

牛 iPSCs 向神经细胞的诱导分化

吕长荣¹, 陈冬梅¹, 辛晓玲^{1,2}, 窦忠英¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心,
陕西 杨凌 712100; 2 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002)

【摘要】 **【目的】**通过类胚体介导体外自由分化与诱导分化, 验证所建立的牛诱导性多能干细胞(Bovine induced pluripotent stem cells, biPSCs)能否分化为外胚层的神经细胞。**【方法】**将 biPSCs 悬浮培养以制备类胚体, 通过类胚体介导使 biPSCs 在添加全反式维甲酸(RA)和 β 巯基乙醇(β -Me)诱导体系中分化为神经细胞, 比较其诱导效率; 提取不同诱导体系的分化细胞与类胚体的总 RNA, 利用 RT-PCR 方法鉴定分化细胞中神经细胞特异性基因的表。 **【结果】**培养的 biPSCs 集落呈球形, 中央隆起, 周围界限清晰, 与胚胎干细胞集落形态类似。biPSCs 碱性磷酸酶(AP)染色为阳性, 并表达 SSEA-4 干细胞特异性表面蛋白。biPSCs 通过类胚体介导分化, 在未添加化学诱导物的条件下, 可自由分化为 Nestin、GFAP 与 NSE 阳性神经细胞, 其阳性细胞率分别为 $(15.14 \pm 1.13)\%$, $(6.25 \pm 0.35)\%$ 和 $(5.45 \pm 0.62)\%$; biPSCs 在 RA 诱导组中分化的神经细胞的数量最多, 诱导后表达 Nestin、GFAP 和 NSE 细胞的阳性率分别为 $(49.56 \pm 2.33)\%$, $(16.58 \pm 1.28)\%$ 和 $(13.66 \pm 2.21)\%$; 在 β -Me 诱导组中, 表达 Nestin 的阳性细胞率为 $(42.23 \pm 1.25)\%$ 。2 个诱导组的诱导效率与无化学诱导物组有显著差异($P < 0.05$)。RT-PCR 检测结果显示, 不同诱导体系获得的分化细胞均能扩增到神经细胞特异性基因 *Nestin* 和 β III-Tubulin 片段, 产物长度与预期结果完全一致。**【结论】**biPSCs 在体外具有向神经细胞发育的能力; RA 是诱导 biPSCs 向神经细胞分化的良好诱导物。

【关键词】 诱导性多能干细胞; 神经细胞; 诱导分化; 发育多能性; 牛

【中图分类号】 Q813.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)07-0007-07

Differentiation potential of neural lineage cells from bovine induced pluripotent stem cells

LÜ Chang-rong¹, CHEN Dong-mei¹, XIN Xiao-ling^{1,2}, DOU Zhong-ying¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering & Technology Center, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, He'nan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, He'nan, 450002, China)

Abstract: **【Objective】**Bovine induced pluripotent stem cells (biPSCs) have been generated in the previous study. This study was conducted to verify the differentiation potential of neural lineage cells from the resulting biPSCs under different induction conditions. **【Method】**The resulting biPSCs were cultured using the hanging drop and suspension culture method for embryoid body (EBs) formation, and EBs were transferred into 0.1% gelatin-coated 24-well plates for attached culture. The attached cells were divided into three induction groups including inducer-free group, supplemented with retinoic acid (RA) and β -Mercaptoethanol (β -Me). The marker proteins of nerve cells including nestin, GFAP, and NSE were examined by immunocytochemistry staining. The induction efficiency was evaluated based on the number of immunocytochemistry positive cells. RT-PCR was performed to examine the neural cell marker genes β III-Tubulin and

* [收稿日期] 2010-03-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30671067); 陕西省重大科技项目(2006KZ05-G1)

[作者简介] 吕长荣(1972—), 男, 陕西三原人, 在读博士, 主要从事分子生物学与干细胞研究。E-mail: bestone1992@163.com

[通信作者] 窦忠英(1939—), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物胚胎工程与干细胞研究。

