

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.12.004

慢病毒介导的绿色荧光蛋白报告基因对人多能干细胞的生物风险评估研究*

潘丽 王晓丹 吕德馨 单培芬 聂鑫[△]

(温州医科大学附属口腔医院口腔颌面外科 浙江 温州 325000)

摘要 目的:探讨慢病毒介导的绿色荧光蛋白(GFP)标记人诱导多能干细胞(hiPSC)是否影响其细胞生物学特性,为多角度评价生物学风险提供实验基础。**方法:**慢病毒感染 hiPSC 后 24 小时,通过抗性基因表达筛选成功标记 GFP 的 hiPSC。利用流式细胞分析法(FACS)检测 GFP 阳性的细胞比例。通过碱性磷酸酶染色检验干细胞的多能性,并通过免疫荧光染色检测多能性标记基因 OCT4, NANOG, SOX2, SSEA4 的表达情况。体外拟胚体分化实验检测 GFP 标记的 hiPSC 分化为不同胚层细胞的能力。**结果:**慢病毒感染不仅可以成功 hiPSC 标记上 GFP,而且抗性基因表达筛选使 GFP 阳性细胞比例从 37.5%提高到 97.4%。AP 染色和多能性标记基因的免疫染色证明标记后的细胞能维持多能性。体外分化实验显示感染后 hiPSC 可以形成拟胚体并实现三个胚层细胞共存。**结论:**慢病毒能够高效的标记 hiPSC,并且不影响其多能性和拟胚体形成能力,可以用于后续的分化和细胞示踪研究。

关键词:人诱导多能干细胞;慢病毒;绿色荧光蛋白;拟胚体

中图分类号:R-33;R78;R331.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)12-2216-05

Green Fluorescence Protein Reporter Gene Labeled Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Lentivirus*

PAN Li, WANG Xiao-dan, LV De-xin, SHAN Pei-fen, NIE Xin[△]

(School and hospital of stomatology, Wenzhou medical university, Wenzhou, Zhejiang, 325000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of green fluorescence protein (EGFP) labeling mediated by lentivirus on the biophysical properties of human induced pluripotent stem cells (hiPSC), and provides experimental basis for multi angle evaluation of biological risk. **Methods:** HiPSC labeled with GFP was successfully screened by resistance gene expression 24 h after lentivirus infection. After GFP expression was observed under fluorescence microscope, Positive rate of GFP were measured with fluorescent-Activated cell scanning (FACS) analysis. The pluripotency of the cells was tested by alkaline phosphatase staining, and the expressions of pluripotent marker genes OCT4, NANOG, SOX2 and SSEA4 with immunostaining. Finally, in vitro embryoid body experiments were performed to detect differentiate ability of GFP labeled hiPSC into different cell layer. **Results:** Lentivirus infection can not only successfully label hiPSC with GFP, but through expression screening of resistant genes, the proportion of GFP positive cells were improved from 37.5% to 97.4%. Both AP staining and immunostaining of the pluripotent marker genes demonstrated that the pluripotent feature were maintained in the labeled cells. In vitro differentiation experiments showed that GFP labeled hiPSC could form the embryoid body and further differentiate into three embryo layers. **Conclusion:** Lentiviruses can efficiently label hiPSC and has no significant effect on the pluripotency and differentiation of embryoid body, and can be used for subsequent differentiation and cell tracer studies.

Key words: Human induced pluripotent stem cells; Lentivirus; Green fluorescence protein; Embryoid body

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R78; R331.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)12-2216-05

前言

人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSC)具有分化为所有成体细胞类型的潜能^[1,2],在组织修复和细胞替代治疗中具有非常重要的应用前景^[3,4]。而进行细胞标记,在细胞移植治疗等临床前研究中对移植细胞的追踪和效果评价具有重要价值^[5]。绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,

GFP)报告基因在研究中的应用十分普遍,且具有其独特的优势^[6]。其中慢病毒载体由于其整合基因组的特性,其在感染时可以有效地将其遗传物质引入靶细胞,可在细胞或组织中长期稳定表达目标蛋白,广泛应用于基因转染^[7]。但对于慢病毒的安全性一直存在疑虑,是否对目标细胞的生物学特性产生不良影响也较少报道。本研究的目的是通过慢病毒构建稳定表达 GFP 的 hiPSC,并验证 GFP 是否影响细胞的多能性和分化能力。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(31870971);温州市基础性医疗卫生科技项目(Y20190494)

