

细胞接种密度对小鼠 iPS 细胞 诱导效率的影响

汪凌波 蒋 婧 吕纹简 张 璇 李劲松*

(中国科学院 上海生命科学研究院 生物化学与细胞生物学研究所 分子细胞生物学重点实验室 上海 200031)

摘要: 为研究小鼠胚胎成纤维细胞的接种密度对 iPS (induced pluripotent stem, iPS) 细胞诱导效率的影响, 采用逆转录病毒载体法将 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, ρ -*Myc* 4 个基因或者 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 3 个基因转入到携带有 *Oct4*-EGFP 转基因的小鼠胚胎成纤维细胞 (*Oct4*-EGFP mouse embryonic fibroblasts, *Oct4*-EGFP MEF) 中。感染病毒后的第 4 天将 *Oct4*-EGFP MEF 以 500~128 000 个/孔 (每孔面积 9.6 cm²) 进行梯度铺盘, 并分别于病毒感染后的第 12 天和第 16 天对 4 因子组和 3 因子组进行碱性磷酸酶染色和 *Oct4*-EGFP 阳性细胞比例检测。结果表明, *Oct4*-EGFP MEF 感染病毒后的接种密度对于 iPS 细胞诱导效率存在较大的影响。4 因子和 3 因子诱导产生 iPS 细胞的最佳接种密度分别为 8 000 个/孔和 32 000 个/孔。此外, 通过逆转录病毒法, 在最佳的接种密度下, 可顺利地建立起 iPS 细胞系。

关键词: 体细胞重编程; 胚胎干细胞; 逆转录病毒; 诱导多能干细胞

中图分类号: Q954.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)05-0868-08

The Effect of Mouse Cell Seeding Density on the Efficiency of iPS Cell Derivation

WANG Ling-bo, JIANG Jing, LV Wen-jian, ZHANG Xuan, LI Jing-song*

(Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: In order to investigate the effect of mouse cell seeding density on the efficiency of iPS cell derivation, the authors infected the mouse embryonic fibroblasts (MEFs) containing *Oct4*-EGFP transgene (*Oct4*-EGFP MEF) with retrovirus carrying four or three transcription factors. Virus-infected *Oct4*-EGFP MEFs were seeded at densities varying from 500~128 000 cells/9.6 cm² at four days post infection. AP staining and flow cytometric analysis were carried out at 12 days post infection when four factors were used and 16 days post infection when three factors were used to evaluate the reprogramming efficiency. The results showed that the cell seeding density could influence the reprogramming efficiency. And the authors found that the optimal cell

收稿日期: 2010-09-22

基金项目: 国家科技部项目(2009CB941100) 和上海市科委项目(08DJ1400500)

作者简介: 汪凌波, 主要从事细胞生物学研究。

* 通讯作者: 李劲松(1971—) 男, 研究员, 博士生导师。1993 年本科毕业于江西农业大学畜牧兽医系, 1996 年在扬州大学畜牧兽医学院获得硕士学位并留校任教。1997—1999 年在中科院动物研究所生殖生物学国家重点实验室从事客座研究。2002 年在中科院动物研究所获得博士学位后赴美, 在纽约的洛克菲勒大学从事博士后研究。2007 年被聘为中科院上海生科院生物化学与细胞生物学研究所研究组长。一直从事体细胞重编程机制及应用研究, 在攻读博士学位期间率队获得了国内第一批体细胞克隆牛, 并于 2006 年以第四完成人的身份获得国家自然科学二等奖。在博士后期间, 获得 2007 年美国生殖年会的 USDA-CSREES-NATIONAL RESEARCH INITIATIVE MERIT AWARDS。2007 年 8 月回国后, 继续从事体细胞重编程机制及应用的研究。E-mail: jsli@sibs.ac.cn。

seeding density for generating iPS cells was 8 000 cells/9.6 cm² when four factors were used while the optimal cell seeding density was 32 000 cells/9.6 cm² when three factors were used. Moreover, through the retrovirus-mediated mouse iPS cell derivation system, iPS cell lines at the optimal cell seeding densities were successfully established.

Key words: somatic reprogramming; embryonic stem cells; retrovirus; induced pluripotent stem cells (iPSCs)

体细胞重编程(somatic reprogramming)是指分化的体细胞在特定的条件下被逆转后恢复到多能性或全能性状态,或者形成多能干细胞系,或者形成早期胚胎然后发育成一个新的个体的过程^[1]。2006年,日本科学家 Shinya Yamanaka 从 24 个转录因子中筛选到了 4 个转录因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc,利用病毒载体将这 4 个转录因子转入小鼠胚胎成纤维细胞中,可以使其重编程为胚胎干细胞样的多潜能细胞,称之为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells),即 iPS 细胞^[2]。随后,一系列的研究优化了这一诱导技术,并证明 iPS 细胞与胚胎干细胞(embryonic stem cell,ES 细胞)非常的相似^[3-5]。Zhao 等^[6]和 Kang 等^[7]则进一步地通过四倍体囊胚注射实验证明 iPS 细胞具有与 ES 细胞完全相同的多能性。除小鼠之外,人^[8-11]、大鼠^[12]、猪^[13-14]、猴^[15]的体细胞都被成功重编程为 iPS 细胞。更令人振奋的是,疾病特异性 iPS 细胞亦成功获得^[16-19]。

