

宋琼,滕夏虹,王丽惠,等. 稳定表达 E-cadherin 的 TW2R 细胞增强人胚胎干细胞生长 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (11): 1-8.

Song Q, Teng XH, Wang LH, et al. E-cadherin-expressing TW2R feed cells enhance growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 1-8.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 11. 001

稳定表达 E-cadherin 的 TW2R 细胞增强人胚胎干细胞生长

宋 琼^{1,2},滕夏虹³,王丽惠^{1,2},许倩倩^{1,2},孙晓婷^{1,2},邹春林^{1,2*}

(1.广西医科大学转化医学研究中心,广西医科大学基础医学院,南宁 530021;2.长寿与老年相关疾病教育部重点实验室,南宁 530021;3.广西医科大学国际教育学院,南宁 530021)

【摘要】 目的 构建一种可高效支持人胚胎干细胞生长的人源饲养层细胞系。方法 首先通过在 TW2R 细胞系稳定表达人 E-钙黏素 (*E-cadherin*) 基因构建永生化人源饲养层细胞系 TWE3R,并比较人胚胎干细胞在 TWE3R 及其亲本细胞上的克隆形成数。将 H9 人胚胎干细胞在 TWE3R 细胞上经过 10 代连续传代培养后,进行人胚胎干细胞特异性标志物分析、拟胚体形成分析和畸胎瘤形成检测等实验。结果 本研究成功构建了永生化的人源饲养层细胞系 TWE3R,TWE3R 细胞可比其亲本细胞更高效地支持人胚胎干细胞生长,并且 TWE3R 饲养层细胞还具有支持低密度接种条件下(每平方米 5 个)人胚胎干细胞生长的特性。此外,H9 人胚胎干细胞在 TWE3R 细胞上长期传代培养后,仍可保持所有人胚胎干细胞的未分化特性、正常细胞核型以及在体内外均可分化形成所有 3 个胚层衍生物的潜能。结论 本研究所建立的永生化人源饲养层细胞系 TWE3R 具有高效支持胚胎干细胞生长的特性。

【关键词】 人胚胎干细胞;人源饲养层细胞;E-钙黏素

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 11-0001-08

E-cadherin-expressing TW2R feed cells enhance growth of undifferentiated human embryonic stem cells

SONG Qiong^{1,2}, TENG Xiaohong³, WANG Lihui^{1,2}, XU Qianqian^{1,2}, SUN Xiaoting^{1,2}, ZOU Chunlin^{1,2*}

(1. Center for Translational Medicine and School of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China.

2. Key Laboratory of Longevity and Ageing-Related Disease of Chinese Ministry of Education, Nanning 530021.

3. School of International Education, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

【Abstract】 **Objective** To establish an immortalized human feeder cell line that efficiently supports the growth of undifferentiated human embryonic stem (hES) cells. **Methods** The immortalized TWE3R cell line was established by stably expressing the human *E-cadherin* gene in the TW2R cell line. The numbers of hESC colonies on TWE3R feeder cells were compared with those on its parental cell lines. After H9 hES cells were cultured on TWE3R cells for 10 consecutive passages, pluripotency marker analysis, embryoid body (EB) formation assays and teratoma formation assays were conducted. **Results** We succeeded in establishing the TWE3R human feeder cell line that showed higher efficiency to

【基金项目】国家自然科学基金项目(81971191,81670750);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2013]694号)。

【作者简介】宋琼(1979—),女,助理研究员,博士,研究方向:细胞生物学研究。E-mail:songqem@163.com

【通信作者】邹春林(1975—),男,研究员,博士,硕士生导师,研究方向:非人灵长类重大疾病模型及干细胞治疗研究。

E-mail:zouchunlin@sohu.com

support the growth of hES cells than its parental cell line. TWE3R feeder cells supported the growth of H9 ESCs at low density (5 cells/cm²). Additionally, after long-term culture on TWE3R feeders, H9 ESCs retained all undifferentiated characteristics, a normal karyotype and the potential to differentiate into derivatives of all three embryonic germ layers.

Conclusions The immortalized TWE3R human feeder cell line is capable of supporting efficient growth of human ESCs.

