



论文

一种获得猪诱导性多能干细胞的新方法

阮卫民^①, 韩建永^{①②}, 李品^②, 曹素英^{①②}, 安杨^①, 林宾^②, 李宁^{①*}

① 中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;

② Genome Institute of Singapore, Singapore 138672, Singapore

* 联系人, E-mail: ninglcau@cau.edu.cn

收稿日期: 2011-03-12; 接受日期: 2011-04-23

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2009CB941003, 2011CBA01102 和 2011CBA01000)资助项目

摘要 诱导性多能干细胞技术表明, 通过过表达 4 个重编程因子可使体细胞逆转到多能性的状态, 为建立更多家畜动物的多能性干细胞系提供了新的方法, 如猪、牛、羊等农业动物. 莫洛尼氏鼠白血病逆转录病毒载体被广泛应用于小鼠 iPS 细胞的建系和机制研究上, 然而这种病毒只能感染小鼠和大鼠细胞, 这限制了它在其他哺乳动物 iPS 细胞系建立上的应用. 本实验采用一种新的逆转录病毒系统, 可以高效便捷地从猪成纤维细胞中获得 iPS 细胞. 通过在 GP2-293 细胞中包装 VSV-G 蛋白包被的病毒, 仅一步感染猪成纤维细胞即可转入 4 个人源重编程因子(*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*). 在添加有碱性成骨因子 bFGF 的人类胚胎干细胞培养体系中, 成功建立 6 株和人类胚胎干细胞形态极其相似的猪 iPS 细胞系. 这些猪 iPS 克隆具有较大的细胞核/细胞质比例、边界清晰、细胞呈扁平状等特征. 在体外可以分化成拟胚体, 注射入免疫缺陷性小鼠体内可以形成畸胎瘤, 含有 3 种胚层类型的组织.

关键词

诱导性多能干细胞

莫洛尼氏鼠白血病逆转录病毒载体

拟胚体

畸胎瘤

猪多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)在猪转基因修饰、遗传育种、人类疾病模型和组织移植上具有广泛的应用价值^[1]. 由于缺乏对猪早期胚胎发育和体外培养机制的研究, 虽然经过近 20 年的努力, 但从内细胞团(inner cell mass)建立猪胚胎干细胞系仍未获得成功. 近年来, 许多报道通过过表达 4 个多能性重编程因子, 如 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*, 可以将体细胞逆转到多能性状态, 建立其诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞), 已经在小鼠(*Mus musculus*)^[2]、人(*Homo*

sapiens)^[3]、大鼠(*Rattus norvegicus*)^[4]、猴子(*Macaca mulatta*)^[5]、小型猪^[6]等物种实现. 并且已经证实, iPS 细胞可以应用在核移植^[7]、基因精确打靶^[8]及疾病模型的研究上^[9]. 在已经报道的 iPS 细胞获取时使用的重编程因子的转入方法中, 莫洛尼氏鼠白血病逆转录病毒载体(moloney murine leukemia retroviral vectors, MMLV) pMXs-系统广泛地应用在 iPS 细胞的建系和机制研究中^[3]. 这种逆转录病毒可以高效地导入处于分裂期的哺乳动物细胞内, 并高水平表达目的基因. 更关键的是, pMXs-逆转录病毒载体可

以在成熟的人类和小鼠 iPS 细胞内转录上沉默, 指示出完全的重编程^[3,10,11]. 并且可以简单地通过定量 PCR, 检测这些外源的病毒载体上基因的表达水平.

根据 MMLV 所识别的细胞类型和外壳蛋白, 将其分为以下几类: (1) 亲嗜性逆转录病毒(Ecotropic), 仅识别在鼠科动物细胞表达的受体; (2) 兼嗜性逆转录病毒(Amphotropic), 可以广泛地感染大多数哺乳动物细胞; (3) 泛嗜性逆转录病毒(Pantropic), 由 VSV-G 蛋白包被, 可以感染所有类型的哺乳动物和非哺乳动物细胞. VSV-G 蛋白通过介导脂类的结合与细胞膜的融合, 侵染并进入宿主细胞内部. 在小鼠 iPS 细胞应用广泛的是亲嗜性逆转录病毒, 可通过 pLat-E 细胞包装, 但其对非鼠类细胞的感染效率极低^[3], 需要提前在靶细胞内转入其受体 Slc7a1 解决这一缺陷. 这里用一种新的逆转录病毒系统可以高效且快捷地从猪成纤维细胞中获得 iPS 细胞.

