

研究论文

建立高效表达猪LIF的猪胚胎成纤维细胞系

杨 宁[#] 赵丽华[#] 张曼玲 金 永 侯道荣 吴兆强 陈 袁 李荣凤^{*}

(南京医科大学江苏省异种移植重点实验室, 南京 210029)

摘要 该文目的是建立高效表达重组猪白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)的猪胚胎成纤维细胞(porcine embryonic fibroblasts, PEF)系PEF-pLIF, 为下一步辅助建立和培养猪naïve胚胎干细胞奠定基础。以猪胚胎成纤维细胞的总RNA为模板, 利用RT-PCR的方法扩增猪白血病抑制因子基因(LIF), 将LIF cDNA连接到真核表达载体pCAGDNA3的启动子下游, 构建LIF基因真核表达载体pCAGDNA3-pLIF; 利用核转染的方法将pCAGDNA3-pLIF质粒转入PEF; 对转染细胞进行G418筛选, 得到稳定高效表达重组猪LIF的PEF-pLIF; 利用RT-PCR、Western blot鉴定PEF-pLIF中LIF基因及LIF表达情况; 使用PEF-pLIF细胞作为饲养层培养小鼠胚胎干细胞, 通过对小鼠胚胎干细胞进行碱性磷酸酶染色及细胞免疫荧光染色, 对PEF-pLIF维持干细胞干性功能进行初步验证。实验结果显示, 成功构建了真核表达载体pCAGDNA3-pLIF; 并将其成功转入PEF中, 获得高效表达重组猪LIF的PEF-pLIF; 以PEF-pLIF作为饲养层成功培养克隆形态正常的小鼠胚胎干细胞。该研究表明, 稳定高效表达重组猪LIF蛋白的猪胚胎成纤维细胞系PEF-pLIF可作为饲养层维持小鼠胚胎干细胞的未分化状态, 可为下一步建立及培养猪naïve胚胎干细胞提供条件。

关键词 猪白血病抑制因子; 猪胚胎成纤维细胞; 饲养层细胞; 小鼠胚胎干细胞

Establishment of Cell Lines of Porcine Embryonic Fibroblasts Effectively Expressing Porcine Leukemia Inhibitory Factor

Yang Ning[#], Zhao Lihua[#], Zhang Manling, Jin Yong, Hou Daorong, Wu Zhaoqiang, Chen Yuan, Li Rongfeng^{*}

(Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract The purpose of this study is to establish the cell lines (PEF-pLIF) of porcine embryonic fibroblasts (PEF) effectively expressing recombinant porcine leukemia inhibitory factor (pLIF) in order to lay the foundation for establishing stable naïve porcine embryonic stem cells (pESCs). The pLIF genes were obtained from the total RNA of porcine embryonic fibroblasts by polymerase chain reaction. The pLIF cDNA fragment was inserted into the eukaryotic expression vector pCAGDNA3 to generate the eukaryotic expression plasmid pCAGDNA3-pLIF. After nuclear transfection of the plasmid pCAGDNA3-pLIF into PEF, the cell lines that effectively express pLIF

收稿日期: 2015-01-22 接受日期: 2015-04-22

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31371487)和江苏高等学校协同创新计划“心血管病转化医学协同创新中心”资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 025-86862059, E-mail: lirf01@126.com

Received: January 22, 2015 Accepted: April 22, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31371487) and the Collaborative Innovation Center for Cardiovascular Disease Translational Medicine of Jiangsu Province

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-25-86862059, E-mail: lirf01@126.com

网络出版时间: 2015-07-03 15:57 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150703.1557.004.html>

stably were screened by G418. The expression of the *LIF* gene and recombinant pLIF was detected by RT-PCR and Western blot. The functions of PEF-pLIF maintaining the characteristics of stem cells were investigated by mouse embryonic stem cells (mESCs) culture, the alkaline phosphates expression detection and immunocytofluorescent. The results showed that the eukaryotic expression plasmid pCAGDNA3-pLIF was constructed successfully. The cell lines expressing effectively the recombinant pLIF (PEF-pLIF) were successfully established and mESCs could maintain formal morphology with them as feeder cells. The PEF overexpressing the recombinant pLIF (PEF-pLIF) were successfully established. As feeder cells, they could keep mouse embryonic stem cells at undifferentiated state. The derived PEF-pLIF cell lines could be possibly helpful for establishing stable naïve pESCs in the future.

Keywords leukemia inhibitory factor; porcine embryonic fibroblasts; feeder cells; mouse embryonic stem cells

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是一种多功能的分泌型细胞因子,可抑制小鼠胚胎干细胞的分化及促进其自我更新^[1]。自1981年建立小鼠胚胎干细胞系以来^[2-3],LIF一直是小鼠胚胎干细胞培养的必备条件。LIF亦是目前已成功建立的大鼠和人的naïve多潜能干细胞培养的必备添加因子^[4-6]。但除小鼠、大鼠和人已成功建立能够稳定传代的naïve多潜能干细胞外,其他物种的naïve多潜能干细胞稳定建系仍罕见报导,其原因之一可能与使用鼠源或人源的LIF有关。虽然LIF在哺乳动物中高度保守,但不同物种之间仍存在差别,而这种差别可能影响其在naïve多潜能干细胞形成过程中的作用。

猪的许多器官在大小和生理功能上和人相似,同时,猪也普遍被认为是异种组织和器官移植潜在的供体,因而猪naïve胚胎干细胞的研究具有很大的育种和实用医疗价值。然而,到目前为止,除Telugu等^[7]外,尚未有成功培养真正稳定传代且具有生殖系嵌合能力的猪naïve胚胎干细胞的相关报道。猪*LIF*基因已于1992年被克隆,猪LIF与人和小鼠LIF氨基酸的同源性分别有87%和78%^[8],尽管LIF在哺乳动物之间高度保守,但仍存在差别,故现有的商业化人源或鼠源LIF对猪naïve胚胎干细胞可能不是最佳选择,但至今猪LIF因子仍未被商品化。饲养层细胞能够分泌很多细胞因子、生长因子、细胞外基质,可以为干细胞提供许多营养物质及适宜的生长环境,在胚胎干细胞系的建立与培养过程中具有重要的作用^[9]。但猪胚胎干细胞的培养一直采用小鼠胚胎成纤维细胞系(murine fibroblasts, STO)或小鼠胚胎成纤维细胞(murine embryonic fibroblasts, MEF)作为饲养层,给其后续的培养及操作带来潜在的不利影响。有研究表明,猪胚胎成纤维细胞(porcine embryonic fibroblasts, PEF)作为饲养层培养猪胚胎干细胞的效果优

于鼠源饲养层^[10]。

综上所述,我们推测,利用表达猪LIF的PEF做饲养层可能比其他物种在培养猪naïve胚胎干细胞方面更有效,且避免了不同物种细胞混杂对后续实验所带来的潜在危害。因此,本文通过构建猪LIF真核表达载体,并核转染PEF,从而获得稳定表达重组猪LIF的PEF饲养层细胞,为下一步培养稳定传代且具有生殖系嵌合能力的猪naïve胚胎干细胞做准备。