作者简介:潘丽(1986-)女,主治医师,主要研究方向:口腔干细胞的多向分化,电话:13634288237, E-mail: 779699637@qq.com

[△] 通讯作者:聂鑫,主要研究方向:干细胞与组织重建, E-mail: dr.xinnie@qq.com

(收稿日期:2020-12-23 接受日期:2021-01-18)

1 材料与方法

1.1 材料

hiPSC 细胞株, hiPSC/hESC 培养基 -ncTarget、EDTA 传代工作液、Blebbistatin 购自安徽中盛溯源生物科技有限公司; Matrigel 购自美国 Corning 公司; Ubi-MCS-EGFP-IRES-Puromycin 慢病毒购自吉凯基因; AP 染色液试剂盒购自上海斯丹赛公司; OCT4 抗体、NANOG 抗体购自 Abcam 公司; SOX2 抗体购自 SantaCruz 公司; SSEA4 抗体、TrypLE Select 消化液、Puromycin、KSR、FBS、非必需氨基酸、谷氨酰胺购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 hiPSC 用 hiPSC/hESC 培养基 -ncTarget 培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱中, 用 Matrigel 包被的培养板进行培养, 当细胞融合度达到 80% 左右, 进行常规的传代。传代时使用 EDTA 传代工作液, 培养基中加入 10 μM 的 Blebbistatin 促进干细胞存活和维持干细胞干性。

1.2.2 慢病毒感染 传代后第二天的 hiPSC, 6 孔板每孔中加入 1 mL 培养基, 加入 1 μL 10⁸ 慢病毒, 24 h 后更换培养基, 并加入 5 μM Puromycin 筛选 7 天。

1.2.3 流式细胞分析 将培养 4 天的 hiPSC 用 TrypLE Select 消化液消化成单个细胞, 并用 300 目的滤网过滤后, 用 BD Calibur 流式细胞分析仪分析细胞中 GFP 的表达情况。

1.2.4 碱性磷酸酶染色 (AP) 染色 将 hiPSC 吸出细胞培养液, 用 DPBS 润洗 2-3 次, 用 4% 多聚甲醛 (PFA) 固定 1-2 min; 吸出固定液, 用 DPBS 洗 2 次; 吸出 DPBS, 用 TBST 润洗 2 次; 吸出 TBST 溶液, 加入染色试剂使染色液能够覆盖孔底, 室温避光放置 15-20 min; 吸出染色液, 用 DPBS 润洗 1 次, 最后保存于 DPBS 中, 显微镜下观察染色结果。

1.2.5 免疫染色检测蛋白表达 将培养于细胞爬片上的细胞用 DPBS 洗 1 次, 再用 4% PFA 固定 5 min; 加入含有 0.05% Triton X-100 的 DPBS 室温通透 10 min, 用山羊血清室温封闭 1 h, 加入 1:1000 稀释的一抗放入湿盒中 4℃ 过夜; 加入二抗,

湿盒室温孵育 1 h; 加入 DAPI 进行细胞核染色, 用抗淬灭剂封片, 置于激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.6 干细胞拟胚体分化能力 hiPSC 用 EDTA 消化, 加入分化培养液 (DMEM/F12 培养基中添加 20% KSR, 非必需氨基酸, 2 mM 谷氨酰胺, 0.18 μM β- 巯基乙醇和 10 mM Y-27632) 培养 8 天, 形成拟胚体 (embryonic body, EB), 将这些 EB 铺到 0.1% Gelatin 包被的铺有细胞爬片的 24 孔板中继续贴壁培养 10 天后, 检测不同胚层标志物。

2 结果

2.1 慢病毒感染效率研究

hiPSC 呈成纤维细胞样形态, 慢病毒感染后 48 h, 细胞形态不变, 部分细胞出现 GFP 表达, 表达效率为 37.5% (图 1), 通过感染细胞对嘌呤霉素的抗性进行筛选, 最终表达效率为 97.4% (图 2)。

