科学通报 2011 年 第 56 卷 第 8 期: 567 ~ 572
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

体外诱导脑膜来源的 iPS 细胞形成神经样的细胞

许晶[①②], 王皓[①], 梁涛[①②], 蔡祥盛[①], 饶秀茸[①], 黄振波[①], 盛国庆[①*]

① 中国科学院广州生物医药与健康研究院再生医学重点实验室, 广州 510530;
② 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026
* 联系人, E-mail: sheng_guoqing@gibh.ac.cn

2010-11-29 收稿, 2011-02-18 接受
国家重点基础研究发展计划(2007CB947804)、国家自然科学基金委员会-广东省人民政府自然科学联合基金(U0972001/L02)、国家自然科学基金(30700213)和广东省自然科学基金(07007215)资助项目

摘要 单层贴壁的培养方法能够在无血清的情况下将胚胎干细胞(ES 细胞)诱导分化形成神经样的细胞. 重编程小鼠脑膜细胞产生的多能干细胞(iPS 细胞) C5, 也可以运用诱导 ES 细胞神经发生的方法来诱导神经特异性标志基因 *Sox1*, *Sox3*, *Pax6*, *Nestin* 和 *Tuj1* 的表达; 与之相反, 随着分化的进行, ES 细胞特异性的标志基因 *Oct4* 和 *Nanog* 的表达量迅速降低. 通过细胞免疫荧光技术, 可以检测到大量 Pax6 和 Nestin 阳性的神经前体细胞的存在, 并且随着时间的推移, 这些前体细胞能够分化形成 3 类中枢神经系统的细胞, 分别是神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞. 体外诱导 iPS 细胞形成的个体特异性细胞可以作为研究遗传类疾病机制的工具, 并且可用来治疗机能紊乱和年老的神经组织. 此外, 脑膜细胞由于高表达胚性调控因子 Sox2, 更容易被逆分化形成 iPS 细胞, 为此将更加胜任于临床治疗应用.

关键词
iPS 细胞
ES 细胞
脑膜
神经分化
无血清培养基
单层贴壁培养

阿尔茨海默氏症、帕金森氏综合症和中风等神经系统疾病的共同病理特征是, 在中枢神经系统脑区内某特定类型的神经元丢失[1]. 绝大多数情况下, 这些疾病的发生是无法找到明确原因的[2]. 由于缺乏有效的预防措施, 并且现在的药物治疗存在诸多局限性, 很多人倾向于通过外科手术, 如用移植治疗的方法进行干预[1]. 不难想象, 应用合适的细胞是一个明智的途径, 这些细胞可以从 ES 细胞中诱导产生, 也可以用组织特异的干细胞, 来代替病理丢失的细胞[3~6].

2006 年, Takahashi 和 Yamanaka[7]报道, 由体细胞重编成产生出的 iPS 细胞与 ES 细胞非常相似. 病人特异的 iPS 细胞对于药物的筛选和再生治疗有着重要的作用. 如今, 许多研究认为, iPS 细胞可以通过多种方法产生, 这些方法包括运用不同转录因子组合、不同组织来源和不同筛选方法[8~19]. 尽管不同实验室独立产生出的 iPS 细胞都表达多能基因, 而且可以参与 3 个不同胚层的分化, 现在尚不清楚这些 iPS 细胞是否都对治疗应用有价值.

先前研究指出, 神经干细胞和脑膜细胞因为高表达胚胎主要调节因子 Sox2, 所以更容易被诱导成 iPS 细胞[13,15,20]. 然而, 脑膜产生的 iPS 细胞更适合细胞移植治疗, 因为神经干细胞的获取存在很大的局限性. 本研究主要为了探讨小鼠脑膜细胞来源的 iPS 细胞 C5 的神经分化能力. 通过运用用于诱导 ES 细胞进行神经分化的单层贴壁无血清培养系统, 将 iPS 细胞 C5 在体外分化成为神经前体细胞, 并且进一步地分化出神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞. 结果暗示了 iPS 细胞 C5 和 ES 细胞具有相似的神经分化能力.