1 材料与方法

1.1 材料与主要仪器

高糖DMEM、胎牛血清、0.25% Trypsin-EDTA、MEM NEAA、2-Mercaptoethanol、Phosphate-buffered saline(PBS)和青/链霉素均购自美国Gibco公司;ES-GRO® mLIF Medium Supplement、Alkaline Phosphatase Detection Kit购自Millipore公司;CHIR99021、PD 0325901、DMSO和L-谷氨酰胺均购自Sigma公司;丝裂霉素购自Wako公司;G418购自Invitrogen公司;Nucleofector™ Kits for Primary Fibroblasts购自Amaya公司;pMD18-T vector、各种限制性内切酶、EX Taq、DNA凝胶回收试剂盒、DNA连接试剂盒、各种DNA marker、RNA提取试剂盒RNAiso Plus、Recombinant DNase I(RNase-free)试剂盒和反转录试剂盒High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit等均购自大连宝生物工程有限公司;SYBR® Premix Ex Taq™(Tli RNase H Plus)试剂盒购自Roche公司;质粒小量及大量提取试剂盒购自Tiangen公司;Wizard® Genomic DNA Purification Kit购自Promega公司;LIF一抗购自Santa Cruz公司; Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit anti-Goat IgG(H+L) Secondary Antibody购自Bioworld公司;Potent ECL Kit购自杭州联科生物技术股份有限公司。

大白猪胚胎成纤维细胞(PEF)、小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)和pCAGDNA3-hFat1质粒为本实验室保存,菌株DH5 α 购自天根生化科技有限公司。

定量PCR仪购自Roche公司;PCR仪购自ABI公司;细胞培养箱购自Thermo公司;高速冷冻离心机购自Eppendorf公司;荧光倒置显微镜购自日本Nikon公司;核转染仪购自Amaga公司;凝胶成像仪购自BIO-RAD公司。

1.2 实验方法

1.2.1 猪胚胎成纤维细胞总RNA的提取 准备细胞数约为 1×10^7 的猪胚胎成纤维细胞(PEF),使用RNA提取试剂盒RNAiso Plus,按照说明书进行细胞总RNA的提取。使用Recombinant DNase I(RNase-free)试剂盒去除DNA干扰,按说明书进行操作。使用紫外分光光度计检测总RNA浓度及 D 值测定,样品保存于 -80°C 备用。

1.2.2 重组猪LIF表达载体的构建 根据猪LIF基因序列(GenBank登录号: NM_214402)设计一对用于扩增猪LIF基因cDNA序列的引物pLIF。为实现后续质粒的构建,在上游引物和下游引物中均加入BamH I限制性内切酶识别位点(由下划线部分表示)。上游引物pLIFS为: 5'-TCC GGA TCC GCC CTC TGG AGT TCA GCC CAT AAT G-3',下游引物pLIFA为: 5'-AGG GGA TCC GGT GCT AGG GGA CCT TCC ATC TAG A-3'(引物序列由上海金斯瑞公司合成)。

取2 μg 准备好的猪胚胎成纤维细胞总RNA做模板,使用PrimeScriptTM RT Reagent Kit(Perfect Real Time),根据说明书进行反转录获得猪cDNA。以猪cDNA为模板进行PCR反应扩增猪LIF基因的cDNA片段,PCR反应总体积为25 μL ,包括2 $\times$ Taq Master Mix 11.5 μL ,上游引物pLIFS 1 μL ,下游引物pLIFA 1 μL ,模板cDNA 2 μL ,ddH₂O 9.5 μL 。反应条件如下:95 $^\circ\text{C}$ 预变性5 min;95 $^\circ\text{C}$ 变性30 s,61 $^\circ\text{C}$ 退火30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸1 min,共35个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸10 min。琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,凝胶成像仪照相。并使用Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System试剂盒进行胶回收,具体步骤按说明书进行。

将猪LIF的cDNA片段胶回收产物与克隆载体PMD18T-vector以摩尔数4:1的比例按说明书进行操作,16 $^\circ\text{C}$ 过夜连接;连接产物转化DH5 α 感受态细胞,挑单克隆菌落,命名为pMD18T-pLIF;按质粒小量提

取试剂盒说明书进行质粒提取,使用限制性内切酶BamH I酶切正确后送上海金斯瑞公司进行基因测序。测序结果与GenBank中猪LIF基因序列进行基因比对,测序比对结果正确的pMD18T-pLIF质粒用于下一步实验。

将测序正确的pMD18T-pLIF质粒与基础表达载体pCAGDNA3-hFat1分别用BamH I进行双酶切,并回收长677 bp的猪LIF cDNA片段和长6 828 bp的线性化pCAGDNA3载体片段;按照LIF: pCAGDNA3摩尔比4:1的比例,经T4 DNA连接酶进行16 $^\circ\text{C}$ 过夜连接,转化DH5 α ,提取质粒,使用限制性内切酶Nde I、BamH I和Sma I进行酶切鉴定,挑选连接正确的克隆,即为重组猪LIF表达载体,命名为pCAGDNA3-pLIF。

1.2.3 pCAGDNA3-pLIF质粒的准备 提取重组猪LIF表达载体pCAGDNA3-pLIF质粒,按照无内毒素质粒大提试剂盒(DP117)说明书进行操作;使用限制性内切酶Bgl II对提取的pCAGDNA3-pLIF质粒进行酶切线性化,反应体系400 μL ,反应组分及条件按说明书进行,具体如下: ddH₂O 334.5 μL ; 10 $\times$ H buffer 40 μL ; pCAGDNA3-pLIF环形质粒 5.5 μL ; Bgl II 20 μL ; 37 $^\circ\text{C}$ 过夜。取线性化的pCAGDNA3-pLIF质粒1 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,确认质粒酶切完全后利用乙醇沉淀法回收剩余线性化质粒。具体如下:用2倍体积的乙醇于室温沉淀核酸,震荡混匀,室温静置2 min;用微量离心机于4 $^\circ\text{C}$ 以最大转速离心5 min,收集沉淀的核酸;小心吸去上清,将离心管倒置于纸巾上,流出所有液体;加1 mL 70%乙醇于沉淀中并盖紧管盖颠倒数次,用微量离心机于4 $^\circ\text{C}$ 以最大转速离心2 min,去除所有液体;将管盖打开,置于室温,直至管内无可见液体;用20 μL PBS重新溶解回收DNA,使用紫外分光光度计检测质粒浓度后,储存于 -20°C 备用。

1.2.4 稳定表达猪LIF的猪胚胎成纤维细胞系的建立 于转染前1 d准备大白猪原代胚胎成纤维细胞,铺于60 cm细胞培养皿中,培养液成分为85% DMEM+15% FBS;待转染当天细胞汇合度达80%~90%时,进行细胞转染。利用核转染仪,将5 μg 线性化的pCAGDNA3-pLIF质粒转入 1×10^6 个猪胚胎成纤维细胞中,具体操作步骤按核转染试剂盒说明书进行,转染条件编号为U023。转染后细胞于六孔板中培养,待细胞长至汇合度达95%时,利用0.05%胰

