

研究论文

胎儿肺组织来源间充质干细胞的分离、
培养、鉴定及重编程初探池 颖[#] 杨少光[#] 徐方运 王有为 韩之波 赵钦军 马凤霞
陈 芳 卢士红 韩忠朝^{*}

(中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 该文主要研究将进行胎儿肺部组织来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells derived from fetal lung, FL-MSCs)转变成成为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)。首先使用酶消化法对胎儿肺部组织进行分离, 然后采用常规方法进行培养并成功获得成纤维细胞样细胞。使用共聚焦技术检测获得的细胞, 发现角蛋白表达呈阴性; 共聚焦技术检测c-Myc、Oct4、Nanog以及Nestin四个干性相关因子, 发现它们呈阳性; 检测成纤维细胞样细胞的免疫表型, 符合间充质干细胞的表型判断标准; 然后进行诱导分化实验, 发现这些细胞可以向成脂、成骨细胞分化, 经过以上实验鉴定获得的成纤维细胞为FL-MSCs。使用Yamanaka四因子体系对FL-MSCs进行诱导, 可以形成类似人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES细胞)的克隆, 采用核型分析、STR检测分析以及畸胎瘤形成实验初步验证获得的克隆为iPS。

关键词 胎儿肺组织来源间充质干细胞; Yamanaka四因子; 诱导多能干细胞

Isolation, Proliferation, Identification and Reprogramming of
Mesenchymal Stem Cells Derived from Fetal LungChi Ying[#], Yang Shaoguang[#], Xu Fangyun, Wang Youwei, Han Zhibo, Zhao Qinjun, Ma Fengxia,
Chen Fang, Lu Shihong, Han Zhongchao^{*}(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract The research is about to reprogramme mesenchymal stem cells derived from fetal lung (FL-MSCs) into induced pluripotent stem cells (iPS cells). At first, we used trypsin to digest the tissue block derived from fetal lung, and then we obtained fibroblast-like cells through the conventional culture method. Detected the immunophenotype and differentiation potential of fibroblast-like cells to confirm that they were FL-MSCs. The expression level of keratin was demonstrated by confocal immunofluorescence, and it was negative. The expres-

收稿日期: 2013-11-19 接受日期: 2014-01-17

国家高技术研究发展计划(“863”计划)(批准号: 2011AA020118)资助的课题

[#]为共同第一作者^{*}通讯作者。Tel: 022-23909186, E-mail: hanzhongchao@hotmail.com

Received: November 19, 2013 Accepted: January 17, 2014

This work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.2011AA020118)

[#]These authors contributed equally to this work^{*}Corresponding author. Tel: +86-22-23909186, E-mail: hanzhongchao@hotmail.com网络出版时间: 2014-05-06 11:11 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0382.html>

sion levels of c-Myc, Oct4, Nanog and Nestin were demonstrated by confocal immunofluorescence, and they were all positive. Then we used Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc to transfect FL-MSCs and got the human embryonic stem cells-like (hES-like) clones. We used karyotype and STR analysis to prove that these clones were derived from the FL-MSCs, and then we got the preliminary evidence about that these clones were iPS by teratoma experiment.

Key words mesenchymal stem cells derived from fetal lung (FL-MSCs); Yamanaka four transcription factors; induce pluripotent stem cells (iPS cells)

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)是本世纪最重要的生命科学热点之一,最先构建出iPS的Yamanaka^[1]获得了2012年诺贝尔生理学或医学奖。随着研究的发展,越来越多的iPS细胞系被构建成功^[2]。我们在研究过程中成功地获得了胎儿肺组织来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells derived from fetal lung, FL-MSCs),经过共聚焦检测发现,Oct4、Nanog、c-Myc和Nestin表达呈阳性,表明FL-MSCs可能具有诱导成为iPS的潜能。随后,我们根据Park等^[3]的Protocol对FL-MSCs进行诱导,获得了人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES细胞)样的克隆,并初步证明所获的克隆为iPS(FL-iPS)细胞。已经有很多研究团队成功地获得了不同组织来源的人源iPS细胞,这些不同组织来源的iPS细胞具有其组织特性,我们获得的FL-MSCs来源的iPS细胞将为肺部组织发育研究提供良好的研究工具^[4-6]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 胶原酶II、胰蛋白酶、DMEM-F12、L-DMEM、MEMα培养基和谷氨酰胺购自GIBCO公司; FBS购自Hyclone公司; 青霉素、硫酸链霉素购自Solarbio公司; bFGF、EGF购自Peprotech公司; 地塞米松、IBMX、胰岛素、消炎痛、抗坏血酸磷酸盐、β-甘油磷酸、油红O、硫酸鱼精蛋白和2-巯基乙醇购自Sigma公司; 硝酸银、亚硫酸钠购自天津市化学试剂二厂; 流式所用小鼠抗人单克隆抗体、同型对照和Matrigel购自BD公司; c-Myc、Oct4、Nanog、Nestin一抗购自R&D公司; 角蛋白购自中杉金桥公司; 非必需氨基酸、荧光标记二抗、rhodamine phalloidin、DAPI和KOSR购自Invitrogen公司; Oct4、Klf4、Sox2和c-Myc四种因子慢病毒购自STEM-GENT公司; Y-27632购自Calbiochem公司。

