论著·实验研究

小鼠胚胎干细胞定向诱导为胰岛样细胞过程中印记基因变化

刘峰　郑甲　雷闽湘　陈慧玲

（中南大学湘雅医院内分泌科，湖南 长沙　410008）

［**摘　要**］ **目的**　探讨体外诱导对小鼠胚胎干细胞株 SF1-G 印记基因 *Kcnq1*、*Cdkn1c* 的影响。**方法**　体外诱导小鼠胚胎干细胞 SF1-G 向胰岛样细胞分化，RT-PCR 和细胞免疫荧光检测胰岛细胞标志基因表达；聚合酶链式反应-限制性内切酶片段长度多态性（PCR-RFLP）检测印记基因 *Kcnq1*、*Cdkn1c* 在分化各阶段细胞中的亲本表达情况。**结果**　胰岛细胞标志性基因 *Insulin*、*Glucagon*、*Somatostatin*、*IAPP*、*Glut2* 在诱导分化后的细胞都有表达；分化终末细胞能表达胰岛细胞特异性蛋白胰岛素、C 肽及 Somastatin；PCR-RFLP 检测分析显示，体外诱导分化后细胞的印记基因 *Kcnq1*、*Cdkn1c* 呈双等位基因表达。**结论**　胚胎干细胞经体外诱导培养可定向分化为胰岛样细胞；用此种分化方法可导致胚胎干细胞印记基因表达的改变，出现印记丢失。［**中国当代儿科杂志，2010，12（12）：954－958**］

［**关　键　词**］ 胚胎干细胞；分化；印记丢失；胰岛样细胞；小鼠

［**中图分类号**］ R－33　　［**文献标识码**］ A　　［**文章编号**］ 1008－8830（2010）12－0954－05

Expression of imprinted genes during the course of differentiation from mouse embryonic stem cells to islet-like cells *in vitro*

LIU Feng, *ZHEN Jia*, *LEI Min-Xiang*, *CHEN Hui-Ling*. *Department of Endocrinology*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008, *China* (*Chen H-L*, *Email*: *huilingchen_8@hotmail.com*)

Abstract: **Objective**　To study the effects of *in vitro* inducement on the expression of SF1-G imprinted genes, *Kcnq1* and *Cdkn1c* during the course of differentiation from mouse embryonic stem (ES) cells to islet-like cells. **Methods**　Mouse ES cells were induced to differentiate into islet-like cells *in vitro*. The expression of islet specific markers was tested by RT-PCR or immunofluorescence. RT-PCR/RFLP was used to test the imprinted genes parental expression in cells at different stages. **Results**　Islet specific genes, such as *Insulin*, *Glucagon*, *Somatostatin*, *IAPP* and *Glut2*, were expressed in differentiated cells. The proteins of insulin, C-peptide and Somastatin were expressed in the final stage cells. Imprinted gene *Kcnq1* and *Cdkn1c* were biallelicly expressed in islet-like cells. **Conclusions**　Mouse ES cells can be successfully induced into islet-like cells *in vitro*. Gene imprinting status of *Kcnq1* and *Cdkn1c* may be changed in differentiated cells (causing loss of imprinting) during the *in vitro* inducement.　[**Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (12): 954－958**]

Key words:　Embryonic stem cell; Differentiation; Loss of imprinting; Islet-like cell; Mice

胚胎干细胞（embryonic stem cells）因具有无限制的自我更新和多潜能的分化能力，成为目前细胞和器官移植领域具有潜在优势的资源，理论上，在合适的诱导条件下，胚胎干细胞也可定向分化为胰岛β细胞，作为糖尿病的细胞移植治疗中强大的后备资源，有可能治愈糖尿病，尤其是以胰岛素缺乏为主要特点的 1 型糖尿病[1]。但是，体外的诱导分化过程很难完全模拟体内的发育过程，因此，在胚胎干细胞培养、诱导分化的过程中，虽然细胞的基因序列可以没有变化，但基因的表达，即细胞的表观遗传学是否会发生改变却不清楚。

基因组印记（genomic imprinting）是目前表观遗传学研究的主要内容之一，指某些基因呈不遵从孟德尔定律依靠单亲传递某些遗传学性状的现象，也就是某些基因呈亲源依赖性单等位基因表达[2]。印记基因在胚胎生长、行为发生、肿瘤生成、神经发育等过程中起着重要的作用，基因组印记的紊乱将导致一系列的疾病[3]。有研究显示，体外长期培养的胚胎干细胞，其表观遗传学呈现不稳定趋势[4]；经体外受精（*in vitro* fertilization，IVF）得到的胚胎干

