

过表达 $FOXN1$ 基因诱导人胚胎干细胞向胸腺 上皮细胞定向分化的研究

林喜娟[#] 汪进平[#] 肖磊^{*}

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310062)

摘要 通过在人胚胎干细胞中过表达转录因子 $FOXN1$ (forkhead box protein N1), 观察细胞形态变化并检测标志基因的表达, 成功地将其定向分化为胸腺上皮细胞。利用TALEN介导的同源重组在人胚胎干细胞中敲入 $FOXN1$ - $mCherry$ 报告元件, 使其能够指示内源 $FOXN1$ 的表达。通过Tet-on诱导表达慢病毒系统在人胚胎干细胞系X-01中过表达 $FOXN1$, 发现人胚胎干细胞逐渐分化, 细胞形态变扁平, 细胞体积变大, 表现出类似胸腺上皮细胞的形态。RT-PCR结果表明, 过表达 $FOXN1$ 后胸腺上皮细胞的标志基因 $TBX1$ 、 $HOXA3$ 、 $EYAI$ 、 $K5$ 、 $K8$ 和内源 $FOXN1$ 的mRNA水平都显著上调, 并且随着诱导时间的延长而增加, 在第12 d达到最高。对诱导后第12 d所得的细胞进行免疫染色可观察到K5(keratin 5)和K8(keratin 8)的表达, 其中19%的细胞表达K5, 45%的细胞表达K8。上述结果表明, 通过过表达 $FOXN1$ 可诱导人胚胎干细胞定向分化为胸腺上皮细胞。

关键词 人胚胎干细胞; $FOXN1$; 胸腺上皮细胞; 定向分化

Study of Direct Differentiation of hESCs to Thymic Epithelial Cells by Overexpressing Transcription Factor $FOXN1$

Lin Xijuan[#], Wang Jinping[#], Xiao Lei^{*}

(College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310062, China)

Abstract By overexpressing transcription factor $FOXN1$ (forkhead box protein N1) in human embryonic stem cells (hESCs), observing cell morphological changes and analyzing gene expression of the hESC-derived TECs, we successfully generated thymic epithelial cells (TECs). We knocked in $FOXN1$ - $mCherry$ reporter element in hESCs by TALEN-mediated homologous recombination. A Tet-on inducible lentiviral system was used to overexpress $FOXN1$ in hESCs. The results showed that after induction, hESCs colonies gradually became flat with enlargement of cells, which was consonant with typical morphology of TECs. RT-PCR results indicated that mRNA level of TEC specific genes including $TBX1$, $HOXA3$, $EYAI$, $K5$ and $K8$, as well as endogenous $FOXN1$ were significantly upregulated. The increase of TEC marker gene expression accumulated over time and reach the top by day 12. Moreover, the expression of $K5$ and $K8$ were detected in the hESC-derived TECs by immunostaining. About 19% and 45% of differentiated cells expressed $K5$ and $K8$, respectively. These results demonstrated that hESCs could be directly differentiated into TECs by overexpressing transcription factor $FOXN1$.

Keywords human embryonic stem cells; $FOXN1$; thymic epithelial cells; direct differentiation

收稿日期: 2015-09-16 接受日期: 2015-11-12

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 0571-88982709, E-mail: leixiao@zju.edu.cn

Received: September 16, 2015 Accepted: November 12, 2015

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-571-88982709, E-mail: leixiao@zju.edu.cn

网络出版时间: 2015-12-28 10:18:52 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151228.1018.004.html>

胸腺是机体关键的中枢免疫器官,它不仅是哺乳动物T细胞发育分化和成熟的场所,而且还可以通过消除自体反应T细胞从而形成自身免疫耐受^[1-2]。胸腺机能障碍将对机体免疫功能带来严重影响,使机体免疫自稳功能紊乱并伴发自身免疫性疾病。对免疫缺陷疾病或胸腺退化个体进行胸腺移植可有效促进T细胞的再生,同时,在做其他移植手术时移植胸腺可诱导免疫耐受的产生从而避免受体对移植物的免疫排斥^[3-5]。目前,胸腺移植治疗先天性无胸腺或发育不全、癌症等免疫缺陷疾病已广泛应用于临床。然而,胸腺来源短缺仍然是目前临床面临的主要问题。

胸腺的发育是一个高度复杂又受到严格调控的动态过程,在内胚层第三咽囊形成胸腺原基^[6-7]。胸腺主要由胸腺细胞与胸腺上皮细胞(thymic epithelial cells, TEC)组成,其中胸腺上皮细胞又分为皮质上皮细胞(cortical TECs, cTECs)和髓质上皮细胞(medullary TECs, mTECs),是构成胸腺微环境最主要的细胞成分^[8-10]。胸腺细胞在胸腺中游走的同时,通过与胸腺上皮细胞相互作用而发育成熟。cTECs主要介导T细胞的阳性选择,而mTECs主要介导T细胞的阴性选择^[11]。这些选择过程保证胸腺细胞最终发育成为成熟的T细胞既具有识别自身MHC分子限制性抗原,又具有对自身抗原耐受的特性。可见,胸腺上皮细胞是胸腺微环境中最重要的组成部分。