【Keywords】 human embryonic stem cell; human feeder cell line; E-cadherin

人多能干细胞,包括人胚胎干细胞(human Embryonic Stem Cells, hESCs)和人诱导多能干细胞(human induced Pluripotent Stem Cells, hiPSCs),具有体外无限增殖、保持未分化状态的自我更新能力和多向分化潜能,在转化医学、再生医学以及新药筛选方面有着广阔的运用应用前景^[1-5]。目前干细胞 hESCs 和 hiPSCs 的体外培养,一般需要小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)作为饲养层细胞,但其应用于临床有可能导致动物源性病原体污染及免疫排斥等问题^[6-8]。为了解决上述问题,各种无动物源性饲养层培养体系被研发,包括无饲养层培养体系和人源饲养层细胞培养体系^[9-12]。虽然已有研究报道,某些体细胞可在无饲养层培养条件下重编程为 iPSCs,但重编程的效率明显比在 MEF 上的重编程效率低,并仍然需要动物源性的基质来支持细胞的生长,因此不利于临床的转化应用^[13-15]。已有研究报道在端粒酶的 3 个亚单位中,人端粒酶催化亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是调节端粒酶活性的关键组分,正常人体细胞中 hTERT 不表达或表达量很低,如果在体外培养的体细胞中过表达 hTERT,可明显延长培养细胞的寿命,从而建立永生化的细胞系^[16-18]。此外,也有研究报道,Wnt/ β -catenin 信号通路在维持胚胎干细胞的多能性和体细胞重编程过程中发挥着重要作用^[19]。Wnt3a 作为 Wnt 家族的重要成员,有研究表明 Wnt3a 在调控干细胞多能性和自我更新中发挥重要的作用^[20-21]。有研究报道,在人胚胎干细胞培养基中加入 Wnt3a 促进细胞增殖,并且不影响细胞凋亡^[22]。在水牛胚胎干细胞培养基中加入 Wnt3a,通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, β -catenin 表达显著上调,进而激活下游靶基因 *Nanog* 的表达,从而维持胚胎干细胞多能性^[23]。过表达 *Wnt3a* 的小鼠成纤维细胞制备的条件培养基可以促进小鼠胚胎干细胞的增殖能力,维持小鼠胚胎干细胞自我更新能力和多能分化能力^[24]。因此,在前期研究中,通过在人骨髓间充质细胞中稳定表达 *hTERT* 基因和 *Wnt3a* 基因,获得了永生化人源饲养层细胞系 TW2R, TW2R 细胞系虽然

能够支持人胚胎干细胞的不分化生长,但在支持人胚胎干细胞生长效率方面,与 MEF 比较并无明显优势^[25]。有研究结果显示跨膜蛋白 E-cadherin 所介导的细胞间相互作用在体细胞重编程中起着非常重要的作用^[26],因此本研究提出将 *E-cadherin* 基因转导至永生化人源饲养层细胞内,将有可能获得可高效支持人胚胎干细胞生长的人源饲养层细胞系,并有助于人多能干细胞的相关研究和临床应用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄 NOD-SCID 雄性小鼠,2 只,25~26 g,购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005],并饲养于广西医科大学实验动物中心[SYXK(桂)2020-0004],实验中所涉及的所有动物实验操作均获得广西医科大学实验动物伦理委员会的批准(201711032),遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞与病毒

人胚胎干细胞系 H9 由首都医科大学宣武医院细胞治疗中心惠赠,永生化人间充质干细胞(human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs)细胞系 TW2R 是由先前实验通过在 hMSCs 中过表达 *hTERT* 基因和 *Wnt3a* 基因建立的永生化人饲养层细胞系^[25],表达 *E-cadherin* 基因和嘌呤霉素(*Puromycin*)抗性基因的慢病毒由上海吉玛制药技术有限公司制备。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM(low glucose)培养基、KNOCKOUT DMEM 培养基、KNOCKOUT Serum Replacement、MEM Non-Essential Amino Acids Solution、胎牛血清、bFGF、GlutaMAX Supplement、Antibiotic-Antimycotic、0.05% Trypsin-EDTA、消化酶 Accutase、Lipofectamine 2000、Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司);抗 E-cadherin 抗体、抗 OCT4 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);抗 Tra-1-60 抗体、抗 SSEA-4 抗体、抗 Wnt3a 抗体、抗 α -SMA 抗体(美国 Millipore 公司);抗 β -tubulin 抗体(美国 Sigma 公司);抗 NANOG 抗体(美国 Peprotech 公司);抗 AFP 抗体(美国 Abcam 公司)。

恒温 CO₂ 培养箱、生物安全柜、水浴锅、多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);正置荧光显微镜、倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验流程

实验流程见图 1。

1.3.2 培养基配置

(1)人间充质干细胞培养基:含 10%胎牛血清、1% Antibiotic-Antimycotic 和 1 ng/mL bFGF 的低糖 DMEM;(2)293T 培养基:含 10%胎牛血清的高糖 DMEM;(3)人胚胎干细胞培养基:含 1% Antibiotic-Antimycotic、1% L-glutamine、1% Nonessential amino acids、20% KNOCKOUT Serum Replacement、0.007% β-mercaptoethanol 和 10 ng/mL bFGF 的 KNOCKOUT DMEM。

1.3.3 人骨髓间充质干细胞的培养

将人骨髓来源去除 CD34 阳性细胞的单个核细胞重悬于 hMSCs 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每 48 h 更换培养基,培养 14 d 左右见明显细胞克隆形成,将细胞进行传代培养。