［收稿日期］2010－08－13；［修回日期］2010－09－15
［基金项目］国家自然科学基金资助项目（No. 30771025）。
［作者简介］刘峰，男，博士，医师。
［通信作者］陈慧玲，副教授。

细胞,亦存在基因组印记异常现象[5]。目前还没有关于胚胎干细胞体外诱导分化为胰岛样细胞过程中表观遗传性状变化的研究。本研究采用聚合酶链式反应-限制性内切酶片段长度多态性分析法,检测印记基因 *Kcnq1* 和 *Cdkn1c* 在诱导分化细胞中的表达情况,以了解体外诱导培养是否影响基因组印记。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠胚胎干细胞 SF1-G 来源于雌性 C57BL/6 小鼠与雄性 M. spretus 小鼠交配后子一代[5],由美国斯坦福大学 Andrew. R. Hoffman 惠赠。Knock-out DMEM、DMEM/F12、L-glutamine、FBS、NAA、N2、B27、β-ME、Laminin 均购自 GIBCO/BRL 公司,LIF 购自 Chemicon 公司,Matrigel、TRIZOL 购自 Invitrogen 公司,RA、Nicotinamide(Sigma)、Activin A(R&D 公司)、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas 公司),Taq DNA 聚合酶(Fermenta)、限制性内切酶(NEB 公司)、insulin 单克隆抗体(CST)、C-peptide 单克隆抗体(LICON)、somatostatin 单抗(Abcam 公司)。胚胎干细胞培养基:Knock-out DMEM,含 0.1 mM β-ME、2 mM L-Glu、1% NAA、20% FBS、1 000 U/mL LIF、100U/mL 的青、链霉素;EBs 培养基:Knock-out DMEM,含 0.1 mM β-ME、2 mM L-Glu、1% NAA、15% FBS、100 U/mL 的青、链霉素;诱导培养基 I:EBs 培养基,100 ng/mL activin A;诱导培养基 II:EBs 培养基,10-6 M RA;胰岛祖细胞增殖培养基:EBs 培养基,10 ng/mL bFGF;诱导培养基 Ⅲ:无糖 DMEM/F12,添加 1% N2,2% B27,10-2M NIC,1% L-谷氨酰胺,1 μg/mL laminin、10 ng/mL bFGF。

1.2 方法

1.2.1 体外定向诱导胰岛样细胞生成 未分化的 SF1-G 铺于明胶包被的并有滋养层细胞的细胞培养皿,37℃,5% CO_2 培养、增殖,参照 Shi 等[6]的三阶段法诱导培养,简述如下:① 诱导胰岛祖细胞形成(第一阶段),纯化后的未分化的胚胎干细胞混悬于细菌培养皿,混悬培养以形成拟胚体。将拟胚体转移到 metrigel 包被的细胞培养皿上贴壁培养 2 h 后,换用诱导培养基 I 培养 24 h,随后换成拟胚体培养液间歇培养 6 ~ 8 h,再次换成诱导培养基 II 培养 24 h;② 扩增胰岛祖细胞(第二阶段),将第一步诱导完的细胞换成含 10 ng/mL bFGF 的胰岛祖细胞增殖培养液培养 3 ~ 5 d,增殖胰岛样祖细胞。③ 诱导胰岛祖细胞成熟为胰岛样细胞(第三阶段),经增殖后的胰岛祖细胞,换成含无血清诱导培养基 Ⅲ 培养 3 ~ 5 d。

1.2.2 对诱导分化后细胞的鉴定 (1)RT-PCR 检测诱导分化后胰岛细胞标志基因的表达情况:分化各阶段细胞总 RNA 按 TRIZOL 说明书提取,逆转录(RT)合成 cDNA,PCR 扩增目的基因,引物的序列以及 PCR 的条件如表 1。反应体系为:10 × 缓冲液:1.0 μL,$MgCl_2$:0.8 μL,dNTPs:0.2 μL,Taq 酶:0.2 μL,引物:0.2 μL,cDNA 模板:0.2 μL ddH_2O 7.6 μL。反应程序条件:94℃ 预变性 2 min 后,94℃ 变性 30 s,X℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,完成 Y 个循环,72℃ 5 min,琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下摄像观察(X、Y 分别代表不同基因 PCR 时所需退火温度和循环数,列于表 1)。

