论文

Sox10和Olig2加速人源性诱导多能干细胞向少突胶质前体细胞分化

李鹏燕^{①②③†}, 李默^{①②†}, 唐玺和^{①②}, 关云谦^{①②}, 王淑艳^{①②}, 张愚^{①②}, 陈志国^{①②③*}

① 首都医科大学宣武医院细胞治疗中心, 北京 100053;

② 北京脑重大疾病研究院神经损伤与修复研究所, 北京 100069;

③ 北京脑重大疾病研究院帕金森病研究所, 北京 100069

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: chenzhiguo@gmail.com

收稿日期: 2015-06-08; 接受日期: 2016-08-31; 网络版发表日期: 2016-11-04

国家重点研发计划干细胞与转化医学项目(批准号: 2016ZY05002449)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB965103, 2012CBA01307)、国家自然科学基金(批准号: 81661130160, 81422014, 81561138004)、北京市自然科学基金(批准号: 5142005)和牛顿奖高级学者项目(批准号: NA150482)资助

摘要 少突胶质细胞(OLs)有望用于治疗多发性硬化和先天性脑瘫等脱髓鞘疾病。近年来,一些研究者利用人的胚胎干细胞和神经干细胞作为起始细胞来获得少突胶质细胞前体细胞(OPCs)。然而,神经干细胞的应用受到其来源的限制;现有的将胚胎干细胞分化为OPCs的方法耗时较长。因此,本研究探讨了一种通过在人诱导多能干细胞中过表达两个转录因子(Sox10和Olig2),从而有效获得OPCs的方法。通过这种方法,可以在14天内获得PDGFR α 阳性的OPCs,并在56天内获得O4阳性的OPCs。获得的OPCs在和大鼠(*Rattus norvegicus*)皮质神经元共培养时能分化为成熟的少突胶质细胞并包裹轴突形成髓鞘。该研究结果在自体细胞移植领域中具有一定的应用潜力。

关键词 少突胶质前体细胞, 人诱导多能干细胞, 分化, 脱髓鞘

在中枢神经系统中,少突胶质细胞(oligodendrocytes, OLs)的死亡以及髓鞘的破坏常引起脱髓鞘疾病,具有高发病率和死亡率等特点,如多发性硬化和脑白质营养不良。目前临床上应用的治疗措施主要针对免疫系统;这种方法在阻碍炎症的进展方面有一定的效果,但不能阻止疾病的进展且预后一般较差。少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)在脑发育中能分化为成熟少突胶质细胞并包裹轴突形

成髓鞘结构,也能在脑损伤后完成轴突的髓鞘再生。因此,OPCs通常被认为是一种很有希望应用于治疗脱髓鞘疾病的细胞。

大多关于OPCs的研究关注由胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)^[1-3]和神经干细胞(neuron stem cells, NSCs)^[4,5]分化得到OPCs或者是通过直接的横向分化而获得^[6,7]。然而,人ESCs来源的异体少突胶质前体细胞移植后需要进行免疫抑制,而且人ESCs涉及

引用格式: 李鹏燕, 李默, 唐玺和, 等. Sox10和Olig2加速人源性诱导多能干细胞向少突胶质前体细胞分化. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1259-1266, doi: 10.1360/N052016-00289

英文版见: Li P Y, Li M, Tang X H, et al. Accelerated generation of oligodendrocyte progenitor cells from human induced pluripotent stem cells by forced expression of Sox10 and Olig2. Sci China Life Sci, 2016, 59: 1131-1138, doi: 10.1007/s11427-016-0165-3

