

腺病毒介导的心肌营养-1 基因转染对神经干细胞作用的实验研究

杨云华, 廖维宏, 伍亚民, 张正丰, 李红运, 刘 媛, 龙在云
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所第三研究室 400042 重庆市)

【摘要】目的:观察腺病毒介导的心肌营养-1(Adv-CT-1)基因转染对大鼠神经干细胞(NSCs)的作用。**方法:**分离、培养胚胎大鼠 NSCs,以 Adv-CT-1 基因转染 NSCs,应用细胞集落与细胞突起计数、流式细胞仪凋亡检测等技术,检测 NSCs 的生长与凋亡情况。**结果:**Adv-CT-1 基因转染培养大鼠 NSCs 可增加 NSCs 集落数量和诱导分化细胞突起的数量($P<0.05$)。在 H_2O_2 诱导的 NSCs 凋亡模型中,转染 Adv-CT-1 基因的 NSCs 凋亡细胞数量较对照组减少($P<0.05$),存活细胞数增加($P<0.01$)。**结论:**CT-1 基因转染可促进 NSCs 分裂增殖以及细胞突起的生长,减少超氧化损伤诱导的 NSCs 凋亡发生,促进损伤 NSCs 的存活。

【关键词】神经干细胞;细胞培养;心肌营养-1;基因治疗;凋亡;大鼠

中图分类号:R394.3,R651.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-06-0361-04

An experimental study of effects of adenovirus-mediated cardiotrophin-1 gene transfer into neural stem cells/YANG Yunhua, LIAO Weihong, WU Yamin, et al //Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(6): 361~364

【Abstract】 Objective:To investigate the effect of adenovirus-mediated cardiotrophin-1 (Adv-CT-1) gene transfer on rat neural stem cells (NSCs) in vivo.**Method:**NSCs were isolated, cultured and transferred with Adv-CT-1. The effects of Adv-CT-1 on NSCs were investigated by neuron-sphere growth and neurites assays. Adv-CT-1 was transferred into the injured NSCs, effects of Adv-CT-1 on NSCs survival and apoptosis were checked in a H_2O_2 -induced NSCs apoptosis injury model.**Result:**NSCs were cultured with conditional medium and persisted existing even after several passages. After transferring NSCs with Adv-CT-1, the colony and induced NSCs increased ($P<0.05$). CT-1 relieved NSCs apoptosis ($P<0.05$), improved cell survival in H_2O_2 -induced NSCs apoptosis model ($P<0.01$) which determined by flowcytometry.**Conclusion:**After transfection, Adv-CT-1 improved growth of NSCs and proliferation of neurites, improved cell survival in H_2O_2 -induced NSCs apoptosis.

【Key words】Neural stem cell; Cell culture; Cardiotrophin-1; Gene therapy; Apoptosis; Rat

【Author's address】Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China

心肌营养-1(cardiotrophin-1, CT-1)属于促神经元生长细胞因子家族(neuropoietic cytokines family),也称白细胞介素-6超家族(interleukin-6 superfamily)。已有研究证实CT-1能支持运动神经元、多巴胺神经元和交感神经元的存活,诱导交感神经元的表型连接,促进离体大鼠背根节神经元存活^[1,2],但CT-1对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的作用和机制尚不清楚。重组腺病毒-CT1(recombinant adenovirus-CT1, Adv-

CT1)可作为基因载体将目的基因CT-1导入NSCs,并在NSCs中转录、复制和表达。本研究拟培养大鼠NSCs,将携带CT-1基因的Adv-CT1转染到NSCs,观察表达的CT-1对NSCs存活与生长的作用,并了解其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、胰岛素、谷氨酰胺、青霉素均购自Sigma公司,DMEM/F12 1:1、D-Hank's液、N2添加剂、胎牛血清均购自Gibco公司,分析纯30%

第一作者简介:男(1968-),主治医师,医学博士,研究方向:中枢神经损伤及修复(现在成都军区昆明总医院神经外科 650000)
电话:(0871)4074689 E-mail:yangyunhua68@hotmail.com