1 材料与方法

1.1 成纤维细胞的来源和培养

本研究所用的猪胚胎成纤维细胞(SW3)取自发育 26~30 天的早期胚胎, 来源于中国农业大学自交系实验用黑色小香猪. 成纤维细胞的培养体系: 含高糖的 DMEM 培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, 11960 Invitrogen), 添加 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、2 mmol/L L 型-谷氨酰胺(L-Glutamine)、1 mmol/L 非必需氨基酸(non-essential amino acid)和 1% 双抗(青霉素/链霉素, Pen/Strep). 在病毒感染的前一天, 将 1×10^4 SW3 细胞铺在 6 孔板的 1 个孔内, 可多准备几个孔备用. 饲养层细胞(feeder cells)来源于见栓 13.5 天的 CF-1 小鼠的胎儿成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF). 使用和猪成纤维细胞相同的培养体系, MEF 传代到第 4 代时, 经过 10 ng/mL 丝裂霉素 C(mitomycin C, Sigma)灭活处理 2.5~3.0 h, 使其失去增殖能力, 按照每管每毫升 10^6 个 MEF 细胞数量冻存. 饲养 iPS 和 ES 细胞时, 提前 1 天将一只管的 10^6 个 MEF 解冻并均匀地铺在 4 个 10 cm 培养皿或 6 孔板内, 作为饲养层细胞. 本研究细胞培养所用试剂均购于美国 Invitrogen 公司, 耗材购于美国 Corning 公司.

1.2 逆转录病毒包装和诱导 iPS 细胞

本研究所用载体均购于美国 Addgene 机构(www.addgene.com), 编号分别为 pMXs-hOct3/4, 17217; pMXs-hSox2, 17218; pMXs-hKlf4, 17219; pMXs-hc-MYC, 17220. 按照 Clontech 产品说明, VSV-G 蛋白包被的泛嗜性逆转录病毒通过 GP2-293 细胞包装完成. 在每个 T75 培养瓶内, 用脂质体(Lipofectamine 2000, LF2K, 11668019, Invitrogen)按 DNA(μ g):LF2K(μ L)=1:2.5 的比例, 将 12 μ g 和 6 μ g VSV-G 共转染入汇合率在 80%~90% 的 GP2-293 细胞内, 6~12 h 后更换新鲜的培养基, 开始收集病毒. GP2-293 细胞生长在与 MEF 相同的培养基, 转染使用时需提前 24 h 传代且不添加双抗. 转染后 48~72 h 后, 收集病毒上清液, 经过 200 $\times$ g 低速离心和 0.45 μ m 过滤除去细胞碎片后, 将其超速离心, 10000 $\times$ g, 2 h. 病毒沉淀再重悬后, 添加 4~8 μ g/mL 助染剂 polybrene(H9268, Sigma)感染提前准备的猪成纤维细胞, 一个 T75 培养瓶的浓缩前病毒量(约 12 mL)感染一个孔, 即 1×10^4 个细胞. 6~12 h 后更换新鲜培养基使细胞恢复, 记为第 0 天(d0), 第 3~5 天(d3~5)将细胞转移至饲养层细胞上培养. 随后更换为 ESC 培养体系, 保持每天更换新鲜培养基. 第 15~20 天挑取健康和形态较好的克隆, 使用机械法在显微镜下将克隆切成小聚团, 用 50 μ L 移液器转移至 12 孔板的饲养层细胞上, 再用 1 mL 移液器吹打均匀. 小鼠 ESC 培养体系: 含高糖的 DMEM, 添加 15% ESC 级别的胎牛血清(FBS, 16141, Invitrogen)、2 mmol/L L 型-谷氨酰胺、1 mmol/L 非必需氨基酸、1% 双抗(青霉素、链霉素)、0.1 mmol/L β -巯基乙醇(β -Mercaptoethanol)和 1000 U/mL 白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF, ESG1107, Millipore). 人类 ESC 培养体系: 含高糖的 DMEM-F12 (Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12=1:1), 添加 20% 血清替代物(knockout serum replacement, KSR, 10828, Invitrogen)、1 mmol/L L 型-谷氨酰胺、1 mmol/L 非必需氨基酸、1% 双抗、0.1 mmol/L β -巯基乙醇和 4 ng/mL 碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF, 13256, Invitrogen). 病毒操作均在二级生物安全柜内进行. 细胞培养用生长因子均购自美国 Invitrogen 公司.

1.3 RNA 提取和适时定量 PCR

各种细胞经过胰酶(Trypsin-EDTA, 0.25%)消化

和 250×g 低速离心后, 用预冷的磷酸缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)清洗一遍, 最后用 1 mL Trizol 重悬细胞沉淀并转移到 1.5 mL 离心管内, 随后立即于-80℃保存. RNA 样品再经过氯仿(CHCl_3 , 分析纯, 国药集团)抽提和异丙醇(Isopropanol, 分析纯, 国药集团)沉淀后, 用 70%乙醇(ethanol, 分析纯, 国药集团)转移至回收柱内(RNasy Mini Kit, Qiagen, 德国), 再按照 Qiagen 产品说明纯化并溶解 RNA. RNA 浓度使用 NanoDrop(Thermo, 美国)测定. 反转录使用 High Capacity cDNA 反转录试剂盒(Applied Biosystems, 43688814, 美国), 定量 PCR 使用 SYBR 荧光试剂(Applied Biosystems, 4334973)和 7900 仪器(Applied Biosystems, 美国)进行, 最后在 Microsoft Excel 软件内用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法分析数据. 检测外源基因的引物为: 通用正向引物(GACGGCATCGCAG-CTTGATACAC, 5'→3'下同), Exo-hOct4(CCCCA-GGGCCCCATTTTGGTACC), Exo-hOct4(GGCACC-CCTGGCATGGCTCTTGCTC), Exo-hKlf4(ACGAT-CGTGGCCCCGAAAGGACC), Exo-hMyc(CAAC-AACCGAAAATGCACCAGCCCCAG). 检测内源性基因引物: Endo-pSox2-3' s(AGGGAAATGGGAGG-AGAG), Endo-pSox2-3' as(GAGTGTGGATGGGATT-GGTG), pNanog-S468(CAGTCAAGAAGCAGAAGA), pNanog-AS598(GCTAAGGTTTCAGGATGTT). 内参基因引物: pGAPDH-S1(ACTCACTCTTCTACCTTT-GATGCT), pGAPDH-AS(TGTTGCTGTAGCCAAAT-TCA). 本实验所用引物均由北京生工生物有限公司合成.

