

甲基结合蛋白 1 对小鼠胚胎干细胞增殖及克隆形态的影响^{*}

张鹏^{1,2}, 杨红兰^{1,2}, 刘含^{1,2}, 周艳华^{1,2}, 杨燕^{1,2}, 范安然^{1,2}, 何志旭^{2,3**}, 舒莉萍^{1,2**}

(1. 贵州医科大学 细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室, 组织工程与干细胞实验中心, 贵州省再生医学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 中国医学科学院 成体干细胞转化研究重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 遵义医科大学附属医院 儿科学教研室, 贵州 遵义 563000)

[摘要] 目的: 研究甲基结合蛋白 1 (Mbd1) 对小鼠胚胎干细胞克隆形态及增殖的影响。方法: 设计针对 Mbd1 转录起始位点的 gRNA, 将表达有 gRNA 和 Cas9 蛋白的质粒使用脂质体转染方法转入小鼠胚胎干细胞 (J1); 使用抗生素将未转染成功的细胞杀死后, 细胞继续培养 7 d, 挑取单克隆细胞, 采用 PCR 法筛选敲除 Mbd1 的纯合子细胞, 观察 Mbd1 缺失对小鼠胚胎干细胞克隆形态的影响; 使用细胞计数法检验 Mbd1 对胚胎干细胞增殖的影响。结果: 通过 Cripsr/Cas9 成功获得敲除 Mbd1 的胚胎干细胞, Mbd1 缺失后的小鼠胚胎干细胞丧失了常规小鼠胚胎干细胞的 3D 克隆形态, 细胞呈现单层扁平克隆; Mbd1 缺失后小鼠胚胎干细胞增殖速率变慢。结论: Mbd1 通过影响小鼠胚胎干细胞克隆形态和增殖而影响胚胎干细胞的多能性。

[关键词] 甲基结合蛋白; 胚胎干细胞; 多能性; 细胞增殖; 神经前体细胞; 基因敲除

[中图分类号] R741.02 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)06-0621-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.001

Effect of Methyl-CpG Binding Domain Protein 1 on the Colony Morphology and Proliferation of Mouse Embryonic Stem Cells

ZHANG Peng^{1,2}, YANG Honglan^{1,2}, LIU Han^{1,2}, ZHOU Yanhua^{1,2},
YANG Yan^{1,2}, FAN Anran^{1,2}, HE Zhixu^{2,3}, SHU Liping^{1,2}

(1. National & Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Province Key Laboratory of Regenerative Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Adult Stem Cell Translational Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of methyl-CpG binding domain protein 1 (Mbd1) on the colony morphology and proliferation of mouse embryonic stem cells (mESCs). **Methods:** A gRNA was designed to specifically target to the transcriptional start site of Mbd1 and cloned into pX459 plasmid, and then co-transfected with the plasmid which contains Cas9 gene into mESCs. mESCs expressing gRNA were selected by puromycin treatment, cultured for 7 days to form a colony and then the Mbd1 deletion was verified by genotyping using PCR. The efficiency of Mbd1 deletion was further confirmed using Western Blot. The morphology of mESCs was observed and cell proliferation was measured using cell counting method. **Results:** The expression of Mbd1 was completely abrogated by Cripsr/Cas9. The 3D-colony morphology of mESCs was lost in Mbd1 knockout mESCs. The proliferation of Mbd1 knockout cells was slower than the wildtype cells. **Conclusion:** Mbd1 is important for the pluri-

^{*}[基金项目] 贵州医科大学博士启动基金[院博合J字(2018)016号]; 国家自然科学基金项目(31660316); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2017PT31042); 贵州省教育厅导师工作室[黔教研合GZS(2016)02]

^{**}通信作者 E-mail: hzx@gmc.edu.cn; 415165261@qq.com

网络出版时间: 2019-06-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190622.0723.001.html>

potency maintenance of mESCs via regulating the colony formation and cell proliferation.

