

· 论 著 ·

慢病毒介导 NGF 过表达转染促进骨髓间充质干细胞向神经细胞转化的研究

邓明¹, 谢萍², 马永刚¹, 明江华¹, 周炎¹, 陈庆¹, 刘志勇³, 刘世清¹

1. 武汉大学人民医院骨科, 湖北 武汉 430060; 2. 武汉市第三医院中医科, 湖北 武汉 430060;
3. 武汉大学人民医院风湿免疫科, 湖北 武汉 430060

摘要: **目的** 探究慢病毒介导神经生长因子(NGF)过表达转染促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)向神经细胞转化的作用。**方法** 体外分离,培养人 BMSCs,利用基因过表达技术,构建 NGF 过表达慢病毒载体转染 BMSCs。根据转染情况分成 3 组,空白对照组(未转染慢病毒载体的 BMSCs)、空白载体病毒组(转染不含 NGF 过表达慢病毒载体的 BMSCs)和过表达载体病毒组(转染过表达 NGF 慢病毒载体的 BMSCs)。利用流式细胞仪检测 BMSCs 的表面标记物,利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 分别检测神经细胞表面蛋白胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经元特异性烯醇化酶(NSE) mRNA 及蛋白的表达。**结果** (1)BMSCs 的表面蛋白标记物 CD44 和 CD29 在第 2 代 BMSCs 的表达为 60.2% 和 58.3%,CD34 和 CD45 在第 2 代 BMSCs 的表达为 3.4% 和 2.6%。(2)慢病毒转染效率为 90% 以上。转染效率较高。(3)空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组的 GFAP 和 NSE mRNA 的相对表达量三组比较有统计学差异($P < 0.05$);其中空白载体病毒组和空白对照组的组间比较无统计学差异($P > 0.05$);过表达载体病毒组高于空白载体病毒组,组间比较有统计学差异($P < 0.05$)。Western blot 检测蛋白表达量也具有同样的表达特点。**结论** 慢病毒介导 NGF 过表达转染促进 BMSCs 可以提高 BMSCs 向神经细胞转化的效率,可以为神经损伤和脊髓损伤提供种子细胞。

关键词: 神经生长因子; 骨髓间充质干细胞; 慢病毒转染; 胶质纤维酸性蛋白; 神经元特异性烯醇化酶

中图分类号: R 651 R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)02-0145-05

Effect of lentivirus-mediated NGF overexpression on promoting transformation of bone marrow mesenchymal stem cells into neural cells

DENG Ming*, XIE Ping, MA Yong-gang, MING Jiang-hua, ZHOU Yan, CHEN Qing, LIU Zhi-yong, LIU Shi-qing

* Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China

Corresponding author: MING Jiang-hua, E-mail: 2110339041@qq.com

Abstract: Objective To explore the effect of lentivirus-mediated neural growth factor (NGF) overexpression on promoting transformation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into neural cells. **Methods** Human BMSCs were isolated and cultured in vitro. Using gene overexpression technology, lentivirus NGF overexpression vector was constructed to transfect BMSCs. According to the transfection condition, the BMSCs were divided into three groups: blank control group (BMSCs without lentiviral transfection), lentiviral blank vector transfection group (BMSCs transferred by vector without NGF overexpression) and NGF overexpression lentiviral vector transfection group (BMSCs transferred by vector with NGF overexpression). Flow cytometry was used to detect the expressions of BMSCs surface markers. Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to respectively detect the expressions of nerve cell surface proteins glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuron-specific enolase (NSE) mRNAs and proteins. **Results** (1) The positive expression rates of BMSCs surface markers CD44 and CD29 in second generation BMSCs were 60.2% and 58.3% respectively, and the positive expression rates of CD34 and CD45 in second generation BMSCs were 3.4% and 2.6%, respectively, and this showed that these cells were derived from BMSCs. (2) Transfection efficiency of lentiviruses was higher with transfection efficiency more than 90%. (3) There were significant differences in the relative expression levels of GFAP and NSE mRNAs and proteins in blank control group, blank vector lentiviral transfection group

and NGF overexpression lentiviral vector transfection group (all $P < 0.05$), while there were no significant differences in them between blank control group and blank vector lentiviral transfection group (all $P > 0.05$), and there were significant differences in them between NGF overexpression lentiviral vector transfection group and blank vector lentiviral transfection group (all $P < 0.05$). **Conclusion** NGF overexpression lentivirus vector transfection to BMSCs can improve the efficiency of transformation to nerve cells and provide seed cells for nerve injury and spinal cord injury.