E-mail: douzhongying@china.com

Nestin.【Result】The resulting biPSCs colonies showed a ball-shaped and tightly packed morphology with rough surfaces and clear borders. The cells were strongly positive for alkaline phosphatase (AP) and SSEA-4. BiPSCs could effectively form typical ball-shaped and cavity-like EBs in suspension culture. Under the inducer-free condition, the attached cells randomly differentiated nerve cells, the percentage of positive for Nestin, GFAP and NSE respectively was $(15.14 \pm 1.13)\%$, $(6.25 \pm 0.35)\%$ and $(5.45 \pm 0.62)\%$ about 6 days after attached culture. There were $(49.56 \pm 2.33)\%$, $(16.58 \pm 1.28)\%$ and $(13.66 \pm 2.21)\%$ of the attached cells to express Nestin, GFAP and NSE in RA medium around 8 days after induction. Approximately $(42.23 \pm 1.25)\%$ attached cells were positive for Nestin protein in β -Me medium after 3 hours induction. RT-PCR further confirmed that the differentiated cells derived from biPSCs could express neural lineage cells marker genes *nestin* and β III-Tubulin.【Conclusion】The results revealed that the established biPSCs can effectively differentiate into neural lineage cells. RA is suitable for biPSCs induced differentiation into nerve cells.

Key words: induced pluripotent stem cells (iPSCs); neural lineage cells; cell differentiation; developmental potential; bovine

胚胎干细胞 (Embryonic stem cells, ESCs) 是来源于哺乳动物囊胚内细胞团 (Inner cell mass, ICM) 的一类细胞, 其具有 2 个显著的特性, 一是具有自我更新能力, 在体外可以无限传代培养; 二是具有发育的全能性, 即胚胎干细胞在特定培养条件下可以发育成为胚胎 3 个胚层的各类细胞。胚胎干细胞的这些独一无二的生物学特性, 使其在细胞治疗、疾病模型建立、细胞生物学和再生医学领域都成为非常重要的实验材料。自从 1981 年 Evans 与 Martin 等 2 个研究小组几乎同时从小鼠囊胚内细胞团第 1 次获得小鼠 ESCs^[1-2] 以来, Thomson 等于 1998 年^[3] 又从人类囊胚分离出第 1 株人类 ESCs 系。随后, 经过多年的努力, 研究人员先后建立了牛、马、猪、山羊、绵羊、鹿、犬、猫以及实验动物大鼠等多种动物的 ESCs, 但至今并未建立一株世界公认的 ESCs 系^[4], 这说明通过传统的方法难以获得这些动物的 ESCs, 动物的 ESCs 研究仍存在着巨大的技术挑战^[5-6]。因此, 寻求另一种途径获得具有 ESCs 特性的多能性干细胞, 成为家畜 ESCs 研究的热点之一。2006 年, Takahashi 等^[7] 利用逆转录病毒, 将干细胞多能性关键基因的转录因子 *Oct4*、*Sox2*、*c-Myc* 与 *Klf4* 导入小鼠皮肤成纤维细胞, 使其重编程获得了具有 ESCs 特性的多能性干细胞, 称之为诱导性多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPSCs)。2007 年, Takahashi 等^[6] 利用慢病毒介导上述 4 个转录因子, 将人类体细胞也诱导成为 iPSCs。几乎同时, Yu 等^[8] 在 Thomson 实验室筛选出另外 4 种基因 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 和 *Lin28*, 利用慢病毒载体也得到了具有 ESCs 多能性的人类 iPSCs。这

些通过导入多能性转录因子, 将体细胞重编程为多能性干细胞研究的成功, 立刻引起科学界的轰动, 随即掀起了 iPSCs 研究的热潮。目前, 利用基因转染策略已成功建立了小鼠、人类、猴、大鼠和猪等动物的 iPSCs 系^[6,7,9-12]。有研究证明, 已建立的 iPSCs 系都具有类似 ESCs 的多能性, 在特定条件下可以诱导分化为 3 个胚层的各类细胞。

西北农林科技大学国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心应用转基因技术获得牛 iPSCs, 开辟了牛多能性干细胞来源的新途径, 在转基因牛生产、抗病育种以及牛优良品种资源的保存与利用等方面, 具有非常重要的理论意义和应用价值。为了验证所建立的牛 iPSCs 具有发育多能性, 本试验通过类胚体介导, 诱导牛 iPSCs 分化为外胚层的神经系细胞, 并比较了不同诱导条件的诱导效率, 以期筛选出牛 iPSCs 诱导的适合条件, 为进一步研究牛 iPSCs 的分化机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 牛诱导性多能干细胞 (Bovine induced pluripotent stem cells, biPSCs) 由西北农林科技大学干细胞中心保存, 是利用逆转录病毒对牛皮肤成纤维细胞转基因后筛选获得的。

