

Wnt3a 和 Activin A 共同促进人胚胎干细胞 向限定性内胚层细胞分化

周 静^{1,2}, 李 进^{1,2}, 林 戈^{1,2}, 卢光琇^{1,2}

(1 中南大学 生殖与干细胞研究所, 湖南 长沙 410078; 2 国家干细胞工程研究中心, 湖南 长沙 410078)

【摘 要】【目的】研究 Wnt3a 和 Activin A 在限定性内胚层诱导中共同作用的最佳时间窗。【方法】在无饲养层体系培养的人胚胎干细胞中,加入 25 ng/mL Wnt3a 和 100 ng/mL Activin A,共同作用不同时间(1~4 d),收集不同作用时间点(0,1,2,3,4,5 d)细胞,对原条、内中胚层前体标记 Brachyury 及限定性内胚层标记 Sox17 分别进行免疫荧光染色,统计阳性细胞总数,计算阳性细胞率。以看家基因 $\beta actin$ 作为对照,采用 RT-PCR 方法对原肠作用基因(*Goosecoid*(GSC)、*Mixl1*)及三胚层发育相关基因(内胚层基因 *Sox17*、*Foxa2*,内中胚层前体基因 *Brachyury*,中胚层基因 *Flk-1*,外胚层基因 *Pax6*,胚外内胚层基因 *Sox7*、*CDX2*)的表达进行检测。【结果】Wnt3a 与 Activin A 共同作用 1~4 d,均能获得限定性内胚层细胞,其中二者共同作用 1 d 分别能获得(78.9±7.3)% Brachyury 阳性细胞和(85.2±3.8)%的 Sox17 阳性细胞。RT-PCR 结果显示,在 Wnt3a 与 Activin A 共同作用下,原肠作用基因及三胚层发育相关基因表达的时间有差异。【结论】Wnt3a 和 Activin A 共同作用 1 d,是有效促进人胚胎干细胞向限定性内胚层细胞分化的最佳作用时间窗。

【关键词】 人胚胎干细胞;限定性内胚层;Wnt3a;Activin A

【中图分类号】 Q813.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)04-0037-05

Wnt3a synergized with Activin A promote differentiation of human embryonic stem cells into definitive endoderm

ZHOU Jing^{1,2}, LI Jin^{1,2}, LIN Ge^{1,2}, LU Guang-xiu^{1,2}

(1 Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hu'nan 410078, China;

2 National Research and Engineering Center of Human Stem Cells, Changsha, Hu'nan 410078, China;)

Abstract: 【Objective】The study is done to confirm the effective time window of Wnt3a and Activin A in endoderm induction. 【Method】Human embryonic stem cells cultured on feeder free system are treated with 25 ng/mL Wnt3a and 100 ng/mL Activin A for 4 days. Cells on different time points (0,1,2,3,4,5 d) are collected to perform immunofluorescence staining of Brachyury (primitive streak and endomesodermal marker) and Sox17 (definitive endodermal marker) and genes analysis of early developmental genes (primitive streak marker (*Goosecoid*(GSC), *Mixl1*), endodermal marker (*Sox17*, *Foxa2*), mesoendodermal marker Brachyury, mesodermal marker *Flk-1*, ectodermal marker *Pax6*, extra endodermal marker *Sox7*, *CDX2*) expression. 【Result】Among the different durations of combination of Wnt3a and Activin A all can induce the definitive endoderm cells. When the duration is 1 day, the highest percentage of Brachyury and Sox17 positive cells are gained (78.9±7.3)% and (85.2±3.8)% respectively. RT-PCR results indicate the gas-

* [收稿日期] 2010-01-07

[基金项目] 国家“973”项目(2005CB522705, 2007CB948103); 国家“863”计划项目(2006AA02A102); 国家自然科学基金项目(30800659)

[作者简介] 周 静(1982—),女,江西鹰潭人,在读博士,主要从事人胚胎干细胞工程研究。

[通信作者] 卢光琇(1939—),女,湖北天门人,教授,博士生导师,主要从事干细胞工程及生殖与不孕研究。

E-mail: lugxdirector@yahoo.com

trulation and germ lines relating genes expression modes are different. 【Conclusion】 It is the optimal endoderm inducing protocol to combine Wnt3a with Activin A for the 1st day.

