

# Cdyl基因敲除的小鼠诱导多能干细胞系的建立及鉴定

胡晓俊<sup>1</sup>, 赖文玉<sup>2</sup>, 万利<sup>1</sup>, 王涛<sup>1</sup>, 张秀明<sup>1</sup>, 李伟强<sup>1</sup>, 项鹏<sup>1\*</sup>

(1.中山大学干细胞与组织工程中心,广东广州 510080;2.中山大学附属第二医院 儿科,广东广州 510120)

**摘要:**【目的】建立 Cdyl 基因敲除的小鼠诱导多能干细胞系(iPSC)。【方法】通过组织块贴壁法培养 Cdyl<sup>-/-</sup>的胚胎成纤维细胞(MEF)。将 pMx-Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 和 hrGFP 五种质粒分别转染 Plat-E 细胞,收集病毒上清,感染 Cdyl<sup>-/-</sup>MEF获得 Cdyl<sup>-/-</sup> iPS,并对 Cdyl<sup>-/-</sup> iPS 细胞的分子标记及体内外分化能力进行检测。【结果】取 Cdyl<sup>-/-</sup>胎鼠皮肤,培养得到增殖旺盛的 Cdyl<sup>-/-</sup> MEF。成功包装逆转录病毒并感染 Cdyl<sup>-/-</sup>MEF,得到胚胎干细胞样的 Cdyl<sup>-/-</sup> iPS 细胞。该细胞表达 AKP、Oct3/4、SSEA-1,在体内外可以分化为三胚层的细胞类型。【结论】Cdyl<sup>-/-</sup> iPS 细胞具有自我更新和多向分化能力的特性。Cdyl<sup>-/-</sup> iPS 细胞系的建立为研究 Cdyl 在小鼠早期胚胎发育中的功能提供一个良好的细胞模型。

**关键词:** 小鼠诱导多能干细胞; Cdyl; 基因敲除; 小鼠胚胎成纤维细胞

**中图分类号:** R329.2+1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2011)02-0146-09

## Establishment and Characterization of Induced Pluripotent Stem Cell Line from Cdyl Knockout Mice

HU Xiao-jun<sup>1</sup>, LAI Wen-yu<sup>2</sup>, WAN Li<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, ZHANG Xiu-ming<sup>1</sup>, LI Wei-qiang<sup>1</sup>, XIANG Peng<sup>1\*</sup>

(1.Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】This study was designed to establish induced pluripotent stem cell line from Cdyl knockout mice. 【Methods】 Cdyl<sup>-/-</sup> MEF were attained by adhesion culture of E18.5 embryonic tissue. pMx-Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4, and hrGFP plasmid were transfected into Plat-E cells, respectively. Then virus-containing supernatants were harvested to infect Cdyl<sup>-/-</sup>MEF. The characteristics of Cdyl<sup>-/-</sup> iPS were analyzed by detection of pluripotent marker expression and differentiation capacity in vivo and in vitro. 【Results】 The Cdyl<sup>-/-</sup> iPS cell colonies were emerged 5 days after Cdyl<sup>-/-</sup> MEF were infected with virus-containing supernatants. Cdyl<sup>-/-</sup>iPS expressed AKP, Oct3/4, SSEA-1 and were able to differentiate into cell types of three germ layers. 【Conclusion】 Cdyl<sup>-/-</sup> iPS cell line was successfully established and provides a valuable model for studying Cdyl function in mouse embryonic development.

**Key words:** induced pluripotent stem cells; Cdyl; knockout; mouse embryonic fibroblasts

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(2): 146-154]

1999年 Lahn BT 在人类 Y 染色体上发现一组基因,命名为 Chromodomain Y(CDY)。CDY 常染色体的同源基因在人类中命名为 CDYL,在小鼠中命名为 Cdyl。进化上的研究表明人 Y 染色体上的 CDY 基因是通过 CDYL mRNA 转座而来,再在 Y 染色体上进行复制扩增。小鼠 Y 染色体上无 CDY 基因。2002, Lahn BT 研究提示 CDYL 在精子发生

中发挥重要作用<sup>[1-4]</sup>。本实验室前期已经成功建立 Cdyl 基因敲除的小鼠模型,并且发现 Cdyl<sup>-/-</sup>小鼠出生后的短时间内死亡。由于一直未能成功建立 Cdyl<sup>-/-</sup>小鼠胚胎干细胞系,阻碍了 Cdyl 在小鼠胚胎发育中的功能研究。2006 年 3 月,日本学者 Yamanaka 等首次通过导入 4 种基因 Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4,将分化成熟的小鼠成纤维细

收稿日期:2011-01-07

基金项目:广东省自然科学基金博士启动(9451008901002230);国家自然科学基金(81000150)

作者简介:胡晓俊,硕士研究生,从事 Cdyl 基因功能研究,E-mail: xiaojunhu1985@163.com; \* 通信作者:项鹏,教授,博士生导师,E-mail: xiangp@mail.sysu.edu.cn

胞,重新诱导成为具有胚胎干细胞特性的多能干细胞,将其命名为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)。2007年11月,日本和美国研究人员分别将人的成纤维细胞诱导为人类的iPS细胞。这些研究证实了已分化的细胞可以通过少数几个因子的外源导入而被重编程到具有多能性的状态。iPS细胞在形态学、基因表达和表观遗传等方面都与ES细胞十分相似<sup>[5-7]</sup>。本研究拟应用iPS技术建立Cdy1<sup>-/-</sup> iPS细胞系,为Cdy1在小鼠胚胎发育中的功能研究提供一个良好的细胞模型。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

Plat-E 细胞购于 ATCC 公司;pMx-Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 和 hrGFP 质粒购于 Addgene 公司;0.22  $\mu\text{m}$  和 0.45  $\mu\text{m}$  滤器购于 Millipore 公司;Opti-MEM、DMEM 培养基购于 Gibco 公司;小鼠白血病抑制因子(mLIF)购于 Chemicon 公司;胰蛋白酶购于 Sigma 公司;胎牛血清 FBS 购于 Hyclone 公司;Oct3/4、SSEA-1 抗体购于 Santa Cruz 公司;AFP 和  $\alpha$ -SMA、Tuj-1 购于 R&D 公司。