1.4 免疫荧光染色

将需要做免疫染色的 iPS 细胞, 正常传代在 12 孔板内, 待克隆状态较健康时, 用 PBS 洗 1 遍, 4%多聚甲醛固定 15 min. 用 0.1% Triton X-100 通透 10 min, 再放在 10×g 低速水平摇床上 PBS 洗 3 遍, 每遍 5 min. 使用 PBS 配置的 3%牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum, BSA, Sigma)和 5%羊血清封闭 iPS 细胞 30 min, 再用 PBS 洗 3 遍, 每遍 5 min. 使用封闭液稀释(1:200)一抗, 每孔准备 500 μL 稀释液, 放置 4℃低速摇床上过夜杂交; PBS 洗 3 遍后, 用二抗(1:200 稀释)杂交 30 min. 更换为 300 nmol/L DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, Roche, 德国)稀释液, 染色 DNA 2~5 min, 迅速使用 PBS 洗 3 遍, 最后将细胞

泡在 PBS 内. 使用 NIKON Ti 荧光倒置显微镜(日本)进行荧光照相. 本实验所用一抗均购于 Millipore 公司(德国), 荧光标记二抗购于 Invitrogen 公司.

1.5 G-带核型分析

猪成纤维细胞和 iPS 细胞在处于对数生长期时, 用 100 ng/mL 秋水酰胺(Colcemid, 15210, Invitrogen)处理 1~4 h. 用胰酶消化和离心收集后, 细胞使用低渗液 0.075 mol/L KCl 重悬并在 37℃处理 15~30 min. 300×g 低速离心 10 min 后, 用固定液(冰醋酸:甲醇=1:3, 国药集团)轻轻重悬和静置 10 min 固定, 再重复 2 遍. 最后用 500 μL 固定液重悬细胞沉淀, 滴在预冷且干燥的载玻片上, 然后 70℃干燥 3 h. G 带显示时使用 37℃预热的 0.01%胰酶消化 30~60 s, 生理盐水清洗后, 使用 10%吉姆萨染液(Giemsa, 10092, Invitrogen)染色, 使用 600×~100×光学正置显微镜观察中期染色体.

1.6 拟胚体形成

将猪 iPS 细胞经 0.25%胰酶消化成单细胞后, 用拟胚体分化液重悬, 铺在低吸附的培养皿(Corning, 美国)中. 拟胚体形成过程中, 细胞放置在 37℃, 5%CO₂ 培养箱内的 10×g 低速水平摇床上, 每天更换新鲜培养基和 100×光学倒置显微镜(Nikon TS100)下观察. 拟胚体分化液为撤去 bFGF 因子的人类 ESC 完全培养基.

1.7 畸胎瘤形成

收集 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个 iPS 细胞, 最后使用 300~500 μL 生理盐水重悬后, 皮下注射免疫缺陷性(severe combined immune deficiency, SCID, 北京大学医学部)小鼠腋下. 6~8 周后, 会出现 1 cm 左右大小的畸胎瘤. SCID 小鼠安乐死后, 切取畸胎瘤, 放置 10%甲醛(HCHO, 分析纯, 国药集团, 北京)内固定. 经过石蜡包埋、切片和制片、苏木精和伊红(Hematoxylin & eosin, H&E)染色后, 200×光学倒置显微镜(Nikon Ti)下照相.

2 实验结果

2.1 逆转录病毒诱导猪体细胞成 iPS 细胞

开始使用 pLat-E 包装 pMXs-的亲嗜性病毒载体, 感染中国农业大学实验用小香猪的胚胎成纤维细胞(sw3 细胞), 利用 GFP 作为对照, 观察其感染效率.