H₂O₂ 购自重庆化学药品公司, Annexin V-PI 试剂盒购自 Bender Med Systems 公司, Adv-CT-1 病毒液滴度为 3.3×10^{11} PFU/ml, Adv-EGFP 病毒液滴度为 1.3×10^{11} PFU/ml。

1.2 NSCs 原代及传代培养

于妊 14~16d 的 Wistar 胎鼠中分离室管膜和海马区脑组织于 D-Hank's 液中剪碎, 吸管吹打制成悬液, 过 200 目细胞筛, 以 $(0.5 \sim 1) \times 10^6$ 个/ml 细胞密度接种于培养瓶 (6~7ml/瓶), 37℃ 恒温湿化培养箱内孵育 (95% 空气, 5% CO₂), 每 6~7d 传代更换培养液。培养基成分: DMEM/F12+20ng/ml bFGF+1% N2+100μg/ml 胰岛素+100μg/ml 谷氨酰胺+50U/ml 青霉素。

1.3 Adv-CT-1 对 NSCs 增殖和神经球形成的影响

取传代后生长旺盛的 NSCs, 分散细胞按 0.5×10^6 /ml 细胞密度接种于 12 孔培养板。分 2 组, 实验组中加入 Adv-CT-1 (200 PFU/细胞), 对照组中加入 Adv-EGFP (200 PFU/细胞)。于第 3、5、7、10d 进行细胞集落的比较, 相差显微镜下 ($\times 100$) 进行细胞集落数计数, 每组 12 个标本, 每个标本随机取 4 个视野计算平均值, 对数据进行统计学处理。

1.4 Adv-CT-1 转染对 NSCs 的作用

超氧化应激诱导 NSCs 凋亡参照 Satoh 等^[3]的方法进行。取传代后生长旺盛的 NSCs, 按 0.5×10^6 /ml 细胞密度接种于 12 孔培养板。正常组 6 个标本不加 H₂O₂ 和病毒液; 实验组和对照组每组分 4 个时相点, 每个时相点 6 个标本, 分别加入 30% H₂O₂, 使其在培养液的终浓度为 50μmol/L。实验组中加入 Adv-CT-1 (终滴度为 200 PFU/细胞), 对照组中加入相同量的病毒缓冲液。对正常组标本、第 12h、1、3、7d 的实验组和对照组标本进行流式细胞仪 AnnexinV-PI 检测。收集细胞, 以 0.1% PBS 洗涤, 调整细胞密度约 1×10^6 /ml, 各标本取 100μl, 加入 Annexin V 5μl、PI 2.5μl, 振荡后 0℃, 避光 10min。加入预冷 buffer 150μl, 上机检测, 分别计数凋亡细胞百分比和正常存活细胞百分比。

1.5 Adv-CT-1 对 NSCs 分化后细胞突起生长的作用

传代后生长旺盛的 NSCs 以 0.5×10^6 个/ml 细胞密度接种于预涂 0.1% 多聚赖氨酸的 12 孔培养

板。实验组和对照组每组分 2 个时相点, 每个时相点 6 个标本。实验组中加入 Adv-CT-1 (终滴度为 200 PFU/细胞), 对照组中加入 Adv-EGFP (终滴度为 200 PFU/细胞)。于第 5、7d 在相差显微镜 ($\times 40$) 下, 每个标本随机选取四个视野, 计数培养细胞的个数以及形成细胞突起连接的个数, 取平均数计算出细胞连接个数与细胞数的比值, 并进行统计学处理。培养基成分: DMEM/F12+10% 胎牛血清+1% N2+100μg/ml 胰岛素+100μg/ml 谷氨酰胺+50U/ml 青霉素。

1.6 结果判定和统计学处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据用 Office 2000-Excel 统计程序进行 *t* 检验分析 (双侧, 多样本), 显著水平 *P* 为 0.05。

2 结果

2.1 NSCs 的培养

原代培养的 NSCs 于培养 2~3d 可见呈悬浮生长的神经球 (neurosphere), 集落细胞数多为数个至数十个, 细胞生长旺盛, 形状为不规则形或类圆形。培养 6~8d 神经球逐渐长大, 可达数十、甚至数百个细胞, 为球形或桑葚状的类球形, 折光性较强, 传代后神经球形状多较规则, 呈橄榄球形或球形。在传代 2~3 代时其分裂增殖速度较快, 生长旺盛, 经 6~8 次传代后细胞仍保持 NSCs 的增殖分裂和分化的特性, 但生长速度减慢。