### 1.2 原代成纤维细胞的分离培养与基因型鉴定

取怀孕 18.5 d Cdy1<sup>+/-</sup>母鼠一只,断颈处死,取出胚胎。分离皮肤组织贴壁培养并剪鼠尾提取 DNA。PCR 鉴定胎鼠 Cdy1 基因型。引物如表 1 所示。

### 1.3 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 的建系

逆转录病毒的包装和感染。Plat-E ( $5 \times 10^6$  cells)细胞接种入 6 孔板内。包装病毒 2 h 前,换 2 mL 新鲜无双抗 DMEM 培养液。pMx-Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 和 hrGFP 分别各取 3  $\mu\text{g}$  质粒加入到 0.25 mL 的 Opti-MEM 培养液中,轻轻混匀。同时取 10  $\mu\text{L}$  的 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 加入到 0.25 mL 的 Opti-MEM 培养液中,轻轻混匀,室温放置 5 min。将含质粒和 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 的 Opti-MEM 培养液轻轻混匀,室温孵育 20 min。然后将质粒与 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 的混合物加入到 6 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。12 h 后换液,加入新鲜培养基。48 h 后观察 Plat-E 细胞的荧光表达情况并拍照。72 h 后收集病毒上清液,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤以除去细胞碎片。贴壁培养

的 Cdy1<sup>-/-</sup>成纤维细胞以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞的密度接种在 6 孔板上,24 h 后换液。各取 0.25 mL 病毒上清液加入到成纤维细胞的培养皿中,同时加入 polybrene 至终浓度 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ ,体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养。转染病毒 24 h 后细胞换液。病毒转染后 2~3 d 换液,4 d 后胰酶消化后种植到 MEF 上,改为 ES 培养液。观察细胞形态变化。当克隆较大时,挑取单克隆,胰酶消化传代。

### 1.4 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 多能性鉴定

1.4.1 碱性磷酸酶染色(AKP) 选取生长状态良好的 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC,弃去培养基,用 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次;加入 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min;弃去固定液,用 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次;加入适量的 BCIP/NBT 染液,染色 30 min,吸出 AKP 染色液,用 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次后,显微镜下观察染色结果。

1.4.2 细胞免疫荧光染色 细胞免疫荧光染色 Oct3/4、SSEA-1(1:100)检测 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 多能性的分子标记。选取贴壁较好的细胞,0.01 mol/L PBS 洗 3 次,用 40 g/L 多聚甲醛室温固定 20 min,将多聚甲醛吸干,再用 0.2% Triton X-100(in PBS, v/v)处理 30 min 穿透细胞膜;然后用 100 mL/L 山羊血清室温下封闭 0.5 h;加入一抗,放置在湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;0.01 mol/L PBS 洗三次,每次至少 5 min;加入 Cy3 标记的二抗,室温放置 1~2 h;用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min;Hoechst 33342 染细胞核 5 min;倒置荧光显微镜下观察,并拍照记录。

1.4.3 RT-PCR 鉴定 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 多能性 提取细胞的总 RNA。选取内源性 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 以及 Nanog、Rex-1 等引物进行 RT-PCR 检测。PCR 引物序列如表 1 所示。取 PCR 产物做凝胶电泳检测基因表达。

1.4.4 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSCs 体外分化能力的检测 取  $5 \times 10^5$  的 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 至 60 mm 低粘附性的培养皿悬浮培养形成拟胚体。拟胚体悬浮培养 8 d 后,转移到 20 g/L 明胶包被的 6 孔板中贴壁培养。7 d 后,取细胞进行 AFP、 $\alpha$ -SMA、Tuj-1(1:200)的免疫荧光染色。

1.4.5 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 体内分化能力的检测 取传代后第 2 天增殖旺盛的 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC,以 0.5 g/L 胰酶-EDTA 消化成单细胞,70  $\mu\text{m}$  孔径滤网过滤去除细胞团和杂质,计数后离心收集,以  $2 \times 10^6$

的细胞重悬于 0.1 mL 的 PBS, 注射到裸鼠的后肢内侧皮下, 2 周开始可见肿物形成。5 周后手术取出肿物并制石蜡切片, 经苏木精、伊红染色后镜检。

表 1 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 多能性分析及 Cdy1 基因型鉴定引物  
Table 1 Primers for Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC pluripotency analysis and Cdy1 mouse genotyping

Gene	Sequence
Cdy1 WT	forward, 5'-TCATGCACATCTGCGGATGT-3'
	reverse, 5'-CCGCACCAGATATTCTGTCT-3'
Cdy1 KO	forward, 5'-TCATGCACATCTGCGGATGT-3'
	reverse, 5'-GGTGGGAAAAGGAAGAAAC-3'
Endogenous Oct3/4	forward, 5'-TCTTTCACCAGGCCCGGCTC-3'
	reverse, 5'-TGCGGGCCGACATGGGAGATCC-3'
Endogenous Sox2	forward, 5'-GGTAC CTCCTCTCCACTCCAG-3'
	reverse, 5'-TCACATGTGCGA CAGGGGAC -3'
Endogenous Klf4	forward, 5'-CACCATGGACCCGGCGTGCTGG -3'
	reverse, 5'-TTAGGCTGTCTTTCCGGGG -3'
Endogenous c-Myc	forward, 5'-TGACCTAACTCAGGAGGAGCTGG -3'
	reverse, 5'-AGGCAGTTAAAATTATGGCT -3'
Endogenous Nanog	forward, 5'-CAGGTGTTGAGGCTAGCTC -3'
	reverse, 5'-CGGTTCAT ATGGTACAGTC -3'
Rex1	forward, 5'-ACGACTGGCAGTTCTCTTGGGA -3'
	reverse, 5'-TATGACTCACTTCCAGGGG -3'

