

红色荧光蛋白标记的小鼠胚胎干细胞系 建立及体内成瘤的初步研究

赵无恙¹, 刘 韬², 钱其军^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒治疗实验室, 上海 200438)

摘 要: 建立能够稳定表达红色荧光的小鼠胚胎干细胞系,并研究其在体内不同部位形成畸胎瘤的能力。构建含红色荧光蛋白(DsRed-Express)的表达质粒,并采用磷酸钙法包装成慢病毒转染小鼠胚胎干细胞(mESCs)。筛选得到强阳性克隆,对其进行 RT-PCR 检测和裸鼠、C57 小鼠体内成瘤实验验证细胞特性,最后获得稳定表达红色荧光的小鼠胚胎干细胞(Red-ESCs)。Red-ESCs 能够表达多能性基因,如 *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* 等,也能在裸鼠体内成瘤。不同部位的畸胎瘤在基因表达上有差异,其中肝部形成的畸胎瘤表达肝特性基因。成功建立稳定表达红色荧光的小鼠胚胎干细胞系,其在体内形成的畸胎瘤性质受到体内环境的影响。

关键词: 胚胎干细胞; 红色荧光蛋白; 畸胎瘤; 肝特异性基因

中图分类号: Q256 **文献标志码:** A

0 引 言

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是一类原始的未分化细胞,来自早期胚胎的内细胞团(inner cell mass, ICM)或桑椹胚,具有最高级的发育全能性,理论上在合适的条件下可以分化出成体动物的所有组织和器官(包括生殖细胞),因此研究前景十分广阔^[1]。但是胚胎干细胞在应用过程中还面临着成瘤的风险。根据“胚巢理论”,即认为恶性肿瘤的最初来源是体内残存的胚胎性细胞^[2]。受非胚胎环境的影响,残存于正常组织中的胚胎性细胞会恶变形形成肿瘤干细胞,这是恶性肿瘤发生并且持续恶化的原因之一。

因为 ESCs 的研究比较多地集中在体外分化和体内细胞组织修复,对 ESCs 做相应的标记可以更好地观察 ESCs 的体外分化,及追踪其在体内参与组织修复的过程。利用荧光物质示踪是人们对分子水平进行观察时普遍采用的工具,已经有报道通过给 ESCs 标记绿色荧光观察分化和发育情况^[3-4]。

红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)发现自珊瑚纲下动物的一类标记物,可与绿色荧光蛋白共用,其激发和发射波长更长,具有发光效率高、耐光性强、细胞内成像背景低、对多 pH 值耐受力强的优点^[5-6],在实际应用中可以起到与绿色荧光互补的作用,为细胞内的多色标记提供更多的荧光标记。

为了更好地追踪胚胎干细胞进入体内的变化,笔者利用携带 DsRed-Express 的慢病毒转染 C57 小鼠胚胎干细胞(mESCs),获得了可以稳定表达红色荧光蛋白的胚胎干细胞系(Red-ESCs)。RT-PCR 检测和体内成瘤实验的结果均证明 Red-ESCs 全能分化性未受到明显影响。其次,将 Red-ESCs 注入 C57 小鼠的不同部位(皮下,腹腔和肝部),观察其形成肿瘤的能力,研究体内不同微环境对胚胎干细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

293T 细胞(美国菌种保藏中心),裸鼠、C57 小鼠

收稿日期: 2014-05-20

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(30925037)

作者简介: 赵无恙(1988-),女,浙江临海人,硕士研究生,主要从事干细胞肿瘤学方面的研究。

通信作者: 钱其军, E-mail: qianqj@163.com

(中国科学院上海实验动物中心); Kod DNA Polymerase、cDNA 合成试剂盒、SYBR® Realtime PCR Master Mix 试剂盒购自 Toyobo; DMEM-H、DMEM/F12、FBS、Neurobasal Medium、L-Glutamine、2-hydroxy-1-ethanethiol、N2、B27、Chir99021、PD0325901、SU5402 购自 Gibco 公司;其余为国产分析纯试剂;引物合成均为上海 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DsRed-Express 表达载体构建及慢病毒包装