结果显示, 只有 10%~20% 的绿色荧光蛋白(GFP)阳性率和感染效率(图 1(A)上排), 同 Yamanaka 等人^[2, 3]先前报道的人类 iPS 细胞类似, 猪也不表达亲嗜性病毒载体的受体. 接着尝试使用 GP2-293 细胞包被的, 由 VSV-G

蛋白包被的泛嗜性逆转录病毒, 侵染猪成纤维细胞, 结果显示有 80%~90% GFP 阳性和感染效率(图 1(A)下排). GP2-293 细胞购于 Clontech 公司, 是在 293 细胞基础上转入病毒的结构基因 *Gag* 和 *Pol*, 因此在包装病毒时需

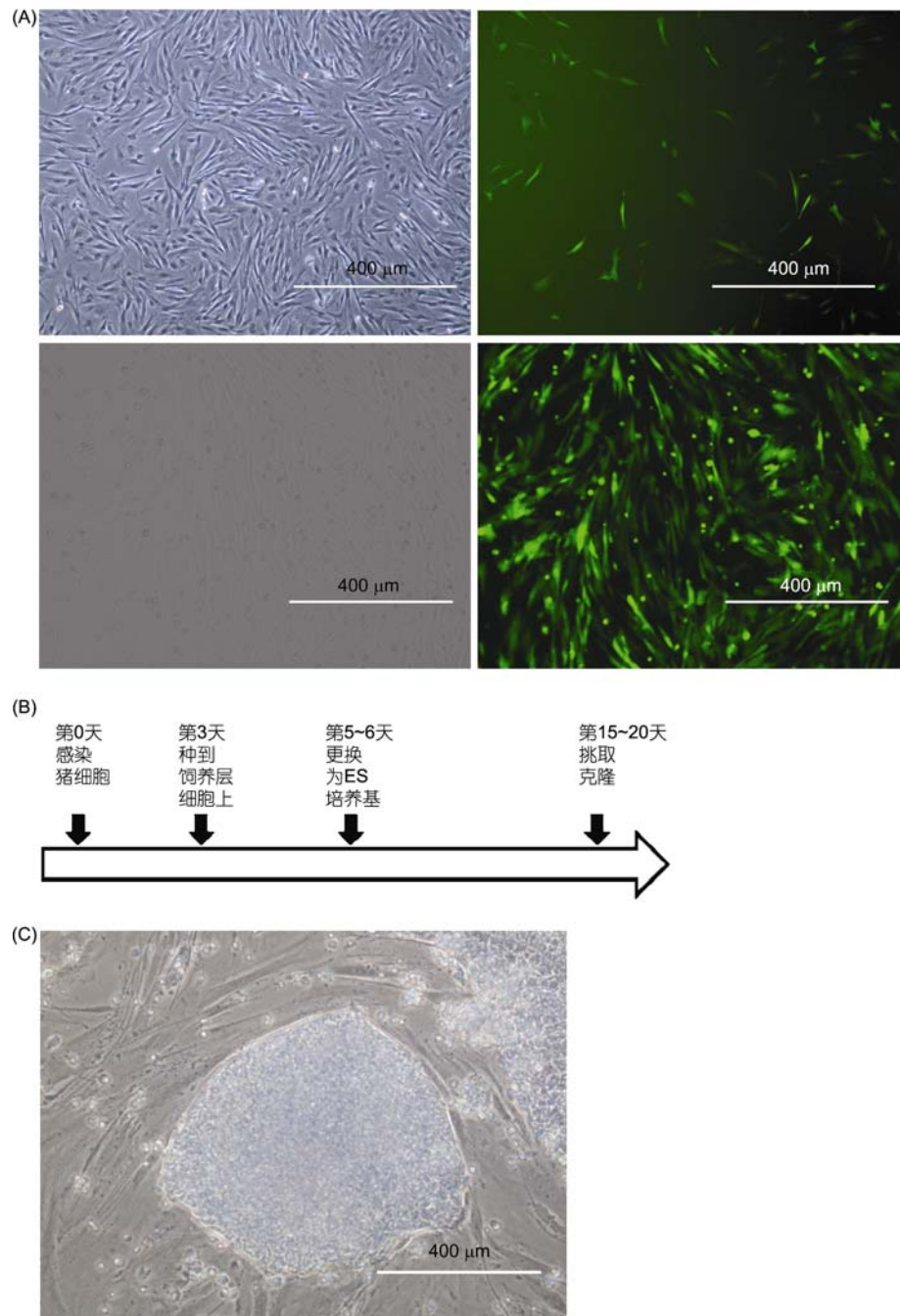


图 1 逆转录病毒诱导猪体细胞成 iPS 细胞

(A) 猪成纤维细胞分别被亲嗜性和泛嗜性逆转录病毒感染, GFP 作为标记指示感染效率, NIKON 倒置荧光显微镜照相; (B) 猪 iPS 细胞由病毒载体诱导的时间表; (C) 典型的原代猪 iPS 克隆形态

将 pMXs 和 VSV-G 载体共转染 GP2-293 细胞^[12].