1.3.4 构建过表达 *E-cadherin* 的 TWE3R 细胞系和空载对照组 TWN3R 细胞系

将含有 *Puromycin* 抗性基因和 *E-cadherin* 基因的慢病毒以及仅含有 *Puromycin* 抗性基因的慢病毒浓缩液分别感染 TW2R 细胞系,通过 1 μg/mL *Puromycin* 加药筛选,获得稳定过表达 *E-cadherin* 基因的细胞系 TWE3R 和稳定表达 *Puromycin* 抗性基因的对照组细胞系 TWN3R。

1.3.5 细胞免疫荧光检测

将细胞接种于 24 孔板中,待细胞贴壁,PBS 清洗,4%的多聚甲醛固定,0.3% TritonX-100 渗透,5% 正常驴血清封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜(抗 *E-cadherin* 抗体 1:200 稀释,抗 *Wnt3a* 抗体 1:100 稀

释,抗 Tra-1-60 抗体 1:300 稀释,抗 Oct-4 抗体 1:400 稀释,抗 NANOG 抗体 1:300 稀释,抗 SSEA-4 抗体 1:100 稀释)。PBS 清洗后室温避光孵育荧光二抗 1.5 h,DAPI 染核 5 min,置于荧光显微镜下观察。

1.3.6 人胚胎干细胞在不同饲养层细胞上的克隆形成实验

将 10 μg/mL 丝裂霉素处理的 hMSCs、TW2R、TWN3R、TWE3R 和 CF1 MEF 饲养层细胞分别接种于预包被明胶的 24 孔板中,过夜培养。将无饲养层细胞中培养的 H9 人胚胎干细胞用 Accutase 酶消化,制备单细胞悬液,按 1、10、100、1×10³ 和 1×10⁴ 细胞密度分别接种到含有不同饲养层细胞的 24 孔培养板中,培养 7 d 后,通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染色,计数阳性克隆数。

1.3.7 人胚胎干细胞在 TWE3R 饲养层细胞上的长期传代培养以及生物学特性分析

将 H9 人胚胎干细胞接种于丝裂霉素预处理的 TWE3R 上并连续传代 10 代,然后进行相关生物学特性的分析:细胞核型分析、拟胚体形成实验和畸胎瘤形成实验。

(1)细胞核型分析 在对数生长期的 TWE3R 细胞中加入秋水仙素(Colcemid)细胞培养箱培养 40~60 min。DPBS 清洗后,胰酶消化离心。加入 KCl 低渗处理,置于 37℃ 水浴锅中孵育 10~15 min,加入固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)进行预固定 10 min,离心弃上清。加入固定液固定 30 min,离心弃上清,再次加入固定液,4℃ 固定过夜。将固定好的细胞悬液,滴在玻片上,置于 75℃ 烤箱烘烤 3 h。将玻片放在胰酶中消化 60 s 后,生理盐水漂洗,进行 Giemsa 混合液染色,自来水冲洗、晾干镜检,共计数 30 个分裂相,分析 3 个核型。

(2)拟胚体形成实验 将 TWE3R 饲养层细胞上连续传代 10 代的 H9 人胚胎干细胞接种到低粘附 6 孔板中,隔天换液,8 d 后将形成拟胚体接种于 0.1% 明胶预处理的 24 孔板,继续培养 2 d 后,4% 多聚甲醛固定,细胞免疫荧光检测,抗体稀释比例如下:抗 β3-tubulin 抗体 1:1000 稀释、抗 AFP 抗体 1:500 稀释、抗 α-SMA 抗体 1:500 稀释。

(3)畸胎瘤形成实验 在 TWE3R 饲养层细胞上连续传代培养 10 代的 H9 人胚胎干细胞,胶原酶消化,离心后将约 5×10⁶ 细胞重悬于 1:1 稀释的 Matrigel 中,注射于 NOD-SCID 小鼠的后肢肌肉中,4~8 周后将形成的畸胎瘤取出,经 4% 的多聚甲醛固

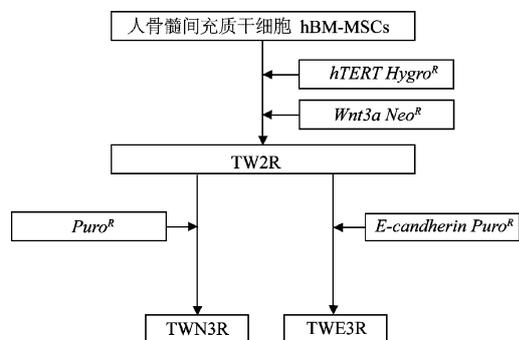


图 1 永生人源饲养层细胞系 TWE3R 的构建

Figure 1 Establishment of immortalized human feeder cell line TWE3R

定,石蜡包埋后进行切片和 HE 染色。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析, GraphPad Prism 8.0 软件进行图标制作, 计量结果以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA), 组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 构建永生化人源饲养层细胞 TWE3R