以 pLV120-hMR 为模板 PCR 得 DsRed 片段,上游引物为:CTA GCTAG C TAG ATGG CCTCCTCCGA,下游引物为:TGG TGGACAAGGA CATC CTTAAG CGG,应用 *Nhe* I 和 *Eco* RI 双酶切连入慢病毒表达载体 PLV120-EF1 α ,得到 DsRed-Express。

采用三质粒磷酸钙转染 293T 细胞的方法获得携带标记基因的慢病毒。质粒准备:应用 QIAGEN 公司的 QIAGEN Plasmid Purification 试剂盒大量抽取 DsRed-Express、psPAX2 和 pMD2. G,经分光光度法准确定量后按照 3 : 2 : 1 的质量比混合均匀。细胞准备:将生长状态良好的 293T 细胞培养在 10% FBS 的无抗生素 DMED-H 培养液中,10 cm 细胞培养皿预包被 0.1%明胶,至细胞密度约为 80%~90%。每个 10 cm 细胞培养皿操作:124 μ L 的 CaCl₂ 与适量的水混合均匀,将已混匀的质粒混合液逐滴加入,终体积为 1 mL,吹打混匀;加入 1 mL 2xHEPES 液,混匀静置 20 min;将混合液均匀点加到细胞培养皿后,轻晃扩散;6 h 后,移除含有 DNA 磷酸钙复合物的上清,代之以正常培养液 DMED-H(10%FBS)并开始计时;转染 24 h 后,补加 5 mL 培养液;48、72 h 各收集一次病毒,将合并的病毒上清在高速超滤浓缩离心管中离心浓缩 50 倍,-80℃保存。

1.2.2 建立稳定表达 RFP 的 ES 细胞系

对 C57 小鼠的 ESCs 采用 N2B27+3i 无血清培养体系^[7],培养板用明胶预包。将病毒浓缩液点加

入生长状态良好的 mESC,12 h 后换液,隔天荧光显微镜下观察荧光表达情况,挑出红色荧光的 mESC 单克隆化,96 孔板扩大培养 3 d 后转移到 24、6 孔板扩大培养,挑取荧光最强克隆二次筛选。

将获得的 DsRed-ESCs 用天根公司的 DNA 提取试剂盒总 DNA。用 PCR 对转基因细胞进行基因表型检测。DsRed-Express 引物为上游引物为:CTA GCTAG C TAG ATGG CCTCCTCCGA,下游引物为:TGG TGGACAAGGA CATC CTTAAG CGG。

1.2.3 胚胎干细胞在不同部位的成瘤

选择生长状态良好的 DsRed-ESCs,制成高密度单细胞悬液(PBS),分别 1×10^6 个细胞注射到裸鼠的皮下,C57 小鼠的皮下、腹腔和肝部(经肝门静脉注射)。4 周后,处死小鼠,观察成瘤情况,摘除畸胎瘤。将得到的畸胎瘤用 4%PFA 固定,送由东方肝胆外科医院病理科进行石蜡包埋,按照步骤对切片进行 H&E 染色^[8]。

1.2.4 RT-PCR 及 qPCR 法检测细胞组织中的基因表达

将各部位获得的畸胎瘤切小块研磨,应用 Trizol 法提取细胞总 mRNA,细胞则直接弃去上清后加入 Trizol 提取。经 IMPLLEN 公司的微量核酸蛋白检测仪测定浓度后,采用 TOYOBO 公司的 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 试剂盒反转录为 cDNA,-20℃保存。cDNA 样品用 ddH₂O 稀释后进行半定量 RT-PCR,以检测干细胞标记 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Esg1*、*Fgf4*、*Utf1* 的表达。每 100 μ L PCR-Mastermix 种 10 \times Taq Buffer 10 μ L, dNTP (10mmol/L each) 4 μ L,上下游引物 (10 μ mol/L) 5 μ L, Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L) 3 μ L,各基因引物见表 1, β Actin 为内参。反转录得到的 cDNA 按 1 : 4 稀释,取 1 μ L 作模板,加入到 19 μ L PCR-Mastermix,按 94℃ 1 min、核酸解链温度-5℃ 45 s、72℃ 1 min 循环 25 次,72℃终延伸 10 min 的程序进行 PCR 扩增。

