

c-Myc对诱导性多能干细胞的诱导效率及全能性影响的研究

魏小元 徐雍羽 王敏 张儒*

(上海市信号转导与疾病研究重点实验室, 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要 本研究探讨转录因子c-Myc对多能诱导干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)诱导效率及形成的iPS克隆全能性的影响。将Yamanaka四因子(Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc, OSKM)和不含c-Myc的三因子(OSK)病毒分别感染OG2小鼠成纤维细胞(mouse embryo fibroblast, MEF), 诱导成为iPS细胞, 通过计数iPS克隆形成数目和流式细胞仪分析iPS克隆的绿色荧光蛋白(GFP)阳性比例, 比较OSKM和OSK诱导iPS的效率。分别挑取三株OSK和OSKM诱导的iPS克隆, 采用荧光定量PCR法、碱性磷酸酶(AP)染色法和免疫荧光法检测iPS克隆的干性相关蛋白的表达; 采用畸胎瘤实验、嵌合体形成实验和四倍体补偿实验检测iPS克隆的全能性。结果显示: 在该实验室诱导体系里, OSK病毒感染MEF后形成的iPS克隆数目明显增多, GFP阳性克隆的比例增加。OSK和OSKM诱导iPS克隆的干细胞基本特征, 包括形态、AP染色、干细胞特异性基因表达、三胚层形成均没有明显差异。然而, OSK诱导iPS克隆在形成嵌合体小鼠的全能性评估实验中的阳性比例高于OSKM克隆, 且只有OSK克隆株能够获得生殖系传递小鼠和四倍体补偿小鼠。该研究表明, 在实验诱导体系里去除c-Myc的三因子OSK诱导iPS的效率显著高于OSKM四因子, 且三因子诱导iPS克隆具有更好的全能性。

关键词 诱导多能干细胞; c-Myc; 嵌合体小鼠; 四倍体补偿小鼠

Influence of c-Myc on Induction Efficiency and Pluripotency of Induced Pluripotent Stem Cells

Wei Xiaoyuan, Xu Yongyu, Wang Min, Zhang Ru*

(Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract This work aimed to investigate the influence of transcription factor c-Myc on induction efficiency and pluripotency of induced pluripotent stem cells (iPS cells). We generated mouse iPS cells from OG2 mouse embryo fibroblasts (MEF) using retroviral virus delivered 4 factors (Oct-4, Sox-2, Klf-4 and c-Myc, OSKM) or 3 factors (Oct-4, Sox-2 and Klf-4, OSK). The number of iPS clones was counted under the microscope. The percentage of green fluorescent protein (GFP)-positive iPS cells was analyzed using flow cytometry. The induction efficiency of iPS was compared between OSKM and OSK. Reprogrammed colonies were picked and expanded into cell lines, which were further subjected to the stemness characterization: pluripotent marker expression, teratoma formation,

收稿日期: 2014-01-21 接受日期: 2014-02-21

国家自然科学基金(批准号: 31071227)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65986852, E-mail: ru.zhang@tongji.edu.cn

Received: January 21, 2014 Accepted: February 21, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31071227)

*Corresponding author. Tel: +86-21-65986852, E-mail: ru.zhang@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2014-03-28 16:51

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0024.html>

chimera formation and tetraploid compensation. In our current induction system, compared to OSKM, our results showed that OSK induced iPS clones more efficiently and led to higher proportion of GFP-positive cells. Randomly picked iPS clones generated by OSKM or OSK possessed similar ES-like morphology, alkaline phosphatase (AP) positive staining, expression of pluripotent genes and ability to differentiate into three germ layers. However, the proportion of chimera generated by OSK clones was higher than OSKM clones and only OSK clones were able to produce chimeric mice with germline transmission and were capable of generating viable, live-born progeny by tetraploid complementation. Thus the present study demonstrated that in our current induction system, omitting c-Myc from the OSKM combination enhanced the reprogramming efficiency and improved pluripotency of generated iPS cells.