FOXN1对胸腺上皮细胞的发育起着至关重要的作用。FOXN1等位基因缺失小鼠(即裸鼠)胸腺萎缩,不产生成熟的T细胞,形成严重的免疫缺陷^[12]。人的FOXN1基因突变后,会造成免疫缺陷、秃发、指甲营养不良等症状^[13]。FOXN1转录因子是翼状螺旋/叉头型转录因子家族成员,包含一个特有的fork-head DNA结合结构域。它是胸腺上皮发育过程中重要的转录因子,对于cTECs和mTECs的产生都是必需的^[14-15]。Clare Blackburn小组在老年小鼠的胸腺上皮细胞中过表达FOXN1使退化的胸腺再生,胸腺大小和产生的T细胞数量均有所增加^[16]。此外,他们通过过表达FOXN1成功将小鼠胚胎成纤维细胞重编程为胸腺上皮细胞,最终在体内培育出一个功能正常的胸腺组织^[17]。可见,FOXN1对胸腺上皮细胞的分化和发育具有至关重要的作用。

自Thomson等^[18]建立第一株人胚胎干细胞系以来,人胚胎干细胞在再生医学领域的应用前景受到

越来越多研究者的关注。人胚胎干细胞具有自我更新能力和多分化潜能。目前已报道的自胚胎干细胞诱导分化的细胞主要包括造血细胞、心肌细胞、神经细胞、脂肪细胞、胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞、成骨细胞、软骨细胞和黑素细胞等^[19-23]。研究胚胎干细胞体外定向分化不仅可以加深对细胞全能性和细胞分化机制的了解,而且为细胞治疗以及组织器官移植供体的来源提供了重要的实验依据。因此,通过体外定向诱导人胚胎干细胞分化为胸腺上皮细胞对免疫缺陷疾病的治疗具有重要的意义。Lai等^[24]通过在细胞培养基中加入外源生长因子成功将小鼠胚胎干细胞定向分化为胸腺上皮细胞,并且分化所得的胸腺上皮细胞与骨髓共同移植到小鼠体内,可促进小鼠T细胞的重建^[25]。2013年,Parent等^[26]与Sun等^[27]同时在*Cell Stem Cell*上报导了在体外将人类胚胎干细胞定向分化为胸腺上皮细胞并能在体内促进T细胞的成熟,同样他们用的方法也是通过外源因子或小分子诱导胚胎干细胞分化。2015年,Su等^[28]通过小分子与重组FOXN1蛋白与重组HOXA3蛋白成功将人类胚胎干细胞分化成胸腺上皮细胞。这些研究为胚胎干细胞向胸腺上皮细胞定向分化的研究奠定了扎实的基础。

本研究采用了经典的诱导外源基因表达的Tet-on系统^[29],在人胚胎干细胞中过表达FOXN1,成功地将人胚胎干细胞定向分化为胸腺上皮细胞。以人类胚胎干细胞为基础,成功构建了胸腺上皮细胞定向分化的模型,为人类胚胎干细胞的临床应用奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚胎干细胞系X-01由本实验室建立^[30];FuGENE HD转染试剂购自Promega公司;细胞直接PCR试剂盒购自Life Technologies公司;LV-EF1 α -rtTA-IRES-puro和LV-EF1 α -eGFP-TRE-Foxn1慢病毒质粒由实验室原有质粒LV-EF1 α -eGFP-TRE-Oct4改造而成;人类胚胎干细胞培养液(含bFGF/不含bFGF)以及小鼠胚胎成纤维细胞(CF1, P3辐照后)由上海斯丹赛生物技术有限公司提供;无需饲养层的人胚胎干细胞维持培养基mTeSR1购自STEMCELL公司;胰蛋白酶替代物TrypLE购自Invitrogen公司;强力霉素购自Sigma公司;鼠抗人K8抗体购自R&D公司;

兔抗人K5抗体购自Abcam公司; 兔抗鼠二抗和羊抗兔二抗购自Abcam公司; 反转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 293T细胞用含10% FBS的DMEM培养, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 隔天传代。小鼠胚胎成纤维细胞(CF1, P3辐照后)提前2 d铺在基质胶处理过的培养瓶中作为人胚胎干细胞的饲养层细胞, 用含10% FBS的DMEM培养, 人胚胎干细胞传代之时将培养基换成人类胚胎干细胞培养液(含bFGF), 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 一周传一次代。无饲养层细胞的人胚胎干细胞用干细胞维持培养基mTeSR1培养, 6 d传一次代。诱导分化细胞用含4 μg/mL强力霉素的人类胚胎干细胞培养液(不含bFGF)培养。

1.2.2 TALENs的设计及效率检测 在FOXNI基因的第一个外显子上设计两套TALENs, 由斯丹赛生物技术有限公司合成TALENs质粒。在293T细胞中验证TALENs的打靶效率。利用FuGENE HD转染试剂, 将TALENs表达载体导入293T细胞中, 药筛3 d后收集细胞, 直接PCR并测序验证TALENs的效率。选择效率最高的一对TALENs进行后续实验。

1.2.3 建立携带FOXNI-mCherry报告元件的人胚胎干细胞系 利用FuGENE HD转染试剂将效率高的一对TALENs与FOXNI-mCherry重组质粒导入人胚胎干细胞系X-01中, 用50 μg/mL G418药筛10 d后, 用TrypLE将克隆消化成单细胞后重新铺到CF-1饲养层细胞上, 细胞密度为500/cm²。CF-1饲养层细胞提前2 d以30 000/cm²的密度铺在基质胶处理过的培养瓶上。一周后, 挑出单细胞形成的细胞克隆进行细胞直接PCR鉴定, 鉴定成功的即为FOXNI-mCherry人胚胎干细胞系。