表 1 RT-PCR 引物

基因	上游引物	下游引物	核酸解链温度/℃
<i>Oct4</i>	GCTCAGCCTTAAGAACATGTGTAAGC	GCCTCATACTCTTCTCGTTGGGA	60
<i>Sox2</i>	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	60
<i>Nanog</i>	CAGGTGTTTGAGGGTAGCTC	CGGTTCATCATGGTACAGTC	60
<i>Utf1</i>	GGATGTCCCGGTGACTACGTCTG	GGCGGATCTGGTTATCGAAGGGT	60
<i>Esg1</i>	GAAGTCTGGTTTCCTTGGCAGGATG	ACTCGATACACTGGCCTAGC	60
<i>Fgf4</i>	CGTGGTGAGCATCTTCGGAGTGG	CCTTCTTGGTCCGCCCGTTCTTA	60
β Actin	ATTCTTCGTTGTCAAGCCGCCAAAGTGGAG	AGTTGTTTGCTGCGGAGTTGTTCATCTCGTC	55

Real-Time qPCR 通过 TOYOBO 公司的 SYBR® Realtime PCR Master Mix 试剂盒,应用 ABI Step One™

Real-Time PCR System 检测肝特异性基因 *AFP* 基因的表达水平,*Gapdh* 为内参,各基因的引物见表 2。

表 2 Real-Time qPCR 引物

基因	上游引物	下游引物
<i>Gapdh</i>	CATGGCCTTCCGTGTTCCTA	GCGGCACGTCAGATCCA
<i>AFP</i>	TCTTTCCACTCCACTTTGGC	GGCGATGGGTGTTTAGAAAG

2 结 果

2.1 构建稳定表达红色荧光蛋白的小鼠胚胎干细胞
含 DsRed-Express 的慢病毒三质粒按比例经磷酸钙法转染 293T 细胞 24、48 h 后在荧光显微镜下可见 70%、90% 的细胞发出红色荧光(图 1),证明携带 DsRed-Express 的慢病毒已经在细胞内成功包装,而且转染效率较高。将病毒浓缩液转染 mESCs 24 h 以后,可在荧光显微镜下观察到发红光的克隆。挑选荧光强度较大的单细胞于 96 孔板中二次培养,得到稳定表达红色荧光蛋白的小鼠胚胎干细胞系(Red-ESCs)(图 2(a))。PCR 结果证明 Red-ESCs 携带约 700 bp 的 DsRed 基因(图 2(b))。

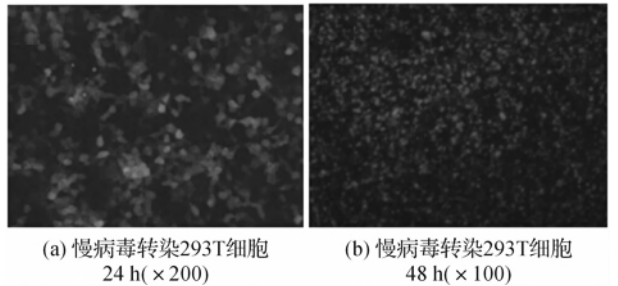


图 1 慢病毒转染 293T 细胞情况

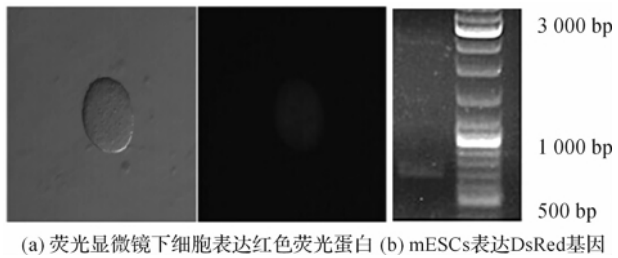


图 2 获得稳定表达红色荧光蛋白的 mESCs

2.2 Red-ESCs 具有多能性

图 3 为半定量 RT-PCR 检测 Red-ESCs 部分多能性基因的结果,一些与干细胞多能性相关的基因如 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 等的表达与未转染的 ESCs 相比没有明显差别。将 Red-ESCs 细胞注射入裸鼠皮下,4 周后可以形成约 1 cm 的肿瘤,图 4 H&E 染色可见肿瘤含有三胚层的组织,证明 Red-ESCs 具有全能性。ESCs 经慢病毒转染后能够表达红色荧光蛋白,转染过程对它的多能性影响不大。