带有 4 个人源因子(*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*)的泛嗜性逆转录病毒(以下简称为病毒), 通过超速离心浓缩后感染处于低代次($P<6$)的小香猪成纤维细胞(sw3 细胞), 8~12 h 后更换新鲜培养基, 使其恢复. 经过 2 天的恢复, 将其胰酶消化和计数后, 转移到提前准备好的饲养层细胞(Feeder 细胞)上, 在每个 10 cm 培养皿中接种约 1×10^4 个感染后的猪细胞. 饲养层细胞是经丝裂霉素 C 处理使其终止分裂的小鼠胎儿成纤维细胞. 第 2 天及此后每天更换为新鲜的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)培养基, 包括有小鼠和人类两种培养体系. 在感染的第 5~6 天时, 会有大量的转化或凋亡细胞出现, 悬浮在培养基内, 这种现象与已报道的小鼠和人类 iPS 细胞诱导过程类似^[2,3]. 经过 15~20 天的诱导, ESC 样克隆会在人类 ESC 培养体系内出现. 在第 8~14 天后, 紧致且平坦的克隆会出现在人类 ESC 培养体系内, 与 Esteban 等人^[6]报道的猪 iPS 细胞诱导过程相似, 显示诱导成功. 在第 18~20 天时, 只有在人类 ESC 培养体系内保留少数健康的 ESC 样克隆, 大量不规则克隆和漂浮的转化后的细胞会出现在这两种培养体系内. 从形态和培养体系上, 说明猪 iPS 细胞具有与人类 ESC 更相似的特征. 用机械法将 ESC 样克隆在显微镜下切开, 挑取到提前一天准备好的 Feeder 细胞包被的 12 孔板的一个孔内, 每个克隆接种到一个孔内, 用人类 ESC 培养基饲养(记作第 1 代, p1). 存活下来的克隆会保持原代(p0)的形态, 可以继续扩繁, 共建立 6 个猪 iPS 细胞系, 记作 SW3-hOSKM LP(1~6). 通过平行对照实验, 从起初的 1×10^4 细胞中可以获得约 200 个碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)阳性克隆, 诱导效率约为 0.5%.

2.2 猪 iPS 细胞与人类 ESC 有相似的特征

猪 iPS 细胞的获取和扩繁均在人类 ESC 培养基内(20%血清替代物再添加 4 ng/mL bFGF), 具有与人类 ES 细胞典型的生长特征, 如克隆扁平、克隆致密, 具有较大的核质比例. 猪 iPS 细胞生长迅速, 按 1:10~1:15 的比例每 3 天传代 1 次, 按照与人类 ESC 类似的传代方法, 即用胶原酶 IV 处理 10~15 min, 待克隆松动用机械法切割为小块, 再用移液器将其吹散至仅含有 10~20 个细胞的小克隆, 离心后再分盘. 扩增培养的猪 iPS 细胞, 经过长期培养后仍保持正常的核型(图 2(A)右), 即 38, XY. 正常的核型对 iPS 细胞在

核移植和转基因动物生产应用中极为关键. 免疫荧光染色结果表明, 本实验的猪 iPS 细胞表达多种 ESC 细胞标记(图 2(B)), 如 *Oct4*, *Sox2*, SSEA-3, SSEA-4 和 Tra-1-60. 但是在小鼠 ESC 内关键基因 *Nanog* 在猪 iPSC 内显示为弱阳性, 这与定量 PCR 检测结果相符(图 3(B)).

2.3 内源多能性基因被激活

内源多能性基因及其调控网络被激活, 并取代外源病毒载体内的因子, 与外源基因沉默是成功获得 iPS 细胞的显著标志^[11]. 通过反转录-定量 PCR 实验发现, 同病毒感染后 2 天的成纤维细胞相比, iPS 细胞中的外源因子显著下调(图 3(A)), 因为感染后 2 天的成纤维细胞, 具有最高的外源因子(*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*)表达水平, 可作为检测表达水平下降与否的对照. 但是它们仍保持较高的水平, 同先前报道的猪 iPS 细胞类似^[6,13], 需要一定的外源因子表达才能维持形态. 这显示目前的诱导体系和培养体系获得的 iPS 细胞, 仅得到了部分的重编程, 如果人为的下调外源因子使其失活则将导致 iPS 细胞的分化^[13]. 而内源多能性基因也获得了一定程度的激活(图 3(B)), 说明该系统仍可以实现 iPS 细胞的诱导, 内外源基因共同维持 iPS 细胞的“干性”. 所以在本实验的泛嗜性 pMXs-病毒载体系统中获取的猪 iPS 细胞, 可以简单地用定量 PCR 方法检测内外源表达水平, 从而进一步评价和探索更适于猪 iPS 细胞的诱导和培养体系.

2.4 猪 iPS 细胞的体内和体外分化

iPS 细胞的多向分化潜能是多能性干细胞的重要特征^[2]. 检测猪 iPS 细胞是否可以在体外分化, 可以通过检测能否获得拟胚体(embryonic bodies)来验证. 将猪 iPS 细胞在不含有生长因子 bFGF 的培养基和低吸附的培养皿内悬浮培养, 在 4~6 天时可以发现拟胚体的出现, 成聚合性生长(图 4(A)). 6 个 iPS 细胞系均通过了检测, 具有较强的分化趋势和潜能. 为了检测是否可以在体内分化为 3 种胚层, 将 iPS 细胞系(LP4)通过皮下注射入严重联合免疫缺陷性(SCID)小鼠体内. 严重联合免疫缺陷小鼠体内 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞大量减少, 细胞免疫和体液免疫功能缺陷, 因此降低免疫排斥风险, 常用在 ESC 的体内多向分化能力的检测上. 8 周后畸胎瘤形成, 经过切片和苏木精伊红染色分析, 畸胎瘤含有 3 种胚层来源的组织(图 4(B)),

