

# 定量分析诱导山羊体细胞重编程过程中端粒酶的表达变化

张淑金, 孟书燕, 雷蕾, 程祥, 王华岩

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 陕西省干细胞工程技术研究中心, 杨凌 712100

**摘要:** 动物体细胞重编程为诱导多能干细胞 (iPS) 是目前干细胞生物学研究的热点。文中重点对山羊体细胞重编程过程中端粒酶 (TERT) 基因的相对表达量进行了检测, 探讨了山羊重编程细胞的形成与端粒酶基因表达的关系。从关中奶山羊胎儿皮肤分离得到的胎儿成纤维细胞 (GEF), 其增殖能力较强, 核型正常 (60 条 XY), 通过转录因子在体外诱导得到山羊重编程细胞。利用 Real-time RT-PCR 方法首先对关中奶山羊胎儿各种组织的 TERT 表达进行了检测, 结果表明睾丸组织中 TERT 的表达显著高于上皮组织 ( $P < 0.01$ ), 在山羊胎儿的其他组织中 TERT 也有不同程度的表达。对原代重编程细胞和 4 株不完全重编程细胞株的 TERT 表达检测结果发现, 碱性磷酸酶 (AP) 阳性的重编程细胞端粒酶表达量要显著高于 AP 阴性的重编程细胞 ( $P < 0.01$ )。这一结果揭示, 激活端粒酶活性并使其保持较高的表达水平对体细胞的重编程至关重要。

**关键词:** 端粒酶, 细胞重编程, Real-time RT-PCR, 关中奶山羊

## Quantitative analysis of telomerase reverse transcriptase gene expression in goat reprogramming cells

Shujin Zhang, Shuyan Meng, Lei Lei, Xiang Cheng, and Huayan Wang

*Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Veterinary Medicine, Shaanxi Center for Stem Cell Engineering and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China*

**Abstract:** Currently, animal somatic cell reprogramming into the induced pluripotent stem cell (iPS) is one of the hottest research target in the field of cell biology. We focused on the analysis of telomerase reverse transcriptase (TERT) gene expression during goat somatic fibroblasts reprogramming, and investigated the relationship between the expression of TERT and the pluripotency of reprogrammed cells. RNA samples of fetal tissues isolated from Guanzhong milk goat fetus, and the induced goat reprogramming cell clones were used to determine the relative expression levels of TERT by the real-time RT-PCR method. Goat embryonic fibroblasts (GEF) collected from the Guanzhong milk goat with normal karyotype were induced by 4 transcription factors to become reprogramming cells. The expression of TERT in reprogramming cells was detected by Real-time RT-PCR. The results showed that the expression of TERT in testis tissue was higher than that in epithelial tissues ( $P < 0.01$ ). The expression level of TERT was higher

**Received:** February 3, 2010; **Accepted:** May 25, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30871786), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA101005), New Transgenic Methods and Technologies (No. 2008ZX0810-001).

**Corresponding author:** Huayan Wang. Tel: +86-29-87080069; E-mail: hhwang101@163.com

国家自然科学基金 (No. 30871786), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2008AA101005), 转基因新技术新方法专项 (No. 2008ZX0810-001) 资助。

in AP staining positive cells than that in AP staining negative cells ( $P < 0.01$ ). This result indicated that TERT activity played an important role in cell reprogramming.

**Keywords:** telomerase reverse transcriptase (TERT), cell reprogramming, real-time RT-PCR, Guanzhong milk goat

体细胞随着分裂次数的增加端粒不断缩短, 从而影响基因组的稳定, 最终导致细胞的衰老和死亡。端粒酶 (TERT) 能以其自身 RNA 为模板反转录合成端粒的重复序列, 延长端粒 (Telomere) 的长度, 提高基因组的稳定性, 保证细胞的持续增殖能力<sup>[1-3]</sup>。除一些特别组织 (如睾丸等) 外, 成体细胞中 TERT 的表达水平较低, 而在胚胎干细胞中 TERT 能始终保持很高的活性。因此, 端粒酶的高表达对于维持干细胞自我更新能力和多分化潜能具有重要意义<sup>[4]</sup>。

2006 年科学家发现用 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc (OSKM) 4 个转录因子, 可以将鼠的成纤维细胞诱导成多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPS)<sup>[5]</sup>, 其细胞形态和生物学特点与 ES 细胞相似。在小鼠 iPS 细胞建系成功后, 又有 4 个科研小组先后报道了人 iPS 细胞建系<sup>[6-9]</sup>。最近, 猴<sup>[10]</sup>、大鼠<sup>[11-12]</sup>和猪<sup>[5]</sup>的 iPS 细胞系也已成功建立。iPS 细胞的产生为干细胞研究开辟了一条新途径, 具有广泛的应用前景。由于 iPS 细胞研究刚刚起步, 还有许多问题和影响因素有待解决。其中 iPS 细胞重编程过程中 TERT 的活性变化, 是值得研究的一个问题。

