基础研究

Lentivirus介导表达多基因的人胚基因工程神经干细胞的实验研究

蔡培强[1],汤 逊[1],林月秋[1],OUDEGA M[2],BLITS B[3],阳运康[1],徐 林[4],周田华[1]

(1 成都军区昆明总医院骨科 650032 昆明市;2 The Miami Project to Cure Paralysis,University of Miami School of Medicine,Miami,FL 33101,USA;3 Graduate School for Neurosciences Amsterdam,Netherlands Institute for Brain Research,Amsterdam,The Netherlands;4 中国科学院昆明动物研究所 650000)

【摘要】 目的:探索以 Lentivirus 为载体,构建同时携带并表达多基因的基因工程人胚神经干细胞(human neural stem cell,hNSC)的可行性,为脊髓损伤治疗的研究提供材料。**方法**:培养和鉴定 hNSC;用携带绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)和神经营养因子-3(neurotrophic factor-3,NT-3)的 Lentivirus 转染 hNSC;用荧光显微镜观察、鼠胚背根神经结培养(dorsal root ganglion,DRG)和 Slot blot 等方法检测基因工程 hNSC 的多基因表达情况。**结果**:培养获得了大量的 hNSC;荧光显微镜观察到几乎 100%的 hNSC 表达 GFP;基因工程 hNSC 的培养液能促使大鼠 DRG 旺盛生长;Slot blot 检测到基因工程 hNSC 能高效分泌 NT-3 蛋白。**结论**:以 Lentivirus 为载体能构建同时携带并稳定表达多基因的基因工程 hNSC,为脊髓损伤治疗的基础研究及进一步临床应用提供了有价值的细胞资源。

【关键词】 Lentivirus;人胚神经干细胞;基因工程;神经营养因子-3;绿色荧光蛋白

中图分类号:R318.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1004-406X(2005)-05-0288-04

The experimental study of genetic engineering human neural stem cell expressing multigene mediated by Lentivirus/CAI Peiqiang,TANG Xun,LIN Yueqiu,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005,15(5):288~291

【Abstract】 Objective:To explore the feasibility to construct the genetic engineering human neural stem cell (hNSC) which were mediated by Lentivirus to express multigene,and afford the material for the further studies of spinal cord injury.**Method**:After the hNSC were isolated and identified,the hNSC were geneticly modified by Lentivirus expressing green fluorescence protein (GFP) and neurotrophic factor-3 (NT-3).The transgenic complex expression were examined by the methods of fluorescence microscope,culturing with dorsal root ganglion of fetal rats and slot blot.**Result**:The genetic engineering hNSC was constructed successfully.Expression of bright green fluorscence were detected in all genetic engineering hNSC by the fluorescence microscope.The conditioned medium with transgenic hNSC could induce neurite flourishing outgrowth of dorsal root ganglion (DRG).The genetic engineering hNSC expressed high level of NT-3 which could be detected by the methods of slot blot.**Conclusion**:The genetic engineering hNSC mediated by Lentivirus expressing multigene can be applied widely in the basic research and the further clinic application as neural grafts for spinal cord injury will be great.

【Key words】 Lentivirus;Human neural stem cell; Genetic engineering; Neurotrophic factor-3; Green fluorescence protein

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Kunming General Hospital of Chendu Military Command, Kunming,650032,China

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后的再生修复一直是医学科学领域内的一大难题。一方面脊髓的原发性损伤及其继发的病理生理改变导致脊髓内功能细胞缺失;另一方面神经营养因子或诱导因子不足,致使绝大部分轴突的再生努力归于失败,即所谓“夭折性再生”。如何改变 SCI 后不适宜再生的微环境是研究和治疗 SCI 急需解决的

基金项目:云南省自然科学基金资助项目(2002C0070M)