将成熟体细胞诱导产生 iPS 细胞有着巨大的临床应用前景,特别是在体外疾病模型、药物筛选、细胞替代治疗等方面潜力巨大^[20]。iPS 技术的出现为获取多能干细胞和研究体细胞重编程机制提供了一种新的方法,并且由于该技术不需破坏人类胚胎,从而避开了人胚胎干细胞研究中存在的伦理问题,为后续的 iPS 细胞形成机制和体细胞重编程机制的研究奠定了基础。鉴于 iPS 细胞的巨大应用前景,如何高效稳定地获得 iPS 细胞显得尤为重要。本实验以接种密度为切入点对逆转录病毒介导的 iPS 细胞诱导系统进行条件优化,力求为后续稳定地获得 iPS 细胞提供保障。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 携带有 Oct4-EGFP 转基因的小鼠,购自南京大学。

1.1.2 细胞株、质粒与宿主菌 质粒 pMXs-GFP、pMXs-Oct4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4 和 pMXs-c-Myc 购自 Addgene; Plat-E 细胞、E14 细胞和菌株 DH5 α 由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 2 \times Taq PCR MasterMix 购自 Tiangen 公司; TRIzol total RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司; First Strand cDNA Synthesis Kit-ReverTra Ace- α -TM 购自 TOYOBO 公司; FuGENE 6 Transfection Reagent、NBT/BCIP Stock Solution 购自 Roche 公司; DMEM、胰酶购自 Gibco 公司; Nonessential Amino Acid(NEAA)、Penicillin/Streptomycin(P/S)、Nucleosides、L-glutamine、 β -Mercaptoethanol 购自 Millipore 公司; FBS 购自 Hyclone 公司; LIF 购自 Chemicon 公司。

1.1.4 主要仪器和设备 PCR 仪(Eppendorf)、高速台式低温离心机(Eppendorf)、湿度 CO₂ 细胞培养箱(Thermo)、荧光显微镜(Olympus)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养基的制备 MEF 培养基按照 88% DMEM、10% FBS、1% P/S、1% NEAA 的量进行混合,用 0.22 μ m 滤膜过滤后于 4 $^{\circ}$ C 保存; ES 细胞培养基按照 80% DMEM、15% FBS、1% L-glutamine、1% NEAA、1% β -Mercaptoethanol、1% P/S、1% Nucleosides、1 000 unit/mL LIF 的量进行混合,用 0.22 μ m 滤膜过滤后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 Oct4-EGFP MEF 的制备 处死妊娠 13.5 d 的携带有 Oct4-EGFP 转基因的母鼠,用无菌手术器械剖腹取出胚胎,用 PBS 冲洗。去除胚胎的头部、尾部、内脏及四肢。躯干部分用 PBS 冲洗干净。将组织块剪碎,移入 50 mL 离心管中,加入 0.125% 胰酶于 37 $^{\circ}$ C 消化 20 min,直到出现大量单细胞,加入 MEF 培养基终止,吹打后制成细胞悬液。将细胞悬液转入 100 mm 培养皿中,补加适量 MEF 培养基。来回晃动培养皿后,置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱培养。待细胞长满时将其冻存。

1.2.3 MEF 饲养层细胞的制备 处理方法大致同 1.2.2,只是所用的小鼠并非为转基因鼠。MEF 经 γ 射线照射灭活后作为饲养层细胞使用。

1.2.4 接种密度对于 iPS 细胞诱导效率的影响 将质粒(pMXs - GFP , pMXs - Oct4 , pMXs - Sox2 , pMXs - Klf4 , pMXs - c - Myc) 分别通过 FuGENE 6 Transfection Reagent 转染 Plat - E 细胞 , 次日换液 , 并于 48 h 后收取逆转录病毒液 , 经 0.45 μm 滤膜过滤后待用 , 对应的 5 种病毒液分别记为 G , O , S , K , M 。 对于 4 因子诱导产生 iPS 细胞而言 , O , S , K , M 以 1:1:1:1 比例感染 Oct4 - EGFP MEF ; 对于 3 因子诱导产生 iPS 细胞而言 , O , S , K 以 1:1:1 比例感染 Oct4 - EGFP MEF 。 而后加入 polybrene (终浓度 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 。 Oct4 - EGFP MEF 细胞感染病毒液 G 作为 iPS 细胞诱导的对照组 , 并用于感染效率的检测。感染后第 4 天 , 将细胞用胰酶消化 , 计数后分别按以下梯度铺至培养有 MEF 饲养层细胞的 6 孔板 : 500 个/孔、2 000 个/孔、8 000 个/孔、32 000 个/孔、128 000 个/孔 (每孔面积为 9.6 cm^2) , 剩余的一孔用于检测 iPS 细胞诱导效率前 2 天接种未感染病毒的 Oct4 - EGFP MEF 作为对照。Oct4 - EGFP MEF 铺至饲养层细胞上之后每天更换 ES 培养基。分别在感染后第 12 天和第 16 天对 4 因子组和 3 因子组进行 iPS 细胞诱导效率检测 (碱性磷酸酶染色和流式细胞仪检测) 并确定最佳接种密度。其中碱性磷酸酶染色采用 NBT/BCIP Stock Solution 进行。