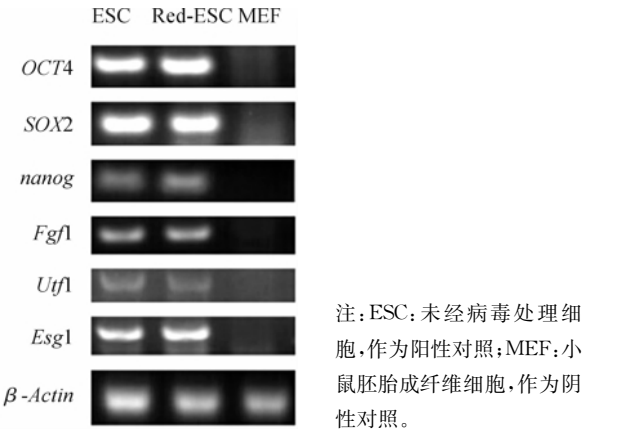


图 3 Red-ESCs 多能性基因的表达结果

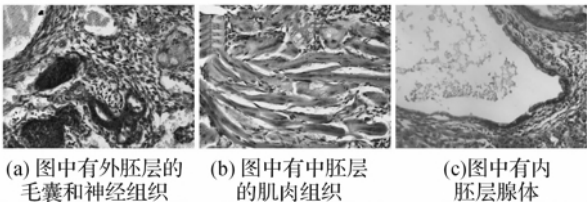


图 4 裸鼠内形成畸胎瘤的 H&E 染色结果

2.3 Red-ESCs 在体内不同部位成瘤

将相同浓度的单细胞悬液注射到 C57 小鼠的皮下,腹腔和肝脏,4 周后处死小鼠,均可在注射部位观察到畸胎瘤的生成。这些畸胎瘤从外观上没有明显的差异,但是图 5 RT-PCR 的结果表明某些多能基因的表达受到了影响,如 *Fgf1*、*Utl1* 在皮下和

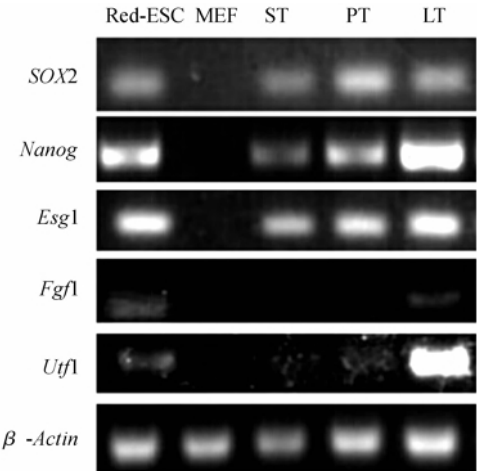


图 5 不同部位畸胎瘤多能性基因的表达
注:Red-ESC;阳性对照;MEF;阴性对照;ST;皮下畸胎瘤;PT;为腹腔畸胎瘤;LT;肝部畸胎瘤。

腹腔的畸胎瘤组织中没有表达,但在肝脏畸胎瘤组织中表达量升高。因为肝部微环境比其他部位要复杂得多,所以我们另外检测了 *AFP* 这个肝部特异性表达的基因。从图 6 qPCR 的结果可以看出,肝部畸胎瘤的 *AFP* 的表达上是远高于其他部位的畸胎瘤。