1.1.2 细胞系 胚胎干细胞系H1由中国医学科学

院血液学研究所重点实验室的胡晓教授和周家喜教授惠赠; K562细胞系购自ATCC。

1.1.3 动物 4~6周龄NOD/SCID雌性小鼠, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.1.4 耗材和仪器 6孔培养板、100 mm培养皿、T75培养瓶、离心管和一次性移液管购自Corning公司; 共聚焦培养皿购自NEST公司。细胞培养箱为美国Thermo公司产品; 共聚焦显微镜的型号为Leica SP2; 荧光倒置显微镜为日本Olympus公司产品; 正置显微镜的型号为Nikon eclipse 80i。

1.2 FL-MSCs的分离、培养和扩增

用手术剪将胎儿肺部组织剪碎至10~100 mm³的组织块, 使用浓度为0.1%的胶原酶II于37 °C条件下消化15 min; 然后使用0.25%的胰蛋白酶37 °C条件下消化20 min。过滤去除未消化的组织。向过滤后的消化液中加入DMEM-F12(DF12)培养基, 并以1 200 r/min离心15 min, 收集细胞。将获得的细胞用完全培养基(含有10% FBS、1%谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 μg/mL硫酸链霉素及10 ng/mL EGF的DF12培养基)以2×10⁴/cm²的密度接种于T75培养瓶中。细胞培养72 h后换新鲜培养基, 所获贴壁成纤维细胞即为第1代FL-MSCs。

所获得的FL-MSCs每隔2~3 d换液1次, 当细胞生长至80%融合时使用0.25%胰酶进行消化, 然后使用FBS终止反应, 离心并收集。将细胞加完全培养基以1:3的比例接种到T75培养瓶中, 即为第2代细胞, 此后按以上方法进行细胞扩增。

1.3 FL-MSCs角蛋白和干性相关因子的表达

取第3代FL-MSCs以1×10⁴/孔的密度接种到共聚焦培养皿中, 培养48 h后吸弃上清。然后将细胞进行固定、破膜, 并分别加入角蛋白以及c-Myc、Oct4、Nanog和Nestin四个干性相关因子的一抗于4 °C下避光孵育过夜, 第二天加入带有荧光标记的二抗室温避光孵育。四个加入干细胞因子抗体的小皿中加入rhodamine phalloidin室温避光孵育20 min。最

后加入DAPI室温避光孵育5 min, 每孔加入2%多聚甲醛1 mL, 使用共聚焦显微镜进行观察检测。

1.4 FL-MSCs表型的流式检测

取第3代FL-MSCs以 2×10^5 /管的密度分装至流式检测管中, 分别加入小鼠抗人单克隆抗体CD34-APC、CD44-APC、CD54-APC、CD90-APC; CD31-FITC、HLA-ABC-FITC、HLA-DR-FITC; CD14-PE、CD29-PE、CD45-PE、CD73-PE、CD105-PE、CD106-PE、CD133-PE、CD144-PE、CD166-PE以及小鼠IgG1同型对照抗体APC、FITC、PE各5 μ L。将加入抗体的细胞于4 °C下孵育30 min后再用1 mL PBS重悬细胞, 离心后取出上清, 用400 μ L PBS重悬细胞, 进行流式检测分析。