蛋白酶消化细胞后, 按每皿细胞量 $(0.5\sim1)\times10^5$ 传代至10 cm培养皿中培养; 培养24 h后, 以未经转染的猪胚胎成纤维细胞为阴性对照, 进行G418药物筛选。以事先确定的G418对PEF的第7 d最低致死浓度为初始药物浓度即800 $\mu\text{g/mL}$ 进行7~8 d的筛选, 待阴性对照组细胞被完全杀死后, 药物浓度降至500 $\mu\text{g/mL}$, 维持筛选; 于G418筛选第9 d收集多克隆细胞, 命名为PEF-pLIF细胞。传至60 cm细胞培养皿中培养, 待细胞汇合度达到90%左右时利用胰蛋白酶消化收集细胞, 取少量细胞进行LIF表达量的鉴定, 其余冻存备用。

1.2.5 RT-PCR检测 分别选取 2×10^6 个PEF-pLIF细胞和野生型PEF细胞, 使用RNA提取试剂盒RNAiso Plus, 按照说明书进行细胞总RNA的提取。为防止后续PCR时有DNA干扰, 使用Recombinant DNase I (RNase-free)去除所提取总RNA中DNA。使用紫外分光光度计检测总RNA浓度及 D 值测定, 样品保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。分别取2 μg 准备好的PEF-pLIF细胞和野生型PEF细胞的总RNA作为模板, 使用PrimeScript™ RT Reagent Kit(Perfect Real Time)根据说明书分别进行反转录获得猪cDNA。然后, 分别以PEF-pLIF细胞和野生型PEF细胞cDNA为模板, PCR反应扩增猪LIF基因的cDNA片段。PCR反应总体积为25 μL , 包括 $2\times\text{Taq Master Mix}$ 12.5 μL , 上游引物pLIFS 1 μL , 下游引物pLIFA 1 μL , 模板cDNA 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。反应条件如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, 共35个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 并用凝胶成像仪拍照。

1.2.6 定量PCR鉴定 分别以PEF-pLIF细胞和野生型PEF细胞cDNA为模板, 使用SYBR® Premix Ex Taq™(Tli RNase H Plus)试剂盒在Roche LightCycler 96上进行Q-PCR测定细胞中LIF基因的mRNA表达量。反应体系10 μL , 包括SYBR® Premix Ex Taq™ (2 $\times$) 5 μL , 上游引物pLIFS 0.2 μL , 下游引物pLIFA 0.2 μL , 模板cDNA 1 μL , ddH₂O 3.4 μL 。采用两步法PCR反应程序进行, 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共40个循环。最后, 进行检测前PCR反应: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s。Q-PCR反应结束后确认扩增曲线和溶解曲线结果, 制作标准曲线并计算mRNA表达量。

1.2.7 Western blot检测 分别提取 2×10^6 细胞量的PEF-pLIF和野生型PEF细胞的总蛋白, 步骤如下: 利

用胰蛋白酶消化收集细胞, 1 500 r/min离心5 min, 去上清后PBS清洗1次, 1 500 r/min离心5 min后去除PBS, 分别加入200 μL RIPA蛋白裂解液, 充分混匀后置于冰上静置5 min, 然后使用高速冷冻离心机最大转速 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心30 min, 取上清, 检测蛋白浓度。具体方法如下: 用标准蛋白BSA测定标准曲线: 取25 μL 标准蛋白, 分五组, 浓度分别为0, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$, 每组3个复孔, 加入到96孔酶标板中; 取2 μL 待测蛋白, 加8 μL 的去离子水稀释, 加入酶标板中。每孔加入200 μL 的工作液(临用前配制: A液:B液=1:50), 混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 用酶标仪测562 nm波长时的吸光度。根据标准蛋白各组复孔的平均值绘制标准蛋白溶液的吸光曲线。根据标准蛋白吸光密度曲线公式计算待测蛋白浓度。加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5 $\times$)后煮沸5 min, 分装后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

各取25 μg PEF-pLIF和野生型PEF细胞的蛋白上样于10%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 进行电泳。电泳结束后, 将凝胶与PVDF膜一起按要求装至电泳槽内, 加入转膜液, 100 V, 1.5 h, 整个电泳过程在冰浴条件下进行。转膜结束后, PVDF膜取出, 用含5%脱脂牛奶的TBS-T封闭1 h, 然后分别进行两组一抗孵育, 分别为: (1)LIF(1:500, Santa, sc-48575); (2)Tublin(1:5 000, Sigma, T5168), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。结束后用TBS-T洗膜3次, 每次10 min。然后, 分别用HRP标记的抗羊(Bioworld, BS30503)和抗鼠(Thermo, 31430)的二抗室温孵育1 h。孵育完毕后TBS-T洗3次, 每次10 min。将ECL发光液(Potent ECL Kit, 联科生物, P1425)中的A液和B液按要求比例混合后, 滴加到PVDF膜上, 暗室反应1 min, 吸走多余发光液, 于BIO-RAD凝胶成像仪上显影。

1.2.8 饲养层的处理 将PEF、PEF-pLIF、MEF细胞分别用10 ng/mL的丝裂霉素处理3 h后, PBS洗4次, 用0.05%的胰蛋白酶消化2 min, 用含15% FBS的DMEM终止消化并计数; 1 500 r/min离心5 min后用含15% FBS的DMEM重悬细胞, 分别以PEF 0.8×10^4 /孔、PEF-pLIF 0.8×10^4 /孔、MEF 1×10^4 /孔的密度铺于0.1%明胶预处理的四孔板中, 于 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂及饱和湿度条件下培养24 h。

1.2.9 小鼠胚胎干细胞的培养及碱性磷酸酶染色 复苏小鼠胚胎干细胞, 将其分别培养于四种培养体系进行培养: (1)已处理的PEF饲养层细胞及不含小鼠LIF因子的小鼠干细胞培养液(DMEM高糖、15%

表1 免疫荧光染色抗体

Table 1 The antibody used for immunostaining

待检测的细胞多能性因子 Pluripotency markers	一抗 Primary antibody	二抗 Secondary antibody
OCT4	Rabbit anti-OCT3/4 (Santa Cruz Biotechnology)	Goat anti-Rabbit IgG FITC (Abcam)
Nanog	Mouse anti-Nanog (Millipore)	Goat anti-mouse IgG FITC (Abcam)
SOX2	Mouse anti-SOX2 (Calbiochem)	Goat anti-mouse IgG FITC (Abcam)