Key words induced pluripotent stem cells; c-Myc; chimera; tetraploid complementation

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)和胚胎干细胞同样具有无限增殖和自我更新的能力,但iPS细胞避免了胚胎干细胞存在的伦理等诸多问题,因此是再生医学研究的重大突破。自2006年Yamanaka小组^[1]通过共表达Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc四种转录因子(OSKM)成功将小鼠成纤维细胞(mouse embryo fibroblast, MEF)诱导成iPS以来,该方法已经应用到多个物种,如大鼠、兔、猪、猴、人等^[2-6],被重编程的细胞类型包括成纤维细胞、胃表皮细胞、肝细胞、B淋巴细胞、骨髓细胞和角化细胞等^[2,7-9]。iPS细胞通过四倍体囊胚注射可以获得具有繁殖能力的小鼠,证明其具有和胚胎干细胞同样的真正意义上的全能性^[10]。目前,已经建立了成熟的iPS细胞定向分化成神经细胞、心肌细胞、胰岛细胞等细胞的方法,有望应用于治疗帕金森氏症、脊髓损伤和糖尿病等组织器官缺损或功能障碍等多种疾病。但是,iPS细胞的应用仍然存在生物安全和诱导效率低两大问题。c-Myc是原癌基因,被认为在激活细胞干性基因表达和维持胚胎干细胞干性中起重要作用^[11]。同时,有研究认为,c-Myc可以促进染色质解聚,加快细胞增殖,抑制细胞衰老,从而促进体细胞重编程^[12]。然而,c-Myc重新激活可能导致通过生殖系传递获得的iPS后代中20%的小鼠形成肿瘤,其应用会增加致癌风险,而且过量表达癌相关基因会引起细胞凋亡和衰老^[13-14]。在重编程中,c-Myc并非必需因子,已有报道显示,去除c-Myc的OSK三因子可以诱导iPS,但该iPS产生具有生殖系传递能力的嵌合体小鼠的效率降低^[15]。在本实验室建立的iPS诱导体系中,我们意外地发现,去除c-Myc的OSK三因子诱导iPS的效率明显高于OSKM^[16]。因而在本研究中,我们进一步对OSK和OSKM诱导的iPS细胞的全能性进行了严格鉴定及对比。结果显

示,尽管四因子和三因子诱导的iPS克隆均表达干性特异标记分子,均可形成畸胎瘤,但和四因子相比,三因子克隆产生嵌合体小鼠的比例更高;且只有三因子iPS能够获得具有生殖系传递的嵌合体小鼠和四倍体补偿小鼠。综上所述,在本实验诱导体系中,OSKM中去除c-Myc不影响iPS诱导效率,且三因子诱导iPS比四因子具有更好的全能性,本研究结果对iPS基础研究和临床应用具有较重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

Platinum-E(Plat-E)逆转录病毒包装细胞、质粒(pMXs-Oct4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、pMXs-c-Myc、pMXs-GFP)、Oct4启动子驱动GFP转基因小鼠(OG2)购自南京大学模式动物研究所;SPF级标准健康C57BL/6J、NOD-SCID、ICR小鼠购自中国科学院上海实验动物中心[SCXK(沪)2007-0005号];OG2小鼠原代MEF细胞(OG-MEF)、滋养层细胞由本实验室分离获得。

1.2 制备MEF和滋养层细胞

将携带Rosa26-lacZ等位基因和Oct4启动子驱动GFP表达的转基因OG2小鼠与129小鼠交配。解剖怀孕13.5 d的孕鼠,取出胎鼠,去除头、尾、四肢及内脏后,将剩余部分剪碎,经胰酶消化后加入MEF培养液(含10%胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酸、0.1 mmol/L非必需氨基酸的DMEM培养液)终止,离心收集获得OG-MEF细胞备用。将野生型C57BL/6J小鼠交配,同法分离MEF细胞,传代至5~6代时经60 Gray Co60射线辐照后作为滋养层细胞。

1.3 小鼠iPS克隆诱导及统计

将编码小鼠Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc的pMXs逆转录病毒载体转染plat-E细胞,收集48 h和72 h的

