

hBDNF-GFP 基因转染神经干细胞后 hBDNF 的表达及生物学特性研究

冯东福 刘勇 陈二涛 汪洋 刘天津

【摘要】 目的 探讨慢病毒载体介导人脑源性神经营养因子(hBDNF)和绿色荧光蛋白(GFP)基因转染大鼠神经干细胞(NSCs)后 hBDNF 的表达及其生物学特性的变化。方法 构建 *hBDNF* 和 *GFP* 基因共表达的慢病毒载体并转染 NSCs (hBDNF-GFP-NSCs 组), 同时设 GFP 转染 NSCs 组(GFP-NSCs 组)和未转染的 NSCs 组(NSCs 组)。应用 RT-PCR 和 Western blot 法分别检测 3 组细胞中 hBDNF mRNA 和蛋白的表达; ELISA 检测 hBDNF-GFP-NSCs 组细胞转染前后培养液中 hBDNF 含量的变化; 使用上述 3 组细胞的上清液培养背根神经节(DRG)与 NSCs, 观察 DRG 的生长情况并应用流式细胞法检测 NSCs 分化为神经元的比例。结果 RT-PCR、Western blot 结果显示转染后 7 d hBDNF-GFP-NSCs 组 hBDNF mRNA 和蛋白的表达均明显强于 GFP-NSCs 组和 NSCs 组; ELISA 检测显示 hBDNF-GFP 转染 NSCs 后上清中 hBDNF 含量增加, 第 5 天分泌达最高峰, 与转染前比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 使用 hBDNF-GFP-NSCs 组上清液培养 DRG 和 NSCs, 4 d 后 DRG 很快伸出突起, 流式细胞法检测显示 NSCs 分化为神经元的比例高于其他两组。结论 NSCs 可作为基因转染载体, 被 *hBDNF-GFP* 基因重组慢病毒转染后仍可保持原有生物学特性, 并稳定表达和分泌有生物学活性的 hBDNF 和 GFP。

【关键词】 神经干细胞; 脑源性神经营养因子; 绿色荧光蛋白; 基因转染

【中图分类号】 R329.28 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)08-0785-05

Biological characteristics of rat neural stem cells transfected with human brain-derived neurotrophic factor and green fluorescent protein genes FENG Dong-fu*, LIU Yong*, CHEN Er-tao*, WANG Yang, LIU Tian-jin. *Department of Neurosurgery, Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

【Abstract】 Objective To explore the expression of human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) and green fluorescent protein (GFP) in *hBDNF-GFP* gene-transfected rat neural stem cells (NSCs) and the changes in the biological characteristics of the transfected cells. **Methods** NSCs were transfected with a lentiviral vector carrying *hBDNF* and *GFP* genes (hBDNF-GFP-NSCs) or *GFP* gene only (GFP-NSCs), with normal NSCs as the control. The expression levels of hBDNF mRNA and hBDNF protein in all the 3 groups were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect hBDNF level in the cell culture medium before and after *hBDNF-GFP* gene transfection. Dorsal root ganglion (DRG) neurons and NSCs were cultured with the supernatants of the transfected NSCs and normal NSCs, and the growth status of the DRG neurons was observed and the proportion of NSCs differentiating into neurons determined. **Results** Compared with GFP-NSCs and normal NSCs, hBDNF-GFP-NSCs showed obvious hBDNF overexpression at both mRNA and protein levels 7 days after the transfection. hBDNF content in the supernatant of hBDNF-GFP-NSCs culture increased significantly with time and peaked 5 days after the transfection ($P < 0.05$). Four days after culture in hBDNF-GFP-NSCs supernatant, the DRG neurons and adherent NSCs extended cells processes, and the

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.08.008

基金项目:上海市教委自然科学基金重点项目(04BB23、07ZZ42)

工作单位:201900 上海,上海交通大学医学院附属第三人民医院神经外科(冯东福、刘勇、陈二涛);200025 上海,复旦大学上海医学院解剖与组织胚胎学系(汪洋);200025 上海,中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所(刘天津)

ratio of the NSCs differentiating into neurons was higher in cells cultured in hBDNF-GFP-NSCs supernatant than in those culture in GFP-NSCs and normal NSCs supernatants. **Conclusion** Lentivirus can be used as the vector for *hBDNF* and *GFP* gene transfection into NSCs, and *hBDNF-GFP* gene-transfected NSCs maintain the basic characteristics of NSCs and are capable of stable expression and secretion of hBDNF and GFP.