2.2 Adv-CT-1 对 NSCs 增殖和神经球形成的作用

比较实验组和对照组中细胞集落的形成, 细胞集落体积和数量均随时间而增大, 7、10d 时数量和体积变得相对稳定。对照组中, NSCs 细胞集落数量中等, 细胞增殖速度正常 (图 1a, 后插页 IV); 相对于对照组, 实验组中 NSCs 生长较快, 细胞集落数量多 ($P < 0.05$), 形态规整, 体积大, 折光性较好 (图 1b, 后插页 IV)。两组 NSCs 集落计数见表 1。

2.3 Adv-CT-1 对 NSCs 生长存活的作用

见表 2、3。相对于正常组, 被 H₂O₂ 诱导发生凋亡后, 实验组和对照组 12h~7d 各时相点的 NSCs 凋亡细胞比例明显增加 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 实验组各时相点 NSCs 凋亡细胞比例显著下降 ($P < 0.05$), 约为对照组的 2/3。

在培养的 NSCs 被 H₂O₂ 损伤后, 相对于正常

组, 实验组和对照组 12h、1、3、7d 时相点的 NSCs 存活细胞比例明显减少 ($P<0.01$); 与对照组比较, 实验组各时相点 NSCs 存活细胞比例增加约 1/2~1 倍 ($P<0.01$)。

2.4 Adv-CT-1 对 NSCs 分化细胞突起生长的作用

在培养的 NSCs 被诱导分化后, 相对于对照组, 实验组各时相点的细胞间的突触连接与细胞总数的比值增加近 1/2 (图 2, 后插页 IV), 相差有显著性 (表 4, $P<0.05$)。

表 1 Adv-CT-1 组与对照组各时间点 NSCs 集落计数 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

	3d	5d	7d	10d
对照组	1.08±0.37	3.58±0.73	5.55±0.72	5.39±1.19
实验组	2.36±0.38 ^①	4.75±0.94 ^②	6.84±0.81 ^①	6.75±1.18 ^②

注: 与对照相同时相比较^① $P<0.01$, ^② $P<0.05$

表 2 Adv-CT-1 组与对照组各时间点 NSCs 凋亡比例 ($n=12, \%, \bar{x} \pm s$)

	12h	1d	3d	7d	正常组
对照组	16.7±4.3 ^①	15.1±3.7 ^①	13.6±3.8 ^①	9±2.1 ^①	4±1.3
实验组	10.1±2.6 ^{①②}	9.2±2.3 ^{①②}	7.7±1.7 ^{①②}	6.5±1.9 ^{③④}	

注: 与正常组比较^① $P<0.01$, ^③ $P<0.05$; 与对照相同时相组比较^② $P<0.01$, ^④ $P<0.05$

表 3 Adv-CT-1 组与对照组各时间点 NSCs 存活比例 ($n=12, \%, \bar{x} \pm s$)

	12h	1d	3d	7d	正常组
对照组	3.9±0.84 ^①	2.7±0.57 ^①	3.7±1.1 ^①	9.6±1.72 ^①	92.5±3.03
实验组	8.7±2.41 ^{①②}	6.9±1.93 ^{①②}	7.2±1.62 ^{①②}	14.6±3.08 ^{①②}	

注: 与正常组比较^① $P<0.01$, ^②与对照相同时相组比较 $P<0.01$

表 4 Adv-CT-1 组与对照组各时间点 NSCs 分化后细胞突起比例 ($n=12, \%, \bar{x} \pm s$)

	5d	7d
对照组	22.8±7.59	48.12±11.53
实验组	34.1±11.23 ^①	64.1±12.5 ^②

注: 与对照相同时相点比较^① $P<0.01$, ^② $P<0.05$

3 讨论

3.1 NSCs 的培养及 Adv-CT-1 转染

NSCs 有自我维持和自我更新能力、无性增殖分裂自我复制能力、多潜能的分化能力、对损伤有反应性增强的能力等基本特征^[4]。本实验借鉴 Hitoshi 等^[5]的方法, 在神经系统常用的 DMEM/F12 培养基基础上, 辅以 N2 添加剂 (N2 中

