

METTL3 对猪干细胞多能基因表达的调控作用

马子玉¹, 任亚辉¹, 凌敏², 王华岩¹

1 西北农林科技大学 动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学 创新实验学院, 陕西 杨凌 712100

马子玉, 任亚辉, 凌敏, 等. METTL3 对猪干细胞多能基因表达的调控作用. 生物工程学报, 2018, 34(3): 369–378.

Ma ZY, Ren YH, Ling M, et al. METTL3 regulates expression of pluripotent genes in porcine pluripotent stem cells. Chin J Biotech, 2018, 34(3): 369–378.

摘要: m⁶A 是真核生物 mRNA 中重要的转录后修饰, METTL3 作为 m⁶A 甲基转移酶复合物中的重要组分, 在细胞重编程、胚胎干细胞和诱导多能干细胞的干性维持、胚胎发育等过程中发挥重要作用。为了揭示猪 METTL3 的表达模式, 对不同物种 METTL3 蛋白序列进行了比对, 用 RT-PCR 检测了 METTL3 基因在不同猪组织和细胞中的表达情况, 并确认了 METTL3 的细胞核定位。为了研究 METTL3 对猪干细胞多能基因表达的调控作用, 克隆了猪 METTL3 编码区序列, 设计了 METTL3 干扰片段, 并构建了相应的过表达和沉默载体。发现干扰 METTL3 的表达后, 猪多能干细胞出现类似 naïve 状态的细胞克隆, NANOG、OCT4 和 LIN28A 表达水平显著升高。在猪多能干细胞培养基中添加 m⁶A 甲基化抑制剂环亮氨酸培养细胞 48 h 后, 试验结果与干扰 METTL3 表达的结果一致。本研究为优化猪多能干细胞的培养体系提供了新的方向和依据。

关键词: 猪多能干细胞, m⁶A 修饰, METTL3, 多能基因, 环亮氨酸

METTL3 regulates expression of pluripotent genes in porcine pluripotent stem cells

Ziyu Ma¹, Yahui Ren¹, Min Ling², and Huayan Wang¹

1 Shaanxi Center for Stem Cell Engineering and Technology, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Innovation Experimental College, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: In post-transcriptional mRNA modification, m⁶A has been observed in a wide range of eukaryotes. METTL3, as a component of methyltransferase complex for m⁶A modification, regulates mouse naïve pluripotency and influences mRNA stability, especially affecting the expression level of the key pluripotent transcription factors. To reveal the expression pattern of the porcine METTL3 gene, we analyzed METTL3 expression level in different porcine tissues, somatic cells, and induced pluripotent stem cells (piPSCs) by RT-PCR. To identify the function of METTL3 for regulation of the expression of porcine

Received: June 21, 2017; **Accepted:** September 4, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31571521, 31371505).

Corresponding author: Huayan Wang. Tel: +86-29-87080069; E-mail: hhwang101@163.com

国家自然科学基金 (Nos. 31571521, 31371505) 资助。

pluripotent genes, we cloned a 1 859-bp coding sequence of *METTL3* and synthesized a shRNA against *METTL3*. When knocking down *METTL3* expression in piPSCs, the cell type of piPSCs became naïve-like morphology, alkaline phosphatase activity was increased, and expression level of pluripotent genes *NANOG*, *OCT4* and *LIN28A* was significantly elevated. In addition, piPSCs cultured in medium containing 10 mmol/L cycloleucine for 48 h exhibited the similar result as that knocked down *METTL3*. These findings set the stage for optimization of piPS culture condition and further study on the roles of m⁶A in piPSCs.

Keywords: porcine pluripotent stem cells, m⁶A, *METTL3*, pluripotent gene, cycloleucine

将外源多能转录因子 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*cMyc* 导入成体细胞, 经过细胞重编程, 能够获得一种具有自我更新和多向分化潜能的诱导性多能干细胞 (即 iPS 细胞)^[1], 可以在体内外分化为内、中、外三个胚层细胞和各种组织、器官^[2]。小鼠的 iPS 建系后, 许多大动物的 iPS 细胞系也相继获得^[3-5]。本实验室在猪胚胎成纤维细胞中表达 OSKM 四因子, 并在培养基中添加外源白血病抑制因子 LIF 和碱性成纤维细胞生长因子 bFGF, 获得原始态 (naïve) 样的猪 iPS 细胞, 能经历 30 代次以上的传代并保持多能性^[6]。然而, 猪 iPS 细胞的建系仍然进展缓慢, 目前未能获得真正 naïve 状态的细胞, 缺少稳定的体外诱导培养体系, 不能实现生殖系嵌合^[7-8], 因此, 优化体外培养体系、获得真正 naïve 状态的猪 iPSCs 具有十分重要的意义。m⁶A 甲基化作为重要的表观遗传修饰方式, 对小鼠和人的胚胎干细胞和诱导多能干细胞的干性维持与逆转、细胞重编程以及胚胎发育等生物学过程均起着重要的调节作用。

m⁶A 修饰是指腺嘌呤第 6 位 N 原子上的甲基化修饰, 是真核生物 mRNA 中最常见的转录后修饰^[9], 影响 mRNA 的剪接、出核转运、翻译和稳定性等^[10]。mRNA 的 m⁶A 修饰由甲基转移酶复合体 (WTAP/*METTL3*/*METTL14*) 催化形成^[11-12], 由去甲基化酶 ALKBH5 和 FTO 催化去甲基化^[13-14], 并被 YTH 结构域家族识别^[15-16], 结合蛋白 YTHDF2 招募 CCR4-NOT 复合体降解被 m⁶A 修饰的 mRNA^[17]。*METTL3* 亚基是 m⁶A 甲基转移酶复合体中的核心组分^[18], 定位于核散斑^[19], *Mettl3*