1.2.5 iPS 细胞系的初步鉴定 在最佳接种密度的条件下 , 从诱导产生的 iPS 克隆中选取 Oct4 - EGFP 阳性克隆进行扩大培养 , 建立起 iPS 细胞系 , 并对 iPS 细胞系进行鉴定。鉴定主要包括如下四方面 : (1) 用荧光显微镜检测 iPS 细胞系的 Oct4 - EGFP 表达情况 ; (2) 用碱性磷酸酶染色检测 iPS 细胞系是否处于未分化状态 ; (3) 用 RT - PCR 检测 iPS 细胞中 ES 细胞标志性基因的表达情况。RT - PCR 方法 : 用 TRIzol total RNA 抽提试剂抽提总 RNA , 而后用 First Strand cDNA Synthesis Kit - ReverTra Ace - α - TM 反转录成 cDNA , 最后用 2 \times Taq PCR MasterMix 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序 : 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min ; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 sec , 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 sec , 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min , 循环扩增 30 次 , 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min 。 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳 ; (4) 用 RT - PCR 检测 iPS 细胞中外源基因的表达情况。



A: Plat - E 细胞形态 , 标尺为 100 μm ; B: Oct4 - EGFP MEF 细胞形态 , 标尺为 200 μm ; C: ES 细胞形态 , 标尺为 200 μm 。

A: Morphology of Plat - E cells , scale bar = 100 μm ; B: Morphology of Oct4 - EGFP MEF , scale bar = 200 μm ; C: Morphology of E14 cells , scale bar = 200 μm 。

图 1 Plat - E , Oct4 - EGFP MEF 和 E14 细胞形态

Fig. 1 Morphology of Plat - E , Oct4 - EGFP MEF and E14 cells

2 结 果

2.1 相关细胞的培养

本实验培养的相关细胞主要有 : Plat - E 细胞 , Oct4 - EGFP MEF , E14 细胞 (标准的小鼠胚胎干细胞系) 。 其中 E14 细胞需培养在 MEF 饲养层细胞上 , 并使用 ES 细胞培养基培养。培养的细胞如图 1 所示。

2.2 转染效率和感染效率检测

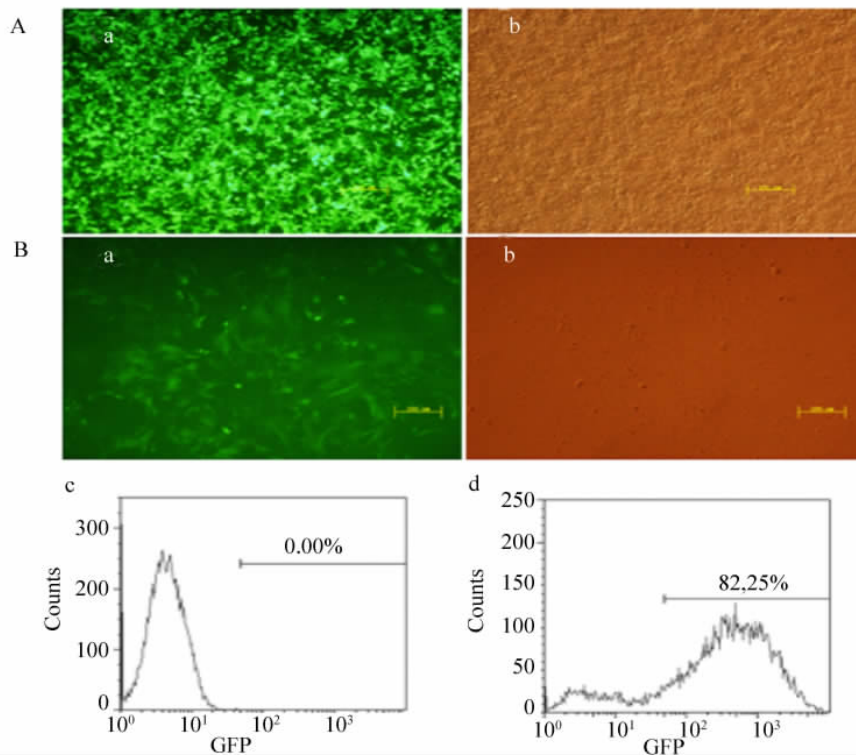
本实验采用 Plat - E 细胞来包装并生产出包含有外源基因的逆转录病毒。

在转染后 48 h , 利用荧光显微镜检测 GFP 表达 , 以评估病毒包装和生产的质量。结果如图 2A , 估计转染效率 (transfection efficiency) 约为 90% 。