表 1 胰岛细胞特异基因引物序列、退火温度及循环数

基因	产物长度(bp)	引物序列	退火温度(X,℃)	循环数(Y)
Insulin	250	5-CCCACCCA GGCTTTTGTCAAACAGC -3′ 5′-TCCAGCTGGTAGAGGGAGCAGATG-3′	60	30
Glucagon	296	5′-CAGGGCACATTCACCAGCGACTAC -3′ 5′-TCAGAGAAGGAGCCATCAGCGTG -3′	60	30
Somatostatin	253	5′-ATGCTGTCCTGCCGTCTCCA -3′ 5′-TGCAGCTCCAGCCTCATCTCG -3′	60	30
IAPP	221	5′-CTCTCTGTGGCACTGAACCA -3′ 5′-GATTCCCTATTTGGATCCCC -3′	58	30
Glut2	254	5-GAAGACAAGATCACCGGAACCTTGG-3 5-GGTCATCCAGTGGAACACCCAAAA-3	60	30
β-actin	142	5′-CAGGTCATCACTATTGGCAACGAG-3′ 5′-CGGATGTCAACGTCACACTTCATGA -3′	58	25

(2)免疫荧光染色检测分化后细胞特异性蛋白:收集分化成熟的第三阶段细胞,4% 的多聚甲醛溶液室温下固定细胞 45 min,加 PBS 清洗 3 遍;加封闭液(含 10% 驴血清、0.1% 的 Triton-X-100 和 1% BSA)处理 2.5 h,PBS 清洗 3 遍;加一抗,室温 1 h或 4℃过夜孵育,PBS 清洗 3 遍后加入二抗,室温孵育 1 h,PBS 洗 4 次,每次 5 ~ 10 min,然后用 5% BSA 室温封闭 30 min;加 DAPI(1∶1 000 稀释)染

核,室温避光孵育 5 min,用 PBS 清洗 2 遍;将 DAPI/Antifade Solution 稀释 30 倍,滴适量到盖玻片上,室温染色 20 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;封片剂封片,37℃ 烤片 10 min,激光共聚焦显微镜下观察结果。

1.3 RT-PCR/RFLP 法分析细胞印记基因亲本表达

参照文献[5]检测印记基因的表达。以各阶段细胞 cDNA 为模板,用特异性引物(表 2)扩增印记基因 *Kcnq*1、*Cdkn*1*c*,PCR 产物用特异的限制性内切酶(表 2)酶切,反应体系:内切酶 0.5 μL,10 × 缓冲液 2.0 μL,PCR 产物 10 μL,ddH_2O 7.5 μL,水浴箱中 37℃孵育过夜;酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,溴乙锭染色,紫外投射仪上观察电泳结果。

表 2 印记基因特异引物及内切酶

基因	产物长度(bp)	引物序列	退火温度(℃)	内切酶	片段大小(bp)
Kcnq1	276	5′-AGGAGCTCAGAAGGGAGGTC -3′ 5′-GTTCCAGCCATCAGAAGAGC -3′	60	EcoRV	276/167
Cdkn1c	386	5′-GGCTTCAGATCTGACCTCAG -3′ 5′-AGAGAGGCTGGTCCTTCAGC -3′	60	AvaI	386/281

2 结果

2.1 胚胎干细胞体外诱导分化形态变化

由图 1 可见,胚胎干细胞在滋养层细胞上呈团状生长,边缘清晰,在无 LIF 的培养基中悬浮培养后可形成拟胚体,拟胚体在 metrigel 上经 Activin A 及 RA 的连续定向诱导后在铺展开来大片细胞中间出现新细胞集落,细胞体积较小,密集生长,即为胰岛祖细胞;接着胰岛祖细胞在含生长因子 bFGF 的培养基中增殖扩增成熟,小细胞集落中细胞数量增加,范围扩大,呈小克隆样结构,周边的上皮样细胞减少,成凋亡趋势,即向终末胰岛细胞成熟。在整个诱导分化过程中细胞形态学发生了明显的变化(图 1)。