Key words: Nerve growth factor; Bone marrow mesenchymal stem cells; Lentivirus transfection; Glial fibrillary acidic protein; Neuron-specific enolase

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81802203); Special Funds for Basic Research and Business Expenses in Central Universities (2042017KF0139)

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有多向分化潜能, 在特定环境下, 可以分化成人体内的各种细胞^[1]。比如 BMSCs 可以分化成骨细胞, 软骨细胞以及神经细胞等^[2-4]。新近研究表明, BMSCs 在特定诱导条件下可以转化成神经细胞, 进而能促进神经损伤的修复, 而且 BMSCs 来源于患者自体, 移植后可以避免排斥反应, 另外 BMSCs 能分泌多种细胞因子, 这为神经的修复提供了一个新的思路^[5]。

神经生长因子 (neural growth factor, NGF) 是第一个被发现的神经营养因子, 是最重要的生物活性分子之一, 在神经系统中维持正常发育和功能的必要因素。有研究表明, NGF 能促进 BMSCs 向感觉神经元分化, 参与损伤的神经再生和功能修复^[6]。本研究的目的是将 NGF 过表达慢病毒载体介导 BMSCs, 探究是否慢病毒介导 NGF 过表达转染促进 BMSCs 向神经细胞转化, 从而为临床上神经损伤的患者提供新的治疗思路, 对于神经损伤患者的治疗具有重要的意义。

1 材料与对象

1.1 人 BMSCs 的分离和培养 选取 20 名健康志愿者, 男性 8 名, 女性 12 名, 年龄 (27.48 ± 7.83) 岁。实验方案获得了本院伦理委员会的批准, 所有志愿者均签署知情同意书, 术前查体, 排除肝炎、性病、艾滋病等传染性疾病。术中取俯卧位, 暴露双侧髂后上棘, 消毒, 铺巾, 利多卡因 20 ml 局部麻醉, 利用骨穿穿刺针提取志愿者的新鲜骨髓。按照 1:3 体积比加入含 0.01 mol/L 的胎牛血清、100 U/ml 青霉素的 DMEM 细胞培养液, 充分混匀后, 移入 25 cm² Hank 培养瓶中, 差速培养法培养, 3 d 后去掉培养瓶中的油脂等杂质, 之后每 3 天换一次细胞培养液。BMSCs 细胞融合率达 70% ~ 80% 后进行传代培养。

1.2 BMSCs 的鉴定 采用流式细胞仪检测 BMSCs 的表面蛋白标记物 CD29、CD44、CD45 和 CD34 等的表达, 为 BMSCs 的鉴定提供依据。采用倒置光学显

显微镜观察 BMSCs 的细胞形态。

1.3 慢病毒 NGF 过表达载体的构建 慢病毒 NGF 过表达载体由上海吉凯公司合成, 选择 pHBLV-U6-ZsGreen-PGK-Puro 作为质粒的克隆载体。慢病毒 NGF 过表达载体的克隆切入点是 XhoI/BamHI, 编号为 ENST00000005893。经过基因测序, 从而证明序列的正确性。

1.4 慢病毒转染和实验分组 取第 3 代 BMSCs 进行实验, 将细胞接种到 6 孔板, 待融合率为 50% 时进行慢病毒转染, 根据转染说明书, 感染复数 (MOI) = 50, 慢病毒滴度为 3×10^7 TU/ml, 根据病毒转染情况分成 3 组: 空白对照组为未转染慢病毒的 BMSCs; 空白载体慢病毒组为转染不含 NGF 过表达载体慢病毒的 BMSCs; NGF 过表达载体慢病毒组为转染 NGF 过表达载体慢病毒的 BMSCs。