1.2.4 构建慢病毒质粒 根据人FOXNI基因序列(GenBank登录号: NM_003593.2)设计一对用于扩增人FOXNI基因cDNA序列的引物。在上游引物和下游引物中分别加入BamH I和Sal I限制性内切核酸酶识别位点。上游引物: 5'-GCG CGG ATC CAT GGT CTC GCT ACC CCC GCC-3', 下游引物为: 5'-GGG GGT CGA CTC ATG CCA GGG CCA CGG GCT-3'(引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成)。用人胚胎成纤维细胞总RNA反转录获得的人cDNA做模板进行PCR扩增人FOXNI基因的

cDNA片段。胶回收人FOXNI基因的cDNA片段, 用BamH I和Sal I酶切胶回收产物过夜。同时用BamH I和Sal I酶切LV-EF1α-eGFP-TRE-Oct4质粒。酶切完全后, 用DNA分离纯化及胶回收试剂盒(Tiangen公司)纯化, 经过T4连接酶进行16 °C过夜连接, 转化GBE180。提取质粒, 酶切鉴定正确后送铂尚生物技术(上海)有限公司进行基因测序。测序结果与GenBank中人FOXNI基因序列进行比对, 测序正确的质粒即为携带人FOXNI基因的慢病毒质粒, 命名为LV-EF1α-GFP-TRE-Foxn1。

1.2.5 慢病毒包装 将293T细胞传代至预先铺有明胶的T75培养瓶中, 每个T75培养瓶接种1 200万个细胞。在37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h后, 待细胞密度长至80%~90%汇合率时适合包装病毒, 转染前无需换培养基。转染每瓶T75的混合成分包括: 含cDNA的Lv质粒10 μg, pVSVG 5 μg, delta8.91 7.5 μg, optiMEM补足至1 mL。混匀后再加入50 μL FuGENE HD转染试剂, 颠倒混匀后室温静置15 min, 即可加入T75培养瓶中。转染后24 h观察荧光亮度并计算转染效率。更换培养基, 分别收集48 h和72 h两个时段的病毒上清, 计算病毒滴度, 收集后置于4 °C冰箱保存; 病毒如需长期保存, 可分装后置于-80 °C保存。

1.2.6 建立可诱导FOXNI过表达的人胚胎干细胞系 用包装好的FOXNI与rtTA慢病毒感染人胚胎干细胞系X-01, 感染24 h后换液, 用0.5 μg/mL嘌呤霉素药筛一周后, 用TrypLE将克隆消化成单细胞后重新铺到CF-1饲养层细胞上, 细胞密度为500/cm²。挑选GFP阳性的克隆即为可诱导FOXNI过表达的人胚胎干细胞系。

1.2.7 诱导人胚胎干细胞分化 将可诱导FOXNI过表达的人胚胎干细胞传代到无饲养层细胞的培养瓶中, 待细胞贴壁后, 用加入4 μg/mL强力霉素的人类胚胎干细胞培养液(不含bFGF)培养12 d。

1.2.8 RT-PCR检测胸腺上皮细胞标志基因的mRNA水平情况 收集分化后的细胞, 加Trizol裂解细胞, 提取总RNA, 测定RNA浓度, 用反转录试剂盒反转为cDNA, 进行RT-PCR。扩增程序为40 °C 5 min; 95 °C 2 min; 94 °C 15 s, 60 °C 10 s, 72 °C 15 s, 8 °C 8 s, 40个循环。检测的胸腺上皮细胞的标志基因有HOXA3、TBX1、EYAI、K5、K8和内源FOXNI。

1.2.9 细胞免疫染色 将用强力霉素处理12 d后的细胞吸弃培养基, 用PBS洗2遍, 加入4% PFA室

温固定30 min, 用PBS洗1次, 再用抗体稀释液(0.2% BSA和0.1% Triton X-100溶于PBS)洗涤2次, 每次5 min; 用封闭液(含1% BSA+4% normal serum+0.4% Triton X-100的PBS溶液)封闭细胞, 室温放置1 h; 将一抗稀释在抗体稀释液中(K5和K8的稀释比例均为1:200), 加到样品上, 4 °C放置过夜; 用PBT(0.1% Triton X-100)洗涤细胞5次, 5 min/次; 将标记有红色荧光的二抗稀释在抗体稀释液中(二抗稀释浓度为1:1 000), 并加到细胞样品上, 室温放置1 h; PBT洗涤3次, 将DAPI(1 mg/mL PBS)母液以1:1 000用PBS稀释, 室温放置5 min; 用PBS洗涤2次, 每次5 min, 用4%多聚甲醛室温固定30 min, 最后再用PBS洗涤2次, 每次5 min。用荧光显微镜观察免疫染色结果。

1.3 数据统计

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差表示, 两组均数比较采用 t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 FOXNI TALEN序列
Table 1 FOXNI TALEN sequence

组别 Group	序列(5'-STEMP-Loop-STEMP-3') Sequences (5'-STEMP-Loop-STEMP-3')
Set 1	F1: GTC GCT ACC CCC GCC GC F2: CGC TAC CCC CGC CGC A R1: GGT GGG GCC CGG CAG R2: CTG GTG GGG CCC GGC A
Set 2	F3: CAT GCA GGC ACC GGG CC F4: CAT GCA GGC ACC GGG C R3: TAC ACT CTG TGG GGC R4: ACT TAC ACT CTG TGG GG