【Key words】 Stem cells; Brain derived neurotrophic factor; Green fluorescent protein; Gene transfection

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一种多能前体细胞,具有自我更新和多向分化能力,为中枢神经系统疾病的治疗带来了新的希望^[1]。目前对 NSCs 的研究大多集中在诱导分化与移植领域,对 NSCs 进行外源性基因转染的研究占很少部分。而使用慢病毒载体,同时进行人脑源性神经营养因子(human brain derived neurotrophic factor, *hBDNF*)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, *GFP*)基因转染 NSCs 的研究鲜见报道。本研究构建了 *hBDNF-GFP* 基因共表达慢病毒载体,包装病毒后转染脑源性 NSCs,观察其表达 hBDNF 的稳定性和生物学活性的变化,以期对 NSCs 的进一步应用提供实验依据。

材料与方 法

一、材料

孕 14 d SD 大鼠(复旦大学上海医学院实验动物中心提供);高糖 DMEM/F12 培养基、N2、B27(美国 GIBCO 公司);表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)(美国 R&D 公司);兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)一抗、小鼠抗 β -tubulin 一抗(武汉博士德公司);Cy3 标记的羊抗兔 IgG、Cy3 标记的羊抗小鼠 IgG(美国 Sigma 公司);Trizol(美国 Invitrogen 公司);DL2000 Marker(日本 Takara 公司);ECL(美国 Perkin Elmer 公司);HRP 标记的山羊抗兔 IgG(上海康成有限公司);兔抗 hBDNF(美国 Santa Cruz 公司);大鼠 BDNF ELISA 检测试剂盒(美国 Chemcicon 公司)。

二、NSCs 的分离与培养

采用机械分离、无血清选择性培养法培养 NSCs,培养液为含 N2(1:100)、B27(1:50)、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF 和 4 mmol/L 谷氨酰胺的高糖 DMEM/F12(1:1),置 37℃、5%CO₂ 条件下培养,具体步骤参考文献[2]。每天观察细胞,每 3 天半量换液,每 7~10 天传代。

三、慢病毒载体的构建与转染

通过在 PWPXL 的 *Bam*H I 和 *Mlu* I 位点插入 GFP-IRES 序列构建双 GFP 表达的载体

PWPXL-MOD,通过 PCR 方法从人羊膜组织中扩增获得 *hBDNF* 基因,克隆到双 GFP 表达慢病毒载体的 *Mlu* I 和 *Asu* II 中,从而构建成功 GFP-hBDNF 共表达载体(PWPXL-MOD-BDNF)。通过酶切和测序的方法确定正确的克隆,具体操作参考文献[3]。慢病毒的包装:在 10 cm 平板中接种 1×10^7 个对数生长期 293T 细胞,生长至铺满板底 80%时开始磷酸钙转染。取 20 μ g 慢病毒载体(PWPXL-MOD、PWPXL-MOD-hBDNF),10 μ g pMDLg/pRRE,5 μ g pMD2.G,10 μ g pRSV-REV 混合后,加蒸馏水至 250 μ L,再加入等体积 0.5 mol/L CaCl₂ 混匀,缓慢滴加到 500 μ L 2 \times HeBS 中,静置 30 min,将混合液缓慢滴加到 10 mL 培养液中,混匀。37℃、5%CO₂ 条件下培养 14 h 后换液,继续培养 28 h 后收集病毒,4℃ 1500 r/min 离心 15 min 去除细胞碎片,0.45 μ m 滤膜过滤后 4℃ 20 000 r/min 超速离心 90 min,弃上清,沉淀悬浮在 1 mol/L PBS 中分装,-80℃ 保存备用。病毒通过梯度稀释后,取 1 μ L 病毒加入培养液(含 1×10^5 个细胞)转染细胞,通过流式细胞仪检测转染效率,根据公式($1 \times 10^5 \times$ GFP 阳性细胞% $\times 1000/\mu$ L)计算出病毒的滴度大约为(0.1~1) $\times 10^9$ TU/mL。

将 NSCs 吹打成单细胞悬液,调整细胞浓度为每瓶 1×10^6 个/mL,按 1:2 比例加入基因重组慢病毒上清液转染 NSCs (hBDNF-GFP-NSCs 组),同时设 GFP 转染 NSCs 组(GFP-NSCs 组)和未转染的 NSCs 组(NSCs 组)。37℃、5%CO₂ 条件下培养 24 h 后离心,更新干细胞培养液,并调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,继续培养并进行形态学观察。