## 2 结 果

### 2.1 基因型鉴定及成纤维细胞培养

以 Cdy1 WT 和 Cdy1 KO 为引物, Cdy1 野生型小鼠 PCR 鉴定产物只有 575 bp 的条带, 而 Cdy1 纯合子 PCR 鉴定产物只有 638 bp 的条带, Cdy1 杂合子小鼠 PCR 鉴定产物中 575 bp 和 638 bp 两种条带都会出现。经过 PCR 鉴定, 取 E18.5 的 Cdy1<sup>-/-</sup>胎鼠一只(图 1)并分离其皮肤组织, 剪碎后贴壁培养。贴壁 3 d 后, 贴壁的组织块边缘有少量细胞爬出。第 5 天时, 组织块边缘可见大量的成纤维细胞长出。

### 2.2 逆转录病毒的包装以及 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 获得

Plat-E 细胞包装病毒后 48 h, 可见 GFP 荧光表达(图 2), 72 h 收集病毒感染 Cdy1<sup>-/-</sup>成纤维细胞。细胞感染病毒 4 d 后, 传代至 MEFs 上用 ES 培养液培养。5~6 d 可见克隆长出(图 3)。

### 2.3 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 多能性鉴定

以 E14(ATCC, USA)和 miPSC<sup>[8]</sup>为阳性对照, 免疫荧光染色结果显示 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 表达胚胎干

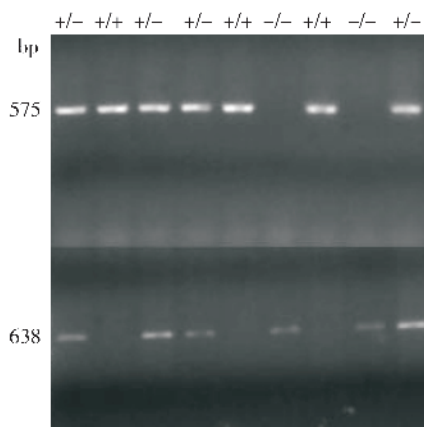


图 1 胎鼠基因型鉴定结果

Fig.1 The results of PCR genotyping of E18.5 mouse fetuses

In wild type animal, we should only get the 575 bp product. In homozygous knockout mice, we should only get the 638 bp product. In heterozygotes, we should get both products.

细胞的特异分子标记 Oct3/4、SSEA-1(图 4、5);碱性磷酸酶染色表明 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 表达 AKP(图 6) RT-PCR 的结果显示 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 表达内源性的 Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog 和 Rex-1(图 7);分化形成的拟胚体中含有三个胚层来源的细胞类型, 包括表达 AFP 的内胚层细胞, 表达  $\alpha$ -SMA 的中胚层细胞和表达  $\beta$  III-tubulin 的外胚层细胞(图 8-10), 表明 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 在体外具有多向分化潜能, 能够分化为三个胚层的组织细胞。将 Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 注射入裸鼠皮下, 约 2 周开始出现肿瘤。接种 5 周后将裸鼠引颈处死, 取出肿瘤, 瘤体直径 3.5 cm。经石蜡切片和 HE 染色后, 镜下观察可见三个胚层来源的细胞类型, 其中包括内胚层的腺上皮, 中胚层的肌肉组织, 外胚层的神经管结构(图 11)。由此可见, Cdy1<sup>-/-</sup> iPSC 在体内同样具有三胚层分化能力。

## 3 讨 论

小鼠的常染色体 Cdy1 基因表达两个转录本。一个是 3.6Kb 的在各组织中广泛表达的转录本, 另一个是在睾丸组织中特异表达的 2.8Kb 的转录本。CDYL 一方面具有管家基因功能, 另一方面可能在精子发生中发挥重要作用。最近研究表明 Cdy 和 Cdy1 具有体外组蛋白乙酰化酶活性, 并且 Cdy1 主要表达于延长期精子阶段的组蛋白超乙酰化和置换的过程中。这些研究进一步表明在精子

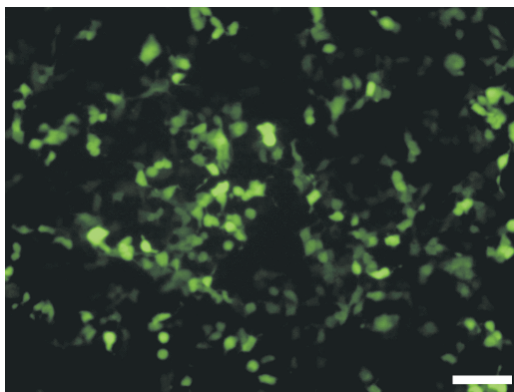


图 2 Plat-E 细胞包装病毒 48 h 后 GFP 表达情况  
**Fig.2** The retrovirus production by Plat-E cells 48 hours after transfected with pMx-hrGFP, 80% of Plat-E cells expressed GFP. (bar = 50  $\mu$ m)

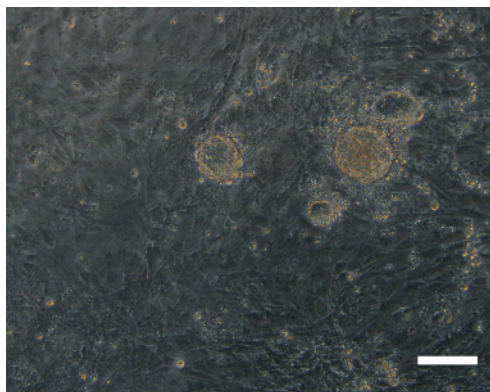


图 3 *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC 的形态  
**Fig.3** The morphology of *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC exhibited morphology similar to mES cells, including a round shape, large nucleoli, and scant cytoplasm. (bar = 50  $\mu$ m)

