

不同病毒感染方法对山羊体细胞重编程效率的影响

宋辉^{1,2}, 李卉^{1,2}, 王锋^{2*}

(1. 宁夏医科大学生育力保持省部共建教育部重点实验室, 宁夏银川 750004; 2. 南京农业大学江苏省肉羊产业工程技术研究中心, 江苏南京 210095)

摘要 [目的]检测2种病毒感染方法(悬浮感染和贴壁感染)对体细胞重编程效率的影响。[方法]采用慢病毒作为载体携带多能因子分别使用悬浮感染和贴壁感染2种方法感染正常山羊体细胞,统计克隆形成率。[结果]悬浮感染和贴壁感染的平均克隆率分别为0.44%和0.31%,悬浮感染的效果要显著地优于贴壁感染。[结论]悬浮感染的方式更利于山羊成纤维细胞重编程。

关键词 诱导性多能干细胞;病毒;重编程效率

中图分类号 S852.65⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)32-0089-02

Effects of Different Virus Infection Methods on Reprogramming Efficiency of Goat Somatic Cells

SONG Hui^{1,2}, LI Hui^{1,2}, WANG Feng^{2*} (1. Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance, Ningxia Medical University, Ministry of Education, Yinchuan, Ningxia 750004; 2. Jiangsu Engineering Technology Research Center of Meat Sheep & Goat Industry, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract [Objective] To study the effect of two kinds of virus infection methods (suspension infection and adherent infection) on somatic cell reprogramming efficiency. [Methods] Lentivirus was used as carrier to carry the pluripotent factor. The somatic cells of normal goat were infected by suspension infection and adherent infection respectively. The colony formation rate was calculated. [Result] The average cloning rate of suspension infection and adherence infection was 0.44% and 0.31% respectively. The effect of suspension infection was significantly better than that of adherent infection. [Conclusion] The method of suspension infection is more suitable for reprogramming of goat fibroblasts.

Key words Induced pluripotent stem cells; Virus; Reprogramming efficiency

体细胞重编程方法主要包括:核移植、细胞融合和诱导性多能干细胞技术(induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[1](图1),而目前最常用的方法是iPSCs技术。但是作为一个新技术仍然存在一些问题,例如重编程的效率低等。该技术从产生至今,尽管研究人员不断对其进行优化,Huang等^[2]报道,不论是人类细胞还是小鼠细胞,不论使用2,3或4个因子进行诱导,VPA都可以有效地提高重编程的效率。VPA与腺病毒和质粒转染的方法相结合,能否提高重编程的效率仍值得进一步探索。

最近的研究也已经表明,在重编程过程中转基因的表达只需要在开始的10~12 d^[3-4],表明游离病毒载体携带的外源转录因子已经足够重编程体细胞。因此,该研究尝试在病毒感染的初期使用2种感染方法:悬浮感染和贴壁感染,检测是否对体细胞重编程效率产生影响,从而为山羊成纤维细胞重编程提供指导。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM培养基、DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS)、血清替代物(KSR)、非必需氨基酸(NEAA)、脂质体(Lipofectamine TM 2000)、胰蛋白酶、谷氨酰胺、 β -巯基乙醇(β -ME)均购置于美国Life公司;丝裂霉素-C(MIT-C)购置于瑞士Roche公司;成纤维细胞生长因子(β -FGF)购置于美国Peprotech公司。

1.2 方法

1.2.1 悬浮感染。用胰酶消化羊耳成纤维细胞,用含有病

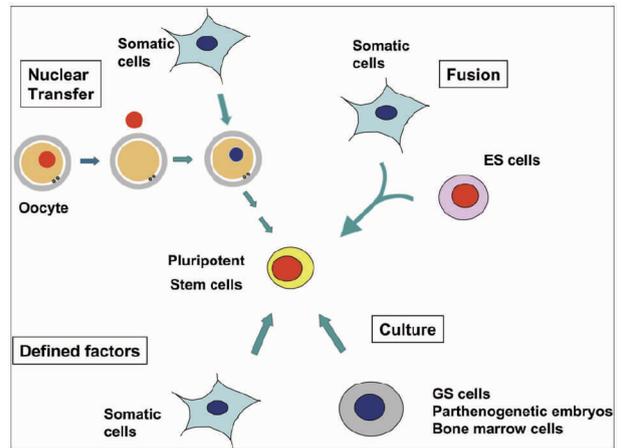


图1 3种重编程方法^[1]