四、hBDNF 在 NSCs 中的表达情况

1. RT-PCR 检测 hBDNF mRNA 表达:1 mL Trizol 消化转染后 7 d 的细胞制备 RNA,将 RNA 用 MMLV 反转录酶做反转录。以制备的 cDNA 为模板,用 hBDNF 及 GFP 和 β -actin 引物扩增,引物序列分别为:hBDNF 上游引物 5'-cggatccgtgatgaccatcc t-3',下游引物 5'-ggtcgactccactatcttccc-3';GFP 上游引物 5'-cgagctggacggcgacgtaaac-3',下游引物 5'-gc gcttctcgttgggtctttg-3'; β -actin 上游引物 5'-aacgagcg

gttccgatgccttag -3', 下游引物 5'-tgtcgccttcaccgttccagtt-3'。反应条件:94 °C 5 min;28 个循环:94 °C 1 min,58 °C 1 min,72 °C 1 min;72 °C 10 min。扩增片段长度为:GFP 597 bp,hBDNF 744 bp, β -actin 590 bp。取扩增产物 10 μ L 用 1.5%琼脂糖电泳检测,Marker 为 DL2000,凝胶成像系统拍照。

2. Western blot 检测 hBDNF 蛋白的表达:取转染后 7 d 的细胞,加入 1 mL RIPA 裂解液(含 100 μ g/mL 苯甲基磺酰氟),吹打均匀,12 000 r/min 离心 10 min;取上清液,进行 Western blot 检测。用 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离蛋白(100 V,60 min)电转移到硝酸纤维素膜上;5%脱脂牛奶室温封闭 1 h;将膜孵育在封闭液稀释的兔抗鼠 hBDNF 中(1:500),4 °C 过夜;使用 TBST 缓冲盐溶液洗膜 3 次;加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5000)室温孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次,ECL 显色,压片,显影,定影。

3. ELISA 法检测 hBDNF-GFP 转染 NSCs 前后上清液 hBDNF 的浓度:将转染后的 NSCs 按 1×10^6 /mL 密度接种于 12 孔培养板,每孔 1 mL,分别于转染后 24 h、48 h、72 h、96 h、5 d、7 d、14 d 取上清液,用 ELISA 法进行检测,具体操作参照试剂盒说明书进行,终止反应后置酶标仪测量 450 nm 处吸光度值(A 值),计算 hBDNF 浓度,并与转染前进行比较。

五、hBDNF 的生物学活性检测

1. 对大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)生长的影响:取新生 SD 大鼠 DRG 贴壁培养,分别用培养 7 d 的 NSCs、GFP-NSCs、hBDNF-GFP-NSCs 上清液作为培养基,观察其对 DRG 轴突生长的影响。

2. 对 NSCs 分化的影响:取传代 3 次的 NSCs,分 3 组接种于预包被多聚赖氨酸的培养瓶中贴壁分化,其培养液分别为培养 7 d 的 NSCs、GFP-NSCs、hBDNF-GFP-NSCs 上清液。定时观察其形态学变化,并于 NSCs 贴壁 7 d 后行细胞免疫荧光染色,一抗为小鼠抗 β -tubulin(1:200),二抗为 Cy3 标记的羊抗小鼠 IgG(1:100),流式细胞法测定 β -tubulin 阳性细胞的比例,比较 3 组间的差异。

六、统计学方法

采用 SAS 统计软件包进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间的比较采用单因素方差分析,多个实验组与一个对照组的比较采用 Dunnett-*t* 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、hBDNF-GFP-NSCs 的形态学观察

转染 48 h 后荧光显微镜下即观察到细胞克隆内有散在表达微弱绿色荧光的细胞,随时间延长,阳性数量增多,荧光强度增强,至第 4 天时几乎所有细胞均表达绿色荧光(图 1A)。传代 6 次后神经球仍能表达强烈绿色荧光,贴壁后很快有细胞向周围迁移,且形态上可以分化为神经元样(β -tubulin 阳性细胞)或神经胶质样细胞(GFAP 阳性细胞),均呈红色荧光(图 1B,1C)。