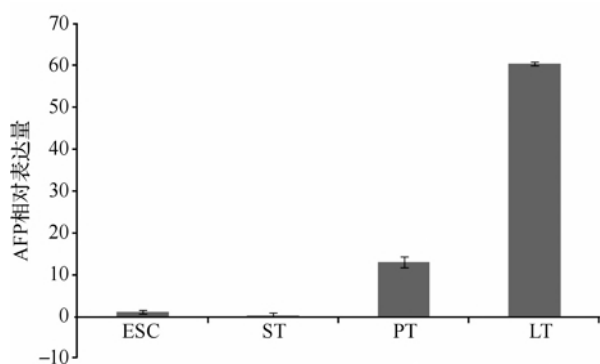


图 6 不同部位畸胎瘤细胞肝特异性基因的表达

注:以 ESC 的 *AFP* 表达量为 1,ST:皮下畸胎瘤,PT:腹腔畸胎瘤,LT:肝部畸胎瘤。

3 讨 论

胚胎干细胞在再生医学和疾病模型研究拥有巨大潜力,自发现以来一直是科学界的研究热点。在不影响 ESCs 的全能性的情况下,建立带有明显标记的胚胎干细胞无疑是为 ESCs 的体外分化和体内研究带来极大的便利。红色荧光蛋白表达稳定,十分适合标记细胞,在不少情况下可以起到与绿色荧光蛋白互补的作用。这项研究中,利用慢病毒将红色荧光蛋白基因导入胚胎干细胞,通过二次筛选得到稳定表达红色荧光蛋白的胚胎干细胞系(Red-ESC)。其后的多能基因检测和裸鼠成瘤试验均表明,插入的 RFP 基因并未对细胞的多能性造成极大的影响,Red-ESCs 仍保有 ESCs 的部分全能性。

尽管在研究中发现体内不同部位 RED-ESCs 都可以形成畸胎瘤,在肿瘤的外观没有明显的差别,但是从 RT-PCR 的结果可以发现,ESCs 的多能性受到了部分影响。虽然 *Sox2* 和 *Nanog* 这 2 个干细胞维持多能性的重要调节基因的表达没有明显的减少,但是 *Fgf1*、*Utf1* 在皮下和腹腔畸胎瘤的表达明显下降,*Utf1* 的表达在肝脏畸胎瘤中却呈上升状态。成纤维细胞生长因子 1(FGF1)受 *Fgf1* 编码,是 FGF 蛋白家族一个重要的成员,参与胚胎发育、细胞增殖、血管形成、组织修复等广泛的细胞生理活动^[9],*Fgf1* 的表达改变对细胞的影响是十分深远的。*Utf1* 基因在维持干细胞的自我更新起到重要的缓冲调节作用,可以通过与 *Myc* 和 *PRC2* 协同作

用维持胚胎干细胞的全能性和长期增殖能力^[10]。肝脏畸胎瘤中 *Utf1* 的表达明显升高可能是胚胎干细胞受到肝脏微环境作用为维持自我更新能力的一个应激反应。

目前,干细胞的体外培养诱导是其进入临床应用的主要途径,科学家已经采用拟胚体诱导、体细胞共培养、三维立体培养等多种方式成功的将人的胚胎干细胞诱导分化为心肌细胞、造血细胞、神经细胞、少淋巴细胞、胰岛细胞等几十余种细胞,并且这些细胞移植入体内能够模拟一定的生物功能^[11-13]。胚胎干细胞之所以不能直接应用于临床的原因是其体内的分化不受控制,若直接注入体内会形成畸胎瘤,引发免疫反应^[14]。畸胎瘤是一类自胚胎性组织的恶性肿瘤组织,其分离得到的细胞兼具肿瘤恶性和多能性,为胚胎癌细胞(EC)。由于胚胎癌细胞特性与肿瘤干细胞特性有相近之处,有学者猜测肿瘤干细胞可能来自于正常干细胞的癌变,有少量存在于成体器官中的胚胎性组织,一般处于静息状态,但是若所处微环境变化,这些残存的胚胎组织会重新开始增殖,但由于相关的调控的缺失,只能产生大量类似胚胎组织的细胞而不能发育成完整的个体,形成肿瘤。因为胚胎组织的这种变化与体内环境相关,故本文通过将胚胎干细胞注射入皮下,腹腔和肝内,观察体内不同微环境对胚胎干细胞的影响。

肝脏是人体一个重要的器官,功能繁多,因此肝脏微环境比皮下或者腹腔要复杂许多,胚胎干细胞可能在这样复杂的环境下获得某些肝特性。我们用 qPCR 法检测肝部畸胎瘤检测的 *AFP* 表达。*AFP* 是幼肝细胞特异性表达的基因^[15],表明有部分细胞在肝部微环境的影响下向着肝细胞的方向分化。值得注意的是 *AFP* 同时也是肝癌细胞的一个标记物^[16],ESCs 在肝脏微环境的影响下也存在着朝肝癌细胞方向恶化的可能性。