第一作者简介:男(1974-),主治医师,硕士研究生,研究方向:脊柱脊髓损伤

通讯作者:汤逊

电话:(0871)4074657 E-mail:Tangxun6209@163net

问题。神经干细胞(NSC)是中枢神经系统(CNS)中具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞,能被大量扩增,并可在体内和体外诱导分化成 CNS 内 3 种主要的功能细胞:神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,是 SCI 后再生修复的理想材料和基因载体。采用神经营养因子基因修饰的 NSC 移植可能是目前最具前景的治疗方法之一。笔者应用无血清培养技术联合应用有丝分裂抑制剂碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)和表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)从流产胎儿大脑皮层分离、培养人胚神经干细胞(hNSC),经携带神经营养因子-3(neurotrophic factor-3,NT-3)和绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)标记基因的 Lentivirus 转染,构建成能分泌 NT-3 的基因工程 hNSC,并经荧光显微镜观察、鼠胚背根神经节(dorsal root ganglion,DRG)培养及 Slot blot 等方法检测其转基因表达情况,为进一步利用基因工程 hNSC 治疗 SCI 的实验研究和临床研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12、B27、N2 均购自 Gibco 公司;bFGF、EGF 购自 Sigma 公司,DNase 购自 Roche 公司,Nestin 抗体、神经丝-200(NF-200)抗体、神经胶质元纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)抗体均购自武汉博士德,羊抗鼠 NT-3 抗体购自 USB 公司,质粒提取试剂盒购自 Promega 公司,人胚肾 293T 细胞购自武汉大学保藏中心,携带 NT-3 和 GFP 标记基因的 Lentivirus 的各种质粒由美国迈阿密大学 Martin 教授和 Blits 博士构建。

1.2 培养及检测方法

1.2.1 hNSC 的分离培养 经成都军区昆明总医院伦理委员会批准,并经胎儿母亲及家属的知情同意,由本院妇产科提供孕 2~3 个月的流产胎儿。在无菌条件下取出胎儿皮层组织,放入 PBS 仔细分离去除筋膜和血管,转入 0.1%胰酶和 0.04%的 DNase 中,37℃消化 20min,用 0.04%的 DNase 漂洗 3 次,然后用一光洁巴斯德管反复吹打组织,制成单细胞悬液,再用 200 目细胞筛过滤,去除大的组织块,转入 DMEM/F12,加 B27 添加剂、EGF(20ng/ml)、bFGF(20ng/ml);台盼兰染色计数,调整细胞浓度为 5×10^5/ml 接种于培养瓶,于 37℃、5%CO_2 孵箱中培养。14d 传代一次,从第一次传代起,将 B27 更换为 N2 添加剂,5~6d 半量换液。用 Nestin 抗体染色鉴定 hNSC。

1.2.2 hNSC 的诱导分化 取适量培养的 hNSC,置入装有经 0.1%多聚赖氨酸处理过盖玻片的 6 孔培养板中,再加入胎牛血清(终浓度为 1%~2%),37℃、5%CO_2 培养 10~14d 后收获细胞。用 NF-200 和 GFAP 分别鉴定分化的神经元和星形胶质细胞。

1.2.3 Lentivirus 载体的制备 (1)质粒的扩增和提取。将三种质粒,即携带 GFP 和 NT-3 的目的质粒(Lentivirus-NT-3)、携带病毒合成必需成分的辅助质粒(PCMV847)和口腔粘膜水疱病毒糖蛋白(VSV-G)用大肠杆菌 DH5α 扩增,质粒提取试剂盒提取扩增的质粒。(2)293T 细胞的培养、转染、病毒上清收获和浓缩。在转染前 18~24h,将 293T 细胞接种于直径 10cm 培养皿中,每皿约 3×10^6 个细胞,使其在转染时达到 80%~90%汇片。将三种质粒 Lentivirus-NT-3 10μg、PCMV847 6.5μg、VSV-G 3.5μg 用磷酸钙沉淀法转染。于转染后 36h 收集病毒上清,每天一次,共 3d。然后将所收集的病毒液经超速离心浓缩 100 倍,分装为 30μl/管,-80℃保存。

