

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810219195.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 7 月 29 日

[11] 公开号 CN 101492677A

[22] 申请日 2008.11.18

[21] 申请号 200810219195.3

[71] 申请人 中国科学院广州生物医药与健康研究院

地址 510663 广东省广州市东圃科学城国际  
企业孵化器 A 区 3 楼

[72] 发明人 裴端卿 张小飞 张娟 王涛

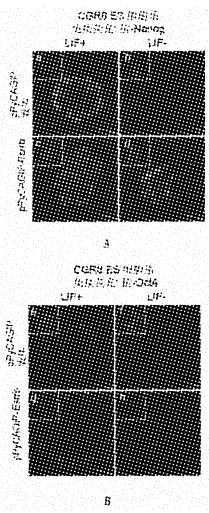
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 4 页

[54] 发明名称

雌激素相关受体 2 在维持小鼠胚胎干细胞多能性中的应用

[57] 摘要

本发明公开了用小鼠 *Esrrb* (雌激素相关受体 2) 基因的载体构建方法及其在小鼠胚胎干细胞研究中的用途。小鼠缺失 *Esrrb* 会导致上胚层的干细胞分化并且胚胎发育出现不正常,胚胎会在发育的 10.5 天死亡,说明 *Esrrb* 对于维持哺乳动物的胚胎正常发育起着非常重要的作用。本发明中,*Esrrb* 作为转录因子,可以不依赖于 LIF (白细胞介素抑制因子) 维持胚胎干细胞多能性的作用。该重组体的构建途径及在胚胎干细胞中的应用,对研究其它转录因子如何在胚胎干细胞中发挥作用提供了借鉴意义。



1. Esrrb 基因的用途,其在转染入胚胎干细胞并表达后可以使得胚胎干细胞不依赖于 LIF 而维持其多能性。
2. 权利要求 1 所述的用途,其中 Esrrb 基因来源于哺乳动物。
3. 权利要求 2 所述的用途,其中 Esrrb 基因来源于小鼠。
4. 权利要求 1 所述的用途,其中胚胎干细胞为小鼠胚胎干细胞。
5. 权利要求 2 所述的用途,其中所述小鼠胚胎干细胞为 CGR8 ES 或者 E14T ES。
6. 权利要求 1 所述的用途,其中转染是通过脂质体转染、基因枪、病毒(例如腺病毒)介导的转染、电穿孔等进行的。
7. 使用 Esrrb 基因维持胚胎干细胞多能性的方法,所述方法包括
  - (a) 构建在 ES 细胞中表达的包含 Esrrb 基因的载体;
  - (b) 将(a)中构建的载体转染进胚胎干细胞中;
  - (c) 在适合于胚胎干细胞生长的条件下培养步骤(b)中得到的胚胎干细胞;
  - (d) 去掉维持胚胎干细胞所需的白细胞介素生长因子;
  - (e) 检测胚胎干细胞中维持多能性和发生分化的标志性基因。
8. 权利要求 7 所述的方法,其还包括步骤:
  - (f) 对内源维持干细胞多能性的因子进行检测。
9. 权利要求 7 或 8 所述的方法,其中包含 Esrrb 基因的载体是使用 pPyCAGIP 载体构建的。
10. 权利要求 7 或 8 所述的方法,其中使用的 Esrrb 基因是小鼠 Esrrb 基因。
11. 权利要求 7 或 8 所述的方法,其中所使用的胚胎干细胞是小鼠胚胎干细胞。
12. 权利要求 10 所述的方法,其中所述小鼠胚胎干细胞为 CGR8 ES 或者 E14T ES。
13. 权利要求 7 所述的方法,其中所使用的检测方法包括对基因的实时定量 PCR 检测。
14. 权利要求 7 所述的方法,其中所检测的多能性标志性基因包括 Nanog 或 Rex-1 等,发生分化的标志性基因包括 FGF5 或 T 等。
15. 权利要求 8 所述的方法,其中所述对内源基因的检测为免疫荧光反应检测。
16. 权利要求 8 所述的方法,其中所检测的维持干细胞多能性的因子为 Nanog 和 Oct4 等。

## 雌激素相关受体 2 在维持小鼠胚胎干细胞多能性中的应用

## 技术领域：

本发明涉及 Esrrb（雌激素相关受体 2）的构建表达载体以及在胚胎干细胞中的用途，所述 Esrrb 是一个雌激素相关受体家族受体，在胚胎发育过程中起重要作用的转录因子。