尽管体细胞重编程在小鼠和人上已经有较深入地研究, 但在家畜特别是山羊上的研究还在探索中。另外, 山羊体内各种组织细胞中的 TERT 表达变化目前也不清楚。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术 (Real-time RT-PCR)<sup>[15]</sup>对关中奶山羊胎儿组织和重编程细胞中端粒酶基因相对表达量进行了检测, 探讨 iPS 细胞形成与端粒酶基因表达之间的对应关系, 以及碱性磷酸酶阳性和阴性的重编程细胞端粒酶基因表达水平的差异, 以期对山羊 iPS 细胞的研究和应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

高糖 DMEM、谷氨酰胺、胎牛血清 (FBS)、 $\beta$ -巯基乙醇、非必须氨基酸均购自 Gibco, 人 bFGF 购

自 Millipore,  $\alpha$ -萘酚磷酸盐、坚固红 TR 盐、丝裂霉素 C 均购自 Sigma, RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen, 反转录试剂盒购自 Fermentas。TRET 一抗购自 Abcam, 绿色荧光二抗购自鼎国生物制品有限公司。

MEF 培养液为: 高糖 DMEM+10% 新生牛血清 (NBS)+100 IU/mL 青霉素+0.1 mg/mL 链霉素。

山羊重编程细胞培养液为: 高糖 DMEM+15% FBS+2 mmol/L 谷氨酰胺+0.1 mmol/L 非必需氨基酸+0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇+4 ng/mL bFGF+100 IU/mL 青霉素+0.1 mg/mL 链霉素。

根据山羊 Tert mRNA 序列 (GenBank Accession No. EU139124.1) 和山羊 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) mRNA 序列 (GenBank Accession No. AF030943), 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由北京奥科生物技术有限责任公司合成荧光定量 PCR 引物 (表 1)。

表 1 荧光定量 PCR 扩增引物序列表  
Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Length (bp)
Tert	Forward: CACTCGCACCTGGAGGTGCAT	100
	Reverse: CCGCCAACAGCTTGCACGCATG	
GAPDH	Forward: CATGTTTGTGATGGGCGTGAACCA	158
	Reverse: TGATGGCGTGGACAGTGGTCATAA	

### 1.2 方法

#### 1.2.1 关中奶山羊胎儿组织 RNA 的提取

取胎膜完整的 3 月龄关中奶山羊胎儿, 浸泡在含有双抗的生理盐水中, 4℃ 运回实验室。用生理盐水冲洗山羊胎儿, 取胎儿皮肤、睾丸、脑、肌肉、肾、肝、脾、肺等组织, 切成 1 mm<sup>3</sup> 左右的小块, 立即放入装有适量液氮的研钵中迅速研磨成粉末, 研磨过程中始终保持研钵内有液氮。然后将组织粉末移入 1.5 mL 的 EP 管中, 加入 1 mL Trizol 裂解组织, 剧烈振荡 30 s, 并在室温放置 5 min。加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min。样品分为 3 层: 上层无色

水相, 下层粉红色有机相, 中间蛋白质膜层。将上清转移至另一新的 DEPC 处理过的 1.5 mL EP 管中, 加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀后室温放置 30 min。4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 1 mL 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀。4℃、7 500 r/min 离心 5 min, 室温放置 10~15 min 干燥, 加入 60 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀, -80℃ 保存。Trizol 法提取组织总 RNA, 紫外分光光度仪检测 RNA 的质量和浓度。所得 RNA 260 nm/280 nm 介于 1.8~2.0 之间, 符合纯度要求。取 3 μg 总 RNA 进行逆转录反应, 步骤按 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明书进行, 逆转录的 cDNA 置于 -20℃ 保存。