1.1.2 主要试剂 全反式维甲酸 (Retinoic acid, RA, 货号: R2625), 购自 Sigma 公司; Knockout-DMEM 培养液 (货号: 10829-018)、胎牛血清 (ES Cell-Qualified Fetal Bovine Serum, 货号: 10439-024)、 β -巯基乙醇 (β -Mercaptoethanol, β -Me, 货号:

21985-023),购自 Gibco 公司;人重组碱性成纤维生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF, 货号:GF003)、白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF, 货号:ESG1107)、阶段特异性胚胎抗原 4 (Stage specific embryonic antigen, SSEA-4, 1 : 250, 货号:MAB4304)、鼠抗巢蛋白单克隆抗体(Nestin, 1 : 200, 货号:MAB5326)、鼠抗胶质纤维酸性蛋白抗体(Glial fibrillary acidic protein, GFAP, 1 : 200, 货号:MAB360)、鼠抗神经元特异性烯醇化酶抗体(Neuron specific enolase, NSE, 1 : 200, 货号:MAB314), 购自 Chemicon 公司;Alexa-594 标记的驴抗鼠 IgG 荧光二抗(1 : 500, 货号:A21203)、TRIzol 试剂(货号:15596-026), 购自 Invitrogen 公司;RT 试剂盒(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, 货号:K1622), 购自 Fermentas 公司;PCR 试剂盒(EX Taq polymerase kit, 货号:DRR001A)、DNA marker DL2000 (货号:D501A), 均购自 Takara 公司。

1.1.3 主要仪器 台式高速低温离心机(Heraeus Biofuge Stratos, 德国), 细胞培养层流间与超净工作台(Forma Scientific, 美国), 倒置荧光显微镜(Leica DMIRB, DFC420 相机, 德国), CO₂ 恒温培养箱(Thermo forma 311, 美国), PCR 扩增仪(Perkin Elmer Gene Amp PCR System9600, 美国), 紫外凝胶成像系统(GeneGenius UVP, 美国), -80 °C 超低温冰箱(Sanyo MDF-383E, 日本)。

1.2 biPSCs 的复苏与鉴定

取第 12 代 biPSCs, 解冻后于 38 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下在脱细胞人羊膜支架(Cell-free human amniotic membrane, HAM) 上培养, 培养液为含体积分数 15% ES 级 FBS 的 Knockout-DMEM, 并添加 4 ng/mL bFGF、1 000 U/mL LIF、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、0.1 mmol/L β -巯基乙醇。在显微镜下观察复苏后 biPSCs 集落的形态, 并用碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP)和 SSEA-4 进行免疫细胞化学染色, 鉴定其生物学特征。

1.3 biPSCs 向神经细胞的诱导分化

1.3.1 biPSCs 形成类胚体 将 biPSCs 细胞集落从 HAM 上挑出, 用 2.5 g/L 胰酶+0.4 mg/L EDTA 消化成单个细胞, 取 20 μ L(含 500~700 个细胞)悬滴在培养皿盖内壁, 倒置培养 2 d, 显微镜下挑出典型的类胚体(Embryoid body, EBs), 转移至预先用 10 g/L 琼脂糖铺过的 6 孔培养板中, 用添加体

积分数 20% Knockout serum replacement (KSR) 的 Knockout-DMEM 培养液(不添加 bFGF 和 LIF)继续悬浮培养 4 d, 第 7 天转移至用 1 g/L 明胶包被的 24 孔培养板中贴壁培养。

1.3.2 biPSCs 的诱导 对贴壁细胞按照以下方法诱导其向神经细胞分化。

1) 无化学诱导物组。贴壁细胞在无诱导物的培养基(DMEM+体积分数 10% FBS+体积分数 1% 谷氨酰胺+10 ng/mL bFGF)上培养, 每 2~3 d 更换 1 次培养液, 观察细胞形态变化, 并进行免疫细胞化学染色鉴定。