表2 RT-PCR引物

Table 2 Primer pairs for RT-PCR

基因 Gene	基因序列号 GenBank ID	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	产物大小 Product size
<i>TBX1</i>	NM_080646.1	F: ACG CCT TCC ACA GCT CCT R: CGC TAT CTT TGC GTG GGT C	243 bp
<i>HOXA3</i>	NM_030661.4	F: ATG CCA GCA ACA ACC CTA CC R: TTG TAC TTC ATG CGG CGA TT	352 bp
<i>Endo FOXNI</i>	NM_003593.2	F: CGA CTT CCA GGG AAA CCT GTG R: GCA AAC GCT GGA GCT GAC GA	364 bp
K5	BC071906.1	F: CGA TGA CCT CCG CAA CAC R: GAC TGG TCC AAC TCC TTC TC	340 bp
K8	BC075839.1	F: AGG CAT CAC CGC AGT TAC R: CAT GTA AGC TTC ATC CAC	433 bp
<i>EYA1</i>	NM_172060.3	F: TTG AAG CCC TGA CCG ACT C R: TTG CTC CTT GTT CTT CTT CTA C	282 bp
<i>GAPDH</i>	NM_002046.5	F: GAA GGT GAA GGT CGG AGT C R: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	226 bp

2 结果

2.1 构建靶向FOXNI的TALENs

在FOXNI的第1个外显子上设计两套TALENs(表1)。构建TALENs质粒, 在293T细胞上验证TALENs的效率。结果表明, F2R1与F4R4这两对TALENs能够成功地靶向FOXNI, 效率分别为66.6%与46.6%。

2.2 构建携带FOXNI-mCherry报告元件的人胚胎干细胞系

用效率最高的F2R1这对TALENs质粒和FOXNI-mCherry重组质粒转染人胚胎干细胞系X-01, 用G418处理10 d后, 将存活的细胞消化成单细胞进行培养, 挑取单细胞来源的细胞克隆进行鉴定, 获得3个成功敲入(knock in, KI)的细胞系(图1)。

2.3 慢病毒质粒的构建与慢病毒包装

在已有的研究基础上构建Lv-Tet-on系统, 分别将Tet-on系统中的两个关键元件TetO和rtTA构建在两个慢病毒载体骨架上, 在rtTA后加上一个IRES介导的嘌呤霉素抗性基因使之与rtTA形成双顺反子结构, 作为建立稳转株时的药筛标记。而在受调控的载体上, EF1a启动绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)表达作为标记(图2)。分别将LV-EF1a-rtTA-IRES-puro和LV-EF1a-GFP-TRE-Foxn1慢病毒质粒与病毒包装质粒包(pCMV-VSVG和pCMV-dR8.91)用FuGENE HD转染试剂导入293T细胞中包装病毒, 收集48 h的病毒上清液并测试病毒滴度。其中, rtTA和FOXNI的病毒滴度分别为