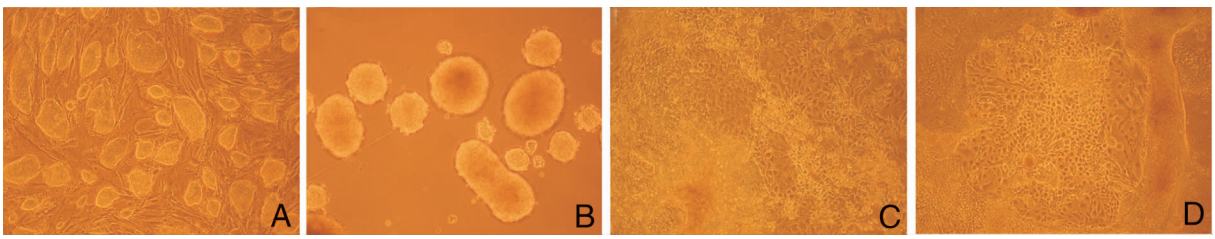

图 1 各阶段的细胞的光镜图(×100) **A**: 在滋养层上的未分化细胞; **B**: 拟胚体; **C**: 分化第二阶段胰岛样细胞; **D**: 分化第三阶段胰岛样细胞。

2.2 免疫荧光染色检测分化末细胞特异性蛋白表达

蛋白 Insulin、C-peptide 和 Somatostatin 是胰岛细胞特异表达的激素,免疫荧光染色结果显示,诱导分化终末细胞能表达胰岛细胞特异性激素(图 2)。

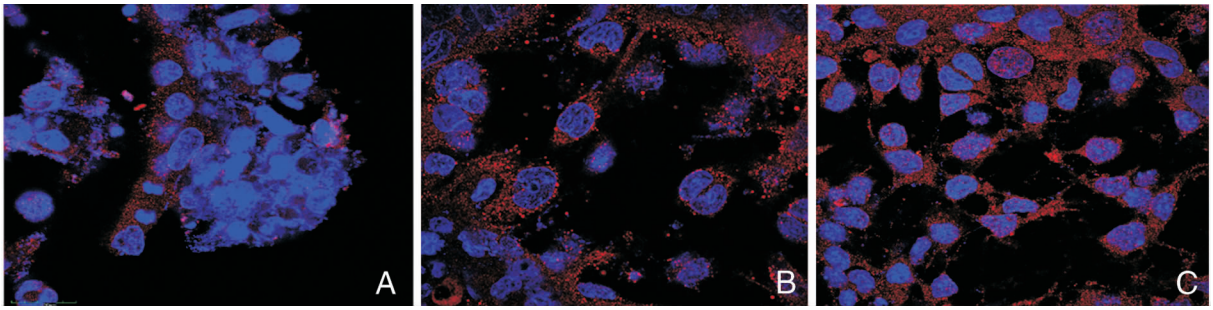

图 2 分化细胞免疫荧光检测特异性蛋白的表达(×600) **A**: Somatostatin 的免疫荧光染色,蓝色为细胞核,红色为 Somatostatin; **B**:C-peptide 免疫荧光染色,蓝色为细胞核,红色为 C-peptide; **C**:Insulin 免疫荧光染色,蓝色为细胞核,红色为 Insulin。

2.3 RT-PCR 检测分化各阶段细胞胰岛细胞特异性基因表达

Insulin、*Glucagon*、*Somatostatin*、*IAPP*、*Glut2* 是胰岛细胞标志性基因,它们在未分化的胚胎干细胞不表达,而在诱导分化第二阶段末和第三阶段末的细胞都有表达(图 3)。

2.4 RT-PCR/RFLP 检测印记基因表达结果

印记基因 *Kcnq1* 和 *cdkn1c* 在分化前的胚胎干细胞是从母本单等位基因表达，分化终末细胞 *Kcnq*1 呈双等位基因表达，从分化第二阶段开始 *Cdkn*1c 呈双等位基因表达，表现为印记异常，见图 4。