1.5 FL-MSCs的分化能力

取第3代FL-MSCs以 3×10^4 /孔的密度接种于6孔板中进行培养, 24 h后加入成脂完全培养基(含有10% FBS、1 μ mol/L地塞米松、0.5 mmol/L IBMX、10 mg/L胰岛素和100 μ mol/L消炎痛的L-DMEM培养基)和成骨完全培养基(含有10% FBS、0.1 μ mol/L地塞米松、0.2 mmol/L抗坏血酸磷酸盐和10 mmol/L β -甘油磷酸的L-DMEM培养基)继续培养, 每隔3 d换液1次。当诱导培养到第21 d的时候, 成脂诱导分化的细胞进行油红O染色、成骨诱导分化的细胞进行Von kossa染色, 观察诱导分化效果。

1.6 Yamanaka四因子病毒感染FL-MSCs: 克隆形成

取第3代FL-MSCs以 1×10^5 /孔的密度接种到6孔板中用完全培养基培养6 h, 然后更换病毒感染培养基(含有10% FBS、50 U/mL青霉素、50 μ g/mL硫酸链霉素及带有Oct4、Klf4、Sox2和c-Myc四种因子慢病毒的MEM α 培养基)并加入5 μ g/mL的硫酸鱼精蛋白。FL-MSCs在此条件下培养24 h后吸弃上清, 用PBS清洗后加入新鲜的病毒感染培养基, 培养72 h后将细胞消化以 $2.5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ /皿的密度接种于预铺了MEF的100 mm培养皿中, 并加入病毒感染培养基培养48 h。随后将病毒感染培养基吸弃, 然后更换为ES培养基(含有20% KOSR、10 ng/mL bFGF、100 μ mol/L非必需氨基酸、100 μ mol/L 2-巯基乙醇、50 U/mL青霉素和50 mg/mL链霉素)并加入终浓度为10 μ mol/L的Y-27632。

每天为感染后的FL-MSCs更换预热的新鲜hES培养基, 如在iPS细胞集落出现前细胞密度过大则以1:3的比例采用ES的传代方法进行传代, 直到出现类

似ES的FL-iPS集落且细胞数达到50~150个即可挑取单克隆并传代, 此克隆即为第一代FL-iPS。

1.7 FL-iPS和FL-MSCs的染色体分析

当第4代FL-iPS和FL-MSCs长到60%融合时加入终浓度为0.4 μ g/mL的秋水仙碱培养6~12 h, 收集细胞分别加入10 mL预热的0.075 mol/L KCL于37 °C低渗处理30 min。加入2 mL甲醇-冰醋酸固定, 然后收集细胞沉淀, 加入10 mL固定液于4 °C静置30 min, 再次收集沉淀重复以上步骤。收集沉淀后以1 mL固定液重悬, 然后进行滴片和染色步骤, 并进行显微镜观察。

1.8 FL-iPS和FL-MSCs对照的STR检测

收集第4代长到60%融合的FL-iPS和长到80%融合的FL-MSCs各 1×10^6 细胞, 按照标准步骤进行冻存, 然后将细胞送公司检测。

1.9 FL-iPS的小鼠皮下畸胎瘤形成实验

当第3~5代6孔板中的FL-iPS长到60%融合时, 采用机械刮取的方法将细胞刮下, 离心收集后将细胞团混合到Matrigel中, 然后将混合细胞的Matrigel注射到NOD/SCID小鼠的右肩部皮下作为实验组。同时, 采用相同的方法将H1细胞、K562细胞和FL-MSCs分别注射到NOD/SCID小鼠的左肩皮下作为对照组。细胞接种6周后处死小鼠, 将形成的瘤体取出, 用10%甲醛固定过夜, 进行石蜡包埋制作石蜡切片, 然后进行HE染色及切片分析。