## 背景技术：

胚胎干细胞 (Embryonic stem cells, ES 细胞)，是一类来源于哺乳动物胚胎发育早期的胚泡 (Blastocyst) 期的内细胞团 (ICM-Inner cell mass) 的多能性细胞，重要特性之一就是它仍然具有随着发育成三个完整的胚层的能力，这也是胚胎干细胞能应用于临床的基础。因此，基于干细胞这种全能性或者多能性特性的疗法是现在许多未解决的疾病（例如帕金森氏病）的一种有前景的解决方案。但是，在将人的 ES 细胞安全和有效地应用到治疗人类疾病之前，我们必须克服人 ES 带来的很多难以克服的障碍。目前，ES 细胞的基础生物学研究已经提供了一些针对这些障碍的相对比较合理的解决方式，例如将维持在多能性状态下的 ES 细胞可以在特定的培养条件下诱导分化成特定的其他细胞类型。

干细胞的多能性以及自我更新能力的维持，需要多条信号通路以及各种转录因子来协调。其中，维持小鼠 ES 细胞的多能性的转录因子包括 Oct4、Sox2、FoxD3 和 Nanog (Pan, G., 等人, (2006) *Faseb J* 20(10), 1730-1732; Boyer, L. A., 等人, (2005) *Cell* 122(6), 947-956; Mitsui, K., (2003) *Cell* 113(5), 631-642; Chambers, I., (2003) *Cell* 113(5), 643-655)。近期，大规模的生物学工具（如微阵列核蛋白组，RNA 干扰等）对于干细胞的分析，生成了大量关于干细胞多能性调节因子的数据 (Boyer, L. A., 等人, (2005) *Cell* 122(6), 947-956; Assou, S. 等人 (2007) *Stem Cells* 25(4), 961-973; Orkin, S. H. (2005) *Cell* 122(6), 828-830; Wang J. 等人 (2006) *Nature* 444(7117), 364-368; Ivanova, N, 等人, (2006) *Nature* 442(7102), 533-538)，但是关于干细胞维持多能性及自我更新的分子机制还不是很清楚。现有技术中已经证明了在干细胞培养基中添加 LIF（白细胞介素生长因子）来维持干细胞的多能性。

作为雌激素相关受体家族的一员，Esrrb 的缺失会引起干细胞的分化和胚胎的不正常发育 (Mitsunaga K 等人, (2004) *Mech Dev* 121(3), 237-246)。RNAi 实验发现，和干扰了 Nanog 的表达一样，干扰了 Esrrb 表达的干细胞在 LIF 存在的情况下也会分化，并且这种分化可以被过表达的 Nanog 所部分挽回 (Ivanova, N, 等人, (2006) *Nature* 442(7102), 533-538)。在蛋白水平上，通过 Nanog 富集的干细胞裂解液中的复合体中也包括 Esrrb，这些结果都表明了 Esrrb 在维持胚胎干细胞中所起的重要作用 (Wang J. 等人 (2006) *Nature* 444(7117), 364-368)。并且这些结果可能说明 Esrrb 可能是独立于 Nanog 而存在的另外一条可以维持胚

胎干细胞多能性的信号通路。在此我们证明了 *Esrrb* 在没有 LIF 的情况下仍然能维持胚胎干细胞的多能性和自我更新。这可以为干细胞的培养提供一条新的途径，而且由于替换掉了昂贵的 LIF，使得干细胞的培养更加经济。

#### 发明内容：

在本发明中，发明人将小鼠 *Esrrb* 基因（序列见 SEQ ID NO: 1）的 CDS 构建到 pPYCAGIP 载体中，以便验证 *Esrrb* 在小鼠胚胎干细胞中的作用。

令人惊讶的，发明人发现，当小鼠 *Esrrb* 在胚胎干细胞系 CGR8 及 E14T 中，建立稳定转染的细胞株，与空载体 pPYCAGIP 形成的稳定转染细胞株相比，可以不依赖于 LIF（白细胞介素抑制因子）而维持胚胎干细胞的多能性和自我更新。使用我们所构建的 *Esrrb* 及其稳定转染的干细胞表达株，可以丰富干细胞研究的研究手段和材料，将更好的研究胚胎干细胞多能性和自我更新维持的分子机制及其丰富整个调控网络。

#### 附图说明：

图 1：显示了将 pPyCAGIP-*Esrrb* 及其 pPyCAGIP 载体转入胚胎干细胞 CGR8 后，筛选出的稳定转染表达株，在 LIF 存在（LIF+）或者不存在（LIF-）的情况下的细胞形态。