### 1.2.2 SYBR Green 实时定量 PCR

首先对样品进行标定。取待测样品的 cDNA 分别稀释 1、10、100 和 1 000 倍。取不同浓度稀释的样本 cDNA 2 μL, 分别加入 2×SYBR Premix ExTaq™ 12.5 μL, 10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL, DMSO 1.25 μL, 去离子水 7.25 μL, 总反应体系为 25 μL。将不同反应体系置于 96 孔 Clear Optical Reaction Plate 内, 在实时荧光定量 PCR 仪 (LineGene9600) 上进行 PCR 扩增, 并同时荧光定量, 检测目的基因和内参基因 (GAPDH) 在不同浓度稀释样本中的扩增情况。反应条件为: 94℃ 2 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 共 40 个循环。从 72℃ 到 94℃ 每上升 0.5℃ 取 1 次荧光值。试验证明 10 倍稀释样品的 Ct 值在 15~30 个循环出现。取 10 倍稀释浓度的样本 cDNA 2 μL, 加入 2×SYBR Premix ExTaq™ 12.5 μL, 上、下游引物各 1 μL (10 μmol/L), DMSO 1.25 μL, 去离子水 7.25 μL, 总反应体系 25 μL。反应条件为: 94℃ 2 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 共 40 个循环, 从 72℃ 到 94℃ 每上升 0.5℃ 取 1 次荧光值。最后生成溶解曲线, 通过溶解曲线确定反应产物的单一性。对细胞进行检测时, 细胞 RNA 样品的制备提取详见 1.2.1。山羊胎儿成纤维细胞 (GEF) 为对照; AP+ 为碱性磷酸酶 (AP) 阳性的原代重编程细胞; 14#、25# 为传到第 4 代的重编程细胞; F11#、F12# 为传到第 16 代的重编程细胞。上述 4 株细胞均为 AP 阴性。Real-time RT-PCR 反应程序和定量分析, 同上。每个组织或细胞株取 3 组样品进行测定, 每组样品设

3 个重复, 用随机携带的图像定量分析软件对数据进行处理。

### 1.2.3 关中奶山羊皮肤成纤维细胞的原代分离培养

无菌条件下取皮肤 1 mm<sup>3</sup> 左右, 置于含有双抗的 PBS 中, 反复漂洗直到漂洗液清亮透明为止, 转移至培养皿中剪弃脂肪和结缔组织, 用镊子将组织块在培养皿上均匀摆置, 每小块间距 5 mm 左右, 组织块放置好后, 向皿内组织块上滴加少量培养液, 放入 37℃ 培养箱中。第 2 天向皿内再加入少许培养液, 以后每 3 天换 1 次培养液, 每天在倒置相差显微镜下观察, 有成纤维细胞游离出后, 长到细胞成片时, 进行传代培养。

细胞生长曲线测定时, 将胎儿成纤维细胞分别以  $3 \times 10^4$  细胞数/孔接种于已铺被 0.1% 明胶的 24 孔板内, 加入培养液, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养。每 2 天换液 1 次。每 24 h 分别消化 3 孔细胞, 计数每孔细胞总数, 求平均值。细胞接种当天记为第 0 天, 连续测定 8 d。以培养时间 (d) 为横坐标, 细胞数 ( $1 \times 10^4$ /mL) 为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。公式为  $TD = t \times \log_2 / (\log N_t - \log N_0)$ , 式中 TD 为细胞群体倍增时间,  $t$  为培养时间,  $N_0$  为接种后的细胞数,  $N_t$  为培养  $t$  小时后的细胞数<sup>[16]</sup>。

胎儿成纤维细胞核型分析时, 将处于对数生长期 (第 3 天) 的 GEF 细胞, 用浓度为 0.2 μg/mL 秋水仙素处理 1.5 h, PBS 洗 2 遍, 0.25% 的胰酶消化, 收集细胞, 弃上清, 加入预温 37℃、0.075 mol/L 的 KCL 低渗液 5 mL, 37℃ 水浴作用低渗 15~25 min。1 000 r/min 离心收集细胞, 加入固定液 (甲醇与冰醋酸 3:1) 5 mL, 室温下作用 2 h, 1 000 r/min 离心收集细胞, 2 次固定室温作用 30 min。1 000 r/min 离心收集细胞, 加入 0.1 mL 固定液, 轻轻吹打混匀制成悬液。距离载玻片约 1 m 高度, 向经过 -20℃ 预冷的玻片滴 2 滴细胞悬液, 空气中自然干燥。用吉姆萨染色 10~20 min 后用自来水冲洗。干燥后, 在倒置显微镜下观察染色体核型情况。

### 1.2.4 诱导山羊细胞重编程

取生长旺盛的包装病毒 Phoenix-A 细胞按照  $8 \times 10^5$ /mL 接种到培养皿内, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 过夜培养, 24 h 后, 将鼠的 4 个转录因子 pMXs-Oct4、

