

小鼠骨髓间充质干细胞、骨髓单核细胞和胚胎成纤维细胞重编程为诱导性多能干细胞的效率比较

王 尧,王 雷,陆玉华,范向军,朱铭岩,朱沙俊,王志伟*

南通大学附属医院普通外科,南通 226001

[摘要] **目的** 比较小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)、小鼠骨髓单核细胞(BM-MNCs)和小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)重编程为诱导性多能干细胞(iPS细胞)的效率。**方法** 用慢病毒 LV-ef1a-mOct4-IRES-EGFP、LV-ef1a-mSox2-IRES-EGFP、LV-ef1a-mKlf4-IRES-EGFP 和 LV-ef1a-mc-Myc-IRES-EGFP 感染 BMSCs、BM-MNCs 和 MEFs,通过计算碱性磷酸酶染色阳性克隆数比较这3种细胞重编程为iPS细胞的效率。用胚胎干细胞表面标记检测、胚胎干细胞内源基因检测、拟胚体形成实验和畸胎瘤形成实验验证重编程获得的iPS细胞的多能性。**结果** 起源于小鼠 BMSCs、BM-MNCs 及 MEFs 的3种iPS细胞均能形成边缘光整的致密克隆,可表达干性基因 *Nanog*、*ReX-1*、*SSEA-1*,并能在体内外分化为三胚层组织。但是 BMSCs 来源的碱性磷酸酶阳性克隆数低于 BM-MNCs 和 MEFs 来源的克隆数。**结论** 小鼠 BMSCs、BM-MNCs 及 MEFs 均可重编程为 iPS 细胞,但 BMSCs 重编程为 iPS 细胞的效率低于 BM-MNCs 和 MEFs。

[关键词] 诱导性多潜能干细胞;重编程效率;骨髓间充质干细胞;骨髓单核细胞;小鼠胚胎成纤维细胞

[中图分类号] R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)12-1304-08

Reprogramming of mouse bone marrow mesenchymal stem cells, mouse bone marrow mononuclear cells and mouse embryonic fibroblasts into induced pluripotent stem cells: a comparison of efficiencies

WANG Yao, WANG Lei, LU Yu-hua, FAN Xiang-jun, ZHU Ming-yan, ZHU Sha-jun, WANG Zhi-wei*

Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To compare the reprogramming efficiencies of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), mouse bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) into induced pluripotent stem cells (iPS cells). **Methods** BMSCs, BM-MNCs and MEFs were infected with lentivirus (LV-ef1a-mOct4-IRES-EGFP, LV-ef1a-mSox2-IRES-EGFP, LV-ef1a-mKlf4-IRES-EGFP and LV-ef1a-mc-Myc-IRES-EGFP) at a multiplicity of infection. Reprogramming efficiencies of BMSCs, BM-MNCs and MEFs were compared by counting the number of alkaline phosphatase (AP)-positive clones. Pluripotency of the clones was evaluated by detecting the expression of embryonic stem cells markers and assessing their ability to form embryoid bodies and teratomas. **Results** iPS cells derived from BMSCs, BM-MNCs and MEFs were all able to grow into clones with clear borders, to express embryonic stem cell-specific cell surface markers (*Nanog*, *ReX-1* and *SSEA-1*), and to express characteristic genes of all three germ layers both *in vitro* and *in vivo*. The AP-positive clones derived from BMSCs were notably less than those from BM-MNCs and MEFs. **Conclusion** BMSCs, BM-MNCs and MEFs can all reprogram into iPS cells, but the reprogramming efficiency of BMSCs in adherent culture is lower than those of BM-MNCs and MEFs.

[Key words] induced pluripotent stem cells; reprogramming efficiency; bone marrow mesenchymal stem cells; bone marrow mononuclear cells; mouse embryonic fibroblasts

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12):1304-1311]

[收稿日期] 2013-07-24 **[接受日期]** 2013-09-04

[基金项目] 国家自然科学基金(81101615, 81070654), 中国博士后基金(2012M521107), 江苏省自然科学基金(BK2010276). Supported by National Natural Science Foundation of China (81101615, 81070654), China Postdoctoral Science Foundation (2012M521107), and Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2010276).

[作者简介] 王 尧, 博士, 主治医师. E-mail: 404520803@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0513-81161108, E-mail: zww3639@sina.com