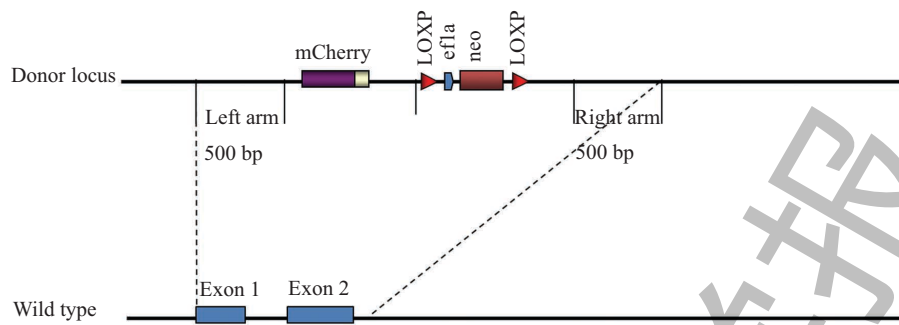


图1 FOXN1-mCherry KI载体结构

Fig.1 The structure pattern of FOXN1-mCherry KI vector

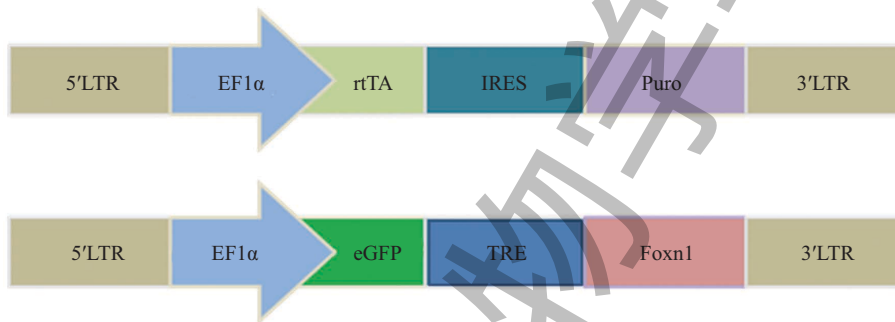
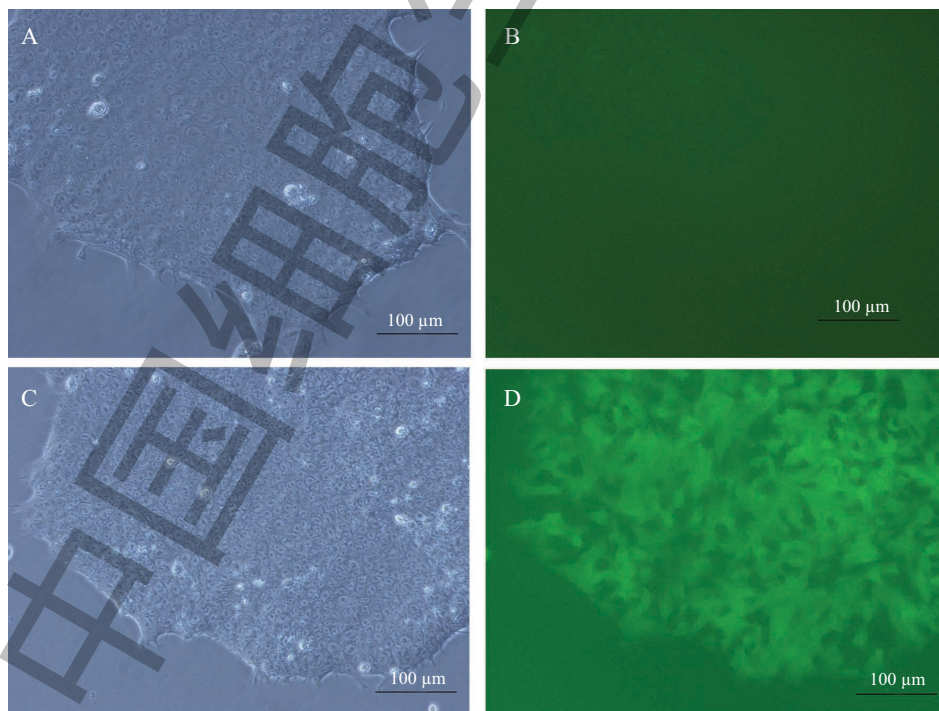


图2 Lv-Tet-on系统病毒载体示意图

Fig.2 The structure pattern of Lv-Tet-on vector

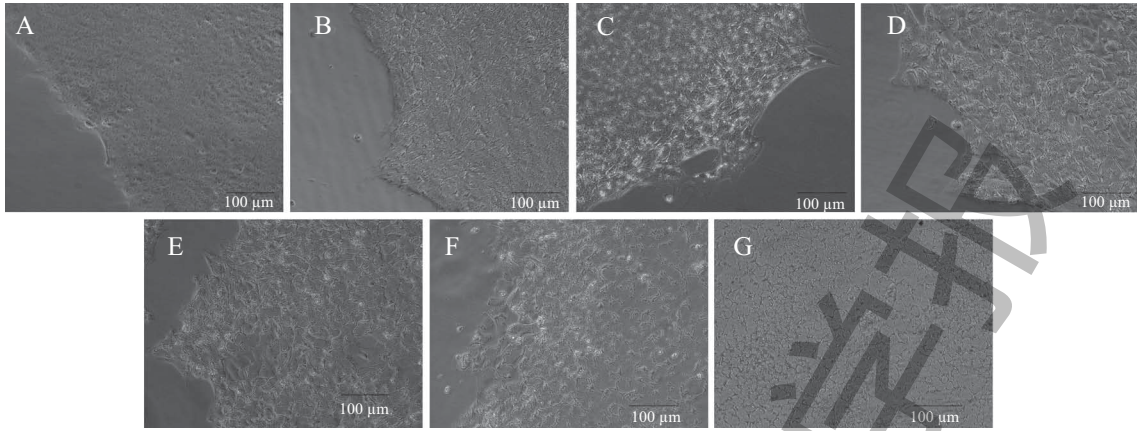


A: 光镜下的未感染病毒对照组; B: 荧光显微镜下的未感染病毒对照组; C: 光镜下的感染病毒组; D: 荧光显微镜下的感染病毒组。

A: control group under optical microscope; B: control group under fluorescence microscope; C: transfected group under optical microscope; D: transfected group under fluorescence microscope.

