

鼠星形胶质细胞重编程为诱导多潜能干细胞的研究*

许杰[#], 闫秋月[#], 唐洲平, 湛彦强, 吴军, 李昌盛,
李珍, 肖连臣, 张苏明[△]

华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科, 武汉 430030

摘要: 目的 研究星形胶质细胞重编程为诱导多潜能(iPS)干细胞的可行性,为进一步研究 iPS 细胞诱导技术奠定基础。方法 用分别含 Oct4, Sox2, Klf4 和 e-myc 因子的 4 种逆转录病毒载体病毒颗粒感染星形胶质细胞,获得 iPS 细胞并进行鉴定。结果 感染后第 28 天具有胚胎干细胞形态的克隆出现,诱导效率为(0.015±0.005)%,且碱性磷酸酶(AP)染色及 SSEA-1 和 Oct4 免疫荧光染色均显阳性。结论 星形胶质细胞可以重编程为 iPS 细胞,进一步证明了 iPS 细胞诱导技术的普遍适用性。

关键词: 星形胶质细胞; 诱导多潜能干细胞; 重编程

中图分类号: R349.5 DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.2011.01.002

Generation of Induced Pluripotent Stem Cells by Reprogramming of Mouse Astrocytes

Xu Jie[#], Yan Qiuyue[#], Tang Zhouping *et al*

Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective To investigate the feasibility of reprogramming mouse astrocytes into induced pluripotent stem (iPS) cells. **Methods** Astrocytes were infected with retroviruses expressing Oct4, Sox2, Klf4, and e-Myc respectively. iPS cells were harvested and identified. **Results** The clones appeared on the day 28 after the infection, the reprogramming efficiency was (0.015±0.005)%, and the clones were positive for alkaline phosphatase activity, Oct4 and SSEA-1 staining. **Conclusion** Astrocytes could be reprogrammed into iPS cells, which demonstrated the universal applicability of reprogramming.

Key words astrocytes; induced pluripotent stem cells; reprogramming

目前,多数神经系统疾病尤其是神经变性及遗传性疾病尚无有效的治疗方法,胚胎干细胞移植治疗虽然已在部分动物模型上取得一定疗效^[1],但伦理性和免疫原性两大问题一直阻碍着其应用于临床。诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem, iPS)的出现,成功地解决了这两大难题,为细胞治疗开辟了新的领域,同时也成了医学和生物学领域的研究热点^[2-4]。Yamanaka 研究小组^[5]近来发现供体细胞来源不同的 iPS 细胞向神经元分化的能力有所不同,是否神经组织细胞来源的 iPS 细胞更易于向神经元分化还有待于进一步研究。星形胶质细胞是神经组织内数量最多、分布最广的胶质细胞,其增长速度远远大于少突胶质细胞和其他神经细胞。而

星形胶质细胞能否诱导为 iPS 细胞,用于神经系统疾病的治疗还是个未知数,本研究用星形胶质细胞作为供体细胞诱导 iPS 细胞,为进一步研究 iPS 细胞的应用及诱导机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生昆明种小鼠由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供。

1.1.2 器材与主要试剂 37℃细胞培养箱(Thermo 公司);荧光显微镜(Olympus 公司);Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂(Invitrogen 公司);小提质粒提取试剂盒(Omega 公司);DMEM 高糖培养液,DMEM/F12 培养液,胎牛血清,0.25%胰蛋白酶,0.125%胰蛋白酶(Hyclone 公司);pMXs-IRES-GFP, pMXs-IRES-Sox2, pMXs-IRES-eMyc, pMXs-IRES-Klf4, pMXs-IRES-Oct4 (Addgene 公

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30370505), 武汉科技计划资助项目(No. 200860423216)

许杰,男,1982年生,博士研究生, E-mail: huaxinxiaoqu@126.com

[#] 同为第一作者

[△] 通讯作者, Corresponding author, E-mail: suming_zhang@163.com

司);白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)(Chemicon公司);SSEA-1、Oct4和AP染色试剂(Chemicon公司)。

1.2 方法

1.2.1 星形胶质细胞的原代培养 取出生后1 d的小鼠的脑髓,去除脑膜及血管,将组织剪碎,经0.25%胰酶消化10 min,培养液终止消化,以1 000 r/min离心5 min,去上清,悬浮细胞再经滤网过滤,得含星形胶质细胞的细胞悬液,将细胞悬液接种于含普通培养液(DMEM/F12培养液和10%胎牛血清,2%青/链霉素)培养瓶中,将培养瓶反放于37℃恒温培养箱培养30 min,再将未贴壁的细胞悬液种于另一培养瓶中,隔天换液,长到一定密度(约7 d)后,用0.125%胰蛋白酶(不含EDTA)轻微消化,去除星形胶质细胞上层的细胞,然后对底层的星形胶质细胞进行传代和胶质原纤维酸性蛋白(gliafibrillary acidic protein, GFAP)鉴定。