伦理问题; NSCs虽然在成年动物中枢神经系统中存在于侧脑室的室下区, 或者可以从胎脑中分离获得, 然而这些均意味着其来源非常有限。

人诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)可以从多种体细胞中获得, 因此患者特异性的iPSCs可以分化为自体来源的OPCs。最近一篇文献中报道, iPSCs可通过形成拟胚体阶段(embryoid body)获得诱导少突胶质细胞前体细胞(induced oligodendrocyte precursor cells, iOPCs), 然而这篇文献获得较多PDGFR α 阳性的iOPCs大约需要4个月^[8]。这种方法加大了实验成本, 耗时长, 因此, 研究者们也纷纷使用各种方法对其进行优化。最近, Douvaras和Fossati^[9]通过在Matrigel上进行单层细胞培养并结合小分子作用改进了分化方法。改进后的方法可以把iPSCs分化为iOPCs的时间从95天缩短到75天^[10]。还有文献报道, 人iPSCs过表达单因子后可以在2周内生成有功能的诱导神经元^[11], 这就说明通过一些条件的刺激, 可能会加速细胞的分化进程。近期还有文章表明, Sox10和Olig2在OLs分化中起至关重要的作用^[12-18], 因此本研究尝试向iPSCs转入这两种因子加速其生成iOPCs的速度。最终2周内获得了PDGFR α 阳性iOPCs; 获得的iOPCs可以进一步分化为O4阳性的iOL。另外, 把诱导获得的iOPCs与大鼠(*Rattus norvegicus*)皮质神经元共培养来检测其包裹轴突形成髓鞘的能力。

1 材料与方法

1.1 质粒构建

Sox10和Olig2的编码序列用人的cDNA作为模板用PCR技术进行扩增, 然后克隆到iDuet101质粒的Kpn I /BsrG I 位点^[19]。构建的载体转移到*E. coli* DH5 α 菌种中进行扩增之后进行提取质粒和序列确认。

1.2 慢病毒的包装

将HEK293T细胞在包含VSVG、delt 8.74、重组质粒和lipo2000的OPTi-MEM中进行培养^[20]。8 h后, 用包含杜尔伯科改良伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、PS和Glutamax的293T培养基替换掉之前的培养基。3天后, 收集包含病毒的上清液并在用0.45 μ m聚偏氟乙烯(poly(vinylidene fluoride), PVDF)膜过滤后

进行离心浓缩, 获得慢病毒。

1.3 从人iPSC生成iOPC

人iPSC来自于本课题组的前期工作^[21], 在铺有matrigel的六孔板中用E8培养基进行培养。待细胞生长达到培养板的30%时, 加入包含病毒、4 μ g/mL polybrene的E8培养基。感染36 h后, 更换为正常培养基E8, 撤掉病毒的日期被定义为分化起始天数“Day 0”。iDuet101载体具有抗潮霉素的基因, 在“Day1”即开始对细胞用潮霉素进行筛选。在第1天, 用包含DMEM/F12, N2, B27 (without vitamin A), glutamax, 3 μ mol/L dorsomorphin和1 μ mol/L RA的iOPC基础培养基替换掉E8培养基培养细胞5天。当没有用病毒感染的阴性对照组细胞用潮霉素筛选后全部死亡时, 从实验组中撤掉潮霉素。在第6天时, 用accutase处理细胞将其转移到铺有PDL/Laminin的玻片上。按照分化流程图, 应用如下生长因子: 20 ng/mL PDGF-AB(platelet-derived growth factor-AB), 20 ng/mL bFGF(basic fibroblast growth factor), 60 ng/mL T3(thriiodo-L-thyionine), 10 ng/mL NT3(neurotrophin 3), 1 μ mol/L Pur(purmophamine), 10 ng/mL IGF-1(insulin-like growth factor-1)和1 μ mol/L cAMP。

1.4 免疫荧光染色

室温下, 细胞用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗2次, 而后用4% PFA(polytetrafluoro ethylene)固定15 min。再用包含0.3% Triton X-100和3% 驴血清的封闭液室温孵育1 h, 加入一抗4℃冰箱孵育过夜。应用一抗如下: rabbit anti-PDGFR α (Santa Cruz, USA, 1:200), rabbit anti-CNPase (Multi Science, USA, 1:200), rabbit anti-NKX2.2 (Santa Cruz, 1:200), rabbit anti-GFAP (Beijing Zhong Shan-Golden Bridge, 1:100), rabbit anti-Olig2 (Millipore, USA, 1:500), mouse anti-NG2 (Abcam, USA, 1:100), mouse anti-A2B5 (Abcam, 1:800), mouse anti-O1 (eBioscience, USA, 1:100), mouse anti-O4 (R&D Systems, USA, 1:400), mouse anti-Tuj-1(Millipore, 1:400), goat anti-Sox10 (Santa Cruz, 1:50)。第二天加入二抗, 室温孵育2 h。染色时, 设置不加一抗作为对照组。