Oct4 - EGFP MEF 感染带有 GFP 的 cDNA 的逆转录病毒 72 h 后 , 采用荧光显微镜定性检测和流式细胞仪定量检测感染效率 (infection efficiency) 。 荧光显微镜定性检测结果显示 80% ~ 90% 的 Oct4 - EGFP MEF 感染了逆转录病毒 (图 2B a ~ b) ; 流式细胞仪定量检测结果显示 感染效率为 82.25% (图 2B c ~ d) 。

2.3 Oct4 - EGFP MEF 感染病毒后的接种密度对于 iPS 细胞诱导效率的影响

2.3.1 Oct4 - EGFP MEF 转入 4 因子 (OSKM) 后接种密度对于 iPS 细胞诱导效率的影响 Oct4 - EGFP



A: 荧光显微镜检测转染效率。a: 荧光照片, b: 正常视野照片, 标尺为 200 μm 。B: Oct4 - EGFP MEF 感染病毒 72 h 后, 荧光显微镜和流式细胞仪检测感染效率。a: 荧光照片, b: 正常视野照片, 标尺为 200 μm 。c: 未感染病毒的 Oct4 - EGFP MEF (对照组), d: 感染病毒 72 h 后的 Oct4 - EGFP MEF。

A: Transfection efficiency was detected by fluorescence microscope. a: dark field, b: bright field, scale bar = 200 μm ; B: Infection efficiency was detected by fluorescence microscope and a flow cytometry 72 h after Oct4 - EGFP MEF was infected by retrovirus containing the cDNA of GFP. a: dark field, b: bright field, scale bars = 200 μm . c: Oct4 - EGFP MEF (control), d: Oct4 - EGFP MEF 72 h after infection.

图 2 转染效率和感染效率检测结果

Fig. 2 Transfection efficiency and infection efficiency of Plat - E cells and MEF

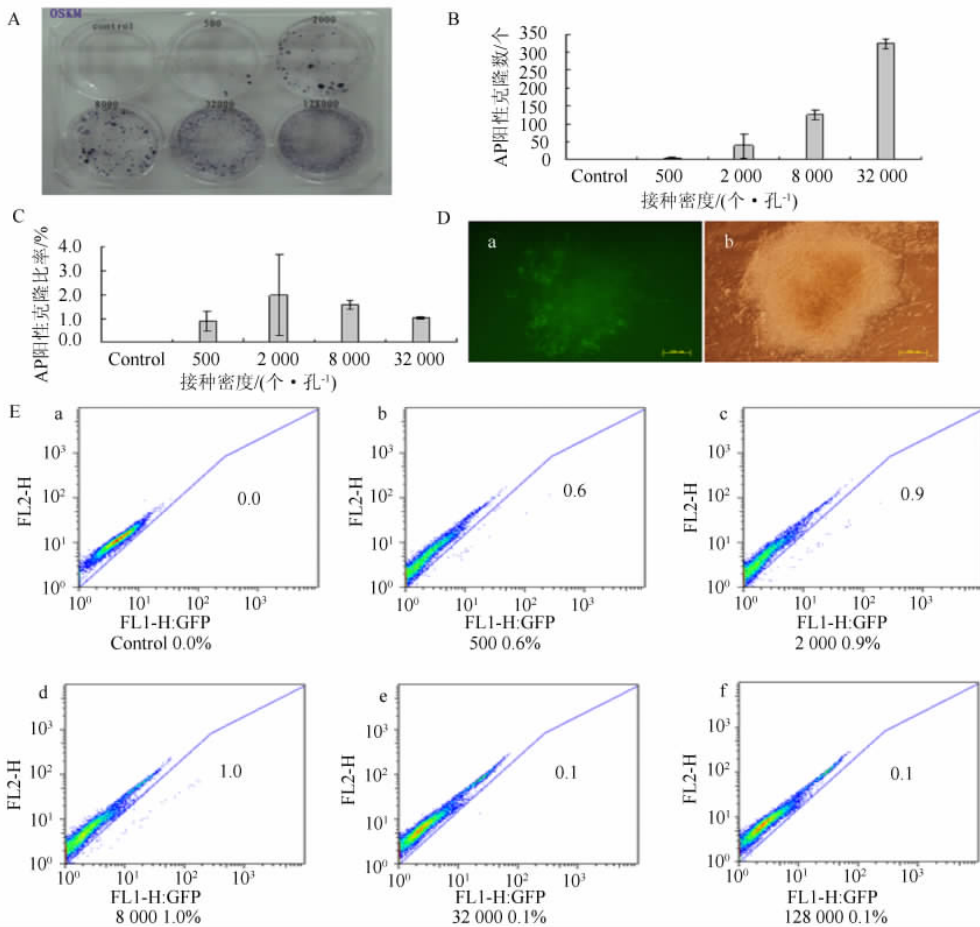
MEF 感染病毒后第 12 天对 4 因子 (OSKM) 诱导组的 4 个 6 孔板进行处理: 3 个 6 孔板用于碱性磷酸酶染色 (AP 染色), 1 个 6 孔板用流式细胞仪检测 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例。AP 阳性克隆比率越高, Oct4 - EGFP 阳性细胞比例越高, 则表示 iPS 细胞诱导效率越高。