图3 慢病毒感染人胚胎干细胞的结果

Fig.3 Lentiviral infection into human embryonic stem cells

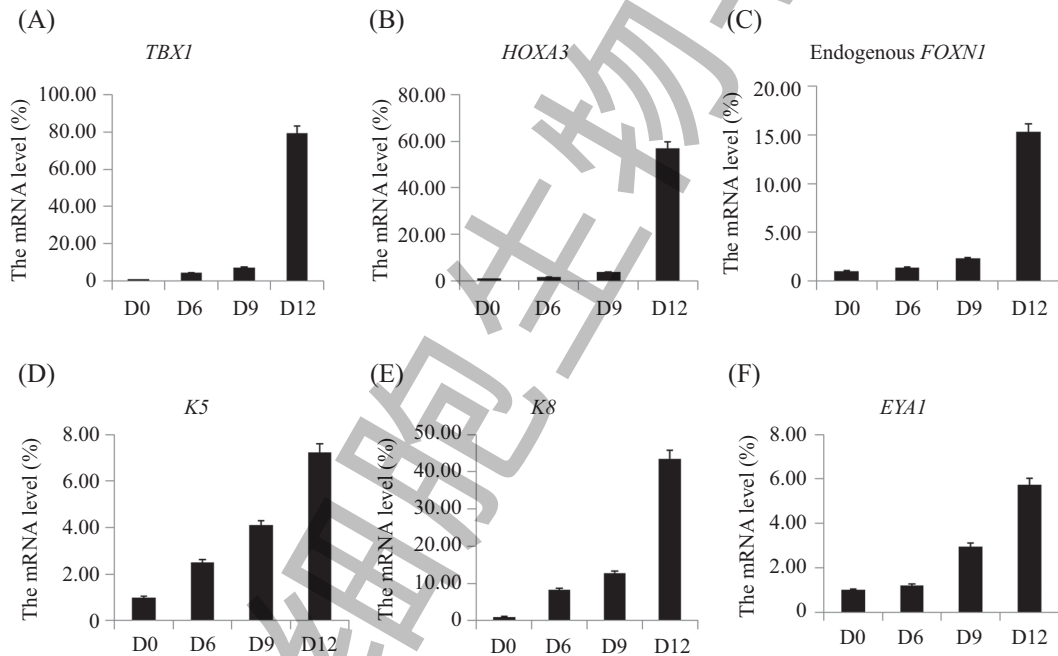


A~F: 分别为强力霉素诱导第0、2、4、6、8、10和12 d细胞的形态。

A~F: the morphology of the cells on day 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 after Doxycycline induction.

图4 诱导分化后细胞形态的变化

Fig.4 Morphological changes of the cells during differentiation



A~F: 用4 μg/mL强力霉素处理第0、6、9和12 d细胞的*TBX1*、*HOXA3*、*EYAI*、*K5*、*K8*以及内源*FOXN1*的mRNA表达情况。

A~F: the mRNA levels of *TBX1*, *HOXA3*, *EYAI*, *K5*, *K8* and endogenous *FOXN1* of the cells on day 0, 6, 9 and 12 after 4 μg/mL Doxycycline induction.

图5 RT-PCR检测胸腺上皮细胞标志基因的表达

Fig.5 Expression of the key thymic epithelial cells marker genes

1.2×10^7 和 1.8×10^7 。

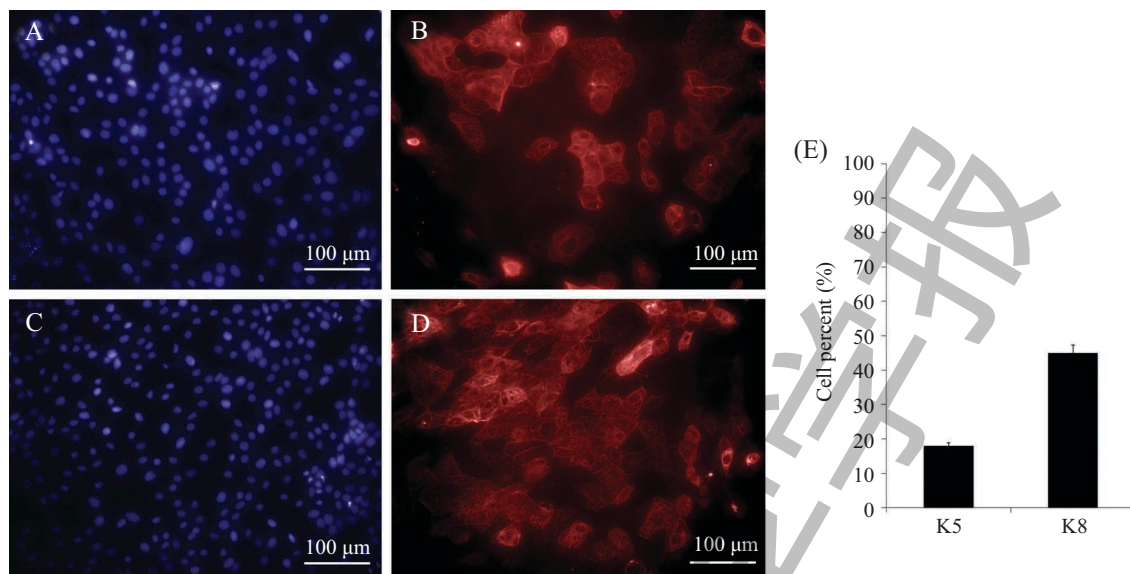
2.4 慢病毒感染获得可诱导表达*FOXN1*的人胚胎干细胞系

用*FOXN1*与*rtTA*慢病毒感染人胚胎干细胞系X-01, 感染操作72 h后于荧光显微镜下观察荧光表达情况, 未感染慢病毒的人胚胎干细胞作为对照组, 经计算, 感染效率在80%以上, 使用嘌呤霉素处理后挑取单细胞来源的细胞克隆, 扩增后获得3个可诱导

表达*FOXN1*的人胚胎干细胞系, 仍然具有胚胎干细胞的形态(图3)。

2.5 诱导分化后细胞形态的变化

用强力霉素处理可诱导表达*FOXN1*的人胚胎干细胞, 每隔1 d观察细胞形态的变化, 可观察到细胞形态逐渐变扁平、变大, 第12 d时大部分细胞都具有典型的胸腺上皮细胞的形态, 说明细胞逐渐向胸腺上皮样细胞分化(图4)。



A: K5的DAPI染色结果; B: K5的免疫荧光染色结果; C: K8的DAPI染色结果; D: K8的免疫荧光染色结果; E: 表达K5和K8的细胞百分比。

A: the DAPI staining of K5; B: the immunostaining of K5; C: the DAPI staining of K8; D: the immunostaining of K8; E: the percentage of cells expression of K5 and K8.