说明猪 iPS 细胞具有体内和体外的多向分化潜能。

3 讨论

Maherali 和 Hochedlinger^[14]与 O'Malley 等人^[15]在已报道的文献中介绍了在获取人类和小鼠 iPS 细胞中采用的各种基因转移的方法。其中, 逆转录病毒载体^[3]、持续表达和四环素诱导^[16]表达的慢病毒载体等可以高效转入细胞并表达多能性因子, 但也可以插入到靶细胞中多个拷贝的基因, 导致 iPS 细胞基因组的变异, 从而限制 iPS 细胞在治疗研究和临床上的应用。*piggyBac*^[17]和 *Cre-Loxp*^[18]能够在获取 iPS 细胞后将外源基因删除, 从而获得无外源基因的 iPS 细胞, 但在删除时需要再次表达转座酶。对基因组的第 2 次

编辑, 常导致基因组变异, 并且筛选无外源基因的克隆也非常耗时; 腺病毒^[19]、质粒瞬时转染^[18]和蛋白诱导^[20]等方法可以获得无基因组改变的 iPS 细胞, 可以应用在疾病模型和临床治疗上, 但极低的诱导效率限制了其在 iPS 细胞大量获取和机制研究中的广泛应用。最近报道, 使用体外合成的 mRNA^[21]和 miRNA^[22]也可以成功重编程人体细胞成 iPSC, 加深了对重编程机制的认识。这些技术方法目前大多仅在小鼠和人类上实现, 而且这两个物种的 ES 和 iPS 细胞均有完善的培养体系和鉴定体系。

本研究建立的猪 iPS 细胞系应用的载体系统是最初用来建立人类^[3]和小鼠 iPS 细胞系^[2]中的 pMXs-亲嗜性逆转录病毒载体, 它可以在获得完全重编程的 iPS 细胞内自动沉默^[11], 从而指示出多能性状态的建

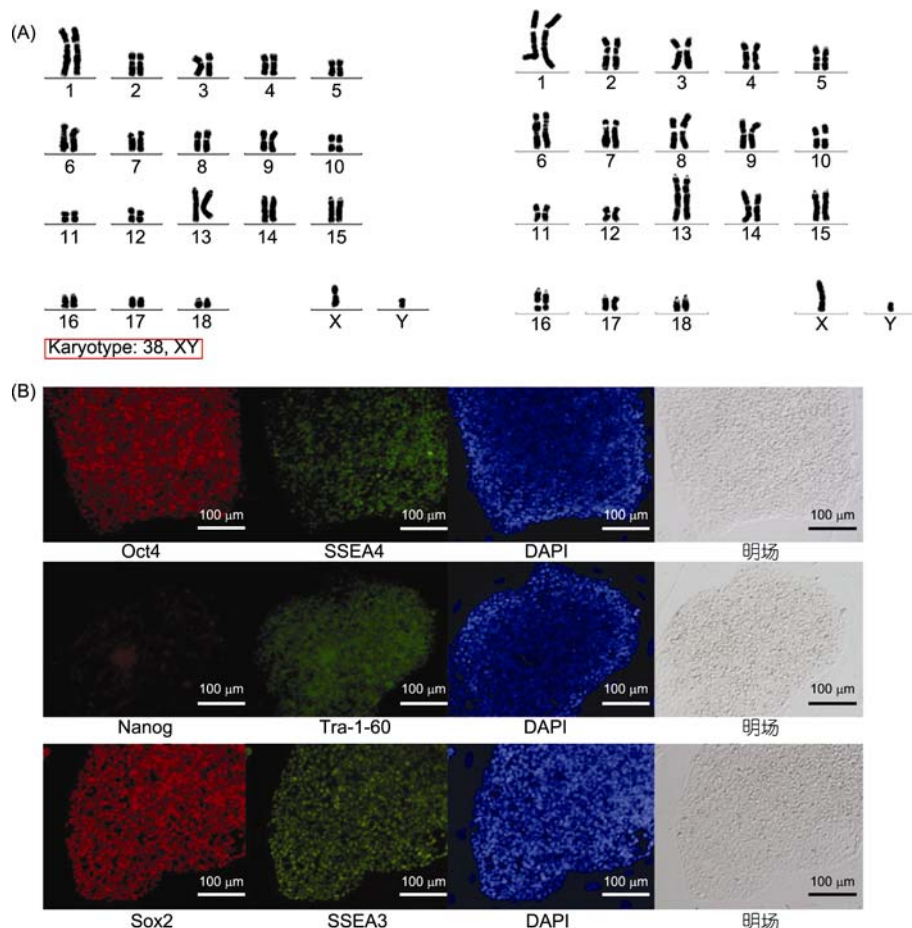


图 2 猪 iPS 细胞具有 ESC 特征

(A) 猪 iPS 细胞保持正常的核型(右), 和其来源的成纤维细胞(左), 成纤维细胞作为对照, 600x; (B) 猪 iPS 细胞表达胚胎干细胞的标记

立. 这种载体可以被很容易地包装出来, 并且高效感染靶细胞. 最后通过简单的定量 PCR 方法, 检测和筛选出外源基因不表达或表达量较低的 iPS 克隆, 鉴别出高质量的 iPS 细胞系. 这个系统可以通过包装成泛嗜性逆转录病毒, 应用到其他哺乳动物上, 如猪、牛、羊等, 而对于这些物种还没有获得真正意义上的多能性干细胞, 可用 iPS 细胞替代. 本研究获得的猪 iPS 细胞, 在细胞形态、标记基因和分化潜能上, 具有一定的多能性; 但外源基因持续表达, 将会影响到其在转基因动物生产中的应用.