2 结果

2.1 FL-MSCs形态、角蛋白以及干细胞相关因子的共聚焦检测

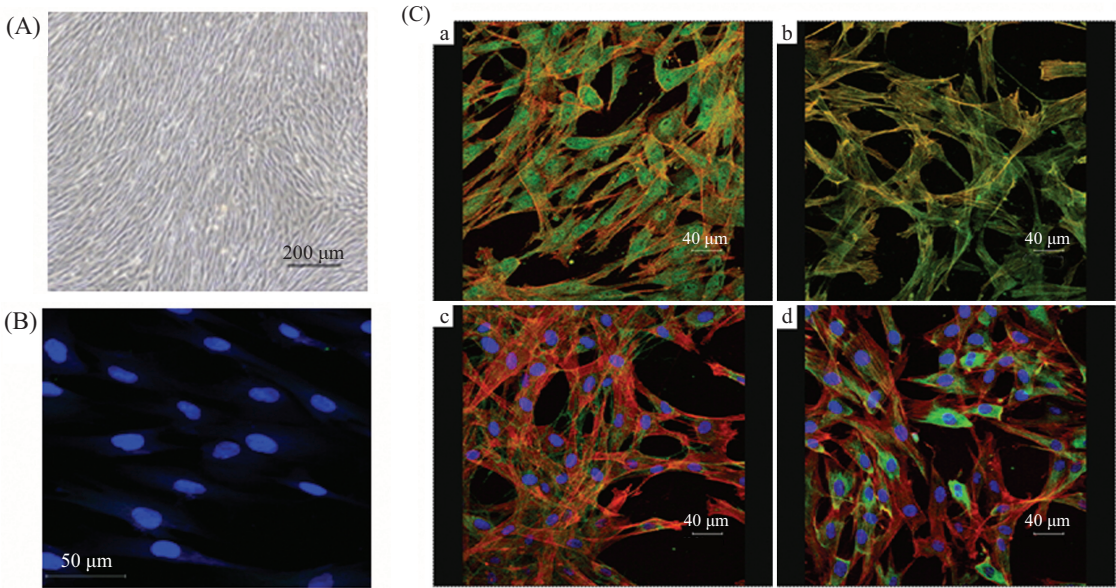
经过传代培养后, FL-MSCs成纤维细胞样并呈密集漩涡状生长(图1A); 取第3代FL-MSCs进行角蛋白、c-Myc、Oct4、Nanog以及Nestin的共聚焦检测。结果表明, FL-MSCs的角蛋白表达为阴性(图1B), 四个干性相关因子共聚焦染色呈阳性(图1C)。

2.2 FL-MSCs的表型测定

第3代细胞经流式检测发现, CD34-APC、HLA-DR-FITC、CD31-FITC、CD14-PE、CD45-PE、CD106-PE、CD133-PE、CD144-PE为阴性表达; CD44-APC、CD54-APC、CD90-APC、HLA-ABC-FITC、CD29-PE、CD73-PE、CD105-PE、CD166-PE为阳性表达(图2)。

2.3 FL-MSCs的诱导分化能力

使用成骨和成脂诱导条件培养基培养第3代FL-MSCs, 21 d后进行成骨显色的von kossa染色和



A: FL-MSCs的形态; B: FL-MSCs的角蛋白表达; C: FL-MSCs四因子表达。a: Oct4; b: Nanog; c: c-Myc; d: Nestin。
A: FL-MSCs under optical microscope; B: Keratin; C: a: Oct4; b: Nanog; c: c-Myc; d: Nestin.

图1 FL-MSCs的形态——角蛋白、Oct4、Nanog、c-Myc以及Nestin的共聚焦检测
Fig.1 Keratin, Oct4, Nanog, c-Myc and Nestin expression level of FL-MSCs