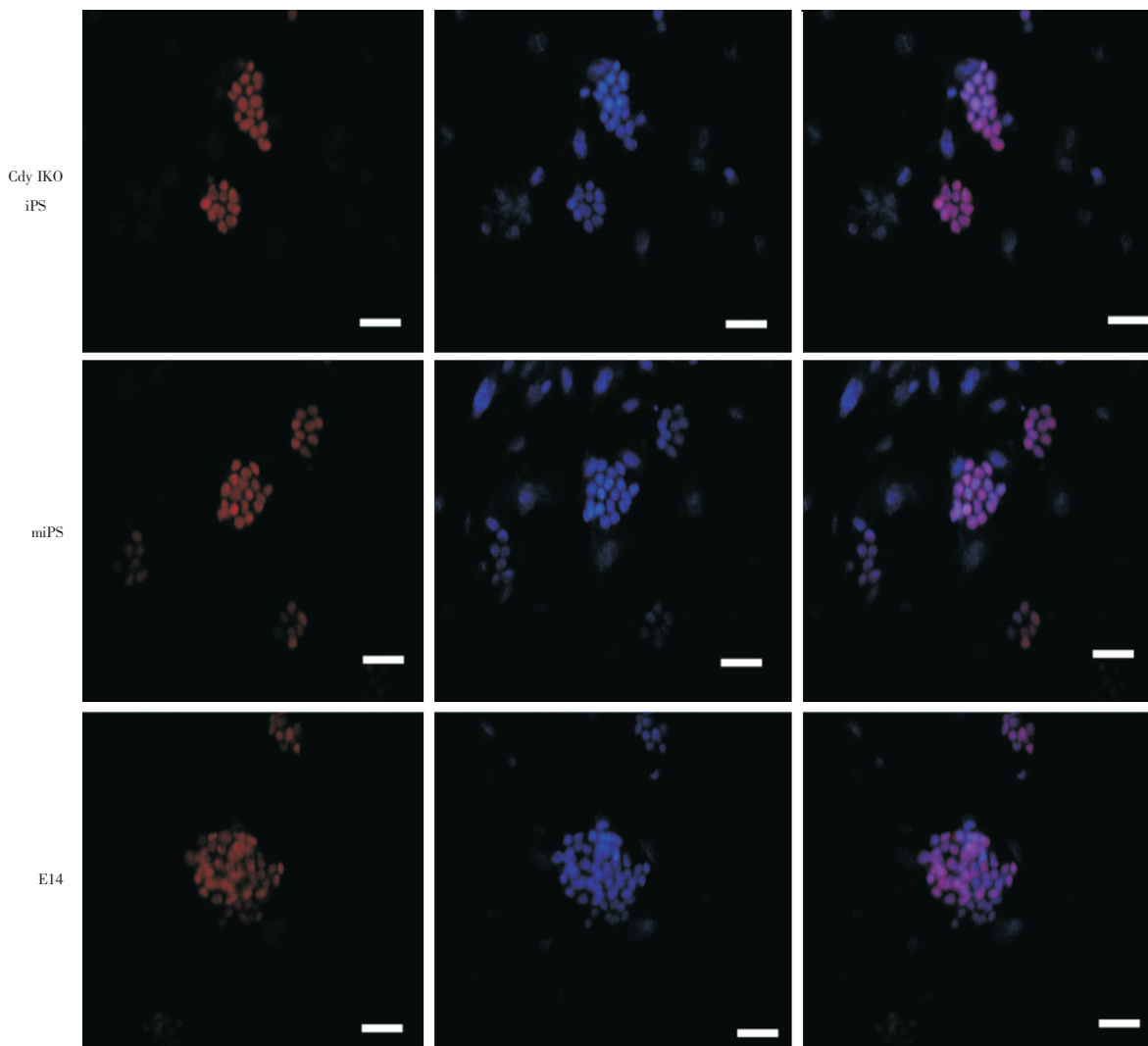


图 4 *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC Oct3/4 表达情况  
**Fig.4** Immunostaing of *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC for Oct3/4 expression  
 E14 and miPSCs were used as controls. bar=50  $\mu$ m

