

# 转录因子 NKX2.1 促进诱导多能干细胞向肺干细胞的分化

邓丽, 刘洋, 王慧, 杨秋, 董明清

<https://doi.org/10.12307/2025.566>

投稿日期: 2024-08-05

采用日期: 2024-11-12

修回日期: 2024-12-23

在线日期: 2025-01-07

中图分类号:

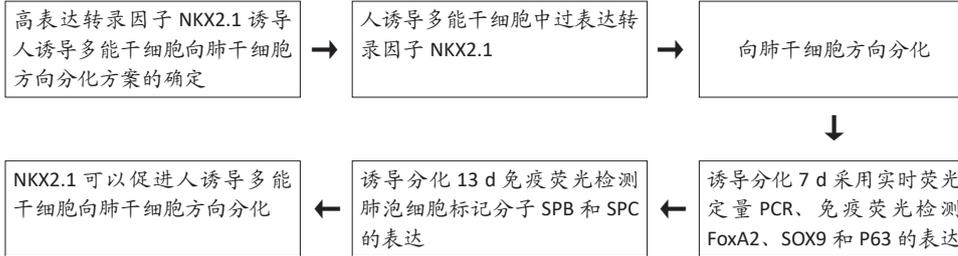
R459.9; R318; R563

文章编号:

2095-4344(2025)36-07790-07

文献标识码: A

## 文章快速阅读: NKX2.1 对人诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化的影响



## 文题释义:

**NKX2.1:** 是由位于人类第14号染色体上的基因编码的一种转录因子, 参与调节形态发生, 特别是甲状腺、肺和大脑发育过程中基因的表达。前期研究表明, NKX2.1是肺上皮分化过程中最早的标志物, NKX2.1缺失会导致肺发育不全。

**肺干细胞:** 是指存在于肺部的特定细胞类型, 具有自我更新和分化成多种类型肺细胞的能力。

## 摘要

**背景:** 如何促进诱导多能干细胞向肺干细胞分化对肺损伤修复具有重要意义。NKX2.1是肺上皮分化过程中最早的标志物, 在肺发育过程中发挥重要调控作用, 然而其表达对诱导多能干细胞向肺干细胞分化的影响还知之甚少。

**目的:** 探究NKX2.1对诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化的影响。

**方法:** 体外培养人诱导多能干细胞, 采用实时荧光定量PCR和免疫荧光检测多能干细胞特异基因的表达; 通过瞬时转染向人诱导多能干细胞中过表达NKX2.1, 再诱导其向肺干细胞方向分化, 诱导分化7 d采用实时荧光定量PCR、免疫荧光检测FoxA2、SOX9和P63的表达, 诱导分化13 d采用免疫荧光检测肺泡细胞标记分子SPB和SPC的表达。

**结果与结论:** ①诱导多能干细胞紧密集落呈典型克隆样生长, 显著高表达干细胞特异表达基因OCT-4、SOX2和NANOG; ②与未转染对照组相比, 过表达NKX2.1组人诱导多能干细胞中NKX2.1表达显著升高( $P < 0.0001$ ); ③诱导分化7 d, 与未转染对照组相比, 过表达NKX2.1组肺干细胞相关标记物FoxA2、SOX9和P63的表达显著升高( $P < 0.0001$ ); ④诱导分化13 d, 与未转染对照组相比, 过表达NKX2.1组肺泡细胞标记分子SPB和SPC荧光强度显著增加。结果表明NKX2.1可以促进诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化。

**关键词:** 诱导多能干细胞; 肺干细胞; NKX2.1; 定型内胚层; 前肠内胚层; 肺损伤; 工程化干细胞

## Transcription factor NKX2.1 promotes differentiation of induced pluripotent stem cells into lung stem cells

Deng Li, Liu Yang, Wang Hui, Yang Qiu, Dong Mingqing

Center for Medicine Research and Translation, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

Deng Li, PhD, Assistant researcher, Center for Medicine Research and Translation, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

**Corresponding author:** Dong Mingqing, MD, Professor, Center for Medicine Research and Translation, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Enhancing the differentiation of induced pluripotent stem cells into lung stem cells is crucial for repairing lung injuries. NKX2.1 is the earliest marker of lung epithelial differentiation and plays a significant regulatory role in lung development. However, the impact of its expression on the differentiation of induced pluripotent stem cells into lung stem cells remains inadequately understood.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of NKX2.1 on the differentiation of induced pluripotent stem cells into lung stem cells.

**METHODS:** Induced pluripotent stem cells were cultured *in vitro*. The expression of specific pluripotent stem cell genes was assessed using real-time fluorescence quantitative PCR. NKX2.1 was overexpressed in induced pluripotent stem cells, which were then induced to differentiate into lung stem cells. The

成都市第五人民医院医学研究与转化中心, 四川省成都市 611130

**第一作者:** 邓丽, 女, 1988年生, 云南省昭通市人, 汉族, 2023年电子科技大学毕业, 博士, 助理研究员, 主要从事干细胞定向分化和组织工程相关基础研究。

**通讯作者:** 董明清, 博士, 教授, 成都市第五人民医院医学研究与转化中心, 四川省成都市 611130

<https://orcid.org/0000-0002-1369-2128> (邓丽)

**基金资助:** 四川省科技厅自然科学基金项目 (2023NSFC0531), 项目负责人: 董明清; 成都市高水平临床重点专科建设项目

(KYJJ2021-27), 项目负责人: 董明清; 成都中医药大学“杏林学者”医院专项 (XJ20230100001), 项目负责人: 邓丽

**引用本文:** 邓丽, 刘洋, 王慧, 杨秋, 董明清. 转录因子 NKX2.1 促进诱导多能干细胞向肺干细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7790-7796.



expression of FoxA2, SOX9, and P63 was determined via quantitative PCR and immunofluorescence on day 7 of induction of differentiation. The expression of the alveolar marker SPB and SPC was evaluated through immunofluorescence staining on day 7 of induction of differentiation.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Induced pluripotent stem cells *in vitro* were tightly packed and showed typical clonoid growth and significantly expressed stem cell-specific genes OCT-4, SOX2, and NANOG. (2) Compared with the non-transfected control group, the expression of NKX2.1 in human induced pluripotent stem cells was significantly increased in the NKX2.1 overexpression group ( $P < 0.0001$ ). (3) Seven days after induction of differentiation, compared with the non-transfected control group, the expression of lung stem cell-related markers FoxA2, SOX9, and P63 was significantly increased in the NKX2.1 overexpression group ( $P < 0.0001$ ). (4) Thirteen days after induction of differentiation, compared with the non-transfected control group, the fluorescence intensity of alveolar cell marker molecules SPB and SPC increased significantly in the overexpression NKX2.1 group. The results show that NKX2.1 can promote the differentiation of induced pluripotent stem cells into lung stem cells.