图 3A 显示, 接种 128 000 个/孔细胞出现的 AP 阳性克隆数目很多, 而且克隆间彼此粘连, 难以区分单个克隆, 因此在处理 AP 染色数据时并未对接种 128 000 个/孔进行统计。但这并不影响流式细胞仪检测 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例, 因此流式细胞仪检测时依然对这个接种密度的孔进行分析。

根据 AP 染色结果, 可得不同接种密度下的 AP 阳性克隆个数 (图 3B)。将 AP 阳性克隆的个数除以原始接种的 Oct4 - EGFP MEF 细胞数目, 可以得到不同接种密度下的 AP 阳性克隆比率 (图 3C)。对于四因子诱导产生 iPS 细胞, AP 阳性克隆的数目随着接种密度的增加而增加, 对照组 (未感染病毒的 Oct4 - EGFP MEF) 则没有出现克隆 (图 3A ~ B)。AP 阳性克隆的比率随着接种密度的增加呈现出先增加后降低的变化趋势, 在接种密度为 2 000 个/孔时达到最大, 为 $1.97\% \pm 1.69\%$ 。然而在此接种密度下, AP 阳性克隆出现的个数稳定性很差, 其相应的 AP 阳性克隆比率数值的稳定性也很差。而在 8 000 个/孔接种密度下, AP 阳性克隆比率为 $1.58\% \pm 0.17\%$, 仅次于 2 000 个/孔对应的 AP 阳性克隆比率, 且此接种密度时稳定性比 2 000 个/孔好。综合考虑诱导效率和稳定性, 对于 4 因子诱导产生 iPS 细胞, 接种密度 8 000 个/孔为佳。

从流式细胞仪检测结果 (图 3E) 显示, 接种密度为 500 个/孔、2 000 个/孔、8 000 个/孔、32 000 个/孔、128 000 个/孔时, 其 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例分别为 0.6%、0.9%、1.0%、0.1%、0.1%。8 000 个/孔接种密度时 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例达到最高, 为 1.0%, 即此接种密度时 iPS 细胞诱导效率最高。

综合考虑 AP 染色和流式细胞仪检测结果, 确定 8 000 个/孔为 4 因子 (OSKM) 诱导产生 iPS 细胞的



A: 不同接种密度下所形成的 AP 阳性克隆; B: 细胞接种密度对 AP 阳性克隆数的影响 $n = 3$; C: 细胞接种密度对 AP 阳性克隆比率的影响 $n = 3$; D: 4 因子诱导形成的 EGFP 阳性克隆; E: 细胞接种密度对 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例的影响。

A: AP positive iPS clones at various seeding densities; B: The effect of the cell seeding density on the number of AP positive clones $n = 3$; C: The effect of the cell seeding density on the ratio of AP positive clones $n = 3$; D: GFP positive clone induced by four factors; E: The effect of the cell seeding density on the ratio of Oct4 - EGFP positive cells.

图 3 Oct4 - EGFP MEF 感染病毒后接种密度对于 iPS 细胞诱导效率的影响(4 因子组)

Fig. 3 The effect of the cell seeding density on the derivation efficiency of iPS cells (four factors)

最佳接种密度。

2.3.2 Oct4 - EGFP MEF 细胞转入 3 因子(OSK) 后接种密度对于 iPS 细胞诱导效率的影响 Oct4 - EGFP MEF 感染病毒后的第 16 天对 3 因子(OSK) 组的 6 孔板进行类似 2.3.1 的处理。同样地, 由于接种 128 000 个/孔细胞的孔出现的 AP 阳性克隆数目很多, 且克隆间彼此粘连, 因此在处理 AP 染色数据时也未对其进行统计。