1.2.2 病毒颗粒的包装及滴度测定 用小提质粒提取试剂盒按说明书步骤提取4种分别含Sox2、e-Myc、Klf4、Oct4因子的逆转录病毒载体质粒。用Lipofectamine 2000脂质体转染试剂转染PLAT-E细胞^[6]进行病毒包装,按质粒(μg):脂质体(μL)为8:20的比例转染融合度为60%~80%的PLAT-E细胞,48 h后收集上清液,用孔径为0.45 μm 的滤器过滤,4 000 r/min离心,所得浓缩病毒液加入8 mg/mL的polybrene使其终浓度为4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以备感染。同时为了检测PLAT-E细胞的转染效率及测定病毒滴度,提取含绿色荧光蛋白(GFP)的逆转录病毒载体质粒作为平行对照,同等条件下进行病毒包装,并将病毒浓缩液感染NIH3T3细胞,使用

逐孔稀释滴度测定法^[7]测定病毒滴度。

1.2.3 iPS细胞的诱导 将星形胶质细胞按 3×10^4 /孔的密度接种到6孔板中,用无抗培养液(DMEM高糖溶液,10%胎牛血清)培养,待星形胶质细胞融合度达30%左右时用病毒液进行感染,每孔中加4种病毒各250 μL ,感染12 h后换无抗培养液培养6 h,如此再循环2次,然后加入ES细胞培养液(DMEM高糖溶液,15%胎牛血清,1% $100 \times L$ -谷氨酰胺,1% $100 \times \beta$ -巯基乙醇,1% $100 \times$ 非必需氨基酸,1% $100 \times$ 青/链霉素,1% $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ LIF)培养,每天换液观察。克隆出现后进行传代培养及鉴定。

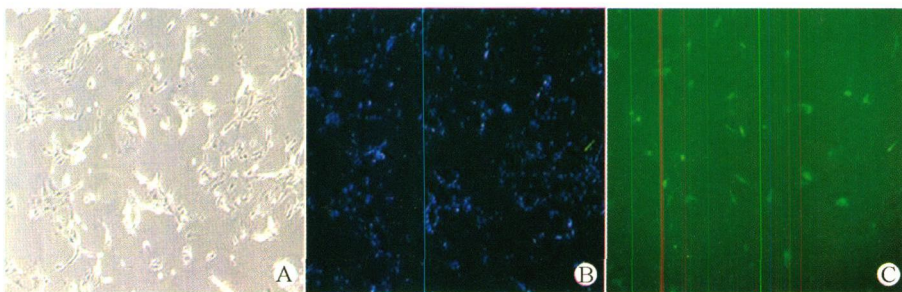
1.2.4 iPS细胞SSEA-1、Oct4和AP染色 待细胞形成克隆团时检测SSEA-1,用PBS洗3 min,加入4%多聚甲醛室温固定15 min;PBS洗5 min,洗3次;加1:100稀释的抗SSEA-1一抗,放于湿盒中4℃过夜;PBS洗5 min,洗3次;加1:100稀释的FITC标记的二抗放于湿盒中,避光室温放置1 h;PBS洗5 min,洗3次;加DAPI染核,PBS洗5 min,置荧光显微镜观察。同样用相应的一抗和二抗检测iPS细胞中的Oct4表达。

AP检测时按说明书步骤将细胞固定15 min,用染色混合液孵育20 min,PBS漂洗后置显微镜下观察。

2 结果

2.1 星形胶质细胞原代培养及鉴定

星形胶质细胞形状呈星形,有许多分支突起,与成纤维细胞形状有些相似,且GFAP染色呈阳性,结果见图1。



A: The normal morphology of astroglial cells; B, C: Immunostaining of astroglial cell marker GFAP (B: DAPI; C: GFAP)

图1 星形胶质细胞形态及鉴定(荧光显微镜, $\times 100$)

Fig 1 The morphology and identification of astroglial cells (Fluorescent microscopy, $\times 100$)

2.2 逆转录病毒的包装及滴度测定

PLAT-E细胞转染前及转染后48 h平行对照组GFP的表达结果见图2。根据公式(病毒滴度=

病毒颗粒数/病毒原液数,病毒颗粒数=荧光细胞比例 \times 病毒加入时的细胞总数)计算病毒滴度为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ TU/mL。