图 2：显示了将 pPyCAGIP-*Esrrb* 及其 pPyCAGIP 载体转入胚胎干细胞 E14T 后，筛选出的稳定转染表达株，在 LIF 存在（LIF+）或者不存在（LIF-）的情况下的细胞形态。

图 3：显示了将 pPyCAGIP-*Esrrb* 及其 pPyCAGIP 载体转入胚胎干细胞 CGR8 后，筛选出的稳定转染表达株，在 LIF 存在（LIF+）或者不存在（LIF-）的情况下，用 AP（碱性磷酸酶）进行染色分析的结果。

图 4：显示了将 pPyCAGIP-*Esrrb* 及其 pPyCAGIP 载体转入胚胎干细胞 E14T 后，筛选出的稳定转染表达株，在 LIF 存在（LIF+）或者不存在（LIF-）的情况下，用 AP（碱性磷酸酶）进行染色分析的结果。

图 5：显示了将 pPyCAGIP-*Esrrb* 及其 pPyCAGIP 载体转入胚胎干细胞 CGR8 后，筛选出的稳定转染表达株，在 LIF 存在（LIF+）或者不存在（LIF-）的情况下，提取其总 RNA 并反转录后，用实时定量 PCR 分析干细胞多能性标志性因子（*Nanog* 和 *Rex1*）及分化因子（*FGF5* 和 *T*）的结果。

图 6：显示了将 pPyCAGIP-*Esrrb* 及其 pPyCAGIP 载体转入胚胎干细胞 E14T 后，筛选出的稳定转染表达株，在 LIF 存在（LIF+）或者不存在（LIF-）的情况下，提取其总 RNA 并反转录后，用实时定量 PCR 分析干细胞多能性标志性因子（*Nanog* 和 *Rex1*）及分化因子（*FGF5* 和 *T*）的结果。

图 7：显示了将 pPyCAGIP-*Esrrb* 及其 pPyCAGIP 载体转入胚胎干细胞 CGR8 后，筛选出的稳定转染表

达株，在 LIF 存在（LIF+）或者不存在（LIF-）的情况下，用免疫荧光技术检测干细胞多能性标志性因子（Nanog 和 Oct4）的蛋白表达情况。

具体实施方式：

如上文所述，本文中使用的 Esrrb 蛋白质雌激素相关受体家族的一员，在 Esrrb 缺失的情况下会引起干细胞的分化和胚胎的不正常发育（Mitsunaga K 等人，（2004） *Mech Dev* 121(3),237-246），在维持胚胎干细胞中所起的重要作用（Wang J.等人(2006) *Nature* 444(7117), 364-368）。因此 Esrrb 可能是独立于 Nanog 而存在的另外一条可以维持胚胎干细胞多能性的信号通路。本文中使用的 Esrrb 基因可以来自包含其的任何动物，优选来自哺乳动物，最优选来自小鼠。

本文中使用的胚胎干细胞可以是现有技术中已经分离的任何胚胎干细胞，优选来自哺乳动物的胚胎干细胞，优选来自小鼠，最优选是 CGR8 ES 或者 E14T ES。

可以通过本领域已知的任何手段转染胚胎干细胞，例如脂质体转染、基因枪、病毒（例如腺病毒）介导的转染、电穿孔等。优选地使用脂质体转染技术。

本发明还涉及使用 Esrrb 基因维持胚胎干细胞多能性的方法，所述方法包括：

- (a) 构建在 ES 细胞中表达的包含 Esrrb 基因的载体；
- (b) 将 (a) 中构建的载体转染进胚胎干细胞中；
- (c) 在适合于胚胎干细胞生长的条件下培养步骤 (b) 中得到的胚胎干细胞；
- (d) 去掉维持胚胎干细胞所需的白细胞介素生长因子；
- (e) 检测胚胎干细胞中维持多能性和发生分化的标志性基因。

在一个实施方案中，上述方法还包括：(f) 对内源维持干细胞多能性的因子进行检测。

可以通过本领域已知的任何方法构建能在 ES 细胞中表达的包含 Esrrb 基因的载体，优选使用本领域熟知的胚胎干细胞表达载体 pPyCAGIP（来自 Ian Chambers 教授，爱丁堡大学干细胞研究所）。

本文所使用的胚胎干细胞的生长条件是本领域技术人员熟知的，例如 W. French Anderson 等人，HANDBOOK OF STEM CELLS，卷 2 中所述的那些培养方法以及培养条件。

本文所使用的检测基因的方法包括本领域已知的任何方法，如 PCR、实时定量 PCR、内源基因的免疫荧光反应检测等，这些方法在 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, 分子克隆实验指南，第 3 版（2002）；CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 等人编著(1987))等多种参考文献中均有详细的描述。

