉及伦理问题,为获得患者自身遗传背景的多能干

胞,以及研究遗传疾病的发病机理提供了一条新的途径。

利用病毒载体将 Oct4、Sox2、Nanog 和 Lin28 四个全能性因子感染成纤维细胞,得到的 iPSCs 具有和胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)类似的特性,譬如表达多能性的表面标记,具有高的端粒酶活性,具有向三胚层分化的能力等。更为重要的是将小鼠 iPSCs 注射入四倍体囊胚中可得到存活并具有繁殖能力的小鼠,从而证明了小鼠 iPSCs 的全能性^[4,5]。但是对于人 iPSCs 仍有许多科学问题需要解决,其中一个关键问题就是人 iPSCs 的多能性在分子水平以及分化为功能细胞方面是否与 hESCs 相同。2009 年 Chin MH 等发现不同培养代数

* 基金项目 国家 973 项目(2005CB522705) 国家 863 计划项目(2006AA02A102)

作者简介 杜丽丽(1980-)女,博士研究生,主要从事体细胞重编程的研究。E-mail: jilidu8107@yahoo.com.cn

Δ 通讯作者:卢光琇 E-mail: lugxdirector@yahoo.com.cn

(收稿日期:2010-10-20 接受日期:2010-11-13)

的人 iPSCs 在全基因组基因表达方面与 hESCs 有显著的不同^[6]。Ghosh Z 等进一步研究发现重编程过程并没有使得体细胞完全去分化至 ESCs 状态,在 iPSCs 中仍有部分体细胞基因的表达^[7]。外源性全能性因子的转入对 iPSCs 的分化是否有影响,iPSCs 是否与 hESCs 一样可作为一种合适的研究体外分化的模型仍是值得关注的问题。本文对本实验室分离得到的 hESCs 与通过慢病毒方法诱导获得的 iPSCs 在分化过程中三胚层分化基因以及全能性基因的表达进行了比较,发现人 iPSCs 具有向三胚层分化的能力,但在分化过程中仍维持较高水平的全能性基因 Oct4、Nanog 的表达。

1 材料与方法

1.1 试剂

1.1.1 细胞 chHES-137 为本实验室自行分离获得^[8]。iPS-#2, iPS-#5 为本实验室通过慢病毒感染的方法将含有 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 全能性基因的慢病毒颗粒转入人类胚胎成纤维细胞,获得的 iPSCs^[9]。

1.1.2 试剂及仪器 高糖 DMEM (Gibco), 胎牛血清(Hyclone), 丝裂霉素 C (Alexis, San Diego, CA); 谷氨酰胺(MAX) (Sigma), 丙酮酸钠 (Sigma), β -巯基乙醇 (invitrogen), knock-out DMEM/F-12(Gibco), 替代血清 SR(Gibco)、bFGF(invitrogen)、1%非必需氨基酸(invitrogen); 小鼠抗人 Oct4 抗体来源于 Santa Cruz Biotechnology; Alexis 594 二抗来源于 invitrogen; DAPI 为 Sigma 产品; Go Taq Reaction buffer 为 Promega Product In-

formation 产品, 荧光显微镜为日本 Nikon 公司产品。

1.2 细胞培养

hESCs 及 iPSCs 为本实验室常规传代培养,见参考文献^[10],即在人饲养层细胞中培养,每天观察并换液,7 天传代一次。

1.3 iPSCs 与 hESCs 体内体外分化比较

1.3.1 EB 分化 体式镜下将 iPSCs 以及 hESCs 克隆切割至合适大小(比传代克隆团块稍大),用 TIP 头轻轻将克隆团块铲下,将克隆块摇至培养皿中央,转移至加有 4ml EB 培养基的 60mm 的细菌培养皿(petri dish)中,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。隔天换液。收集培养第 3 天,第 7 天,第 10 天,第 14 天,第 18 天的 EB。

1.3.2 RT-PCR 使用 Trizol 试剂(invitrogen)抽提 iPSCs、hESCs 和 EB 的 RNA,以 RNA 为模板, β -actin 为引物进行 PCR 扩增,确定无 gDNA 的污染。并用随机引物和逆转录试剂盒 A RevertAidTM first strand cDNA synthesis kit(Fermentas Life Sciences)合成 cDNA,起始的总 RNA 定量到 1 μ g。所有的聚合酶链式反应都使用 Tag DNA 聚合酶,在不同的反应温度和循环次数下,总的反应体系为 10 μ l,PCR 产物在 2%的琼脂糖凝胶上分离并用溴化乙锭染色。检测内源性 Oct4/Nanog 表达的引物(参见参考文献^[11])以及三胚层分化代表基因(外胚层:Pax6,中胚层:Runx1,内胚层:Sox17)的引物(根据所检测基因的 CDNA 序列使用 Primer5 设计)送上海英骏公司合成。具体引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物