2) RA 诱导组。用 DMEM+体积分数 10% FBS+10⁻⁵ mol/L RA 诱导 6 d 后, 将培养液更换为 DMEM+体积分数 10% FBS+体积分数 1% 谷氨酰胺+10 ng/mL bFGF, 继续培养, 观察细胞形态变化。

3) β -Me 诱导组。先用 DMEM+体积分数 10% FBS+5 ng/mL bFGF+1 mmol/L β -Me 诱导 24 h, 然后更换为只添加 5 mmol/L β -Me、不添加血清和 bFGF 的 DMEM 培养液正式诱导 2~4 h, 最后将培养液更换为 DMEM+体积分数 10% FBS+体积分数 1% 谷氨酰胺+10 ng/mL bFGF, 继续培养, 每 2~3 d 更换 1 次培养液, 观察细胞形态变化。

诱导开始后, 每天(β -Me 诱导组正式诱导后检测频为每小时 1 次)先用体积分数 4% 多聚甲醛固定部分供试细胞, 待诱导结束后, 利用免疫细胞化学方法检测神经细胞特异性标志蛋白的表达情况。

1.4 神经细胞特异性标志蛋白的检测

根据细胞形态变化, 在贴壁后不同阶段取样, 用体积分数 4% 多聚甲醛固定细胞, 体积分数 0.1% Triton X-100 室温处理 10 min, 体积分数 5% 正常山羊血清封闭 10 min, 加入一抗(1 : 200 倍稀释), 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 加入 Alexa-594 标记的驴抗小鼠 IgG 荧光二抗(1 : 500 倍稀释), 37 °C 孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。同时设阴性对照, 用 PBS 替换一抗。用荧光倒置显微镜观察并照相, 检测神经细胞特异标志蛋白 Nestin、GFAP 和 NSE 的表达情况。

1.5 免疫细胞化学染色结果的判定与统计分析

免疫细胞化学染色后, 在显微镜下随机取同一诱导条件下的 10 个视野进行细胞计数, 计算诱导效率(阳性细胞占总细胞数的百分比)。组间数据比较采用 *t* 检验, 统计分析用 Excel 软件进行。

1.6 神经细胞特异性标志蛋白基因的 RT-PCR 检测

1.6.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中的牛 β III-*Tubulin* (NM_001077127.1)、*Nestin* (XM_600663.4) 和 β *actin* (NM_173979.3) 基因的序列, 用 primer premier 5.0 软件设计引物, 其信息如表 1 所示。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.6.2 RT-PCR 反应 分别收集悬浮培养第 6 天的 EBs 和 3 种不同诱导条件下的分化细胞, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 并用 DNase I 酶处理以除去

基因组 DNA 污染, 然后经反转录合成 cDNA。以反转录合成的 cDNA 为模板, PCR 扩增神经细胞特异标志基因 β III-*Tubulin* 和 *Nestin* 片段。PCR 反应体系参照 EX Taq 说明书配制, 反应条件为: 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 30 s, 54~58 ℃ 退火 45 s (β III-*Tubulin* 为 58 ℃, *Nestin* 为 54 ℃, β *actin* 为 55 ℃), 72 ℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。分别取扩增产物 5 μ L, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像系统下观察结果。以牛 β *actin* 基因为系统内参, biPSCs 的 cDNA 模板作为阴性对照, 无模板 (RT-) 作为空白对照。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 The sequences of primer for PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	产物长度/bp Size	退火温度/℃ T _m
β III- <i>Tubulin</i>	AGGCGCTCTACGACATCTGC	529	58
	CCCTCGCCCGTGTACCAGT		
<i>Nestin</i>	AGAGGAGAACGCTGAGTCATT	537	54
	TCTGTAGGCTTTAGTGGTTCTG		
β <i>actin</i>	CAAGGACCTCTACGCCAACA	455	55
	CTCGATCCAACCGACTGCT		

2 结果与分析

2.1 biPSCs 的形态与鉴定

biPSCs 能够在体外长期培养和传代, 形态与胚

胎干细胞类似, 呈隆起的集落样生长, 集落形态不规则, 边缘界限清晰; 单个细胞体积小, 核质比高(图 1A)。AP 染色呈强阳性(图 1B), 并强表达 SSEA-4 等多能性干细胞的特异性表面标记(图 1C)。