FBS、2 mmol/L L-Glutamine、0.1 mmol/L NEAA、0.1 mmol/L 2-mercaptoethanol、100 μ L/mL青/链霉素); (2)PEF-pLIF饲养层细胞及不含小鼠LIF因子的小鼠干细胞培养液(DMEM高糖、15% FBS、2 mmol/L L-Glutamine、0.1 mmol/L NEAA、0.1 mmol/L 2-mercaptoethanol、100 μ L/mL青/链霉素); (3)PEF-pLIF饲养层细胞及含小鼠LIF的小鼠干细胞培养液(DMEM高糖、15% FBS、2 mmol/L L-Glutamine、0.1 mmol/L NEAA、0.1 mmol/L 2-mercaptoethanol、1 000 U/mL LIF、100 μ L/mL青/链霉素); (4)MEF饲养层细胞及含小鼠LIF的小鼠干细胞培养液(DMEM高糖、15% FBS、2 mmol/L L-Glutamine、0.1 mmol/L NEAA、0.1 mmol/L 2-mercaptoethanol、1 000 U/mL LIF、100 μ L/mL青/链霉素)。每天更换干细胞液, 4 d传1代。

各组培养了3代后的第6 d, 对培养的小鼠胚胎干细胞进行碱性磷酸酶染色。使用Alkaline Phosphatase Detection Kit(Millipore, SCR004)进行染色, 具体步骤按说明书进行操作。染色完毕后于倒置显微镜上观察染色结果并拍照。

1.2.10 小鼠胚胎干细胞细胞免疫荧光染色 取各组传了3代后的第6 d的小鼠胚胎干细胞, 去除干细胞液, 用PBS洗1次, 5 min后, 用4%多聚甲醛固定10 min; 再用PBS洗3次, 每次5 min; 之后用1% Triton X-100通透1 h; 然后用PBS洗3次, 每次5 min; 用10% Goat serum封闭液封闭1 h后, 加入用封闭液1:200稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C过夜孵育。第二天移除一抗, 用PBS洗3次, 每次5 min; 避光加用封闭液1:400稀释的二抗, 室温避光孵育; 1 h后, 避光移除二抗, 用PBS洗2次, 每次5 min; 之后加入用封闭液1:100稀释DAPI, 室温孵育3 min; 移除DAPI后, 用PBS洗1次, 5 min后加抗淬灭剂DABCO Anti-fade, 观察染色情况。使用的抗体见表1。

1.3 数据统计分析

部分数据采用SPSS 20.0统计软件进行单因素方差分析。进行显著性检验方差分析, $P < 0.01$ 判定

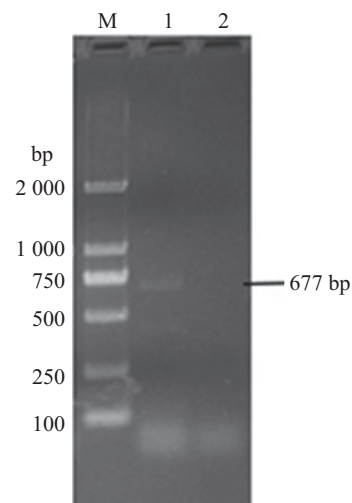
为差异极显著。

2 结果

2.1 重组猪LIF表达载体的构建

2.1.1 pMD18T-pLIF质粒的获得 从PEF中提取的总RNA的 D 值为1.9, 表明RNA纯度较高, 可用于后续实验。取2 μ g PEF的总RNA为模板, 反转录成cDNA; 以PEF的cDNA为模板, 使用猪LIF基因特异引物进行扩增, 获得了677 bp的猪LIF基因的目的cDNA片段(图1)。经胶回收、T载体克隆和转化DH5 α 后获得了全长3 369 bp的pMD18T-pLIF质粒, 经BamH I酶切鉴定, 获得了预期的各种目的片段(图2)。对pMD18T-pLIF的测序结果显示, 获得的目的片段与猪LIF基因序列(GeneBank登录号: NM_214402)同源性为100%, 说明成功获得了猪LIF的cDNA序列。

2.1.2 pCAGDNA3-pLIF质粒的构建 pMD18T-pLIF载体的pLIF片段及pCAGDNA3-hFat1载体的

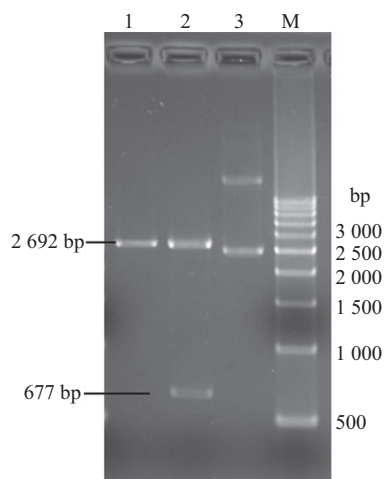


M: DL2000 DNA marker; 1: RT-PCR扩增的pLIF基因; 2: 空白对照(ddH₂O)。

M: DL2000 DNA marker; 1: pLIF gene amplified by RT-PCR; 2: blank control (ddH₂O).

图1 RT-PCR扩增的猪胚胎成纤维细胞的pLIF基因

Fig.1 RT-PCR result of pLIF gene by amplifying the total RNA of PEF



1: 限制性内切酶*Bam*H I酶切pMD18T-vector; 2: 限制性内切酶*Bam*H I酶切鉴定pMD18T-pLIF质粒; 3: pMD18T-vector; M: 500 bp DNA marker。

1: restricted endonucleases digestion of pMD18T-vector with *Bam*H I; 2: restricted endonucleases digestion of pMD18T-pLIF with *Bam*H I; 3: pMD18T-vector; M: 500 bp DNA marker.

图2 pMD18T-pLIF质粒酶切鉴定

Fig.2 Restricted endonucleases digestion of pMD18T-pLIF

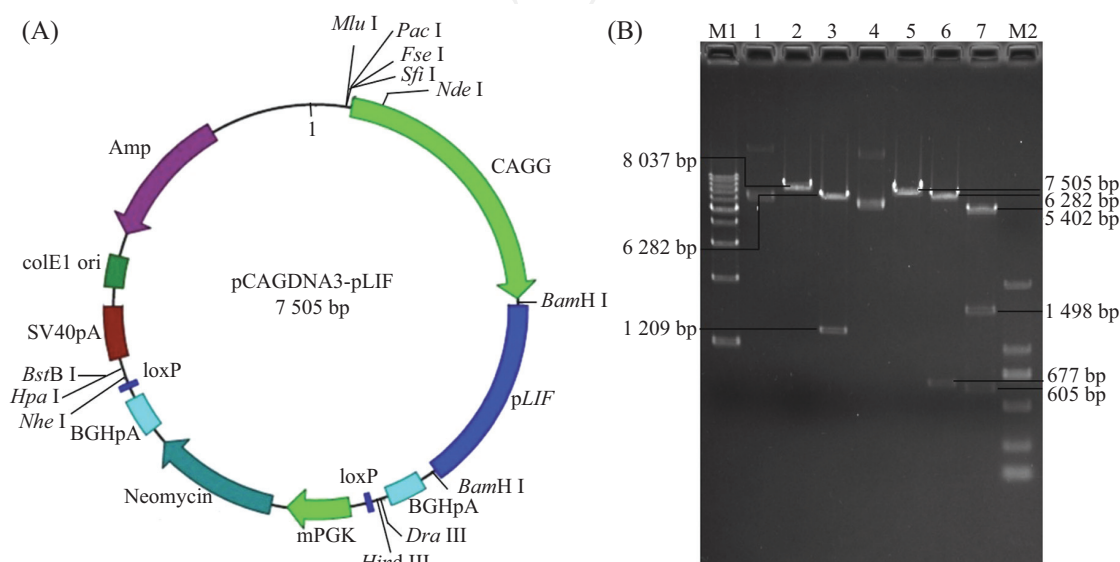
hFat1片段的两端均为限制性内切酶*Bam*H I的酶切位点, 将pMD18T-pLIF和pCAGDNA3-hFat1分别用限制性内切酶*Bam*H I进行酶切后连接获得pCAGDNA3-pLIF质粒, 全长7 505 bp。图3A为pCAGDNA3-