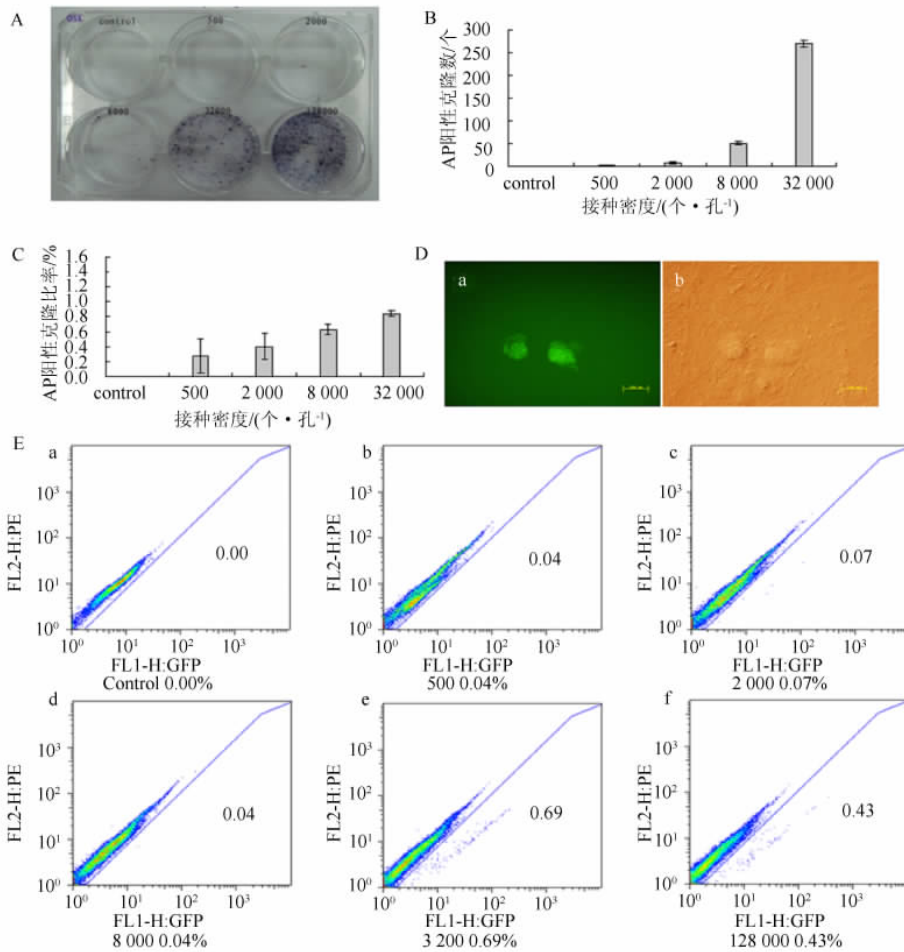
对于 3 因子诱导产生 iPS 细胞来说, AP 阳性克隆的数目随着接种密度的增加而增加(图 4B) , AP 阳性克隆比率随着接种密度从 500 个/孔到 32 000 个/孔的变化呈现增加趋势(图 4C) , 在接种密度为 32 000 个/孔时 AP 阳性克隆比率达到最大, 为 $0.84\% \pm 0.03\%$ 。

流式细胞仪检测 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例结果显示, 接种密度为 500 个/孔、2 000 个/孔、8 000 个孔、32 000 个/孔、128 000 个/孔时, 其 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例分别为 0.04%、0.07%、0.04%、0.69%、0.43%(图 4E) 。32 000 个/孔接种密度时出现的 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例最高, 为 0.69% , 即此接种密度时 iPS 细胞诱导效率最高。

综合考虑 AP 染色和流式细胞仪检测结果, 确定 32 000 个/孔为 3 因子(OSK) 诱导产生 iPS 细胞的最佳接种密度。

2.4 iPS 细胞系初步鉴定

2.4.1 绿色荧光蛋白表达检测 用荧光显微镜对所建立的 iPS 细胞系进行 GFP 表达检测。4 因子诱



A: 不同接种密度下所形成的 AP 阳性克隆; B: 细胞接种密度对 AP 阳性克隆数的影响 $n = 3$; C: 细胞接种密度对 AP 阳性克隆比率的影响 $n = 3$; D: 3 因子诱导形成的 EGFP 阳性克隆; E: 细胞接种密度对 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例的影响。

A: AP positive iPS clones at various seeding densities; B: The effect of the cell seeding density on the number of AP positive clones $n = 3$; C: The effect of the cell seeding density on the ratio of AP positive clones $n = 3$; D: GFP positive clones induced by three factors; E: The effect of the cell seeding density on the ratio of Oct4 - EGFP positive cells.

图 4 Oct4 - EGFP MEF 感染病毒后接种密度对于 iPS 细胞诱导效率的影响(3 因子组)

Fig. 4 The effect of the cell seeding density on the derivation efficiency of iPS cells (three factors)

导建立的细胞系 iPS OSKM - 1 和 3 因子诱导建立的细胞系 iPS OSK - 1 均可在体外长期培养, 并均能表达 GFP(图 5A), 说明它们可以长期保持未分化状态。此外, 这些 iPS 细胞呈克隆状生长, 克隆内部细胞均质, 单个细胞核质比高, 克隆形态和胚胎干细胞相似。