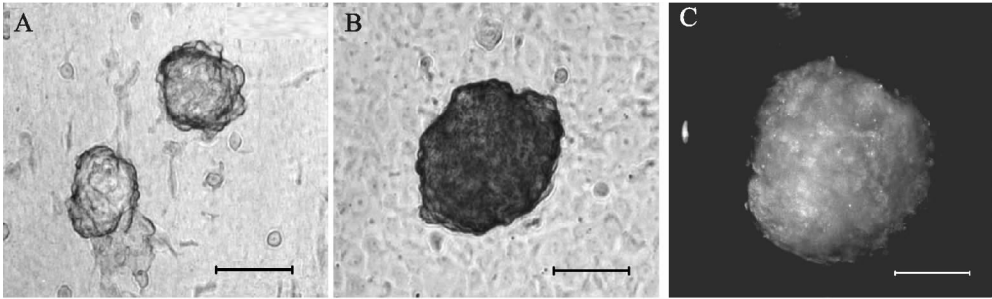


图 1 biPSCs 的形态和生物学特征

A. biPSCs 集落形态(100 $\times$); B. biPSCs 集落 AP 染色(200 $\times$); C. SSEA-4 免疫组化染色(200 $\times$); A 标尺=100 μ m;
B~C 标尺=50 μ m

Fig. 1 Morphology and biological characteristics of biPSCs

A. The typical ES cell-like colony morphology of biPSCs (100 $\times$); B. Bovine iPSCs colony is positive for AP (200 $\times$);
C. Immunocytochemistry is positive for SSEA-4 (200 $\times$). A scale bars=100 μ m; B~C scale bars=50 μ m

2.2 biPSCs 向神经细胞的诱导分化

biPSCs 悬浮培养 6 d 后, 形成球状和囊腔样的类胚体(图 2A); 贴壁培养 2 d 后, 类胚体周围生长出长梭形细胞, 呈辐射状生长排列(图 2B); 贴壁诱导培养 6 d 后, 细胞体积变小, 胞质收缩, 细胞逐渐伸展成锥形或三角形, 细胞突起增多, 出现神经样细胞(图 2C)。3 种不同诱导条件下, 均可得到 Nestin、GFAP 和 NSE 阳性细胞(图 2D~F)。

2.3 不同诱导方法对 biPSCs 的诱导效果

在不添加任何化学诱导物条件下自由分化的细胞, Nestin 在 EBs 贴壁后 2 d 开始表达, 其表达量及阳性细胞数在贴壁后第 6 天达到最高值, 阳性率为 (15.14 $\pm$ 1.13)%, 随后表达减弱, 第 9 天消失; 而 GFAP 和 NSE 的表达在类胚体贴壁后第 6 天才出现, 阳性细胞数在第 9 天最多, 阳性率分别为 (6.25 $\pm$ 0.35)% 和 (5.45 $\pm$ 0.62)%。其中 Nestin