pMXs-Sox2、pMXs-Klf4 和 pMXs-c-Myc 转染病毒包装细胞, 6 h 后换成含血清体积分数为 10% 的培养液, 收 48 h 病毒液, 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。将 4 种病毒液按照 1:1:1:1 的比例混合, 按照 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的比例加入 polybrene, 混合均匀, 加到提前 1 d 按  $8 \times 10^4/\text{mL}$  铺好的 GEF 第 1 代的细胞中, 可进行第 2 次转染以提高转染效率。为了保证转染效率, 病毒的滴度要求达到  $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  以上, 病毒转染的当天为诱导 0 d。按照上述方法再攻毒 1 次。以后每天换 1 次培养液, 第 3 天将攻过毒的 GEF 细胞按照  $5 \times 10^3/\text{mL}$  的比例铺到 MEF 饲养层上。24 h 后换成 iPS 细胞培养液, 以后每天换液 1 次, 诱导 12 d 左右开始出现细胞克隆, 18 d 左右用机械法在体视显微镜下挑取克隆, 接种到已经铺好 MEF 饲养层的 96 孔板上, 选 20 株形态好的克隆编号、扩增、冻存。

对部分克隆细胞进行碱性磷酸酶染色。用 40 g/L 多聚甲醛溶液室温固定集落 10 min, 无钙镁 PBS 冲洗 3 次, 每次间隔 10 min。再加入 AP 染液 (0.2 mg/mL  $\alpha$  萘酚磷酸盐, 1 mg/mL 坚固红 TR 盐, 0.1 mol/L Tris-HCl, 调节 pH 值为 8.6), 作用 10~20 min。吸出染色液, 用 PBS 冲洗后, 倒置显微镜下观察, 阳性细胞为红色, 阴性细胞不着色。

### 1.2.5 对诱导的重编程细胞进行免疫荧光检测

待细胞长到 70%~80% 时, 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 3~5 min, 0.5% Triton 打孔 15 min; PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min; 加入 1% BSA 封闭 30 min; 弃去, 此步骤不用洗涤, 直接加入 1% BSA 稀释的一抗 Tert, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 1% BSA 稀释的绿色的荧光二抗, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 0.5~1 h; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; Leica 倒置荧光显微镜下观察照相。

## 2 结果

### 2.1 山羊组织中 TERT 的表达检测

采用 Real-time RT-PCR 方法, 对关中奶山羊不同组织中端粒酶基因表达量进行了测定, 结果表明相对表达量最高的是睾丸组织。内胚层的 3 种组织中肝、脾的 TERT 表达量较高, 是皮肤组织的 6~7 倍, 而肺脏的 TERT 量比其他两种组织要低 1 倍以

上。中胚层的肌肉和肾脏组织中 TERT 的表达量是皮肤组织的 3~5 倍。TERT 表达量最低的是外胚层的大脑和皮肤组织, 端粒酶相对表达量在 1 左右 (图 1)。

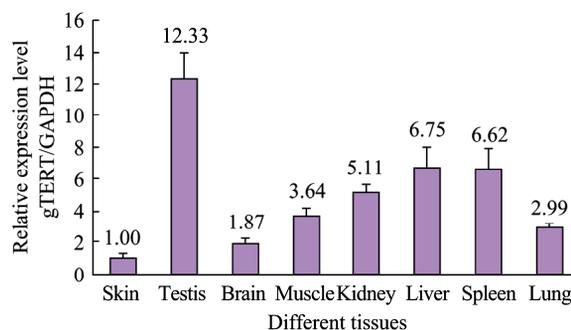


图 1 Real-time RT-PCR 定量分析山羊组织中 TERT 表达量

Fig. 1 Real-Time RT-PCR analysis of TERT expression in goat tissues. The RNA samples were made from Guanzhong milk goat tissues including skin, testis, brain, muscle, kidney, liver, spleen, and lung. The relative expression level was calculated by goat TERT (gTERT) vs internal control GAPDH ( $n=3$ ).

### 2.2 山羊胎儿成纤维细胞培养与检测

为了进行体细胞诱导重编程研究, 我们首先制备了山羊胎儿成纤维细胞。将山羊皮肤组织块接种后, 第 2 天可以看到原代胎儿成纤维细胞从组织块周围迁出, 逐渐向四周扩散。在倒置显微镜下观察组织块透光性较差, 呈现为暗黑色遮光区域 (图 2A 箭头处)。迁出的细胞界限较清楚, 细胞以成纤维样为主, 也可见不规则三角形样, 细胞核呈类圆形或长椭圆形, 细胞排列紧密 (图 2A)。以后每隔 2 天换 1 次培养液, 细胞 1 周即可长满皿底。

对山羊 GEF 细胞生长曲线作了测定, 细胞在 1~2 天的潜伏适应期后, 第 3 天进入对数生长期, 第 6 天进入生长平台期, 第 8 天后便进入衰退期。分离得到的细胞样品不同代次的倍增时间分别为 P1 代 36.2 h, P4 代 39.8 h (图 2B)。这一结果表明原代细胞随着传代次数的增加, 其生长活力逐步下降。核型分析表明, GEF 染色体核型 60 条, 为雄性 xy, 可用于细胞诱导实验 (图 2C、D)。