2.2 干细胞生物学特性分析

为了验证慢病毒感染是否影响干细胞的多能性, AP 染色实验证明了细胞仍具有较强的碱性磷酸酶活性。进一步的干细胞标志物, 干细胞表面标记物 OCT4、SOX2, 胚胎干细胞标记物 SSEA4、胚胎干细胞关键蛋白抗体 NANOG 的免疫染色结果显示, 慢病毒感染后的细胞仍然表达对应的干细胞标志物, 表达模式和强度与未感染细胞一致, 提示干细胞的多能性未受到影响 (图 3)。

2.3 拟胚体形成分析

干细胞最重要的用途是后期分化为不同的组织或者细胞类型, 进行细胞替代治疗。为了验证干细胞的分化能力, 我们在体外进行了拟胚体往三个胚层的分化。结果证明, 第 1-3 天可见细胞团逐渐增大未出现分层; 从第 4 天起开始分层并形成简单拟胚体; 第 8 天基本形成拟胚体, 此后放入含细胞爬片的 24 孔板内, 可见细胞伸展并进行贴壁生长; 免疫荧光染色可见外胚层标志物 GFAP、中胚层标志物 α-SMA、内胚层标志物 AFP 均可以在分化的拟胚体中找到, 证明标记后的 hiPSC 可以分化为三个胚层的细胞 (图 4)。

Figure 1

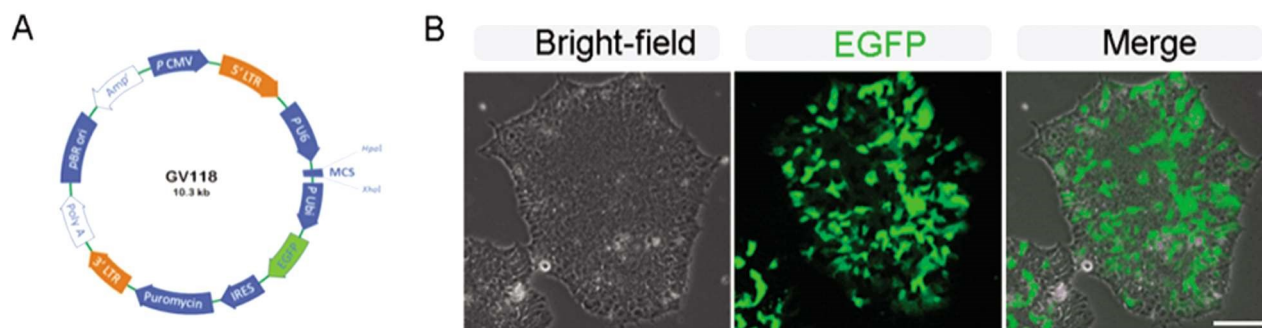


图 1 慢病毒载体示意图 (A) 和感染 hiPSC 的情况 (B)

Fig.1 Schematic diagram of lentiviral vector (A) and hiPSC infection (B)

3 讨论

胚胎发育学和定向诱导的早期涉及多个胚层之间的对话

和相互诱导, 体外要模拟这些过程较困难, 而胚胎干细胞应用存在诸多伦理问题, hiPSC 细胞的建立为体外研究胚胎发育学和定向诱导各组织器官提供了可行性^[89], 而且体细胞比胚胎细

Figure 2

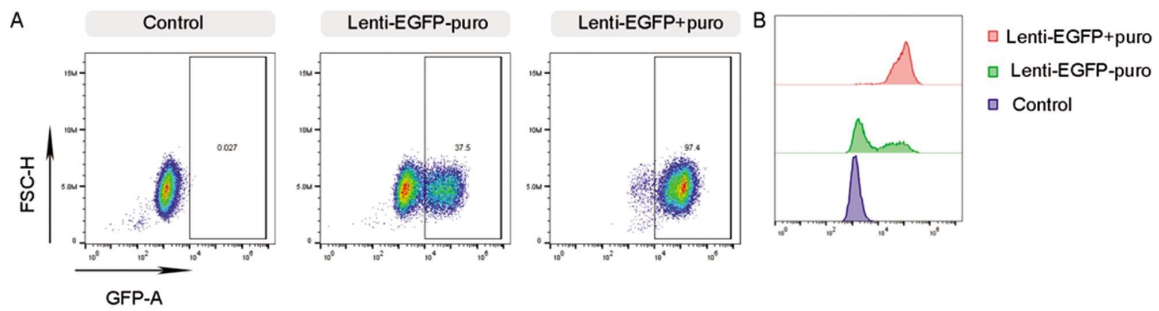


图2 流式细胞仪分析 GFP 阳性细胞比例(A)和不同条件下的阳性率对比(B)