阳性率分别约为 GFAP 和 NSE 的 2.5 与 3 倍。

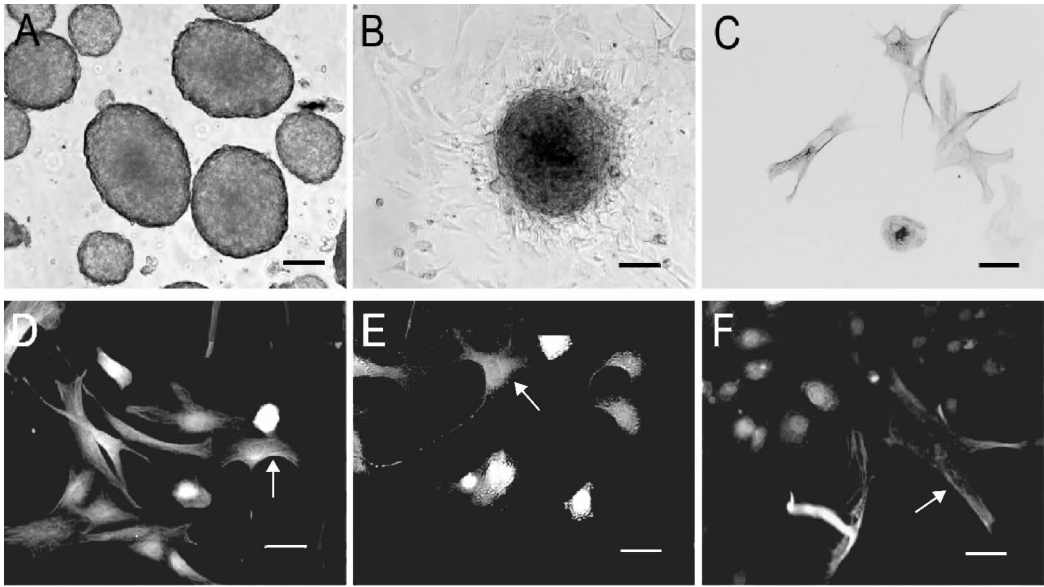


图 2 biPS 细胞向神经细胞的诱导分化
A. biPSCs 形成的类胚体(100×);B. EBs 贴壁生长 2 d(100×); C. 诱导分化后的神经样细胞(200×);
D. Nestin 检测(200×);E. GFAP 检测(200×);F. NSE 检测(200×); →. 示胞质染成红色的阳性细胞;
A~B 标尺=100 μm;C~F 标尺=50 μm

Fig. 2 Differentiation of the biPSCs into neural cells
A. The EBs derived from biPSCs (100×);B. Morphology of EBs attached culture for two days (100×);
C. Differentiated into neuro-like cells (200×);D. Nestin positive (200×);E. GFAP positive (200×);F. NSE positive (200×);
A—B scale bars=100 μm;C—F scale bars=50 μm

RA 诱导组 Nestin 在诱导后第 2 天开始表达,第 8 天表达量及阳性细胞数达到最高水平,阳性率为(49.56±2.33)%,之后表达减弱,第 12 天消失。RA 诱导后第 8 天可检测到表达 GFAP 和 NSE 的阳性细胞,第 10 天阳性细胞数最多,阳性率分别为(16.58±1.28)%和(13.66±2.21)%。Nestin 细胞阳性率是 GFAP 和 NSE 细胞的 3 倍多。

用 1 mmol/L β-Me 预先诱导后,有少部分细胞体积变小,胞质收缩。换为 5 mmol/L β-Me 正式诱导液后,多数细胞收缩、变圆并出现多个突起。免疫细胞化学染色结果显示,β-Me 正式诱导 1 h 后,可观察到 Nestin 阳性细胞;诱导 3 h 后,Nestin 阳性细胞数量增多,阳性率为(42.23±1.25)%;诱导 5 h 后,少数细胞开始死亡、脱落。经 β-Me 诱导后细胞活力减弱,增殖缓慢,继续培养 6 d 后,大量细胞脱落、死亡,仅有少量存活细胞表达 GFAP 和 NSE。

综合比较各组诱导效果(图 3)可知,RA 诱导组中神经细胞数量多,诱导率高,对细胞的毒害作用较小,细胞活力强,诱导效率与无化学诱导物组差异显著($P<0.05$); 5 mmol/L β-Me 诱导条件下也有较高的诱导效率,且与无化学诱导物组差异显著($P<$

0.05),但 β-Me 对细胞毒害较大,诱导后细胞增殖缓慢,活力较弱,阳性细胞的绝对数量急剧减少,不适宜用作 biPSCs 向神经细胞诱导分化的诱导物。

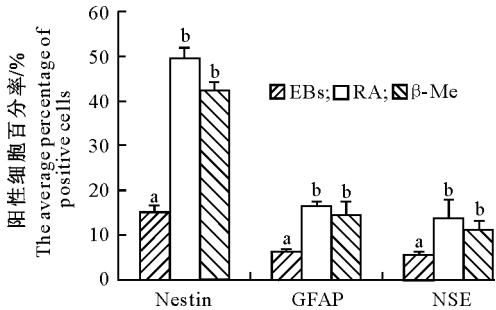


图 3 不同诱导条件下 Nestin、GFAP 和 NSE 的表达
每个蛋白检测中相同小写字母表示差异不显著
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Fig. 3 The expression of Nestin under different conditions

Columns within each protein marker with the same small letter above are not significant differences, while, different small letters stand for significant differences under the condition of $P<0.05$.