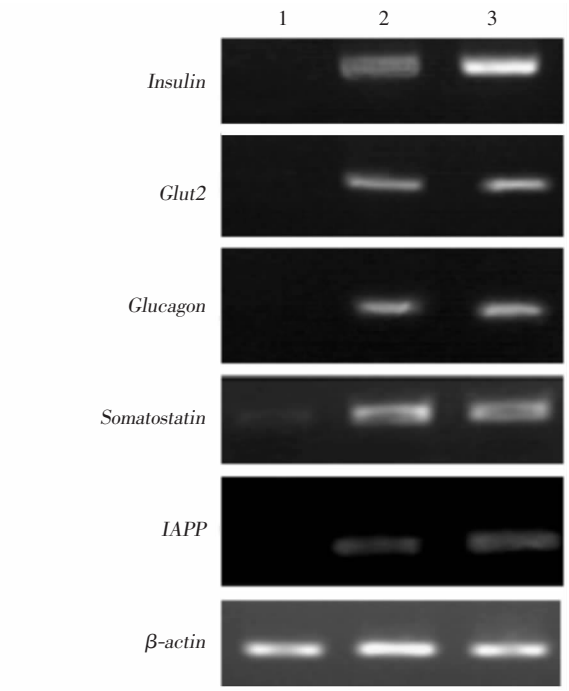

图 3　不同阶段细胞特异性基因的表达　1：胚胎干细胞；2：分化第二阶段细胞；3：分化第三阶段细胞

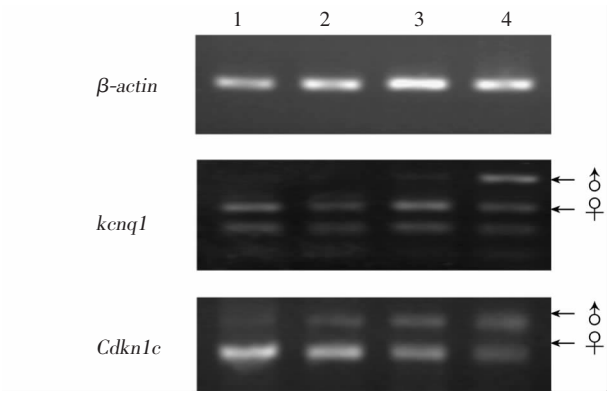

图 4　*Kcnq1* 和 *Cdkn1* 在不同阶段细胞中的表达　1. 胚胎干细胞；2. 拟胚体；3. 分化第二阶段细胞；4. 分化第三阶段细胞；♀母源，♂父源

3　讨论

胚胎干细胞作为个体生长发育最早阶段来源的细胞，具有分化为个体中任何组织细胞的潜能，胚胎干细胞分化的整个过程其实就是表观遗传调控基因表达的过程，即遗传物质不变，其表型却可以有多种形式。稳定的表观遗传调控是机体正常生长发育的基础，有研究显示，作为生长发育初始阶段的胚胎干细胞，存在表观遗传调控的不稳定性，胚胎干细胞的生长条件及微环境的改变均会影响其生长和分化[4]，表明其表观遗传调控受环境的影响较大。目前，作为干细胞研究的热点之一就是在体外诱导胚胎干细胞向特定组织细胞分化，用于细胞、组织和器官的修复和移植治疗[1]，以此实现利用干细胞资源的目的。现有的定向诱导的基本策略中，大多是利用特定的细胞因子或化学诱导物质来启动胚胎干细胞定向诱导分化，并且，诱导所用的浓度大大超出体内生理剂量浓度。那么，体外培养的环境，加上这种大剂量的诱导剂是否会影响印记基因的表达，目前尚未见报道。

Cdkn1c 基因又称 *P57kip2*，编码的蛋白是细胞周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinase，CDK）的抑制因子，细胞周期调控有赖于 CDK 的活化，细胞周期蛋白（cyclins）是 CDK 的正性调控因子，可激活 CDK 的活性；相反 CDK 的抑制蛋白因子则使 CDK 失去活性。因此，Cdkn1c 蛋白有限制性调节细胞周期进程的作用，通过协同细胞周期蛋白对 CDK 活性的调控而影响着细胞周期的转换[7]。有研究报道，Cdkn1c 蛋白能促进细胞凋亡、诱导分化，并且在胚胎发育过程中起独特的作用[8-9]。也有研究发现，Cdkn1c 能在胰腺表达，并且和胰岛 β 细胞的增殖相关[10]。*Kcnq1* 基因又称 *KvLQT1*，是 1996 年 Wang 等[11]用定位克隆首先克隆的一个基因，编码电压门控钾离子通道的亚单元。随后研究发现，*Kcnq1* 在机体多种组织表达，具有调节水盐代谢等重要的生理作用[12]。*Kcnq1*、*Cdkn1c* 是相邻的两个从母源表达的印记基因，它们的印记异常和多种生长发育疾病相关[13-14]，最近的研究显示，*Kcnq1* 基因的变化和 2 型糖尿病有一定的相关性，并推测可能是 *Kcnq1* 基因编码的电压门控钾离子通道和胰岛细胞胰岛素分泌有关[15-17]。