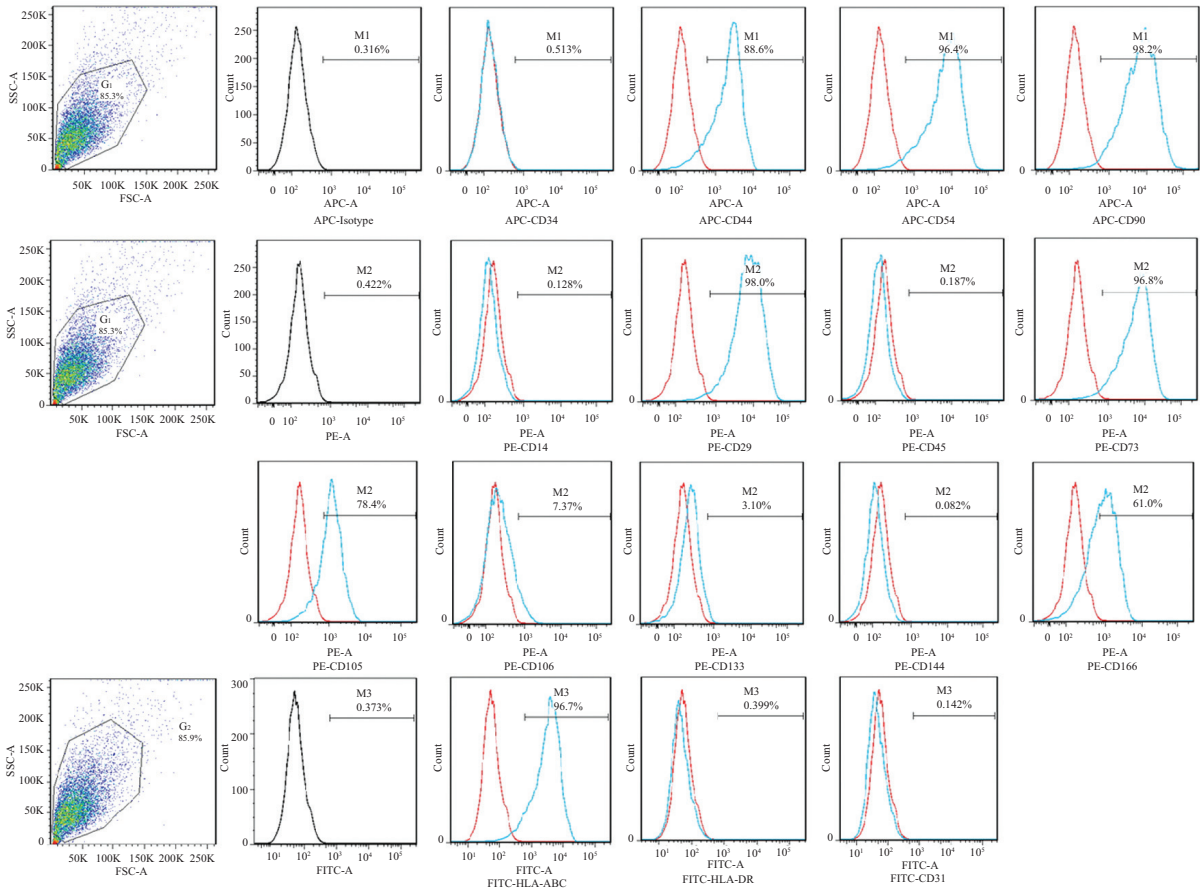
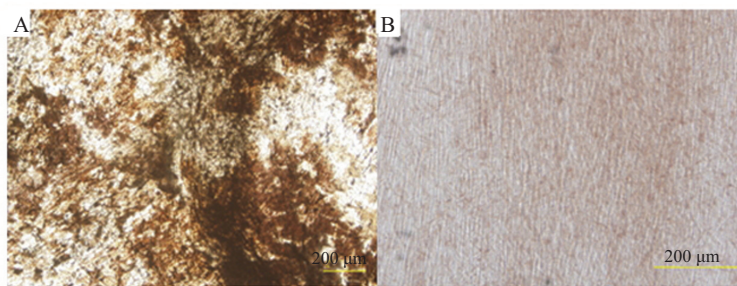


图2 FL-MSCs的表型检测结果
Fig.2 Flow cytometric analysis of immunophenotype of FL-MSCs

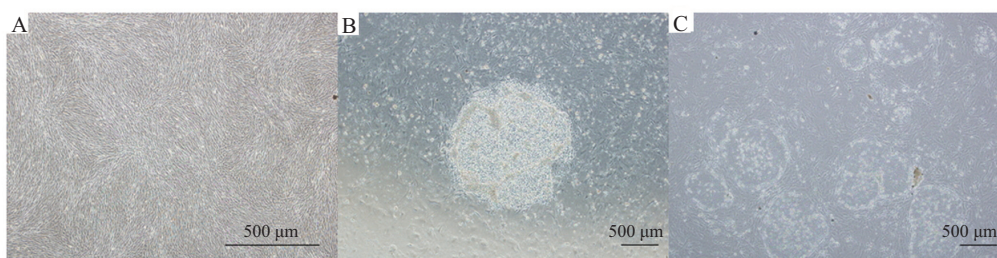


A: 成骨分化的FL-MSCs; B: 成脂分化的FL-MSCs。

A: von Kossa's staining of FL-MSCs treated with osteogenic differentiation medium for 21 days; B: oil red O staining of FL-MSCs treated with adipogenic differentiation medium for 21 days.