**Key words:** induced pluripotent stem cell; lung stem cell; NKX2.1; definitive endoderm; foregut endoderm; lung injury; engineered stem cell

**Funding:** Natural Science Foundation of Sichuan Provincial Department of Science and Technology, No. 2023NSFSC0531 (to DMQ); Chengdu High-Level Clinical Key Specialty Construction Project, No. KYJ2021-27 (to DMQ); Chengdu University of Traditional Chinese Medicine "Xinglin Scholar" Hospital Special Project, No. XJ2023010001 (to DL)

**How to cite this article:** DENG L, LIU Y, WANG H, YANG Q, DONG MQ. Transcription factor NKX2.1 promotes differentiation of induced pluripotent stem cells into lung stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7790-7796.

## 0 引言 Introduction

肺损伤及肺纤维化等难治性肺病的发病机制复杂,目前临床药物特异性和靶向性较差,治疗效果并不理想<sup>[1-3]</sup>,因此迫切需要开发治疗这类疾病的新药物和治疗方法。成体干细胞和祖细胞在维持特定器官的细胞稳态中发挥着重要作用,同时也参与疾病状态下的组织修复<sup>[4-6]</sup>。通过将器官特异性干细胞引入体内,用于修复、补充或替代受损细胞的方法,即干细胞治疗,为传统治疗效果不佳的难治性疾病提供了新希望。

在肺部损伤修复过程中,具有肺上皮分化潜能的肺干细胞进入肺组织后能够分化为肺部结构细胞(如气道上皮细胞和肺泡上皮细胞),从而替代、补充和修复受损的肺细胞,在肺损伤治疗中表现出了良好的应用前景<sup>[7-8]</sup>。然而,成体肺脏中肺干细胞数量较少、取材过程具有创伤性、在慢性肺病状态下其功能可能会受到影响等因素限制了肺干细胞治疗的深入研究和临床应用<sup>[1]</sup>。诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的出现为获取包括肺干细胞在内的器官特异性干细胞提供了新途径。诱导多能干细胞可以通过重编程患者的体细胞获得,具有与胚胎干细胞相似的多能性和无限增殖能力。通过模拟器官发育过程中的信号作用模式,可以将诱导多能干细胞诱导分化为不同发育阶段的器官特异性干细胞,实现个性化的干细胞靶向治疗<sup>[9-11]</sup>。目前,研究人员已通过体外一系列步骤再现胚胎发育的关键阶段,即定向分化,实现胚胎干细胞、间充质干细胞和诱导多能干细胞等向感兴趣的细胞和组织谱系方向分化<sup>[12-16]</sup>。ALBER等<sup>[17]</sup>构建了一种Tbx4肺增强子示踪的小鼠诱导多能干细胞,定向诱导其进入早期肺间质,这些诱导多能干细胞衍生的肺间充质祖细胞与原代小鼠胚胎肺间充质具有相同的转录特征,并且能够分化为更成熟的间充质谱系。KANAGAKI等<sup>[18]</sup>通过Wnt信号抑制诱导多能干细胞向肺泡I型细胞定向分化。然而,这些方法都存在诱导周期长且获得肺干细胞数量有限等限制,未能满足临床应用

需求。因此,探究肺干细胞分化的机制,寻找更快、更利于肺干细胞分化的方法具有重要现实意义。

NKX2.1,也被称为TTF-1,是由位于人类第14号染色体上的基因编码的一种转录因子,参与调节形态发生,特别是甲状腺、肺和大脑发育过程中基因的表达<sup>[17]</sup>。研究表明,NKX2.1是肺上皮分化过程中最早的标志物,它的缺失会导致肺发育不全<sup>[18-21]</sup>。急性损伤后肺上皮细胞的再生需要多种细胞的协调来形成形态复杂的肺泡气体交换表面,而NKX2.1是肺泡上皮祖细胞的关键调控因子。NKX2.1表观遗传的动态维持是控制肺泡上皮祖细胞中选择性祖细胞活性的关键因素。在成年肺再生过程中,Wnt响应的肺泡上皮祖细胞增殖并转化为肺泡I型/II型细胞的过程受NKX2.1差异性活性的调控<sup>[22-27]</sup>。然而,通过差异表达NKX2.1以调节人诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化的研究尚不明确。因此,该研究尝试在人诱导多能干细胞中过表达NKX2.1,旨在探究NKX2.1表达对人诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化实验。

1.2 时间及地点 实验于2023年1月至2024年6月在成都市第五人民医院医学研究与转化中心完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞株 成纤维细胞、人诱导多能干细胞株购自四川康克俞生物科技有限公司。

1.3.2 实验试剂和仪器 人诱导多能干细胞维持自我更新完全培养基、Vitronectin包被蛋白、细胞冻存液、细胞消化液(中国中盛溯源生物科技有限公司);DPBS、DMEM/F12、GlutaMax-supplemented DMEM/F12、RPMI 1640(美国GIBICO公司);转染试剂Lipofectamine 2000(美国ThermoFisher公司);Activin A(美国R&D Systems公司);Noggin、成纤维生长因子7、成纤维生长因子4和骨形态发生蛋白4(美国Stemimmune LLC公司);SB431542(英