4 结 论

通过慢病毒转染的方法成功构建了稳定表达红色荧光蛋白的小鼠胚胎干细胞系,并且标记蛋白的表达对胚胎干细胞的全能性没有明显影响,将该细胞注射入体内不同部位均可形成畸胎瘤。但是这些畸胎瘤细胞在某些多能性基因和组织特异性基因的表达存在着一定的差异,甚至有表达癌症相关的标记基因,说明体内微环境对 ESCs 的影响是复杂多变的,在今后的胚胎干细胞研究中对体内环境应该更加重视。

参考文献:

- [1] 李凌松. 干细胞生物工程研究展望[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001(3): 275-279.
- [2] Pierce G B. Teratocarcinoma: model for a developmental concept of cancer[J]. Curr Top Dev Biol, 1967, 2(2): 223-246.
- [3] 冯 娟, 高 苒, 全雄志, 等. 红色荧光和绿色荧光转基因小鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报. 2007, 15(4): 267-270.
- [4] 王贵利, 白 琳, 陈 炜, 等. 绿色荧光转基因大鼠模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(1): 5-9.
- [5] 樊晋宇, 崔宗强, 张先恩. 红色荧光蛋白的光谱多样性及体外分子进化[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008(10): 1112-1120.
- [6] 郝丽梅, 李唐棣, 梅兴国. 红色荧光蛋白的研究进展[J]. 国外医学: 药学分册, 2006(2): 131-133.
- [7] Ying Q L, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal[J]. Nature, 2008, 453: 519-523.
- [8] 杨宝田. 胚胎干细胞来源的畸胎瘤干细胞研究[D]. 杭州: 浙江理工大学; 2013.
- [9] Raju R, Palapetta S M, Sandhya V K, et al. A network map of FGF-1/FGFR signaling system[J]. J Signal Transduct, 2014, 2014: 962962.
- [10] Jia J, Zheng X, Hu G, et al. Regulation of pluripotency and self-renewal of ESCs through epigenetic-threshold modulation and mRNA pruning[J]. Cell, 2012, 151(3): 576-589.
- [11] Heo J, Factor V M, Uren T, et al. Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver[J]. Hepatology, 2006, 44(6): 1478-1486.
- [12] Vallee J P, Hauwel M, Lepetit-Coiffe M, et al. Embryonic stem cell-based cardiopatches improve cardiac function in infarcted rats[J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(3): 248-260.
- [13] Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, et al. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 23): 5391-5399.
- [14] Nussbaum J, Minami E, Laflamme M A, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response[J]. FASEB J, 2007, 21(7): 1345-1357.
- [15] 李 岩. 小鼠胚胎干细胞定向分化为肝细胞过程中转录组和蛋白质组的动态变化[D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [16] 骆 敏, 杨 帆, 匡志鹏, 等. 血清 GP73、AFP 在小鼠肝癌模型建立中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2013(1): 34-37.

Establishment of Mouse Embryonic Stem Cell Line Marked by Red Fluorescent Protein and Primary Study on Its Tumor in Vivo

ZHAO Wu-yang¹, LIU Tao², QIAN Qi-jun^{1,2}

(1. School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

Abstract: This paper establishes a mouse embryonic stem cell line which can express red fluorescent stably and studies its ability to form teratoma in different parts in vivo. DsRed-Express plasmid is constructed. Calcium phosphate method is used to pack it into lentiviral transfection mouse embryonic stem cells (mESCs). Strong positive clone is gained through screening. The cell characteristics are tested by RT-PCR test and tumor formation experiment in nude mice and C57 mice. Finally, Red-ESCs which can express red fluorescent stably are gained. Red-ESCs can express pluripotent genes, such as *Oct4*, *Sox2* and *Nanog*, and form tumor in nude mice. Teratoma in different parts has differences in gene expression. Teratoma formed in liver expresses hepatic specific gene. Mouse embryonic stem cell line which can express red fluorescent stably is established successfully. Teratoma nature is influenced by internal environment.

Key words: embryonic stem cells; red fluorescence protein; teratoma; hepatic specific gene

(责任编辑: 许惠儿)