Keywords: human embryonic stem cell; definitive endoderm; Wnt3a; Activin A

在胚胎发育过程中,最重要的事件是外、中、内三胚层的形成。在小鼠中,原肠作用的开始是以形成一个位于上胚层的暂时性结构——原条为标记的。在原肠作用中,上胚层细胞迁移通过原条形成中胚层或限定性内胚层^[1-3]。限定性内胚层进一步分化,形成肝脏、胰腺、消化道等多个重要的组织器官。不同细胞类型的特化并不是随机的,而是受到某些特定信号(如 Wnt 信号和 TGF- β 信号)的时空调控^[4-5]。研究发现,在 小鼠 Wnt3 缺失胚胎中,上胚层停止分化,原条、原结和中胚层均不能发育^[6]。完全缺失 Nodal(TGF- β 超家族成员)的小鼠胚胎无法形成原条,而亚等位基因表达 Nodal 的小鼠,因其 Nodal 表达水平低于正常,原条前端和中、内胚层前端均缺失^[7],这提示在胚胎发育早期,原条形成时,Wnt 和 Nodal 信号均起着重要的作用,缺一不可。在原肠作用开始后,高浓度的 Nodal 信号将进一步促进上胚层细胞形成内胚层细胞,此时 Wnt 信号的持续作用可促使中胚层细胞出现^[8]。在胚胎发育过程中,变化的信号环境决定着不同细胞的命运;同样,在胚胎干细胞体外诱导中,培养条件也需要适当变化以获得最佳的诱导效果。2006 年,Gadue 等^[9]发现,在人胚胎干细胞培养中加入 Activin A (Nodal 的类似物)受体抑制剂 SB431542 及 Dkk1 (Wnt 信号抑制剂),均能完全阻止血清诱导人胚胎干细胞形成原条样细胞。2008 年,Kroon 等^[10]报道,利用 Wnt3a 和高浓度 Activin A 诱导人胚胎干细胞,可获得限定性内胚层细胞(Sox17 阳性细胞),这提示 Wnt 信号和 Nodal/Activin A 信号在人胚胎干细胞体外向原条样细胞及内、中胚层细胞分化过程中也是必需的。由于 Wnt3a 在内胚层分化中有着关键但又短暂的作用,目前对于 Wnt3a 和 Activin A 联合诱导的最佳时间尚无明确的试验证据,因此如何把握 Wnt3a 最佳的作用时期,是限定性内胚层诱导策略中的重要环节。本试验利用自主建系的人胚胎干细胞系为材料,研究 Wnt3a 和 Activin A 在人胚胎干细胞向限定性内胚层分化过程中共同作用的最佳时间窗,以期为诱导人胚胎干细胞体外分化为更成熟的内胚层来源组织细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人胚胎干细胞细胞系 *chHES-8*、*chHES-20* 和 *chHES-22*,由中南大学生殖与干细胞研究所在人源性饲养层上建立^[11],核型正常,P20~P50 用于试验。

1.1.2 试剂及仪器 knock-out DMEM、胎牛血清、驴血清、DPBS、RPMI1640、Activin A、Wnt3a、山羊抗人 Sox17、山羊抗人 Brachyury、驴抗羊 Rodamin 二抗、驴抗羊 Alexis 488 二抗,均为 R&D 产品;Matrigel 为 BD 公司产品;DAPI 为 Sigma 产品;BSA 为上海生工生物工程技术有限公司产品;Go Taq Reaction Buffer 为 Promega Product Information 产品;荧光显微镜为日本 Nikon 公司产品。

1.2 人胚胎干细胞的培养

将人胚胎干细胞细胞系在人饲养层细胞中培养,每天观察并换液,5~7 d 传代 1 次。将准备用于诱导试验的人胚胎干细胞传代至用 Matrigel 预铺皿的 6 孔培养板上,在 37 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱内继续培养。