国 Tocris 公司); CHIR99021 (加拿大 Stem Cell Technologies 公司); SPB 抗体、FoxA2 抗体、SOX9 抗体、P63 抗体、SPC 抗体、NKX2.1 抗体 (中国博奥森生物公司); Anti-Mouse/Rabbit 荧光二抗、GAPDH 抗体、DAPI (中国华安生物公司); 总 RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (中国诺维赞生物公司); 实时荧光定量 PCR 引物 (中国擎科生物公司); NKX2.1 过表达质粒 (中国生工公司); 倒置相差荧光显微镜 (日本奥林巴斯)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 人诱导多能干细胞培养** 提前加入 Vitronectin 包被蛋白于 6 孔板中孵育过夜, 传代前弃包被蛋白。将人诱导多能干细胞用 DPBS 轻洗 1 次, 加入细胞消化液至细胞变圆时终止消化, 3 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 细胞沉淀用人诱导多能干细胞培养基重悬, 以  $3 \times 10^5/\text{cm}^2$  密度接种于处理过的 6 孔板中, 加入人诱导多能干细胞培养基, 置于 37 °C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中, 每天换液 1 次, 每两三天传代 1 次, 通过光学显微镜观察细胞及克隆形态, RT-qPCR 检测 OCT4、NANOG 和 SOX2 mRNA 表达水平, 引物序列见表 1; 免疫荧光观察 OCT4、NANOG 和 SOX2 蛋白表达水平。

表 1 | RT-qPCR 引物  
Table 1 | RT-qPCR primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
GAPDH	Forward: ACA TCG CTC AGA CAC CAT G Reverse: TGT AGT TGA GGT CAA TGA AGG G
OCT4	Forward: TCT CCC ATG CAT TCA AAC TGA G Reverse: CCT TTG TGT TCC CAA TTC CTT C
NANOG	Forward: GAA ATA CCT CAG CCT CCA GC Reverse: GCG TCA CAC CAT TGC TAT TC
SOX2	Forward: TAC AGC ATG TCC TAC TCG CAG Reverse: GAG GAA GAG GTA ACC ACA AGG G
NKX2.1	Forward: CTG CTC CAC CTT GCT ATA CG Reverse: GTT AAG AAA AGT CGA AGC GCG
FoxA2	Forward: TTT TAA ACT GCC ATG CAC TCG Reverse: TTC ATG TTG CTC ACG GAG G
SOX9	Forward: ACT TGC ACA ACG CCG AG Reverse: CTG GTA CTT GTA ATC CGG GTG
P63	Forward: TTC GGA CAG TAC AAA GAA CGG Reverse: GCA TTT CAT AAG TCT CAC GGC

**1.4.2 瞬时转染建立过表达 NKX2.1 人诱导多能干细胞** 人诱导多能干细胞分为 2 组: 未转染对照组, 过表达 NKX2.1 组。根据说明书, 采用 Lipofectamine 2000 将 NKX2.1 过表达质粒转染入第 15 代人诱导多能干细胞中, 转染 4-6 h 后更换新鲜完全培养基, 培养 48, 96 h 采用 RT-qPCR 检测 NKX2.1 mRNA 表达, 引物序列见表 1; 培养 72 h 采用 Western blot 检测 NKX2.1 蛋白表达。

**1.4.3 人诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化** 参照 GHAEDI 等<sup>[28]</sup> 和 YAMAMOTO 等<sup>[29]</sup> 的方法, 采用单层细

胞贴壁法对未转染对照组和过表达 NKX2.1 组人诱导多能干细胞进行诱导分化。人诱导多能干细胞消化后以  $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$  密度接种于 Vitronectin 包被蛋白处理过的 6 孔板中, 24 h 后将细胞培养基更换为 RPMI 1640 添加 Activin A(100 ng/mL) 培养 3 d, 更换培养基为 GlutaMax-supplemented DMEM/F12 添加 Noggin(200 ng/mL) 和 SB431542 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 培养 4 d, 更换培养基为 GlutaMax-supplemented DMEM/F12 添加 CHIR99021(3  $\mu\text{mol/L}$ )、成纤维生长因子 7(10 ng/mL)、成纤维生长因子 4(10 ng/mL) 和骨形态发生蛋白 4(20 ng/mL) 培养 6 d。诱导方案如图 1 所示。

**1.4.4 Western blot 检测** 人诱导多能干细胞转染后培养 72 h 检测 NKX2.1 蛋白表达, 细胞刮于冰上收集细胞, 3 500 r/min 离心弃上清, 加适量细胞裂解缓冲液重悬置于冰上裂解 25 min, 每隔 5 min 斡旋 1 次, 4 °C、12 000 $\times g$  离心 10 min, SDS 上样缓冲液重悬制备样本, 通过 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后, 转移到硝酸纤维素膜上, 5% BSA 室温封闭 45 min, 加入 5% BSA 稀释的一抗 (GAPDH 1 : 2 000, NKX2.1 1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜, 室温摇床 TBST 洗膜 5 次, 5 min/次, 加入 2.5% BSA(1 : 5 000) 稀释 HRP 酶标抗兔 / 小鼠二抗抗体室温孵育 1 h, 采用 ECL 试剂盒对膜上目标蛋白进行显影。

**1.4.5 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 检测** 未转染人诱导多能干细胞用于检测 OCT4、NANOG 和 SOX2 mRNA 表达; 人诱导多能干细胞转染后培养 48, 96 h 检测 NKX2.1 mRNA 表达; 人诱导多能干细胞分化培养 7 d 检测 FoxA2、SOX9 和 P63 mRNA 表达。操作步骤如下: 弃培养基, 根据总 RNA 提取试剂盒使用说明书提取细胞 RNA 并测定浓度, 再利用反转录试剂盒得到样本 cDNA, 按照 RT-qPCR 说明书操作, 以人 GAPDH 为内参, 通过  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法对各基因表达进行相对定量分析。引物序列见表 1。

**1.4.6 细胞免疫荧光** 未转染人诱导多能干细胞进行 OCT4、NANOG 和 SOX2 免疫荧光染色; 人诱导多能干细胞分化培养 7 d 进行 FoxA2、SOX9 和 P63 免疫荧光染色; 人诱导多能干细胞分化培养 13 d 进行 SPB、SPC 免疫荧光染色。操作步骤如下: 弃培养基, 在室温下用 PBS 轻洗两三次 (5 min/次), 加入 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗两三次 (5 min/次), 0.25% 免疫染色通透液 TritonX-100 室温孵育 30 min, PBS 轻洗两三次 (5 min/次), 封闭液 3%BSA 室温孵育 1 h, 加入一抗抗体 (由 1% BSA 配置, SPB、SPC、FoxA2、SOX9、P63 按照 1 : 300 稀释, OCT4、NANOG 和 SOX2 按照 1 : 500 稀释) 4 °C 孵育过夜, 弃一抗, PBS 轻洗两三次 (5 min/次), 加入荧光二抗 (由 1% BSA 按照 1 : 1 000 稀释) 室温避光孵育 1 h, DAPI 染色工作液避光室温染色 10 min, PBS 洗两三次 (5 min/次),