pLIF质粒结构模式图。用*Nde* I单酶切pCAGDNA3-pLIF质粒, 获得7 505 bp的预期的全长质粒片段; *Bam*H I双酶切该质粒, 分别获得677 bp猪LIF基因片段和6 828 bp的pCAGDNA3载体片段; 用*Nde* I和*Sma* I酶切鉴定片段正反连接的情况, 获得了正向连接的605 bp、1 498 bp和5 402 bp的预期目的酶切片段(图3)。以上酶切结果说明, pLIF目的片段已正确连入pCAGDNA3载体, pCAGDNA3-pLIF质粒构建成功。

2.2 稳定表达猪LIF蛋白的猪胚胎成纤维细胞系的建立及鉴定

2.2.1 重组猪LIF基因表达 将线性化的 pCAGDNA3-pLIF质粒通过核转染稳定转入猪胚胎成纤维细胞, 用G418进行筛选, 第9 d收集多克隆, 共得到PEF-pLIF细胞系共17个细胞株。图4为部分细胞克隆图片。

对这17个细胞株分别进行RT-PCR和Q-PCR鉴定, 结果显示, 筛选得到高表达pLIF基因的细胞株PEF-pLIF1~17(图5A和图5B), 与野生型PEF相比, 具有极显著差异($P < 0.001$)。但因不同细胞株间pLIF基因表达水平不一致会导致其对干细胞作用的不

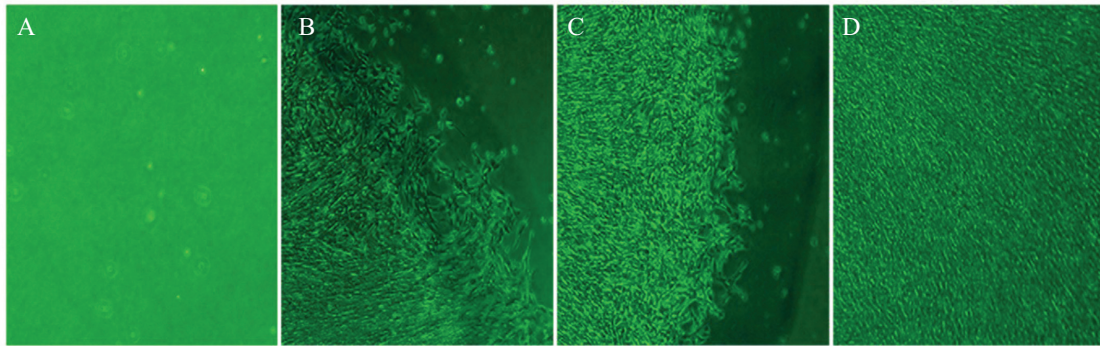


A: pCAGDNA3-pLIF质粒结构模式图; B: pCAGDNA3-pLIF质粒酶切鉴定。M1: 1 Kb DNA marker; M2: DL2000 DNA marker; 1: pCAGDNA3-Fat1质粒; 2: *Nde* I单酶切pCAGDNA3-Fat1; 3: *Bam*H I酶切pCAGDNA3-Fat1; 4: pCAGDNA3-pLIF质粒; 5: *Nde* I酶切pCAGDNA3-pLIF; 6: *Bam*H I酶切pCAGDNA3-pLIF; 7: *Nde* I/*Sma* I酶切pCAGDNA3-pLIF。

A: structure pattern of pCAGDNA3-pLIF plasmid; B: restricted endonucleases digestion of pCAGDNA3-pLIF. M1: 1 Kb DNA marker; M2: DL2000 DNA marker; 1: pCAGDNA3-Fat1 plasmid; 2: restricted endonucleases digestion of pCAGDNA3-Fat1 with *Nde* I; 3: restricted endonucleases digestion of pCAGDNA3-Fat1 with *Bam*H I; 4: pCAGDNA3-pLIF plasmid; 5: restricted endonucleases digestion of pCAGDNA3-pLIF with *Nde* I; 6: restricted endonucleases digestion of pCAGDNA3-pLIF with *Bam*H I; 7: restricted endonucleases digestion of pCAGDNA3-pLIF with *Nde* I/*Sma* I.

图3 pCAGDNA3-pLIF质粒结构及其酶切鉴定

Fig.3 The structure pattern and restricted endonucleases digestion of pCAGDNA3-pLIF