1 材料和方法

(ⅰ) 小鼠脑膜来源的 iPS 细胞的培养. 小鼠脑膜来源的 iPS 细胞 C5 是由 Qin 等人[13]制备的, iPS 细

英文版见: Xu J, Wang H, Liang T, et al. *In vitro* induction of mouse meningeal-derived iPS cells into neural-like cells. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4436-9

胞 C5 在预先铺有丝裂霉素处理过的 MEFs 上培养, 置于 37℃, 5%的 CO_2 细胞培养箱, 其培养基成分为 DMEM (Gibco)中添加 15% FCS (PAA)、1 mmol/L l-glutamine (Gibco)、0.1 mmol/L 非必需氨基酸 (Gibco)、0.1 mmol/L β-巯基乙醇 (Gibco)和 1000 U/mL 啮齿类 LIF (Invitrogen))[13]. iPS 细胞每隔 1 d 传代 1 次, 传代时用 0.05% 胰酶和 0.04% EDTA (Gibco) 37℃消化 5 min. 细胞按照 1∶3~1∶8 的比例进行传代.

(ⅱ) 小鼠脑膜来源的 iPS 细胞的神经分化. 为了诱导 iPS 细胞 C5 神经分化, 在 0.1%明胶(Sigma)包被的培养皿上细胞至少培养 3 代以去除 MEF 细胞, 其间用标准的 ES 细胞培养基培养. 在进行神经诱导时, 未分化的 iPS 细胞按 0.5×10^4~1.5×10^4 细胞/cm^2 密度接种于 0.1%明胶(Sigma)包被的培养皿上, 此时的细胞培养基更换为神经诱导培养基 N2B27, 按 1∶1 的比例混合添加了 N2 (Gibco)的 DMEM/F12 (Gibco)和添加了 B27 (Gibco)的 Neurobasal Medium (Gibco). 为了提高 iPS 细胞的神经发生效率, 进行诱导的最初 2 天在 N2B27 培养基内添加了 1 μmol L^{-1} RA. 培养基每隔 1 d 更换 1 次.

(ⅲ) 免疫细胞化学. 细胞在室温用 4%多聚甲醛固定 10 min, 10% FBS 和 0.2% Triton X-100 封闭、通透 30 min. 一抗 4℃孵育过夜, 二抗抗小鼠 Alexa Fluor 488/594 (Invitrogen)以 1∶2000 的稀释度室温孵育 1 h. 细胞核用 1 μg/mL 4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(Sigma)染色、用甘油封片后在激光共聚焦显微镜(Leica)下进行观察和拍摄. 以下是本次研究所用的一抗: 小鼠抗 Oct4 (1∶100, Santa Cruz Biotechnology)、兔抗 Pax6 (1∶200, Abcam)、小鼠抗 Nestin (1∶200, Abcam)、小鼠抗 Tuj1 (1∶500, Abcam)、小鼠抗 MAP2 (1∶200, Chemicon, Millipore)、小鼠抗 TH (1∶500, Abcam)、山羊抗 Hb9 (1∶200, Santa Cruz Biotechnology)、小鼠抗 GFAP (1∶200, Cell Signaling Technology)和小鼠抗 O4 (1∶50, Stem Cell).

(ⅳ) 实时定量 PCR 分析. 细胞总 RNA 用总 RNA 提取试剂盒(Macherey-Magel)提取. 第 1 条 cDNA 链由 0.2 mg 总 RNA 在 60 μL 体系中用逆转录酶(TaKaRa)和引物 olig-dgT 合成. 实时定量 PCR 反应使用 SYBR Green Premix Ex *Taq* (TaKaRa)进行 PCR 反应, 并在 MJR4 色荧光通道定量 PCR 仪上进行检测. 看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*)作为本次实验的内参来衡量目标基因的表达水平.

2 结果

2.1 神经诱导过程中 iPS 细胞形态的变化

诱导 iPS 细胞 C5 分化形成神经细胞要经历多个步骤(图 1). 简单地说, iPS 细胞 C5 首先以一个较低的密度生长, 在诱导过程的最初 2 d 用 1 μmol L^{-1} RA 处理. 然后将培养基更换成不含有任何外源生长因子的 N2B27 培养基. 当生长在小鼠胚胎成纤维细胞培养基(mouse embryonic fibroblasts, MEF)上时, 未分化的诱导多能干细胞 C5 呈现为边缘清晰的克隆(图 1(a)). 经数日诱导后, C5 逐渐长出了神经样的突出(图 1(d)).