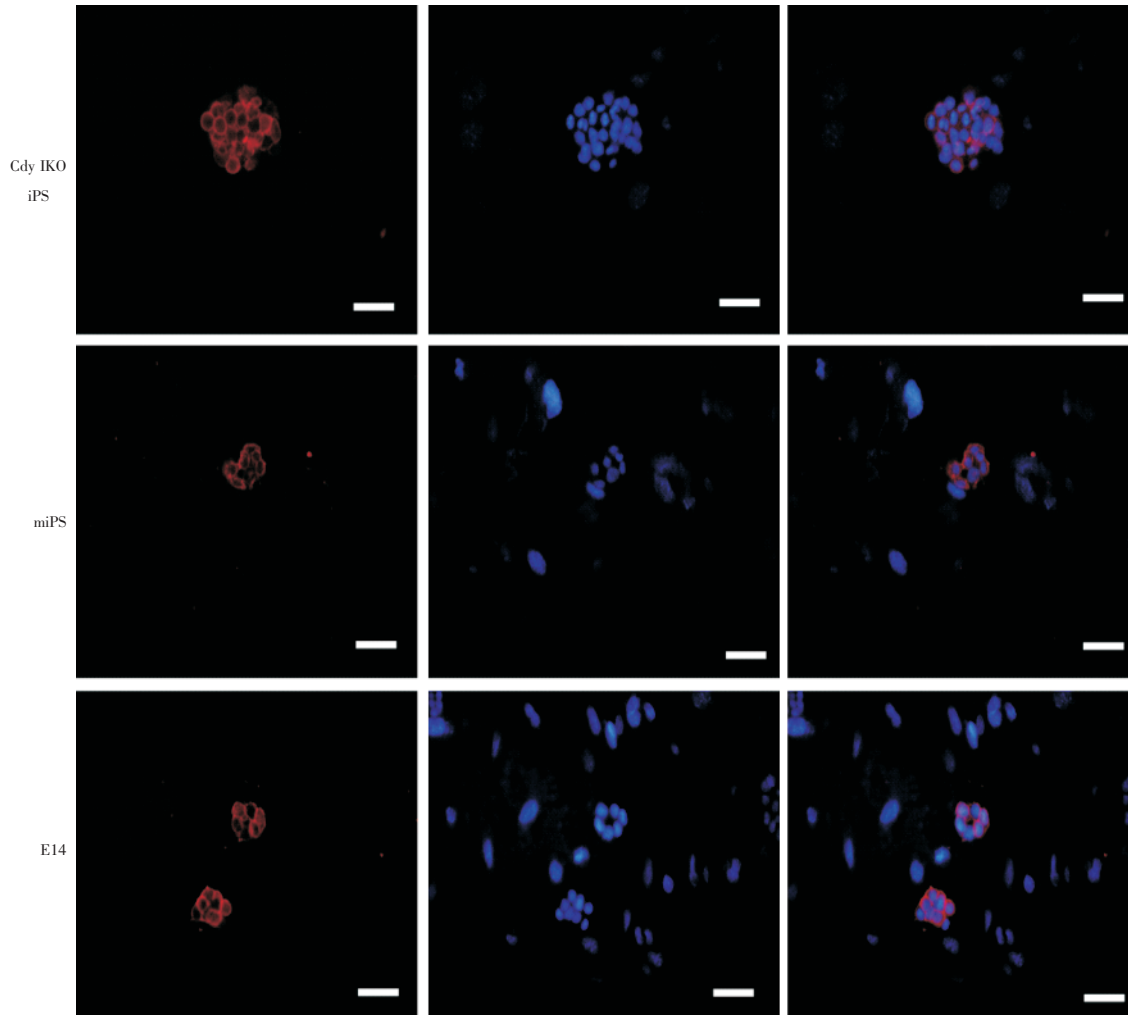


图 5  $Cdy1^{-/-}$  iPSC SSEA-1 表达情况

Fig.5 Immunostaining of  $Cdy1^{-/-}$  iPSC for SSEA-1 expression

E14 and miPSCs were used as controls. bar=50  $\mu$ m

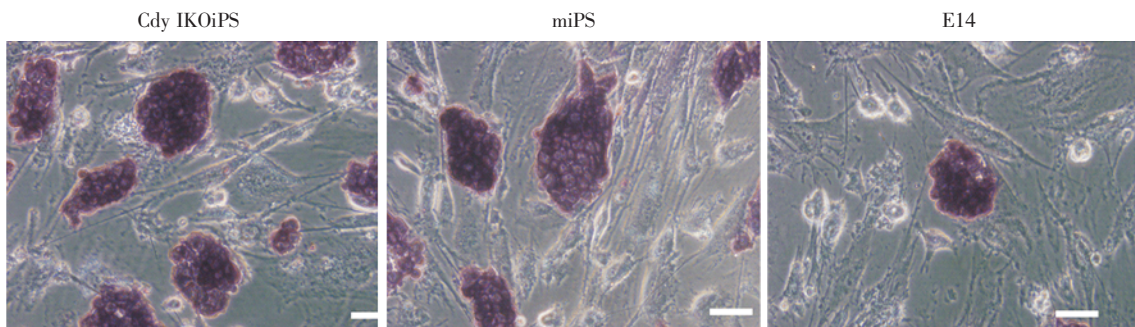


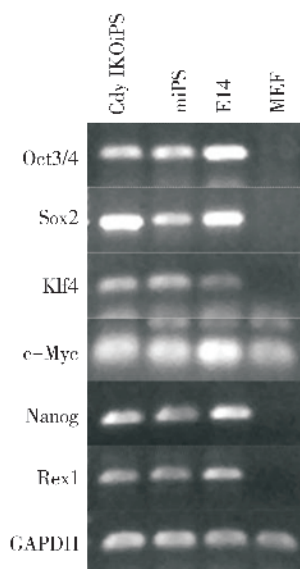
图 6  $Cdy1^{-/-}$  iPSC 碱性磷酸酶染色

Fig.6 Alkaline phosphatase staining of  $Cdy1^{-/-}$  iPSC

$Cdy1^{-/-}$  iPSCs were positive for alkaline phosphatase immunostaining. bar=50  $\mu$ m

生成过程中  $Cdy1$  与染色质重建潜在的关系。 $Cdy1$  的一个重要的结构域序列与烯酰辅酶 A 水解酶/异构酶 CoA pocket 的同源性, 在其羧基端有一个与 enoyl-CoA hydratase/isomerase 同源的结构域,

研究表明其能结合 CoA 和组蛋白去乙酰化酶 (HDAC), 其能有效地抑制转录<sup>[9-14]</sup>。而且  $Cdy1$  与 Hdc1 的结合抑制了  $Cdy1$  与 CoA 的结合, 只有在不存在 HDACs 的时候  $Cdy1$ -CoA 间的相互作用才