### 2.3 诱导山羊体细胞重编程

诱导山羊体细胞重编程是个缓慢的过程, 一般需要 15~20 d 以上的培养时间。在攻毒时, 取 1~3

代生长状态好、细胞活力强、密度适中的 GEF 作为受体细胞 (图 3A)。为加强诱导效率,可对细胞进行二次攻毒。攻毒后 3 d, 将细胞接到有 MEF 饲养层的培养皿上, 细胞密度在  $5 \times 10^3/\text{mL}$  左右 (图 3B)。诱导的细胞在 10~12 d 开始出现克隆集落, 周围的细胞逐渐开始聚团, 从成纤维细胞时的长梭形形态变为圆形并聚集成集落。初始的克隆集落较小, 出

现两种形态, 扁平状集落和隆起状集落 (图 3C)。隆起的克隆逐渐变黑, 且细胞结构逐渐不清晰, 挑单克隆之后不再继续生长, 逐渐死亡。扁平的集落边缘整齐, 核质比高, 挑单克隆之后可以继续传代培养, 且保持基本的细胞形态。持续培养 15 d 后, 克隆集落长大, 成圆形或者椭圆形, 边缘整齐, 核质比较高, 挑克隆, 进行传代培养 (图 3D)。

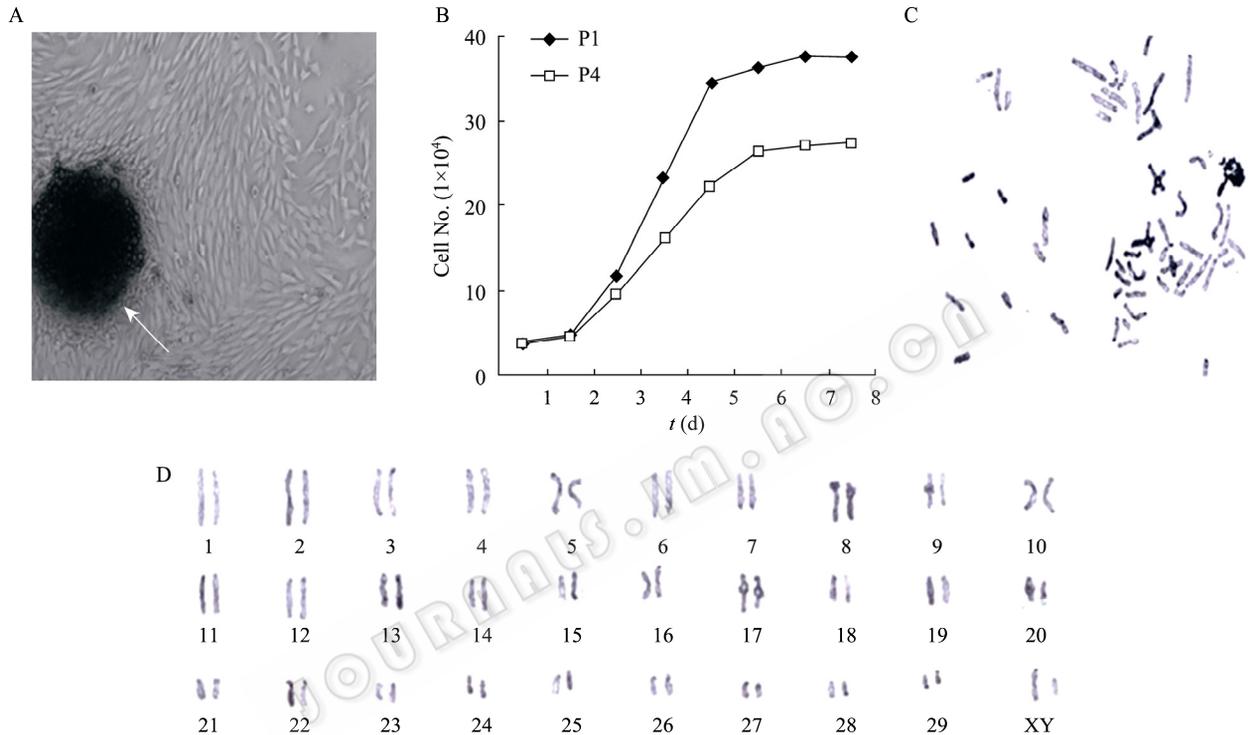


图 2 山羊胎儿成纤维细胞 (GEF) 的培养与鉴定

Fig. 2 Culture and characterization of GEF cells. (A) Primary tissue culture of GEF. Arrow indicates the tissue block. (B) The growth curve of GEF at first and fourth passages. (C) The karyotype of GEF. (D) The paired chromosomes of GEF.