2.2 iPS 细胞 C5 衍生出的神经细胞中神经特异性基因的表达情况

为了监视 iPS 细胞 C5 的分化过程, 我们用实时定量 PCR 检测了神经上皮细胞特异性标记基因 *Sox1*, *Sox3* 和 *Pax6* 以及神经前体细胞特异性标记基因 *Nestin* 和早期神经元特异性标记基因 *Tuj1* 的表达情况. 随着神经分化的进行, 这些神经特异性标记基因的表达量均有所上升(图 2(b)), 相反多能性基因 *Oct4* 和 *Nanog* 的表达水平有所下降(图 2(a)). 这些数据证明了多能的 C5 细胞能够经诱导转变为神经类细胞.

2.3 小鼠脑膜来源的 iPS 细胞 C5 中诱导分化出神经前体细胞

按照以上描述的结论, 我们用细胞免疫荧光的方法详细检测了 iPS 细胞 C5 向神经前体细胞分化的情况. 连续记录的图片结果显示, Oct4 阳性的细胞数

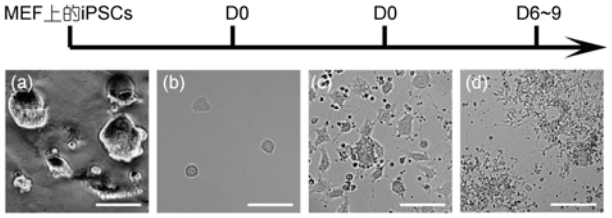


图 1 iPS 细胞 C5 在体外进行神经分化的步骤

(a) 小鼠脑膜细胞来源的 iPS 细胞 C5 生长在 MEFs 上; (b) iPS 细胞 C5 传代于明胶包被的细胞培养皿上; (c) 诱导 C5 细胞进行神经分化的最初 2 d 在培养基中添加了 1 μmol L^{-1} RA; (d) 经过 9 d 的培养, C5 细胞逐渐生长出了突出样结构

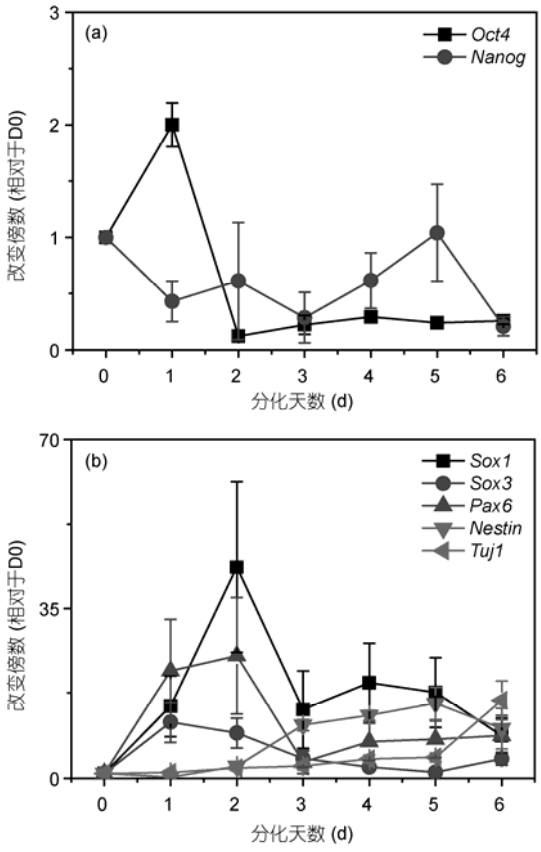


图 2　实时定量 PCR 分析 iPS 细胞 C5 在神经分化过程中的基因表达情况

(a) 多能性标记基因 *Oct4* 和 *Nanog* 表达量下降; (b) 神经前体细胞典型标记基因 *Sox1*, *Sox3*, *Pax6* 和 *Nestin* 的表达量上升

量在神经诱导过程中下降, 这一结果与实时定量 PCR 的结果一致(图 2(a)和 3). 经过 6 d 的诱导, 绝大多数细胞是 Oct4 阴性(图 3); 相反, 这些细胞转变为了 Nestin 和 Pax6 阳性的神经前体细胞, 并且在这一时期可以观察到神经前体细胞特有的花环样结构(图 4).