Table 1 Primers used in the RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
OCT-4 UTR	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	ACTTCACCTCCCTCCAACC
NANOG UTR	TTTGAAGCTGCTGGGAAG	GATGGGAGGAGGGGAGAGGA
Sox17	GCGCAGCAGAATCCAGA	CCACGACTTGCCAGCAT
PAX6	GCCTTTATTGTGAGAGTGG	CTCACACATCCGTTGGACAC
Runx1	CAGTGACCTGTCTTGGTTTCCG	CAGCCGAGTAGTTTTCATCATTGC
β -actin	CGCACCCTGGCATTGTCAT	TTCTCCTTGATGTCACGCAC

1.3.3 畸胎瘤形成及 Oct4 免疫荧光染色 为进行体内分化分析,2~3 \times 10⁶ iPS 细胞经过肌肉注射至 6-8 周大小严重的联合免疫缺陷(SCID)鼠的后腿内。8-10 周后处死小鼠分离畸胎瘤,切片,脱蜡、复水、抗原修复后,采用细胞免疫荧光染色检测。用 0.2% TritonX-100 孵育 10min 后,再用封闭血清作用 30min,弃血清,加小鼠抗人 Oct4 一抗(1:50; Santa Cruz Biotechnology)4℃孵育过夜。PBS 漂洗 20min,加荧光标记二抗,37℃孵育 60min; PBS 漂洗 20min,DAPI 复染,荧光观察。

2 结果

2.1 iPSCs 与 hESCs 在 EB 分化过程中三胚层分化能力的比较

RT-PCR 结果显示了 hESCs 与 iPSCs 在 EB 分化过程中外胚层(pax6)、内胚层(sox17)和中胚层(Runx1)基因表达开始出现的时间。hESCs 在 EB 分化的第 3 天即开始出现 Pax6、Sox17 和 Runx1 的表达,Pax6 在 EB 分化的 D14 高表达,而 Sox17 在

EB 分化的第 10 天高表达,第 14 天低表达。在 iPS-#2 和 #5 中 Runx1 表达出现的时间与 ES 相似,但在 iPS-#2, pax6 和 sox17 在 EB 分化的第 10 天才开始出现,至第 18 天表达无明显变化,iPS-#5 中 Pax6 在 EB 分化的第 3 天即开始表达,至 18 天一直维持低表达的水平,而 Sox17 则在 EB 分化的第 14 天才开始表达(图 1)。

2.2 iPSCs 与 hESCs 在 EB 分化过程中内源性 Oct4、Nanog 的表达水平变化

本实验对 iPSCs 与 hESCs 所得的第 7,第 10,第 14,第 18 天分化的 EB,检测其内源性 Oct4/Nanog 的表达水平。RT-PCR 结果显示 hESCs(chHES-137)中内源性 Oct4、Nanog 在 EB 分化的第 14 天后开始下降,EB 分化第 18 天后明显下降。而 iPSCs(iPS-#2,iPS-#5)中内源性 Oct4、Nanog 在 EB 分化过程中直至第 18 天后尚未发现明显的下降趋势(图 2)。

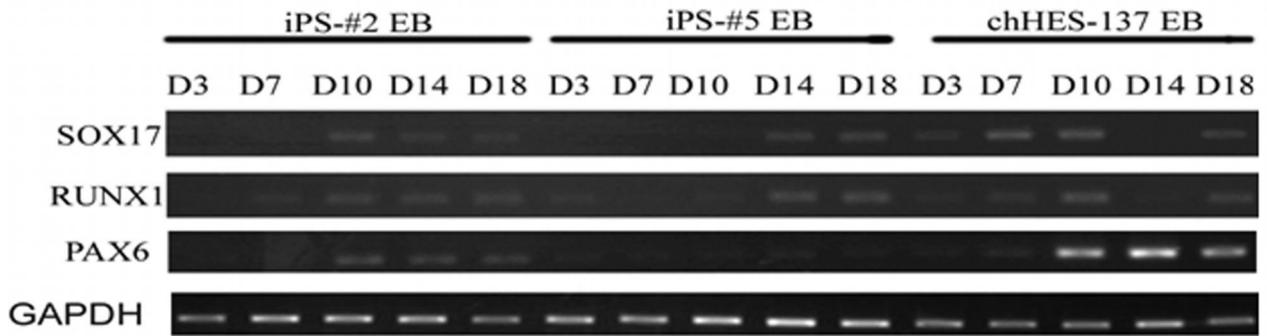


图1 iPSCs 与 hESCs 来源的 EB 不同分化时间点内中外 3 胚层代表基因表达

Fig.1 Three germ lines relating genes expression in EB at different time from iPSCs and hESCs