[**Key words**] methyl-CpG binding domain protein; embryonic stem cell; pluripotency; cell proliferation; neural precursor cells; gene knockout

全能性干细胞是一类处于未分化状态、可以长期自我更新和自我分化、具有在一定条件下分化形成各种组织细胞潜能的细胞^[1],在体外获得足够数量的全能干细胞对于再生医学的发展至关重要。随着体外诱导多能干细胞以及体外多能干细胞分化技术的发展,体外获得组织特异性及疾病特异性的细胞已经成为现实,但是其过程还需要进一步的优化,其分化的相关机制还需进一步的阐明。干细胞分化及诱导多能性干细胞获得过程中伴随着全基因组转录水平及染色质结构的变化,而这些变化会受细胞内的表观修饰及其识别蛋白的影响^[1-6]。因此,研究 DNA 表观修饰及其与甲基结合蛋白(methyl-CpG binding domain, Mbd)的相互关系对阐明干细胞分化以及重编程的机制至关重要。Mbd2 和 Mbd3 在胚胎干细胞分化以及重编程过程中具有非常重要的作用^[7-10],提示同家族蛋白 Mbd1 可能在多能性获得和丧失过程中也具有非常重要的作用。神经退行性疾病危害人类的健康,如何修复损伤的神经细胞对于治疗神经退行性疾病至关重要。有研究发现,多能性胚胎干细胞在体外可以分化为神经干细胞,这为神经退行性疾病的治疗提供了新的思路^[2-3]。有研究发现 Mbd1 在神经干细胞多能性的维持过程中具有非常重要的作用^[11]。Mbd1 敲除的神经干细胞分化潜力下降,其分化为 β -tubulin 阳性的神经细胞能力下降^[12]。这一结果暗示在神经前体细胞获得多能性的过程中 Mbd1 可能起到非常重要的作用。本研究通过研究 Mbd1 在胚胎干细胞多能性维持过程中的功能,为神经退行性疾病的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验中所用的化学试剂除非特殊指明,都来源于 Sigma 公司;小鼠胚胎干细胞(J1)制备参考文献[13],用于 gRNA 和 Cas9 表达的质粒 px459 来源于 Addgene,寡聚核苷酸合成于 ITD 公司,Mbd1 抗体购买于 Abcam 公司,HRP 标记二抗和 ECL 液体购买于 Thermo Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 gRNA 设计及克隆 根据 Crispr/Cas9 的工

作原理,使用 gRNA 在线设计软件(<https://benchling.com/enterprise/crispr>)针对 Mbd1 基因转录起始位点设计 gRNA,然后在正义链 5'端添加 CACC,反义链 5'端添加 AAAC。序列分别为 gRNA oligo 上游引物为 5'-CACCGTTCTGTCCCTGAAGCATC-TA,gRNA oligo 下游引物为 5'-AACTAGATGCT-TCAGGGACAGAAC。合成的正义链和反义链 DNA 在 $1 \times$ NEBuffer2.0 中退火后与 BbsI 限制性内切酶酶切后的骨架载体使用 T4-DNA 连接酶连接,然后将连接产物转化到 JM109 感受态细胞中,并在含有氨苄抗性的平板过夜生长。挑取单个克隆在含有氨苄抗性的培养液中培养,收集细胞提取质粒并进行测序验证 gRNA 序列是否克隆成功。

1.2.2 小鼠胚胎干细胞培养及质粒转染 小鼠胚胎干细胞 J1 培养在明胶(0.1% 明胶溶解于水中)处理过的细胞培养皿中,细胞培养液为高糖 DMEM 含有 16% FBS,2 mmol/L L-谷氨酰胺,0.1 mmol/L 的 β 巯基乙醇, $1 \times$ 双抗(青霉素,链霉素), $1 \times$ 非必需氨基酸,1 000 000 U/L LIF(Leukemia inhibitory factor),1 μ mol/L PD0325901 和 3 μ mol/L CHIR99021 (2i, 2 inhibitors)。将构建好的质粒使用 Lipofectamine 3000 转染试剂按照转染试剂说明书转入细胞内。转染后 48 h 消化细胞,然后重悬细胞,在含有终浓度为 1 mg/L 的嘌呤霉素培养液中培养 48 h,最后细胞在不含抗性的培养液中继续培养 7 d。