2.4　小鼠脑膜来源的 iPS 细胞 C5 中诱导分化出神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞

神经前体细胞是多能的, 它们可以向中枢神经系统中 3 个基本谱系的神经细胞分化, 分别是神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞[21]. 在本研究的方案中, 经过 3 d 的诱导后就可以在 iPS 细胞 C5 中检测到神经元特异性标记 Tuj1 和 MAP2 阳性的细胞(数据未显示). 到了第 9 天, 绝大多数细胞表现为这 2 种标记阳性(图 5(a)和 6(a)). 在这期间还可以检测到多巴胺能神经元特异性标记 TH 和运动神经元特异性标记 Hb9 阳性的细胞(图 5(b)和 6(b)). 然而, 经过了 9 d 的诱导分化以后, 只有很少量的星形胶质细胞特异性标记 GFAP 和少突胶质细胞特异性标记 O4 阳性的细胞存在(图 7).

3　讨论

在本研究中, 运用改良的 Ying 等人[22]报道的诱导小鼠 ES 细胞分化形成神经细胞的方法, 诱导小鼠脑膜细胞来源的 iPS 细胞 C5 转变为神经细胞, 并且进一步的分化形成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞. 本次研究证明, 脑膜细胞来源的 iPS 细胞具有与 ES 细胞相似的神经发生能力.

自从 2006 年 Takahashi 和 Yamanaka[7]报道体细胞可以直接脱分化到多能性状态以来, iPS 细胞被证明可以分化产生出很多种细胞类型, 比如造血细胞、心肌细胞、脂肪细胞和上皮细胞. 更值得提出的是, iPS 细胞分化产生出的体细胞已经被证实可以用作改善某些疾病模型的病症[7,17,23~27]. 如今, iPS 细胞可以从不同的组织、运用不同的转录因子和不同的筛选方法产生出来. 考虑到上述诸多不同之处, 在进行更深入的研究之前, 必须对 iPS 细胞的分化能力进行彻底的分析[8~19]. Qin 等人[13]指出, 脑膜细胞高表达胚胎主要调控因子 *Sox2*, 因此更容易经过诱导产生出 iPS 细胞. 脑膜来源的 iPS 细胞 C5 能够表达内源性的 ES 细胞特异性标记, 包括 *Nanog* 和 *Oct4* (图 2(a)和 3), 并且可以支持嵌合体的构建. 然而, 脑膜来源的 iPS 细胞是否可以分化形成神经类细胞尚且是未知数.

许多报道证明了 iPS 细胞可以有效地分化成神经类细胞. Wernig 等人[28]指出, 运用 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc* 四种转录因子, 将 MEFs 诱导生成的 iPS 细胞可以有效的在体外分化形成神经前体细胞、神经元和胶质细胞, 并且这些细胞可以有效的整合入胎鼠的脑组织. Miura 等人[10]认为, MEFs, 尾部尖端细胞和肝细胞来源的 iPS 细胞均能够在体外和体内形成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞. 当运用相同的神经诱导方案时, 人 iPS 细胞和人 ES 细胞发育的时程一致[29]. 通过我们的策略, 小鼠脑膜细胞来源的 iPS 细胞 C5 能够表达神经特异性标记 *Sox1*, *Sox3*, *Pax6*, *Nestin* 和 *Tuj1*, 而多能性标记 *Oct4* 的表达量随着神经诱导的进行迅速降低(图 2). 这些结果证明, iPS 细胞 C5 在基因特征方面, 对于向神经细胞转换