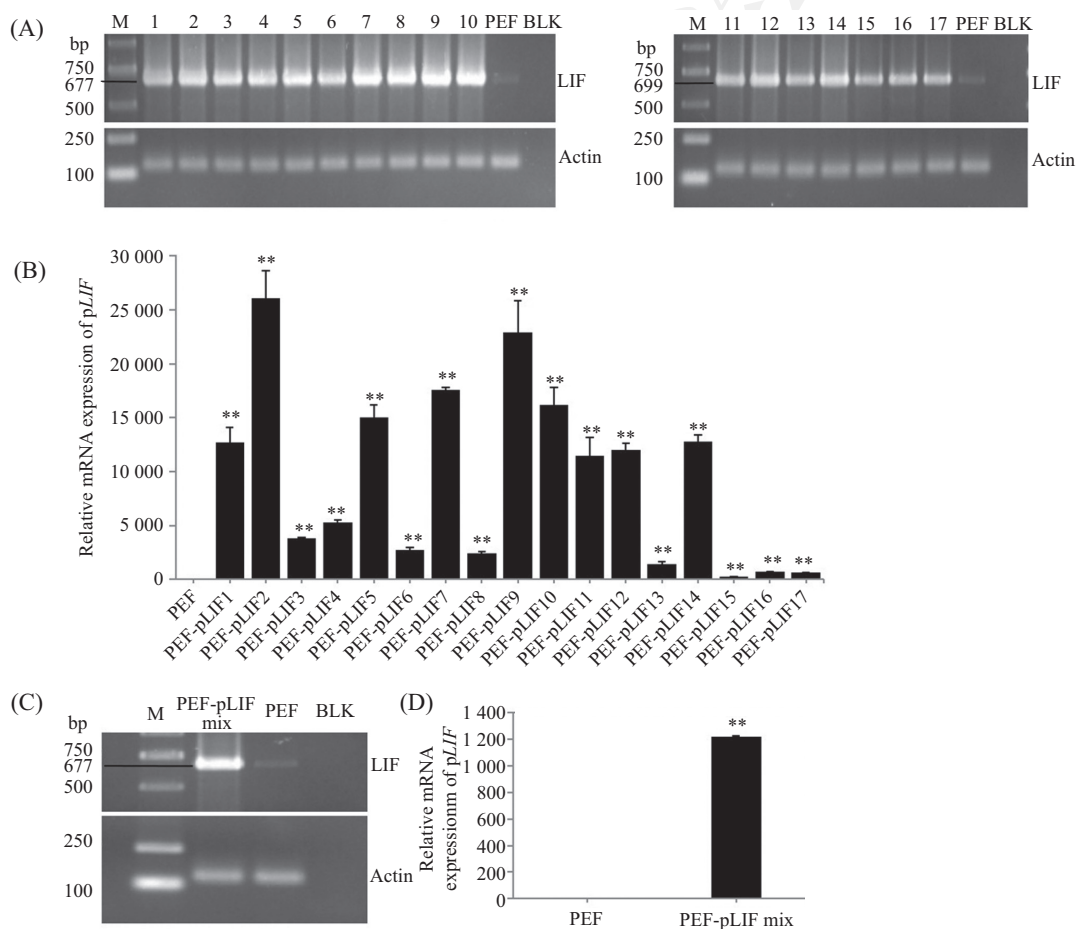


A: 经G418处理的空转阴性对照PEF; B~D: 经G418筛选的PEF-pLIF细胞克隆。

A: negative control, PEF processed by G418; B~D: cell clones of PEF-pLIF selected by G418.

图4 经G418筛选后的细胞克隆(40×)

Fig.4 Cell clones selected by G418 (40×)

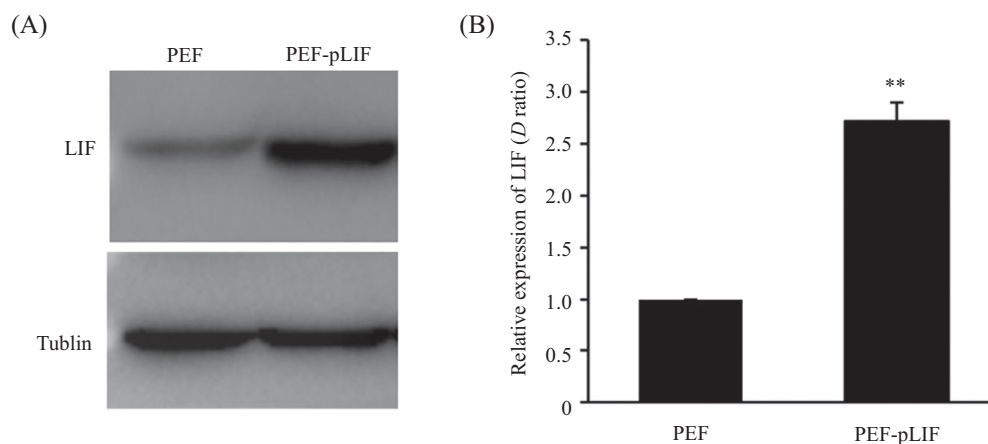


A: 17个PEF-pLIF细胞株经RT-PCR后EB染色。M: DL2000 DNA marker; 1~17: 经药物筛选PEF-pLIF细胞株; PEF: 阴性对照; BLK: 空白对照; B: PEF-pLIF各细胞株经RT-PCR后定量PCR(3次独立实验, 图中数据为平均数±标准差, **P<0.001, 与PEF相比较); C: 混合后的PEF-pLIF细胞株经RT-PCR后EB染色。M: DL2000 DNA marker; PEF-pLIF mix: 混合后PEF-pLIF细胞株; PEF: 阴性对照; BLK: 空白对照; D: PEF-pLIF混合细胞株经RT-PCR后定量PCR(3次独立实验, 图中数据为平均数±标准差, **P<0.001, 与PEF组比较)。

A: ethidium bromide staining of RT-PCR for porcine *LIF* genes of 17 cell strains of PEF-pLIF. M: DL2000 DNA marker; 1~17: 17 cell strains of PEF-pLIF selected by G418; PEF: negative control; BLK: blank control; B: quantitative analysis of RT-PCR for porcine *LIF* genes of 17 cell strains of PEF-pLIF. The graphs showed mean±S.D. of the amount of PCR product obtained in three independent experiments, **P<0.001 vs PEF; C: ethidium bromide staining of RT-PCR for porcine *LIF* genes of PEF-pLIF after mix. M: DL2000 DNA marker; PEF-pLIF mix: the cell strain of PEF-pLIF after mix; PEF: negative control; BLK: blank control; D: quantitative analysis of RT-PCR for porcine *LIF* genes of PEF-pLIF after mix. The graphs showed mean±S.D. of the amount of PCR product obtained in three independent experiments, **P<0.001 vs PEF group.

图5 猪*LIF*基因在PEF和PEF-pLIF细胞中的mRNA表达水平

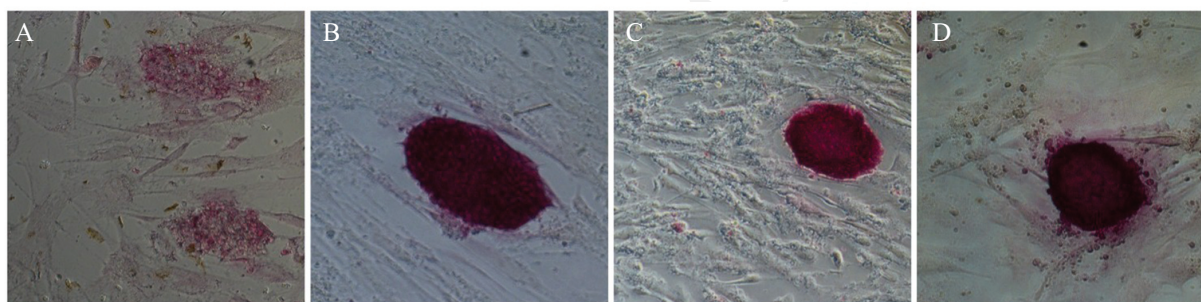
Fig.5 Expression level of mRNA of porcine *LIF* genes in PEF and PEF-pLIF cells



A: LIF表达的Western blot分析; B: LIF蛋白表达水平的定量分析, D 比值为PEF-pLIF细胞LIF表达比PEF细胞LIF表达($n=3$), $**P<0.001$, 与PEF组比较。
A: Western blot analysis of LIF expression in PEF and PEF-pLIF cells; B: protein expression level. D ratio of LIF between PEF and PEF-pLIF cells. Data are reported as mean $\pm$ S.D., $n=3$, $**P<0.001$ vs PEF group.