Fig.2 The proportion of GFP positive cells with flow cytometry (A) and the positive rate under different conditions (B)

Figure 3

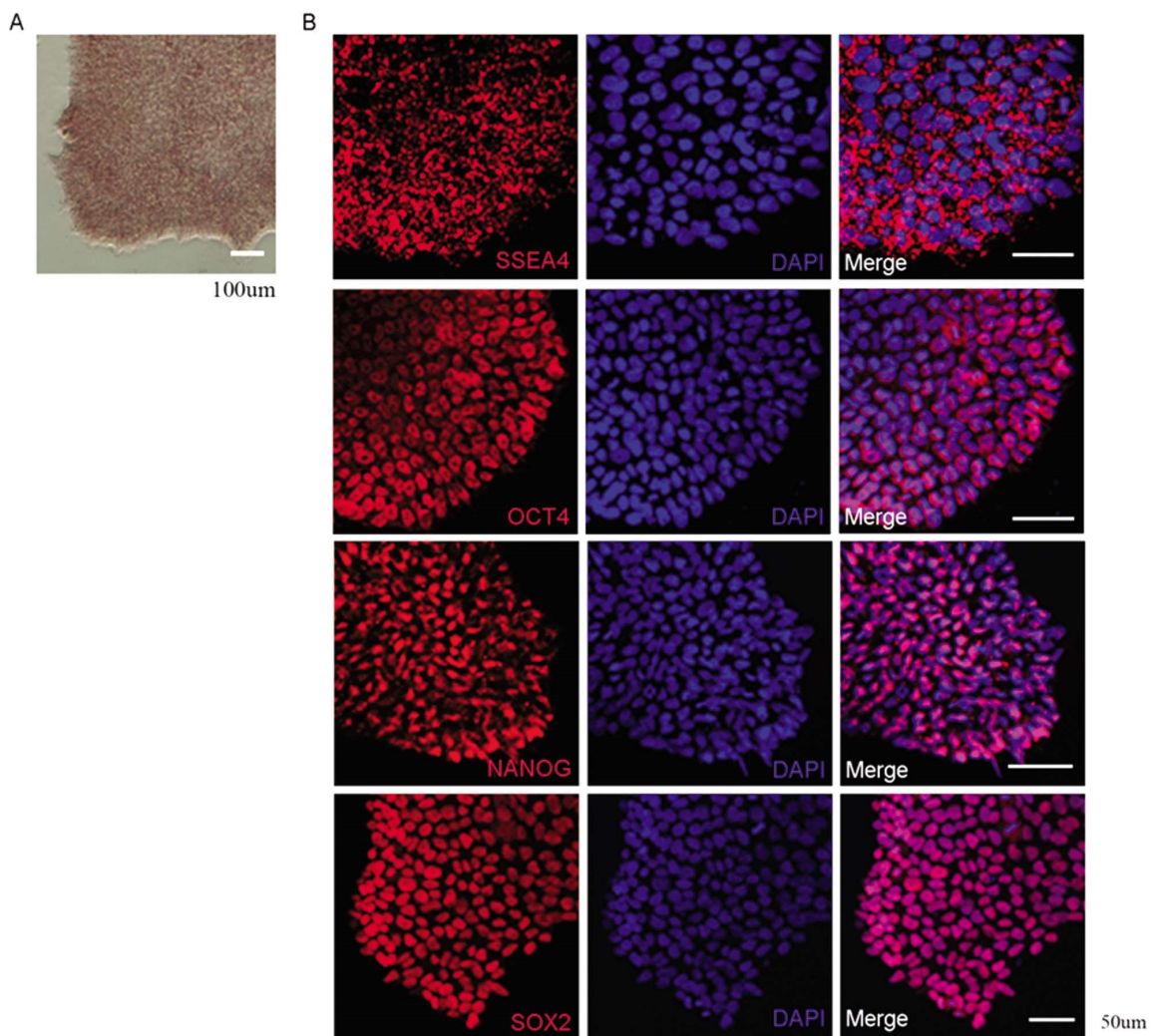


图3 碱性磷酸酶染色(A)和干细胞标志物的免疫染色(B)