失活使 m⁶A 水平降低后促进小鼠 ESC 细胞自我更新, 并阻碍分化^[20]。有报道表明, *Mettl3* 可以作为小鼠 naïve 状态的分子开关, 确保多能性因子正确下调, 为细胞分化做准备^[21]。m⁶A 甲基转移酶将甲基供体 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 上的甲基转移到 mRNA 腺嘌呤的第 6 位 N 原子上^[22], 环亮氨酸是 SAM 转移酶的竞争性抑制剂。有研究表明, 在培养体系中添加环亮氨酸可以调控小鼠成纤维细胞的重编程进程^[23]。由此可见, m⁶A 修饰可以影响 mRNA 的稳定性, 调控多能干因子的转录水平, 以及调控小鼠多能干细胞的表观遗传状态与细胞重编程。因此, 我们推测 *METTL3* 能够影响猪多能干细胞中多能因子 mRNA 的稳定性, 调节这些因子的表达水平, 从而对猪多能干细胞的多能性产生影响。

我们克隆了猪 m⁶A 甲基化修饰相关基因 *METTL3*, 构建了过表达和干扰载体, 并通过在猪多能干细胞培养体系中添加甲基化抑制剂环亮氨酸, 研究其对猪多能干细胞状态转变和多能基因的影响, 为优化猪 iPSCs 的诱导培养体系提供新的方向和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 Stellar 感受态细胞、质粒 pEGFP-C1、pCDH、pSIH1、人胚肾细胞 (HEK293T)、小鼠胎儿成纤维细胞 (MEF)、猪胎儿成纤维细胞 (PEF)、猪肾上皮细胞 (PK-15)、猪诱导多能干细胞 (DOX-iPS、PS11、PS23) 由陕西省干细胞工程技

术研究中心保存。pGEM-T Easy 购自 Promega 公司。猪各组织器官采集于陕西万盛肉类加工有限公司的屠宰场。

1.2 试剂

基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、总 RNA 试剂盒、DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、反转录试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific;高保真 DNA 聚合酶和 CCK-8 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;Taq 聚合酶购自康为世纪生物科技有限公司;荧光定量 PCR 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;DMEM 购自 Hyclone;Opti-MEM、DPBS、Trypsin、胎牛血清(FBS)购自 Gibco;琼脂糖、脂质体(Lipofectamine 2000)、非必需氨基酸(NEAA)、谷氨酰胺(GlutaMAX)、 β -巯基乙醇(β -ME)、购自 Invitrogen;SB431542、CHIR99021 购自 Stem RD;明胶、Doxycycline、DMSO、环亮氨酸、 α -磷酸萘酚钠、Fast Red TR 购自 Sigma-Aldrich;多聚甲醛、Tris-HCl 购自北京索莱宝科技有限公司;引物由华大基因合成(表 1)。

1.3 METTL3 基因表达分析

登录 NCBI 下载不同物种 METTL3 氨基酸序列,使用在线软件 phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/index.cgi>) 构建 METTL3 蛋白进化树。使用 Primer Blast 设计引物,通过 RT-PCR 检测 METTL3 在猪的不同器官(肺、脾、脑、肾等)、不同细胞(PEF、PK-15)和不同多能干细胞(DOX-iPS、PS11、PS23)中的表达情况。使用软件 ImageJ 对 DNA 琼脂糖电泳结果进行灰度分析。

1.4 猪 METTL3 的克隆和载体构建

从 PEF 细胞中提取总 RNA,反转录得到 cDNA。设计合成猪 METTL3 上下游引物,以得到的 cDNA 为模板克隆 METTL3 (CDS + polyA)

片段,连接 pGEM-T Easy 载体,送华大基因测序鉴定,并将测序结果与 NCBI 公布的猪 METTL3 序列进行对比。

用 Xho I 和 Hind III 将目的基因 METTL3 和载体 pEGFP-C1 进行酶切,电泳、回收后将 METTL3 连接到载体上,获得过表达载体 pEGFP-METTL3;重新设计带 Xba I 和 Bstb I 酶切位点的 METTL3 上下游引物,以构建好的 pEGFP-METTL3 为模板进行 PCR 扩增,电泳、回收后重新酶切、连接,构建慢病毒载体 pCDH-METTL3。设计并合成 METTL3 的 shRNA 序列(表 1)用 BamH I 和 EcoR I 将 pSIH1-copGFP、pSIH1-PURO 进行酶切、电泳、回收,将退火后的干扰序列连接到载体上,获得慢病毒干扰载体 pSIH1-copGFP-sh-METTL3 和 pSIH1-Puro-sh-METTL3。将以上构建的载体转化到大肠杆菌中,挑取阳性菌落,提取质粒,进行酶切鉴定,选取鉴定正确的质粒送华大基因测序鉴定。

1.5 细胞培养、转染和感染

HEK293T、PK-15 细胞培养在 10% FBS 的 DMEM 中;MEF、PEF 细胞培养在 15% FBS 的 DMEM 中,并添加 1% NEAA;DOX-iPS 细胞培养在 15% FBS 的 DMEM 中,并添加 1% NEAA、1% GlutaMAX、0.1 mmol/L β -ME、2 μ mol/L SB431542、3 μ mol/L CHIR99021、4 μ g/mL Doxycycline。称取不同重量的环亮氨酸溶解在 DOX-iPS 培养基中,配制成不同浓度的环亮氨酸培养基,用于竞争性抑制猪 piPS 细胞内源 METTL3 的活性。