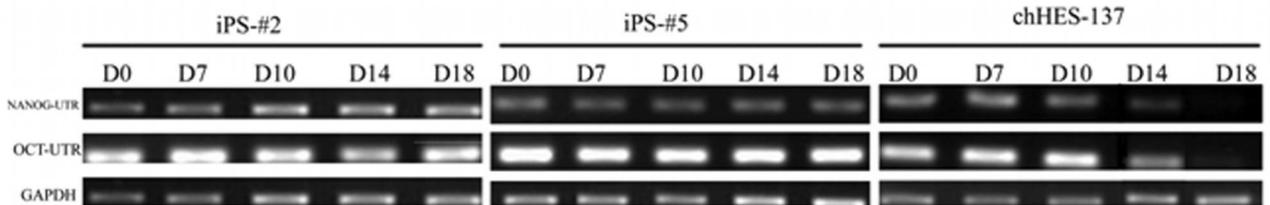


图2 iPSCs 与 ESCs 来源的 EB 不同分化时间点上内源性 Oct4、Nanog 的表达

Fig.2 endogenous expression of Oct4/Nanog in EB at different time from iPSCs and hESCs

2.2 iPSCs 与 hESCs 的畸胎瘤组织切片分析

经本实验室前期工作证实，iPSCs 与 hESCs 均具有成瘤能力，且可向三胚层分化^[5,6]。本实验取 iPSCs 与 hESCs 形成的畸胎瘤的石蜡切片，进行 Oct4 染色，结果见图 3。其中，图 3A 显示 chHES137 分化得到的畸胎瘤切片中未发现 Oct4 阳性细

胞，而图 3B、C 和 D 显示 iPS-#2、#5 中均存在 Oct4 阳性的未分化细胞，其中 #5 中明显多于 #2。阳性细胞计数结果见图 4。iPS-#2 与 iPS-#5 来源畸胎瘤中 Oct4 阳性细胞数显著多于 hESCs 来源畸胎瘤（本实验中未检测到）中 Oct4 阳性细胞。

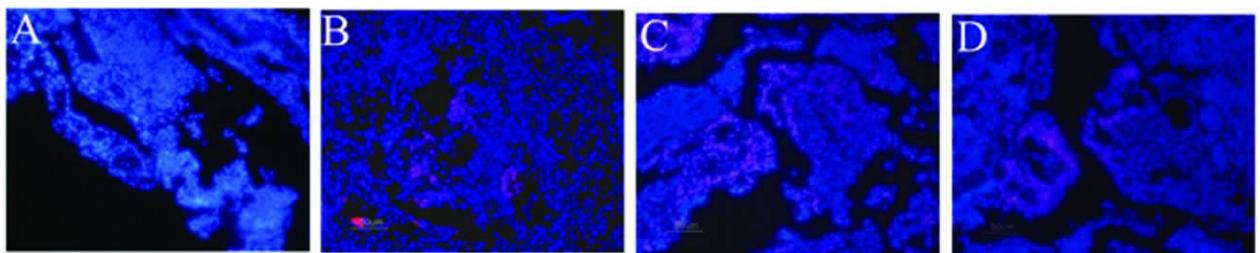


图3 畸胎瘤组织切片 Oct4 染色

Fig.3 The Oct4 staining of teratoma from hESCs and iPSCs: A: from hESCs, B: from iPS-#2, C and D: from iPS-#5

(blue: DAPI red: Oct4)