Fig. 3 Alkaline phosphatase staining (A) and immunostaining of stem cell markers (B)

胞更容易获得,建立不同 HLA 配型的细胞库的成本也更低^[10]。结合多种细胞和器官的体外分化技术,hiPSC 是解决未来临床问题中细胞来源匮乏的重要途径^[11-15]。在对 hiPSC 的研究中,如何标记活细胞并示踪是研究的重点,目前的方法主要有基因标记法、磁性标记法、5-溴-脱氧尿嘧啶(5-BrdU)标记法、荧光染料标记法等。其中慢病毒载体感染方法简单、快速,在大部分实验室均可以完成,可用于构建稳定表达报告基因的干细胞。但真正应用于临床之前,仍然需要大量的基础研究和动物实验来

验证慢病毒载体感染细胞的安全性和有效性^[16-18]。我们的研究证实采用慢病毒感染可以成功 hiPSC 标记上 GFP,虽然最初感染率相对较低,但通过筛选后具有较高的感染率(97.4%),与常规质粒转染模式有了明显的提高。而转染后的细胞我们通过细胞形态、干细胞相关表达特性和拟胚体的形成进行了检测,结果表明通过感染的细胞在生物学特性上与未感染细胞无明显差异。基于上述特点,本研究为对 MSC 的标记及示踪研究奠定了实验基础。

Figure 4

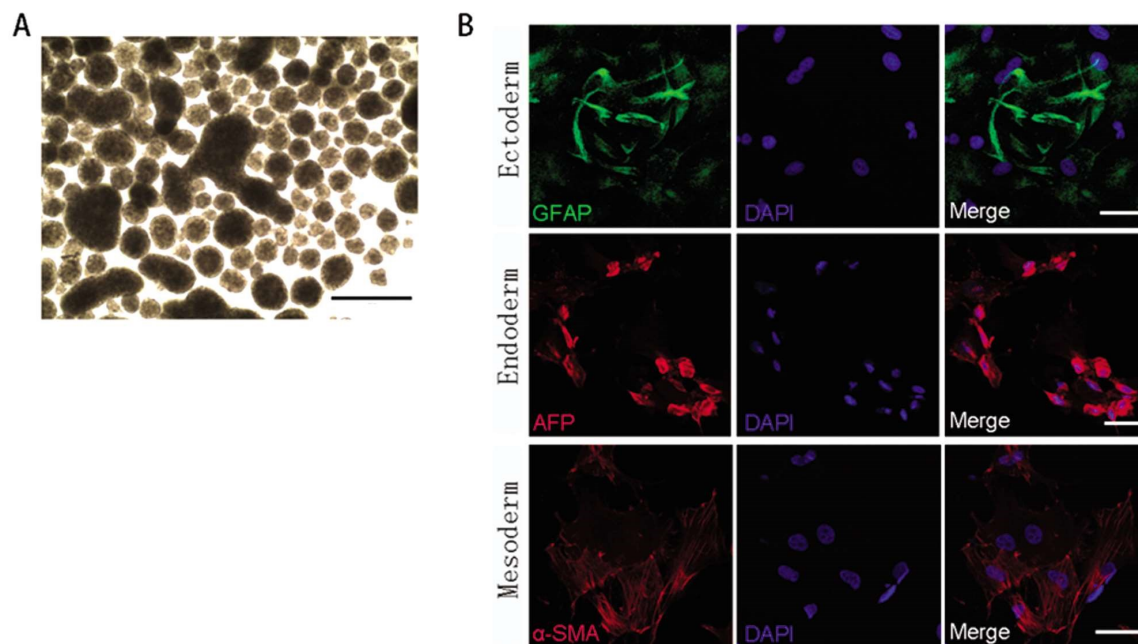


图4 体外拟胚体分化(A)和三胚层标志物的免疫染色(B)