实施例

下列实施例举例了发明人的标准实验室实践，用于示例本发明的模式，而不应将本发明理解为限于这些实施例的范围。这些实施例。根据本文公开和本领域技术人员的普遍水平，技术人员将理解下列仅用于示例，可以在不超过本发明的范围内进行各种变动、修饰和改造。其中所涉及的技术，除非特别说明，均是本领域技术人员熟知的分子生物学、细胞生物学、生物化学等各个领域的常规技术。

#### 实施例 1：ES 细胞系的培养

小鼠 ES 细胞（CGR8 ES 及 E14T ES）培养在 0.1%明胶包被基质上，用添加了 20%胎牛血清 FBS（GIBCO）、100mM 非必需氨基酸（Invitrogen, CA）、0.55mMβ-巯基乙醇（Sigma, St.Louis, MO）、2mM L-谷氨酸（Invitrogen, CA），以及 1000 单位/ml 人重组 LIF（CHEMICON,CA）的培养基在 37℃培养箱中培养（参见 Pan Guangjing 等人, (2006) Faseb J 20(10), 1730-1732、Mitsui K 等人, (2003) Cell 113(5), 631-642、Chambers, I 等人, (2003) Cell 113(5), 643-655、Pan, G 等人, (2005) J Biol Chem 280(2), 1401-1407）。

#### 实施例 2：Esrrb 载体(SEQ ID NO: 1)及在 ES 细胞中表达 Esrrb 载体（pPyCAGIP-Esrrb）的构建

用终体积为20ul的反应体系逆转录2ug的总RNA（参见Pan, G等人, (2006) Faseb J 20(10), 1730-1732），得到cDNA文库。利用表1的引物扩增小鼠Esrrb片段，然后用琼脂糖凝胶电泳回收。

表 1：克隆 Esrrb 片段的引物：

| SEQ ID NO    | 引物名称     | 序列（5'~3'）                  |
|--------------|----------|----------------------------|
| SEQ ID NO: 3 | Esrrb-正向 | accatggctgctgaggagcggcacat |
| SEQ ID NO: 4 | Esrrb-反向 | tcacaccttggcctccagcatctcca |

用于产生ES稳定遗传系的质粒通过在pPyCAGIP载体的多克隆位点pme I 插入PCR片段构建的，即在 37℃下通过pme I 酶切pPyCAGIP载体4小时，然后将从胚胎干细胞cDNA中扩增的小鼠Esrrb片段，在连接酶的存在下16℃连接4小时，得到载体pPyCAGIP-Esrrb。

#### 实施例3：构建稳定转染的细胞系并观察其形态

用含有 $10^3$ u/ml LIF（Chemicon）的ES培养基培养的无滋养层的ES细胞（CGR8及E14T）种植在6cm培养皿中，将表达pPyCAGIP和pPyCAGIP-Esrrb载体各转染2ug。转染24小时后，细胞按1：100稀释，接种到新的10cm培养皿中用于筛选。筛选时在培养基中加入嘌呤霉素（2ug/ml, Invitrogen, CA）。经过10天的筛选，在Olympus倒置显微镜下观察转染后的ES细胞，如图2所示，整合了pPyCAGIP-Esrrb载体的稳定转染ES细胞系同整合了PyCAGIP空载体的稳定转染ES细胞系，都表现出典型的ES细胞表型，并且均表现出很强的AP（碱性磷酸酶）阳性反应。然而，在去掉LIF（白细胞介素生长因子）的情况下，培养6天后发现，整合了PyCAGIP空载体的稳定转染ES细胞系发生了很明显的分化，并且AP呈现明显的阴性反应；而整合了pPyCAGIP-Esrrb载体的稳定转染ES细胞系仍然表现出典型的ES细胞表型，并且表现出很强的AP阳性

反应。

一方面裂解细胞用于进一步的RT-PCR分析，另一方面扩大细胞，并在有玻片的培养皿中培养以备免疫荧光分析。所有的细胞培养都在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中进行。

实施例4：对于细胞维持多能性和发生分化的标志性基因的实时定量PCR分析

用INVITROGEN公司的Trizol裂解液，根据其说明书，将上述稳定整合了pPyCAGIP与pPyCAGIP-Esrrb载体的ES细胞的稳定转染株裂解，提取细胞的总RNA。