病毒。在病毒感染前一天将原代OG-MEF接种于6孔板中(1.8×10^5 /孔)。次日,将添加含8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 聚凝胺的病毒上清到6孔板中,于2 500 r/min离心99 min后更换培养液继续培养2 d。胰酶消化收集细胞并重新接种至预先铺好滋养层细胞的96孔板中,加入mES培养液(含有15%胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酸、0.1 mmol/L非天然氨基酸、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、1000 U/mL白血病抑制因子、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM培养液)培养4 d后,替换为KSR培养液(含有15% Knockout™ 血清替代物、2 mmol/L L-谷氨酸、0.1 mmol/L非天然氨基酸、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、1000 U/mL白血病抑制因子、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的Knockout™ DMEM培养液),此后每2 d更换一次KSR培养液,更换4~5次培养液后用4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定,用Olympus IX71型倒置荧光显微镜扫描整张孔板并拍摄代表性孔的图像,并用Image-pro软件统计GFP阳性克隆数;或用胰酶消化细胞后用Guava EasyCyte 8HT流式细胞仪(Milipore)进行流式细胞分析,统计GFP阳性细胞比例。病毒感染后约16 d,用口吸管挑选出GFP阳性、形态圆、边界清晰的iPS克隆,在预铺有滋养层细胞的培养板中扩大培养并建系,用于后续鉴定等实验。

1.4 碱性磷酸酶染色及免疫荧光染色

将已建系的iPS克隆(2×10^4 /孔)接种于预铺有滋养层细胞的24孔板中。待克隆生长2 d后,用4% PFA固定细胞,经PBS洗涤后根据碱性磷酸酶(AP)染色试剂盒(Sigma, 85L3R)说明书进行操作。对于免疫荧光染色,细胞固定之后,加入含0.2% Triton的PBS作用20 min破膜,加入抗SSEA1(Santa Cruz, sc-21702)和抗Nanog(Milipore, AB5731)的一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,后经二抗、Hoechst33342染核后使用封片剂封片。将玻片于Olympus FV10i激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.5 PCR检测外源病毒基因插入

胰酶消化iPS克隆,离心收集细胞后提取基因组DNA。使用针对病毒载体pMXs-Oct4、pMXs-Klf4、pMXs-Sox2、pMXs-c-Myc特异性引物检测外源病毒基因插入基因组的情况。

PCR反应条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 30个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 荧光定量PCR检测内源性基因表达

胰酶消化iPS克隆,离心收集细胞沉淀。用Trizol试剂(Roche)提取总RNA,然后逆转录成cDNA。按FastStart Universal SYBR Green Master试剂盒(Roche)说明书要求进行荧光定量PCR(quantitative Real-time PCR, qPCR)。使用特异性针对内源Oct4、Sox2和Nanog、Rex1引物进行检测,以MEF为阴性对照,以小鼠胚胎干细胞系E14细胞(ES)为阳性对照检测内源性基因表达。使用特异性针对病毒载体pMXs-Oct4、pMXs-Klf4、pMXs-Sox2、pMXs-c-Myc设计的特异性引物,以E14胚胎干细胞为阴性对照,以感染过OSKM的MEF细胞为阳性对照检测病毒基因沉默。GAPDH作为内参。qPCR反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。

1.7 畸胎瘤实验

胰酶消化iPS细胞,取 1×10^6 细胞重悬于100 μL mES培养液(不含白血病抑制因子)皮下注射入4周龄NOD-SCID雌鼠大腿内侧,观察畸胎瘤生长情况,iPS细胞接种1~1.5个月后,处死小鼠,取出畸胎瘤,经4% PFA固定,石蜡包埋、切片、H&E染色等步骤后,置于显微镜下观察。

1.8 iPS细胞形成嵌合体小鼠及四倍体补偿小鼠能力鉴定

4周龄ICR雌鼠腹腔注射PMSG和HCG,致其超排卵后与公鼠交配,将见栓的小鼠于1.5 d收集2-细胞期胚胎(2n),继续在KSOM微滴培养皿培养3 d至囊胚。胰酶消化iPS克隆成单个细胞,重悬于无白血病抑制因子的KSR培养液中,在显微操作仪下,每个囊胚注射10~15个iPS细胞,定时把注射过的胚胎放在KSOM微滴中,于培养箱中培养。注射完成后,将16~20个囊胚分别移植到假孕2.5 d的ICR雌鼠子宫中。待17.5 d后小鼠出生,通过检查眼睛颜色及皮肤毛色来判断嵌合与否。在四倍体补偿小鼠的产生实验中,使用CF-150B脉冲发生器(设定为非电解质状态、电压30 V、时间40 μs 、重复次数1)将超排获得的2n电融合成1-细胞期(4n)的胚胎,融合成功的胚胎于KSOM微滴中继续培养至囊胚,同上将iPS细胞注射入囊胚,移植回假孕小鼠子宫,观察小鼠出生情况。