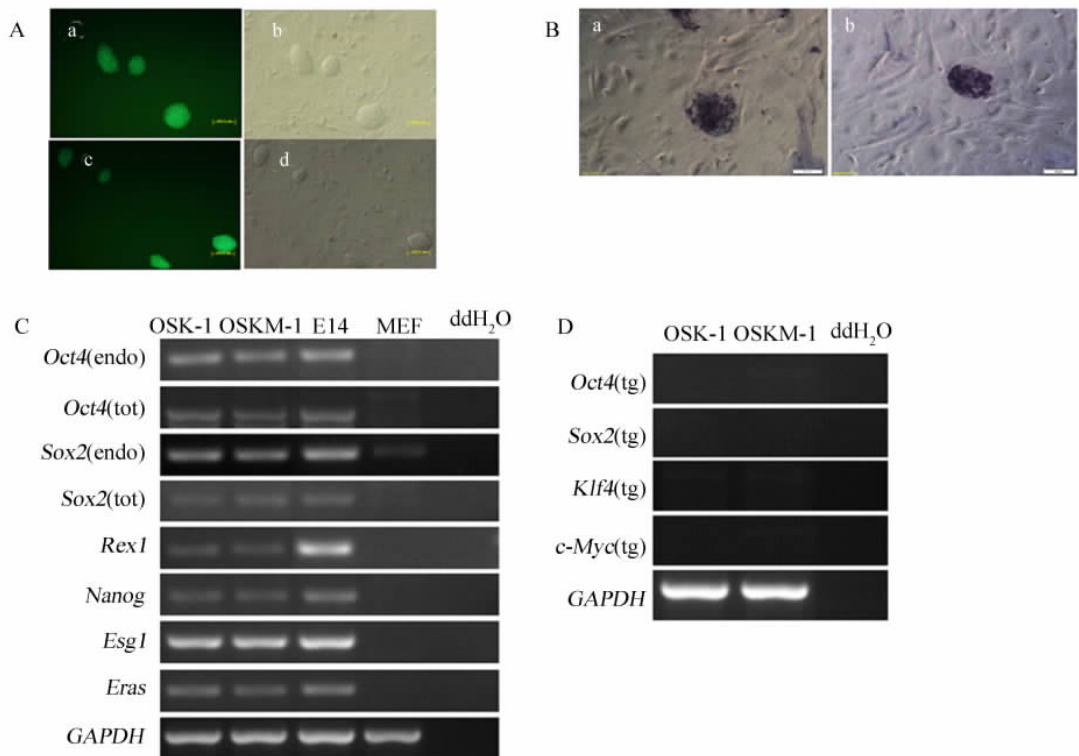
2.4.2 碱性磷酸酶染色鉴定 小鼠 ES 细胞和 EG 细胞都表达碱性磷酸酶(AP) 的活性, 除牛的 ES 细胞不表达 AP 的活性外^[21], 其它动物和人的 ES 细胞都表达 AP 的活性^[22], 分化的 ES 细胞和分化的 EG 细胞不表达, 所以 AP 的活性可作为鉴定 ES 细胞是否分化的一个标志。本文采用 AP 染色法对 iPS 细胞系 iPS OSKM - 1 和 iPS OSK - 1 进行鉴定, 结果显示几乎整个 iPS 集落都呈现很强的碱性磷酸酶活性, 具备 ES 细胞的多能性特征(图 5B), 证明 iPS OSKM - 1 和 iPS OSK - 1 处于未分化状态。

2.4.3 iPS 细胞中 ES 细胞标志性基因表达情况的检测 在分子水平上, iPS 细胞中导入的外源基因表达水平会随着重编程的完成逐渐降低或沉默, 内源的多能性基因表达则激活。本文通过 RT - PCR 的方法对获得的 iPS 细胞进行 ES 细胞标志性基因表达检测, 并与 E14 细胞以及未感染病毒的 Oct4 - EGFP MEF 细胞进行对比分析。RT - PCR 结果表明, iPS OSKM - 1 和 iPS OSK - 1 均表达 ES 细胞标志性基因, 未感染的 Oct4 - EGFP MEF 细胞则不表达这些基因(图 5C)。

2.4.4 iPS 细胞中外源基因表达检测 本文通过 RT - PCR 的方法对 iPS 细胞中的外源基因表达进行检测。结果表明, 在 iPS 细胞系 iPS OSK - 1 和 iPS OSKM - 1 中, 转入的外源基因都发生了沉默(图 5D)。

3 讨论

本实验以接种密度对 iPS 细胞诱导效率的影响为切入点对逆转录病毒介导的 iPS 细胞诱导系统进



A: iPS 细胞中 GFP 表达检测; a, b: 4 因子诱导建立的 iPS OSKM - 1; c, d: 3 因子诱导建立的 iPS OSK - 1; 标尺为 100 μm ; B: iPS 细胞系碱性磷酸酶染色鉴定; a: iPS OSKM - 1; b: iPS OSK - 1; 标尺为 50 μm 。 C: iPS 细胞中 ES 细胞标志性基因的表达情况; endo: 内源的; tot: 总, 即内源和外源。 D: iPS 细胞中外源基因的表达情况; tg: 外源。

A: The expression of GFP in iPS cells. a, b: iPS OSKM - 1 induced by four factors; c, d: iPS OSK - 1 induced by three factors. Scale bars = 100 μm . B: AP staining of iPS cell lines. a: iPS OSKM - 1; b: iPS OSK - 1; Scale bars = 50 μm . C: The expression patterns of ES cell marker genes in iPS cells. endo: endogenous; tot: total. D: The expression of transgenes in iPS cells. tg: transgenic.