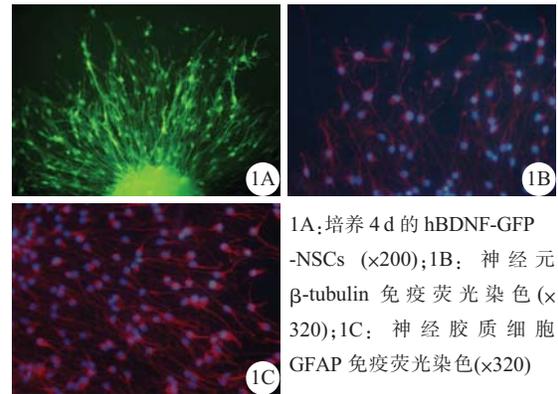
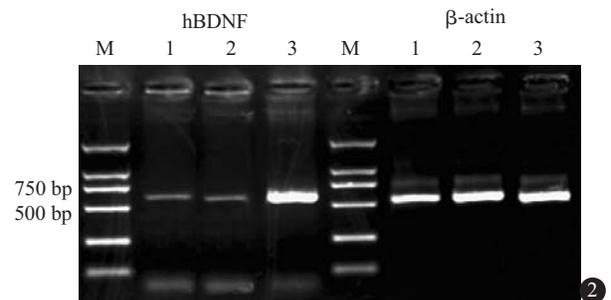


图 1 hBDNF-GFP-NSCs 的贴壁分化鉴定图片

Fig.1 Differentiation of the NSCs and identification of the differentiated cells

二、RT-PCR 检测 hBDNF mRNA 的表达

RT-PCR 检测显示 GFP-NSCs、NSCs 组中 hBDNF mRNA 仅有弱表达,而 hBDNF-GFP-NSCs 组 hBDNF mRNA 表达明显增强(图 2)。



M:DL2000;1:NSCs 组;2:GFP-NSCs 组;3:hBDNF-GFP-NSCs 组

图 2 RT-PCR 检测 hBDNF mRNA 结果

Fig.2 Expression of hBDNF mRNA in the transfected NSCs

三、Western blot 检测 hBDNF 蛋白的表达

Western blot 检测发现 hBDNF-GFP-NSCs 组的 hBDNF 蛋白条带明显较 GFP-NSCs 组、NSCs 组增强,而后二者之间的条带无明显差异(图 3)。

四、ELISA 检测 NSCs 上清中 hBDNF 的含量

hBDNF-GFP 转染 NSCs 前后上清中 hBDNF 的含量不同,与转染前比较,hBDNF-GFP 转染后各时间点 NSCs 上清中 hBDNF 含量均升高,且转染后 5 d 时达到最高峰,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(表 1)

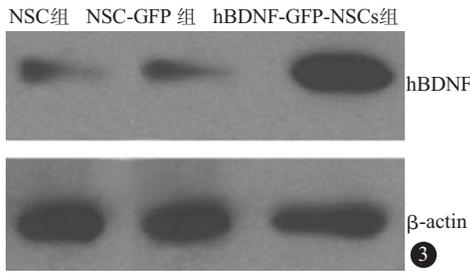


图3 Western blot 检测 hBDNF 蛋白表达结果

Fig.3 Expression of hBDNF in the transfected NSCs

表 1 hBDNF-GFP-NSCs 组转染前后细胞上清液中 hBDNF 含量(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

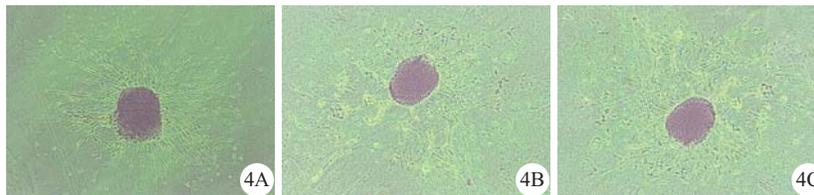
Tab.1 hBDNF levels in the supernatant of the NSCs before and after hBDNF-GFP gene transfection (pg/mL, Mean \pm SD)

组别	例数	hBDNF 含量
转染前	6	53.3 \pm 4.6 ^b
转染后 24 h	6	67.2 \pm 3.8 ^{ab}
转染后 48 h	6	132.5 \pm 12.8 ^{ab}
转染后 72 h	6	399.4 \pm 29.5 ^{ab}
转染后 96 h	6	487.0 \pm 10.6 ^{ab}
转染后 5 d	6	558.8 \pm 11.6 ^a
转染后 7 d	6	545.6 \pm 8.8 ^{ab}
转染后 14 d	6	527.7 \pm 11.8 ^{ab}
F值		1564.600
P值		0.000