1.9 数据统计

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 形式表示,显著性差

异分析用SPSS 11.5软件进行。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为更加显著, $P < 0.001$ 为极其显著。

2 结果

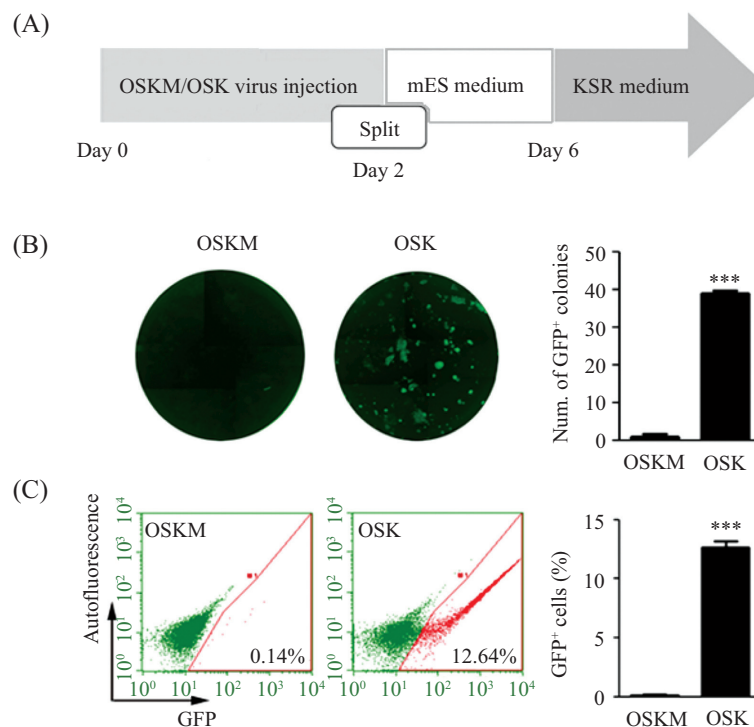
2.1 OSKM和OSK的诱导iPS效率的比较

用携带OSKM或OSK基因的逆转录病毒分别感染OG-MEF,当OG-MEF重编程为iPS时会激活Oct4启动子从而表达干性基因Oct4。OG-MEF因含有Oct4启动子驱动GFP,在重编程为干细胞时会表达GFP,因此,检测GFP阳性细胞或克隆数可以反映OG-MEF重编程的状况。实验流程如图1A所示,在病毒感染约14 d后,可以观察到类似小鼠胚胎干细胞形态且GFP阳性的iPS克隆。通过该重编程体系对OSKM和OSK的诱导效率进行了比较,结果如图1B所示:OSK诱导产生的GFP阳性iPS克隆数明显多于OSKM诱导组。用胰酶消化各组细胞,使用流式细胞仪分析GFP阳性细胞百分比,结果如图1C所示,OSK诱导产生GFP阳性细胞的比例为12.64%,显著高于OSKM组。以上结果表明,三因子诱导体细胞重编程的效率高于四因子。

2.2 iPS克隆内源干性基因的表达和外源病毒基因的沉默

病毒感染后约14 d,挑选出GFP阳性、圆形且边界清晰的iPS克隆进行传代,建系后冻存。随机各挑选三株OSKM和OSK诱导形成的iPS细胞系进行干细胞特性鉴定和全能性比较。首先,提取上述6株iPS细胞系(OSKM-1~3, OSK-1~3)的基因组DNA,以诱导时所用的质粒作为阳性对照,检测病毒基因的在iPS细胞中的整合情况。如图2A所示,所有OSKM和OSK诱导生成的iPS克隆均有与预期一致的外源基因插入整合。

之后,采用qPCR对所获得的iPS克隆中内源性干细胞特异基因的表达及外源病毒基因的沉默进行了检测。以MEF为阴性对照,ES为阳性对照,6株iPS克隆均高表达内源干细胞特异性基因(包括Oct4、Sox2、Nanog和Rex1),且表达水平与ES细胞相当;同时,以病毒感染后4 d的MEF为阳性对照,ES细胞为阴性对照,6株iPS克隆外源病毒基因均未见表达,与ES细胞类似(图2B)。以上结果表明,在我们的诱导体系下所获得的iPS克隆具有公认的干细胞特性。