2006 年, Takahashi 和 Yamanaka 研究小组利用反转录病毒将 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *c-Myc* 导入小鼠的成纤维细胞, 将其重编程为与小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 在表型、生长特性、基因表达和分化潜能等方面高度相似的小鼠诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)^[1]。此后, 研究者们发现多种类型的体细胞能成功被重编程为 iPS 细胞, 包括胃细胞、肝细胞、胰腺 B 细胞、淋巴细胞、角质形成细胞、神经祖细胞和骨髓间充质细胞等^[1-8]。这些 iPS 细胞能表达 ESCs 相关的多能性基因, 分化为三个胚层的细胞, 并且能在裸鼠体内形成畸胎瘤。骨髓细胞易于收集, 是一种获取细胞的良好资源, 所以有研究已将小鼠骨髓单核细胞 (bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)^[9] 和人类外周血细胞^[10] 重编程为 iPS 细胞。本研究用慢病毒 LV-ef1a-m*Oct4*-IRES-EGFP、LV-ef1a-m*Sox2*-IRES-EGFP、LV-ef1a-m*Klf4*-IRES-EGFP 和 LV-ef1a-mc-*Myc*-IRES-EGFP 感染小鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)、小鼠 BM-MNCs 和小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs), 成功获取了 iPS 细胞, 并比较了这 3 种细胞重编程为 iPS 细胞的效率, 为后续研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 LV-ef1a-m*Oct4*-IRES-EGFP、LV-ef1a-m*Sox2*-IRES-EGFP、LV-ef1a-m*Klf4*-IRES-EGFP 和 LV-ef1a-mc-*Myc*-IRES-EGFP 慢病毒载体的构建及包装委托上海斯丹赛生物技术有限公司完成; 凝聚胺、0.25% 胰蛋白酶、谷氨酰胺、 β -巯基乙醇、非必需氨基酸、丝裂霉素 C、明胶均为 Sigma 公司产品; DMEM 低糖培养基、PBS 为 HyClone 公司产品; DMEM/F12 培养基、胎牛血清、knockout DMEM 为 Gibco 公司产品; 重组人白血病抑制因子 (rhLIF) 为 ProSpec 公司产品。碱性磷酸酶染色试剂盒由上海斯丹赛生物技术有限公司提供; 淋巴细胞分离液 (密度: 1.077 g/mL) 由上海华精生物高科技公司提供; 兔抗小鼠 Nanog IgG 抗体 (Santa Cruz 公司, SC-33760), 羊抗小鼠 Rex-1 IgG 抗体 (Santa Cruz 公司, SC-50668), 小鼠抗小鼠 SSEA-1 IgM 抗体 (Abcam 公司, ab16285), FITC 驴抗羊荧光抗体、Texas Red 羊抗兔荧光抗体、Cy3 羊抗小鼠荧光抗体 (Proteintech 公司); 微量 RNA 提取试剂盒 (Omega 公司);

反转录试剂盒 (Fermentas 公司); Faststart Universal SYBR Green Master (ROX) PCR 试剂盒 (Roche 公司); 琼脂糖 (TaKaRa 公司); 抗荧光淬灭封片液 (上海碧云天生物技术有限公司)。成纤维细胞生长因子 (bFGF) 购自 Sigma 公司。SPF 级健康 C57BL/6J 小鼠购自南通大学实验动物中心, 许可批号为 SCXK(苏)2008-0010。

1.2 BMSCs、BM-MNCs 及 MEFs 重编程为 iPS 细胞

1.2.1 小鼠 BMSCs 的获取及培养 取 6~8 周 C57BL/6J 小鼠, 颈椎脱臼法处死, 在无菌条件下解剖股骨、胫骨并且将其置于 PBS 中。以含有 100 U/mL 青霉素 + 100 g/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养液冲洗小鼠股骨、胫骨髓腔后 200×g 离心 5 min。弃上清, 加入完全培养液 (DMEM/F12 + 10% FBS + 4 mmol/L 谷氨酰胺 + 100 U/mL 青霉素 + 100 g/mL 链霉素 + 10 ng/mL bFGF) 重悬后接种, 接种密度为 $(2\sim4)\times 10^7$ 个细胞/10 cm²。72 h 后用 PBS 洗涤 3 次, 除去悬浮细胞, 以后每 3 d 换液 1 次, 贴壁细胞继续培养 3~5 周。细胞融合达 80% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min, 按 1:2 进行传代。根据本课题先前的研究方法^[11] 收集并使用荧光激活细胞分选术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 检测第 3 代 BMSCs 表面抗原 (CD29、CD44、SCA-1、CD14、CD45、CD34) 的表达情况。

1.2.2 小鼠 BM-MNCs 悬液的制备 取 6~8 周 C57BL/6J 小鼠, 颈椎脱臼法处死, 以含有 100 U/mL 青霉素 + 100 g/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养液冲洗小鼠股骨、胫骨髓腔, 将细胞悬液小心地滴加在淋巴细胞分离液上, 800×g 离心 15 min, 吸取离心后相交液面处的单核细胞。

1.2.3 MEFs 的分离培养 取孕 12.5~13.5 d 的 C57BL/6J 胎鼠, 去除胎鼠头部、内脏、四肢及尾巴, 用显微剪将鼠胚躯干剪成 1 mm³ 以下的碎块, 用 0.05% 胰蛋白酶消化 5 min 后, 吸取上清加入至完全培养液 (DMEM 低糖培养液 + 10% 胎牛血清 + 4 mmol/L 谷氨酰胺) 中。反复消化多次直至组织块消失。再离心后重悬细胞于 MEFs 培养液 (DMEM 低糖培养液 + 10% 胎牛血清 + 4 mmol/L 谷氨酰胺) 中, 待细胞长至 80%~90% 融合时传代或冻存。

1.2.4 饲养细胞的制备 第 3~5 代 MEFs 的培养上清中加入终浓度为 10 μ g/mL 的丝裂霉素 C, 放回培养箱中处理 2.5 h。PBS 洗涤丝裂霉素 C 处理过的 MEFs。消化后种植到预先用 0.1% 明胶包被过