图6 免疫染色检测分化所得胸腺上皮细胞中K5和K8的表达情况

Fig.6 Immunostaining of K5 and K8 in hESC-derived TECs

2.6 诱导分化后胸腺上皮细胞标志基因的表达分析

用强力霉素处理后, 分别收集第0、6、9和12 d的细胞抽提RNA, 进行反转录。RT-PCR检测发现, 胸腺上皮细胞的标志基因 $HOXA3$ 、 $TBX1$ 、 $EYAI$ 、 $K5$ 、 $K8$ 和内源 $FOXNI$ 的mRNA水平均有显著上调, 并且随着诱导时间的延长表达量逐渐增加, 在第12 d时表达量达到最高, 并且发现在诱导后内源的 $FOXNI$ 也被激活(图5)。

2.7 免疫染色检测K5、K8的表达

对诱导分化第12 d的细胞进行免疫染色, 可以观察到角蛋白5(K5)和角蛋白8(K8)的表达。经过3次独立实验, 分别统计表达K5和K8的细胞百分比。结果显示, 19%的细胞表达K5, 45%的细胞表达K8(图6)。

3 讨论

胸腺是机体重要的中枢免疫器官, 胸腺上皮细胞是构成胸腺微环境的主要组成部分, 它能够支持T细胞的分化成熟以及机体免疫耐受的形成^[1-2]。胸腺移植对免疫缺陷疾病的治疗具有重大的临床意义, 但移植供体的短缺使其应用受到了很大的限制。我们通过在人胚胎干细胞中过表达胸腺发育过程中重要的转录因子 $FOXNI$, 从而诱导人胚胎干细胞向

胸腺上皮细胞分化。利用TALEN基因定点打靶技术在 $FOXNI$ 基因启动子后插入一个 $mCherry$ 报告元件, 这样当内源 $FOXNI$ 表达上调时, 就可通过红色荧光准确、快速地观察细胞的分化情况。但在本实验分化过程中并未观察到红色荧光蛋白的表达, 分析原因可能是由于外源标记基因的插入影响了内源 $FOXNI$ 的表达, 虽然RT-PCR结果可以检测到内源 $FOXNI$ mRNA水平上调, 但是其表达量不足以使荧光标记产生反应, 因此在荧光显微镜下为观察到红色荧光。

通过一种可诱导基因表达系统(Tet-on系统)来介导外源基因的表达, Tet-on系统来自于大肠杆菌Tn10的操纵子, 主要有两个关键因子, 一个是Tet调控序列(tetO), 另一个是Tet抑制蛋白(TetR)。Tet-on系统调控外源基因的表达是通过 TRE 和 $rtTA$ 的相互作用完成的。 TRE 是由下游的minCMV启动子(PminCMV)和七个重复tetO序列构成, 将外源基因克隆在 TRE 的下游; $rtTA$ 是由反向的TetR(rTetR)和一个VP16活化结构域组成的融合序列。在加入强力霉素后, $rtTA$ 融合蛋白可特异地结合 TRE 上的tetO序列, 激活下游的PminCMV启动子, 诱导外源基因表达, 没有强力霉素时, 外源基因则不表达。在加入强力霉素诱导人胚胎干细胞过表达 $FOXNI$ 后, 细胞形

态逐渐发生变化, 细胞逐渐变扁平, 细胞体积增大, 最终表现出类似胸腺上皮细胞的形态。分别收集诱导第0、6、9和12 d的细胞, 通过RT-PCR分析胸腺上皮细胞的标志基因*HOXA3*、*EYA1*、*TBX1*、*K5*、*K8*和内源*FOXN1*的mRNA水平情况, 结果表明, 随着诱导时间的增加, 这些标志基因的表达也都有明显的上调。*HOXA3*是*HOX*家族成员之一, 是胸腺胚胎发育过程中重要的转录因子^[31]。*HOXA3*敲除的小鼠表现出无胸腺并伴随甲状腺发育不全。*HOXA3*的表达上调表明细胞往胸腺上皮方向分化^[26-27]。*EYA1*在胸腺、甲状腺、甲状旁腺的发育过程中都具有极其重要的作用, 小鼠敲除*EYA1*后表现出胸腺和甲状旁腺缺失并伴随甲状腺发育缺陷^[32]。*TBX1*对胸腺发育过程中胸腺上皮细胞的分化与增殖起着重要的作用, 小鼠敲除*TBX1*会导致胸腺发育不全, 并且*FOXN1*表达量下降^[33]。因此, *EYA1*和*TBX1*表达的上调也表明了细胞向胸腺上皮细胞的分化。由于皮质上皮细胞(cTECs)和髓质上皮细胞(mTECs)表达不同的角蛋白分子, mTECs主要表达角蛋白5(K5), 而cTECs主要表达角蛋白8(K8)^[8-10], K5和K8的表达上调更进一步说明了细胞向胸腺上皮细胞分化。另外, 我们还检测到了内源*FOXN1*被激活表达, 由此表明, 过表达*FOXN1*可使人胚胎干细胞定向分化到胸腺上皮细胞。对诱导12 d的细胞进行免疫染色可以观察到K5和K8的表达, 统计分析表明, 其中有19%的细胞表达K5, 45%的细胞表达K8, 进一步说明分化得到了胸腺上皮细胞。