1.5 神经元与OPC共培养

取E17胎鼠大脑皮层, 经胰酶消化并过滤, 接种于

图 1 iOPC的加速生成

A: iOPC分化流程图; B~E: 感染2因子后从iPSC到iOPC的形态改变; B: 加病毒前的iPSC; C: 感染病毒36 h的iPSC; D: 细胞传代到PDL/LMN上; E: 第14天时iOPC的形态; F: iPSC的PDGFRα染色阴性; G: 在分化14天时, 仅感染带GFP空载体的iPSC的PDGFRα染色阴性; H: 在分化14天时, 感染Sox10和Olig2的iPSC; I: 在分化14天时, 两因子组中PDGFRα染色阳性的细胞比例显著高于对照组。***: $P < 0.001$; Hoechst-蓝色, PDGFRα-红色, 标尺: 200 μm (B~E), 100 μm (F), 75 μm (G和H)

图 2 不同组中iOPC生成的效率

A~D: 分化15天时4组细胞的形态。A: Sox10; B: Olig2; C: Sox10+Olig2; D: 无病毒对照组; 标尺: 200 μm。E~N: 分化15和56天时两因子组中PDGFRα和O4染色阳性的细胞比例明显高于其他组; E~L: E和I: Sox10; F和G: Olig2; G和K: Sox10+Olig2; H和L: 无病毒对照组。PDGFRα: 红色; O4: 绿色; Hoechst: 蓝色; 标尺: 50 μm。 (M和N) 双侧 t 检验; ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$

铺有PDL/Lamini的培养皿中,最后用含有阿糖胞苷的培养液培养3天,抑制胶质细胞的生成.3天后,将分化的OPC接种于已生长小鼠(*Mus musculus*)神经元的培养皿中,用OPC培养基培养14天.

2 结果与分析

2.1 2周之内获得iOPCs

为了加快OPCs获得的速度,本研究设计了一种诱导方法(图1A),即通过使iPSCs过表达OLs谱系特异性的转录因子Sox10和Olig2来诱导OPCs的生成.在编码Sox10和Olig2的病毒感染iPSCs后用潮霉素进行筛选,大约60%的细胞共转染了这两个因子,用Sox10和

Olig2两种抗体进行染色来检验感染效率.在感染了两因子后用OPC培养基进行培养,在2周内培养细胞从典型的iPSCs的细胞形态转化为双极形态(图1B~E).一部分iPSCs来源的细胞能在添加PDGF因子的OPC培养基中进行增殖,并且PDGFR α 染色阳性,PDGFR α 是OPC的一种特异性抗体标记物^[8,22],其在iPSCs中没有表达(图1F).在第14天,与仅感染了GFP的阴性对照组相比,由于Sox10和Olig2两因子的结合,有较大比例的细胞表达PDGFR α (图1G~I).

2.2 Sox10和Olig2双因子的诱导效果优于单因子

为了检测Sox10或Olig2单因子是否具有协同作用促进iOPCs的生成,设置了4个实验组,(i)单用Sox10,

图3 用RT-PCR分析检测内源和外源因子的表达

A: 用RT-PCR分析检测iPSC相关基因(*OCT4*/*NANOG*/*SOX2*)OPC相关基因(*OLIG2*/*PDGFR α*)OL相关基因(*CNPase*)的表达; B~D: 用 β -ACTIN的表达标准化后*OLIG2*(B), *PDGFR α* (C), *CNPase*(D)的相对表达量; E: 在3个实验组中用RT-PCR分析外源因子的表达

(ii) 单用Olig2, (iii) Sox10+Olig2, (iv) 未感染病毒的阴性对照组(control). 感染病毒的3个组中, 在分化第15天时都观察到了较多具有OPC样双极形态的细胞(图2A~D), 这些细胞都能在含有PDGF-AB和bFGF的培养基中进行增殖^[23]. 对4组细胞进行了PDGFR α 抗体染色, 结果显示, 双因子组中PDGFR α 抗体染色阳性的细胞比例高于单因子和阴性对照组, 且具有统计学差异(图2E~H, M). 为了研究iOPC的分化能力, 把iOPC细胞置于包含T3, NT3, IGF-1(已知的有助于少突胶质细胞的分化和生存)^[7,9,23]的分化培养基中. 为了检测是否有iOL的生成, 每隔一周用O4抗体进行染色. 在分化的第4周, 在Sox10+Olig2双因子组中大约42%的细胞O4染色阳性, 比例高于单因子组和阴性对照组(图2I~L, N).