2.4 神经细胞特异标志基因的表达

RT-PCR 结果(图 4)显示,在 biPSCs 中不能扩增出神经细胞的特异性基因条带;在 EBs 和 2 种不

同诱导条件下诱导的分化细胞(RA-EBs, β -Me-EBs)中,均能扩增出神经细胞特异性标志基因 β III-Tubulin(529 bp)和 Nestin(537 bp),与预期结果完全一致。

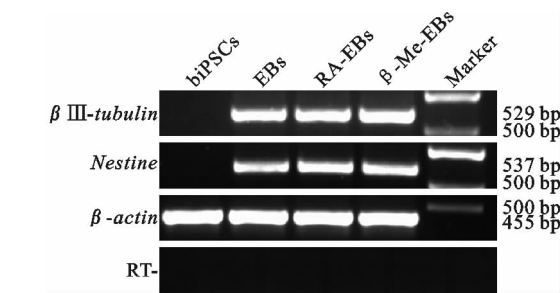


图 4 神经细胞特异标志基因的 RT-PCR 检测
Fig. 4 Expression of special makers of neural cells

3 讨 论

小鼠 iPSCs 在体外通过 EBs 介导或者在体内形成畸胎瘤,均能分化为 3 个胚层的各类细胞,表明小鼠 iPSCs 具有多能性。最近,Dimos 等^[13]将有家族遗传性肌萎缩侧索硬化的 82 岁妇女的皮肤细胞转化为 iPSCs 后,成功诱导其分化为神经元细胞;帕金森病人来源的特异性 iPSCs 也被成功地诱导为多巴胺神经细胞^[14]。此外,人类的 iPSCs 还被成功地诱导为中脑多巴胺与脊髓运动神经元^[15-16]。这些研究成果为 iPSCs 分化为外胚层神经系细胞提供了有力的实验依据。

本试验是在利用转基因策略获得牛 iPSCs 的基础上,通过 EBs 介导的自由分化和添加化学诱导物定向诱导分化,使牛 iPSCs 分化为外胚层的神经细胞。复苏后的牛 iPSCs 呈集落样生长,强表达 AP 与 SSEA-4 等干细胞特异性表面抗原,说明牛 iPSCs 在复苏传代后仍然保持了多能性干细胞的形态与生物学特性。

EBs 贴壁培养后,自由分化的细胞形态变为梭形,继续培养逐渐形成多突起的神经样细胞,其中 Nestin 阳性细胞数最多。在 RA 诱导组,诱导后第 2 天 Nestin 开始表达,第 8 天时 Nestin 阳性细胞最多,随后减少直到第 12 天才完全消失。在 β -Me 诱导组中,诱导 1 h 后 Nestin 开始表达,3 h 后达到最高,但在诱导 5 h 后细胞开始死亡、脱落,表明细胞在此之前已经受到不可逆性损伤。因此,在 biPSCs 分化为神经样细胞的过程中,Nestin 在分化后的神经细胞中表达最早,一般在贴壁后第 2 天开始表达,第 7 天左右表达量最高,以后逐渐降低,大约在第

10 天时消失。GFAP 与 NSE 的表达时间较 Nestin 晚 4~6 d,无论是在无诱导物组还是 RA 与 β -Me 诱导组中,Nestin 表达量达到最高时,GFAP 与 NSE 才开始表达,而且 GFAP 与 NSE 阳性细胞率都很低。在无诱导物组中,Nestin 细胞阳性率分别约为 GFAP 与 NSE 细胞阳性率的 2.5 和 3 倍;在 RA 组中,Nestin 细胞阳性率是 GFAP 与 NSE 的 3 倍多。这些结果表明,在牛 iPSCs 分化为神经细胞的过程中,Nestin 表达时间最早,表达量高,适合作为神经细胞早期鉴定的标志。

牛 iPSCs 形成的 EBs 与分化后的细胞分别经过 RT-PCR 检测,在 RA 与 β -Me 诱导组均能扩增出 β III-Tubulin 与 Nestin 基因片段,其长度与预期结果完全一致。说明在 EBs 形成过程中,已有牛 iPSCs 分化为神经细胞,这些分化细胞在分子水平具有神经细胞特性,属于神经系细胞范畴。