为了探讨体外诱导分化过程中基因印记的改变，本研究利用存在等位基因单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）并含有限制性内切酶多态位点的 SF1-G 细胞体外诱导分化为胰岛样细胞，通过检测胰岛特异性的标志基因以及特异性的蛋白，确认 SF1-G 细胞在体外能定向诱导成胰岛样细胞。在分化过程各阶段收集细胞，通过限制性内切酶片段长度多态性 PCR 检测印记基因

Kcnq1、*Cdkn1c*表达的亲本来源。结果发现,这两个本来主要从母源单等位基因表达的基因,在分化后细胞内却呈现出双等位基因表达,即表现为印记丢失(lose of imprinting, LOT),这一结果提示,诱导分化导致了印记基因印记状态的改变。基因组印记的形成主要是来自父方和母方的等位基因在通过精子和卵子传递给子代时发生了修饰,使带有亲代印记的等位基因具有不同的表达特性,这种修饰常为 DNA 甲基化修饰,也包括组蛋白乙酰化、甲基化等修饰[3]。有研究显示差异性 DNA 甲基化区 KvDMR1 在调控 *Kcnq1*、*Cdkn1c* 的表达上起了重要的作用[18],那么,分化过程中是否是因为 KvDMR1 甲基化发生了变化而导致基因印记改变呢? 同样基因印记的改变对分化后细胞的作用即是否对胰岛素形成及分泌产生影响呢? 这都需进一步实验明确。虽然这种印记状态改变的生理意义尚不明确,印记改变的机理也未阐明,但它提醒我们在体外诱导胚胎干细胞定向分化时,不仅要追求分化效率的提高,同时还应注意监测表观遗传性状的改变。

[参 考 文 献]

[1] Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(2 Suppl 2): S336-S344.

[2] Morison IM, Reeve AE. A catalogue of imprinted genes and Parent-of-origin effects in humans and animals[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(10): 1599-1609.

[3] Ubeda F, Wilkins JF. Imprinted genes and human disease: an evolutionary perspective[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 626:101-115.

[4] Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM 3rd, Biniszkiewicz D, et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice[J]. Science, 2001,293(5527): 95-97.

[5] Li T, Vu TH, Ulaner GA, Littman E, Ling JQ, Chen HL, et al. IVF results in de novo DNA methylation and histone metylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch[J]. Mol Hum Reprod, 2005,11(9): 631-640.

[6] Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, et al. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid[J]. Stem Cells, 2005, 23(5): 656-662.

[7] Chellappan SP, Giordano A, Fisher PB. Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1998, 227: 57-103.

[8] Reid LH, Crider-Miller SJ, West A, Lee MH, Massagué J, Weissman BE. Genomic organization of the human p57KIP2 gene and its analysis in the G401 Wilms tumor assay[J]. Cancer Res, 1996, 56(6):1214 -1218.

[9] Vlachos P, Nyman U, Hajji N, Joseph B. The cell cycle inhibitor p57(Kip2) promotes cell death via the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(8): 1497-1507.

[10] Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Hussain K, Smith V, Lindley KJ, et al. p57(KIP2) expression in normal islet cells and in hyperinsulinism of infancy[J]. Diabetes, 2001, 50(12): 2763-2769.

[11] Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias[J]. Nat Genet, 1996, 12 (1): 17-23.

[12] Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function[J]. Physiology (Bethesda), 2005, 20: 408-416.

[13] Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beck with-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements[J]. Nat Genet, 1997, 15(2): 181-185.

[14] Paulsen M, El-Maarri O, Engemann S, Strödicke M, Franck O, Davies K, et al. Sequence conservation and variability of imprinting in the Beckwith-Wiedemann syndrome gene cluster in human and mouse[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(12): 1829-1841.

[15] Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Genet, 2008, 40(9):1092-1097.

[16] Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, et al. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations[J]. Nat Genet, 2008, 40(9): 1098-1102.

[17] Tan JT, Nurbaya S, Gardner D, Ye S, Tai ES, Ng DP. Genetic variation in KCNQ1 associates with fasting glucose and beta-cell function: a study of 3,734 subjects comprising three ethnicities living in Singapore[J]. Diabetes, 2009, 58(6): 1445-1449.

[18] Mancini-DiNardo D, Steele SJ, Ingram RS, Tilghman SM. A differentially methylated region within the gene Kcnq1 functions as an imprinted promoter and silencer[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12 (3): 283-294.

(本文编辑:王 霞)