用RT-PCR检测内源基因的表达发现, 随着分化的进程, iPSC相关基因*Oct4*, *Nanog*和*Sox2*关闭, OPC和OL的相关基因开始表达(图3A~D). 这就从分子水平确定了3组细胞在向OPC方向分化. 同时监测了外源因子的表达, 在15天时仍可检测到其表达, 之后外源基因逐渐沉默(图3E).

为了进一步确定双因子组的iOPCs和iOL的生成, 用图1A中展示的实验流程, 同时在整个分化过程的不同时间段进行了OPC和OL特异标记物Nkx2.2, A2B5^[6,8], O1和CNPase的染色. 本课题组观察到了在含生长因子的培养基中可以增殖的细胞, 这些细胞具有OPC的形态(图4A). 对这些细胞进行Nkx2.2, A2B5, PDGFR α , NG2染色可以证实iOPC的生成(图4C~E). 在第14天时, PDGFR α 和A2B5共染阳性的细胞比例约为18%. 在分化的过程中, 有GFAP染色阳性的星形胶质细胞的生成(图4F). 在分化第8周, 许多细胞出现蜘蛛网状形态(图4B), 并且O1, CNPase和O4染色阳性(图4G~J), 这些结果进一步表明, 通过过表达两因子可能使人iPSC分化获得iOPC.

2.3 iOPCs与大鼠皮质神经元体外共培养时可能生成iOLs

为了评估人iPSC来源的iOL的髓鞘形成能力, 把诱导的细胞与从E17胎鼠分离得到的皮质神经元共培养. 首先把皮质神经元(大约 4×10^5)培养在铺有PDL/Laminin的玻璃片上, 并用阿糖胞苷(Ara-c)处理3天抑制胶质细胞

图4 从人iPSC到iOL的生成

A: 分化14天时iOPC的形态; B: 分化56天时iOPC的形态; C: Nkx2.2: 红色; D: A2B5(绿色)和PDGFR α (红色)的共染结果; E: NG2(绿色)和CNPase(红色)的共染结果; G: O1: 红色; H: CNPase: 绿色; I: O4: 红色; J: CNPase: 红色. Hoechst: 蓝色; 标尺: 200 μ m(A), 100 μ m(B~C), 75 μ m(D), 50 μ m(E~G), 25 μ m(H~J)

生长. 在诱导分化14天时, 先用携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的慢病毒感染iOPCs, 使其易于和胎鼠神经元区别. 把这种带有绿色荧光标记的诱导细胞(大约 1×10^5)传代到皮质神经元上, 并用分化培养基进行培养. 分别在共培养7及14天对细胞进行固定染色. 共培养第7天时观察到标记绿色荧光的细胞具有蜘蛛网样突起的形态, 并且O4染色阳

性(图5A~C), 其比例约为5%, 具有典型形态(蜘蛛网样突起)的iOL与异常形态(扁平且突起较少)的比例约为1:2. 与没有经过共培养直接从iOPC分化组比较, 与皮质神经元共培养可能加速iOL的生成. 在共培养第14天时, 大约0.5%的大鼠皮质神经元轴突与iOL的突起有共染的部分(图5D), 结果表明, 用两因子诱导获得的iOL可能具有包裹轴突形成髓鞘结构的能力.

3 讨论

本研究介绍了一种通过使人iPSC过表达Sox10和Olig2两因子使其转变成iOPCs的方法. 这两个因子的诱导显著加快了OPC的生成, 并且两因子的作用效果高于单因子.