1.5 qRT-PCR 检测 3 组细胞融合率达 80%, 0.25% 胰蛋白酶消化后放入 15 ml 离心管, 加入 1 ml 的 Trizol RNA iso (Takara, 日本), 提取总 RNA, 根据 Takara 逆转录试剂盒的说明书, 检测总 RNA 的纯度, 为 1.9 ~ 2.0。逆转录 cDNA 保存在 4 °C 冰箱中备用。根据 TaKaRa 荧光定量 PCR 试剂盒的说明书的要求, 采用 20 μl 的反应体系, 加入各样品。进行荧光定量 PCR 的检测。采用 FS2000 系统对 PCR 进行分析, 反应条件预设为预变性: 95 °C 30 s; 1 个循环。PCR: 95 °C 5 s; 60 °C 30 s, 40 个循环。溶解曲线: 95 °C 5 s; 60 °C 1 min。降温: 50 °C 30 s, 1 个循环。内参基因 GAPDH 和表皮成纤维细胞的标志物小鼠抗波形蛋白 (Vimentin) 引物由上海生工公司生产 (表 1)。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算目的基因的相对表达量。

1.6 Western blot 检测 3 组细胞处理后, 加入 1 ml RIPA 细胞裂解液, 各组细胞在冰上裂解 30 min, 收集入 1.5 ml 的离心管中, 在预冷 4 °C 的离心机中离心, 预设: 5 000 r/min, 5 min 后提取上清, 经 95 °C 煮沸后, 收集蛋白备用。按照说明书制备浓缩胶 10 ml, 分离胶 20 ml。上样后电泳分离, 转膜后在 4 °C 冰箱避

表 1 目的基因的引物序列

引物名称	引物序列
GFAP	正义链 5'-CAA GAG GTC CTG TCT TCA GAT GA-3'
	反义链 5'-TCT GTT TCC GTT TCC TGG TTC-3'
NSE	正义链 5'-GTG ATA AAG GTT TCG GTT GCT G-3'
	反义链 5'-TGT TTT CTG TGG CTC CTC TCG TGG-3'
hGAPDH	正义链 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'
	反义链 5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'

注:GFAP:胶质纤维酸性蛋白;NSE:神经元特异性烯醇化酶;hGAPDH:人甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

光孵育过夜 (>12 h)。GFAP 和 NSE 一抗经一抗稀释液 1:10 000 稀释后加入样本离子膜。第二天用 PBST 稀释液洗膜,重复 3 次,加用山羊抗小鼠 IgG 二抗经二抗稀释液 1:1 000 稀释后孵育二抗 1.5 h,用 PBST 稀释液洗膜,重复 3 次,而后用 DAB 显影液处理样本。Image J 软件可以用来分析蛋白条带。

1.7 统计学方法 应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间的比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 BMSCs 的培养和鉴定 接种 48 h 后,原代 BMSCs 开始贴壁,细胞成梭形或者多角形(图 1a);培养至第 2 代后,呈旋涡状或者辐射状生长,细胞增殖迅速(图 1b);流式细胞仪检测第 2 代 BMSCs 的表面标记物,CD44 和 CD29 在第 2 代 BMSCs 的表达为 60.2% 和 58.3%;CD34 和 CD45 在第 2 代 BMSCs 的表达为 3.4% 和 2.6%(图 1c ~ 图 1f)。

2.2 慢病毒 NGF 过表达载体的构建和慢病毒转染 BMSCs 慢病毒 NGF 过表达载体的构建的模式图见图 2;空白对照组、空白载体慢病毒组、NGF 过表达载体慢病毒组的慢病毒转染见图 3,慢病毒转染效率为 90% 以上。转染效率较高。

2.3 qRT-PCR 检测 GFAP 和 NSE 神经标志物 mRNA 的表达 与空白对照组相比,空白载体病毒组的 GFAP mRNA 的相对表达量为 1.23 ± 0.93 ,过表达载体病毒组为 2.58 ± 0.57 ;空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组的三组比较有统计学差异 ($F = 17.903, P = 0.018$);其中空白载体病毒组和空白对照组的组间比较无统计学差异 ($t = 0.942, P = 1.923$);过表达载体病毒组和空白载体病毒组的组间比较有统计学差异 ($t = 1.922, P = 0.022$)。

与空白对照组相比,空白载体病毒组的 NSE mRNA 的相对表达量为 1.09 ± 0.21 ;过表达载体病毒组为 6.12 ± 1.28 ;空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组的三组比较有统计学差异 ($F =$

$10.213, P = 0.028$);其中空白载体病毒组和空白对照组比较无统计学差异 ($t = 0.179, P = 0.484$);过表达载体病毒组和空白载体病毒组的组间比较有统计学差异 ($t = 2.752, P = 0.012$)。