1.3 限定性内胚层的诱导与检测

将人胚胎干细胞在无饲养层体系上培养 4~5 d,去除分化细胞,用 DPBS 冲洗 2 遍,之后用 RPMI1640 培养基(含 100 ng/mL Activin A)培养 4~5 d,每天换液,根据 25 ng/mL Wnt3a 的作用时间不同,分为 Wnt3a 作用 1 d 组(A+W₁)、Wnt3a 作用 2 d 组(A+W₂)、Wnt3a 作用 3 d 组(A+W₃)和 Wnt3a 作用 4 d 组(A+W₄)。

1.3.1 免疫荧光染色 收集各诱导组分化不同时间点(0,1,2,3,4,5 d)的细胞,分别进行 Brachyury 和 Sox17 的免疫荧光染色,并用 DAPI 复染细胞核。具体操作方法如下:收集培养细胞,用 40 g/L 的多聚甲醛溶液在室温下固定 15 min,PBS 清洗 3 遍;加封闭液(PBS 中添加体积分数 10% 驴血清、1 g/L triton-X-100 和 10 g/L BSA)处理 45 min,加 PBS 清洗 3 遍;加一抗(山羊抗人 Sox17,1:40 倍稀释;山羊抗人 Brachyury,1:20 倍稀释),室温孵育 1 h 或 4 ℃ 过夜,加 PBS 清洗 3 遍;加入荧光二抗(驴抗羊 Rodamin 二抗,1:200 倍稀释;驴抗羊 Alexis

488 二抗,1 : 1 000 倍稀释)室温避光孵育 1 h,用 PBS 清洗 3 遍;加入 DAPI(1 : 10 000 倍稀释)染核,室温避光孵育 5 min,用 PBS 清洗 2 遍;荧光显微镜下观察结果。阳性细胞计数方法:随机选取 10 个显微镜视野,平均每个视野下约 200 个细胞,共计数 2 000 个细胞,统计阳性细胞总数,计算阳性细胞率。

以上试验重复 3 次。应用 SPSS 10.0 软件分析数据。

表 1 PCR 反应的引物序列及退火温度
Table 1 Primer sequences and annealing temperature (*T*_m)

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward Primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse Primer(5'→3')	退火温度℃ <i>T</i> _m
<i>Brachyury</i>	TGCTTCCCTGAGACCCAGTT	GATCACTTCTTTCTTTGCATCAAG	57
<i>Sox17</i>	GGCGCTGACACCAGACTT	TCTCGCCTCGTTTTGACTTT	57
<i>Foxa2</i>	GGGAGCGGTGAAGATGGA	TCATGTTGCTCACGGAGGAGTA	58
<i>GSC</i>	GAGGAGAAAGTGGAGGTCTGGTT	CTCTGATGAGGACCGCTTCTG	56
<i>Mixl1</i>	CCGAGTCCAGGATCCAGGTA	CTCTGACGCCGAGACTTGG	58
<i>Flk-1</i>	GGTATTGGCAGTTGGAGGAA	ACATTTGCCGCTTGGATAAC	58
<i>Pax6</i>	AACAGACACAGCCCTCACAAACA	CGGGAAGTTGAACTGGAAGTGC	55
<i>CDX2</i>	GGGCTC TCTGAGAGGCAGGT	CCTTTGCTCTGCGGTTCTG	55
<i>Sox7</i>	ACGCCGAGCTCAGCAAGAT	TCCACGTACGGCCTC TTCTG	55
<i>βactin</i>	CGCACCCTGGCATTGTCAT	TTCTCCTTGATGTCACGCAC	60

(2) RT-PCR。PCR 反应体系为 10 μL,其中 2×Green Go *Taq* Reaction Buffer 5 μL,上、下游引物(10 pmol/L)各 0.1 μL,模板 DNA(50 ng/μL) 0.2 μL,加双蒸水至 10 μL。PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1min, 55~60 ℃ 退火 1min,72 ℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。

1.3.2 RT-PCR 检测 (1) 引物的设计与合成。根据所检测基因的 cDNA 序列设计引物,送上海英竣公司合成。检测原肠作用基因 *Gooseoid*(*GSC*)、*Mixl1*,内胚层基因 *Sox17*、*Foxa2*,内中胚层前体基因 *Brachyury*,中胚层基因 *Flk-1*,外胚层基因 *Pax6*,胚外内胚层基因 *Sox7*、*CDX2* 的表达,同时以扩增的看家基因 *βactin* 作为对照。设计的引物序列及退火温度(*T*_m)如表 1 所示。