进行细胞转染时,将 HEK293T 细胞接种于直径为 60 mm 的培养皿中培养,按照脂质体 2000 转染说明书,将构建的过表达和干扰载体分别转染 HEK293T 细胞包装病毒,48 h 后收集上清毒液,经 0.45 μ m 滤器过滤后加入浓度为 4 μ g/mL 的 polybrene 混匀,分别感染 DOX-iPS,12 h 后换液。重复感染 2 次。

表 1 引物和干扰片段信息表

Table 1 Primers and shRNAs used in this study

Name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>METTL3</i> -F	CTAGTCTAGAATGTCGGACACGTGGAGCTCT	1 859
<i>METTL3</i> -R	TTCGAACCCAACTACAATACAAACTT	
<i>METTL3</i> -F	CCACTTCTGGTGGCCCTAAG	502
<i>METTL3</i> -R	AGGTCAACATCTGAGGCAGC	
<i>GAPDH</i> -F	AAGGTCGGAGTGAACGGATT	549
<i>GAPDH</i> -R	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	
q <i>METTL3</i> -F	CCTATGCTGATCATTCCAAG	260
q <i>METTL3</i> -R	TTGTTGGTTCAGAAGGCTCTC	
q <i>OCT4</i> -F	TGAGGCTTTGCAGCTCAGTT	179
q <i>OCT4</i> -R	TCTCCAGGTTGCCTCTCACT	
q <i>LIN28A</i> -F	TGCCGGCATCTGTAATGGT	246
q <i>LIN28A</i> -R	CTCTCGCTCCAATGCAGAA	
q <i>NANOG</i> -F	AGGGCTCAGCCAGTACAGAA	101
q <i>NANOG</i> -R	CCAGCTCTGATTACCCACA	
q β - <i>ACTIN</i> -F	GTGACAGCAGTCGGTTGGAT	161
q β - <i>ACTIN</i> -R	TTTTGGGAAGGCAGGGACTT	
shRNA-F	GATCCGCAGTTCCTGAGCTAGCTACATCAAGA GTGTAGCTAGCTCAGGAACTGCTTTTTG	55
shRNA-R	AATTCAAAAAGCAGTTCCTGAGCTAGCTACAC TCTTGATGTAGCTAGCTCAGGAACTGCG	

1.6 生长曲线测定

MEF feeder 细胞接种于 0.1%明胶包被过的 48 孔板中, 过夜培养后, 每孔接种 2×10^3 个 DOX-iPS 细胞, 加入含有环亮氨酸的培养基 200 μ L, 设置空白组 (未接种 DOX-iPS 细胞) 和对照组 (0 mmol/L 环亮氨酸培养基)。每组设 3 个重复。每孔加入 20 μ L CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 取 100 μ L 上清液转移到 96 孔板中, 测定 450 nm 各孔吸光值, 连续测定 7 d。

1.7 碱性磷酸酶 (AP) 染色

称取 5 mg Fast Red TR 和 2 mg α -磷酸萘酚钠盐, 溶解于 5 mL 的 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 9.0) 中, 配制成 AP 染色液。吸去 DOX-iPS 细胞培养液, 用 PBS 清洗 1 遍; 加入适量的 4% 多聚甲醛,

常温固定 20 min; 吸去固定液, 用 PBS 清洗 3 遍, 加入 AP 染色液洗 1 遍, 加入 AP 染色液常温染色 10–20 min, 吸去染色液, 用 PBS 清洗 3 遍之后, 置于显微镜下进行观察。

1.8 荧光定量 RT-PCR

按照总 RNA 提取和反转录试剂盒说明书, 提取 RNA 并反转录获得 cDNA, 设计 *METTL3*、*OCT4*、*LIN28A*、*NANOG*、 β -*ACTIN* 等引物 (表 1), 按照荧光定量试剂盒说明书检测基因的表达水平, 并用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算表达变化倍数。

1.9 统计学分析

所有数据均用平均值 \pm 标准差表示, 并经过 *t*-test 或 ANOVA 检验差异是否具有统计学意义。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 猪 *METTL3* 的表达谱和分子克隆

比对不同物种 *METTL3* 蛋白序列, 构建出分子进化树, 由进化树可以看出, 猪 *METTL3* 蛋白与人、鼠的进化距离较远, 与牛、羊的进化距离较近 (图 1A)。通过 RT-PCR 对猪胃、皮肤、心脏、脂肪、肌肉、小肠、大肠、子宫、肝脏、肺、脾脏、肾脏、脑各组织和器官中的 *METTL3* 表达情况进行检测, 并对凝胶电泳结果进行了灰度分析, 结果表明 *METTL3* 在不同组织中广泛表达 (图 1B)。用

RT-PCR 检测了猪体细胞 PEF 和 PK-15、多能干细胞 DOX-iPS、PS11 和 PS23 中 *METTL3* 的表达情况, 结果表明, *METTL3* 在猪不同细胞中都有表达 (图 1C)。从猪的基因组中克隆获得 1 859 bp 的 *METTL3* 基因的编码序列片段 (图 1D), 构建了过表达载体 pEGFP-*METTL3*, 经酶切鉴定正确 (图 1E)。将质粒瞬时转染 HEK293T 细胞, 与对照组 EGFP 蛋白相比, 绿色荧光和 DAPI 细胞核染色显示了 EGFP-*METTL3* 融合蛋白定位在细胞核中, 证明该融合蛋白具备核定位功能特性 (图 1F)。