1.2.3 基因敲除细胞的鉴定 使用 10 μ L 枪头在体视显微镜下挑取胚胎干细胞单克隆,并将其转入含有 0.05% 的胰酶中消化为单细胞,然后将 2/3 (板 1)和 1/3 (板 2)的细胞分别培养在两个不同的 96 孔板中。72 h 后,去除板 2 中的培养液,然后加入 50 μ L 细胞裂解液,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 处理 3 h,90 $^{\circ}\text{C}$ 处理 20 min。最终取 2 μ L 细胞裂解液进行 PCR 鉴定。Mbd1 PCR 鉴定的上游引物序列为 5' CGG-GAGACGTTGGAACTCA,下游引物为 5' GAGCA-CACCCGTTACCTCTG。PCR 条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、63.5 $^{\circ}\text{C}$ 20 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s 重复 40 次。最后琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物,并将获得的 PCR 产物纯化后进行测序鉴定,最终根据测序结果选择板 1 中保留的基因敲除细胞扩大培养。

1.2.4 胚胎干细胞克隆形态的观察 Mbd1 敲除和野生型胚胎干细胞在添加或者不添加抑制剂 (2i) 的培养液中培养 3 代, 然后使用倒置相差显微镜观察细胞的克隆形态并拍照。

1.2.5 Mbd1 蛋白检测 取 1.5×10^6 个细胞在细胞裂解液中裂解后离心, 取上清进行 Western blot 分析。蛋白在 PAGE 胶中分离后, 使用半干转膜的方法将蛋白转印到硝酸纤维素膜上, 并进行立春红染色。然后使用 3% 牛奶进行非特异性结合位点的封闭。之后使用 Mbd1 抗体和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidas, HRP) 标记的二抗孵育, 最后使用成像系统检测发光信号。

2 结果

2.1 通过 Crispr/Cas9 技术获得敲除 Mbd1 的小鼠胚胎干细胞

根据 gRNA 在线设计软件 (<https://benchling.com/enterprise/crispr>) 在 Mbd1 基因转录起始

位点附近设计 gRNA, 然后选择敲除效率较高, 但脱靶效率较低的 gRNA 进行后续实验。通过体外合成的方式获得 gRNA 序列后, 将其连接于 px459 载体中, 然后通过脂质体转染的方式将构建成功的 px459 转入小鼠胚胎干细胞中, 最后通过 PCR 方法鉴定获得敲除 Mbd1 的纯合子细胞 (图 1A)。基因组序列和测序结果相比对序列完全一致, 说明细胞内并未发生 Mbd1 的敲除 (图 1B 上半部分), 如果在转录起始位点附近发生缺失, 说明 Mbd1 基因序列发生了变化 (图 1B 下半部分)。另外, 通过 Western blot 检测细胞内是否还存在完整的 Mbd1 蛋白, 如图 1C 所示, 敲除 Mbd1 的细胞总蛋白和野生型细胞中总蛋白相似的情况下 (Ponceau S 染色), 野生型胚胎干细胞在 70 KDa 附近能够检测到两个条带, 分别为完整的 Mbd1 (Mbd1a) 和缺失 CXXC3 的 Mbd1 (Mbd1b), 但是 Mbd1 敲除细胞在 70 KDa 附近并不能检测到任何 Mbd1 的特异性条带。