2 结果与分析

2.1 Wnt3a、Activin A 共同作用不同时间时 *Brachyury* 和 *Sox17* 标记表达的变化

对各时间点细胞分别进行 *Brachyury*(原条、内中胚层前体标记)和 *Sox17*(限制性内胚层标记)染色,结果见图 1。

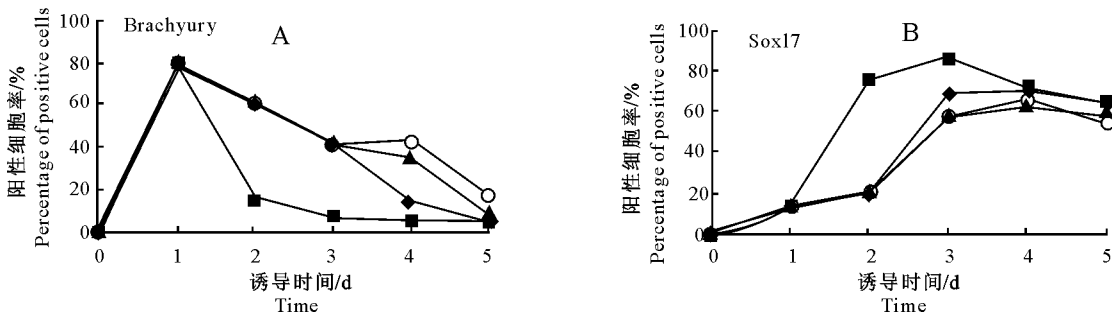


图 1 Wnt3a 和 Activin A 共同作用不同时间时 *Brachyury*(A)和 *Sox17*(B)阳性细胞率的变化

—■—. A+W₁; —◆—. A+W₂; —▲—. A+W₃; —○—. A+W₄
Fig.1 Trend line chart of percentage of *Brachyury* (A) and *Sox17* (B) positive cells in different time points of Wnt3a and Activin A

图 1A 显示,Wnt3a 和 Activin A 共同作用后 6 h 即可检测到约 4%的细胞表达了 *Brachyury*,当共同作用 1 d 时 *Brachyruy* 阳性细胞率上升到(78.9±7.3)%,提示在 Wnt3a 和 Activin A 共同作用下,诱导的人胚胎干细胞进入了原肠作用,分化为内中胚层前

体细胞;在 A+W₁ 组,于诱导第 2 天撤去 Wnt3a 后,*Brachyury* 阳性细胞率迅速下降至(16.6±7.7)%,之后在高浓度 ActivinA 单独作用下,第 5 天时 *Brachyruy* 阳性细胞率逐渐下降到 4.5%左右;A+W₂ 组、A+W₃ 组、A+W₄ 组的 *Brachyury* 阳性细胞率均

随着 Wnt3a 和 Activin A 共同作用时间的延长而逐渐降低,在诱导第 4 天,各组 Brachyury 阳性细胞率为 $A+W_4$ 组 $((42.6 \pm 3.8)\%) > A+W_3$ 组 $((34.8 \pm 7.1)\%) > A+W_2$ 组 $((14.8 \pm 4.9)\%) > A+W_1$ 组 $((6.2 \pm 0.6)\%)$,说明 Wnt3a 在人胚胎干细胞早期诱导过程中,具有维持 Brachyury 表达的作用。

图 1B 显示,随着作用时间的延长,第 2 天 $A+W_1$ 组的 Sox17 阳性细胞率明显上升,达 $(74.8 \pm 9.9)\%$,第 3 天达到最高 $((85.2 \pm 3.8)\%)$,进入第 4 天开始下降;而随着 Wnt3a 作用时间的延长, $A+W_2$ 组、 $A+W_3$ 组和 $A+W_4$ 组的 Sox17 阳性细胞率高峰值与 $A+W_1$ 组相比均下降。提示 Wnt3a 和 Activin A 共同作用诱导第 1 天,能有效地促进无饲养层体系下胚胎干细胞分化为限定性内胚层细胞,