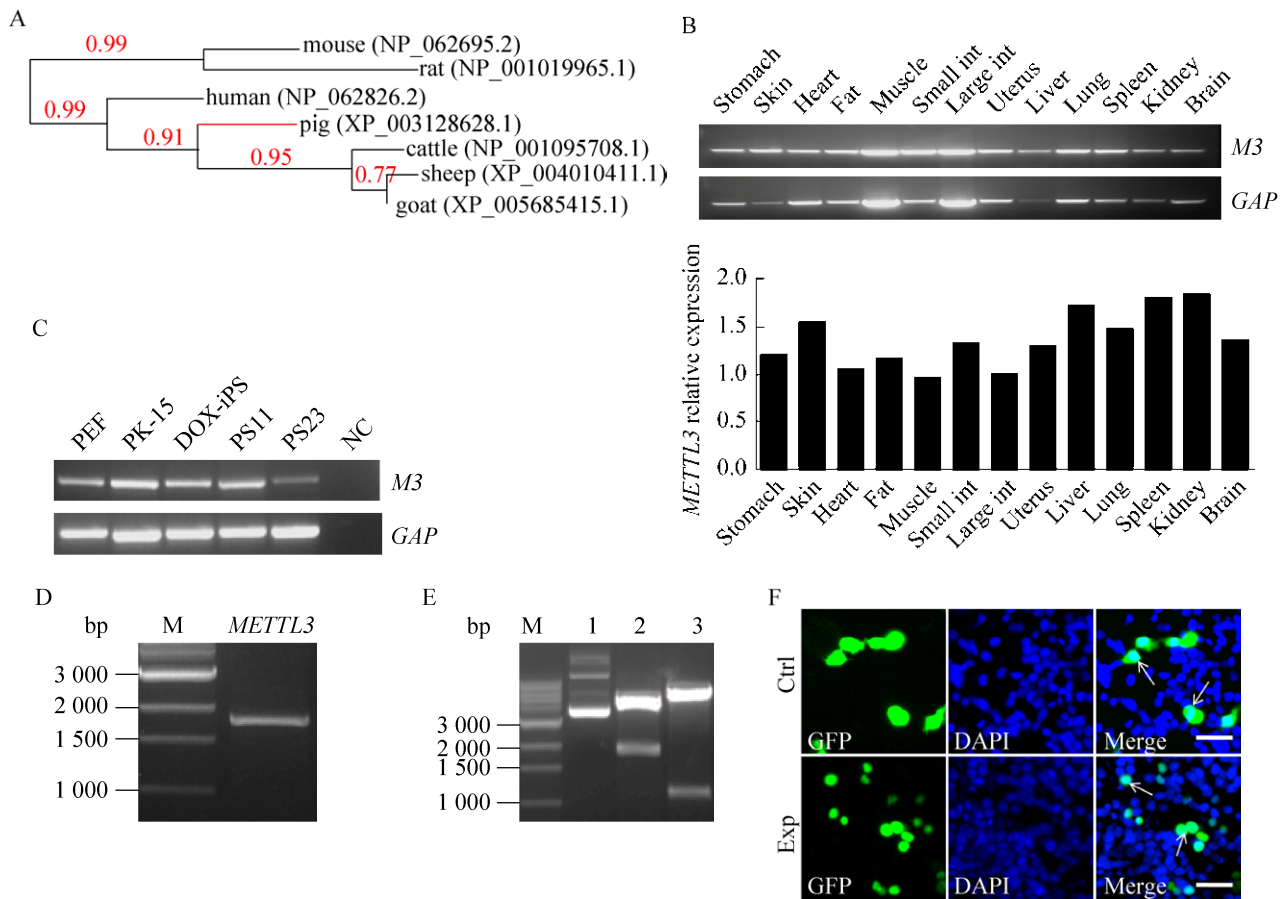


图 1 猪 *METTL3* 表达谱和分子克隆

Fig. 1 Porcine *METTL3* expression profile and cloning. (A) Phylogenetic tree of *METTL3*. (B–C) RT-PCR and densitometry analysis of porcine *METTL3* expression in different tissues (B) and cells (C). *M3*: *METTL3*. *GAP*: *GAPDH*. (D) Cloning of porcine *METTL3* (1 859 bp). M: DNA marker. (E) Enzyme digestion analysis. 1: uncut pEGEP-*METTL3*. 2: pEGEP-*METTL3* digested with *Xho* I / *Hind* III. 3: pEGEP-*METTL3* digested with *Bgl* II / *Nde* I. (F) Translocation of EGFP-*METTL3* fusion protein in HEK293T cells. Scale bar=50 μ m.

2.2 过表达 *METTL3* 对多能基因表达的调控

将 pCDH-*METTL3* 过表达载体转染 HEK293T 细胞包装病毒, 感染多能干细胞 DOX-iPS, 设定感染了空载体 pCDH 的多能干细胞为对照组。在荧光显微镜下观察到过表达载体 pCDH-*METTL3* 成功感染 DOX-iPS (图 2A)。与对照组相比, RT-PCR 检测到

METTL3 在 DOX-iPS 中表达量升高 (图 2B), 经 qRT-PCR 确认 *METTL3* 表达升高 8.41 倍 (图 2C)。显微镜观察结果显示, 细胞形态未发生显著变化, 但是, AP 染色结果显示, 实验组细胞碱性磷酸酶活性比对照组低 (图 2D)。qRT-PCR 结果显示, 实验组 *OCT4* 和 *LIN28A* 的表达水平变化不显著 (图 2E)。