Wernig等人^[6]最近发表的论文报道可以通过将小鼠的皮肤成纤维细胞加入Olig2, Sox10和Zfp536 3个外源因子, 直接将其诱导成OPCs. 在Tesar课题组^[7]发表的另一篇论文中提到Olig2, Sox10和Nkx6.2也能完成诱导转化. 在以上研究中, Olig2和Sox10均包含在三因子中, 表明其在OPC的发育和维持中起关键作用. 胚胎发育过程中, 不同的细胞类型在某种程度上反映了被一系列因子或蛋白主导的一种特定功能状态. 一个关键因子可能通过前反馈和后反馈信号通路重置这个网络结构, 并且最终生成一种不同的功能状态或细胞类型. 单因子可显著加快胚胎干细胞来源的功能干细胞的生成, 考虑到两因子的关键作用, 认为Sox10+Olig2两因子也可能促进iPSC向iOPC的转变. 事实上, 本研究发现Sox10+Olig2能把较长的分化时间缩短到2周.

图5 iOPC与大鼠皮质神经元共培养

A~C: 共培养7天时, GFP(绿色)和O4(红色)共染结果; D: 共培养14天时, GFP(绿色)和Tuj-1(红色)共染结果. 标尺: 50 μm (A~B), 25 μm (C), 75 μm (D)

然而, 仍然不确定的是用这种方法获得的OPC与原代培养OPC, 以及使ESC通过EB方式分化出的OPC是否

相同. 为了解答这些问题, 有必要进行基因表达图谱的研究以及在脱髓鞘模型中进行体内移植实验.

参考文献

- 1 Piao J, Major T, Auyeung G, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors remyelinate the brain and rescue behavioral deficits following radiation. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 198–210
- 2 Kang S M, Cho M S, Seo H, et al. Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2007, 25: 419–424
- 3 Cloutier F, Siegenthaler M M, Nistor G, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors into rat spinal cord injuries does not cause harm. *Regen Med*, 2006, 1: 469–479
- 4 Sher F, van Dam G, Boddeke E, et al. Bioluminescence imaging of Olig2-neural stem cells reveals improved engraftment in a demyelination mouse model. *Stem Cells*, 2009, 27: 1582–1591
- 5 Hwang D H, Kim B G, Kim E J, et al. Transplantation of human neural stem cells transduced with Olig2 transcription factor improves locomotor recovery and enhances myelination in the white matter of rat spinal cord following contusive injury. *BMC Neurosci*, 2009, 10: 117
- 6 Yang N, Zuchero J B, Ahlenius H, et al. Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 434–439
- 7 Najm F J, Lager A M, Zaremba A, et al. Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 426–433
- 8 Wang S, Bates J, Li X, et al. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 252–264
- 9 Douvaras P, Fossati V. Generation and isolation of oligodendrocyte progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2015, 10: 1143–1154
- 10 Douvaras P, Wang J, Zimmer M, et al. Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep*, 2014, 3: 250–259
- 11 Zhang Y, Pak C H, Han Y, et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron*, 2013, 78: 785–798
- 12 Wang J, Pol S U, Haberman A K, et al. Transcription factor induction of human oligodendrocyte progenitor fate and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E2885–E2894
- 13 Cahoy J D, Emery B, Kaushal A, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*, 2008, 28: 264–278
- 14 Dugas J C, Tai Y C, Speed T P, et al. Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci*, 2006, 26: 10967–10983
- 15 Goldman S A, Kuypers N J. How to make an oligodendrocyte. *Development*, 2015, 142: 3983–3995
- 16 Stolt C C, Lommes P, Friedrich R P, et al. Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development*, 2004, 131: 2349–2358
- 17 Zhou Q, Wang S, Anderson D J. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron*, 2000, 25: 331–343
- 18 Lu Q R, Yuk D, Alberta J A, et al. Sonic hedgehog—regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron*, 2000, 25: 317–329
- 19 Zhou B Y, Ye Z, Chen G, et al. Inducible and reversible transgene expression in human stem cells after efficient and stable gene transfer. *Stem Cells*, 2007, 25: 779–789
- 20 Sheng C, Zheng Q, Wu J, et al. Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors. *Cell Res*, 2012, 22: 208–218
- 21 Wang S, Wang B, Pan N, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells to mature functional Purkinje neurons. *Sci Rep*, 2015, 5: 9232
- 22 Sim F J, McClain C R, Schanz S J, et al. CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 934–941
- 23 Pang Y, Fan L W, Tien L T, et al. Differential roles of astrocyte and microglia in supporting oligodendrocyte development and myelination *in vitro*. *Brain Behav*, 2013, 3: 503–514