Fig. 1 Three approaches to nuclear reprogramming to pluripotency

毒感染液的培养液将细胞吹下。将细胞悬液铺到事先准备好的饲养层上。24 h后将病毒感染液吸出,加入体细胞培养液。24 h后重复感染一次。4 d后,用胰酶消化病毒感染的羊耳成纤维细胞,按一定的比例铺到事先准备好的饲养层上,每天换液,在第6天用ESCs培养基代替体细胞培养基继续培养,直到出现克隆。

1.2.2 贴壁感染 感染前,在6孔板的一个孔里铺上羊耳成纤维细胞。待细胞汇合到80%时,加入病毒感染液感染(每孔的感染液为:每种病毒浓缩液按照1:1:1的比例加入到1 mL体细胞培养液,混匀)。24 h后将病毒感染液吸出,加入体细胞培养液。24 h后重复感染一次。4 d后,用胰酶消化病毒感染的羊耳成纤维细胞,按一定的比例铺到事先准备好的饲养层上,每天换液,在第6天用ESCs培养基代替体细胞培养基继续培养,直到出现克隆。

基金项目 宁夏自然科学基金(NZ15071)。

作者简介 宋辉(1983—),男,安徽淮南人,讲师,博士,从事干细胞诱导分化研究。*通讯作者,教授,博士生导师,从事动物遗传育种与繁殖研究。

收稿日期 2017-09-15

2 结果与分析

2.1 病毒感染前后羊耳成纤维细胞的形态学观察 图 2A 为原代培养的山羊成纤维细胞,中间夹杂着一些卵圆形的上皮细胞,经过传代即可除去混杂的上皮细胞,得到纯度很高的成纤维细胞,在第 2~3 代进行病毒感染(图 2B;F3 代山羊成纤维细胞),图 2C 和图 2D 依次分别是经过两轮病毒贴壁

感染和悬浮感染后的山羊成纤维细胞,由于病毒对细胞的损伤导致部分细胞出现凋亡现象。将病毒感染后的细胞使用胰酶消化后铺到事前准备好的饲养层上继续培养(图 2E 和图 2F),不论是在悬浮感染还是贴壁感染,一般都会在感染后 12~15 d 出现克隆(图 2G 和图 2H,表 1)。

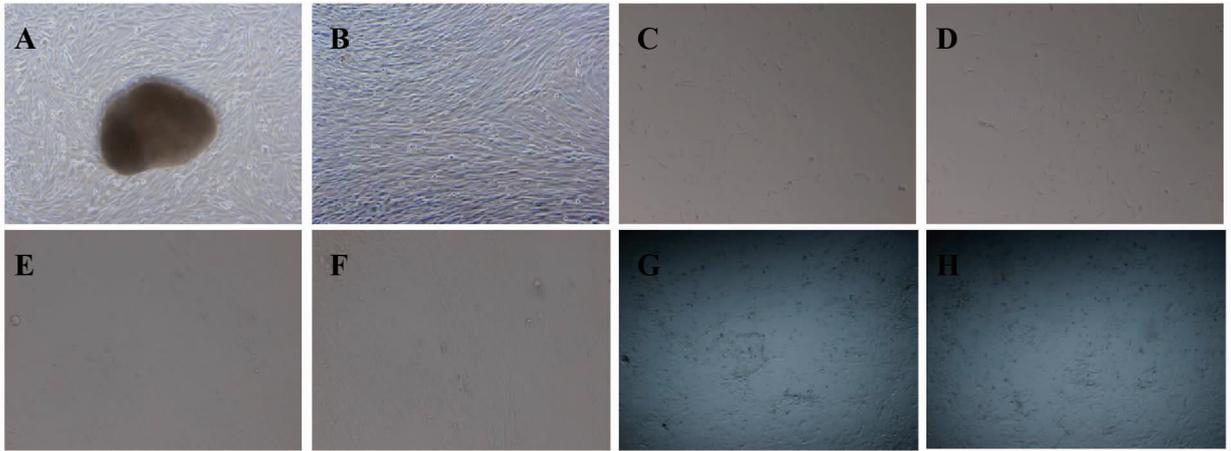


图 2 病毒感染前后山羊成纤维细胞形态特征变化及克隆形成

Fig. 2 Morphological changes and clonal formation of goat fibroblasts before and after virus infection

2.2 不同病毒感染方式对克隆形成效率的影响 每种感染方式各做了 5 次重复试验,每次感染 1×10^5 个细胞,悬浮感染和贴壁感染的平均克隆率分别为 0.44% 和 0.31%,悬浮感

染的效果要显著地优于贴壁感染,使用悬浮感染更利于山羊成纤维细胞重编程。

表 1 不同病毒感染方法对山羊成纤维细胞重编程效率的影响

Table 1 Effects of different viral infection methods on reprogramming efficiency of goat fibroblasts