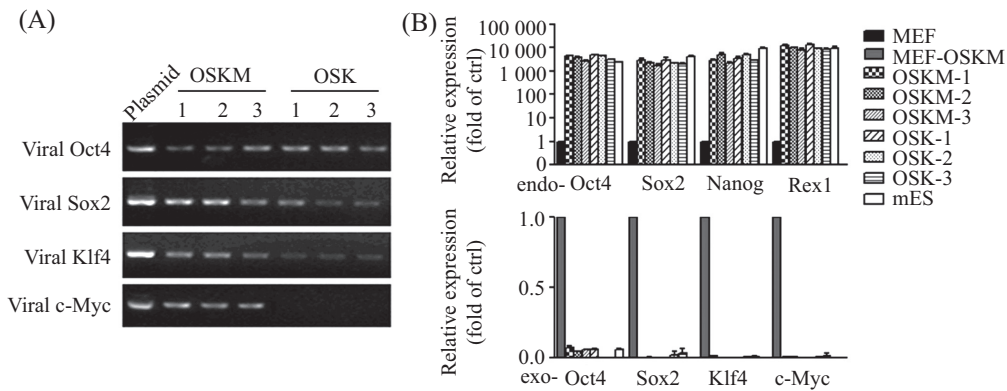


A: iPS细胞的形成的实验操作流程; B: OSKM四因子和OSK三因子诱导OG-MEF重编程图像及其数目统计; C: 流式细胞仪检测GFP阳性细胞百分比图, $***P < 0.001$ 。

A: the schedule of iPS induction; B: representative images and corresponding statistical analysis of OSKM- and OSK-induced reprogramming of OG-MEF; C: representative FACS plots and statistical data of OSKM- and OSK-induced reprogramming of OG-MEF; $***P < 0.001$.