Fig. 4 In vitro embryoid differentiation (A) and immunostaining of three germ layer markers (B)

胚胎干细胞(ESC)和诱导性多能干细胞(iPSC)是最常研究的两类PSC。而iPSC能够被诱导成有功能的成熟细胞,作为细胞疗法的一种原始材料拥有广阔的前景^[19,20]。研究其体内分布、分化及相关机制是其能够应用于临床成为近年来干细胞研究热点之一,而稳定高效标记hiPSC并维持干细胞特性成为研究这一问题的关键^[21]。对于干细胞的特性研究中,我们分别选取干细胞表面标记物OCT4、SOX2,胚胎干细胞标记物SSEA4、胚胎干细胞关键蛋白抗体NANOG作为研究目标。其中OCT4和SOX2转录因子是诱导人类和小鼠多能干细胞的初始因子,SOX2也是维持胚胎干细胞自我更新和多潜能性的必要条件^[22,23]。SSEA-4被认为是特异性胚胎干细胞和卵泡期早期卵裂的标记物,也被视为早期间充质干细胞的标记物。SSEA-4参与干细胞的自我更新,调节胚胎干细胞的多向分化潜能,在胞核和胞质中都有表达^[24]。转录因子NANOG是一种转录调节因子,参与内细胞团和胚胎干细胞的增殖和自我更新,而在分化细胞中不表达^[25]。此外,iPSC通过成年体细胞中的重编程基因如OCT4、SOX2等的异位表达而成,本实验也间接证明通过慢病毒转染技术对iPSC的重编程基因的异位表达无影响^[26]。

iPSC在体外培养条件下能够维持自我更新,并具有向多种细胞类型分化的能力,因此被广泛用于研究细胞分化的分子机理以及药物筛选。其中形成拟胚体是iPSC分化常用的技术手段^[27,28]。我们的实验结果显示,胚胎干细胞在体外长期培养不仅能保持高度未分化状态,体外悬浮培养时,还可形成含内胚层、中胚层、外胚层的拟胚体,能基本上模拟体内的发育过程。通过细胞爬片进行免疫荧光检测,结果证实外胚层标志物GFAP、中胚层标志物 α -SMA、内胚层标志物均在拟胚体中细胞有表达,表明三胚层细胞的存在,细胞互相支持,互相提供分化生长的微环境。

本研究也存在一定的缺陷:我们无法确定慢病毒载体介导的目的基因整合到细胞基因组的具体位点和数量^[29,30]。尽管初步的结果显示,表达报告基因GFP的hiPSC的多能性和分化能力并未受到影响,但其特异性的分化为所有体细胞类型的能力仍需要进行深入的验证。也认识到LV风险评估也应考虑到与转基因相关的危害。

参考文献(References)

- [1] Glicksman MA. Induced Pluripotent Stem Cells: The Most Versatile Source for Stem Cell Therapy[J]. Clin Ther, 2018, 40(7): 1060-1065
- [2] De Vos J, Bouckenheimer J, Sansac C, et al. Human induced pluripotent stem cells: A disruptive innovation [J]. Curr Res Transl Med, 2016, 64(2): 91-96
- [3] Bindhya S, Sidhanth C, Shabna A, et al. Induced pluripotent stem cells: A new strategy to model human cancer [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2019, 107: 62-68
- [4] Baghbaderani BA, Syama A, Sivapatham R, et al. Detailed Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cells Manufactured for Therapeutic Applications [J]. Stem Cell Rev Rep, 2016, 12 (4): 394-420
- [5] Wang M, Zhang L, Gage FH. Modeling neuropsychiatric disorders using human induced pluripotent stem cells [J]. Protein Cell, 2020, 11 (1): 45-59
- [6] Porciuncula A, Kumar A, Rodriguez S, et al. Pancreatic differentiation of Pdx1-GFP reporter mouse induced pluripotent stem cells[J]. Differentiation, 2016, 92(5): 249-256
- [7] Benskey MJ, Manfredsson FP. Lentivirus Production and Purification [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1382: 107-114
- [8] Hosoyama T. Possible application of muscle specific conditional mouse-derived induced pluripotent stem cells for muscle research[J]. Biochem Biophys Rep, 2020, 21: 100744
- [9] Dulak J, Szade K, Szade A, et al. Adult stem cells: hopes and hypes of