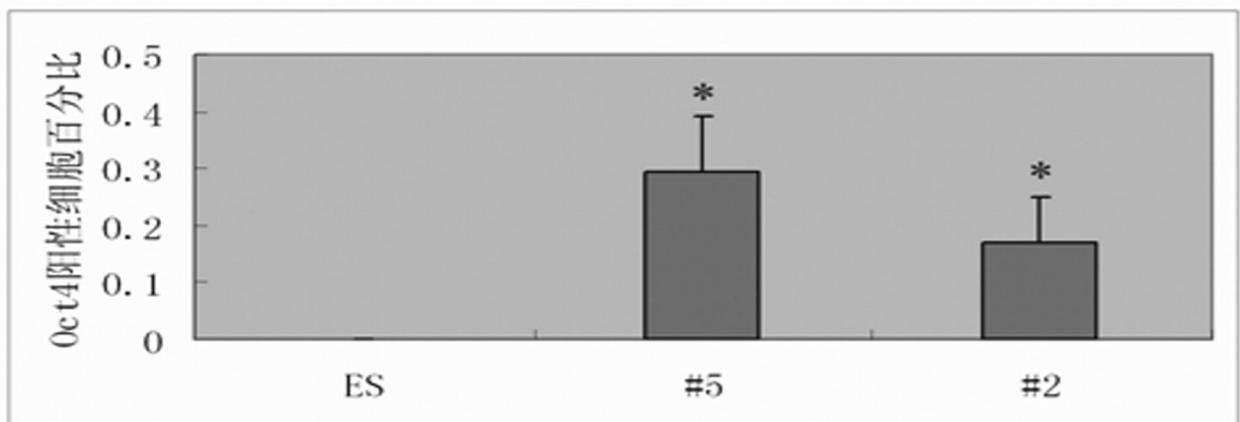


图4 畸胎瘤组织切片中 Oct4 阳性细胞数

Fig.4 The number of Oct4 positive cells in teratoma from hESCs and iPSCs(iPS-#2 and iPS-#5)

3 讨论

胚胎干细胞的重要特征是具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的潜能^[1]。iPSCs 与 hESC 在多能性的表面标记的表达、体内、体外向三胚层分化的能力等方面相似,可作为研究细胞的表现遗传学及干细胞多能性维持的重要材料。病人特异的诱导性多能性干细胞可进行定向分化,作为疾病的细胞模型,用来研究疾病的发病机制和进行药物筛选。虽然目前已有报道通过非病毒整合的方式可获得 iPSCs^[12,13],但由于效率极其低,目前大部分实验室仍是借助于病毒载体使外源因子(Oct4/Sox2/Nanog/lin28 或 Oct4/Sox2/cMyc/Klf4)在体细胞内表达,以完成重编程过程而获得 iPSCs 的。借助慢病毒载体获得的 iPSCs 在分化过程中全能性基因以及分化基因的表达是否与 hESC 分化中呈现相同的变化趋势是不清楚的。

本研究发现通过慢病毒方法获得的 iPSCs 形成的 EB 中,内源性 Oct4、Nanog 的表达仍处于高水平,不同于 hESC 中随分化逐渐下降。这与 Thomson 试验中检测的分化 D9 的 EB 中 Oct4、Nanog 表达高于同期 hESC 来源的 EB 的结果是一致的^[3]。这可能是由于 iPSCs 中整合的慢病毒载体在 iPSCs 分化过程中 EF1a 启动子仍启动外源性 Oct4、Sox2、Nanog 和 Lin28 的表达。加之 Oct4、Sox2、Nanog 的自调控作用,介导了 iPSCs 在 EB 分化的 D18 仍有内源性 Oct4、Nanog 的高表达。而由于内源性 Oct4、Nanog 等的高表达影响了 iPSCs 的分化,这与本实验结果 iPSCs 的 EB 分化中内外胚层的基因表达晚于 hESC 的结果也是一致的。畸胎瘤组织切片的 Oct4 染色显示 iPSCs 获得的畸胎瘤虽然比 hESC 来的畸胎瘤体内分化时间长但仍存在 Oct4 阳性的细胞。这说明 iPSCs 虽然具有向三胚层分化的能力,但向三胚层分化的起始时间与 hESC 比较相对滞后。另外除了多能性基因 Oct4、Nanog 的持续表达影响 iPSCs 的分化外是否存在其他影响因素也是值得探讨的。Stadtfeld M. 等最近对鼠 iPSCs 进行嵌合体试验发现由于位于 iPS 细胞染色体 12qF1 内的印记基因异常沉默,小鼠 iPSCs 分化发育成全身各类细胞的能力较低^[14]。是否人 iPSCs 存在此印记区的异常以及外源基因的整合是否对疾病特异的 iPSCs 向特定功能细胞的定向分化时候有影响也是需要进一步研究的。

参考文献(References)

[1] 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

- [2] 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
- [3] Yu J, Vodyanik MA, Smuga OK, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858): 1917-1920
- [4] Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation[J]. Nature, 2009, 461(7260): 86-90
- [5] Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(2): 135-138
- [6] Chin MH, Mason MJ, Xie W, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures [J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(1): 111-123
- [7] Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, et al. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells [J]. PLoS One, 2010,5(2): e8975
- [8] Lin G, Xie Y, Ouyang Q, et al. HLA-matching potential of an established human embryonic stem cell bank in China [J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(5): 461-465
- [9] Du L, Lin G, Lu G. Generation and identification of pluripotent stem cells from human embryonic fibroblast cells by 4 defined factors[J]. Journal of Central South University of Technology, 2009, 34(12): 1157-1165
- [10] Zhou J, Ou-Yang Q, Li J, et al. Human feeder cells support establishment and definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(4): 737-749
- [11] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147
- [12] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors [J]. Science, 2008, 322(5903): 949-953
- [13] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration [J]. Science, 2008, 322(5903): 945-949
- [14] Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells[J]. Nature,465(7295): 175-181