1.2.4 基因工程 hNSC 的构建 取$(5\sim10)\times10^5$ 个 hNSC,经吹打制成单细胞悬液,将其置入圆底离心管中,加入 5μl 病毒浓缩液和聚凝胺(终浓度为 8μg/ml),2000 转/min 离心 2h,然后收集细胞,加入新鲜 hNSC 培养液及生长因子,于 37℃、5%CO_2 孵箱中继续培养。第二天重复一次以上操作。

1.2.5 基因工程 hNSC 生物学活性检测 取妊 14d 胎鼠,分离出 DRG,放入经多聚赖氨酸包被处理过的培养板中,每孔一个,共 24 孔,分别加入转基因 hNSC 培养上清液(n=12 孔)、普通 hNSC 培养上清液(n=6 孔)、含 1%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液(n=6 孔),每孔 50μl。培养 48h。

1.2.5 Slot blot 检测 将待测样品(普通 hNSC 培养上清液、转基因 hNSC 培养上清液和 DMEM/F12 培养液)在沸水中加热 10min。裁剪一张合适大小的硝酸纤维膜,用铅笔在上面画三个圈,将其放置于一个盒子上,使膜的中部悬空。然后在圈内分别滴加上述三种样品,每次 2μl,待膜干燥后再次滴加。如此重复 6~8 次。然后将膜转入含 1%胎

牛血清白蛋白的 TBS 封闭液中封闭 1h,再于羊抗鼠 NT-3 一抗孵育 1h,TTBS 漂洗 3 次, 每次 15min,辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗羊二抗孵育 1h,TTBS 漂洗 3 次,每次 15min,DAB 显色。

2 结果

2.1 hNSC 体外培养体系建立

由流产胎儿大脑皮层分离培养的细胞经 2 周无血清加 bFGF、EGF 和 B27 培养后, 细胞呈团状,悬浮生长。细胞集落中的细胞数目有数十、甚至数百个不等(图 1a,后插页Ⅱ)。加入血清诱导分化后,细胞团 1~2d 开始贴壁分化,NSC 团呈放射状发出许多轴突,相互交错呈网状(图 1b,后插页Ⅱ)。原代培养时,培养瓶中可见一些飘浮细胞碎片和一些贴壁生长的杂细胞,但经传代后,这些杂细胞均减少甚至消失,细胞集落培养 13 代以上仍具有干细胞特性,经 Nestin 免疫组化染色阳性(图 2a,后插页Ⅱ)。分化的细胞有的为 1~2 个或多个突起的呈 NF-200 免疫染色阳性的神经元(图 2b,后插页Ⅱ);有的为多突起的呈 GFAP 免疫染色阳性的星形胶质细胞(图 2c,后插页Ⅱ)。这种从流产胎儿大脑皮层分离的细胞能够自我更新,Nestin 染色阳性,具有分化为神经元和星形胶质细胞的能力,证明其为 hNSC。

2.2 基因工程 hNSC 的荧光显微镜观察

在倒置相差荧光显微镜下可见到 hNSC 呈现强度适中的荧光,单个细胞荧光强度稍弱,多个细胞聚集的神经球荧光较强, 说明这些 hNSC 可表达转入的报告基因 GFP(图 3a、3b,后插页Ⅱ)。

2.3 生物学活性检测

妊 14d 胎鼠的 DRG 培养 48h 后,可见到转基因 hNSC 上清液培养组 DRG 旺盛生长, 轴突从 DRG 密密麻麻地长出,呈细丝状,并不断地发出分支,相互交错成网状,长度甚至超过 DRG 的直径,但没有神经元向外迁徙(图 4a,后插页Ⅱ)。表明培养液中含有较高浓度的 NT-3 蛋白, 能够促进胎鼠 DRG 轴突的旺盛生长。普通 hNSC 上清液组无轴突生长(图 4b,后插页Ⅲ)。而含 1%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液组有稀疏的轴突从 DRG 中长出,但长度较短。说明胎牛血清能在一定程度上促进 DRG 的轴突生长。

2.4 Slot blot 检测

在 Slot blot 的硝酸纤维膜上, 转基因 hNSC 上清液组在铅笔所画圈内可见到一黄色斑点,其它两个圈内无阳性发现(图 5,后插页Ⅲ)。说明转基因 hNSC 培养上清液中含有较高浓度的 NT-3。