图3 FL-MSCs成骨、成脂分化结果

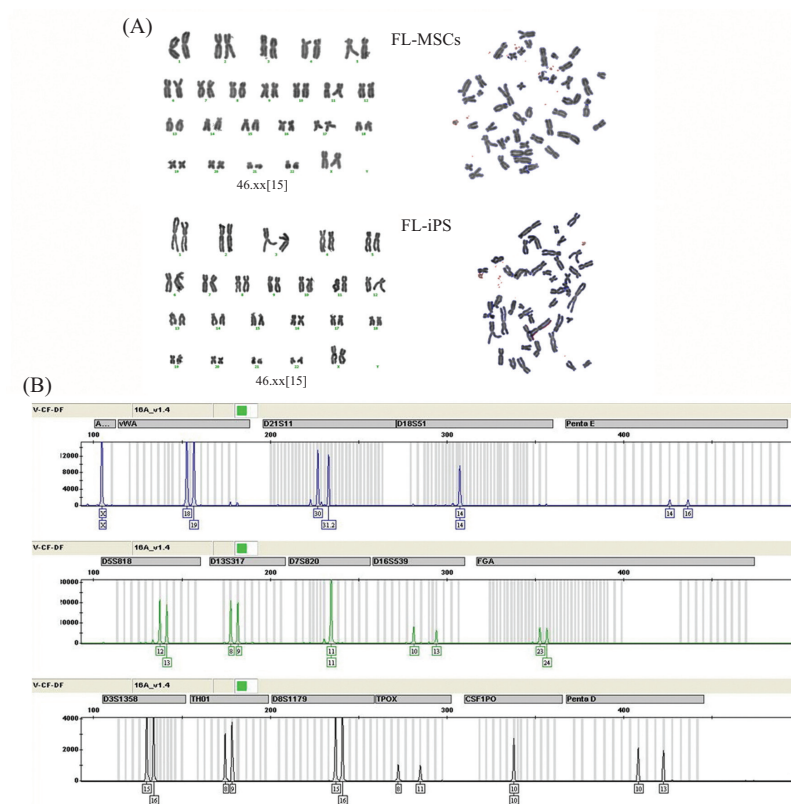
Fig.3 Morphology of FL-MSCs under different conditions



A: FL-MSCs; B: FL-iPS; C: H1.

图4 FL-iPS克隆形成

Fig.4 Clones of FL-iPS

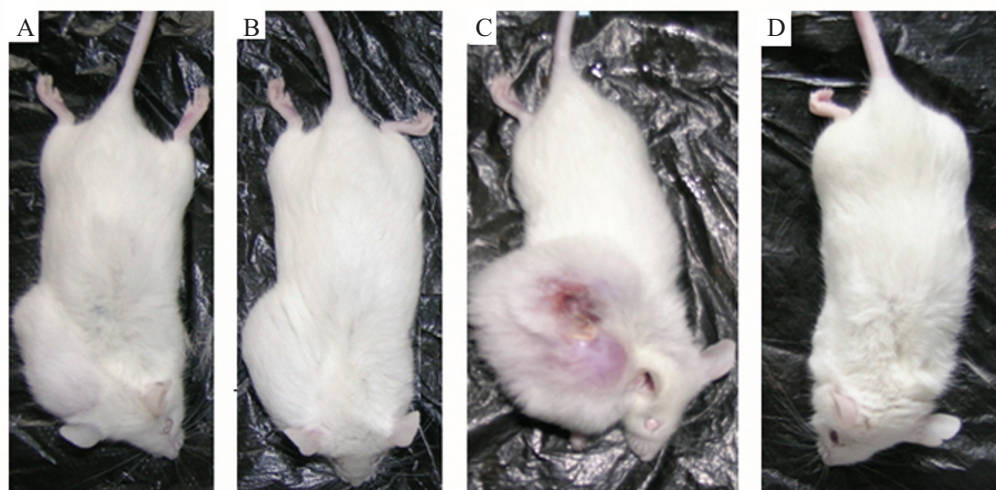


A: FL-iPS的核型; B: FL-iPS和FL-MSCs的STR对照。

A: karyotype analysis of FL-iPS; B: STR analysis of FL-iPS and FL-MSCs.