2.4 Western blot 检测 GFAP 和 NSE 神经标志物蛋白的表达 空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组的 GRAP 和 NSE 的蛋白的表达印迹见图 4。

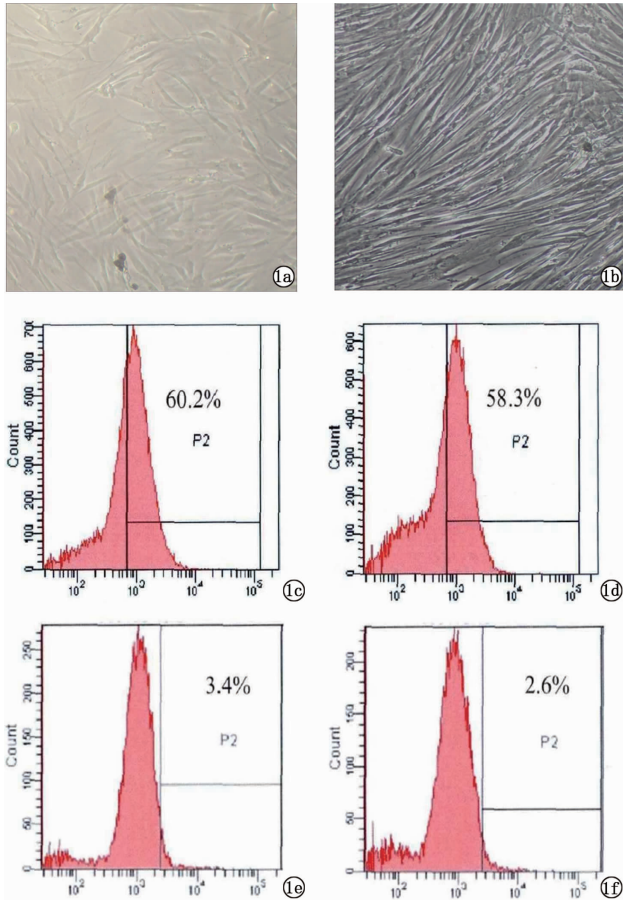
空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组 GRAP 相对蛋白表达量(与内参 β -actin 相比)分别为 0.27 ± 0.09 、 0.28 ± 0.08 和 1.19 ± 0.22 ,组间比较具有统计学差异 ($F = 11.731, P = 0.017$);其中空白载体病毒组和空白对照组的组间比较无统计学差异 ($t = 0.227, P = 0.721$);过表达载体病毒组和空白载体病毒组的组间比较有统计学差异 ($t = 1.389, P = 0.029$)。

空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组的 NSE 相对蛋白表达量(与内参 β -actin 相比)分别为 0.29 ± 0.08 、 0.28 ± 0.07 和 1.25 ± 0.23 ,组间比较具有统计学差异 ($F = 9.483, P = 0.026$);其中空白载体病毒组和空白对照组的组间比较无统计学差异 ($t = 0.427, P = 0.971$);过表达载体病毒组和空白载体病毒组的组间比较有统计学差异 ($t = 2.001, P = 0.002$)。

3 讨论

近年来,随着交通事故的多发,在交通事故中发生的神经损伤和脊髓损伤比较常见^[7],而针对神经损伤的治疗,一直是临床上的难点,BMSCs 具有多分化潜能,最近由研究表明,BMSCs 可以分化成骨细胞,软骨细胞以及神经细胞^[8-11]。有研究表明,在 NGF 的刺激下,BMSCs 可以转化成神经细胞,但是效率不高^[12]。本研究利用基因过表达技术,构建 NGF 的过表达载体,利用慢病毒的高转染效率,转染 BMSCs,探究 BMSCs 向神经细胞高效率转化的实验方法,为临床上神经损伤和脊髓损伤提供新的种子细胞。

NGF 是由神经元细胞分泌的一类营养物质,可以对中枢和外周神经系统发挥营养作用^[13-14],也可以对干细胞向神经细胞的分化具有调控作用^[15]。近年来,随着对 NGF 研究的深入,有研究发现,NGF 对神经轴突的再生有促进作用,尤其是对于新生类骨质周围有轴突生成^[16-18],可见 NGF 的确可以促进神经元谱系细胞的分化。本研究立足于基因过表达技术,构建 NGF 的过表达载体,利用慢病毒的高转染效率,转染 BMSCs。本研究发现,慢病毒的转染效率较高,