3 讨论

3.1 hNSC 的基本特性

hNSC 作为干细胞的一种,具有其它所有干细胞的基本特征,具有自我更新、增殖分裂能力和多向分化潜能, 可以分化为本系统大部分类型细胞[1]。但它与鼠胚 NSC 又有所不同,在体外培养过程中,鼠胚 NSC 仅需 bFGF 或者 EGF 中的一种因子即可, 而 hNSC 必须同时使用 bFGF 和 EGF 两种有丝分裂抑制剂方能维持 hNSC 的未分化状态。有研究表明,在 hNSC 的培养过程中使用白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor,LIF)可以大大延长干细胞的体外培养时间, 因为 LIF 可以上调细胞中端粒酶的浓度, 端粒酶能修复每次 hNSC 分裂后短缩的端粒,从而延长 hNSC 在体外培养的时间[2,3]。本实验联合应用有丝分裂抑制剂 bFGF 和 EGF 对 hNSC 已培养了 13 代,超过 5 个月, 从不同时期的 hNSC 均能诱导分化得到神经元和星形胶质细胞。

3.2 Lentivirus 的特性及其作为转基因载体的优点

Lentivirus 的染色体是二倍体,包含一条正链 RNA,可以通过逆转录转化为 DNA(即所谓的前病毒),然后通过和宿主染色质的一系列复杂的相互作用整合到宿主的染色体中。与 RV 和 AAV 相比较,①它的前病毒整合到宿主的染色体中后,可直接利用宿主的 RNA 聚合酶合成病毒转录产物,因而不需要依赖于宿主 DNA 的复制,所以它既能感染分裂活跃期细胞, 又能高效率地感染非分裂活跃期细胞,甚至静止期细胞[4];②在其构建过程中增加了一种口腔粘膜水疱病毒糖蛋白 (VSV-G),使其感染宿主更为广泛。VSV-G 既增加了病毒颗粒识别和亲和更多宿主的能力 (几乎可以感染所有类型的宿主细胞),又增加了病毒颗粒的稳定性, 可以经历多次冻融或者常温下保存较长时间而不影响其病毒滴度; 而且可以在不改变病毒特性的前提下, 通过超速离心将病毒颗粒浓缩上百倍, 大大增加了病毒的转染滴度, 甚至可达到 10^9~10^{10}pfu/ml [5], 可以直接用于体内的转基因研究,并可获得较理想的转染效果;③可以同时携带

并稳定表达多基因[6]。本实验所构建的病毒能同时携带并表达标记基因 GFP 和治疗基因 NT-3,既能达到治疗目的，也能很方便地检测到转基因的表达;④可在其长末端序列(LTRs)的 U3 上敲除掉某些序列,使其自我失活,提高了其应用的安全性[7],而且其安全性在包括鼠、猴等动物的各器官系统的体内转基因研究中得到了证实[8~10],是脊髓损伤研究中较理想的转基因载体；⑤能够携带较大的外源性基因，它可以携带超过 8kb 的目的基因，几乎是 AAV 携带外源性基因能力的 2 倍[11],为转基因研究提供了更大的平台和空间；⑥Lentivirus 感染细胞后能稳定表达,直至细胞凋亡。