的培养瓶内(种植的细胞数为 6×10^4 个/cm²),以备小鼠 iPS 细胞的培养。

1.2.5 慢病毒感染与 iPS 细胞的生成 分别制备含 5×10^4 个细胞的 BMSCs 和 BM-MNCs 悬液,将慢病毒 LV-ef1a-mOct4-IRES-EGFP、LV-ef1a-mSox2-IRES-EGFP、LV-ef1a-mKlf4-IRES-EGFP 和 LV-ef1a-mc-Myc-IRES-EGFP 分别加入细胞悬液中,感染复数(MOI)分别为 5、10 和 20;12 h 后除去培养液中的慢病毒;24 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,并将细胞接种于预先铺好饲养细胞的 6 孔板中;第 2 天将培养液更换为 ESCs 培养液(knock-out DMEM+15% 胎牛血清+1×必需氨基酸+1×谷氨酰胺+0.1 mmol/L β-巯基乙醇+rhLIF 1 000 U/mL)。同法,将慢病毒感染的 MEFs 接种于预先铺好饲养细胞的 6 孔板中,第 2 天将培养液更换为 ESCs 培养液。每 2 d 换液 1 次,第 11~13 天挑取克隆,将 ESCs 样的克隆挑至新的饲养层细胞上,继续培养、扩增。

1.3 iPS 细胞的鉴定

1.3.1 碱性磷酸酶染色 吸除细胞培养液,将细胞用 PBS 润洗 2~3 次,用 4% 多聚甲醛固定 1~2 min。加入碱性磷酸酶染色试剂覆盖孔底,室温避光放置 15 min。吸除染色液,用 PBS 润洗后镜检。

1.3.2 细胞免疫荧光检测 将细胞固定在 4% 多聚甲醛中,室温下放置 30 min。无水乙醇中浸泡 3 次,每次 10 min(限于核蛋白)。用 PBS 洗涤 1 次后再用抗体稀释液(0.2% BSA 和 0.1% Triton X-100 溶于 PBS)洗涤 2 次。用封闭液(含 6% BSA+0.3% Triton X-100 的 PBS)封闭细胞。将一抗稀释在抗体稀释液中,加到样品上,4℃ 放置过夜。用 PBT(0.1% Triton X-100)洗涤细胞 3~5 次。将二抗稀释在抗体稀释液中,并加到细胞样品上,室温放置 1 h。用 PBT 洗涤 3 次。将 Hoechst (1 mg/mL)母液以 1:1 000 比例用 PBS 稀释,室温放置 30 min。用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。

1.3.3 实时定量 PCR 检测相关基因表达 细胞去培养液后用焦碳酸二乙酯(DEPC)水洗 1 次,TRIzol 法提取总 RNA。取总 RNA 0.1 ng~5 μg, Oligo(dT)₁₈ 引物 1 μL,再加不含核酸酶的水补足至 12 μL。将 1 μL RiboLock™ RNase 抑制剂、2 μL dNTP 混合物(10 mmol/L)、1 μL RevertAid™ M-MuLV 反转录酶(200 U/μL)加至无菌的不含核酸酶的离心管中,混匀并离心,42℃ 孵育 60 min,70℃

孵育 5 min 终止反应,然后进行 PCR 扩增。引物序列见表 1。反应条件:94℃ 预变性 5 min,经过 35 个循环(94℃ 变性 30 s,55~60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s),最后 72℃ 总延伸 10 min。PCR 结束后行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶成像系统检测电泳结果。实时定量 PCR 采用 Roche 试剂盒的 20 μL 反应体系,依次加入 SYBR Green/ROX 10 μL,引物(见表 1)F+R(10 mmol/L) 1.2 μL,cDNA 模板 1 μL,双蒸水补足至 20 μL,用 Applied Biosystems 7500 real-time PCR 仪进行反应。反应条件:95℃ 预变性 10 min 后,98℃ 变性 30 s,60℃ 退火 25 s,72℃ 延伸 25 s,共 35 个循环。

表 1 小鼠 iPS 细胞干性基因的引物序列

Tab 1 Primer sequences of stem cell genes of mouse iPS cells

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>Nanog</i>	F: TGCTTACAAGGGTCTGCTACTG
	R: AGCCTCAGGACTTGAGAGCTT
<i>Oct4</i> (total)	F: GATCACTCACATCGCCAATCA
	R: CTCATACTCTTCTCGTTGGGAATA
<i>Oct4</i> (endogenous)	F: CAAGGCAAGGGAGGTAGACA
	R: CAAAATGATGAGTGACAGACAGG
<i>Sox2</i> (total)	F: GCACCGCTACGACGCTCAG
	R: GGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC
<i>Sox2</i> (endogenous)	F: GAACTGGAGAAGGGGAGAGATT
	R: ATTTGGATGGGATTGGTGGTV
<i>Klf4</i> (total)	F: AGTTCTCATCTCAAGGCACACC
	R: CCTGTCACTTCTGGCACTG
<i>Klf4</i> (endogenous)	F: TGCTTGGTGAGTCGTGGTTC
	R: AGGCTTATTTACCTGGCTTAGG
<i>c-Myc</i> (total)	F: TGTACCTCGTCCGATTCCAC
	R: CCTCATCTTCTTGCTCTTCTTCA
<i>c-Myc</i> (endogenous)	F: ACACGGAGGAAAACGACAAG
	R: TCGTCGTTTCTCAATAAGTCC
<i>GAPDH</i>	F: CAGGTTGTCTCTCGCGACTT
	R: GGTGGTCCAGGGTTTCTTACT