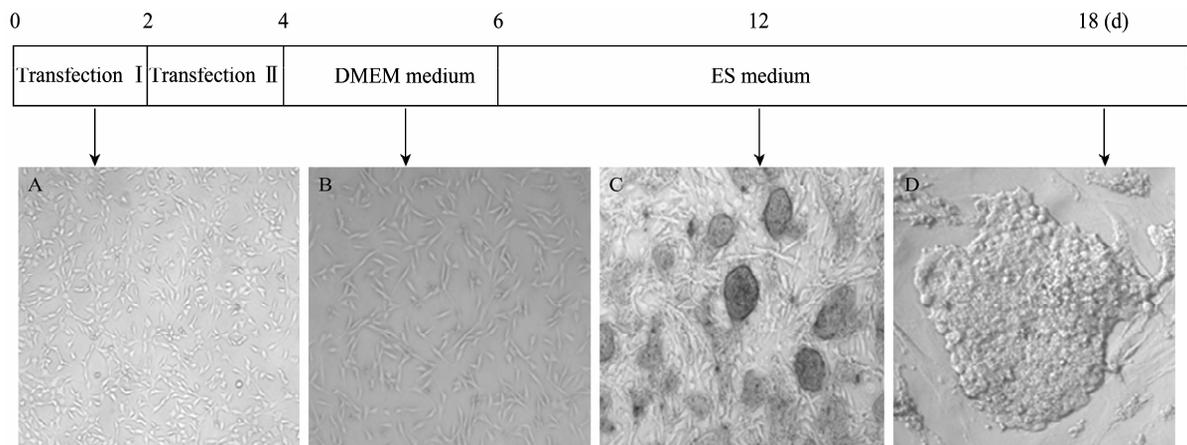


图 3 山羊 GEF 细胞诱导为重编程细胞

Fig. 3 The experimental outline to induce goat GEFs into the reprogrammed cells. (A) Uninfected GEFs (50 $\times$ ). (B) GEFs infected by retrovirus with OSKM (50 $\times$ ). (C) The reprogrammed cell colonies formed in 12 days after the infection (50 $\times$ ). (D) A goat reprogramming cell colony (50 $\times$ ).

## 2.4 测定山羊重编程细胞中 TERT 的表达变化

将 4 种转录因子 OSKM 导入 GEF 细胞 (图 4A1), 经过 15~20 d 诱导, 培养皿上出现大量克隆集落, 经碱性磷酸酶 (AP) 染色, 可见 AP 阳性克隆 (图 4A2)。对典型的重编程克隆进行挑选和编号, 并选出 4 株克隆进行大量扩增培养, 制备 RNA 样品 (图 4A3-6)。对上述样品, 用 Real-time RT-PCR 方法定量分析 TERT 基因的表达变化。检测结果表明, 在诱导出的原代 AP 阳性重编程细胞 (AP+) 中端粒

酶的相对表达量最高, 是诱导前 GEF 细胞的 65 倍 (图 4B)。而分离传代的 4 株 AP 阴性重编程细胞, 其端粒酶相对表达量明显比对照组 GEF 细胞高, 但是却显著低于原代 AP 阳性重编程细胞 (AP+)。以上结果说明端粒酶基因表达量高低与诱导体细胞重编程的完全程度成正相关, AP 阳性重编程细胞端粒酶的表达量较高, 而 AP 阴性重编程细胞端粒酶的表达量相对较低。

## 2.5 端粒酶免疫荧光检测

对诱导出的重编程克隆进行扩增、冻存。端粒酶免疫荧光检测, 碱性磷酸酶 (AP) 阳性的克隆进行端粒酶免疫荧光检测时呈阳性 (图 5A、B), AP 阴性的克隆端粒酶免疫荧光检测呈阴性 (图 5C、D)。