而 Wnt3a 的持续作用并不利于内胚层细胞的分化。

2.2 原肠作用基因及三胚层发育相关基因表达的 RT-PCR 检测

RT-PCR 结果(图 2)显示,原条作用基因 GSC、*Mixl1* 在诱导 1~5 d 持续表达,提示原肠作用于诱导第 1 天开始启动,并持续进行;内中胚层前体基因 *Brachyury* 在诱导第 1 天出现了明显的强表达,提示在 Wnt3a 和 Activin A 共同作用的第 1 天即可有效地促进原肠作用的进行。内胚层基因 *Sox17*、*Foxa2* 在诱导第 2 天即有强表达,提示内胚层细胞在此时开始出现。外胚层基因 *Pax6* 在诱导过程中其表达逐渐增加,中胚层基因 *Flk-1* 和胚外内胚层基因 *CDX2*、*Sox7* 的表达在诱导 1~5 d 均呈逐渐减弱的趋势。

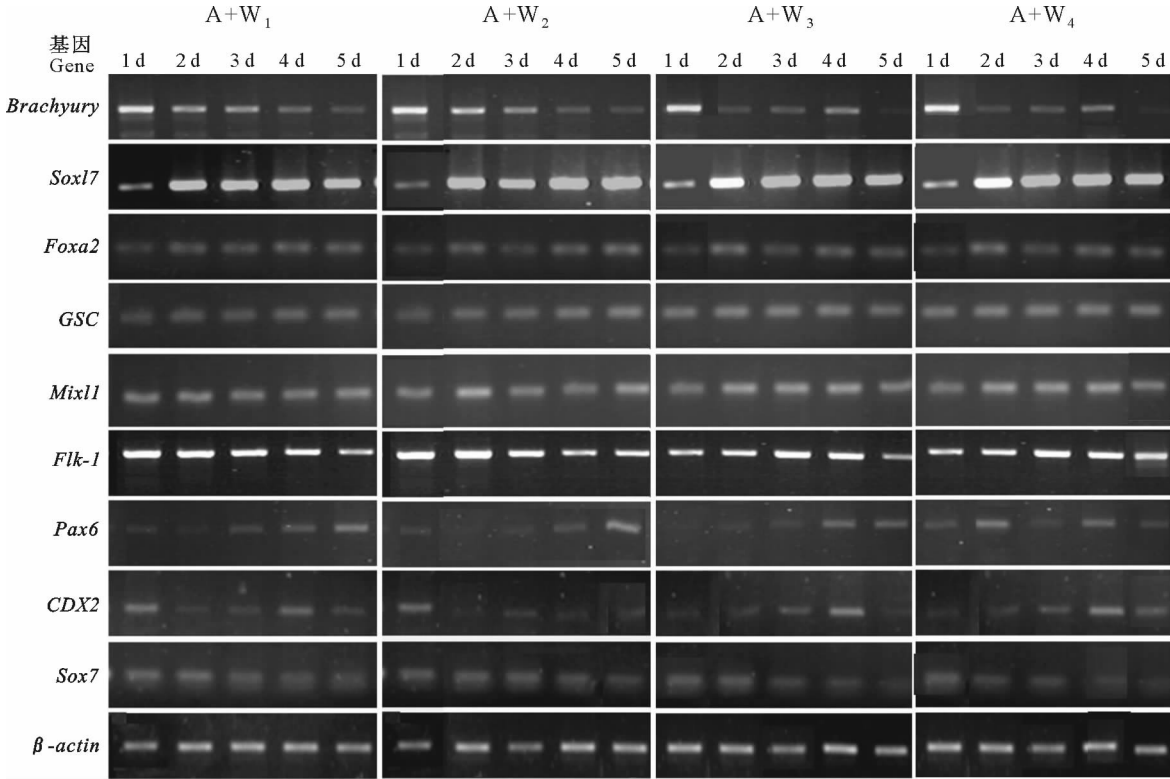


图 2 Wnt3a 和 Activin A 共同作用不同时间时原肠作用基因及三胚层发育相关基因表达的 RT-PCR 检测

Fig. 2 Gastrulation and three germ lines relating genes expression on different time points of cells in different group Wnt3a and Activin A

3 讨论

近年来,人胚胎干细胞的诱导分化是胚胎干细胞领域研究的热点之一,但如何精确调控胚胎干细胞的体外分化一直是一个难点。通过模拟模式动物体内信号调控发育的机理来实现体外胚胎干细胞的