iPS cells: Induced pluripotent stem cells; F: Forward; R: Reverse

1.3.4 拟胚体(EBs)形成实验 将 iPS 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化为单细胞,悬浮培养于 MEFs 培养液中。3 d 后第 1 次换液,之后每 2~3 d 换液 1 次。观察 EBs 的形成情况,并用 RT-PCR 检测各胚层基因的表达。

1.3.5 畸胎瘤形成实验 iPS 细胞系传代培养至 10 代以上后,用 0.25% 胰蛋白酶消化后将单细胞重

悬于 300 μL 的 ESCs 培养液中,以每只小鼠 $(2\sim 3)\times 10^6$ 个细胞的量无菌注射于 NOD-SCID 小鼠(来源于南通大学实验中心)腋下。6 周后取出畸胎瘤进行 H-E 染色,观察分化为三胚层情况。

1.3.6 染色体核型分析 将 iPS 细胞用含有 100 ng/mL 秋水仙碱的 ESCs 培养液处理 3 h,然后用 0.05% 胰蛋白酶消化。将 0.4 mol/L 氯化钾加入细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中低渗处理 25 min。用甲醇与冰乙酸(1 : 3)混合物固定细胞。将固定的细胞滴于冰水浸泡过的载玻片上,过夜晾干,然后用 Giemsa 染液染色 20 min,显微镜下观察染色体。

2 结果

2.1 BMSCs、BM-MNCs 及 MEFs 重编程为 iPS 细胞的效率比较 第 2 代和第 3 代 BMSCs 的形态如图 1A 所示,收集第 3 代 BMSCs,使用 FACS 检测 6 种表面抗原 (CD29、CD44、SCA-1、CD14、CD45、CD34) 的表达情况,可见几乎所有的 BMSCs 均为 CD29 $^{+}$ 、CD44 $^{+}$ 、SCA-1 $^{+}$ 、CD14 $^{-}$ 、CD45 $^{-}$ 、CD34 $^{-}$ (图 1B)。根据图 1C 所示的实验流程图,带有绿色荧光蛋白的 4 个重编程因子 (*Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *c-Myc*, OSKC) 的慢病毒感染 3 种细胞 12 h 后,除去病毒,1 d 后将受染细胞种植于饲养层细胞。第 3 天时,细胞开始表达绿色荧光且可见小的细胞聚集,细胞形态由梭形变为圆形。第 7 天时,小的克隆已经形成(图 1D)。细胞长至 13~15 d 时挑取克隆,扩增培养后起源于 BMSCs、BM-MNCs 及 MEFs 的 iPS 细胞均能够成长为形态与 ESCs 相似的克隆团(图 1E)。诱导第 15 天时,通过计算碱性磷酸酶阳性克隆数比较 3 种类型细胞的诱导效率,可见起源于 BMSCs 的碱性磷酸酶阳性克隆数明显低于 BM-MNCs 和 MEFs 来源的克隆数(图 1F、1G)。

2.2 iPS 细胞的多能性鉴定 分别选取第 20 代的 iPS-M2(MEFs 起源)、iPS-B1(BMSCs 起源)和 iPS-BM5(BM-MNCs 起源)检测其干性基因的表达。免疫荧光结果显示 3 株 iPS 细胞表达出了 ESCs 特异性的细胞表面标记,包括 *Nanog*、*Rex-1* 和 *SSEA-1* (图 2A)。RT-PCR 和实时定量 PCR 凝胶电泳结果显示 3 株 iPS 细胞表达 *Nanog* 基因及内源性 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* 基因(图 2B、2C)。其中,内源性 *Sox2* 基因的表达较弱。

体外 EBs 形成实验结果显示 3 株 iPS 细胞悬浮培养于普通培养液后均能形成 EBs(图 3A),培养 1 周的 EBs 表达三胚层基因,包括 *Afp* (内胚层)、*Pdx1* (内胚层)、*Sparc* (中胚层)、*Brachyury* (中胚层)、*Sox1* (外胚层)、*Pax6* (外胚层)和 *Nestin* (外胚层),其中内胚层基因 *Pdx1* 的表达较低(图 3B)。畸胎瘤形成实验结果(图 3C)显示 3 株 iPS 细胞注射于 NOD-SCID 小鼠的腋下 6 周后形成了瘤体,H-E 染色结果显示瘤体含有三胚层组织,包括神经组织(外胚层)、角质表皮组织(外胚层)、软骨(中胚层)和肠上皮样组织(内胚层)。染色体核型分析(图 3D)显示 3 株 iPS 细胞含有正常的 40 条染色体,未观察到明显的缺失、重复、易位等情况。