综上, 本研究结果显示, 通过在人胚胎干细胞中过表达*FOXN1*可诱导其定向分化为胸腺上皮细胞。本实验的分化方法时间短、效率高, 但在细胞纯度以及安全性上还有待进一步研究, 这将对免疫缺陷疾病的细胞治疗具有重大的临床意义。

参考文献 (References)

- Anderson G, Lane PJ, Jenkinson EJ. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(12): 954-63.
- Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(4): 278-89.
- Nobori S, Shimizu A, Okumi M, Samelson-Jones E, Griesemer A, Hirakata A, *et al.* Thymic rejuvenation and the induction of tolerance by adult thymic grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(50): 19081-6.
- Li B, Li J, Devlin BH, Markert ML. Thymic microenvironment reconstitution after postnatal human thymus transplantation. *Clin Immunol* 2011; 140(3): 244-59.
- Chinn IK, Markert ML. Induction of tolerance to parental parathyroid grafts using allogeneic thymus tissue in patients with DiGeorge anomaly. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(6): 1351-5.
- Farley AM, Morris LX, Vroegindewij E, Depreter ML, Vaidya H, Stenhouse FH, *et al.* Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development. *Development* 2013; 140(9): 2015-26.
- Zou D, Silvius D, Davenport J, Grifone R, Maire P, Xu PX. Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. *Dev Biol* 2006; 293(2): 499-512.
- Gordon J, Manley NR. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* 2011; 138(18): 3865-78.
- Calderon L, Boehm T. Synergistic, context-dependent, and hierarchical functions of epithelial components in thymic microenvironments. *Cell* 2012; 149(1): 159-72.
- Bleul CC, Corbeaux T, Reuter A, Fisch P, Mönning JS, Boehm T. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 2006; 441(7096): 992-6.
- Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(1): 31-40.
- Schorpp M, Hofmann M, Dear TN, Boehm T. Characterization of mouse and human nude genes. *Immunogenetics* 1997; 46(6): 509-15.
- Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol* 2003; 4(11): 1128-35.
- Chen L, Xiao S, Manley NR. FOXN1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood* 2009; 113(3): 567-74.
- 李红然, 张连军, 赵勇. Foxn1在胸腺上皮细胞发育分化中的关键调控作用. *细胞与分子免疫学杂志*(Li Hongran, Zhang Lianjun, Zhao Yong. Key regulatory role of Foxn1 in the development of thymic epithelial cells. *Chin J Cell Mol Immunol*) 2010; 26(11): 1161-3.
- Bredenkamp N, Nowell CS, Blackburn CC. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development* 2014; 141(8): 1627-37.
- Bredenkamp N, Ulyanchenko S, O'Neill KE, Manley NR, Vaidya HJ, Blackburn CC. An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2014; 16(9): 902-8.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazzer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005; 23(12): 1534-41.
- Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, *et al.* Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23(2): 215-21.
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazzer S, *et al.* Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2008; 26(4): 443-52.

- 22 Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ, Studer L. Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2010; 5(4): 688-701.
- 23 Barberi T, Bradbury M, Dincer Z, Panagiotakos G, Socci ND, Studer L. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med* 2007; 13(5): 642-8.
- 24 Lai L, Jin J. Generation of thymic epithelial cell progenitors by mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(12): 3012-20.
- 25 Lai L, Cui C, Jin J, Hao Z, Zheng Q, Ying M, *et al*. Mouse embryonic stem cell-derived thymic epithelial cell progenitors enhance T-cell reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2011; 118(12): 3410-8.
- 26 Parent AV, Russ HA, Khan IS, LaFlam TN, Metzger TC, Anderson MS, *et al*. Generation of functional thymic epithelium from human embryonic stem cells that supports host T cell development. *Cell Stem Cell* 2013; 13(2): 219-29.
- 27 Sun X, Xu J, Lu H, Liu W, Miao Z, Sui X, *et al*. Directed differentiation of human embryonic stem cells into thymic epithelial progenitor-like cells reconstitutes the thymic microenvironment *in vivo*. *Cell Stem Cell* 2013; 13(2): 230-6.
- 28 Su M, Hu R, Jin J, Yan Y, Song Y, Sullivan R, *et al*. Efficient *in vitro* generation of functional thymic epithelial progenitors from human embryonic stem cells. *Sci Rep* 2015; 5: 9882.
- 29 Sun Y, Chen X, Xiao D. Tetracycline-inducible expression systems: New strategies and practices in the transgenic mouse modeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; 39(4): 235-46.
- 30 Wu Z, Li H, Rao L, He L, Bao L, Liao J, *et al*. Derivation and characterization of human embryonic stem cell lines from the Chinese population. *J Genet Genomics* 2011; 38(1): 13-20.
- 31 Manley NR, Capecchi MR. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* 1995; 121(7): 1989-2003.
- 32 Xu PX, Zheng W, Laclef C, Maire P, Maas RL, Peters H, *et al*. Eya1 is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development* 2002; 129(13): 3033-44.
- 33 Reeh KA, Cardenas KT, Bain VE, Liu Z, Laurent M, Manley NR, *et al*. Ectopic TBX1 suppresses thymic epithelial cell differentiation and proliferation during thymus organogenesis. *Development* 2014; 141(15): 2950-8.