前期研究通过先后转染共表达 *hTERT* 基因和 *Hygromycin* 抗性基因的逆转录病毒载体以及共表达 *Wnt3a* 基因和 *Neomycin* 抗性基因的逆转录病毒载体的病毒载体到 hMSCs 细胞, 通过体外长期传代培养获得了永生化的人源饲养层细胞系 TW2R。在 TW2R 细胞基础上, 通过转染共表达 *E-cadherin* 基因和 *Puromycin* 抗性基因的慢病毒载体到 TW2R 细胞, 抗性筛选获得了稳定过表达 *E-cadherin* 基因的永生化 TWE3R 细胞系。如图 2A 中相差显微镜图片所示在细胞形态上 TW2R、TWN3R 和 TWE3R 细胞系与原代 hMSCs 基本相似, 细胞呈长梭形。免疫荧光染色结果显示 hMSCs 不表达 *Wnt3a* 蛋白和 *E-cadherin* 蛋白。TW2R 和 TWN3R 仅表达 *Wnt3a* 蛋白不表达 *E-cadherin* 蛋白, TWE3R 既表达 *Wnt3a* 蛋白也表达 *E-cadherin* 蛋白。由于原代 hMSCs 在连续传 5~6 代后, 其细胞增殖能力开始下降, 并开始出现细胞核与细胞质的比率减小等细胞衰老的特征, 因此本研究通过对 TWE3R 细胞进行长期连续传代培养, 来观察 TWE3R 细胞是否会出现细胞衰老的表型, 以证实 TWE3R 是否具有永生化细胞的生物学特点, 结果如图 2B 所示, 连续传代中 TWN3R 和 TWE3R 细胞的增殖倍增曲线显示, 稳定转染 *E-cadherin* 基因不会影响 TWE3R 细胞的增殖能力, 对照组的 TWN3R 细胞和 TWE3R 细胞的细胞倍增时间在长期连续传代培养过程中无明显改变, 两种细胞连续传代 50 代以上, 细胞形态无明显改变, 也未出现衰老的表现。细胞染色体核型分析结果如图 2C 所示, TWE3R 细胞具有正常的人染色体细胞核型, 无染色体数目或结构异常。

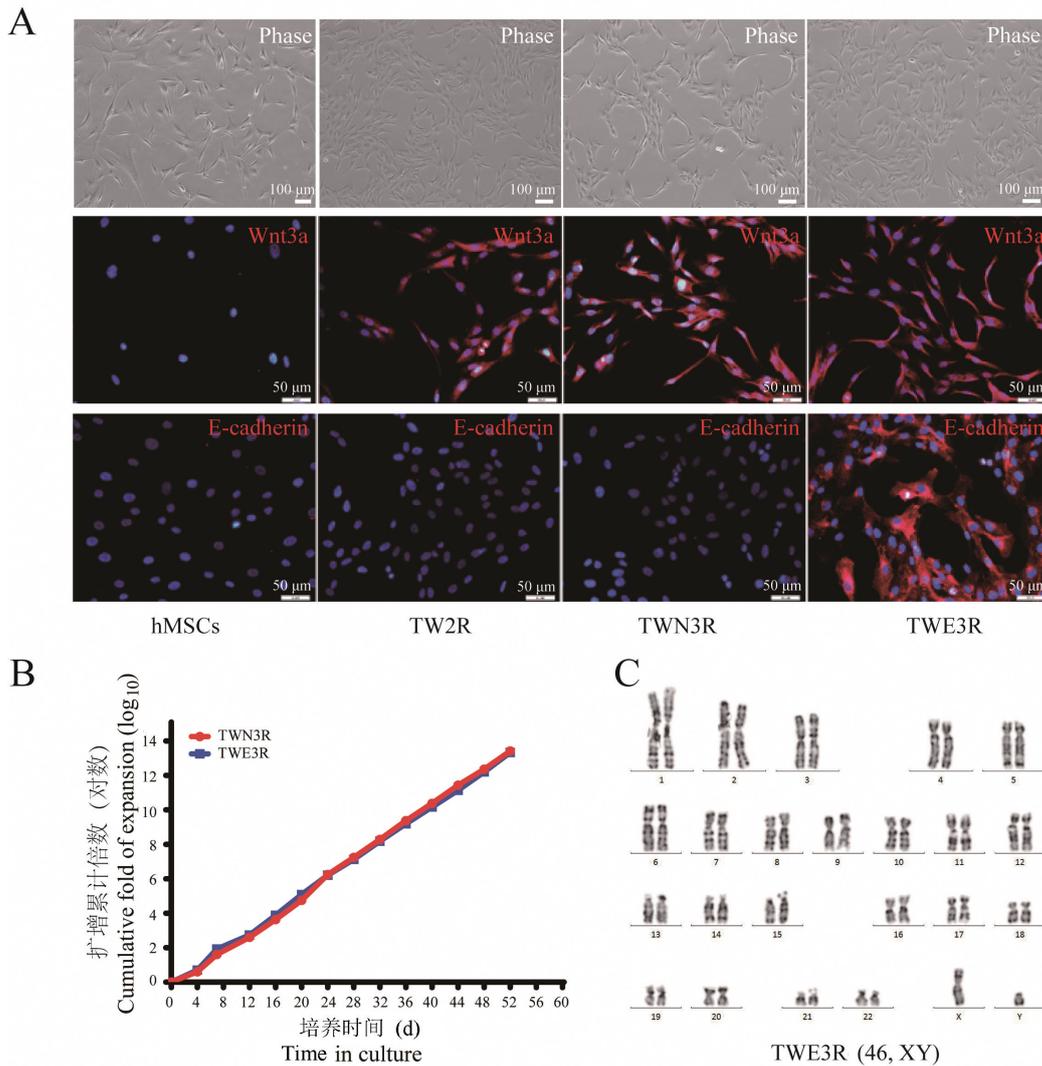
2.2 比较人胚胎干细胞在 TW2R、TWN3R、TWE3R 和 MEF 细胞上的克隆形成率