与转染前比较,^a $P < 0.05$;与转染后 5 d 比较,^b $P < 0.05$

五、DRG 生长情况

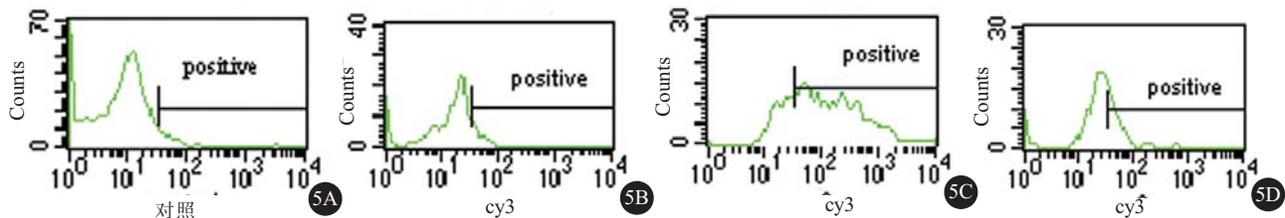
使用 3 种上清液培养 DRG 24 h 后发现, hBDNF-GFP-NSCs 组中神经节周围有突起伸出,且随时间延长突起逐渐增多、增长,而其他两种培养条件下的 DRG 则并没有发现明显的轴突生长(图 4)。



4A:hBDNF-GFP-NSCs 组;4B:GFP-NSCs 组;4C:NSCs 组

图 4 3 组 NSCs 上清液对 DRG 生长情况的影响($\times 100$)

Fig.4 DRG neurons cultured with the supernatant in different groups ($\times 100$)



5A:空白对照;5B:NSCs 组;5C:hBDNF-GFP-NSCs 组;5D:GFP-NSCs 组

图 5 流式细胞法检测 NSCs 分化比例结果

Fig.5 Ratio of the NSCs differentiating into neurons

六、NSCs 分化情况

3 组 NSCs 贴壁分化后显微镜下观察均有细胞迁移和形态学的变化,贴壁 48~72 h 内 3 组细胞迁移速度无明显差异;但在 4 d 后,添加 hBDNF-GFP-NSCs 上清液的神经球细胞迁移速度明显增快,细胞突触明显延长,添加 GFP-NSCs 和单纯 NSCs 上清液培养的 NSCs 仅有杂乱细胞迁出,未见明显轴突生长;分化 7 d 后,流式细胞法检测发现,添加 hBDNF-GFP-NSCs 上清液组 NSCs 分化为 β -tubulin 阳性细胞的比例为 54.76%,明显高于其他两组(NSCs 组:26.71%;GFP-NSCs 组:31.08%)(图 5)。

讨 论

基于 NSCs 的细胞替代治疗已成为中枢神经系统疾病研究的热点,并取得了一定的进展。然而由于 NSCs 增殖分化机制比较复杂,NSCs 分化为神经元的比例较低^[4]。近年来,通过基因工程技术对 NSCs 进行基因修饰或转基因处理为更好地修复神经损伤提供了新的思路。

BDNF 是神经营养因子家族的一员,主要在中枢神经系统表达,对神经元的发育再生具有重要作用,也能通过为损伤神经元提供营养而发挥治疗作用。Scharfman 等^[5]研究发现,将 BDNF 注入大鼠海马内后,可以促进齿状回及相邻区域神经再生,神经元数量增加。但一次注射 BDNF 后,其体内作用时间短暂,而若反复注射又易产生多次损伤及感染。为避免此缺点,有研究将 BDNF 利用腺病毒介导转染后注入体内,从而获得 BDNF 在体内的较长时间表达^[6],但直接注射腺病毒危险性较大,临床应用安