图1 OSKM和OSK诱导iPS效率的比较

Fig.1 The reprogramming efficiency of OSKM and OSK in OG-MEF

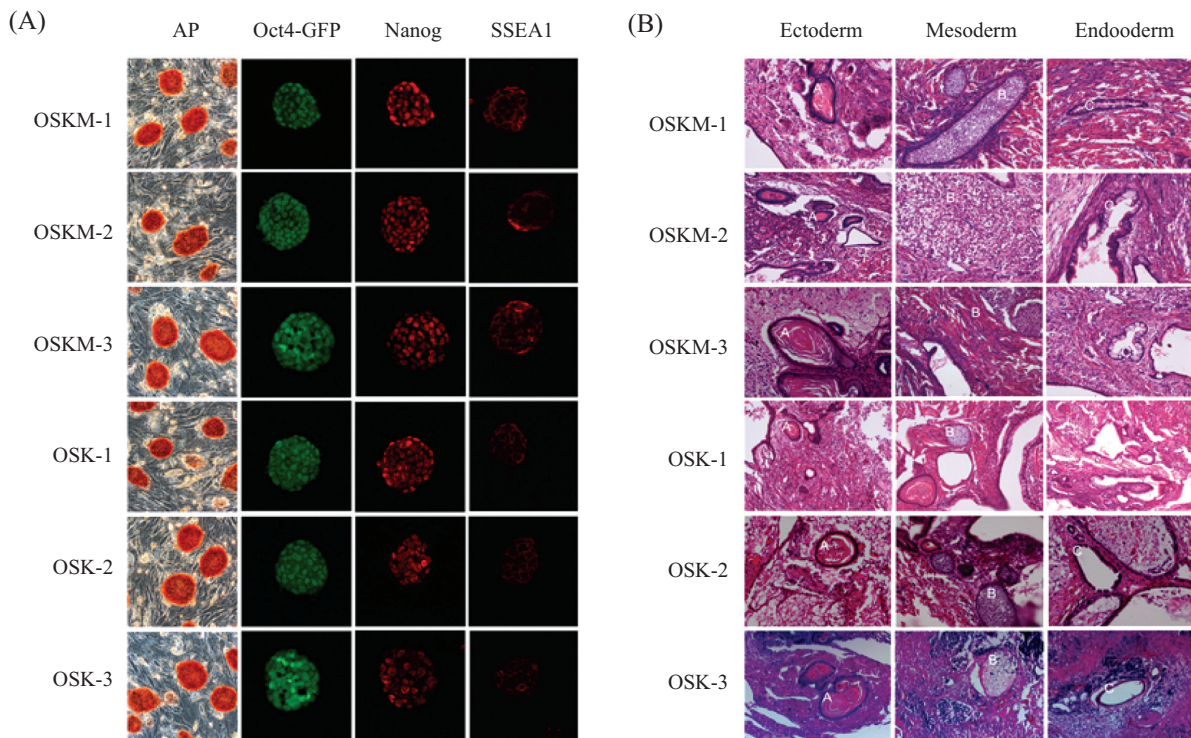


A: 6株iPS克隆病毒DNA的插入鉴定图; B: 荧光定量PCR检测iPS克隆中干细胞特异性基因表达和外源病毒基因沉默。

A: PCR analysis of virus gene integration in iPS clones; B: qPCR analysis of pluripotent genes and exogenous transgene expression in iPS clones.

图2 OSKM和OSK诱导形成iPS克隆内源性干性基因的表达和外源病毒基因的沉默

Fig.2 Validation of virus gene integration and endogenous stemness gene expression in iPS clones induced by OSKM and OSK



A: iPS克隆的碱性磷酸酶染色及干性基因免疫荧光染色图; B: iPS克隆产生的畸胎瘤中三个胚层组织的HE染色图。

A: AP staining and immunofluorescent staining of pluripotent markers SSEA-1 and Nanog in iPS clones; B: hematoxylin and eosin-stained sections of teratomas generated from iPS.

图3 iPS克隆AP染色、干性基因免疫荧光及其产生畸胎瘤三胚层组织染色图

Fig.3 AP staining, immunofluorescence of pluripotent protein and teratoma formation of iPS clones driven by CYT296

2.3 碱性磷酸酶染色及免疫荧光染色检测干性基因表达情况

碱性磷酸酶的活性在干细胞中显著增强,因而AP染色是鉴定细胞干性的常用方法。我们对所建立的iPS细胞系进行AP染色,结果显示,6株iPS细胞系均具有类似胚胎干细胞的形态,强烈表

达Oct4-GFP, AP染色呈阳性;同时,免疫荧光染色显示,6株iPS细胞系均表达干细胞特异性的标记蛋白Nanog和SSEA-1(图3A)。

2.4 畸胎瘤实验

将6株iPS克隆接种至裸鼠皮下后发现,6株iPS细胞系均能形成畸胎瘤。将畸胎瘤固定,石蜡包埋

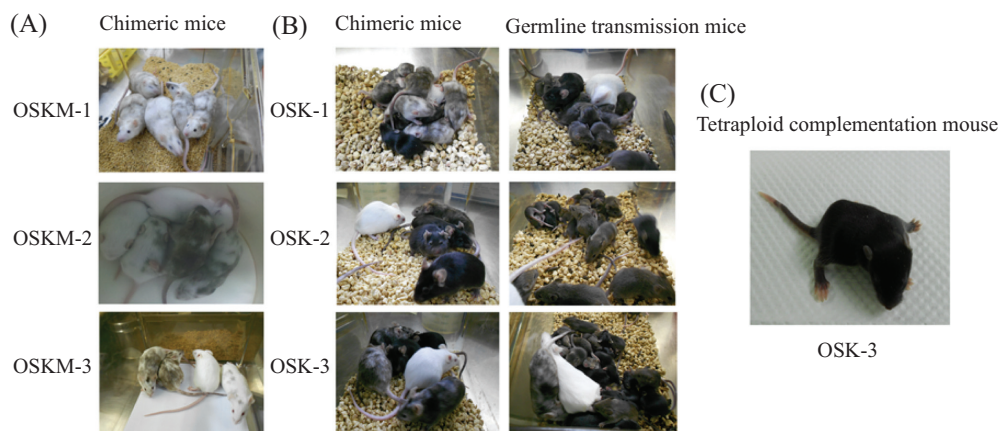
表1 OSKM与OSK诱导的iPS细胞系形成嵌合体小鼠及生殖系传递情况

Table 1 Capacity of chimera contribution and germline transmission in OSKM- and OSK- iPS clones