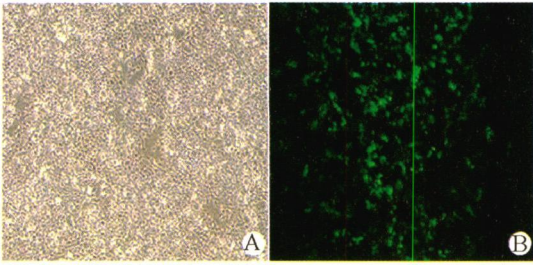


图2 PLAT-E 细胞转染前及转染后 48 h GFP 表达(荧光显微镜, × 100)

Fig 2 The GFP expression of PLAT-E cells before(A) and 48 h after transfection(B) (Fluorescent microscopy, × 100)

2 3 iPS 细胞的诱导

按 3×10^4 / 孔的密度将第 1 代星形胶质细胞种于 6 孔板中的 3 孔, 待细胞融合度达 30% 时进行感染, 进行 3 次病毒感染, 感染后用胚胎干细胞培养液进行培养并每天换液观察, 直至出现克隆。根据每孔的克隆数(分别为 3 个、5 个、6 个) 计算所得的 iPS 细胞的诱导效率为 $(0.015 \pm 0.005)\%$, 感染后第 0 天、感染后第 12 天及感染后第 28 天的细胞形态见图 3。

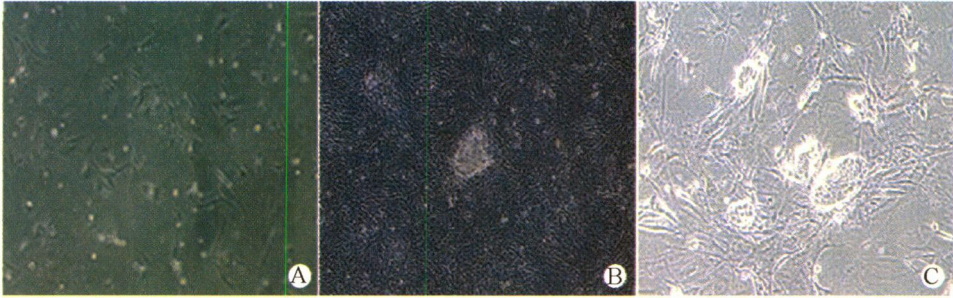


图3 星形胶质细胞感染后第 0 天(A)、12 天(B)、28 天(C) 的细胞形态(× 100)

Fig 3 The morphologies of astroglial cells 0(A), 12(B), and 28 days(C) after transfection(× 100)

2 4 iPS 细胞的 SSEA-1、Oct4 和 AP 染色鉴定

色, 结果均显阳性(图 4)。

对 iPS 细胞进行 AP 染色及 Oct4、SSEA-1 染

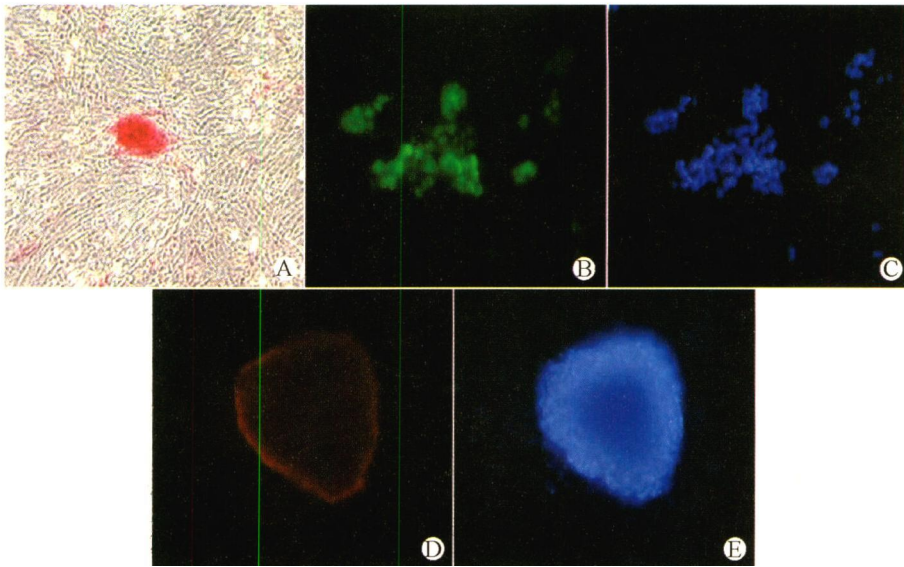


图4 iPS 细胞的 AP(A)、Oct4(B) 及 DAPI(C、E)、SSEA-1(D) 染色鉴定(荧光显微镜, × 100)

Fig 4 Identification of the iPS cells by AP(A), Oct4(B), DAPI(C, E) and SSEA-1(D) staining(Fluorescent microscopy, × 100)