由于克隆形成实验通常用来检测细胞的增殖能力, 为了证实 TWE3R 比其亲本细胞和 MEF 细胞

具有更高效率支持人胚胎干细胞增殖的特性, 本研究比较了不同细胞密度的 H9 人胚胎干细胞在 TW2R、TWN3R、TWE3R 和 MEF 细胞上的克隆形成率, 结果如图 3A 所示, 在 TWE3R 细胞上, 不同密度的 H9 人胚胎干细胞克隆形成率均高于 TW2R、TWN3R 和 MEF 细胞, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在 TW2R、TWN3R 和 MEF 细胞之间克隆形成率无显著差异 ($P > 0.05$), 并且更值得关注的是, TWE3R 细胞可支持低密度接种条件下(每平方米 5 个)人胚胎干细胞的生长, 而在其他饲养层细胞上几乎观察不到人胚胎干细胞克隆的形成。

2.3 人胚胎干细胞在 TWE3R 细胞上长期传代培养后的生物学特性的鉴定

H9 人胚胎干细胞系是国际上最通用胚胎干细胞系之一, 为了证实人胚胎干细胞可在 TWE3R 细胞上长期传代培养并保持未分化人胚胎干细胞的生物学特点, 本研究将 H9 人胚胎干细胞在 TWE3R 细胞上连续传代培养 10 代, 分别进行人胚胎干细胞染色体细胞核型分析、特异性标志物的染色、拟胚体形成和畸胎瘤形成实验。为了检测 H9 人胚胎干细胞在 TWE3R 细胞上连续传代培养后是否具有正常的二倍体核型, 结果如图 3B 显示连续传代的 H9 人胚胎干细胞仍然保持正常的染色体细胞核型, 无染色体数目或结构异常。如图 3C 显示, H9 人胚胎干细胞在 TWE3R 细胞上连续传代培养后, H9 人胚胎干细胞呈克隆团样生长, 克隆边缘清晰, 细胞形态均一, 核质比高, 细胞仍然保持正常未分化的形态, 碱性磷酸酶染色呈强阳性。进一步细胞免疫荧光染色结果也显示, 连续传代的 H9 人胚胎干细胞仍然表达多能干细胞特异性标志物 *Tra-1-60*、*OCT4*、*NANOG* 和 *SSEA-4*。拟胚体形成实验是检测人胚胎干细胞体外多向分化潜能的重要实验, 而畸胎瘤形成实验是检测人胚胎干细胞体内多向分化潜能的重要实验, 本研究结果如图 3D 显示, 由连续传代的 H9 人胚胎干细胞体外分化形成的拟胚体表达外胚层标志物 ($\beta 3$ -tubulin), 中胚层标志物 (α -SMA) 和内胚层标志物 (AFP)。此外, H9 人胚胎干细胞在 TWE3R 传 10 代后, 注射到免疫缺陷小鼠体内, 可形成畸胎瘤, 并且畸胎瘤 HE 染色显示肿瘤组织含有来自外胚层、内胚层和中胚层的组织, 表明 H9 人胚胎干细胞细胞在 TWE3R 饲养层细胞上长期传代后仍然保持体内、体外向 3 个胚层分化的能力。



注:A:相差显微镜图片(Phase)显示细胞形态,细胞免疫荧光染色检测 Wnt3a 蛋白(红色荧光)或 E-cadherin 蛋白(红色荧光)的表达,DAPI (蓝色荧光)染细胞核。B:细胞增殖曲线显示 TWE3R 细胞与对照组 TWN3R 细胞的倍增时间在长期连续传代培养过程中无明显差异。C: TWE3R 细胞具有正常染色体核型。