感染方式 Infection mode	感染次数 Infection number	感染细胞数 Infected cells	克隆形成时间 Colony formation time	克隆数 Cloning number	克隆形成率 Colony formation rate//%	平均克隆形成率 Average colony formation rate//%
悬浮感染 Suspension infection	1	1×10^5	13	45	0.45	0.44
	2	1×10^5	12	37	0.37	
	3	1×10^5	14	51	0.51	
	4	1×10^5	13	47	0.47	
	5	1×10^5	12	39	0.39	
贴壁感染 Adherent infection	1	1×10^5	12	31	0.31	0.31
	2	1×10^5	13	36	0.36	
	3	1×10^5	15	28	0.28	
	4	1×10^5	13	34	0.34	
	5	1×10^5	12	24	0.24	

3 结论与讨论

体细胞重编程的过程中,一直面临诱导效率过低的问题,影响因素很多,细胞本身的质量及个体差异对诱导结果会产生一定的影响,诱导后内源基因表达的时间和克隆出现的时间都会存在一定差异,而其中病毒的用量非常重要,用量过大会对体细胞造成严重的伤害,用量过小不足以将体细胞重编程到需要的程度。因此,该试验采用多次重复感染,并配合悬浮感染和贴壁感染 2 种方法,以期增加 iPSCs 形成的效率和质量。结果表明悬浮感染平均克隆率为 0.44%,而贴壁感染平均克隆率为 0.31%,悬浮感染的效果要显著优于贴壁感染,但是不论用哪种感染方法,对克隆出现的时间不会有太大的影响,一般是在诱导后 12~15 d 出现克隆。该研

究用形态学标准筛选原代克隆进行扩增^[5-6],iPSCs 已经传代超过 20 代,传代细胞活力旺盛,冻存后快速复苏,其复苏后大部分细胞具有良好的细胞活力。

参考文献

- [1] YAMANAKA S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(1): 39-49.
- [2] HUANGFU D W, MAEHR R, GUO W J, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(7): 795-797.
- [3] STADTFELD M, MAHERALI N, BREAUULT D T, et al. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPSC cell reprogramming in mouse[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(3): 230-240.

(下转第 104 页)

0.05)。表明盆栽青海冷地早熟禾在水胁迫影响下,植物体内矿物元素营养也具有蓄积增加的趋势。可见不论是在干

旱或水胁迫的影响下,盆栽青海冷地早熟禾中矿物元素营养均具有蓄积增加的趋势。

表1 干旱和水胁迫下盆栽青海冷地早熟禾中矿物元素

Table 1 Mineral Elements in Potted *Poa crymophila* under Drought and Water Stress

处理 Treatment	钙 Ca g/kg	镁 Mg g/kg	钾 K g/kg	钠 Na g/kg	磷 P g/kg	铁 Fe g/kg
对照组 Control group	4.72 ± 0.40	2.09 ± 0.16	21.03 ± 1.00	0.546 ± 0.063	3.03 ± 0.10	0.143 ± 0.004
干旱组 Drought group	4.58 ± 0.14	2.03 ± 0.17	21.77 ± 1.00	0.577 ± 0.172	3.02 ± 0.05	0.152 ± 0.017
水胁迫组 Water stress group	4.92 ± 0.27	2.03 ± 0.09	20.57 ± 1.42	0.495 ± 0.161	3.35 ± 0.11 * *	0.154 ± 0.018
处理 Treatment	铜 Cu mg/kg	锌 Zn g/kg	锰 Mn g/kg	铬 Cr mg/kg	镍 Ni mg/kg	镉 Cd mg/kg
对照组 Control group	5.76 ± 0.86	0.142 ± 0.020	0.026 ± 0.002	0.303 ± 0.046	11.15 ± 5.73	0.259 ± 0.031
干旱组 Drought group	8.16 ± 0.1.28 *	0.137 ± 0.026	0.031 ± 0.008 *	0.263 ± 0.063	25.30 ± 6.00 *	0.286 ± 0.073
水胁迫组 Water stress group	6.83 ± 0.68	0.117 ± 0.006	0.029 ± 0.005	0.353 ± 0.020	20.43 ± 8.75 *	0.245 ± 0.020