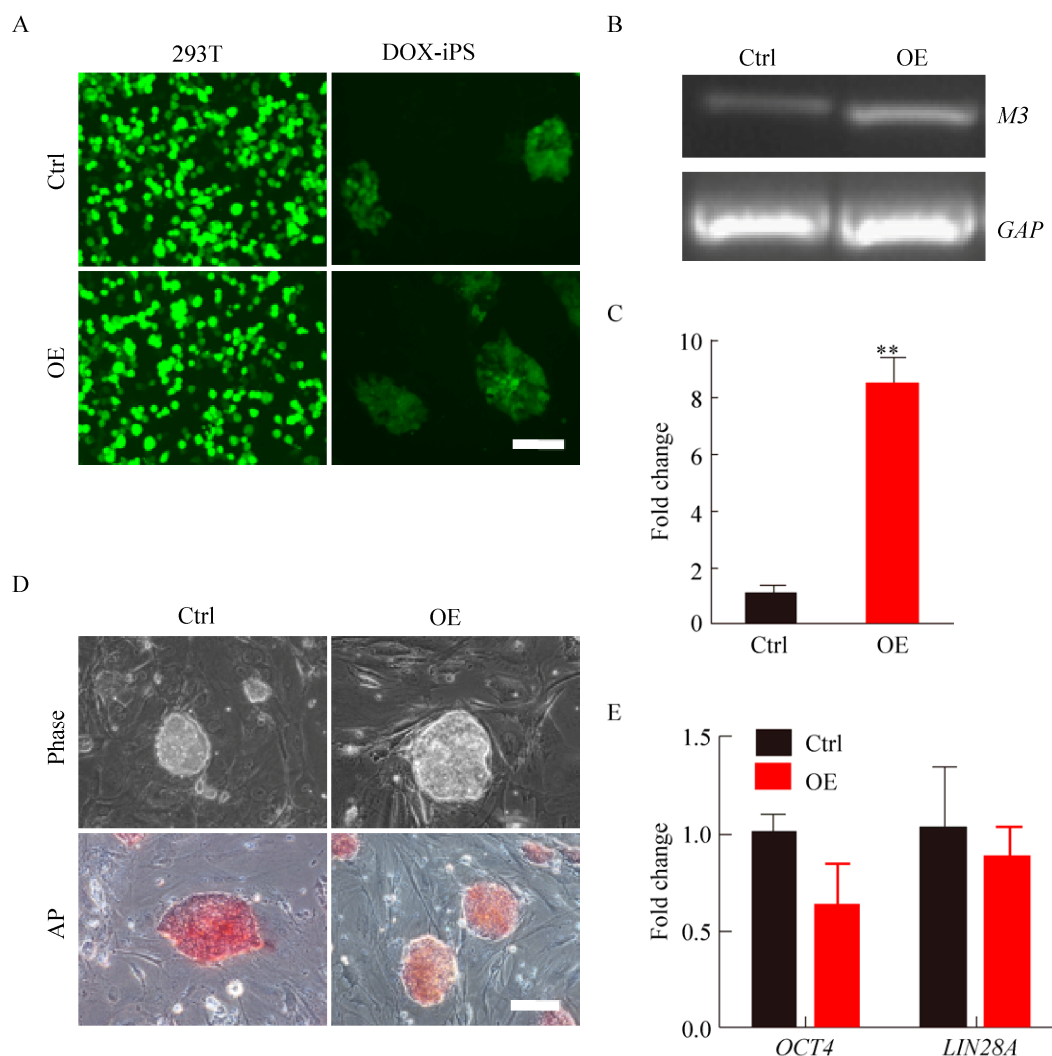


图 2 过表达 *METTL3* 对多能基因表达的调控

Fig. 2 Expression of pluripotent genes in iPS with *METTL3* overexpression. (A) Infection of pCDH (Ctrl) and pCDH-*METTL3* (OE) in HEK293T and DOX-iPS. RT-PCR (B) and qRT-PCR (C) analysis of *METTL3* expression in DOX-iPS. (D) Morphology and AP staining of DOX-iPS. (E) qRT-PCR analysis of pluripotent genes expression in DOX-iPS. ** $P < 0.01$; $n = 3$. Scale bar = 100 μm .

2.3 干扰 *METTL3* 对多能基因表达的调控

将 pSIH1-copGFP-sh-*METTL3* 干扰载体转染 HEK293T 细胞包装病毒, 感染 PEF 细胞, 设定感染了空载体 pSIH1-copGFP 的细胞为对照组。72 h 后观察证明有较高的感染效率 (图 3A), qRT-PCR 检测结果显示, 72 h 干扰效率达到 49%, 96 h 干扰效率达到了 72% (图 3B)。随后, 通过 HEK293T 细胞将 pSIH1-Puro、pSIH1-Puro-sh-*METTL3* 包装成病毒, 感染 DOX-iPS 细胞。与感

染空载体的对照组相比, RT-PCR 结果显示 *METTL3* 在 DOX-iPS 中表达量降低 (图 3C), qRT-PCR 结果显示 *METTL3* 干扰效率达到 88% (图 3D)。显微镜观察结果显示, 干扰 *METTL3* 后细胞形态变得更紧凑、立体, 边缘整齐, 其碱性磷酸酶活性明显高于对照组 (图 3E)。qRT-PCR 检测干扰 *METTL3* 的 DOX-iPS 中多能基因的表达, 结果显示, *NANOG*、*OCT4* 和 *LIN28A* 的表达水平显著高于对照组 (图 3F)。