3 讨论

骨髓细胞是一种较易获得的细胞资源,且骨髓来源的细胞较终末分化的体细胞更少地暴露于周围环境,发生基因突变的概率低,是一种良好的获取 iPS 细胞的种子细胞。BMSCs 能够在体外分化为脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞等多种细胞^[12]。本课题组长期致力于 BMSCs 的研究,在本研究中我们通过比较 BMSCs、BM-MNCs 和 MEFs 的重编程效率探讨 BMSCs 用于获取小鼠 iPS 细胞的可行性。

本研究中,我们发现 MEFs 起源的碱性磷酸酶阳性克隆数较 BM-MNCs 多,但多能性检测发现完全重编程为 iPS 细胞的数量较 BM-MNCs 少。BM-MNCs 含有多种不同类型的细胞,如造血干/祖细胞、髓样细胞(粒细胞和巨噬细胞)、B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、NK 细胞和巨核细胞等。这些细胞中 85% 以上是 CD45 $^{+}$ ^[9]。Kunisato 等^[9]报道 CD45 $^{-}$ 细胞可能较 CD45 $^{+}$ 细胞更容易被重编程为 iPS 细胞,因为他们发现 CD45 $^{+/-}$ 细胞比 CD45 $^{+}$ 细胞形成了更多的 iPS 细胞克隆。但他们的另一项研究显示大多数受含基因 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *c-Myc* 的病毒感染的细胞是 CD45 $^{+}$ 、CD34 $^{+}$ 和 CD38 $^{+}$ ^[10]。CD45 及 CD34 是造血干细胞的特异性表面标记,所以骨髓细胞来源的 iPS 细胞可能主要来自于 CD34 $^{+}$ 的骨髓造血干细胞。本研究中,BMSCs 表面抗原(CD29、CD44、SCA-1、CD14、CD34、CD45)检测结果显示只有 0.2% 的 BMSCs 是 CD45 $^{+}$ 、CD34 $^{+}$ 。几乎所有 BMSCs 是 CD45 $^{-}$ CD34 $^{-}$,这可能解释了为什么本研