3.3 基因工程化 hNSC 的应用前景

所谓基因工程细胞，即在体外对供体细胞用基因重组技术导入或删除某一或某些基因以改变细胞的表型,包括生长特性、对毒物的抵抗力以及生产分泌某些治疗性蛋白等，即进行遗传修饰的细胞。用转基因分泌各种神经营养因子的基因工程 NSC 对 SCI 实行细胞替代和基因治疗是目前极具发展前景的研究领域。移植基因工程 NSC 可以起到多方面的治疗作用:①细胞替代作用。移植的工程化 NSC 能在宿主体内长期存活,并分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,以补充替代损伤或者死亡的神经功能细胞[12]。②调节损伤的局部微环境,促进损伤轴突的功能性再生。植入的工程干细胞能在体内不断地分泌转入的目的营养因子，这些营养因子能诱导和促进轴突功能性再生。Lu 等[13]将转基因分泌 BDNF 的骨髓基质细胞植入损伤脊髓中,1 个月后检测到损伤轴突再生的数量和生长长度较对照组明显增加，并且有较多的再生轴突长入损伤脊髓内。③救援脊髓内损伤功能细胞。Lu 等[14]向损伤脊髓内移植转基因分泌 BDNF 的成纤维细胞，观察到皮质脊髓神经元成活率达 89.8%±5.9%；而对照组仅为 36.2%±7.0%。④分泌的神经营养因子能够诱导植入的外源性 NSC 和内源性 NSC 向特定方向分化。新近的研究[15、16]表明,神经元分泌的营养因子,如 NT-3、NT-4/5、BDNF 等能诱导 NSC 向着神经元方向分化;而星形胶质细胞分泌的因子,如睫状源神经营养因子则诱导 NSC 向星形胶质细胞分化。

本实验首次成功构建了由 Lentivirus 介导的能同时表达 GFP 和 NT-3 的基因工程 hNSC,并通过多种方法检测到了基因工程 hNSC 的多基因表达。证实了构建基因工程 hNSC 是可行的,向 SCI 的临床治疗研究迈出了重要的一步。

4 参考文献

1. 唐少锋,汤逊,蔡景霞,等.人胚神经干细胞的分离培养及鉴定研究[J].中国脊柱脊髓杂志,2003,13(9):523-525.
2. Maeve AC.Recent advances in neural stem cell technologies[J]. Trends Neurosci,2001,24(2):72-74.
3. Ostenfeld T. Human neural precursor cells express low levels of telomerase in vitro and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation[J].Exp Neurol,2000,164(1):215-226.
4. Costantini LC, Bakowska J,Breake X,et al. Gene therapy in the CNS[J].Gene Ther,2000,7(1):93-109.
5. Burns JC,Friedmann T,Driever W,et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors:concentration to very high titer and effcient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells [J].PNAS USA,1993,90(2):8033-8037.
6. Zhu Y, Feuer G, Day SL, et al. Multigene lentivirus vectors based on differential splicing and translational control[J].Mol Ther,2001,3(2):375-382.
7. Iwakuma T, Cui Y,Chang L.Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modications [J].J Virol,1999,261 (1):120-132.
8. Miyoshi H, Takahashi M,Gage FH,et al. Stable and effcient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector[J].Proc Natl Acad Sci USA,1997,94(5):10319-10323.
9. Kafri T,Blomer U,Peterson DA,et al. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors[J].Nat Genet,1997,17(2):314-317.
10. Blomer U,Naldini L,Kafri T,et al. Highly effcient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector [J].J Virol,1997,71(8):6641-6649.
11. Cui Y, Iwakuma T, Chang LJ. Contributions of viral splice sites and cis-regulatory elements to lentivirus vector function [J].J Virol,1999,73(8):6171-6176.
12. Liu Y, Himes BT,Solowska J,et al. Intraspinal delivery of neurotrophin-3 using neural stem cells genetically modified by recombinant retrovirus[J].Exp Neurol,1999,158(1):9-26.
13. Lu P,Jones LL,Tuszynski MH.BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J].Exp Neurol,2005,191(2):344-360.
14. Lu P,Blesch A, Tuszynski MH. Neurotrophism without neurotropism:BDNF promotes survival but not growth of lesioned corticospinal neurons[J].J Comp Neurol,2001,436 (4):456-470.
15. Chang MY,Son H,Lee YS,et al. Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes,respectively[J].Mol Cell Neurosci,2003,23(3):414-426.
16. Aki K,Toshiaki N,Mitsuko T,et al.Lecithinized brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of embryonic stem cells in vitro and in vivo [J].Biochem Biophys Res Commun,2005,328(4):1051-1057.

(收稿日期:2004-11-01 修回日期:2005-03-14)
(英文编审 蒋 欣)
(本文编辑 卢庆霞)