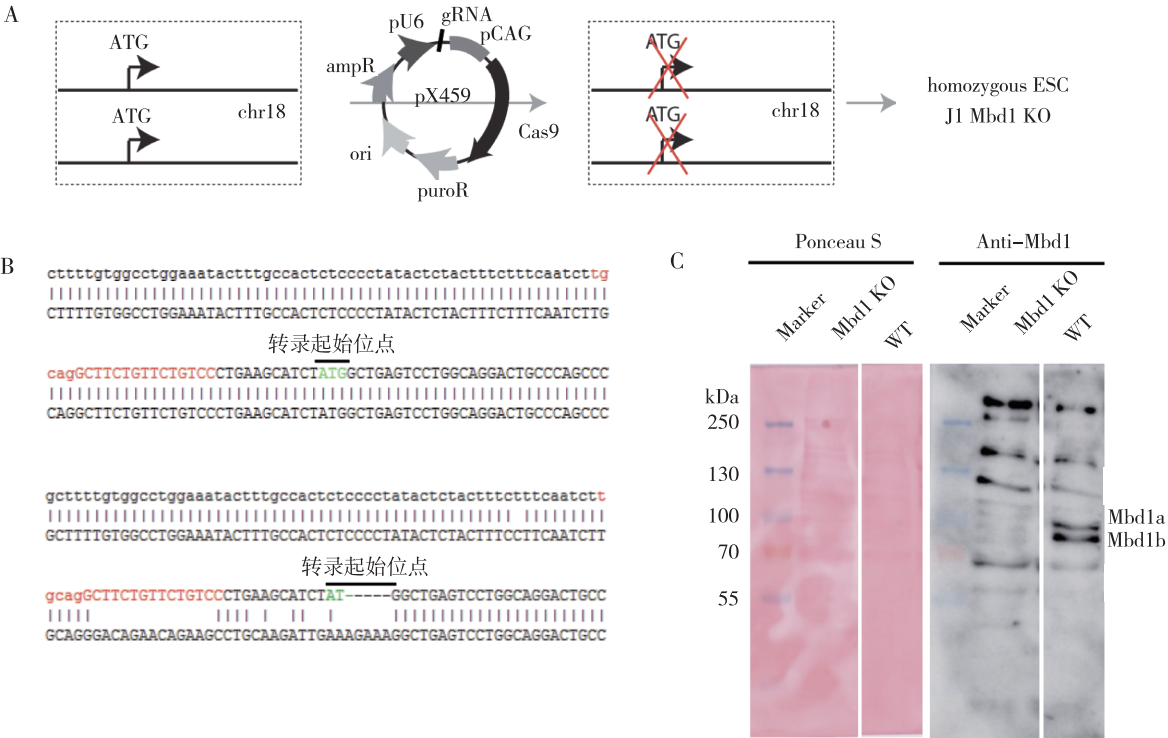


图 1 小鼠胚胎干细胞中 Mbd1 敲除的验证

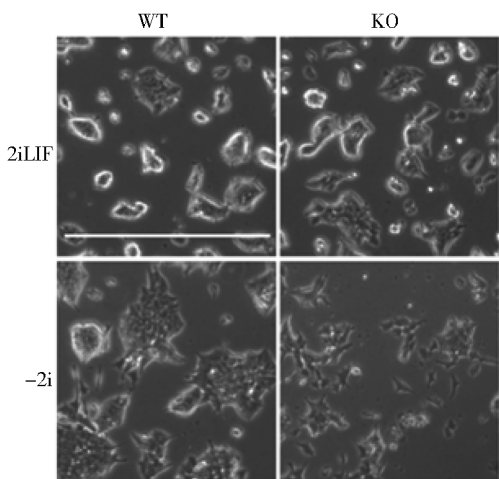
Fig. 1 The design of gRNA against Mbd1 and the efficiency of Mbd1 deletion in mESCs

2.2 敲除 Mbd1 的胚胎干细胞丧失了小鼠胚胎干细胞经典的 3D 克隆形态

为了验证 Mbd1 对小鼠胚胎干细胞多能性维持的作用, Mbd1 敲除和野生型小鼠胚胎干细胞分别在抑制剂 (2i) 存在 (2iLIF) 和缺少 (-2i) 情况下

培养, 培养 3 代后使用倒置相差显微镜观察 Mbd1 对胚胎干细胞克隆形态的影响, 结果显示, 在抑制剂存在的情况下, 野生型小鼠胚胎干细胞呈现 3D 克隆形态 (图 2 左上), 当抑制剂去除的情况下, 多数克隆呈现单层扁平形态, 但是部分克隆仍然保持

3D 克隆形态(图 2 左下)。和野生型胚胎干细胞相比较,敲除 Mbd1 的胚胎干细胞在抑制剂存在的情况下已经有部分克隆丧失了 3D 克隆形态(图 2 右上)。当抑制剂去除后,几乎所有的克隆丧失 3D 克隆形态,并且细胞表现出分化的状态(图 2 右下)。



注:标尺大小为 1 000 μm

图 2 敲除 Mbd1 小鼠胚胎干细胞及野生型小鼠胚胎干细胞的形态

Fig. 2 The effect of Mbd1 deletion on colony morphology of mESCs

2.3 敲除 Mbd1 对小鼠胚胎干细胞增殖的影响

为了验证 Mbd1 是否能够影响胚胎干细胞的增殖速度,实验使用敲除 Mbd1 和野生型胚胎干细胞,在无抑制剂的情况下培养,并且每隔 24 h 左右收集细胞使用细胞计数法检测细胞数量。如图 3 所示,与野生型胚胎干细胞比较,敲除 Mbd1 的胚胎干细胞增殖速率明显下降。实验重复 3 次,图中显示结果为 3 次的平均值和标准差。