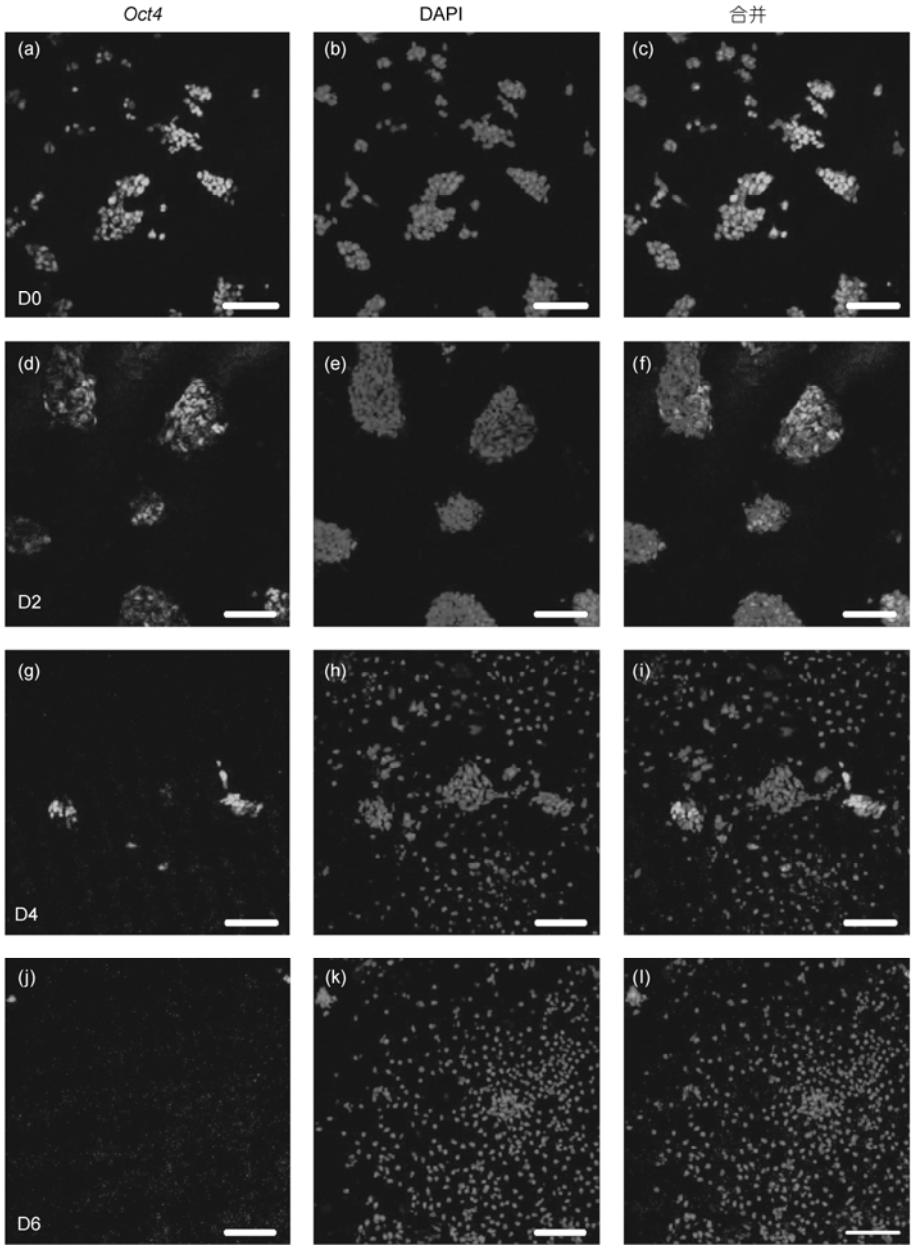


图 3　细胞免疫荧光结果显示 Oct4 阳性细胞的数量随着时间推移下降

标尺示 100 μm

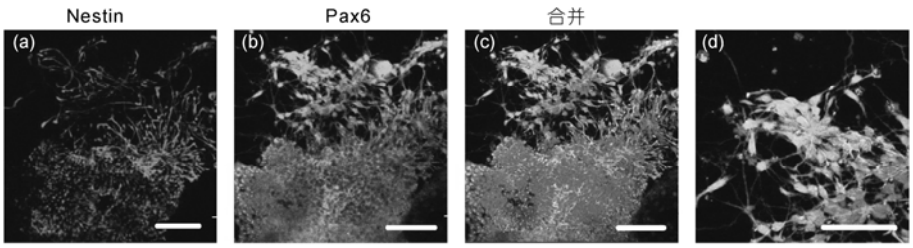


图 4　细胞免疫荧光结果显示，在第 6 天，iPS 细胞 C5 产生出了神经前体细胞特异性标记 Pax6 和 Nestin 阳性的细胞

箭头所示为这一时期的细胞形成了神经管样的花环结构. 标尺示 100 μm

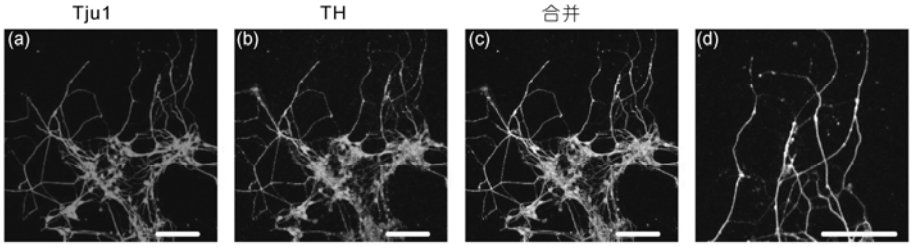


图 5　经过 8~9 d 的诱导, iPS 细胞 C5 中出现了 Tuj1 和 TH 阳性的细胞

标尺示 100 μm

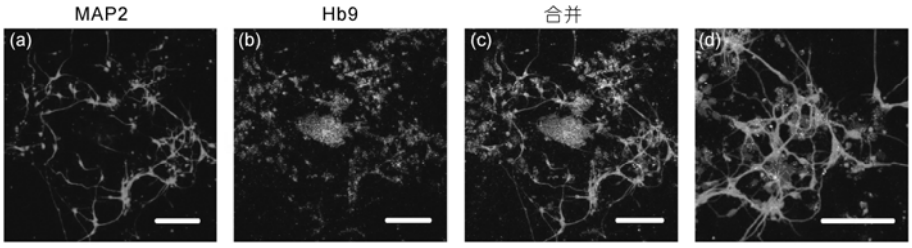


图 6　经过 8~9 d 的诱导, iPS 细胞 C5 中出现了 MAP2 和 Hb6 阳性的细胞

标尺示 100 μm

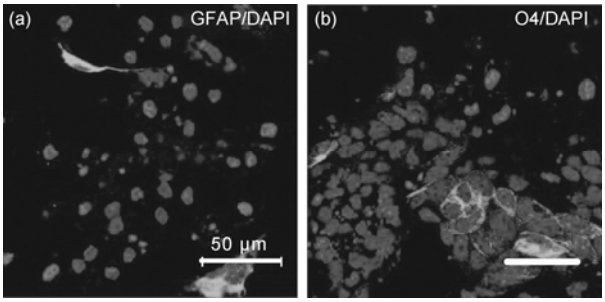


图 7　在诱导的第 9 天可以检测到 GFAP 阳性的星形胶质细胞(a)和 O4 阳性的少突胶质细胞(b)

标尺示 50 μm