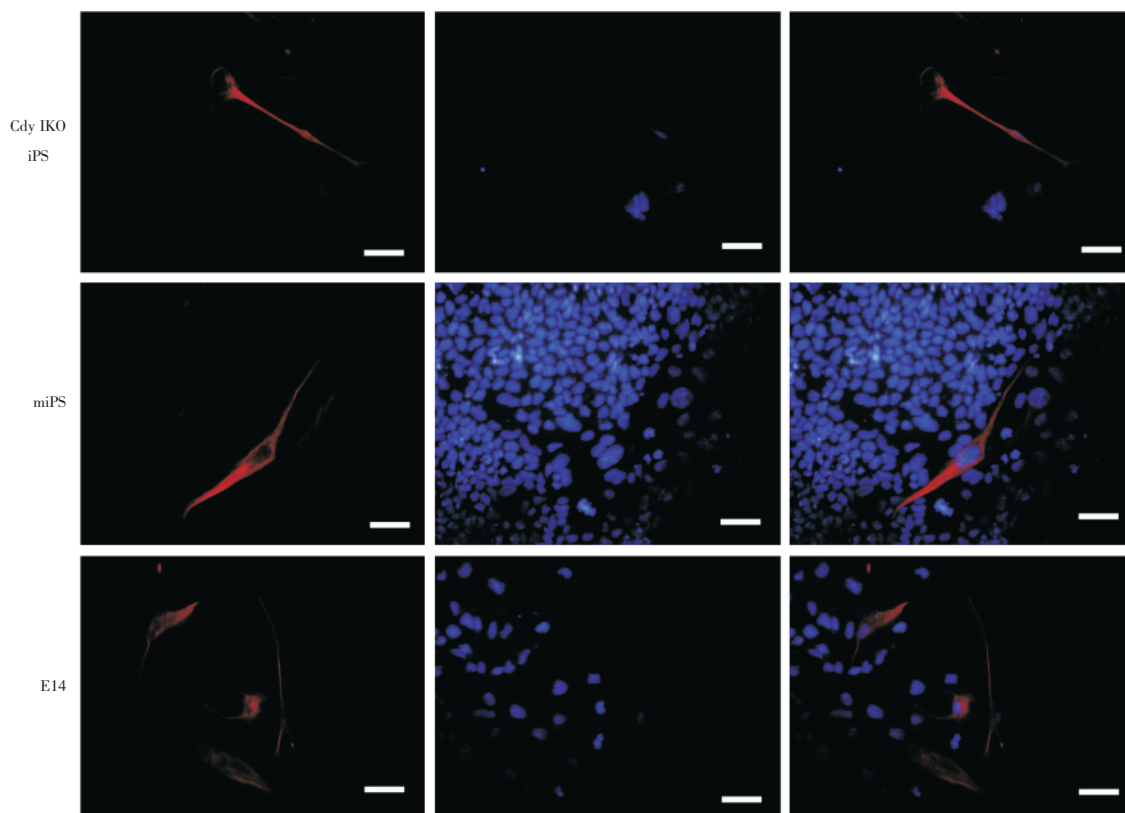
**图 7 RT-PCR 分析 *Cdyl*<sup>-/-</sup>iPSC 的基因表达情况**  
**Fig.7 RT-PCR analysis of *Cdyl*<sup>-/-</sup>iPSC for pluripotent marker gene expression**

The results showed that *Cdyl*<sup>-/-</sup>iPSC expressed Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, and Rex-1.

会发生。*Cdyl* 的结构基础表明是一种主要的转录共抑制因子<sup>[15-18]</sup>。

在 *Cdyl* 基因敲除的小鼠模型中,我们发现这种 *Cdyl*<sup>-/-</sup>小鼠出生后短时间即死亡,表明 *Cdyl* 基因敲除影响了小鼠胚胎发育。本实验室前期研究结果提示 *Cdyl* 基因敲除影响小鼠胚胎肺以及神经系统的发育,并且在肺和神经两个组织器官水平上已经得以证实。*Cdyl* 基因敲除使得 *Cdyl*<sup>-/-</sup>小鼠肺发育迟缓,神经系统畸变。因此在细胞水平证实 *Cdyl* 基因敲除影响小鼠肺以及神经发育将十分有意义。因此 *Cdyl* 基因敲除鼠多能干细胞系的建立就显得十分的重要。

2006 年 3 月,日本学者 Yamanaka 等首次通过导入 4 种基因 Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4,将分化成熟的小鼠成纤维细胞,重新诱导成为具有胚胎干细胞特性的多能干细胞。iPS 细胞在形态学、基因表达状况和表观遗传修饰方面都与 ES 细胞十分相似。因此,iPSC 在临床应用和基础研究方面都有极高的价值。2009 年,Ebert AD 小组建立了脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA)(携



**图 8 *Cdyl*<sup>-/-</sup>iPSC 的体外神经分化检测**

**Fig.8 Immunocytochemistry of *Cdyl*<sup>-/-</sup> embryoid bodies with anti- $\beta$  III-tubulin (Tuj-1) antibody**  
 The results showed that *Cdyl*<sup>-/-</sup>iPS cells differentiated to  $\beta$  III-tubulin+ cells (ectoderm). bar = 50  $\mu$ m

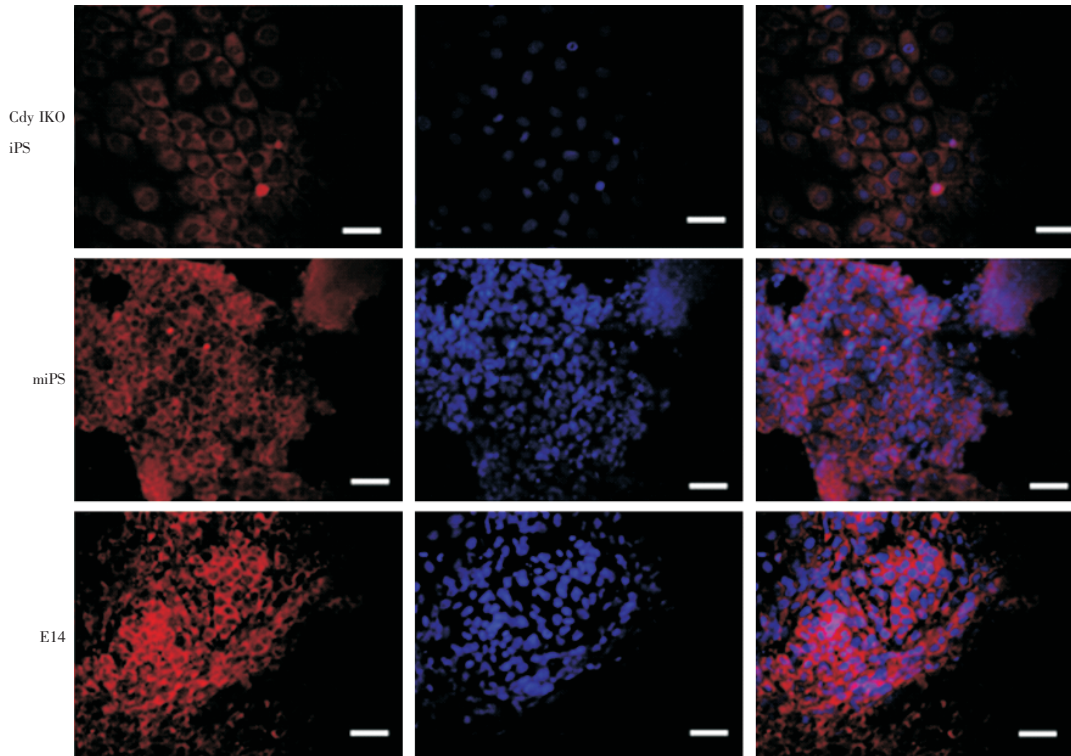


图 9 Cdy1-/- iPSC 的体外肝分化检测

**Fig.9 Immunocytochemistry of Cdy1-/- embryoid body for AFP expression**

The results showed that Cdy1-/- iPSC differentiated to endoderm derived AFP+ cells. bar = 50 μm