荧光显微镜下观察并拍照。通过 Image J 软件对荧光强度进行半定量统计分析。

1.5 主要观察指标 ①人诱导多能干细胞表型及干性标记分子的表达；②人诱导多能干细胞向肺干细胞分化过程中相关标记分子的表达。

1.6 统计学分析 实验数据利用 GraphPad Prism 8.4.0 分析，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，进行 *t* 检验或单因素方差分析， $P < 0.05$  为差异有显著性意义，文章统计学方法已经通过成都市第五人民医院专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 人诱导多能干细胞表型及干性标记分子的表达 如图 2A 所示，人诱导多能干细胞体外传代培养后，显微镜下观察细胞以紧密集结形成典型“干细胞簇”的表型，表明细胞状态良好。如图 2B 所示，人诱导多能干细胞中干性标记分子 OCT4、NANOG 和 SOX2 的 mRNA 表达水平较成纤维细胞显著增加 ( $P < 0.000 1$ )，表明人诱导多能干细胞干性维持良好。如图 2C 所示，免疫荧光检测人诱导多能干细胞中显著表达 NANOG、SOX2 和 OCT4 蛋白。

2.2 瞬时转染获得过表达 NKX2.1 的人诱导多能干细胞 通过 Lipofectamine 2000 转染试剂将 NKX2.1 过表达质粒瞬时转染入人诱导多能干细胞后，分别于 48、96 h 采用 RT-qPCR 检测 NKX2.1 mRNA 表达，72 h 采用 Western blot 检测 NKX2.1 的蛋白表达，见图 3。与未转染对照组相比，过表达 NKX2.1 组细胞中 NKX2.1 mRNA 和蛋白表达明显升高，差异有显著性意义 ( $P < 0.000 1$ )，提示成功转染 NKX2.1 过表达质粒。

2.3 NKX2.1 过表达对人诱导多能干细胞向肺干细胞分化的影响 人诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化要经历定形内胚层、腹部前肠内胚层等阶段<sup>[29]</sup>。与正常的人诱导多能干细胞相比，诱导 7 d 后的未转染对照组和过表达 NKX2.1 组人诱导多能干细胞中均显著高表达肺干细胞相关标记物 FoxA2、SOX9、P63 ( $P < 0.000 1$ )；与未转染对照组相比，过表达 NKX2.1 组 FoxA2、SOX9、P63 的 mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.000 1$ )，见图 4A。此外，免疫荧光染色显示，诱导 7 d 时过表达 NKX2.1 组细胞中显著表达 FoxA2、SOX9 和 P63 蛋白，见图 4B-D。

2.4 NKX2.1 过表达可促进人诱导多能干细胞向肺泡分化为进一步证实 NKX2.1 过表达对人诱导多能干细胞向肺泡方向分化的影响，诱导分化 13 d 通过细胞免疫荧光检测肺泡细胞标记分子 SPB 和 SPC 的表达。如图 5 所示，与未转染对照组相比，NKX2.1 过表达组 SPB 和 SPC 荧光强度明显升高，提示 NKX2.1 过表达可以显著促进人诱导多能干细胞向肺泡方向分化。

## 3 讨论 Discussion

虽然肺移植是终末期肺病患者的一种可能治疗方法，但它受到供肺供应不足、手术创伤和免疫并发症等限制<sup>[30]</sup>。每年有许多患者在供肺等待名单上或因移植并发症而死亡<sup>[31-33]</sup>。体外诱导或分离的成人肺干/祖细胞移植成为替代全器官移植有前景的方法<sup>[34-36]</sup>。然而受体外培养周期长、扩增足够数量细胞困难等限制，寻找更快、更利于肺干细胞分化的方法尤为重要。目前常用的人诱导多能干细胞向肺干细胞分化的诱导方案多为 16-21 d 不等，根据肺干细胞发生的分子机制和特点将该过程简单的分为定形内胚层、腹部前肠内胚层和肺前体多能细胞 3 个阶段<sup>[37]</sup>。FoxA2、SOX9 和 P63 为分化前期阶段所表达的特异性标记蛋白，而 SPB 则是分化后期阶段 II 型肺泡多能细胞所表达的一种特异性生物标记物<sup>[38]</sup>。在肺的发育过程中，肺上皮和间充质前体相互作用，启动了复杂的器官发生发育程序，内胚层谱系中表达的转录因子 FOXA2 常用以标记分化的定形内胚层阶段<sup>[39-40]</sup>。SOX9 是 srybox-containing (SOX) 蛋白家族的一员，P63 为 p53 转录因子家族的成员之一，参与肺干细胞分化的调控，是早期肺祖细胞标志物<sup>[41]</sup>。

在人诱导多能干细胞衍生的肺祖细胞体外分化过程中，多个信号通路参与其中，它们在细胞分化的不同阶段被激活或抑制，最终实现分化<sup>[42]</sup>。KONISHI 等<sup>[43]</sup>发现抑制 Wnt 激活可促进原始 NKX2-1<sup>+</sup> 祖细胞中近端上皮细胞的快速出现，而维持 Wnt 信号可促进远端上皮细胞的形成，早期抑制转化生长因子  $\beta$  信号途径是肺干细胞分化所必须的，作为肺上皮分化过程中最早标志物的转录因子 NKX2.1 可与 Wnt、转化生长因子  $\beta$ 、Notch 等多种信号通路相互作用，调控肺干细胞分化下游相关标志物的表达。为了探究过表达 NKX2.1 对肺干细胞分化的影响，在过表达 NKX2.1 的条件下，通过在不同时间段添加转化生长因子  $\beta$  受体激酶抑制剂 (SB431542) 或 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活剂 (CHIR99021) 等将人诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化，分别在 7 d 和 13 d 时检测了不同阶段特异性标记蛋白的表达。诱导分化 7 d，过表达 NKX2.1 人诱导多能干细胞中肺干细胞早期标志物 FoxA2、SOX9 和 P63 的表达显著高于未转染的人诱导多能干细胞。以往研究中，FoxA2、P63 等早期肺干细胞标志物通常在诱导分化 10-14 d 高表达<sup>[28]</sup>，表明过表达 NKX2.1 可以显著提前启动人诱导多能干细胞向肺干细胞分化。同时，诱导分化 13 d，过表达 NKX2.1 人诱导多能干细胞中明显高表达晚期肺泡细胞标记分子 SPB 和 SPC，表明细胞分化明显提前。以上结果提示，人诱导多能干细胞中 NKX2.1 过表达与其向肺干细胞方向分化呈正相关。