敏感. 神经特异性标记 Pax6 和 Nestin 以及多能性标记 Oct4 的细胞免疫荧光结果也同样支持了上述结果(图 3 和 4). 更值得提出的是, 与 ES 细胞一样, 从 iPS 细胞 C5 中诱导分化产生的神经前体细胞是多能性的, 它们可以往中枢神经系统中 3 个基本谱系的细胞分化. 当用细胞免疫荧光的方法进行检测时, 这些细胞分别表现为神经元特异性标记 Tuj1 和 MAP2 阳性、星形胶质细胞特异性标记 GFAP 阳性和少突胶质细胞特异性标记 O4 阳性(图 5~7). 有趣的是, iPS 细胞 C5 诱导分化产生的神经元大都是 TH 阳性的多巴胺能神经元(图 5(b)). 先前的研究证明, 脑膜细胞可以提高小鼠和人 ES 细胞往多巴胺能神经元分化的效率[30]. Polo 等人[31]指出, iPS 细胞会保留起源组织细胞的某些特征. 综合上述观点, 我们认为, iPS 细胞 C5 倾向于分化成为 TH 阳性的神经元与 C5 细胞仍然保留脑膜细胞的某些特性有关. 在本研究中, 随着神经诱导的进行, 多能性标记 *Nanog* 的表达水平并没有迅速降低(图 2(a)). Miura 等人[10]指出, 与小鼠尾部根尖细胞和肝细胞来源的 iPS 细胞相比, MEF 来源的 iPS 细胞诱导形成的次级神经球中 Nanog-EGFP 阳性的细胞数量最少. 这些结果似乎说明, iPS 细胞分化能力与其起源组织密切有关. 然而我们认为, 这一现象的产生更多与 iPS 细胞形成的最初几代短暂表达某些转录基因有关, 因为相同转录因子和组织来源的 iPS 克隆在神经分化效率上仍有不同[29].