图6 Western blot分析猪LIF蛋白在PEF和PEF-pLIF细胞中的表达

Fig.6 Western blot analysis of pLIF expressed in PEF and PEF-pLIF cells



A: PEF/小鼠胚胎干细胞培养液(不含LIF); B: PEF/小鼠胚胎干细胞培养液(含LIF); C: PEF-pLIF/小鼠胚胎干细胞培养液(不含LIF); D: MEF/小鼠胚胎干细胞培养液(含LIF)。

A: PEF/culture medium of mESC without mLIF; B: PEF/culture medium of mESC with mLIF; C: PEF-pLIF/culture medium of mESC without mLIF; D: MEF/culture medium of mESC with mLIF.

图7 不同培养体系小鼠胚胎干细胞碱性磷酸酶染色(200 $\times$)

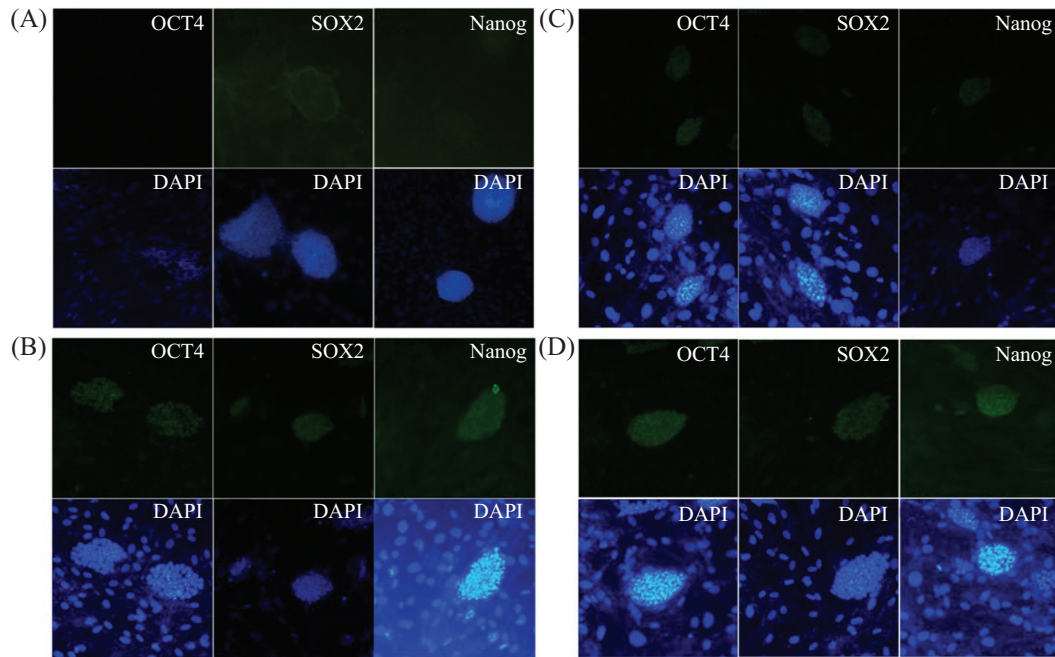
Fig.7 Alkaline phosphates expression of mouse embryonic stem cell indifferent culture systems (200 $\times$)

一致, 故将17个细胞株混合培养, 得到细胞系PEF-pLIF, 并重新进行RT-PCR和Q-PCR鉴定。结果表明, 混合细胞系PEF-pLIF在mRNA水平依然高表达pLIF基因, 且与野生型PEF相比有极显著的差异(图5C和图5D)($P<0.001$)。

2.2.2 重组猪LIF蛋白的表达 提取转染筛选后混合的PEF-pLIF细胞和PEF细胞的总蛋白, 测蛋白浓度分别为1.64 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和4.54 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。以未转染PEF细胞的总蛋白为阴性对照, 两组样品每次各取25 μg 蛋白进行Western blot。实验结果表明, 两组样品在相对分子量约37 kDa处均有LIF条带表达, 但阴性组PEF弱表达而PEF-pLIF组则表达增强, 说明野生型PEF本身有少量LIF表达, 但转染组PEF-pLIF细胞与未转染PEF细胞相比重组LIF表达量有极显著差异($P<0.001$)(图6)。

2.2.3 小鼠胚胎干细胞碱性磷酸酶染色 用PEF/小鼠胚胎干细胞培养液(不含LIF, 阴性对照)、PEF/小鼠胚胎干细胞培养液(含LIF, 阳性对照)、PEF-pLIF/小鼠胚胎干细胞培养液(不含LIF, 实验组)及MEF/小鼠胚胎干细胞培养液(含LIF, 阳性对照)不同培养体系分别培养小鼠胚胎干细胞。在培养3代后的第6 d时, 分别对其进行碱性磷酸酶染色。结果显示, PEF/小鼠胚胎干细胞培养液(不含LIF)培养体系中的干细胞呈现分化状态, 干细胞失去正常形态, 碱性磷酸酶染色弱阳性, 而其余三组培养体系中的干细胞形态正常, 碱性磷酸酶染色阳性(图7), 说明PEF-pLIF细胞可以维持小鼠胚胎干细胞未分化状态。

2.2.4 小鼠胚胎干细胞免疫荧光染色 培养3代后的第6 d对培养的各组小鼠胚胎干细胞进行细胞



A: PEF/小鼠胚胎干细胞培养液(不含mLIF)系统; B: MEF/小鼠胚胎干细胞培养液(含mLIF)系统; C: PEF-pLIF/小鼠胚胎干细胞培养液(不含mLIF)系统; D: PEF/小鼠胚胎干细胞培养液(含mLIF)系统。

A: PEF/culture medium of mESCs without mLIF; B: MEF/culture medium of mESC with mLIF; C: PEF-pLIF/culture medium of mESCs without mLIF; D: PEF/culture medium of mESCs with mLIF.