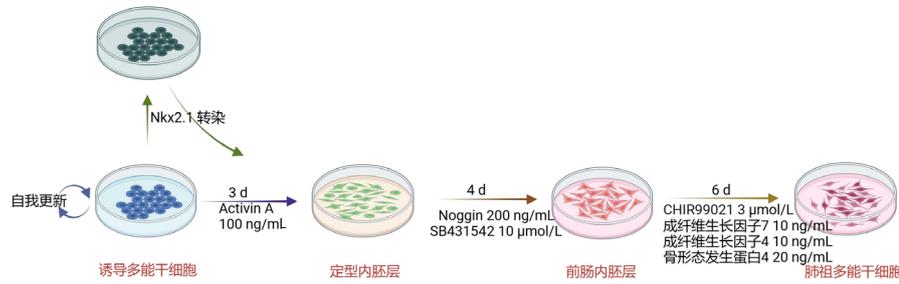


图1 | 人诱导多能干细胞向肺干细胞定向诱导分化流程示意图  
Figure 1 | Schematic diagram of induction of human induced pluripotent stem cell differentiation into lung stem cells

为不同类型肺泡细胞和支持细胞等，增加诱导后细胞向终末分化肺相关细胞分化能力的检测可以更加全面评价过表达 NKX2.1 对人诱导干细胞向肺干细胞分化的影响；其次，肺干细胞是肺损伤修复最有前景的细胞来源，构建肺损伤动物模型并用过表达 NKX2.1 人诱导多能干细胞诱导的肺干细胞进行治疗，从动物水平评价过表达 NKX2.1 人诱导多能干细胞诱导的肺干细胞功能；最后，NKX2.1 是如何调控人诱导干细胞向肺干细胞方向分化仍有待进一步研究。

致谢：感谢成都市第五人民医院医学研究与转化中心全体工作人员的大力支持。  
作者贡献：实验设计董明清，实验实施为邓丽、刘洋、王慧，实验评估为董明清、杨秋，数据统计为邓丽、刘洋。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

- VAZQUEZ-ARMENDARIZ AI, TATA PR. Recent advances in lung organoid development and applications in disease modeling. *J Clin Invest.* 2023;133(22):e170500.
- LEAVY OC, KAWANO-DOURADO L, STEWART ID, et al. Rheumatoid arthritis and idiopathic pulmonary fibrosis: a bidirectional Mendelian randomisation study. *Thorax.* 2024;79(6):538-544.
- OLSON AL, SWIGRIS JJ, SPRUNGER DB, et al. Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease-associated mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(3):372-378.
- GENC AC, OZTURK Z, KARA AB, et al. Assessment of the clinical features of rheumatoid arthritis-related interstitial lung diseases: a retrospective evaluation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2023;27(18):8486-8493.

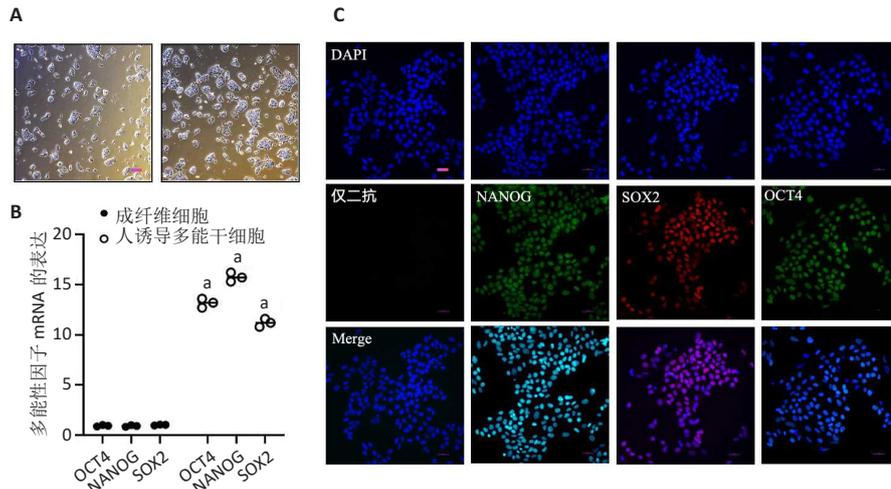


图2 | 人诱导多能干细胞形态及干性标记分子的表达  
Figure 2 | Morphology of human induced pluripotent stem cells and expression of stemness marker molecules