含有神经细胞生长所需的转铁蛋白等营养物质), 同时协同使用 bFGF、胰岛素等生长因子, 促进 NSCs 的有丝分裂和增殖, 提高细胞的长期增殖能力, 并能有效抑制细胞的分化。此培养方法简便易行, 可成功培养 NSCs 并能长期传代。

实验应用的腺病毒载体是非依赖辅助复制缺陷型腺病毒。其重组腺病毒为携带人 CT-1 cDNA 片段的重组腺病毒 Adv-CT-1, 滴度达 3.3×10^{11} PFU/ml, 可满足于体外和体内转染需要^[6]。此重组腺病毒可以有效将外源性 CT-1 基因转入哺乳动物多种细胞中, 包括成熟无分裂能力的神经元, 并且能在胞内有效表达。实验使用的对照重组腺病毒是 Adv-EGFP, 滴度为 1.3×10^{11} PFU/ml, 可在宿主细胞中合成自发性绿色荧光蛋白。

3.2 Adv-CT-1 对 NSCs 增殖和神经球形成的作用

目前已知 bFGF 对 NSCs 的分裂增殖有重要的促进作用^[7]。CT-1 属于促神经元生长细胞因子家族, 对 NSCs 的增殖分裂也有重要作用。本实验采用相差显微镜下观察 NSCs 神经球大小和计数 NSCs 集落数量增殖的方法, 检测 Adv-CT-1 对 NSCs 增殖的作用, 发现 Adv-CT-1 可使 NSCs 球数量增加, 细胞集落体积和数量均增大, 表明 Adv-CT-1 可促进 NSCs 的有丝分裂和增殖。CT-1 对 NSCs 的作用可能是通过它的信号通路, 与受体复合物 gp130/LIFR/CT-1R 结合, 传导胞内信号^[8], 从而促进 NSCs 的有丝分裂增殖。

3.3 Adv-CT-1 对 NSCs 的保护作用及其对细胞凋亡的影响

目前研究发现, CT-1 可促进神经元生存, 对 CNS 损伤有明显的保护作用, 能支持运动神经元、多巴胺能神经元和交感神经元的存活, 并诱导交感神经元的表型连接^[1-2], 还可作用于变性的脊髓或脑干运动神经元, 促进轴突迁移到皮层运动神经元^[9]。CT-1 特别对胚胎中枢神经系统的发育过程起重要作用, 是肌源性的神经保护因子, 可促进发育运动神经元存活^[10]。凋亡是在基因调节下进行的细胞死亡过程, 广泛存在于神经系统。培养基中神经营养因子、生长因子、葡萄糖、氨基酸、血清等缺乏, 微波辐射、紫外线照射、细胞毒性物质等外界因素均可诱导神经细胞发生凋亡。本研究参照 Satoh 等^[3]的方法, 采用低浓度的 H_2O_2 诱导 NSCs 超氧化损伤诱发 NSCs 的凋亡模型。此方法

简单方便,效果良好,重复性好,可建立 NSCs 损伤模型。AnnexinV-PI 双参数法可较好地反映出细胞的生存状态,准确对凋亡细胞进行定量分析。

实验对 NSCs 凋亡细胞数进行了检测,结果显示相对于正常组,损伤组 NSCs 在 12h~7d 各时相点凋亡细胞比例均明显增加;而与对照组比较,使用 Adv-CT-1 后各时相点的 NSCs 凋亡细胞比例明显下降,显示出 CT-1 对 NSCs 凋亡的保护作用。检测 NSCs 诱导凋亡后存活细胞数,结果显示相对于正常 NSCs,NSCs 被 H_2O_2 诱导凋亡 12h~7d 期间,存活细胞比例减少;而与对照组比较,实验组各时相点的 NSCs 存活细胞比例均有所增加,显示 CT-1 对 NSCs 存活有促进作用。CT-1 对诱导的 NSCs 凋亡有保护作用,可减少细胞凋亡发生,促进 NSCs 生存,从而增加 NSCs 存活数量。