定向诱导,是目前国际上较受推崇的诱导策略。前人对模式动物的研究结果表明,Wnt 信号和 Nodal/Activin A 信号是内胚层发育早期最关键的 2 种信号^[9],研究人胚胎干细胞在体外受 Wnt 信号和 Nodal/Activin A 信号的调控效应,对功能细胞诱导具有重要意义。

目前,Wnt3a 是国际上最常用于激活 Wnt 经典信号通路的因子,已经商品化,易于购买。因此,本试验选择 Wnt3a 进行 Wnt 信号激活,通过对 Wnt3a 和 Activin A 共同作用不同时间组合的发育标记(Brachyury、Sox17)进行检测,结果显示,于诱导第1天加入 Wnt3a 和 ActivinA,在其共同作用下于诱导第3天才能获得较多的内胚层细胞。延长 Wnt3a 的作用,虽然都能够得到一定比例的 Sox17 阳性细胞,但均明显低于 Wnt3a 和 Activin A 共同作用1d的处理。这提示在诱导早期阶段(1~4 d)加入 Wnt3a 对内胚层细胞的获得有促进作用,而这种促进作用的最佳发挥时间是诱导第1天。在诱导过程中,第3~4天各组的 Sox17 阳性率都出现了高峰,之后下降至60%左右,提示本研究体系下限定性内胚层细胞的最佳募集时期为诱导前3d,此时胚胎干细胞形成了大量限定性内胚层细胞,是进一步诱导更成熟内胚层功能细胞的良好时机。而胚胎干细胞在 Wnt3a 及 Activin A 的协同作用下,通过原肠作用形成了限定性内胚层细胞,这与前人在胚胎学研究中的发现是类似的^[12-14],说明人胚胎干细胞在体外能够较好地重复体内发育的过程,是研究胚胎体外发育的良好模型。

[参考文献]

- [1] Bradley A, Evans M, Kaufman M H, et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines [J]. *Nature*, 1984, 309: 255-256.
- [2] Tam P P, Gad J M. Gastrulation in the mouse embryo [M]// Stern C D. *Gastrulation*. [s. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004: 233-262.
- [3] Tam P P, Beddington R S. Establishment and organization of germ layers in the gastrulating mouse embryo [J]. *Ciba Found Symp*, 1992, 165: 27-41.
- [4] Parameswaran M, Tam P P. Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation [J]. *Dev Genet*, 1995, 17: 16-28.
- [5] Hogan B L, Tilly R. Cell interactions and endoderm differentiation in cultured mouse embryos [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1981, 62: 379-394.
- [6] Liu P, Wakamiya M, Shea M J, et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation [J]. *Nat Genet*, 1999, 22: 361-365.
- [7] Conlon F L, Lyons K M, Takaesu N, et al. A primary requirement for Nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse [J]. *Development*, 1994, 120: 1919-1928.
- [8] Lako M, Lindsay S, Lincoln J, et al. Characterisation of Wnt gene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells *in vitro*: role of Wnt3 in enhancing haematopoietic differentiation [J]. *Mech Dev*, 2001, 103: 49-59.
- [9] Gadue P, Huber T L, Paddison P J, et al. Wnt and TGF- β signaling are required for the induction of an *in vitro* model of primitive streak formation using embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 16806-16811.
- [10] Kroon E, Martinson L A, Kadoya K, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 443-452.
- [11] Zhou J, Ou-Yang Q, Li J, et al. Human feeder cells support establishment and definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells and Development*, 2008, 17: 737-750.
- [12] Nishita M, Hashimoto M K. Interaction between Wnt and TGF-b signalling pathways during formation of Spemann's organizer [J]. *Nature*, 2000, 403: 782-785.
- [13] Zorn A M, Butler K, Gurdon J B. Anterior endomesoderm specification in *Xenopus* by Wnt/b-catenin and TGF-b signalling pathways [J]. *Developmental Biology*, 1999, 209: 282-297.
- [14] Crease D J, Dyson S, Gurdon J B. Cooperation between the activin and Wnt pathways in the spatial control of organizer gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 4398-4403.