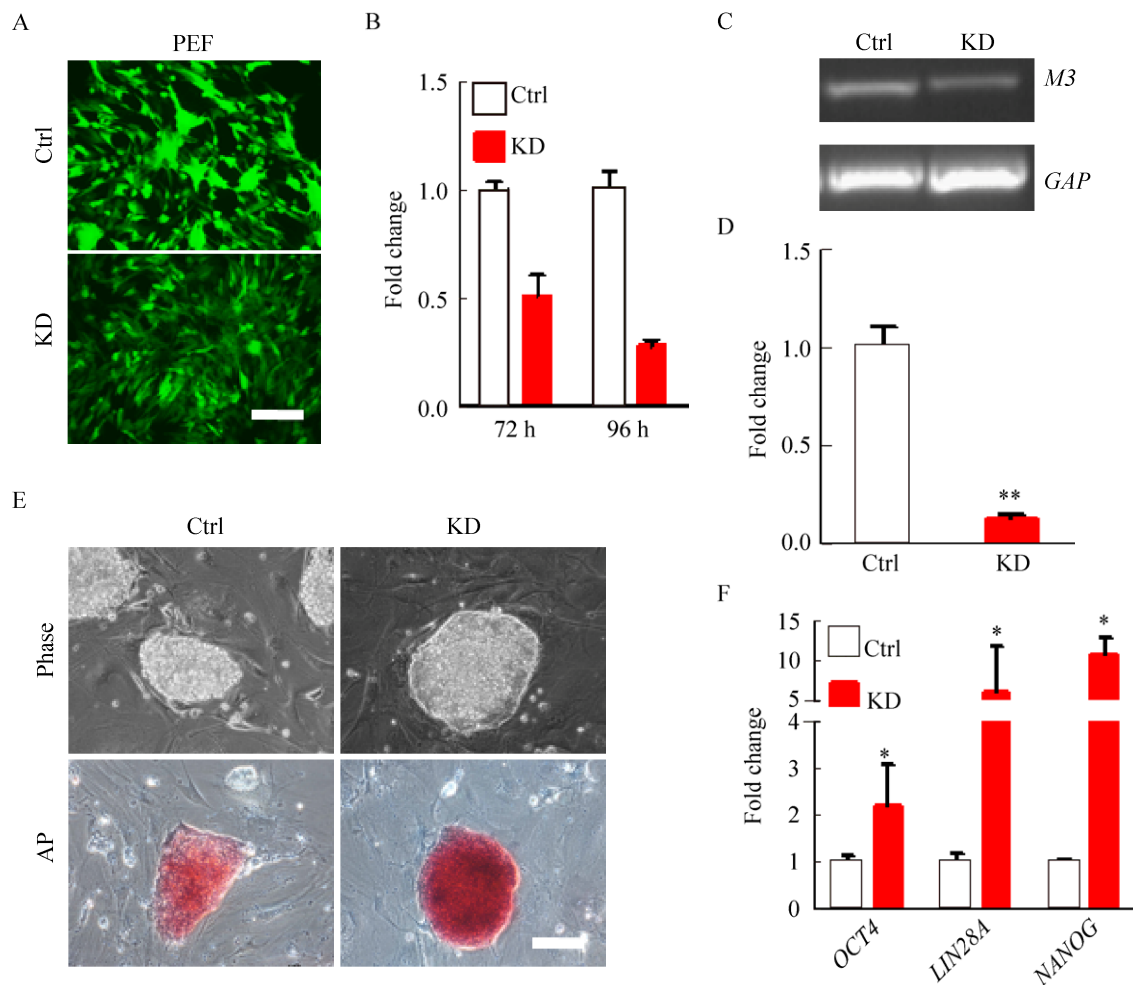


图 3 干扰 *METTL3* 对多能基因表达的调控

Fig. 3 Knockdown of *METTL3* regulates the expression of pluripotent genes in piPS. (A) Infecting of PEF with pSIH1 (Ctrl) and shRNA (KD) for 72 h. Scale bar=200 μ m. (B) qRT-PCR analysis of *METTL3* expression in PEF. (C–D) RT-PCR (C) and qRT-PCR (D) analysis of *METTL3* expression in DOX-iPS. (E) Morphology and AP staining of DOX-iPS. Scale bar=100 μ m. (F) qRT-PCR analysis of pluripotent genes expression in DOX-iPS. * P <0.05; ** P <0.01; n =3.

2.4 添加环亮氨酸对猪干细胞多能基因表达的调控

参考甲基化抑制剂环亮氨酸在小鼠 ES 细胞上的用量^[23], 分别配制了 10 mmol/L 和 20 mmol/L 的环亮氨酸培养基, 用于培养 DOX-iPS 细胞, 并观察其在接种后 1–4 d 的形态学变化。结果显示, DOX-iPS 在 20 mmol/L 环亮氨酸培养基中培养, 细胞克隆形态松散 (图 4A), 并且生长速度缓慢 (图 4B)。因此, 我们又配制了 2 mmol/L、4 mmol/L、10 mmol/L 三个浓度的环亮氨酸培养基, 分别培

养 DOX-iPS 24 h 和 48 h, 观察细胞形态学变化。结果显示, 24 h 和 48 h 的细胞克隆形态均未出现明显改变, 其中 10 mmol/L 实验组的碱性磷酸酶活性强于其他组 (图 4C)。qRT-PCR 检测 48 h 处理组的多能基因表达结果显示, 在 10 mmol/L 培养基中 *NANOG*、*OCT4* 和 *LIN28A* 的表达量显著升高于其他处理组 (图 4D)。这一结果与干扰 *METTL3* 的实验结果相印证, 添加一定浓度 (10 mmol/L) 环亮氨酸, 使猪多能干细胞内源性多能基因的表达水平显著提高。