细胞系 iPS cell line	移植囊胚数 Blastocystes transplanted	总出生数目 Offspring	嵌合数(率) Chimera(%)	F2出生小鼠数* Total F2 number*	生殖传递率 Germline transmission
OSKM-1	40	10	6(60%)	33 (0) 36 (0) 28 (0)	0
OSKM-2	49	9	2(22.2%)	41 (0) 36 (0) 32 (0)	0
OSKM-3	64	12	6(50%)	35 (0) 33 (0) 32 (0)	0
OSK-1	40	12	10(83.3%)	20 (12) 19 (2) 26 (26)	61.5%
OSK-2	32	9	8(88.9%)	28 (28) 30 (30) 27 (7)	76.5%
OSK-3	48	8	6(75%)	17 (17) 20 (20) 12 (12)	100%

*: 括号中数字为因生殖系传递而产生的灰色后代小鼠数目。

*: numbers in bracket indicating agouti coat-colored offsprings generated via germline transmission.



A: OSKM诱导iPS克隆形成的嵌合体小鼠图; B: OSK诱导iPS克隆形成的嵌合体小鼠和生殖传递小鼠图; C: OSK诱导iPS克隆形成的四倍体补偿小鼠图。

A: chimeric mice produced with OSKM-iPS clones; B: chimeric mice and its agouti coat-colored offspring generated with OSKM-iPS clones; C: all-iPS-mice generated by tetraploid complementation with OSK-iPS clones.

图4 OSKM和OSK诱导iPS克隆形成嵌合体小鼠及四倍体小鼠的比较

Fig.4 Comparison of the offspring generated by OSKM- and OSK- iPS clones

后切片, HE染色结果显示, 各iPS细胞系形成的畸胎瘤均能够分化形成三个胚层的组织, 包括外胚层的表皮样结构、中胚层的肌肉样及软骨样结构和内胚层的消化道官腔结构(图3B)。

2.5 嵌合体小鼠实验和四倍体补偿小鼠实验

将6株iPS克隆注射入3.5 d的囊胚, iPS细胞系形

成嵌合体小鼠及其生殖系传递能力情况见表1。结果显示, OSKM和OSK诱导的iPS细胞系均可形成嵌合体小鼠(图4A和4B), OSK克隆平均嵌合率为 $86\% \pm 6.99\%$, 高于OSKM克隆嵌合率($44\% \pm 19.5\%$); 将发育成熟的嵌合体小鼠与ICR小鼠交配, 3株OSKM细胞系均没有产生灰色后代小鼠(生殖系传

递率为0), 而3株OSK细胞系均产生较高比例的灰色后代小鼠(生殖系传递率为79%±19.4%), 表明OSK细胞系具有很好的生殖系传递能力(图4B), 而OSKM细胞系生殖系传递能力欠缺。最后, 我们采用最严格的四倍体补偿实验鉴定iPS细胞的全能性。将能产生生殖系传递能力的OSK细胞系进行四倍体补偿实验, 其中采用OSK-3克隆株(100%生殖系传递率)共注射42个囊胚, 移植至3只代孕母鼠中, 成功产生1个四倍体补偿小鼠(图4C), 表明OSK细胞系具有完全的全能性。我们的实验结果表明, OSK诱导的iPS细胞系较OSKM细胞系具有更好的全能性。