注:与对照组比较,*为 $P < 0.05$,**为 $P < 0.01$

Note:Compared with control,* stands for $P < 0.05$,** stand for $P < 0.01$

水分在植物生命活动中起着极大的作用,矿物元素也是植物生长发育的必需营养物质。矿物元素溶于水后才能被植物吸收和在体内转运,而蒸腾作用又是植物对水分吸收和流动的动力,即矿物元素营养是随水分的吸收和流动而被吸入,并转运到植物体的各组织和器官中发挥其功能作用^[5-7]。盆栽试验中各处理组与对照组比较,干旱和水胁迫处理都会使盆栽青海冷地早熟禾中的多种矿物元素营养蓄积增加,按照矿物元素饥饿效应假说,植物体内矿物元素营养有蓄积,则该矿物元素营养供给不及时或相对不足^[3]。可见在干旱和水胁迫等环境变化的影响下,盆栽青海冷地早熟禾中多种矿物元素营养蓄积是其对于干旱或水胁迫等环境变化的适应与响应。因此,天然草地植物中矿物元素营养的蓄积增加也可能是其对草地演替进程的适应与响应,干旱或水胁迫等环境因子的变化,驱使天然草地植物中矿物元素营养供给不足而蓄积增加,可见,盆栽青海冷地早熟禾中干旱和水胁迫试验也是矿物元素饥饿效应假说理论的再检验。

试验中干旱组、对照组和水胁迫组的水分是梯度控制的,盆栽青海冷地早熟禾中Ca、P、Cr等元素含量随着水分增加而增加,K、Na、Cd等元素含量随着水分的增加而减小,即盆栽青海冷地早熟禾对于有利于矿物元素溶解的水分并非越多越好,水分的匮乏(干旱)和盈余(水胁迫)都不利于植物对于矿物元素营养的摄取与吸收,可以说,盆栽青海冷地早熟禾中矿物元素营养的蓄积增加并非有利于植物的生长发育,即在干旱和水胁迫等逆境条件下,植物体内矿物元素营养元素的积累将发生变化^[8-9]。同理,退化草地植物中矿物元素营养的蓄积增加是草地退化演替的结果,当然退化草地植物中矿物元素营养的蓄积增加可能又驱使草地的再退化,即退化草地植物中矿物元素营养的蓄积也可以说是草地退化演替的原因。

干旱和水胁迫影响试验表明,有利于矿物元素溶解和吸收的水分并非是盆栽青海冷地早熟禾中矿物元素营养蓄积增加的原因,因为在试验中干旱组、对照组和水胁迫组的水分供给是梯度控制的,而盆栽青海冷地早熟禾中除Ca、P、Cr等外,大多数矿物元素营养的蓄积增加与水分之间并非正相关关系,所以矿物元素饥饿效应才是矿物元素营养蓄积增加的动力,即适宜的水分供给才有利于植物正常的生长与发育。

3 结论

在干旱和水胁迫影响下,盆栽青海冷地早熟禾中矿物元素营养具有蓄积增加的趋势,是其对于干旱或水胁迫等环境变化的适应与响应,也是矿物元素饥饿效应假说理论的再检验,其中矿物元素饥饿效应是草地植物中矿物元素蓄积增加的内动力之一。

水分的匮乏(干旱)和盈余(水胁迫)都不利于盆栽青海冷地早熟禾对于矿物元素营养的摄取与吸收,适宜的水分供给才有利于植物对于矿物元素营养的摄取与吸收和正常的生长与发育。

参考文献

- [1] 李天才. 草地矿物元素[M]. 北京:化学工业出版社,2014:77-83.
- [2] 李天才. 青海湖北岸草地矿物元素分布格局与蓄积分异行为研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2013:61-68.
- [3] 李天才. 生物矿物元素“饥饿效应”现象[J]. 青海草业,2015,24(4):2-4.
- [4] 青海省草原总站. 青海草地资源[M]. 西宁:青海人民出版社,2012:186.
- [5] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2002:184-230.
- [6] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2001:17-26.
- [7] 黄子琛,沈渭寿. 干旱区植物的水分关系与耐旱性[M]. 北京:中国环境科学出版社,2000:53-69.
- [8] 汪贵斌,袁安全,曹福亮,等. 土壤水分胁迫对银杏无机营养元素含量的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2005,29(6):15-18.
- [9] 刘建福,倪书邦,贺照勇,等. 水分胁迫对澳洲坚果叶片矿质元素含量的影响[J]. 热带农业科技,2005,27(1):1-3.

(上接第90页)

- [4] BRAMBRINK T, FOREMAN R, WELSTEAD G G, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2):151-159.
- [5] 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.

- [6] KASTENBERG Z J, ODORICO J S. Alternative sources of pluripotency: Science, ethics, and stem cells[J]. Transplant Rev (Orlando), 2008, 22(3):215-222.