图8 不同培养系统中小鼠胚胎干细胞多能因子(OCT4、SOX2和Nanog)的免疫荧光检测(200×)

Fig.8 Immunostaining of pluripotent markers of mESCs (OCT4, SOX2 and Nanog) in different culture systems (200×)

免疫荧光染色,结果显示,PEF/小鼠胚胎干细胞培养液(不含LIF)组的小鼠胚胎干细胞基本检测不到OCT4、SOX2、Nanog等干细胞多能因子的表达;PEF/小鼠胚胎干细胞培养液(含LIF)组、PEF-pLIF/小鼠胚胎干细胞培养液(不含LIF)组及MEF/小鼠胚胎干细胞培养液(含LIF)组的小鼠胚胎干细胞均能表达OCT4、SOX2、Nanog等干细胞多能因子,且表达无明显差别(图8)。

3 讨论

猪胚胎干细胞的研究最早见于1990年^[11],一直以来,其建系及培养是研究难点。直到最近,猪类naïve多能干细胞才建立成功^[7,12-13],但能够产生生殖系嵌合体的猪naïve多能干细胞尚未见报道。究其原因,可能与培养体系中未使用猪源的饲养层和LIF有关。故本实验旨在建立稳定表达重组猪LIF的猪胚胎成纤维细胞,期望以其作为饲养层细胞,以猪LIF代替现有的人源或鼠源LIF以避免因种属不同而造成的LIF作用的不同,同时以猪胚胎成纤维细胞代替STO或MEF避免后续实验中鼠源成分污染的风险,从而为创建猪naïve胚胎干细胞的培养系统提供一

种新的可能性。

LIF是一种高度糖基化的蛋白,有6个糖基化位点,根据糖基化程度的不同,其分子量可从20 kDa到67 kDa不等^[14]。本实验蛋白免疫印迹显示,重组猪LIF大约37 kDa,与文献报道的结果相符^[15],该结果可能由于LIF部分糖基化所致,若6个位点全部糖基化,LIF最大分子量可达67 kDa。原核表达系统难以对其进行糖基化修饰,然而LIF是一种分泌型蛋白^[16],其大部分是分泌到细胞外起作用。虽然糖基化和非糖基化形式都有生物学活性^[17],但尽量保持其糖基化特点以使其更好地发挥作用仍是我们设计载体时应该遵循的原则。因此,本实验构建了真核表达载体pCAGDNA3-pLIF,利用真核表达载体pCAGDNA3-pLIF对猪LIF因子进行表达,使其能够正确进行糖基化修饰。另外,pCAGDNA3-pLIF是具有G418抗性的真核表达载体,利用其可以在哺乳动物细胞中进行稳定表达猪LIF基因细胞系的筛选,进而在猪胚胎成纤维细胞中进行LIF基因的稳定表达。LIF属于IL-6家族^[18],其在多种组织和细胞中都有本底表达。本实验证实,PEF中亦有少量LIF分泌,但其分泌量不足以维持干细胞的未分化状态。我们通

过将pCAGDNA3-pLIF质粒转染进PEF细胞, 进行筛选后的细胞可以稳定高表达重组LIF蛋白, 与PEF相比其LIF分泌量有极显著差异。

LIF与受体LIFR-gp130结合^[19-20], 通过JAK2通路使STAT3磷酸化^[21-22], 从而活化其下游转录因子的转录和表达^[23], 进而抑制胚胎干细胞的分化。以PEF-pLIF细胞作为饲养层细胞培养小鼠胚胎干细胞, 碱性磷酸酶和细胞免疫荧光染色结果显示, 在不添加外源LIF的情况下, 以PEF-pLIF细胞作为饲养层细胞的小鼠胚胎干细胞可以维持未分化状态。

综上所述, 本研究证明, 经转染猪LIF基因的猪胚胎成纤维细胞能够成功分泌重组猪LIF蛋白, 以其作为饲养层可以维持小鼠胚胎干细胞未分化状态。该细胞系的成功构建可能为下一步建立及培养猪naïve胚胎干细胞提供更为优化的培养条件, 亦可为后续实验消除潜在不利因素。但后续还需对PEF-pLIF细胞的LIF表达量进行进一步调整和优化, 以使其对干细胞的作用达到最佳效果, 并需在猪naïve胚胎干细胞上做进一步验证。

参考文献 (References)

- Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(6): 2846-51.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7634-8.
- Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1287-98.
- Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, *et al.* Derivation of novel human ground state naïve pluripotent stem cells. *Nature* 2013; 504(7479): 282-6.
- Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008; 135(7): 1299-310.
- Telugu BP, Ezashi T, Sinha S, Alexenko AP, Spate L, Prather RS, *et al.* Leukemia inhibitory factor (LIF)-dependent, pluripotent stem cells established from inner cell mass of porcine embryos. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 28948-53.
- Willson TA, Metcalf D, Gough NM. Cross-species comparison of the sequence of the leukaemia inhibitory factor gene and its protein. *Eur J Biochem* 1992; 204(1): 21-30.
- Nizhnikov ME, Molina JC, Spear NE. Central reinforcing effects of ethanol are blocked by catalase inhibition. *Alcohol* (Fayetteville, NY) 2007; 41(7): 525-34.
- Li M, Ma W, Hou Y, Sun XF, Sun QY, Wang WH. Improved isolation and culture of embryonic stem cells from Chinese miniature pig. *J Reprod Dev* 2004; 50(2): 237-44.
- Strojek RM, Reed MA, Hoover JL, Wagner TE. A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Theriogenology* 1990; 33(4): 901-13.
- Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, *et al.* Generation of naïve-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev* 2013; 22(3): 473-82.
- Telugu BP, Ezashi T, Roberts RM. Porcine induced pluripotent stem cells analogous to naïve and primed embryonic stem cells of the mouse. *Int J Dev Biol* 2010; 54(11/12): 1703-11.
- Gearing DP, Druck T, Huebner K, Overhauser J, Gilbert DJ, Copeland NG, *et al.* The leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) gene is located within a cluster of cytokine receptor loci on mouse chromosome 15 and human chromosome 5p12-p13. *Genomics* 1993; 18(1): 148-50.
- 李明堂, 付 玉, 王清爽, 果洪宇, 李洪广. 猪白血病抑制因子的真核表达与活性分析. *吉林农业大学学报*(Li Mingtang, Fu Yu, Wang Qingshuang, Guo Hongyu, Li Hongguang. Eukaryotic expression of porcine LIF and the assay of its bioactivities. *Journal of Jilin Agricultural University*) 2008; 30(6): 849-52.
- Haines BP, Voyle RB, Pelton TA, Forrest R, Rathjen PD. Complex conserved organization of the mammalian leukemia inhibitory factor gene: Regulated expression of intracellular and extracellular cytokines. *J Immunol* 1999; 162(8): 4637-46.
- Taupin JL, Pitard V, Dechanet J, Miossec V, Gualde N, Moreau JF. Leukemia inhibitory factor: Part of a large ingathering family. *Int Rev Immunol* 1998; 16(3/4): 397-426.
- Gearing DP. The leukemia inhibitory factor and its receptor. *Adv Immunol* 1993; 53: 31-58.
- Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, *et al.* The IL-6 signal transducer, gp130: An oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992; 255(5050): 1434-7.
- Zhang XG, Gu JJ, Lu ZY, Yasukawa K, Yancopoulos GD, Turner K, *et al.* Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J Exp Med* 1994; 179(4): 1337-42.
- Jenab S, Morris PL. Testicular leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor mediate phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT)-3 and STAT-1 and induce c-fos transcription and activator protein-1 activation in rat Sertoli but not germ cells. *Endocrinology* 1998; 139(4): 1883-90.
- Lowe C, Gillespie GA, Pike JW. Leukemia inhibitory factor as a mediator of JAK/STAT activation in murine osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1995; 10(11): 1644-50.
- 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.