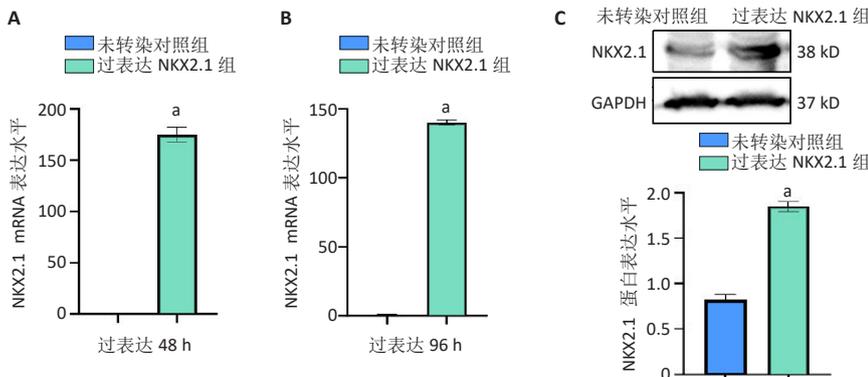
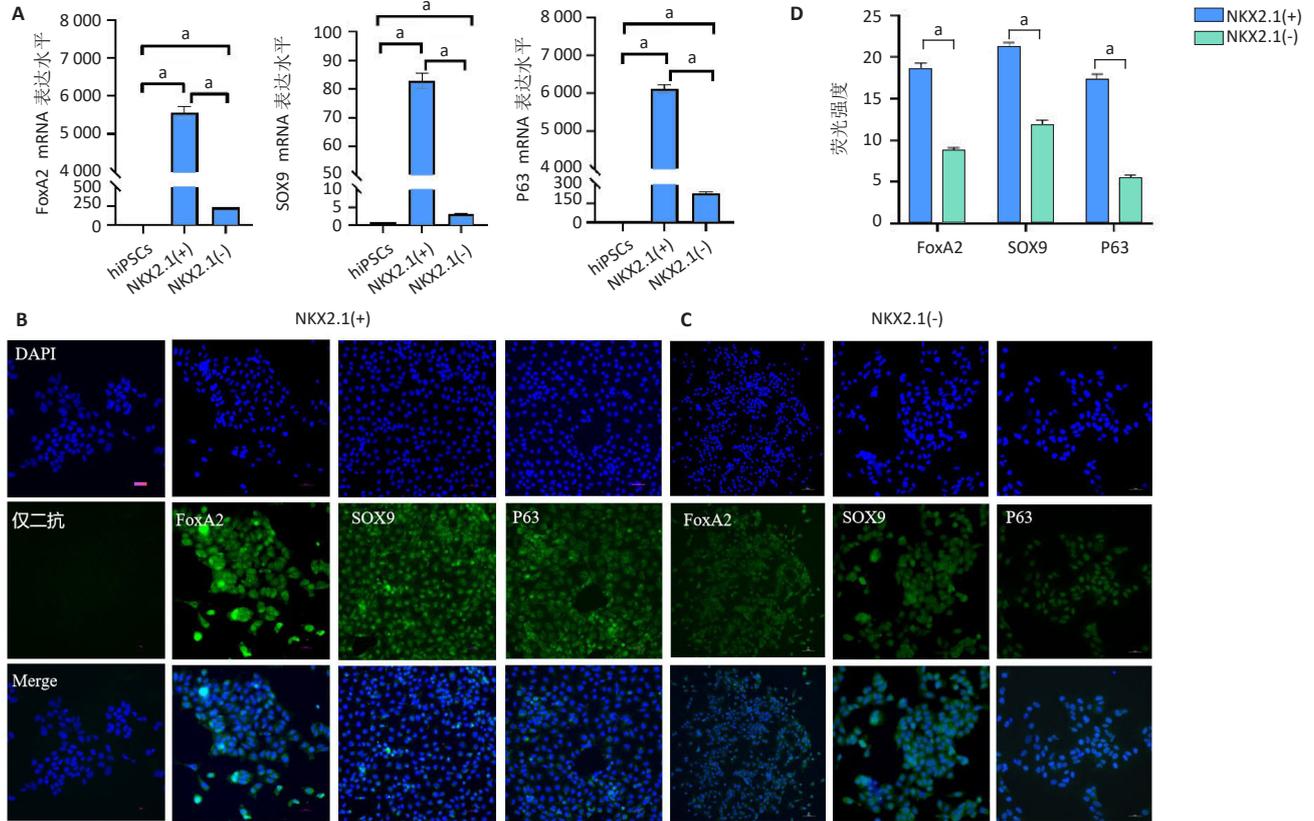


图3 | 人诱导多能干细胞过表达 NKX2.1 质粒的效果  
Figure 3 | Effect of overexpression of NKX2.1 plasmid in human induced pluripotent stem cells

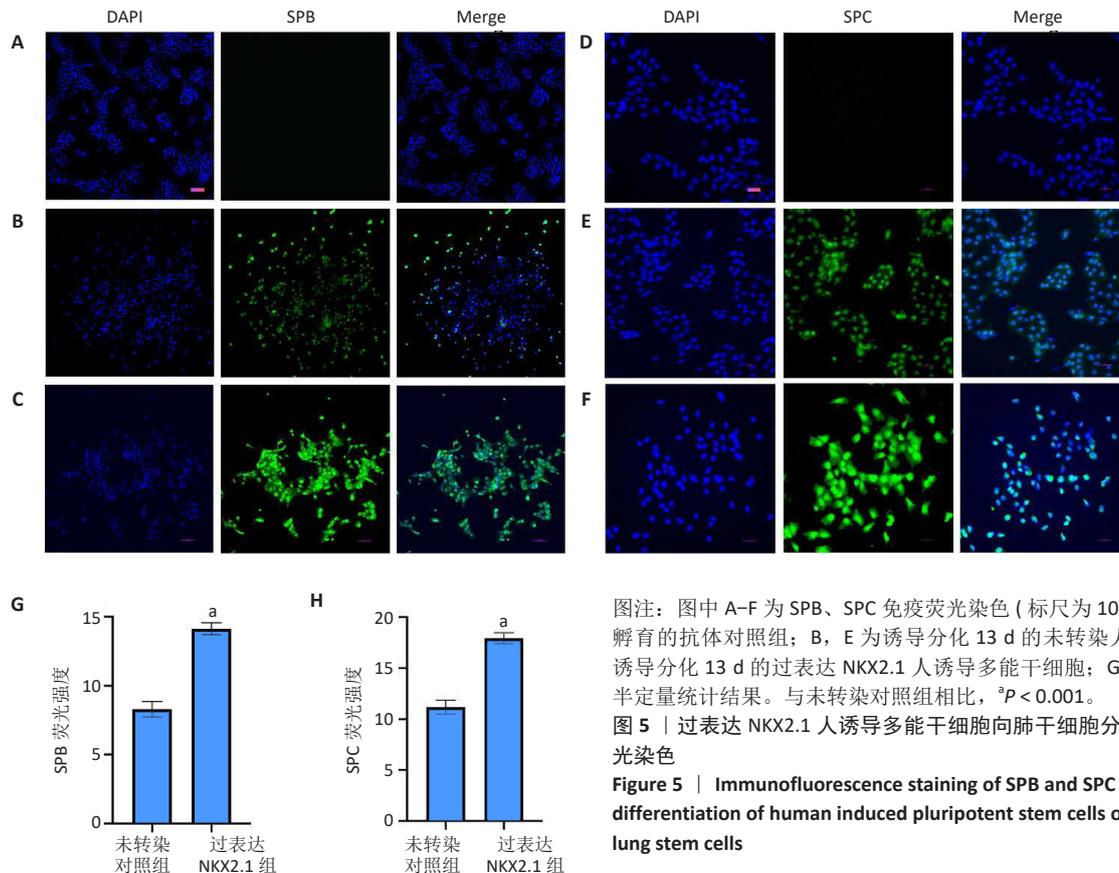
综上，该研究结果表明过表达 NKX2.1 可以缩短人诱导多能干细胞向肺干细胞方向分化的时间，并显著提高分化过程中标记分子的表达，细胞免疫荧光结果同样证明过表达 NKX2.1 可以更高效地促进人诱导多能干细胞向肺泡细胞分化。但该实验也具有一定的局限性：首先，肺干细胞可分化