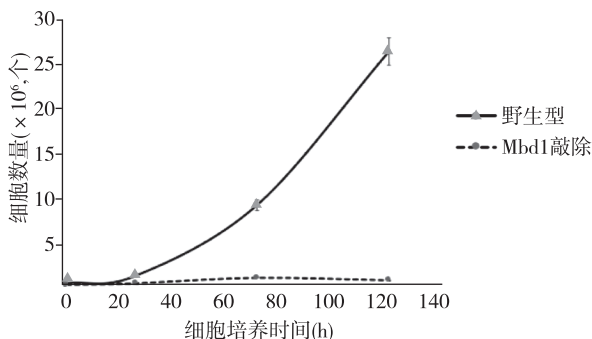


图 3 Mbd1 敲除和野生型胚胎干细胞增殖速率

Fig. 3 The effect of Mbd1 deletion on cell proliferation rate of mESCs

3 讨论

为了验证基因的功能,基因敲除的方法已经得到广泛应用^[14]。在众多的基因敲除方法中,Crispr/Cas9 技术是比较常用的方法^[15-16]。细胞瞬时表达 gRNA 和 Cas9 蛋白后,Cas9 蛋白被 gRNA 特异性的定位于 Mbd1 转录起始位点附近,然后 Cas9 蛋白利用其核酸内切酶的活性将双链 DNA 切开^[17]。断裂的 DNA 会依赖于细胞内的修复机制使得重新恢复到双链 DNA,但恢复过程中可能会有新的碱基掺入和缺失(随机修复),因此会出现一些和原基因组无法匹配的碱基,最终造成 Mbd1 基因的编码序列发生变化。基因转录起始位点被破坏后,合成的 mRNA 会寻找新的转录起始位点,因此,细胞内并不能表达完整的蛋白^[19]。Mbd1 在小鼠细胞中有不同的亚型,其分布和功能也不同^[13,18-19]。在小鼠细胞中 Mbd1 主要有 4 种亚型,分别为 Mbd1a、Mbd1b、Mbd1c 及 Mbd1d,不同亚型之间的功能区别主要取决于是否包含 CXXC3 结构域,完整的 Mbd1 蛋白预期大小为 69.62 kDa,缺失 CXXC3 的蛋白大小为 63.23 kDa^[18-20]。由于本研究中敲除的位点位于转录起始位点处,转录起始位点的改变会影响到所有 Mbd1 亚型的表达,因此,所有 Mbd1 亚型不存在于本研究获得的 Mbd1 敲除细胞中。

胚胎干细胞在体外培养过程中为了保持多能性,细胞内的通路蛋白起到了非常重要的作用。在众多的通路中,PD0325901 和 CHIR99021 抑制剂在胚胎干细胞体外培养中应用比较广泛,并且效果较好。这 2 个抑制剂分别作用于 FGF/MEK/ERK 及 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而保证了多能性基因的正常表达,维持了胚胎干细胞的多能性^[21]。在 2i + LIF 培养液中,Mbd1 的敲除轻微的影响到小鼠胚胎干细胞的克隆形态。但当细胞在 LIF 培养液中培养 3 代后,敲除 Mbd1 的小鼠胚胎干细胞多数为单层细胞,失去了小鼠胚胎干细胞经典的 3D 克隆形态^[22]。小鼠胚胎干细胞克隆形态的变化最终会影响到其多能性,因此推断 Mbd1 对于小鼠胚胎干细胞多能性维持具有重要作用。

多能性胚胎干细胞具有非常短的细胞周期^[23],因此其在体外扩增过程中具有非常高的增殖速率。本研究结果表明,敲除 Mbd1 的胚胎干细胞其增殖速率较野生胚胎干细胞明显下降,说明