图 2 永生化人源饲养层细胞系 TWE3R 的生物学特性

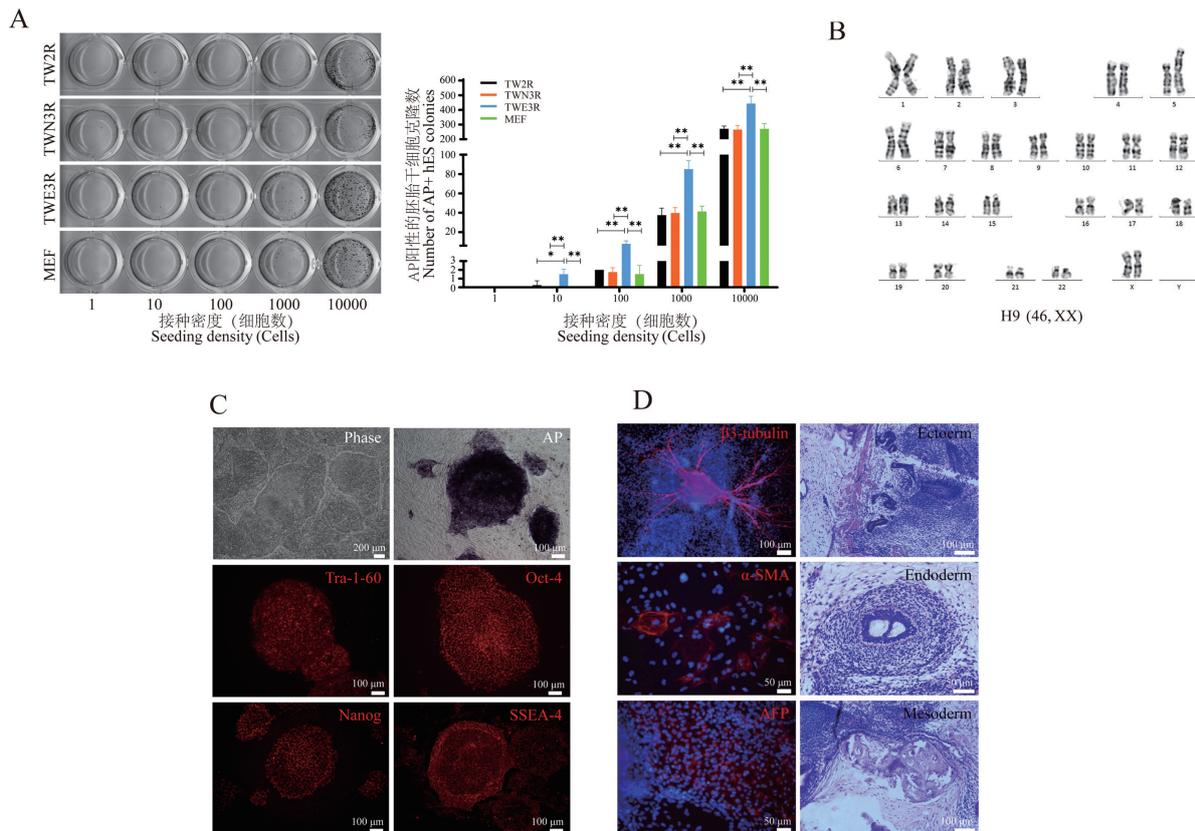
Note. A, Cells morphology observation in phase contrast microscopy images and immunofluorescence staining for Wnt3a (Red) or E-cadherin (Red) and nuclei DAPI(Blue). B, Growth curves of TWN3R and TWE3R on continuous passaging. C, TWE3R maintained a normal karyotype.

Figure 2 Characterization of immortalized human feeder cell line TWE3R

3 讨论

人胚胎干细胞具有体外无限增殖、保持未分化状态的自我更新能力和多向分化潜能的一类细胞。干细胞生长所处的微环境,在调节干细胞活性和行为方面发挥着主导作用,主要包括细胞间的相互作用和细胞与细胞外基质间的相互作用。细胞之间的相互作用通过 3 种方式介导:可溶性因子、细胞外矩阵(ECM)和细胞间粘附。其中细胞间粘附是调节细胞的分化和增殖的重要因素^[27-28]。

E-cadherin 是钙依赖性黏附分子的亚族成员,是一种跨膜蛋白,广泛分布在非神经上皮组织,它与细胞内的特异性分子结合,参与同种亲和性的细胞-细胞间的黏附,胚胎发育以及正常组织中上皮细胞层的形成和维持^[29]。在胚胎发育过程的早期,研究显示 E-cadherin 介导的细胞与细胞间黏附作用参与了细胞的迁移和组织的形成^[30]。此外,有研究显示 E-cadherin 在维持多能干细胞的生长方面也有着重要作用。Nagaoka 等^[31-32] 研究报道,包被了 E-cadherin 蛋白膜外部分的培养表面能够充分维持



注:A:H9人胚胎干细胞克隆形成实验显示在TWE3R饲养层细胞上形成克隆形成率高于TW2R、TWN3R、MEF细胞。与TW2R相比, $*P<0.05$;与TWN3R细胞或MEF细胞相比, $**P<0.01$;B:H9人胚胎干细胞在TWE3R细胞上连续传代培养10代后,H9人胚胎干细胞仍然保持正常染色体核型;C:H9人胚胎干细胞在TWE3R细胞上连续传代培养10代后,细胞仍然保持正常未分化的形态,AP染色以及Tra-1-60、OCT4、NANOG和SSEA-4免疫染色呈阳性;D:拟胚体形成和畸胎瘤形成实验证实H9人胚胎干细胞在TWE3R细胞上连续传代培养10代后,仍然具备体内(右)、体外(左)向3个胚层分化的能力。