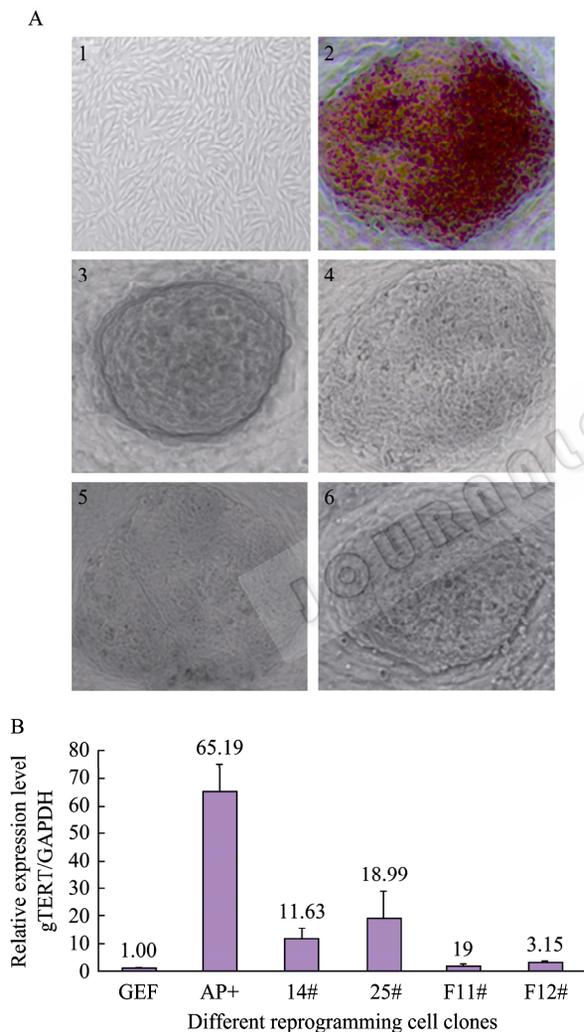


图 4 山羊重编程细胞克隆和 TERT 定量检测

Fig. 4 The quantitative analysis of TERT expression level in goat reprogramming cells. (A) Goat reprogramming cell clones. 1: Uninduced GEF cells (GEF); 2: AP+ Clone No. 1; 3: AP- Clone No.14; 4: AP- Clone No. 25; 5: AP- Clone F11; 6: AP- Clone F12. The magnification of images is 50 $\times$ . (B) Real-Time RT-PCR analysis of TERT expression among the different reprogramming cell clones as described in (A). The relative expression level was calculated by goat TERT (gTERT) vs internal control GAPDH ( $n=3$ ).

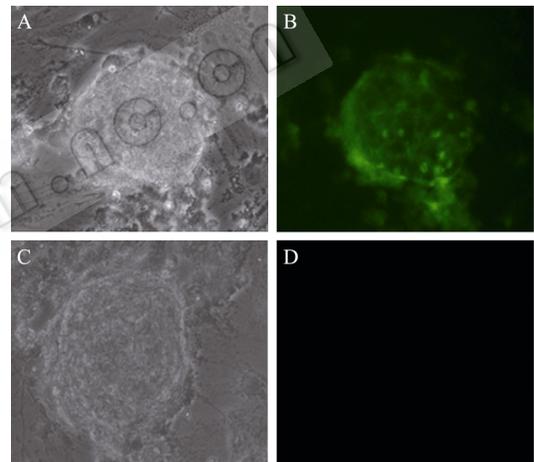


图 5 免疫荧光检测山羊重编程细胞中端粒酶的表达

Fig. 5 TERT immunofluorescence analysis of the reprogrammed cells. (A, B) The reprogrammed AP+ cell clone. (C, D) The reprogrammed AP- cell clone. (A, C) The phase contract. (B, D) TERT immunofluorescence staining.

## 3 讨论

在 Real-time RT-测定中采用相对定量法通常是以表达恒定的看家基因作为内参照, 在目的基因与内参基因扩增效率相同的情况下, 可以直接得到目的基因相对于内参基因的定量<sup>[17]</sup>。本实验中端粒酶基因表达量是以看家基因 GAPDH 作为参照测定出来的。我们首次对山羊胎儿组织中 TERT 基因表达情况进行了检测, 结果表明睾丸组织中 TERT 的表达量显著高于其他组织。另外, 我们还注意到不同胚层来源的组织其 TERT 的表达量也存在差异, 其表现为 TERT 表达量在内胚层组织 > 中胚层组织 >

外胚层组织。Greenberg 等报道 TERT 基因在成年鼠的各种组织中有广泛的低水平表达,而在胎鼠中胸腺和肠道组织 TERT 的表达水平比其他组织的表达显著要高<sup>[18-19]</sup>。但是,由于实验技术上的问题,我们未能对山羊胎儿胸腺组织中 TERT 的表达作出检测。这一缺陷需要在今后的研究中解决。

2006 年,日本科学家报道了利用 4 种转录因子(OSKM)将小鼠成纤维细胞转变为诱导多能干细胞(iPS 细胞)<sup>[5]</sup>。在此之后,在人<sup>[7]</sup>、猴<sup>[11]</sup>、大鼠<sup>[13]</sup>、猪<sup>[14]</sup>等动物也得到了 iPS 细胞,说明 iPS 技术可以广泛用于建立动物 iPS 细胞系,从而弥补缺少大动物 ES 细胞的缺口。目前,还未见在山羊中得到 iPS 细胞的相关报道。本研究初步探讨了诱导山羊重编程细胞的诱导方法和培养体系,得到了 AP 阳性的山羊重编程细胞。但是我们发现细胞诱导过程中,部分重编程细胞的比率很高,极大阻碍了山羊 iPS 细胞建系,因此影响细胞重编程的因素还需要进一步探索。