图5 FL-iPS的染色体和STR检测

Fig.5 Karyotype and STR analysis of FL-iPS

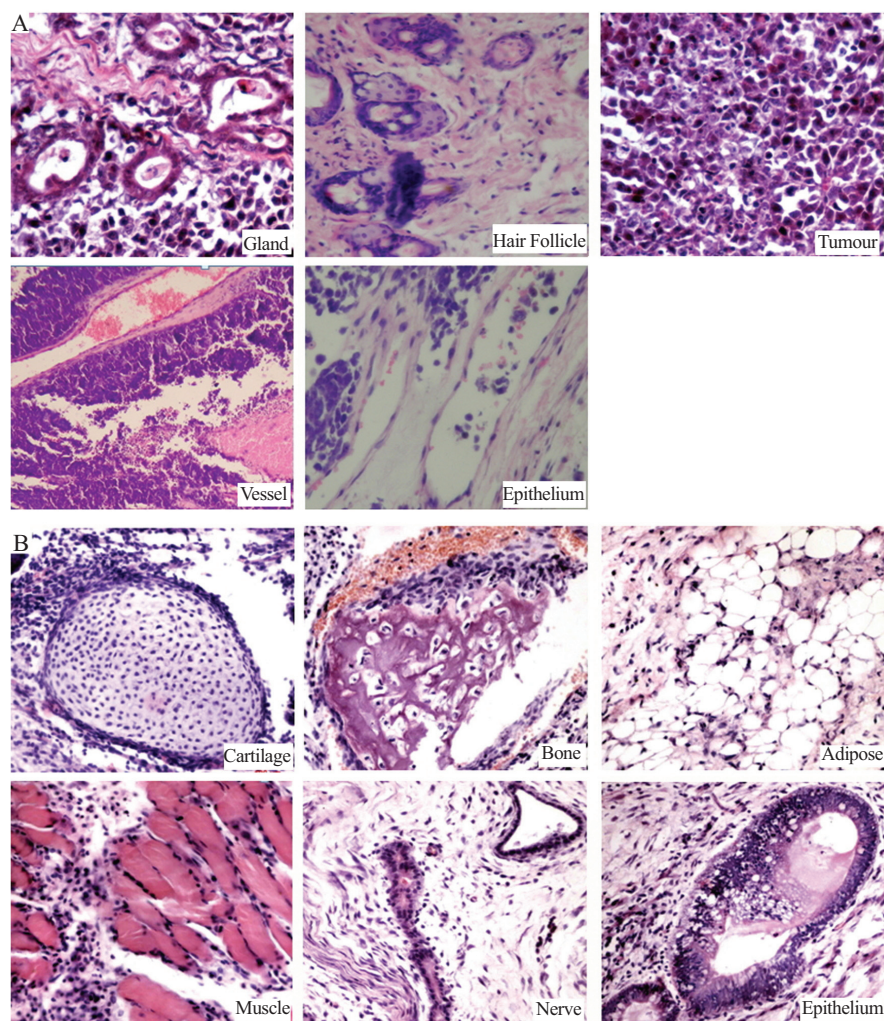


A: FL-iPS组; B: H1组; C: K562组; D: FL-MSCs组。

A: FL-iPS group; B: H1 group; C: K562 group; D: FL-MSCs group.

图6 NOD/SCID小鼠接种细胞6周后形成肿瘤的情况

Fig.6 Tumor formation in NOD/SCID mice after inoculated cells for 6 weeks



A: FL-iPS组; B: H1组。

A: FL-iPS group; B: H1 group.

图7 FL-iPS组和H1组小鼠成瘤部位组织切片的HE染色

Fig.7 H&E staining of the sections from the tumors of FL-iPS group mice and H1 group mice

成脂显色的油红O染色,结果证明,FL-MSCs可以被成功诱导分化为成骨细胞和成脂细胞(图3)。

2.4 FL-iPS的克隆形成

经过Yamanaka四因子病毒感染第3代FL-MSCs形成ES样细胞克隆(图4)。

2.5 FL-iPS的染色体和STR检测

对第4代的FL-iPS染色体进行检测,结果表明核型没有发生异常;与FL-MSCs同时进行STR的检测,结果表明形成的FL-iPS克隆来源于FL-MSCs(图5)。

2.6 FL-iPS畸胎瘤形成实验

取3~5代FL-iPS、FL-MSCs、H1细胞和K562细胞,用Matrigel混合后分别注射到NOD/SCID小鼠的肩部皮下。接种6周后发现FL-iPS组、H1组和K562组均形成肿瘤,FL-MSCs组未发现肿瘤形成(图6)。取成瘤小鼠的瘤组织及FL-MSCs组注射部位的组织进行石蜡包埋切片并进行HE染色,经显微镜观察发现,FL-iPS组形成了类似腺体、毛囊、血管和上皮的组织以及大量的瘤组织,H1组形成类似软骨、骨、脂肪、肌肉、神经和上皮组织,K562组为典型的瘤组织,FL-MSCs组只观察到正常的肌肉组织(图7)。