已有研究表明,多能性干细胞分化为神经细胞要经过 4 个阶段^[17],即:第一步,将维持干细胞多能性的分化抑制物去除,使细胞进入分化状态;第二步,在合适的分化条件下,多能性干细胞先分化为神经干细胞;第三步,利用促进神经细胞生长的细胞因子,如 bFGF 扩增培养,进一步分化为有一定可塑性的神经祖细胞;最后,神经祖细胞分化为成熟的神经细胞。本试验在检测分化细胞特性的过程中发现,Nestin 作为普遍认为的神经干细胞标志蛋白,在类胚体贴壁分化早期就已开始表达,成熟的神经细胞标记 NSE 蛋白则在诱导后 6~8 d 开始表达。由神经干细胞分化产生 GFAP 阳性神经胶质细胞的时间,几乎与产生 NSE 阳性成熟神经细胞的时间相同,这些试验结果与神经细胞经典发育过程完全一致。

多能性干细胞向神经细胞的分化多采用全反式 RA 和神经生长因子结合的诱导模式^[18]。RA 在神经系统的发育、修复和维持过程中具有十分重要的作用^[19]。研究发现,RA 能够通过激活 SHH 通路而提高神经细胞的分化效率^[20]。有研究表明,多能性干细胞在添加 RA 与 bFGF 的无血清培养基中,神经细胞的分化率达 90% 以上^[21]。本试验选用 RA 与 β -Me 2 种不同诱导物对牛 iPSCs 进行定向诱导分化,在诱导过程中细胞逐渐变为具有突起的锥形或三角形神经样细胞,且开始表达神经细胞特异性基因与表面标记,表明在本试验条件下,牛 iPSCs 能诱导分化为神经细胞。比较 RA 与 β -Me 2 种诱导物对牛 iPSCs 的诱导效果,虽然 β -Me 诱导时间

短,仅需 1~3 h,但其对牛 iPSCs 毒害作用大,存活细胞绝对数量太少,因此 β -Me 不适宜作为牛 iPSCs 向神经细胞分化的诱导物;相比较而言,RA 对牛 iPSCs 具有良好的诱导作用,其诱导效率高,且对细胞毒害小,适合作为牛 iPSCs 向神经细胞分化的诱导物。

[参考文献]

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292 (5819): 154-156.
- [2] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by tera-tocarcinoma stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 7634-7638.
- [3] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-1147.
- [4] Keefer C L, Pant D, Blomberg L, et al. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates [J]. *Animal Reproduction Science*, 2007, 98(1/2): 147-168.
- [5] Muller R, Lengerke C. Patient-specific pluripotent stem cells: promises and challenges [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2009, 5(4): 195-203.
- [6] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [7] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [8] Yu J Y, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [9] Liu H S, Zhu F F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 587-590.
- [10] Li W L, Wei W, Zhu S Y, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4 (1): 16-19.
- [11] Liao J, Cui C, Chen S Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 11-15.
- [12] Ezashi T, Telugu B P V L, Alexenko A P, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(27): 10993-10998.
- [13] Dimos J T, Rodolfa K T, Niakan K K, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons [J]. *Science*, 2008, 321(5893): 1218-1221.
- [14] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors [J]. *Cell*, 2009, 136(5): 964-977.
- [15] Chambers S M, Fasano C A, Papapetrou E P, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(3): 275-280.
- [16] Zhang D H, Jiang W, Liu M, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells [J]. *Cell Research*, 2009, 19 (4): 429-438.
- [17] Schwartz P H, Brick D J, Stover A E, et al. Differentiation of neural lineage cells from human pluripotent stem cells [J]. *Methods*, 2008, 45(2): 142-158.
- [18] Nistor G I, Totoiu M O, Haque N, et al. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation [J]. *Glia*, 2005, 49(3): 385-396.
- [19] Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(10): 755-765.
- [20] Li X K, Zhao X Y. Epigenetic regulation of mammalian stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(6): 1043-1052.
- [21] Baharvand H, Mehrjardi N Z, Hatami M, et al. Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition [J]. *Int J Dev Biol*, 2007, 51 (5): 371-378.