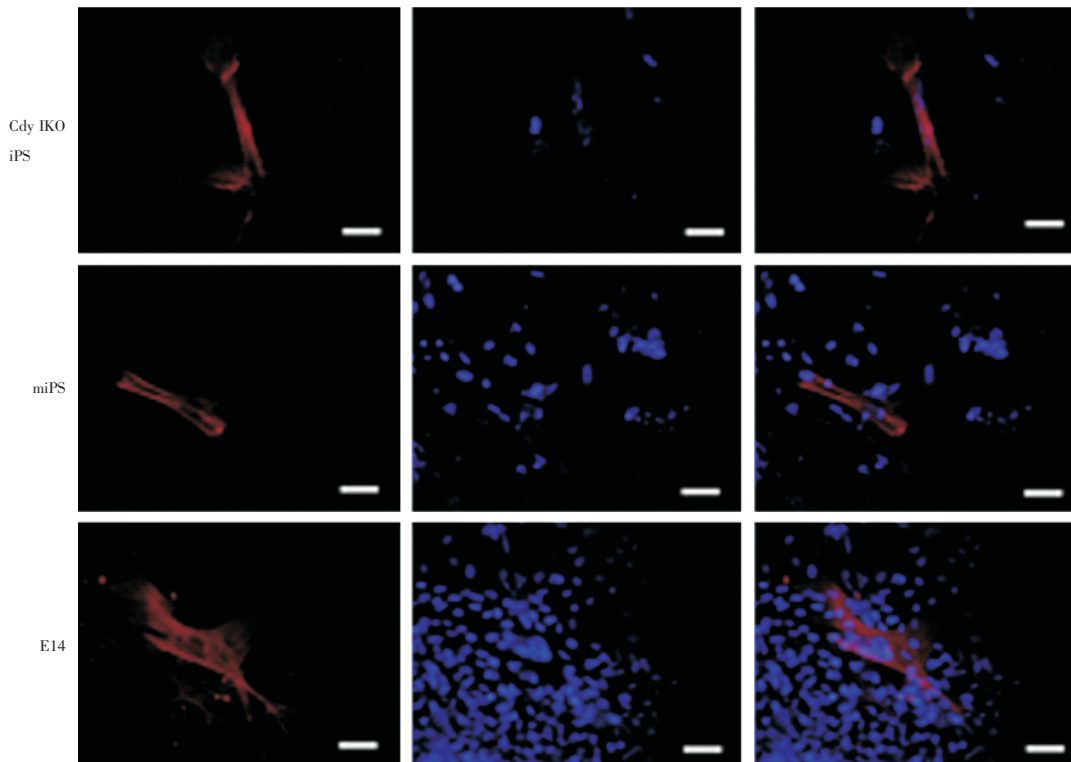


图 10 Cdy1-/- iPSC 的体外肌肉分化检测

**Fig.10 Immunocytochemistry of Cdy1-/- embryoid body for α-SMA expression**

The results showed that Cdy1-/- iPSC differentiated to mesoderm derived α-SMA+ cells. bar = 50 μm

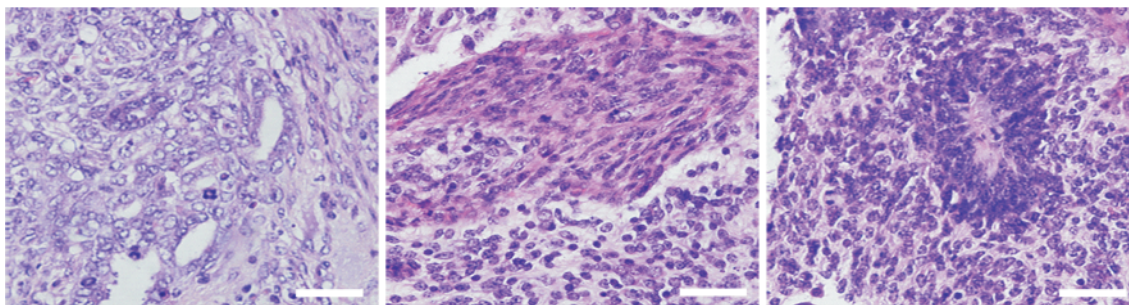


图 11 *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC 畸胎瘤形成实验

Fig.11 Teratoma formation of *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC

Glandular epithelium (endoderm, left), muscle (mesoderm, middle), and neurotube (ectoderm, right) were present in teratomas derived from *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC. The results revealed that *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC retained the pluripotency in vivo. bar=50 μm

带 *SMN1* 基因突变)的 iPSC, 利用这些 iPSC 体外分化培育出包含的运动神经元在 2 个月后开始死亡, 完全模拟了 *SMN* 的发病过程, 为进一步研究相关发病机制和筛选药物提供了重要的细胞模型<sup>[19]</sup>。目前认为, 干细胞技术的进步将使利用 iPSC 细胞模型研究疾病发病机理成为现实, 从而极大推进我们对疾病分子机制的理解, 并进而发展出相应的治疗药物或干细胞产品。在 iPSC 技术出现之前, 我们至今未能成功建立 *Cdyl*<sup>-/-</sup>ES 细胞系。