究中BMSCs的重编程效率远低于BM-MNCs。虽然本研究并没有比较CD45⁺CD34⁺细胞、CD45⁺

CD34⁻细胞和CD45⁻CD34⁺细胞的重编程效率,但似乎CD34⁺细胞更容易被重编程为iPS细胞。

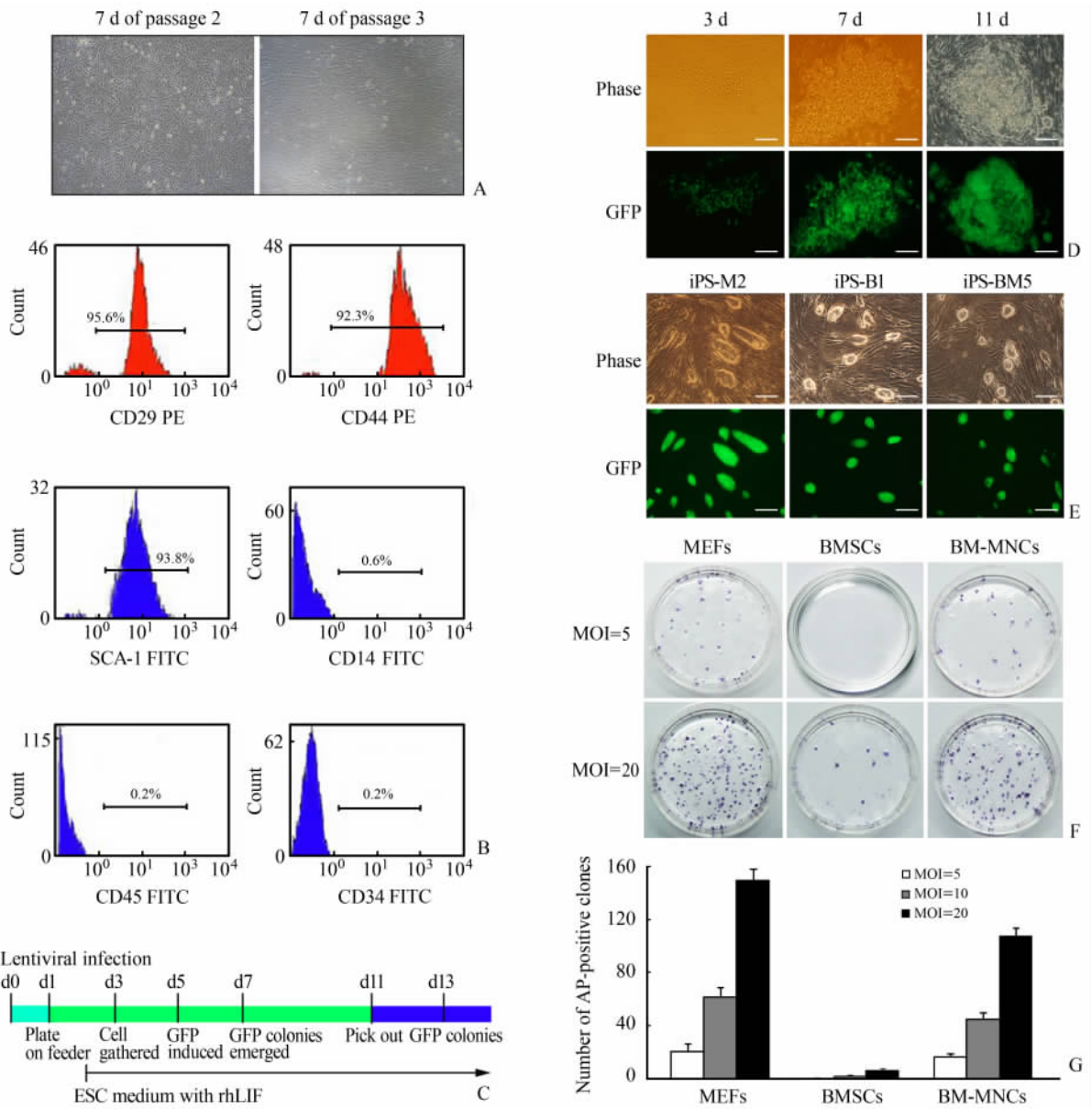


图1 BMSCs、BM-MNCs及MEFs重编程为iPS细胞

Fig 1 Reprogramming of the BMSCs, BM-MNCs and MEFs into iPS cells

BMSCs: Mouse bone marrow mesenchymal stem cells; BM-MNCs: Mouse bone marrow mononuclear cells; MEFs: Mouse embryonic fibroblasts; iPS cells: Induced pluripotent stem cells; ESC: Embryonic stem cell; rhLIF: Recombinant human leukemia inhibitory factor; MOI: Multiplicity of infection. A: The morphology of BMSCs isolated and expanded in DMEM/F12 complete medium. Bright-field images of BMSCs were examined under a regular inverted microscope. Original magnification: $\times 40$; B: Immunophenotype of BMSCs assayed by flow cytometry. The expression rates of six surface antigens were examined, CD29 was expressed in 95.6% of the cells, CD44 in 92.3%, SCA-1 in 93.8%, and CD14 in only 0.6%. Notably, two specific surface molecules of hematopoietic stem cells, CD45 was positive in 0.2% of the cells and CD34 in 0.2%, indicating that these cells differed from the mesenchymal stem cells; C: Scheme for reprogramming of MEFs, BMSCs and BM-MNCs into iPS cells; D: Phase contrast images (top) and fluorescence images (bottom) of OSKC (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc*)-infected BMSCs were shown at day 3, 7 and 11. Scale bar=100 μ m; E: Phase contrast images (top) and fluorescence images (bottom) of iPS-M2, iPS-B1 and iPS-BM5 clones derived from MEFs, BMSCs and BM-MNCs, respectively. Scale bar=100 μ m; F: Dishes (3.5 cm) stained for alkaline phosphatase (AP) on day 15 demonstrated the number of AP-positive clones derived from MEFs, BMSCs and BM-MNCs at a MOI of 5 and a MOI of 20; G: A comparison of the number of AP-positive clones in the same experiment ($n=3$, data presented as $\bar{x} \pm s$)