3 讨论

本研究成功地将星形胶质细胞直接重编程为 iPS 细胞, 进一步证明了 iPS 细胞诱导技术的普遍

适用性。自 iPS 细胞问世以来, 研究者开始纷纷尝试用各种不同组织细胞来诱导 iPS 细胞, 已经先后利用小鼠的终末分化的成熟 B 淋巴细胞^[8]、神经干细胞^[9、12]、胰岛 β 细胞^[13]、肝脏细胞和胃上皮细

细胞^[14]、骨髓单核细胞^[15]及脂肪组织细胞^[10]成功诱导出iPS细胞。胰岛β细胞来源的iPS细胞的诱导证明了重编程不仅仅只限于中胚层而且也适用于内胚层^[3]，神经干细胞的诱导成功^[12]说明了重编程也存在于外胚层的干细胞。而在本研究中利用星形胶质细胞作为供体细胞诱导出iPS细胞更是说明外胚层的终末分化细胞也可以诱导出iPS细胞，进一步证明了重编程不受细胞类型和分化程度的限制，iPS细胞技术具有广泛适用性。

iPS细胞的出现为干细胞及再生医学的研究开辟了新的领域，但将iPS细胞应用于临床还存在一定的问题。首先，由于诱导过程中逆转录病毒载体以及致癌因子(e-Myc)的应用，iPS细胞存在一定的致癌性；其次，诱导效率低的问题一直没有得到较好的解决；而且就iPS细胞的供体细胞来说，研究发现用不同的供体细胞诱导iPS细胞在诱导方法、诱导效率及存在的致癌性方面各自有着不同的特点，因此，为iPS细胞选择合适的供体细胞尤为重要。本研究中星形胶质细胞来源的iPS细胞的诱导成功，使iPS细胞的供体细胞来源更加广泛。

总之，iPS细胞在新药筛选、药物毒理研究、发育生物学和再生医学等领域有着广阔的应用前景，但将iPS细胞应用于临床还有待于进一步的深入研究。本研究为进一步研究iPS细胞的产生机制及分化能力等奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Corti S, Nizzardo M, Nardini M, et al. Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice[J]. Brain, 2010, 133(Pt2): 465-481
 [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] 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
 [4] 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
 [5] Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(8): 743-745
 [6] Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses[J]. Gene Ther, 2000, 7(12): 1063-1066
 [7] 罗祥基, 程庆保, 徐峰, 等. 慢病毒介导基于 microRNA 系统的 HBs RNAi 技术抑制 HBV 复制[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(3): 295-305
 [8] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency[J]. Cell, 2008, 133(2): 250-264
 [9] Kim J B, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors[J]. Nature, 2008, 454(7204): 646-650
 [10] Tat P A, Sumer H, Jones K L, et al. The efficient generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mouse adipose tissue derived and neural stem cells[J]. Cell Transplant, 2010, 19(5): 525-536
 [11] Kim J B, Zaehres H, Arauzo-Bravo M J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells[J]. Nat Protoc, 2009, 4(10): 1464-1470
 [12] Eminli S, Utikal J, Arnold K, et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression[J]. Stem Cells, 2008, 26(10): 2467-2474
 [13] Stadtfeld M, Brennand K, Hochdellinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells[J]. Curr Biol, 2008, 18(12): 890-894
 [14] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells[J]. Science, 2008, 321(5889): 699-702
 [15] Kunisato A, Wakatsuki M, Kodama Y, et al. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells[J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(2): 229-238.

(2010-03-25 收稿)

(上接第4页)

[5] Hynes R O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines[J]. Cell, 2002, 110(6): 673-687
 [6] Juhasz G, Vass G, Bozso Z, et al. Integrin activation modulates NMDA and AMPA receptor function of CA1 cells in a dose-related fashion *in vivo*[J]. Brain Res, 2008, 1233: 20-26
 [7] Chan C S, Weeber E J, Kurup S, et al. Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory[J]. J Neurosci, 2003, 23(18): 7107-7116
 [8] Grace E A, Busciglio J. Aberrant activation of focal adhesion proteins mediates fibrillar amyloid beta-induced neuronal dystrophy[J]. J Neurosci, 2003, 23(2): 493-502
 [9] Caltagarone J, Jing Z, Bowser R. Focal adhesions regulate A-

beta signaling and cell death in Alzheimer's disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(4): 438-445
 [10] Wolfson M, Budovsky A, Tacutu R, et al. The signaling hubs at the crossroad of longevity and age related disease networks[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(3): 516-520
 [11] Reddig P J, Juliano R L. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival[J]. Cancer Metastasis Rev, 2005, 24(3): 425-439
 [12] 郭家龙, 张凯伦, 蒋雄刚, 等. RNA 干扰抑制血管平滑肌细胞 MT1-MMP 基因表达的实验研究[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2009, 38(5): 594-597.

(2010-09-01 收稿)