Toth 等^[11]证明,胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) 和 CT-1 基因转染 PC12 细胞后,对损伤的 PC12 细胞有明显的保护作用,且与磷酸化肌醇脂 3-激酶 (phosphatidylinol 3-kinase, PI3-K) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径密切相关。Dolcet 等^[12]发现,CT-1 等细胞因子促进运动神经元存活是通过 JAK 酪氨酸激酶 (Janus Kinase, JAK) 活化依赖的 PI3-K 通路。我们推断,CT-1 对 NSCs 的保护作用主要是抑制 NSCs 凋亡发生,并且其作用通路依赖于 JAK/MAPK/PI3-K 途径,但其作用机制还有待于进一步的研究和探讨。

3.4 Adv-CT-1 对 NSCs 分化细胞突起生长的作用

比较实验组和对照组细胞的突触连接与细胞总数的比值,结果显示 NSCs 被诱导分化后,相对于未使用 Adv-CT-1 的对照组,给予 Adv-CT-1 后第 5、7d 分化细胞间突起连接与细胞总数的比值增加。表明 NSCs 被诱导分化后,CT-1 可增加分化细胞突起数量,促进细胞间连接形成。CT-1 增加细胞突起的生长和细胞突起的连接,可能与 CT-1 促进 NSCs 的分化有关,但其作用机制还有待于进一步的研究和探讨。

中枢神经系统损伤后的治疗和功能修复是一个复杂的过程,其中包括对 NSCs 增殖分化的影响、细胞间细胞连接建立等过程。CT-1 可通过抑制受损 NSCs 凋亡发生,同时还可能增加 NSCs 分

化后细胞突起的生长和连接,有利神经环路的重建。

4 参考文献

1. Oppenheim RW, Wiese S, Prevett D, et al. Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneuron [J]. *J Neurosci*, 2001, 21 (4): 1283-1291.
2. Thier N, Hall M, Heath JK, et al. Trophic effects of cardiotrophin-1 and interleukin-11 on rat dorsal root ganglion neurons in vitro [J]. *Molecular Brain Res*, 1999, 64 (1): 80-84.
3. Satoh T, Sakai N, Enokido Y, et al. Free radical-independent protection by nerve growth factor and Bcl-2 of PC12 cells from hydrogen peroxide-triggered apoptosis [J]. *J Biochem (Tokyo)*, 1996, 120 (3): 540-546.
4. Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. *Science*, 2000, 287 (5457): 1433-1438.
5. Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells [J]. *Genes Dev*, 2002, 16 (7): 846-858.
6. 张正丰, 廖维宏, 杨青峰, 等. 人心肌营养素-1 重组腺病毒载体的构建、纯化及表达 [J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25 (17): 1531-1535.
7. Park Y, Rangel C, Reynolds MM, et al. Drosophila perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cells division [J]. *Dev Biol*, 2003, 253 (2): 247-257.
8. Tsuruda T, Jougasaki M, Boerrigter G, et al. Cardiotrophin-1 stimulation of cardiac fibroblast growth: roles for glycoprotein 130/leukemia inhibitory factor receptor and the endothelin type A receptor [J]. *Circ Res*, 2002, 90 (2): 128-134.
9. Bordet T, Lesbordes JC, Rouhani S, et al. Protective effects of cardiotrophin-1 adenoviral gene transfer on neuromuscular degeneration in transgenic ALS mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10 (18): 1925-1933.
10. Schweizer U, Gunnarsen J, Karch C, et al. Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult [J]. *J Cell Biol*, 2002, 156 (2): 287-297.
11. Toth G, Yang H, Anguelov RA, et al. Gene transfer of glial cell-derived neurotrophic factor and cardiotrophin-1 protects PC12 cells from injury: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69 (5): 622-632.
12. Dolcet X, Soler RM, Gould TW, et al. Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 18 (6): 619-631.

(收稿日期: 2004-08-09 末次修回日期: 2005-02-21)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)