GEF 细胞在导入了外源基因后会明显加快增殖速度,4 d 之后会发生明显的形态改变。在诱导过程中发现,受体细胞往往会在 ES 样克隆出现之前便已长满整个培养皿,这时需要对其进行传代,尽管有报道称诱导过程中传代会影响诱导的效率,但是不及时传代将会导致受体细胞大量死亡。在连续传代过程中,应尽量采用 IV 型胶原酶进行细胞消化,这样可以除去传代过程中饲养层的干扰。

外源基因对受体细胞的诱导重编程不局限于同一物种,异源转录因子同样可以诱导受体细胞成为 iPS 细胞<sup>[20]</sup>。原因可能由于多能性转录因子在不同物种之间具有很高的保守性,可以调控异种受体细胞基因的表达,从而启动重编程过程。所以试验中用鼠的 4 个转录因子诱导关中奶山羊胎儿成纤维细胞同样得到了重编程细胞。

在对端粒酶表达活性进行检测的过程中,我们发现经过 OSKM 诱导后的重编程细胞中的 TERT 表达明显高于受体成纤维细胞,TERT 表达量的高低与诱导细胞重编程的程度有直接关联。AP 阳性的重编程细胞 TERT 表达量要高于处于部分重编程的细胞(AP 阴性)。我们还发现分离得到的重编程细胞克隆

随着细胞传代次数的增高,端粒酶的表达活性逐渐减弱。这种现象的出现,可能与内源干细胞转录因子尚未完全活化,而外源导入的 4 个因子又随传代逐渐沉默有关。进一步揭示 TERT 的活化与 iPS 细胞的重编程关系,将有益于提高山羊 iPS 细胞的诱导效率和成功建系。

## REFERENCES

- [1] Horikawa I, Chiang YJ, Patterson T, *et al.* Differential cis-regulation of human versus mouse *TERT* gene expression *in vivo*: identification of a human-specific repressive element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(51): 18437-18442.
- [2] Takakura M, Kyo S, Inoue M, *et al.* Function of AP-1 in transcription of the telomerase reverse transcriptase gene (*TERT*) in human and mouse cells. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(18): 8037-8043.
- [3] Achi MV, Ravindranath N, Dym M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity. *Biol Reprod*, 2000, **63**(2): 591-598.
- [4] Golubev AG. Biochemistry of space and time (telomeres, telomerases, and longevity of cell populations and multicellular organisms). *Biokhimiia*, 1996, **61**(11): 2045-2059.
- [5] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, **126**(4): 663-676.
- [6] Maherali N, Sridharan R, Xie W, *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**(1): 55-70.
- [7] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, **131**(5): 861-872.
- [8] Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, **318**(5858): 1917-1920.
- [9] Park IH, Zhao R, West JA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, **451**(7175): 141-146.
- [10] Lowry WE, Richter L, Yachechko R, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(8): 2883-2888.

- [11] Liu HS, Zhu FF, Yong J, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(6): 587–590.
- [12] Li WL, Wei W, Zhu SY, *et al.* Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(1): 16–19.
- [13] Liao J, Cui C, Chen SY, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(1): 11–15.
- [14] Esteban MA, Xu JY, Yang JY, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*, 2009, **284**(26): 17634–17640.
- [15] Gomes AL, Melo FL, Werkhauser RP, *et al.* Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006, **101**(Suppl 1): 133–136.
- [16] Wang H, Dou ZY, Wang HY. Growth and identification of human amniotic fluid stem cells and analysis of their influencing factors. *J Agr Biotechnol*, 2008, **16**(5): 804–809. 王晗, 窦忠英, 王华岩. 人源羊水干细胞的培养、鉴定及影响因素分析. 农业生物技术学报, 2008, **16**(5): 804–809.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . *Methods*, 2001, **25**(4): 402–408.
- [18] Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, *et al.* Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*, 1998, **16**(13): 1723–1730.
- [19] Horikawa I, Chiang YJ, Patterson T, *et al.* Differential cis-regulation of human versus mouse *TERT* gene expression *in vivo*: identification of a human-specific repressive element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(51): 18437–18442.
- [20] Wu Z, Chen JJ, Ren JT, *et al.* Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, 2009, **1**(1): 46–54.

JOURNALS.IM.AC.CN