全性难以保障。

NSCs 具有基因转染的可操作性, 作为基因治疗载体具有其它载体所没有的优点: (1) 有迁移能力, 能远距离迁移到病变部位; (2) 能与宿主组织整合; (3) 自身有修复功能, 能分化为成熟细胞修复病损组织。通过基因工程技术, 可将目的基因转染到 NSCs 中使之长期稳定表达, 而不需要反复注射。目前进行基因转染的方法较多, 常用的有电穿孔转染和病毒转染。电穿孔转染的方法操作简单、费用低、没有生物化学毒性, 然而其转染效率低、细胞损伤大。病毒载体种类较多, 常用的有腺病毒、单纯疱疹病毒和慢病毒等。腺病毒和单纯疱疹病毒均可以携带大 DNA 片段, 能够转染多种细胞, 然而它们转染效率较低, 有较高的抗原性和毒性, 且转染后不能将目的基因整合到靶细胞染色体中, 只能短暂表达^[7,8]。而慢病毒不仅具有毒力低、转染效率高、可转染不同时相细胞、能够携带大片段基因的优点, 更重要的是能将目的基因整合到宿主细胞染色体中, 理论上能够在细胞存活期内永生表达并在子代中稳定表达。Gropp 等^[9]利用慢病毒成功实现人胚胎干细胞基因修饰研究, 而 Cenciarelli 等^[10]同样利用慢病毒载体成功将神经生长因子(NGF)基因转染到小鼠 NSCs 中, 并证明其良好的转染效率。

本实验通过构建 hBDNF 和 GFP 共表达的慢病毒载体, 将共表达基因 *hBDNF-GFP* 转入 NSCs 染色体中, 培养出既能表达 hBDNF 又能表达 GFP 的 NSCs; 结果显示转染后的 NSCs 活性并未受到影响, 可传代、迁移和分化, 并持续表达强绿色荧光; 使用 RT-PCR 和 Western blot 检测发现, 转染后的 NSCs 内 hBDNF mRNA 和胞外分泌的 hBDNF 均过量表达, 证明慢病毒成功将 *hBDNF* 基因转入到 NSCs, 而且 *hBDNF-GFP* 基因转染的 NSCs 上清液可以促进 DAG 的突触生长, 诱导 NSCs 更多地向神经元分化。上述结果表明转染后的 NSCs 所分泌的 hBDNF 具有理想的生物学活性。此外, 本实验在转染 *hBDNF* 基因的基础上又加入了一个报告基因

GFP, NSCs 传 6 代后仍有强烈的绿色荧光表达, 便于对移植后的 NSCs 进行更加直观的追踪研究。

综上所述, 本实验利用慢病毒载体, 成功将 *hBDNF-GFP* 共表达基因转染到 NSCs 中, 使其获得新的生物学属性, 能够稳定表达 hBDNF 和示踪蛋白 GFP, 而且分泌的 hBDNF 具有良好的生物学活性, 为进一步的在体移植研究奠定了一定基础。

参 考 文 献

- [1] Zhang L, Gu ZL, Qin ZH. Repair of glutamate-induced excitotoxic neuronal damage mediated by intracerebroventricular transplantation of neural stem cells in adult mice[J]. *Neurosci Bull*, 2007, 23(4): 209-214.
- [2] 冯东福, 卢亦成, 刘勇, 等. 神经干细胞增殖能力的组织差异性研究[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(43): 3077-3081.
- [3] Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, et al. Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes[J]. *Mol Ther*, 2000, 2(4): 404-414.
- [4] 冯东福, 卢亦成, 楼美清, 等. 组织-细胞共培养诱导神经干细胞定向分化的实验研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25 (2): 236-238.
- [5] Scharfman H, Goodman J, Macleod A, et al. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats[J]. *Exp Neurol*, 2005, 192(2): 348-356.
- [6] 侯旭, 胡丹, 惠延年. 腺病毒介导脑源性神经营养因子基因转染在大鼠视网膜中的表达 [J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24: 1930-1932.
- [7] Lundstrom K. Latest development in viral vectors for gene therapy [J]. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(3): 117-122.
- [8] Mandel RJ, Burger C, Snyder RO. Viral vectors for *in vivo* gene transfer in Parkinson's disease: properties and clinical grade production[J]. *Exp Neurol*, 2008, 209(1): 58-71.
- [9] Gropp M, Itsykson P, Singer O, et al. Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors [J]. *Mol Ther*, 2003, 7(2): 281-287.
- [10] Cenciarelli C, Budoni M, Mercanti D, et al. *In vitro* analysis of mouse neural stem cells genetically modified to stably express human NGF by a novel multigenic viral expression system [J]. *Neurol Res*, 2006, 28(5): 505-512.

(收稿日期: 2009-05-02)

(本文编辑: 王志娟)