先前报道称, 神经干细胞和脑膜细胞因为高表达 *Sox2*, 所以更容易经诱导产生 iPS 细胞[13,15,20]. 相比之下, 脑膜细胞来源的 iPS 细胞更具有移植应用价值, 因为神经干细胞的来源极其有限. 本研究指出, iPS 细胞 C5 具有与 ES 细胞相似的神经分化能力. 总之, 体外诱导 iPS 细胞神经分化将为研究早期神经系统发育机制提供新的策略. 并且, iPS 细胞可以分化形成病人特异的神经细胞, 更有利于治疗机能紊乱和年老的神经组织.

致谢 感谢裴端卿博士提供小鼠诱导性多能干细胞 C5.

参考文献

1 Wichterle H, Przedborski S. What can pluripotent stem cells teach us about neurodegenerative diseases? Nat Neurosci, 2010, 13: 800–804
2 Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: What is it and where are we? J Clin Invest, 2003, 111: 3–10
3 Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. Nature, 2006, 441: 1094–1096
4 Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. Nat Biotechnol, 2005, 23: 862–871
5 Rossi F, Cattaneo E. Opinion: Neural stem cell therapy for neurological diseases: Dreams and reality. Nat Rev Neurosci, 2002, 3: 401–409
6 Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. Nat Neurosci, 2000, 3: 537–544
7 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 2006, 126: 663–676
8 Tat P A, Sumer H, Jones K L, et al. The efficient generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mouse adipose tissue-derived and neural stem cells. Cell Transplant, 2010, 19: 525–536
9 Giorgetti A, Montserrat N, Rodriguez-Piza I, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2. Nat Protoc, 2010, 5: 811–820
10 Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. Nat Biotechnol, 2009, 27: 743–745
11 Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. Cell Stem Cell, 2009, 5: 434–441
12 Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science, 2008, 322: 945–949
13 Qin D J, Gan Y, Shao K F, et al. Mouse meningiocytes express Sox2 and yield high efficiency of chimeras after nuclear reprogramming with exogenous factors. J Biol Chem, 2008, 283: 33730–33735
14 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat Biotechnol, 2008, 26: 101–106
15 Kim J B, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature, 2008, 454: 646–650
16 Eminli S, Utikal J, Arnold K, et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. Stem Cells, 2008, 26: 2467–2474
17 Park I H, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell, 2008, 134: 877–886
18 Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. Science, 2008, 321: 699–702
19 Aasen T, Raya A, Barrero M J, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat Biotechnol, 2008, 26: 1276–1284
20 Kim J B, Sebastiano V, Wu G M, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. Cell, 2009, 136: 411–419
21 Conti L, Pollard S M, Gorba T, et al. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. PLoS Biol, 2005, 3: e283
22 Ying Q L, Stavridis M, Griffiths D, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. Nat Biotechnol, 2003, 21: 183–186
23 Taura D, Noguchi M, Sone M, et al. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: Comparison with that of human embryonic stem cells. FEBS Lett, 2009, 583: 1029–1033
24 Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, et al. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. Neurosci Lett, 2009, 458: 126–131
25 Gai H, Leung E L, Costantino P D, et al. Generation and characterization of functional cardiomyocytes using induced pluripotent stem cells derived from human fibroblasts. Cell Biol Int, 2009, 33: 1184–1193
26 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. Science, 2008, 321: 1218–1221
27 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. Science, 2007, 318: 1920–1923
28 Wernig M, Zhao J P, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 5856–5861
29 Hu B Y, Weick J P, Yu J Y, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 4335–4340
30 Hayashi H, Morizane A, Koyanagi M, et al. Meningeal cells induce dopaminergic neurons from embryonic stem cells. Eur J Neurosci, 2008, 27: 261–268
31 Polo J M, Liu S, Figueroa M E, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nat Biotechnol, 2010, 28: 848–855