3 讨论

iPS是近年来最令人瞩目的技术之一, 病人自身的iPS细胞可以避免免疫排斥反应, 且来源便捷, 因此给再生医学实践于临床带来了新的曙光。在临床前研究中, 已有iPS细胞成功治疗镰刀形红细胞贫血症、修复视网膜病变和修复耳蜗神经元等报道^[17]。因此, iPS研究具有非常重要的临床应用价值, 但生物安全性和诱导效率问题均制约了iPS研究的进程。iPS细胞的诱导过程是通过表达几个转录因子以改变体细胞的表观遗传, 使其由分化状态诱导成为具有发育多潜能性的类似胚胎干细胞的状态。每个转录因子在该过程中发挥不同的作用, Oct4、Sox2具有调控和维持干细胞的“干细胞特性”, 维持多向分化潜能等功能, 通常Oct4和Sox2相互协同以激活相关的基因的表达; Klf4、c-Myc具有介导细胞增殖、调控细胞周期以及在肿瘤的发生、发展过程中均发挥重要作用^[17]。通常认为c-Myc是通过促进细胞大量增殖, 增加病毒感染效率、抑制成纤维细胞特异性基因表达, 从而促进表观遗传重编程^[18]。有研究表明, 去除Yamanaka四因子中的c-Myc会降低诱导效率^[13]。在本实验室建立的iPS诱导体系中, 不含c-Myc的三因子在重编程早期可以减少MEF的增殖, 显著提高重编程效率, 且形成的克隆小鼠具有更好的全能性。这一点不同于已有的报道, 究其原因可能是诱导体系不同。我们在病毒感染第6 d后, 将含有血清的mES培养液替换为不含血清的KSR培养液, 而已报道的诱导体系的整个过程全部使用mES培养液。我们的前期实验结果表明, 在重编程的前期使用mES培养液, 后期替换为KSR培养液的诱导体系的重编程效率高于全程使用mES培养液的诱导体系;

而使用KSR培养液培养的干细胞内源的c-Myc表达水平低于mES培养液培养的干细胞^[16]; 最重要的是, 不含c-Myc的OSK诱导形成iPS克隆具有更好的生殖系传递能力, 并能够形成四倍体补偿小鼠, 具有完全的发育全能性, 提示不含c-Myc的诱导体系更具优势。前期的研究证实, 染色质异常可以影响ES细胞产生生殖系传递小鼠的能力^[19], 而众所周知, 外源c-Myc基因是原癌基因, 它的引入可以促进细胞大量增殖, 过速的细胞增殖会导致细胞引入突变, 引起DNA损伤及促使产生不正常的染色体数量和结构^[20-21]。因此, 可能会影响OSKM诱导形成的iPS克隆的生殖系传递能力。除了染色质异常, 克隆基因背景、表观遗传修饰情况等也是影响生殖系传递能力的因素, 本研究的后续工作将会通过基因表达谱、表观修饰等实验进一步分析c-Myc去除后诱导的iPS细胞的分化潜能。综上所述, 本研究建立的诱导方法更加高效且安全, 有助于iPS技术的发展和提高其临床应用的安全性, 具有非常重要的意义。

参考文献 (References)

- 1 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 2 Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 2009; 4(1): 11-5.
- 3 Osteil P, Tapponnier Y, Markossian S, Godet M, Schmaltz-Panneau B, Jouneau L, *et al.* Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency. *Biol Open* 2013; 2(6): 613-28.
- 4 Wu Z, Chen J, Ren J, Bao L, Liao J, Cui C, *et al.* Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol* 2009; 1(1): 46-54.
- 5 Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 3(6): 587-90.
- 6 Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141-6.
- 7 Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; 321(5889): 699-702.
- 8 Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, *et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008; 133(2): 250-64.
- 9 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1276-84.
- 10 Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, *et al.* iPS cells

- produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009; 461(7260): 86-90.
- 11 Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005; 132(5): 885-96.
- 12 Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(12): 976-90.
- 13 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
- 14 Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 2(1): 10-2.
- 15 Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(32): 14152-7.
- 16 Xu Y, Wei X, Wang M, Zhang R, Fu Y, Xing M, *et al.* Proliferation rate of somatic cells affects reprogramming efficiency. *J Biol Chem* 2013; 288(14): 9767-78.
- 17 常清, 洪明. iPS 在临床应用的新进展. *现代生物医学进展 (Chang Qing, Hong Ming. Progress in the clinical application of iPS. Progress in Modern Biomedicine)* 2009; 9(21): 4169-71.
- 18 Singh AM, Dalton S. The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell* 2009; 5(2): 141-9.
- 19 Carstea AC, Pirity MK, Dinnyes A. Germline competence of mouse ES and iPS cell lines: Chimera technologies and genetic background. *World J Stem Cells* 2009; 1(1): 22-9.
- 20 Felsher DW, Bishop JM. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(7): 3940-4.
- 21 Prochowik EV, Li Y. The ever expanding role for c-Myc in promoting genomic instability. *Cell Cycle* 2007; 6(9): 1024-9.