图注：图中 A 为 RT-qPCR 检测 FoxA2、SOX9 和 P63 mRNA 表达；B、C 为免疫荧光检测 FoxA2、SOX9 和 P63 蛋白表达（标尺为 100 μm）；D 为荧光强度半定量统计结果。hiPSCs 为未诱导的人诱导多能干细胞，NKX2.1(+) 为诱导分化 7 d 的过表达 NKX2.1 人诱导多能干细胞，NKX2.1(-) 为诱导分化 7 d 的未转染人诱导多能干细胞。<sup>a</sup>*P* < 0.01。

图 4 | 过表达 NKX2.1 对人诱导多能干细胞向肺干细胞分化过程中 FoxA2、SOX9、P63 表达的影响

Figure 4 | Effect of overexpression of NKX2.1 on the expression of FoxA2, SOX9, and P63 during differentiation of human induced pluripotent stem cells into lung stem cells



图注：图中 A-F 为 SPB、SPC 免疫荧光染色（标尺为 100 μm），其中 A、D 为仅二抗孵育的抗体对照组；B、E 为诱导分化 13 d 的未转染人诱导多能干细胞；C、F 为诱导分化 13 d 的过表达 NKX2.1 人诱导多能干细胞；G、H 为 SPB 和 SPC 荧光强度半定量统计结果。与未转染对照组相比，<sup>a</sup>*P* < 0.001。

图 5 | 过表达 NKX2.1 人诱导多能干细胞向肺干细胞分化 13 d 后 SPB、SPC 免疫荧光染色

Figure 5 | Immunofluorescence staining of SPB and SPC after 13 days of differentiation of human induced pluripotent stem cells overexpressing NKX2.1 into lung stem cells

- [5] SOLOMON JJ, DANOFF SK, WOODHEAD FA, et al. Safety, tolerability, and efficacy of pirfenidone in patients with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Respir Med.* 2023;11(1):87-96.
- [6] PALOMÄKI A, FINNGEN RHEUMATOLOGY CLINICAL EXPERT GROUP, PALOTIE A, et al. Lifetime risk of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease in MUC5B mutation carriers. *Ann Rheum Dis.* 2021;80(12):1530-1536.
- [7] ALYSANDRATOS KD, GARCIA-DE-ALBA C, YAO C, et al. Culture impact on the transcriptomic programs of primary and iPSC-derived human alveolar type 2 cells. *JCI Insight.* 2023;8(1):e158937.
- [8] DYE BR, DEDHIA PH, MILLER AJ, et al. A bioengineered niche promotes in vivo engraftment and maturation of pluripotent stem cell derived human lung organoids. *Elife.* 2016;5:e19732.
- [9] ANTONI D, BURCKEL H, JOSSET E, et al. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):5517-5527.
- [10] KLEIN SG, SERCHI T, HOFFMANN L, et al. An improved 3D tetra-culture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10:31.
- [11] KÜHL L, GRAICHEN P, VON DAACKE N, et al. Human Lung Organoids-A Novel Experimental and Precision Medicine Approach. *Cells.* 2023;12(16):2067.
- [12] SUN YL, HENNESSEY EE, HEINS H, et al. Human pluripotent stem cell modeling of alveolar type 2 cell dysfunction caused by ABCA3 mutations. *J Clin Invest.* 2024;134(2):e164274.
- [13] KITAMURA T, MISU M, YOSHIKAWA M, et al. Differentiation of embryonic stem cells into lung-like cells using lung-derived matrix sheets. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023;686:149197.
- [14] LI T, SU X, LU P, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Dermcidin-Containing Migrasomes enhance LC3-Associated Phagocytosis of Pulmonary Macrophages and Protect against Post-Stroke Pneumonia. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10(22):e2206432;
- [15] 李强, 张明伟, 李建明, 等. miR-146b 促进诱导多能干细胞向神经元样细胞的分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2018,22(17):2711-2716.
- [16] 伟人悦, 厉雪纯, 李妍, 等. 无血清单层细胞诱导法培养猪诱导多能性干细胞定向分化为血管内皮细胞 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(31):4971-4978.
- [17] ALBER AB, MARQUEZ HA, MA L, et al. Directed differentiation of mouse pluripotent stem cells into functional lung-specific mesenchyme. *Nat Commun.* 2023;14(1):3488.
- [18] KANAGAKI S, IKEO S, SUEZAWA T, et al. Directed induction of alveolar type I cells derived from pluripotent stem cells via Wnt signaling inhibition. *Stem Cells.* 2021;39(2):156-169.
- [19] HEIN RFC, CONCHOLA AS, FINE AS, et al. Stable iPSC-derived NKX2-1+ lung bud tip progenitor organoids give rise to airway and alveolar cell types. *Development.* 2022;149(20):dev200693.
- [20] LAZZARO D, PRICE M, DE FELICE M, et al. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development.* 1991;113(4):1093-1104.
- [21] MINOO P, SU G, DRUM H, et al. Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in *Nkx2.1(-/-)* mouse embryos. *Dev Biol.* 1999; 209(1):60-71.
- [22] LITTLE DR, GERNER-MAURO KN, FLODBY P, et al. Transcriptional control of lung alveolar type 1 cell development and maintenance by NK homeobox 2-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(41):20545-20555.
- [23] KUWAHARA A, LEWIS AE, COOMBES C, et al. Delineating the early transcriptional specification of the mammalian trachea and esophagus. *Elife.* 2020;9:e55526.
- [24] TOTH A, KANNAN P, SNOWBALL J, et al. Alveolar epithelial progenitor cells require *Nkx2-1* to maintain progenitor-specific epigenomic state during lung homeostasis and regeneration. *Nat Commun.* 2023; 14(1):8452.
- [25] LITTLE DR, LYNCH AM, YAN Y, et al. Differential chromatin binding of the lung lineage transcription factor *NKX2-1* resolves opposing murine alveolar cell fates in vivo. *Nat Commun.* 2021;12(1):2509.
- [26] OSTRIN EJ, LITTLE DR, GERNER-MAURO KN, et al.  $\beta$ -Catenin maintains lung epithelial progenitors after lung specification. *Development.* 2018;145(5):dev160788.
- [27] KUSAKABE T, KAWAGUCHI A, HOSHI N, et al. Thyroid-specific enhancer-binding protein/*NKX2.1* is required for the maintenance of ordered architecture and function of the differentiated thyroid. *Mol Endocrinol.* 2006;20(8):1796-1809.
- [28] GHAEDI M, CALLE EA, MENDEZ JJ, et al. Human iPSC cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix. *J Clin Invest.* 2013;123(11):4950-4962.
- [29] YAMAMOTO Y, GOTOH S, KOROGI Y, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPSC cells in organoids. *Nat Methods.* 2017;14(11):1097-1106.
- [30] LIAKOULI V, CIANCIO A, DEL GALDO F, et al. Systemic sclerosis interstitial lung disease: unmet needs and potential solutions. *Nat Rev Rheumatol.* 2024;20(1):21-32.
- [31] BEERS MF, MORRISEY EE. The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2065-2073.
- [32] ALDER JK, BARKAUSKAS CE, LIMJUNYAWONG N, et al. Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(16):5099-5104.
- [33] MATTHAY MA, ARABI Y, ARROLIGA AC, et al. A New Global Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2024;209(1):37-47.
- [34] MATTHAY MA, ZEMANS RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:147-163.
- [35] 李福东, 刘虹, 陈亚君, 等. 肺干细胞向肺泡上皮分化在急性呼吸窘迫综合征中的研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2022,51(6):21-24.
- [36] 张红蕾, 聂宏光. 干细胞治疗肺损伤的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2019,50(4):277-280.
- [37] MILLER AJ, HILL DR, NAGY MS, et al. In Vitro Induction and In Vivo Engraftment of Lung Bud Tip Progenitor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2018;10(1):101-119.
- [38] BEERS MF, MOODLEY Y. When Is an Alveolar Type 2 Cell an Alveolar Type 2 Cell? A Conundrum for Lung Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;57(1):18-27.
- [39] ZHOU L, LIM L, COSTA RH, et al. Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3beta, surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(10):1183-1193.
- [40] MIURA A, SARMAH H, TANAKA J, et al. Conditional blastocyst complementation of a defective *Foxa2* lineage efficiently promotes the generation of the whole lung. *Elife.* 2023;12:e86105.
- [41] WANG Y, MENG Z, LIU M, et al. Autologous transplantation of P63+ lung progenitor cells for chronic obstructive pulmonary disease therapy. *Sci Transl Med.* 2024;16(734):ead13360.
- [42] MCCAULEY KB, HAWKINS F, SERRA M, et al. Efficient Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via Temporal Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell.* 2017;20(6):844-857.e6.
- [43] KONISHI S, GOTOH S, TATEISHI K, et al. Directed Induction of Functional Multi-ciliated Cells in Proximal Airway Epithelial Spheroids from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2016;6(1):18-25.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)