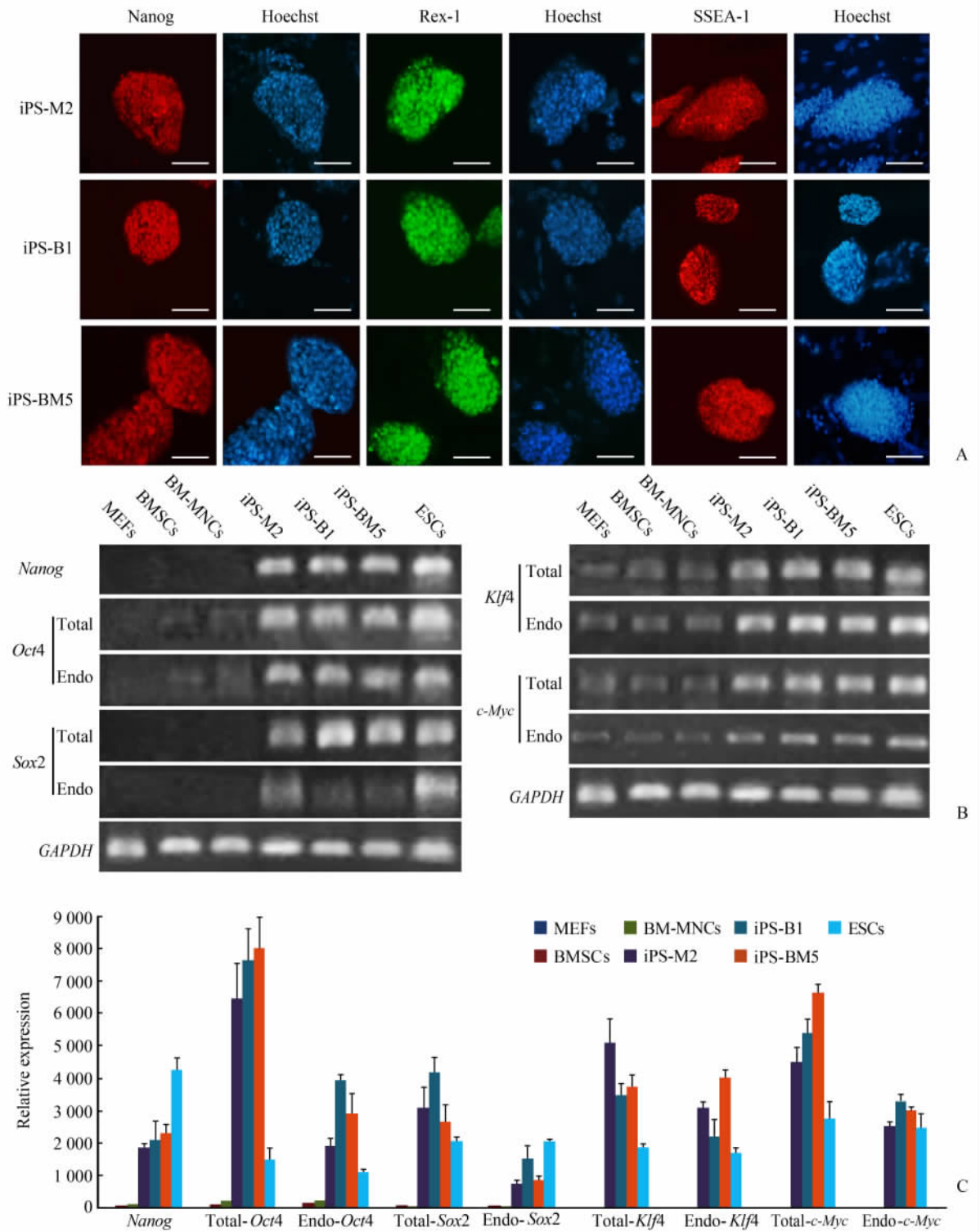


图 2 小鼠 iPS 细胞干细胞表面标记及干性基因的表达

Fig 2 Expression of pluripotent markers and stem cell genes in mouse iPS cells

BMSCs: Mouse bone marrow mesenchymal stem cells; BM-MNCs: Mouse bone marrow mononuclear cells; MEFs: Mouse embryonic fibroblasts; iPS cells: Induced pluripotent stem cells; Endo: Endogenous; ESCs: Embryonic stem cells. A: Immunofluorescence showing the expression of pluripotency markers in expanded iPS-M2, iPS-B1 and iPS-BM5 clones derived from MEFs, BMSCs and BM-MNCs, respectively. Scale bar = 100 μ m; B: RT-PCR analyses of *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc* in iPS-M2, iPS-B1 and iPS-BM5 relative to gene expression observed in the parental somatic cell populations; C: Quantitative RT-PCR analyses of *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc* expression in iPS-M2, iPS-B1 and iPS-BM5 relative to the parental somatic cell populations ($n=35$, data presented as $\bar{x} \pm s$)