用终体积为20ul的反应体系逆转录2ug的总RNA（参见Pan, G等人, (2006) Faseb J 20(10), 1730-1732）。

按照生产商的标准规程，用SYBR Premix ExTaq试剂盒(DRR041A, TAKARA)进行PCR反应。PCR用25ul的总体积运行45个循环。使用的引物见表2:

表2：实时定量PCR所用的标志物引物

| 名称    | 正向引物 (5'-3')                                 | 反向引物 (5'-3')                                |
|-------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Nanog | Ctcaagtcctgaggctgaca<br>(SEQ ID NO:5)        | Tgaaacctgtccttgagtgc<br>(SEQ ID NO:6)       |
| Rex-1 | Cagccagaccaccatctgtc<br>(SEQ ID NO:7)        | Gtctccgatttgcatactctctg<br>(SEQ ID NO:8)    |
| FGF5  | Aaagtcaatggctcccacgaa<br>(SEQ ID NO:9)       | Cttcagtcgtacttcactgg<br>(SEQ ID NO:10)      |
| T     | Ctgtgactgcctaccagaatgaggag<br>(SEQ ID NO:11) | Ggtcgtttctttctttggcatcaag<br>(SEQ ID NO:12) |

如图5及图6所示，在LIF存在的情况下，整合了pPyCAGIP-Esrrb载体的稳定转染ES细胞系同整合了pPyCAGIP空载体的稳定转染ES细胞系相比较，其干细胞多能性标志性因子（Nanog和Rex1）及分化标志性因子（FGF5和T）没有显著性差异，说明整合了pPyCAGIP-Esrrb载体的稳定转染ES细胞系能很好的维持干细胞的特性。在LIF不存在的情况下，整合了pPyCAGIP空载体的稳定转染ES细胞系中，多能性标志性因子（Nanog和Rex1）的表达大幅度降低，分化因子（FGF5和T）的表达表现出很强的增加；而整合了pPyCAGIP-Esrrb载体的稳定转染ES细胞系仍表现出很高水平的多能性标志性因子（Nanog和Rex1）的表达及很低分化因子（FGF5和T）的表达。这些都说明，在不存在LIF的情况下，Esrrb仍然可以维持胚胎干细胞的多能性。

实施例5：免疫荧光反应检测ES细胞稳定转染株内源Nanog和Oct4的表达

首先将分别整合了pPyCAGIP空载体及pPyCAGIP-Esrrb载体的ES稳定转染细胞株，种于铺有玻璃片的24孔板中进行培养，培养24小时后将细胞培养基吸掉，用PBS清洗1次，加入适量含有4%多聚甲醛的固定液，室温固定30分钟；然后用含有2mg/ml甘氨酸的PBS溶液，室温放置5分钟淬灭醛基；再吸掉固定液，加入还有0.2% Triton X-100的PBS，室温放置10分钟以透化细胞，PBS洗2次；然后用含有10%正常羊血清（Normal Goat Serum, NGS）的PBS室温封闭60分钟；再用稀释到含有2%NGS的PBS中的一抗室温孵育60分钟或者4℃过夜；用洗液（1%BSA融于PBS中）摇荡清洗玻片5次，每次5分钟；将TRITC标记的二抗稀释到含有2%NGS的PBS中，室温孵育60分钟；用洗液清洗玻片5次，每次5分钟；用含有0.1-1mg/ml DAPI的PBS染细胞核1分钟放置于PBS中；用封片液或者90%的甘油封片后，用LEICA激光共聚焦显微镜观察分析。

从图7（A和B）中可以看出，在LIF存在的情况下，整合了pPyCAGIP-Esrrb载体的稳定转染ES细胞系同整合了pPyCAGIP空载体的稳定转染ES细胞系相比较，其干细胞多能性标志性因子（Nanog和Oct4）没有显著性差异，都具有很强的表达，证明整合了pPyCAGIP-Esrrb载体的稳定转染ES细胞系能很好的维持干细胞的特性。在LIF不存在的情况下，整合了pPyCAGIP空载体的稳定转染ES细胞系中，失去了多能性标志性因子（Nanog和Oct4）的表达；而整合了pPyCAGIP-Esrrb载体的稳定转染ES细胞系仍表现出很高水平的多能性标志性因子（Nanog和Rex1）的表达。

通过以上实验可以看出，我们所构建的pPyCAGIP-Esrrb能够在不依赖于LIF的情况下而维持小鼠胚胎干细胞的多能性，可以作为一种全新的研究工具和手段来研究维持干细胞多能性的调控网络。