iPS 细胞技术在遗传修饰动物的生产上有广泛的应用前景, 可以通过精确的同源重组、基因的敲除和

敲入, 然后筛选并扩增出阳性的细胞克隆, 再经过核移植^[7,23]或嵌合体技术提高转基因克隆动物的制备效率. 然而如果根据小鼠 ES 和 iPS 细胞的鉴定标准, 而先前建立的猪 ES 和 iPS 细胞还不是真正的多能性干细胞, 还无法获得种系传递的嵌合体后代, 建立不依赖外源基因的猪 iPS 细胞系, 仍面临诸多障碍^[13], 如猪囊胚的内细胞团内有与小鼠和人类不同的转录因子, 使按照小鼠的方法无法获得 ESC; 猪 ESC 的最优培养体系还没有建立起来, 而其中的生长因子对多能性状态影响极大^[24]; 而猪特异的多能性基因和多能性的选择标记还没有被解决. 所以猪 iPS 细胞技术和本研究使用的载体系统, 可以作为探索这些问题的平台.

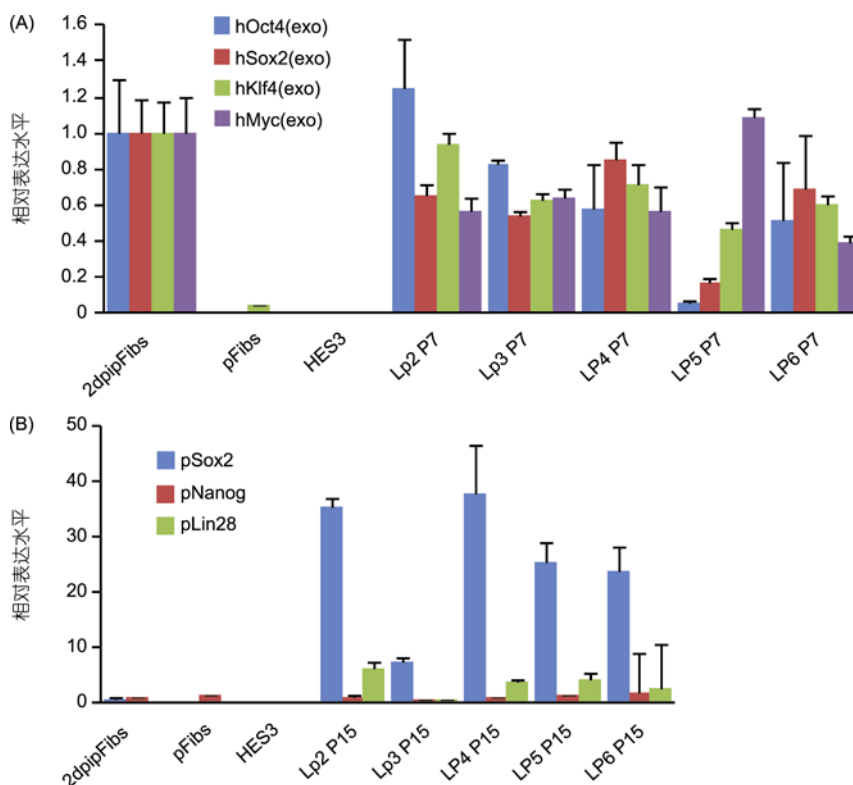


图3 猪 iPS 细胞内的内外源基因的表达水平

(A) 病毒载体上的外源因子表达水平现状下调. 2dpiFibs 为感染后 2 天的成纤维细胞, 具有最高水平的外源基因, 作为阳性对照; LP(2-6)iPS 细胞检测时为第 7 代(p7). GAPDH 为内参基因; (B) iPS 细胞的内源性多能性相关基因 *Sox2*, *Nanog* 和 *Lin28* 被激活. pFibs 和 HES3 作为阴性对照, 显示引物为猪特异的; 检测时 iPS 细胞处在第 15 代(p15)