注:倒置光学显微镜观察图($\times 100$):1a:原代 BMSCs;1b:第 2 代 BMSCs。流式细胞仪检测:1c:第 2 代 BMSCs 表面蛋白 CD44 的表达;1d:第 2 代 BMSCs 表面蛋白 CD29 的表达;1e:第 2 代 BMSCs 表面蛋白 CD34 的表达;1f:第 2 代 BMSCs 表面蛋白 CD45 的表达。

图 1 人 BMSCs 的培养和鉴定

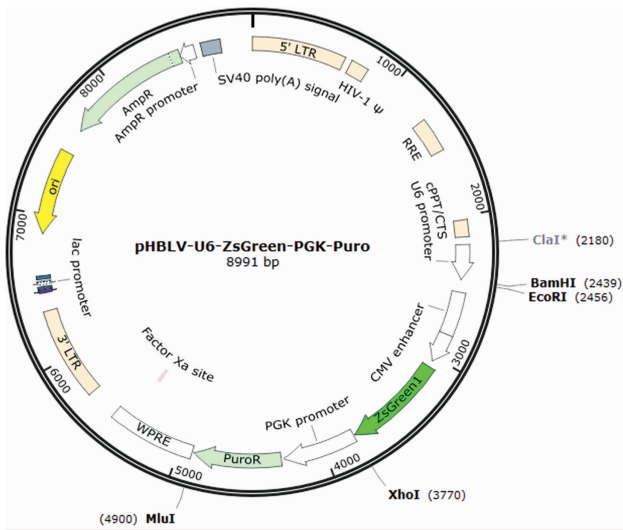
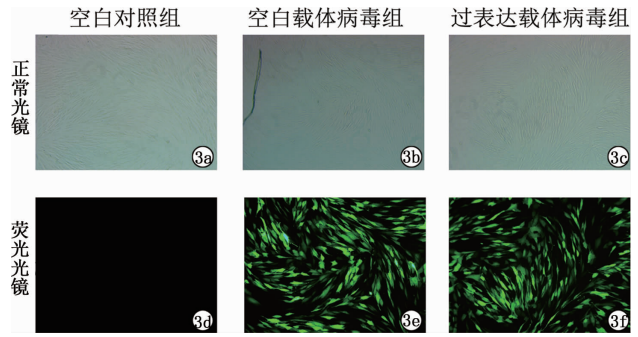


图 2 慢病毒载体构建的模式图



注:空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组转染 BMSCs 转染效率为 90% 以上。

图 3 慢病毒转染 BMSCs 正常光镜和荧光光镜观察图($\times 40$)

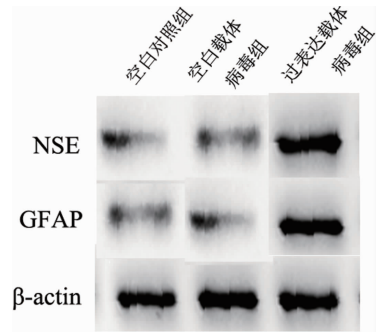


图 4 空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组的 GFAP 和 NSE 的蛋白的表达印迹图

为 90% 以上,可以最大程度利用 NGF 的转化作用。

GFAP 和 NSE 均是神经细胞的标识蛋白,GFAP 是星形胶质细胞活化的标志物,主要分布于中枢神经系统的星形胶质细胞,参与细胞骨架的构成并维持其张力强度^[19]。血清 NSE 是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶^[20]。本文结果显示,空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组的 GFAP mRNA 的相对表达量有统计学差异,其中空白载体病毒组和空白对照组的组间比较无统计学差异;过表达载体病毒组和空白载体病毒组的组间比较有统计学差异,同样的,NES 的 mRNA 的表达也具有这样的表达特点,从而可以证明从基因水平上,将 NGF 的过表达载体通过慢病毒介导的方法转染 BMSCs,可以提高其向神经细胞的转化效率,故而,神经细胞的标记物 GFAP 和 NSE 的表达量明显增高。同样的 Western blot 的检测方法中,空白对照组、空白载体病毒组和过表达载体病毒组的 GRAP 相对蛋白表达量比较有统计学差异;其中空白载体病毒组和空白对照组比较无统计学差异;过表达载体病毒组和空白载体病毒组比较有统计学差异。从而可以证明从蛋白水平上,将 NGF 的过表达载体通过慢病毒介导的方法转染 BMSCs,可以提高其向神经细胞的转化效率,故神经细胞的标记物 GFAP 和 NSE 的表达量明显增高。