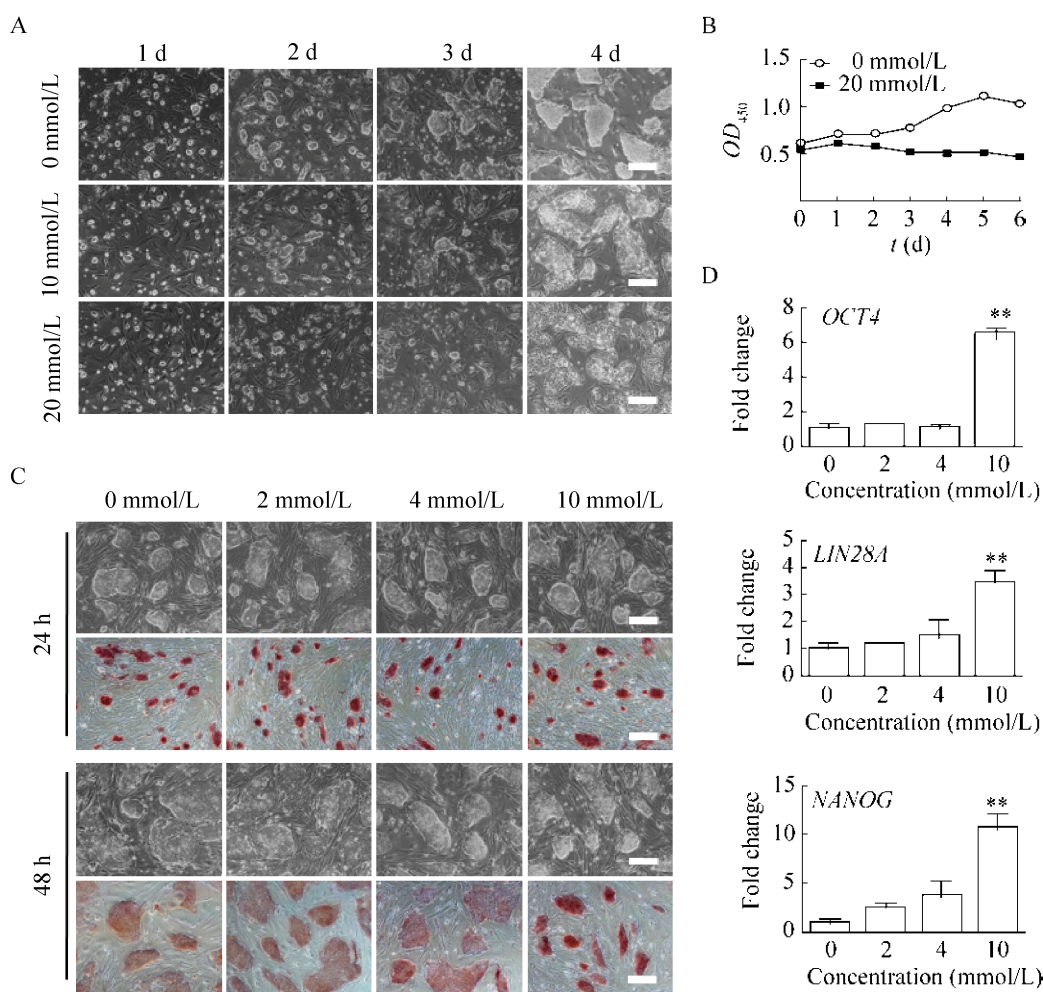


图 4 添加环亮氨酸对多能基因表达的调控

Fig. 4 Expression of pluripotent genes in piPS treated with cycloleucine. (A) Morphology of DOX-iPS. (B) Growth curve of DOX-iPS. (C) Morphology and AP staining of DOX-iPS. (D) qRT-PCR analysis of pluripotent genes expression in DOX-iPS. ** $P < 0.01$, $n = 3$. Scale bar = 200 μm .

3 讨论

目前,发现真核生物 mRNA 的 m⁶A 修饰是由甲基转移酶复合体催化形成的,其中,甲基转移酶 METTL3 广泛分布于各种组织中,与 METTL14/WTAP 共定位于细胞核中的核散斑,甲基转移酶 METTL3、METTL14 和 WTAP 的表达降低都会导致 m⁶A 水平的下降^[11-12,24]。

在小鼠(或人)的胚胎干细胞中,干扰 *Mettl3* 基因后,m⁶A 水平降低,干细胞多能性相关基因 *Nanog*、*Sox2*、*Myc* 等的半衰期延长,促进干性维持^[20]。*Mettl3* 基因敲除小鼠的胚胎干细胞会始终维持在 naïve 阶段,naïve 状态的多能因子表达水平显著升高,维持超多能的状态,在体外虽然能形成类胚体,但在随后发育过程中的分化潜力受到限制^[21]。*METTL3* 蛋白在物种之间有很强的保守性,本实验通过序列比对,也证实了这种保守性。有文献报道,在猪的细胞中,*METTL3* 和环亮氨酸引起的 m⁶A 水平变化,与在小鼠和人的细胞中是一致的,即过表达 *METTL3* 使 m⁶A 水平升高,敲低 *METTL3* 或者添加环亮氨酸,使 m⁶A 水平下降^[25]。本研究中,用构建的 *METTL3* 过表达载体和干扰载体感染 piPSCs,发现过表达 *METTL3* 后,对细胞形态和多能基因 (*OCT4* 和 *LIN28A*) 表达无显著影响,我们推测,可能是由于目前获得的猪 iPSCs 多能基因调控网络与小鼠和人有所不同,多能基因的表达水平本身较低^[26]。敲低 *METTL3* 表达后,出现类似 naïve 样克隆,碱性磷酸酶活性升高,多能基因 *NANOG*、*OCT4*、*LIN28A* 的表达显著升高。此结果表明,降低 *METTL3* 表达有助于维持 piPSCs 细胞的多能性状态。