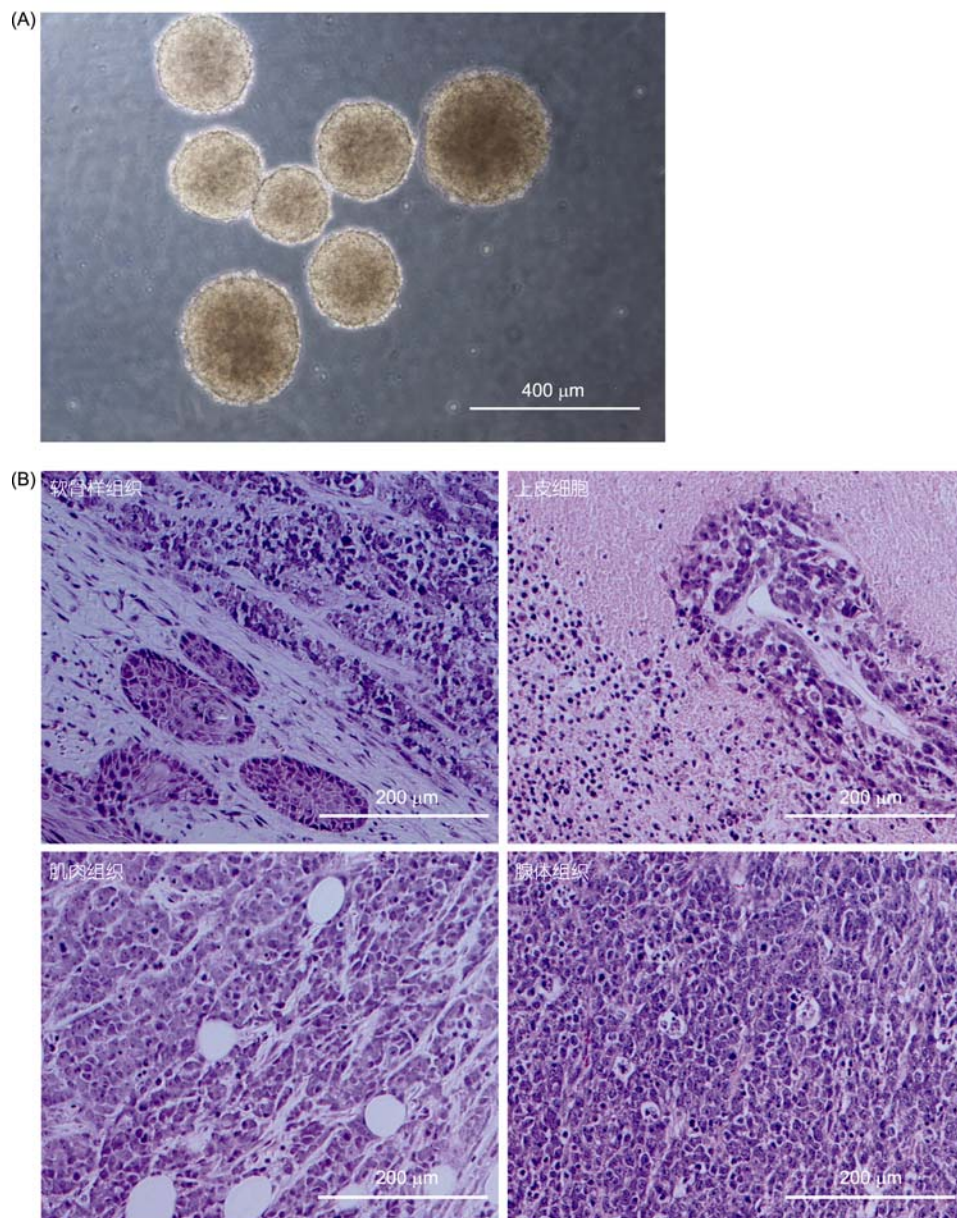


图 4 iPS 细胞的体外和体内分化潜能

(A) 拟胚体的形成; (B) 畸胎瘤的苏木精和伊红染色分析。软骨样组织代表中胚层, 上皮细胞代表外胚层, 肌肉组织代表内胚层, 腺体组织代表内胚层

参考文献

- 1 Hall V. Porcine embryonic stem cells: a possible source for cell replacement therapy. *Stem Cell Rev*, 2008, 4: 275–282
- 2 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 3 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131: 861–872

- 4 Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 11–15
- 5 Liu H, Zhu F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 587–590
- 6 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: 17634–17640
- 7 Kou Z, Kang L, Yuan Y, et al. Mice cloned from induced pluripotent stem cells (iPSC). *Biol Reprod*, 2010, doi: 10.1095/biolreprod.110.084731
- 8 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318: 1920–1923
- 9 Park I H, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134: 877–886
- 10 Han J, Yuan P, Yang H, et al. Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, 463: 1096–1100
- 11 Hotta A, Ellis J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *J Cell Biochem*, 2008, 105: 940–948
- 12 Yee J K, Friedmann T, Burns J C. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol*, 1994, 43(Pt A): 99–112
- 13 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: 46–54
- 14 Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 595–605
- 15 O'Malley J, Woltjen K, Kaji K. New strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20: 516–521
- 16 Wernig M, Lengner C J, Hanna J, et al. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 916–924
- 17 Woltjen K, Michael I P, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458: 766–770
- 18 Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, 458, 771–775
- 19 Zhou W, Freed C R. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27: 2667–2674
- 20 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: 472–476
- 21 Warren L, Manos P D, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 618–630
- 22 Anokye-Danso F, Trivedi Chinmay M, Juhr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 376–388
- 23 Zhou S, Ding C, Zhao X, et al. Successful generation of cloned mice using nuclear transfer from induced pluripotent stem cells. *Cell Res*, 2010, 20: 850–853
- 24 Chou Y F, Chen H H, Eijpe M, et al. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell*, 2008, 135: 449–461