3 讨论

Yamanaka^[1]在2006年使用Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc转染到小鼠胎儿成纤维细胞中,生成了与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)非常类似的细胞克隆,后被称作诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)。2007年,他们又使用同一个系统成功地将人源成体成纤维细胞重编程获得了人源iPS细胞^[7],同年有许多其他研究组也成功获得了iPS细胞^[8-10]。随后,在全球掀起了iPS细胞研究的热潮。到目前为止,除了成纤维细胞以外的其他类型细胞也都可以被成功地重编程为iPS细胞,如角蛋白细胞、脂肪干细胞、胃细胞、肝细胞、淋巴细胞、神经干细胞和胰脏β细胞^[6,11-12]。另外,也有研究团队报道成功地获得了各种疾病来源细胞的iPS细胞^[13-14]。这些研究表明,不同病理条件下获得的iPS细胞可以作为疾病发生研究的良好模型,并有望成为相关疾病治疗的新靶标;另外,从这些研究中还可以看出,不同组织来源的iPS细胞具有其组织特性,而我们所获得的FL-MSCs来源的iPS细胞可以为肺部组织发育研究提供良好的研究工具。由于iPS细胞能够避免ES细胞在应用时所遇到的伦理学问题,同时不同

组织来源的iPS细胞可以做为相应组织发生发展的良好模型,在应用中还可以避免免疫排斥的问题,所以无论是在未来的研究中还是应用中iPS细胞都具有很大的优势。另外,诱导效率低是iPS细胞研究过程中一个关键的问题,有学者认为实际上在重编程过程中真正被诱导的细胞可能是细胞群中类似于干细胞或祖细胞的一小群细胞^[15]。我们通过实验证明,所获得的细胞为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),从这个观点推断,我们所获得的细胞应该具有更高的iPS细胞诱导效率,在今后的研究中我们将进一步证实这一推论。

在本研究中,我们成功地采用酶消化法对胎儿肺部来源的组织细胞进行了分离并进行了培养,获得了成纤维细胞样克隆。通过免疫表型流式细胞检测、成骨和成脂诱导分化实验证明所获得的成纤维细胞样细胞为间充质干细胞(FL-MSCs)。在对FL-MSCs进行的共聚焦检测实验中,我们发现FL-MSCs的Oct4、Nanog、c-Myc和Nestin为阳性表达,由此判断FL-MSCs有可能诱导成为iPS细胞。随后我们按照George Q Daley的实验步骤对FL-MSCs进行诱导培养获得了ES细胞样的克隆^[3],我们将其命名为FL-iPS细胞。之后的核型检测证明,所获得克隆的染色体没有发生变化,说明细胞没有发生恶性转化;STR检测证明,所获得的克隆来源于FL-MSCs,没有和其他细胞发生交叉污染;而畸胎瘤形成实验证明,获得的细胞克隆具有类似于ES细胞的分化能力,此结果初步说明所获得细胞克隆为iPS细胞克隆。

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 申红芬,姚志芳,肖高芳,贾俊双,肖东,姚开泰. 诱导性多潜能干细胞(iPS cells)——现状及前景展望. *生物化学与生物物理进展* (Shen Hongfen, Yao Zhifang, Xiao Gaofang, Jia Junshuang, Xiao Dong, Yao Kaitai. Induced pluripotent stem cells (iPS cells): Current status and future prospect. *Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2009; 36(8): 950-60.
- 3 Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2008; 3(7): 1180-6.
- 4 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.
- 5 Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, Lippman MA, Steine E, Foreman R, *et al.* A drug-inducible transgenic system for direct reprogram-

- ming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 2008; 26(8): 916-24.
- 6 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.
- 7 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 8 Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, *et al.* *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448(7151): 318-24.
- 9 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 10 Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1): 55-70.
- 11 Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; 454(7204): 646-50.
- 12 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Grreta E, Consiglio A. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1276-84.
- 13 Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, *et al.* Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 460(7251): 53-9.
- 14 Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134(5): 877-86.
- 15 Durcova-Hills G. Induced reprogramming of human somatic cells into pluripotency: A new way how to generate pluripotent stem cells. *Differentiation* 2008; 76(4): 323-25.