图3 TWE3R可支持未分化状态人胚胎干细胞的长期传代培养

Note. A, H9 hESCs plated on TWE3R feeders showed a higher efficiency of clonal growth than those on TW2R, TWN3R or MEF. Compared with TW2R, $*P<0.05$. Compared with TWN3R or MEF, $**P<0.01$. B, After 10 passages on TWE3R, the H9 hESCs maintained a normal female karyotype and undifferentiated morphology and expression of pluripotency markers such as SSEA4, TRA-1-60, OCT4, NANOG and alkaline phosphatase. D, Potential to differentiate to derivatives of all three embryonic germ layer *in vivo* (right panel) and *in vitro* (left panel) in embryoid body formation assays and teratoma formation assays.

Figure 3 TWE3R human feeders support long-term culture of undifferentiated human ESCs

小鼠胚胎干细胞和人多能干细胞的生长,并可维持多能干细胞的全部生物学特性,这说明E-cadherin不但是一个细胞黏附分子,同时可能也起到了激活维持多能干细胞多能性信号通路的作用。Chen等^[33]研究报道,在小鼠成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞的过程中下调内源性E-cadherin表达,可使重编程的效率降低80%,并且证明E-cadherin所介导的细胞间黏附作用在体细胞重编程为诱导多能干细胞的过程中起到至关重要的作用。由于体细胞重编程为诱导多能干细胞是小概率事件,因此如何提高重编程过程中单个诱导多能干细胞的存活率,对于诱导多能干细胞的应用有着重要意义。

已知ES细胞和诱导多能干细胞表达E-cadherin,而饲养层细胞不能表达E-cadherin。先前已有研究报道,单个人胚胎干细胞由于不能及时重建E-cadherin所介导的细胞与细胞间的相互黏附作用,而易发生凋亡,导致细胞自我更新能力的下降和细胞死亡的增加^[34]。文献报道hMSCs不能表达E-cadherin^[35],我们研究发现饲养层细胞hMSCs以及永生化TW2R细胞均不表达E-cadherin。由于ES细胞和诱导多能干细胞表达E-cadherin,因此提出本研究假设,在饲养层细胞过表达E-cadherin基因可通过增强多能干细胞和饲养层细胞间的相互作用来提高多能干细胞的自我更新和存活能力。本研

究显示,通过在前期建立的永生生化 TW2R 细胞上过表达 *E-cadherin*,可获得永生化的人源饲养层细胞系 TWE3R,人胚胎干细胞在 TWE3R 细胞上克隆形成率均明显高于其亲本细胞(TW2R)和对照组细胞(TWN3R),并且具备特异性支持低密度接种条件下(每平方米 5 个)的生长,而 MEF、TW2R 和 TWN3R 不具备这种能力,这说明人胚胎干细胞在被消化成单个细胞后在低密度下具有较差的克隆形成能力,而过表达 *E-cadherin* 的 TWE3R 可以显著提高其单细胞存活率和克隆形成率。其机制可能与 *E-cadherin* 调控其下游信号分子 β -catenin 有关,而 β -catenin 是 Wnt 信号系统下游的关键分子,其可通过调控细胞内 *Nanog* 和 *OCT-4* 基因的表达和分布影响胚胎干细胞的增殖和多能性维持^[36-38]。此外,人胚胎干细胞在 TWE3R 上连续传代培养过程中,细胞仍然保持正常未分化的形态,保持正常的染色体细胞核型,表达干细胞标志物 Tra-1-60、OCT4、NANOG 和 SSEA-4^[39],在体外拟胚体实验和体内畸胎瘤实验证实所培养的人胚胎干细胞保持体内、体外向 3 个胚层分化的能力。

综上所述,本研究所建立的过表达 *E-cadherin* 的永生化人源饲养层细胞系 TWE3R 高效支持人胚胎干细胞未分化状态生长的优势,是理想的人源饲养层细胞,为解决人胚胎干细胞体外培养和临床应用时面临的一系列问题提供了新的解决方案。

参考文献:

- [1] Yilmaz A, Benvenisty N. Defining human pluripotency [J]. Cell Stem Cell, 2019, 25(1): 9-22.
- [2] De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, et al. Hallmarks of pluripotency [J]. Nature, 2015, 525(7570): 469-478.
- [3] Amin N, Tan X, Ren Q, et al. Recent advances of induced pluripotent stem cells application in neurodegenerative diseases [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2019, 95: 109674.
- [4] Thies RS, Murry CE. The advancement of human pluripotent stem cell-derived therapies into the clinic [J]. Development, 2015, 142(18): 3077-3084.
- [5] Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(3): 170-182.
- [6] Chugh RM, Chaturvedi M, Yerneni LK. An evaluation of the choice of feeder cell growth arrest for the production of cultured epidermis [J]. Burns, 2015, 41(8): 1788-1795.
- [7] Moore H. The medium is the message [J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(2): 160-161.
- [8] Chen KG, Mallon BS, McKay RD, et al. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics [J]. Cell Stem Cell, 2014, 14(1): 13-26.
- [9] Yasuda SY, Ikeda T, Shahsavaran H, et al. Chemically defined and growth-factor-free culture system for the expansion and derivation of human pluripotent stem cells [J]. Nat Biomed Eng, 2018, 2(3): 173-182.
- [10] 黄冰, 黄文革, 钟女奇, 等. 小鼠胚胎干细胞在六种培养体系的培养观察 [J]. 中国实验动物学报, 2000, 8(1): 1-6.
- [11] 韩甫, 叶荣, 鲍柳君, 等. 无血清无饲养层条件下培养小鼠胚胎干细胞 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(4): 254-257, 324.
- [12] 刘峰, 徐永胜, 俞海燕, 等. 人脐带间充质干细胞作为维持人胚胎干细胞生长饲养层细胞的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(4): 271-276, 369.
- [13] Konala VBR, Nandakumar S, Battu R, et al. Derivation of three induced pluripotent stem cell lines under feeder-free culture conditions from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of Indian patients suffering from inherited retinal diseases carrying different mutations [J]. Stem Cell Res, 2020, 45: 101757.
- [14] Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(37): 15720-15725.
- [15] Sugii S, Kida Y, Kawamura T, et al. Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(8): 3558-3563.
- [16] Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [J]. Science, 1998, 279(5349): 349-352.
- [17] Wieser M, Stadler G, Jennings P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(5): F1365-F1375.
- [18] Yang J, Chang E, Cherry AM, et al. Human endothelial cell life extension by telomerase expression [J]. J Biol Chem, 1999, 274(37): 26141-26148.
- [19] Miki T, Yasuda SY, Kahn M. Wnt/ β -catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming [J]. Stem Cell Rev Rep, 2011, 7(4): 836-846.
- [20] Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration; Wnt signaling and stem cell control [J]. Science, 2014, 346(6205): 1248012.
- [21] Fang D, Leishear K, Nguyen TK, et al. Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(7): 1668-1677.
- [22] Dravid G, Ye Z, Hammond H, et al. Defining the role of Wnt/ β -catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(10): 1489-1501.
- [23] Zandi M, Muzaffar M, Shah SM, et al. WNT3A signalling pathway in buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cells [J].

- Reprod Fertil Dev, 2014, 26(4): 551–561.
- [24] Singla DK, Schneider DJ, Lewinter MM, et al. wnt3a but not wnt11 supports self-renewal of embryonic stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(2): 789–795.
- [25] Zou C, Chou BK, Dowey SN, et al. Efficient derivation and genetic modifications of human pluripotent stem cells on engineered human feeder cell lines [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(12): 2298–2311.
- [26] Horie M, Ito A, Kiyohara T, et al. E-cadherin gene-engineered feeder systems for supporting undifferentiated growth of mouse embryonic stem cells [J]. J Biosci Bioeng, 2010, 110(5): 582–587.
- [27] Chaudhuri O, Cooper-White J, Janmey PA, et al. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour [J]. Nature, 2020, 584(7822): 535–546.
- [28] 胡若文, 陈晓芳. 整合素和 E-钙黏素在诱导多能干细胞重编程及干性维持中的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(29): 4698–4705.
- [29] Biswas KH. Molecular mobility-mediated regulation of E-cadherin adhesion [J]. Trends Biochem Sci, 2020, 45(2): 163–173.
- [30] Leckband DE, De Rooij J. Cadherin adhesion and mechanotransduction [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30: 291–315.
- [31] Nagaoka M, Si-Tayeb K, Akaike T, et al. Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum [J]. BMC Dev Biol, 2010, 10: 60.
- [32] Nagaoka M, Koshimizu U, Yuasa S, et al. E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation [J]. PLoS One, 2006, 1(1): e15.
- [33] Chen T, Yuan D, Wei B, et al. E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation [J]. Stem Cells, 2010, 28(8): 1315–1325.
- [34] Li L, Wang S, Jeziński A, et al. A unique interplay between Rap1 and E-cadherin in the endocytic pathway regulates self-renewal of human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2010, 28(2): 247–257.
- [35] Bhattacharya A, Saluja S, Managuli V, et al. Comparing migratory and mechanical properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with colon cancer cells *in vitro* [J]. J Gastrointest Cancer 2021, 52(3): 882–891.
- [36] Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? [J]. Oncogene, 2008, 27(55): 6920–6929.
- [37] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways [J]. Science, 2004, 303(5663): 1483–1487.
- [38] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor [J]. Nat Med, 2004, 10(1): 55–63.
- [39] 杨玉艾, 华进联, 马勇江, 等. 胚胎干细胞生物学特性 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(3): 61–65.

[收稿日期] 2020-12-28