- regenerative medicine[J]. *Acta Biochim Pol*, 2015, 62(3): 329-337
- [10] Säljö K, Barone A, Mölne J, et al. HLA and Histo-Blood Group Antigen Expression in Human Pluripotent Stem Cells and their Derivatives[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13072
- [11] Fujii S, Yoshida S, Inagaki E, et al. Immunological Properties of Neural Crest Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(1): 28-43
- [12] Mora C, Serzanti M, Consiglio A, et al. Clinical potentials of human pluripotent stem cells[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2017, 33(4): 351-360
- [13] Shahjalal HM, Abdal Dayem A, Lim KM, et al. Generation of pancreatic beta cells for treatment of diabetes: advances and challenges [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 355
- [14] Päch G, Perakakis N, Mantzoros CS, et al. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus - Focus on mesenchymal stem cells [J]. *Metabolism*, 2019, 90: 1-15
- [15] Ilic D, Ogilvie C. Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going?[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(1): 17-25
- [16] Halevy T, Urbach A. Comparing ESC and iPSC-Based Models for Human Genetic Disorders[J]. *J Clin Med*, 2014, 3(4): 1146-1162
- [17] De Filippis L, Zalfa C, Ferrari D. Neural Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells to Model Rare CNS Diseases [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017, 16(8): 915-926
- [18] Geis FK, Galla M, Hoffmann D, et al. Potent and reversible lentiviral vector restriction in murine induced pluripotent stem cells[J]. *Retrovirology*, 2017, 14(1): 34
- [19] Ouyang X, Telli ML, Wu JC. Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cancer Vaccines[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1510
- [20] Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy[J]. *Nature*, 2012, 481: 295-305
- [21] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells [J]. *RNA*, 2003, 9: 493-501
- [22] Rizzino A, Wuebben EL. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(6): 780-791
- [23] Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, et al. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 79-114
- [24] Trusler O, Huang Z, Goodwin J, et al. Cell surface markers for the identification and study of human naive pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Res*, 2018, 26: 36-43
- [25] Malecki M, Anderson M, Beauchaine M, et al. TRA-1-60 (+), SSEA-4(+), Oct4A(+), Nanog(+) Clones of Pluripotent Stem Cells in the Embryonal Carcinomas of the Ovaries [J]. *J Stem Cell Res Ther*, 2012, 2(5): 130
- [26] Xu J, Yu L, Guo J, et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells using an extended pluripotent stem cell culture system [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 193
- [27] Zeevaert K, Elsafi Mabrouk MH, Wagner W, et al. Cell Mechanics in Embryoid Bodies[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2270
- [28] Pettinato G, Wen X, Zhang N. Engineering Strategies for the Formation of Embryoid Bodies from Human Pluripotent Stem Cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(14): 1595-609
- [29] Schroder ARW, Shinn P, Chen HM, et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots [J]. *Cell*, 2002, 110: 521-529
- [30] Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder ARW, et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences [J]. *Plos Biology*, 2004, 2: 1127-1137

(上接第 2252 页)

- [33] Hag ä u N, Wen X, Li S, et al. Time-dependent effects of histone deacetylase inhibition in sepsis-associated acute kidney injury [J]. *J Clin Med*, 2020, 8(1): 9-18
- [34] 邓龙天, 余灿. 脓毒症患者并发急性肾损伤危险因素分析[J]. *现代医药卫生*, 2020, 36(10): 1481-1484
- [35] Nandagopal N, Reddy PK, Ranganathan L, et al. Comparison of Epidemiology and Outcomes of Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients with and without Sepsis[J]. *J Clin Med*, 2020, 24(4): 258-262
- [36] Tang W, Huang J, Huang X, et al. Effect of alkaline phosphatase on sepsis-associated acute kidney injury patients: A systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (4): 18788-18792
- [37] Zhang CF, Wang HJ, Tong ZH, et al. The diagnostic and prognostic values of serum and urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in sepsis induced acute renal injury patients[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(10): 5604-5617