# 转录因子 NKX2.1 促进诱导多能干细胞向肺干细胞的分化

## 文章特色分析

### 一、文章重要性

#### 1. 临床需求导向

肺损伤、肺纤维化等难治性肺病目前缺乏高效治疗方法，肺移植又面临供体短缺与免疫排斥等问题。本研究聚焦于干细胞治疗，特别是利用诱导多能干细胞（iPSCs）分化成肺干细胞，为肺组织修复与再生医学提供了新的细胞来源。

#### 2. 关键调控因子的功能验证

NKX2.1 是肺发育中最早的标志性转录因子，本研究通过实验证实其在促进 iPSCs 向肺干细胞分化中的关键作用，为理解肺干细胞分化的分子机制提供了直接证据。

#### 3. 推动干细胞治疗向临床转化

研究通过过表达 NKX2.1 显著缩短了分化时间并提高了分化效率，为未来规模化、高效制备功能性肺干细胞提供了实验基础，具有明确的转化医学价值。

### 二、创新性特色

#### 1. NKX2.1 的功能强化策略

与以往研究多集中于外源性信号通路调控不同，本研究直接过表达内源性关键转录因子 NKX2.1，从基因层面主动驱动 iPSCs 向肺谱系分化，方法更为直接、高效。

#### 2. 多阶段标志物系统验证

研究不仅检测了早期肺干细胞标志物（FoxA2、SOX9、P63），还进一步验证了晚期肺泡细胞标志物（SPB、SPC），系统性地展示了分化全过程，增强了结论的完整性与说服力。

#### 3. 时间效率的提升

传统肺干细胞分化周期常为 16 - 21 天，本研究在过表达 NKX2.1 的条件下，7 天即可见早期标志物显著上升，13 天可见肺泡标志物表达，显示出加速分化的潜力。

### 三、对学科的启示

#### 1. 转录因子驱动分化的策略值得深入探索

本研究提示，除了调控信号通路外，直接操纵关键转录因子可能是优化干细胞定向分化的有效途径，尤其在提高分化效率与纯度方面。

#### 2. 为肺再生医学提供新型细胞来源

通过 iPSCs 来源的肺干细胞，未来可实现个性化细胞治疗，避免免疫排斥，尤其适用于遗传性肺病或慢性肺损伤患者。

#### 3. 推动肺发育与疾病模型的构建

该分化体系可用于构建肺发育模型或疾病模型，用于研究肺病机制、药物筛选与毒性测试。

#### 4. 跨器官分化机制的借鉴意义

NKX2.1 同样在甲状腺与大脑发育中起作用，本研究策略或可为其他器官的干细胞定向分化提供参考。

### 总结

该研究不仅在理论上深化了对肺干细胞分化调控机制的理解，更在方法上提供了一条高效、可控的 iPSCs 向肺干细胞分化的技术路径，具有显著的基础与临床双重价值，对推动再生医学、干细胞治疗及肺病研究具有重要启示作用。