图 5 iPS 细胞系的鉴定

Fig. 5 The characterization of iPS cell lines

行了条件优化, 现从以下四方面对本实验进行讨论。

(1) 研究材料的选择。为了快速方便地检测 MEF 细胞是否发生重编程, 本实验使用携带有 Oct4 - EGFP 转基因的母鼠来制备 MEF 细胞 (Oct4 - EGFP MEF 细胞)。Oct4 是 ES 细胞的标志性基因, 因此, 当观察到绿色荧光时就预示着调控 EGFP 表达的 Oct3/4 启动子有活性, 表明 Oct4 - EGFP MEF 细胞发生重编程。

(2) iPS 细胞诱导效率衡量指标的选择。准确地评估重编程效率, 对于各批次实验, 特别是对于操作程序的优化和各种细胞类型的重编程探索, 都是非常重要的^[20]。我们同时采用 AP 阳性克隆比率和 Oct4 - EGFP 阳性细胞比例两个指标衡量 iPS 细胞诱导效率, 通过研究小鼠胚胎成纤维细胞感染病毒后的接种密度对于 iPS 细胞诱导效率的影响, 确定了 4 因子和 3 因子诱导产生 iPS 细胞的最佳接种密度分别为 8 000 个/孔和 32 000 个/孔。

2008 年 Wernig 等^[23] 曾用二次重编程系统 (secondary reprogramming system) 研究了细胞接种密度与 GFP 阳性克隆数目的关系, 结果表明, 过高或者过低的接种密度都会阻碍 GFP 阳性克隆的形成。与 Wernig 等的研究不同的是, 我们同时选用了“AP 阳性克隆比率”和“Oct4 - EGFP 阳性细胞比例”两个指标, 而不是 Wernig 等的“GFP 阳性克隆数目”单一指标。双指标同时衡量可以减少误差, 更能反映实际情况。此外, 本实验采用的是逆转录病毒诱导系统, 这有别于 Wernig 等采用的二次重编程系统。

(3) 最佳接种密度下 iPS 细胞系的建立。利用 Oct4 - EGFP MEF 细胞, 本实验在最佳接种密度下成功地获得了 iPS 克隆, 经过挑选和扩大培养, 建立起了 iPS 细胞系, 最后还对 iPS 细胞系进行了初步的鉴定。结果表明, 在最佳接种密度下, 可以分别顺利地建立起 4 因子和 3 因子诱导的 iPS 细胞系。这些细胞系如 iPS OSKM - 1 和 iPS OSK - 1 均可持续表达 GFP, 且 AP 染色阳性, 可表达 ES 细胞标志性基因,

另外, 细胞中外源基因的表达得到了沉默。

(4) 意义。本实验通过研究 Oct4 - EGFP MEF 细胞感染病毒后的接种密度对于 iPS 细胞诱导效率的影响, 分别确定了 4 因子和 3 因子诱导产生 iPS 细胞的最佳细胞接种密度, 为后续稳定地获得 iPS 细胞提供了保障。在最佳接种密度下, 本实验分别顺利地建立起了 4 因子和 3 因子诱导的 iPS 细胞系, 为后续的 iPS 细胞形成机制和体细胞重编程机制等研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 蒋婧, 李劲松. 核移植与诱导多能干细胞技术在体细胞重编程研究中的应用[J]. 生命科学, 2009, 21(5): 608 - 613.
- [2] 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.
- [3] Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(1): 55 - 70.
- [4] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline - competent induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2007, 448(7151): 313 - 317.
- [5] Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES - cell - like state[J]. Nature, 2007, 448(7151): 318 - 312.
- [6] Zhao X Y, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation[J]. Nature, 2009, 461(7260): 86 - 88.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Yu J, Vodyanik M A, Smuga - Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858): 1917 - 1920.
- [10] Park I H, Zhao R, West J A, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. Nature, 2008, 451(7175): 141 - 146.
- [11] Lowry W E, Richter L, Yachechko R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(8): 2883 - 2888.
- [12] Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(1): 16 - 19.
- [13] Esteban M A, Xu J, Yang J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig[J]. J Biol Chem, 2009, 284(26): 17634 - 17640.
- [14] Ezashi T, Telugu B P, Alexenko A P, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(27): 10993 - 10998.
- [15] Liu H, Zhu F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(6): 587 - 590.
- [16] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin[J]. Science, 2007, 318(5858): 1920 - 1923.
- [17] Wernig M, Zhao J P, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(15): 5856 - 5861.
- [18] Dimos J T, Rodolfa K T, Niakan K K, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons[J]. Science, 2008, 321(5893): 1218 - 1221.
- [19] Ebert A D, Yu J, Rose F F, Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient[J]. Nature, 2009, 457(7227): 277 - 280.
- [20] Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(6): 595 - 605.
- [21] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell - derived stem - like cells[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(7): 642 - 646.
- [22] Thomson J A, Itskovitz - Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145 - 1147.
- [23] Wernig M, Lengner C J, Hanna J, et al. A drug - inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(8): 916 - 924.