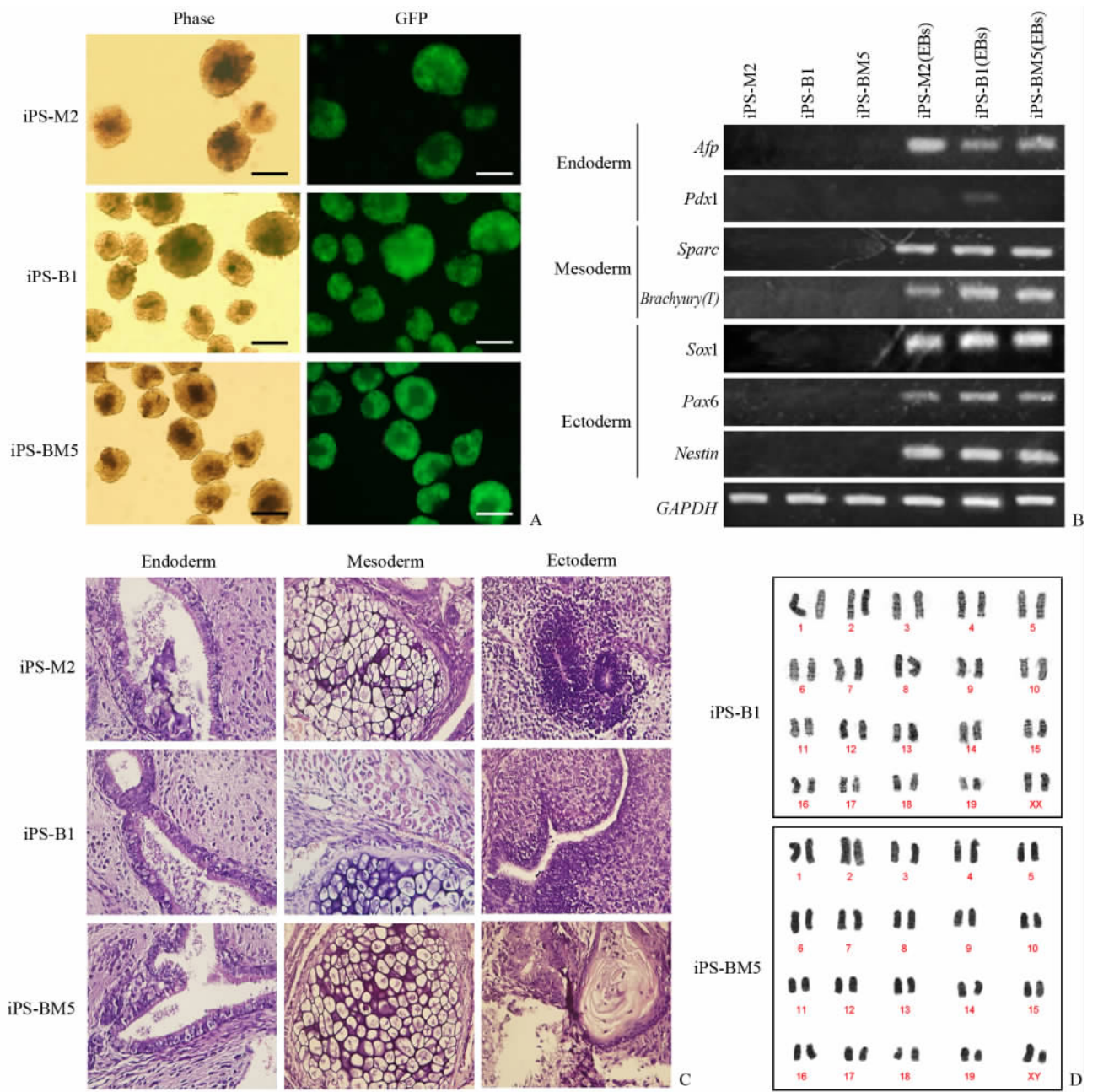


图 3 iPS 细胞拟胚体形成实验、畸胎瘤形成实验及染色体核型分析结果

Fig 3 Ability of iPS cells to form EBs and teratomas and their karyotype analysis

EBs; Embryoid bodies; BMSCs; Mouse bone marrow mesenchymal stem cells; BM-MNCs; Mouse bone marrow mononuclear cells; MEFs; Mouse embryonic fibroblasts; iPS cells; Induced pluripotent stem cells. A: EBs differentiated from iPS-M2, iPS-B1 and iPS-BM5 derived from MEFs, BMSCs and BM-MNCs, respectively. Scale bar = 150 μ m; B: The EBs-differentiated from iPS-M2, iPS-B1 and iPS-BM5 express genes from all three embryonic germ layers; C: H-E staining of teratomas (derived from immunodeficient mice subcutaneously injected with iPS-M2, iPS-B1 and iPS-BM5) tissues representing all three embryonic germ layers, including neural tissue (ectoderm), epidermis (ectoderm), cartilage (mesoderm), and epithelium (endoderm); D: Karyotype analysis using Giemsa-trypsin-Leishman banding of iPS-B1 and iPS-BM5. Both demonstrated a normal karyotype

我们发现 BMSCs 的重编程效率低于 BM-MNCs 和 MEFs。BMSCs 似乎不太适合用于获取大量的 iPS 细胞系。由于 iPS 细胞的产生效率较低,已有大量的研究致力于提高重编程效率,如使用

六因子系统 (*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*、*Nanog* 和 *Lin28*) 来替代四因子系统 (*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*)^[13], KOSR (knockout serum replacement) 代替胎牛血清^[14], ESCs 培养液中加入维生素 C^[15]、导

入相应的 mRNA^[16-17]。我们期待在今后的研究中提高 BMSCs 或 BM-MNCs 的重编程效率。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126: 663-676.
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131: 861-872.
- [3] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells [J]. *Science*, 2008, 321: 699-702.
- [4] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells [J]. *Curr Biol*, 2008, 18: 890-894.
- [5] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey B W, Beard C, Wernig M. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency [J]. *Cell*, 2008, 133: 250-264.
- [6] Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression [J]. *Stem Cells*, 2008, 26: 2467-2474.
- [7] Kim J B, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo M J, Sasse P, Gentile L. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells [J]. *Cell*, 2009, 136: 411-419.
- [8] Park I H, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A. Disease-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2008, 134: 877-886.
- [9] Kunisato A, Wakatsuki M, Kodama Y, Shinba H, Ishida I, Nagao K. Generation of induced pluripotent stem cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19: 229-238.
- [10] Kunisato A, Wakatsuki M, Shinba H, Ota T, Ishida I, Nagao K. Direct generation of induced pluripotent stem cells from human nonmobilized blood [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20: 159-168.
- [11] Xu J, Lu Y, Ding F, Zhan X, Zhu M, Wang Z. Reversal of diabetes in mice by intrahepatic injection of bone-derived GFP-murine mesenchymal stem cells infected with the recombinant retrovirus-carrying human insulin gene [J]. *World J Surg*, 2007, 31: 1872-1882.
- [12] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen G C. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89: 1235-1249.
- [13] Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 475-479.
- [14] Zhao X Y, Li W, Lü Z, Liu L, Tong M, Hai T. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells using an alternative culture medium [J]. *Cell Res*, 2010, 20: 383-386.
- [15] Esteban M A, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 71-79.
- [16] Warren L, Manos P D, Ahfeldt T, Loh Y H, Li H, Lau F. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 618-630.
- [17] Anokye-Danso F, Trivedi C M, Jühr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 376-388.

[本文编辑] 徐佳, 孙岩