在本实验中, 我们利用逆转录病毒转导成功建立 *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC 细胞系。*Cdyl*<sup>-/-</sup>iPSC 细胞具有与胚胎干细胞相似的形态结构, 细胞体积小、核大、有一个或几个核仁、细胞质与细胞核的比例小, 在体外分化抑制培养的过程中呈克隆状生长, 有明显的聚集倾向。*Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC 细胞表达 Oct3/4、SSEA-1 特异性分子标记, 碱性磷酸酶染色呈强阳性。*Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC 细胞具有多向分化潜能, 在体内或体外均可分化为三个胚层的组织或细胞。由于 *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC 细胞系是通过病毒转导的方式获得, 存在 iPSC 细胞畸变率高的风险。同时 iPSC 细胞建系中病毒与基因组 DNA 重组存在随机性, 可能会影响到基因的完整性。因此, 通过 Minicircle<sup>[20]</sup>、蛋白技术<sup>[21]</sup>等非整合转导技术获得 *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC 将是进一步研究的目标。另外, 拟利用 *Cdyl*<sup>-/-</sup>iPSC 细胞系进行体外的神经细胞以及肺上皮细胞的定向分化研究, 以更深入的探讨 *Cdyl* 在小鼠肺以及神经发育所发挥的功能。总之, *Cdyl*<sup>-/-</sup> iPSC 细胞系的成功建立, 不仅为研究 *Cdyl* 在小鼠胚胎发育中功能研究提供了良好的细胞模型, 并且为 *Cdyl* 在

基因转录调控水平研究提供了良好的平台。

#### 参考文献:

- [1] Elkhafif N, Voss B, Hammam O, et al. Homing of transplanted bone marrow cells in livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice [J]. *APMIS*, 118(4): 277-287.
- [2] Lahn BT, Page DC. Functional coherence of the human Y chromosome [J]. *Science*, 1997, 278(5338): 675-680.
- [3] Lahn BT, Page DC. Retroposition of autosomal mRNA yielded testis-specific gene family on human Y chromosome [J]. *Nat Genet*, 1999, 21(4): 429-433.
- [4] Lahn BT, Tang ZL, Zhou J, et al. Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(13): 8707-8712.
- [5] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [6] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult human fibroblasts by Defined Factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [7] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2008, 34(5): 877-886.
- [8] Li W, Wang D, Qin J, et al. Generation of functional hepatocytes from mouse induced pluripotent stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 222(3): 492-501.
- [9] Caron C, Pivot-Pajot C, van Grunsven LA, et al. *Cdyl*: a new transcriptional co-repressor [J]. *EMBO Rep*, 2003, 4(9): 877-882.
- [10] Chinnadurai G. CtBP family proteins: more than transcriptional corepressors [J]. *Bioessays*, 2003, 25

- (1): 9–12.
- [11] Dorus S, Gilbert SL, Forster ML, et al. The CDY-related gene family: coordinated evolution in copy number, expression profile and protein sequence [J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(14): 1643–1650.
- [12] Shi Y, Sawada J, Sui G, et al. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex [J]. *Nature*, 2003, 422(6933): 735–738.
- [13] Li X, Liang J, Yu H, et al. Functional consequences of new exon acquisition in mammalian chromodomain Y-like (CDYL) genes [J]. *Trends Genet*, 2007, 23(9): 427–431.
- [14] Fischle W, Franz H, Jacobs SA, et al. Specificity of the chromodomain Y chromosome family of chromodomains for lysine-methylated ARK (S/T) motifs [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(28): 19626–19635.
- [15] Kuppuswamy M, Vijayalingam S, Zhao LJ, et al. Role of the PLDLS-binding cleft region of CtBP1 in recruitment of core and auxiliary components of the corepressor complex [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(1): 269–281.
- [16] Mulligan P, Westbrook TF, Ottinger M, et al. CDYL bridges REST and histone methyltransferases for gene repression and suppression of cellular transformation [J]. *Mol Cell*, 2008, 32(5): 718–726.
- [17] Franz H, Mosch K, Soeroes S, et al. Multimerization and H3K9me3 binding are required for CDYL1b heterochromatin association [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(50): 35049–35059.
- [18] Wu H, Min J, Antoshenko T, et al. Crystal structures of human CDY proteins reveal a crotonase-like fold [J]. *Proteins*, 2009, 76(4): 1054–1061.
- [19] Ebert AD, Yu J, Rose FF, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient [J]. *Nature*, 2009, 457(7227): 277–280.
- [20] Jia F, Wilson KD, Sun N, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPSC cells [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(3): 197–199.
- [21] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 381–384.

(编辑 孙慧兰)

(上接第 145 页 from page 145)

- [19] Ivey KN, Muth A, Arnold J, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 219–229.
- [20] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 228–233.
- [21] Shang YC, Wang SH, Xiong F, et al. Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(11): 1761–1774.
- [22] Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways [J]. *Cell Calcium*, 2005, 38(3/4): 439–446.
- [23] Zhou W, Lin L, Majumdar A, et al. Modulation of morphogenesis by noncanonical Wnt signaling requires ATF/CREB family-mediated transcriptional activation of TGF beta 2 [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(10): 1225–1234.
- [24] Kim SI, Han DC, Lee HB. Lovastatin inhibits transforming growth factor-beta1 expression in diabetic rat glomeruli and cultured rat mesangial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(1): 80–87.
- [25] Li H, Yu B, Zhang Y, et al. Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(2): 320–325.
- [26] Bhang SH, Gwak SJ, Lee TJ, et al. Cyclic mechanical strain promotes transforming-growth-factor-beta1-mediated cardiomyogenic marker expression in bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2010, 55(4): 191–197.
- [27] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors [J]. *Cell*, 2010, 142(3): 375–386.
- [28] Martin-Puig S, Wang Z, Chien KR. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(4): 320–331.
- [29] Li Z, Gu TX, Zhang YH. Hepatocyte growth factor combined with insulin like growth factor-1 improves expression of GATA-4 in mesenchymal stem cells cocultured with cardiomyocytes [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121(4): 336–340.
- [30] Yu XY, Geng YJ, Li XH, et al. The effects of mesenchymal stem cells on c-kit up-regulation and cell-cycle re-entry of neonatal cardiomyocytes are mediated by activation of insulin-like growth factor 1 receptor [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 332(1/2): 25–32.

(编辑 刘清海)