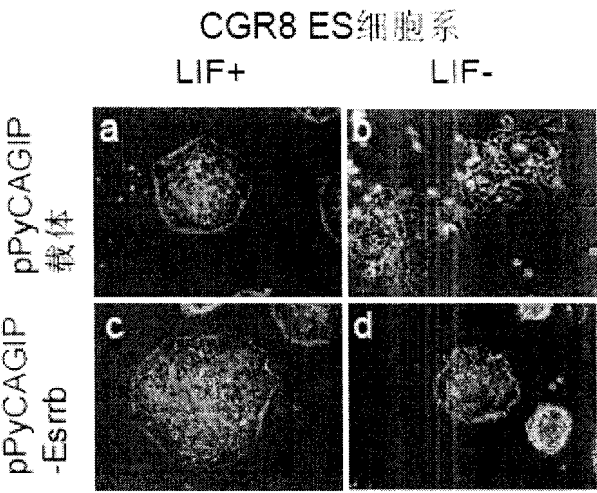


图 1

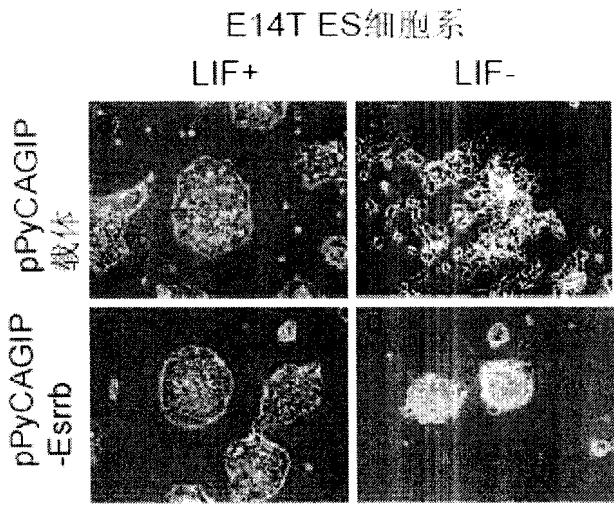


图 2

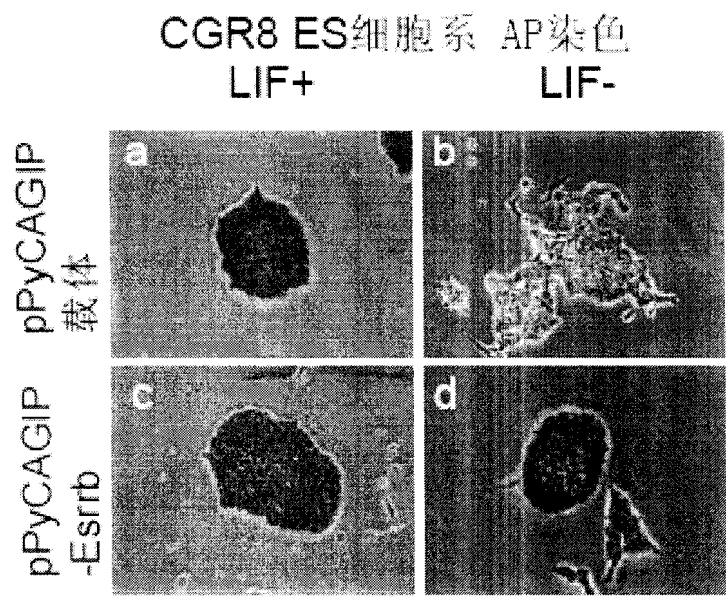


图 3

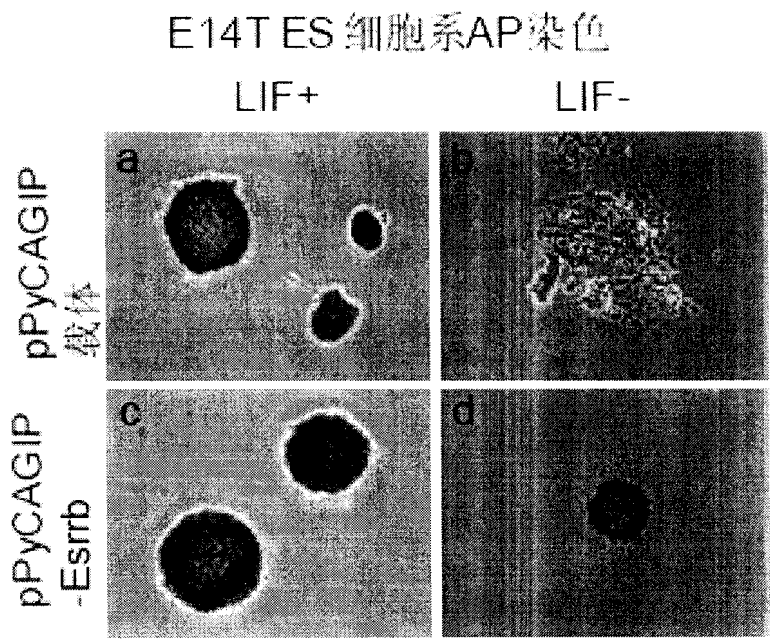


图 4

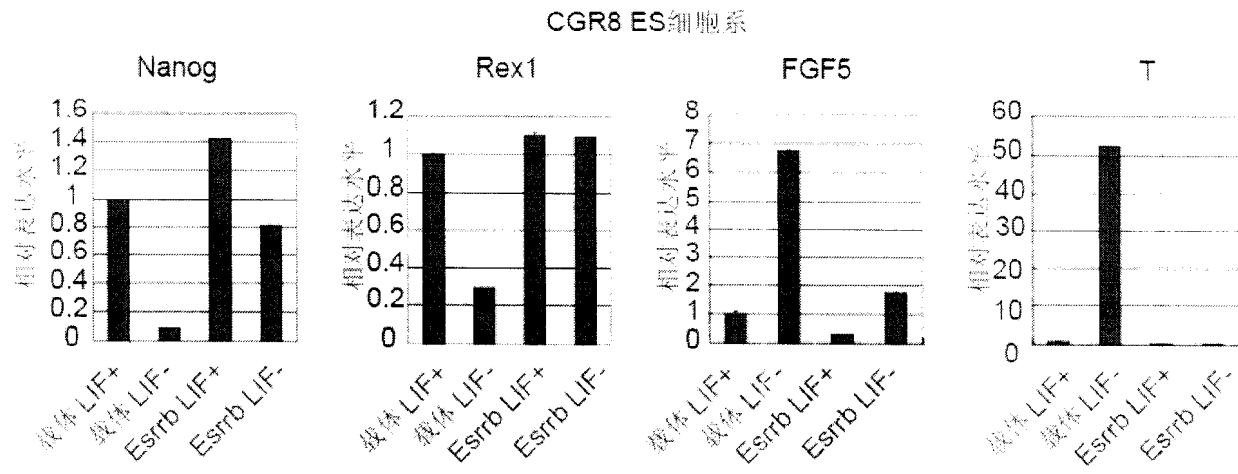


图 5

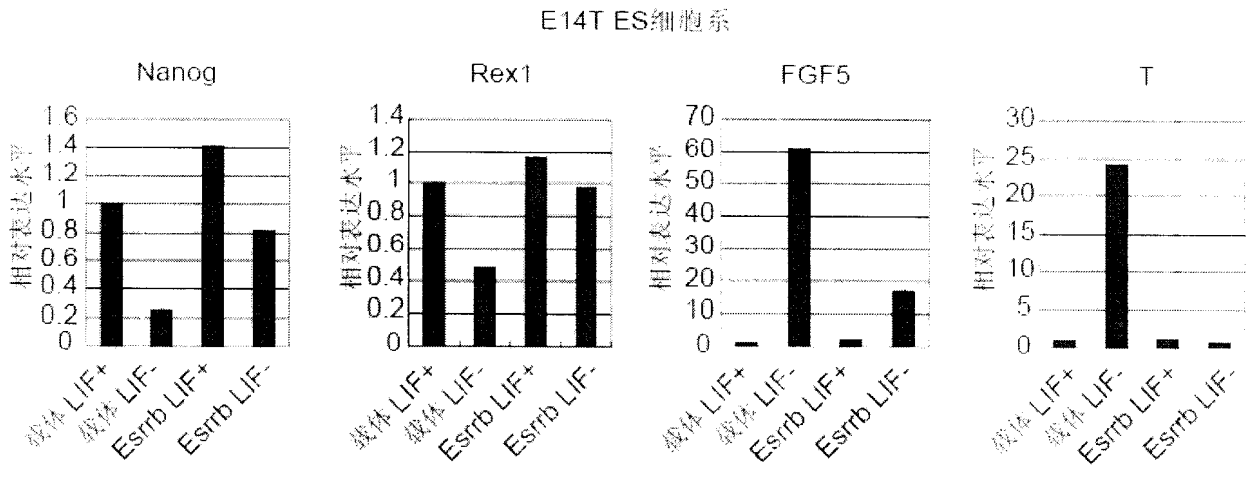
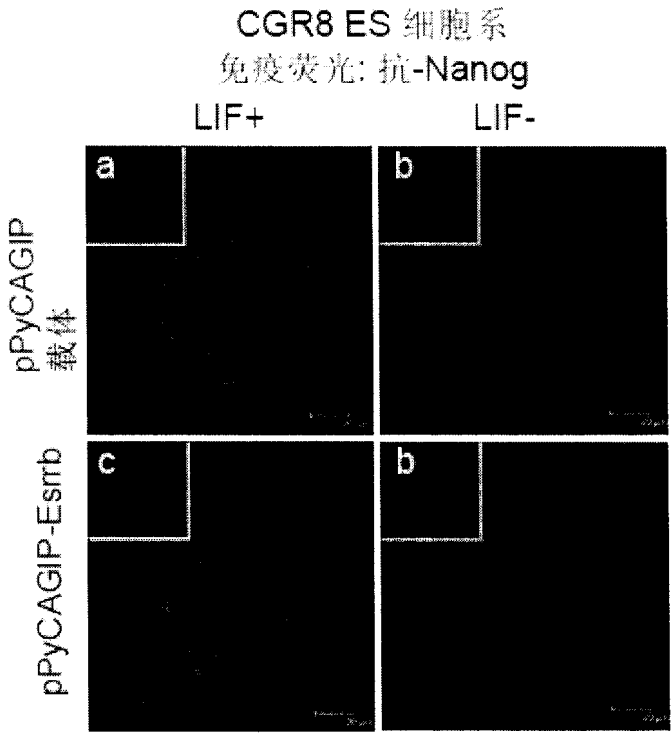
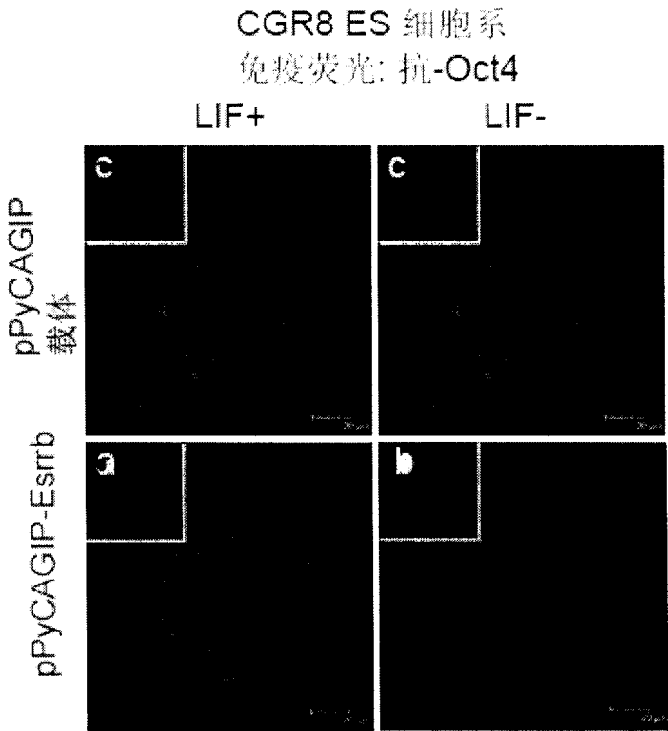


图 6



A



B

图 7

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 雌激素相关受体2在维持小鼠胚胎干细胞多能性中的应用                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101492677A</a>                   | 公开(公告)日 | 2009-07-29 |
| 申请号            | CN200810219195.3                               | 申请日     | 2008-11-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国科学院广州生物医药与健康研究院                              |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中国科学院广州生物医药与健康研究院                              |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中国科学院广州生物医药与健康研究院                              |         |            |
| [标]发明人         | 裴端卿<br>张小飞<br>张娟<br>王涛                         |         |            |
| 发明人            | 裴端卿<br>张小飞<br>张娟<br>王涛                         |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/12 C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/53          |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了用小鼠Esrrb(雌激素相关受体2)基因的载体构建方法及其在小鼠胚胎干细胞研究中的用途。小鼠缺失Esrrb会导致上胚层的干细胞分化并且胚胎发育出现不正常，胚胎会在发育的10.5天死亡，说明Esrrb对于维持哺乳动物的胚胎正常发育起着非常重要的作用。本发明中，Esrrb作为转录因子，可以不依赖于LIF(白细胞介素抑制因子)维持胚胎干细胞多能性的作用。该重组体的构建途径及在胚胎干细胞中的应用，对研究其它转录因子如何在胚胎干细胞中发挥作用提供了借鉴意义。