Mbd1 对于胚胎干细胞的增殖具有非常重要的作用。Mbd1 敲除后小鼠胚胎干细胞增殖速率变慢,从而不能快速的在体外增殖,可能最终丧失了多能性。

综上所述,本研究成功获得了敲除 Mbd1 的胚胎干细胞系,并且发现胚胎干细胞中 Mbd1 缺失后,细胞的增殖速率较野生型胚胎干细胞慢,Mbd1 缺失后小鼠胚胎干细胞体外培养中经典的 3D 克隆形态消失,提示 Mbd1 对于胚胎干细胞多能性维持具有一定的作用。本研究结果也为胚胎干细胞分化为神经干细胞提供理论依据与实验基础。

4 参考文献

[1] SUGIMURA R, JHA D K, HAN A, et al. Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2017, 545 (7655):432 – 438.

[2] BIBEL M, RICHTER J, SCHRENK K, et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage[J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7 (9):1003 – 1009.

[3] BIBEL M, RICHTER J, LACROIX E, et al. Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2 (5):1034 – 1043.

[4] SCHIEBINGER G, SHU J, JAENISCH R, et al. Optimal-Transport analysis of single-cell gene expression identifies developmental trajectories in reprogramming [J]. *Cell*, 2019, 176 (6):1 – 16.

[5] SHIBA Y, FERNANDES S, ZHU W Z, et al. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts [J]. *Nature*, 2012, 489 (7514):322 – 325.

[6] KRIKS S, SHIM J W, PIAO J, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson’s disease[J]. *Nature*, 2011, 480 (7378):547 – 551.

[7] ZHU D, FANG J, LI Y, et al. Mbd3, a component of NuRD/Mi-2 complex, helps maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells by repressing trophectoderm differentiation[J]. *PLoS One*, 2009, 4 (11):e7684.

[8] DOS SANTOS R L, TOSTI L, RADZISHEUSKAYA A, et al. MBD3/NuRD facilitates induction of pluripotency in a context-dependent manner[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15 (3):102 – 110.

[9] RAIS Y, ZVIRAN A, GEULA S, et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. [J]. *Nature*, 2013, 502 (7469):65 – 70.

[10] LU Y, LOH YH, LI H, et al. Alternative splicing of MBD2 supports self-renewal in human pluripotent stem

cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15 (1):92 – 101.

[11] LI X, BARKHO B Z, LUO Y, et al. Epigenetic regulation of the stem cell mitogen Fgf-2 by Mbd1 in adult neural stem/progenitor cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (41):27644 – 27652.

[12] ZHAO X, UEBA T, CHRISTIE B R, et al. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100 (11):6777 – 6782.

[13] ZHANG P, RAUSCH C, HASTERT F D, et al. Methyl-CpG binding domain protein 1 regulates localization and activity of Tet1 in a CXXC3 domain-dependent manner [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 (12):7118 – 7136.

[14] NEMUDRYI A A, VALETIDINOVA K R, MEDVEDEV S P, et al. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery [J]. *Acta Naturae*, 2014, 6 (3):19 – 40.

[15] WANG H, LA RUSSA M, QI L S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond [J]. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85:227 – 264.

[16] HRYHOROWICZ M, LIPIN SKI D, ZEYLAND J, et al. CRISPR/Cas9 immune system as a tool for genome engineering[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2017, 65 (3):233 – 240.

[17] JIANG F, DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms [J]. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46:505 – 529.

[18] FUJITA N, TAKEBAYASHI S, OKUMURA K, et al. Methylation-mediated transcriptional silencing in euchromatin by methyl-CpG binding protein MBD1 isoforms [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19 (9):6415 – 6426.

[19] FUJITA N, SHIMOTAKE N, OHKI I. Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1 mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1 [J]. 2000, 20 (14):5107 – 5118.

[20] JØRGENSEN H F, BEN-PORATH I, BIRD A P. Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (8):3387 – 3395.

[21] DOBLE B W, WOODGETT J R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116 (7):1175 – 1186.

[22] GINIS I, LUO Y, MIURA T, et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells [J]. *Dev Biol*, 2004, 15:269 (2):360 – 80.

[23] WHITE J, DALTON S. Cell cycle control of embryonic stem cells [J]. *Stem Cell Rev*. 2005, 1 (2):131 – 138.

(2019-03-20 收稿,2019-06-06 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