环亮氨酸是 SAM 转移酶的竞争性抑制剂,猪脂肪细胞经环亮氨酸处理后显著降低 mRNA 的 m⁶A 甲基化水平,从而显著提高了成脂分化相关基因和脂肪酸从头合成相关基因的表达^[27]。环亮

氨酸还能通过降低 m⁶A 水平调控小鼠成纤维细胞的重编程过程^[23]。本实验中,piPSCs 在 10 mmol/L 环亮氨酸培养基中培养 48 h 后,碱性磷酸酶活性升高,多能基因 *NANOG*、*OCT4* 和 *LIN28A* 的表达显著升高。此结果表明,环亮氨酸可以作为辅助成分添加到培养基中,促进和维持 piPSCs 细胞的多能性状态。

为研究 *METTL3* 对猪干细胞中重要多能基因表达的影响,我们建立了一套表达调控检测体系。首先,克隆了猪 *METTL3* 编码区序列,设计合成了 *METTL3* 干扰片段;将上述序列和片段构建相应的慢病毒过表达载体和干扰载体,并通过 PCR 鉴定和测序进行确认;利用 HEK293T 细胞制备慢病毒颗粒,并感染多能干细胞;最后,通过过表达和敲低 *METTL3*,观察其对多能基因表达和干细胞多能状态的影响。本研究建立的这一体系为进一步探索 *METTL3* 及 m⁶A 甲基化对猪多能干细胞的调控作用提供了基础研究手段。

综上所述,本研究表明降低 *METTL3* 表达或添加环亮氨酸能够显著提高猪干细胞内源性多能基因的表达水平,为优化猪多能干细胞培养体系提供了新的方向和实验依据,为进一步研究 m⁶A 修饰对表观遗传状态的影响建立了基础。

REFERENCES

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676.
- [2] Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 487–492.
- [3] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861–872.
- [4] Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917–1920.
- [5] Liu HS, Zhu FF, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey

- fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 587–590.
- [6] Cheng D, Guo YJ, Li ZZ, et al. Porcine induced pluripotent stem cells require LIF and maintain their developmental potential in early stage of embryos. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e51778.
- [7] Ezashi T, Telugu BPVL, Roberts RM. Induced pluripotent stem cells from pigs and other ungulate species: an alternative to embryonic stem cells? *Reprod Domest Anim*, 2012, 47(Suppl 4): 92–97.
- [8] Brevini T, Pennarossa G, Maffei S, et al. Pluripotency network in porcine embryos and derived cell lines. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47(Suppl 4): 86–91.
- [9] Narayan P, Ayers DF, Rottman FM, et al. Unequal distribution of N⁶-methyladenosine in influenza virus mRNAs. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(4): 1572–1575.
- [10] Yue YN, Liu JZ, He C. RNA N⁶-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes Dev*, 2015, 29(13): 1343–1355.
- [11] Liu JZ, Yue YN, Han DL, et al. A *METTL3*-*METTL14* complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 93–95.
- [12] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 2014, 24(2): 177–189.
- [13] Jia GF, Fu Y, Zhao X, et al. N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12): 885–887.
- [14] Zheng GQ, Dahl JA, Niu YM, et al. *ALKBH5* is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49(1): 18–29.
- [15] Wang X, Lu ZK, Gomez A, et al. N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505(7481): 117–120.
- [16] Cao GC, Li HB, Yin ZN, et al. Recent advances in dynamic m⁶A RNA modification. *Open Biol*, 2016, 6(4): 160003.
- [17] Du H, Zhao Y, He JQ, et al. YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nat Commun*, 2016, 7: 12626.
- [18] Wang X, Feng J, Xue Y, et al. Structural basis of N⁶-adenosine methylation by the *METTL3*-*METTL14* complex. *Nature*, 2016, 534(7608): 575–578.
- [19] Bokar JA, Rath-Shambaugh ME, Ludwiczak R, et al. Characterization and partial purification of mRNA N⁶-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *J Biol Chem*, 1994, 269(26): 17697–17704.
- [20] Batista PJ, Molinie B, Wang JK, et al. m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(6): 707–719.
- [21] Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, et al. m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 2015, 347(6225): 1002–1006.
- [22] Rottman FM, Bokar JA, Narayan P, et al. N⁶-adenosine methylation in mRNA: substrate specificity and enzyme complexity. *Biochimie*, 1994, 76(12): 1109–1114.
- [23] Chen T, Hao YJ, Zhang Y, et al. m⁶A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(3): 289–301.
- [24] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 2012, 485(7397): 201–206.
- [25] Wang XX, Zhu LN, Chen JQ, et al. mRNA m⁶A methylation downregulates adipogenesis in porcine adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 459(2): 201–207.
- [26] Liu YJ, Ma YY, Yang JY, et al. Comparative gene expression signature of pig, human and mouse induced pluripotent stem cell lines reveals insight into pig pluripotency gene networks. *Stem Cell Rev Rep*, 2014, 10(2): 162–176.
- [27] Zhu LN. Effect of FTO, *METTL3* gene expression on mRNA m⁶A methylation and lipid metabolism in porcine subcutaneous adipocytes[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014 (in Chinese).
朱琳娜. FTO、*METTL3* 基因表达对猪脂肪细胞 mRNA N⁶-甲基腺苷水平及脂肪沉积的影响研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.

(本文责编 陈宏宇)