综上所述,构建 NGF 的过表达载体通过慢病毒介导的方法转染 BMSCs,可以提高其神经细胞的转化效率,为临床上神经损伤和脊髓损伤提供新的种子细胞。

参考文献

- [1] Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes[J]. *J Mol Endocrinol*, 2011, 46(2): 65-72.
- [2] Zhang W, Zhang F, Shi H, et al. Comparisons of rabbit bone marrow mesenchymal stem cell isolation and culture methods in vitro[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88794.
- [3] Zhang H, Ma X, Zhang L, et al. The ability to form cartilage of NPM-SC and BMSC in SD rats[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 4989-4996.
- [4] Xiong N, Yang H, Liu L, et al. bFGF promotes the differentiation and effectiveness of human bone marrow mesenchymal stem cells in a rotenone model for Parkinson's disease[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 36(2): 411-422.
- [5] Ahmed HH, Salem AM, Atta HM, et al. Updates in the pathophysiological mechanisms of Parkinson's disease: emerging role of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *World J Stem Cells*, 2016, 8(3): 106-117.
- [6] 李立新,詹合琴,孙利民,等. 鼠神经生长因子治疗中度与重度老年痴呆临床分析[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2018, 21(3): 287-289.
- [7] 茅磊,王汉东. 脊髓损伤后神经炎症反应的研究现状[J]. *中华神经医学杂志*, 2009, 8(12): 1291-1293.
- [8] 李乔乔,吴振强,张丽君. 骨髓间充质干细胞的定向分化潜能[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(25): 4085-4090.
- [9] 刘林,许珂,姚建锋,等. 生长分化因子 5 对大鼠骨髓间质干细胞生长分化的影响[J]. *新疆医科大学学报*, 2015, 38(10): 1237-1241.
- [10] Ma S, Xie N, Li W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(2): 216-225.
- [11] 闫继红,杨姝,孙海梅,等. 共沉默 miR-221-3p/222-3p 表达抑制骨髓间充质干细胞增殖及促成软骨分化[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(50): 8056-8061.
- [12] 苏立宁,宋小青,魏会平. 神经生长因子诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的效果观察及相关蛋白网络分析[J]. *山东医药*, 2016, 56(39): 33-35.
- [13] 李柏,韦爱玲,赵健,等. 鼠神经生长因子与脑苷肌肽对脑性瘫痪的疗效比较观察[J]. *广西医科大学学报*, 2013, 30(4): 574-575.
- [14] 游志鹏,赵菊莲,汪昌运. 外源性神经生长因子对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2006, 6(4): 211-213.
- [15] 王瑛,刘金华,唐秀武. 蛇毒神经生长因子对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的神经保护研究[J]. *中国实用眼科杂志*, 2008, 26(2): 164-167.
- [16] Maino B, Spampinato AG, Severini C, et al. The trophic effect of nerve growth factor in primary cultures of rat hippocampal neurons is associated to an anti-inflammatory and immunosuppressive transcriptional program[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(10): 7178-7187.
- [17] 施宁华,张志坚,戴树宏. 神经生长因子对内耳缺血再灌注毛细胞损伤的保护作用[J]. *中国临床康复*, 2003, 7(31): 4190-4191.
- [18] Li YJ, Li YJ, Yang LD, et al. Silibinin exerts antidepressant effects by improving neurogenesis through BDNF/TrkB pathway[J]. *Behav Brain Res*, 2018, 348: 184-191.
- [19] Yang X, Xu H, Ding M, et al. Overlapping autoimmune syndromes in patients with glial fibrillary acidic protein antibodies[J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 251.
- [20] Georgantzi K, Sköldenberg EG, Stridsberg M, et al. Chromogranin A and neuron-specific enolase in neuroblastoma: correlation to stage and prognostic factors[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2018, 35(2): 156-165.

收稿日期:2018-05-20 修回日期:2018-06-10 编辑:周永彬