

人 GDNF 基因的腺病毒载体构建及其在人神经干细胞中的表达

郝时兵^{1,2}, 肖建德¹, 刘尚礼²

(1 深圳市第二人民医院骨科 518035 深圳市; 2 中山大学附属第二医院骨科 510120 广州市)

【摘要】目的:观察构建的含人胶质细胞源性生长因子(GDNF)基因腺病毒载体对人神经干细胞的感染及其基因表达情况,为脊髓损伤的基因及神经干细胞治疗提供前期实验依据。**方法:**从 12 周龄流产人新鲜胚胎中提取人神经干细胞并进行培养,行 Nestin 免疫荧光染色进行检验。将全长 558bp 编码人 GDNF 的 cDNA 克隆到重组腺病毒载体质粒,并在人胚肾细胞(HEK293 细胞)中包装出含有目的基因 hGDNF 的腺病毒,然后用该腺病毒感染人神经干细胞,应用荧光显微镜和 Western-blot 检测病毒感染及外源基因的表达情况,并进行 GFAP 和 Tubulin 免疫荧光染色检测神经干细胞向神经细胞分化情况。**结果:**Nestin 免疫荧光染色显示所培养细胞为阳性染色红色,表明其具有神经干细胞性状;感染 48h 后观察到神经干细胞中有大量的增强绿色荧光蛋白(EGFP)表达,以及 hGDNF 蛋白高表达;感染后的神经干细胞有长的伪足伸出,呈 GFAP 和 Tubulin 染色阳性,表明促进了神经干细胞向神经元的分化。**结论:**腺病毒对神经干细胞具有较高感染效率,可作为一种良好的基因导入载体,实现外源基因 hGDNF 在神经干细胞内的有效表达,并可为神经干细胞分化为神经元提供更有利条件。

【关键词】胶质细胞源性神经营养因子;神经干细胞;基因;腺病毒

中图分类号:Q813 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-09-0667-04

Establishment and expression of recombinant human glial cell line-derived neurotrophic factor in human neural stem cells/YU Shibing, XIAO Jiande, LIU Shangli/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(9): 667~670

【Abstract】 Objective:To investigate the interference and expression of human glial cell line-derived neurotrophic factor(hGDNF) gene in neural stem cells and to evaluate the roles of hGDNF in the genetic treatment of spinal cord injury.**Method:**Full-length GDNF cDNA, 558bp, was inserted into the early 1 region of adenovirus genomic DNA and immediated by the human cytomegalovirus (gene promoter/enhancer), and these adenoviruses were propagated in HEK293 cells via homologous recombination for 7-10 days in vivo, then they were used to infect human neural stem cells. The infection and expression of gene were tested under flow cytometry, immunofluorescence and Western-blot after 48 hours.**Result:**Almost all the cultured cells showed the nestin immunofluorescence positive staining, which was the characteristics of neural stem cell. A great quantity of EGFP was observed and high level of GDNF protein was found, expressed in human neural stem cells infected by recombinant GDNF-adenovirus. After transfection of GDNF gene, many neural stem cells show GFAP and Tubulin immunofluorescence positive staining, which meant that most NSCs differentiated into neuron at that condition.**Conclusion:**The infective efficiency of adenovirus is greatly acceptable to neural stem cell, thus adenovirus provide a useful vector for exogenous GDNF gene expressed in neural stem cells, which is useful for differentiation of neural stem cell.

【Key words】Glial cell line-derived neurotrophic factor; Neural stem cells; Gene; Adenovirus

【Author's address】Department of Orthopaedics, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, 518035, China; Department of Orthopaedics, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510120, China

基金项目:广东省自然科学基金项目资助(5009437), 广东省科技厅重点引导项目(2005B36001081)

第一作者简介:男(1970-), 医学博士, 在站博士后, 研究方向: 脊髓损伤

电话: (0755)83211316 E-mail: sbyu90@163.com

通讯作者: 肖建德

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗是世界性难题。神经干细胞移植是目前前景看好的一种治疗方法, 但单纯的神经干细胞在损伤局部移植后绝大多数分化为星形胶质细胞, 而不是理

想中需要的神经元^[1],因而功能恢复仍不满意。研究表明多种神经营养因子,包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)^[2]、神经营养素 3(neurotrophin, NT-3)^[3]、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)^[4]等都有助于神经干细胞向神经元分化。鉴于上述神经营养因子直接应用存在的某些局限性,在神经干细胞移植同时进行相关神经营养因子基因修饰成为神经干细胞移植治疗脊髓损伤时的更优选择。胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是 1993 年发现的 TGF- β 家族的新成员,对多巴胺能神经元有明显的营养作用^[5];此外,它还在胆碱能神经元以及其他多种组织中表达^[6]。目前用于研究的 GDNF 基因克隆多源于鼠,人源的 GDNF 基因克隆也有报道,但用于神经干细胞移植还是一个比较新的研究方向。本研究目的在于将克隆的人 GDNF 转导入人源神经干细胞,为其最终用于脊髓损伤的临床治疗作一有益探索。

1 材料与方法

1.1 人 GDNF 重组腺病毒载体的构建与鉴定

首先将 pLNCX2/GDNF 质粒(首都医科大学北京神经科学研究所提供)以 Bgl II 和 Hind III 双酶切琼脂糖电泳鉴定;随后进行基因测序(北京奥科生物公司),并与 Genebank 中人 GDNF(hGDNF)序列比对。经确认后再以 Bgl II 和 Hind III 双酶切分别酶切 pLNCX2/GDNF 质粒和 pAdtrack-CMV 质粒,然后根据琼脂糖电泳条带分子量大小来分别回收所需要的片段,TA 连接酶连接。连接产物转化 DH5 α 感受态细菌后,挑选克隆并再次用 Bgl II 和 Hind III 进行酶切,以确定阳性克隆。

筛选出含有 hGDNF 的 pAdtrack-CMV 质粒(命名为 pAdtrack-CMV-hGDNF 质粒)后,将 2 μ l (100ng) Adeasy-1 质粒和 5 μ l (200ng) pAdtrack-CMV-hGDNF 质粒同时电转 BJ5183 感受态细菌以获得重组体(命名为 pAdeasy-hGDNF 质粒),电转条件、方法和鉴定见参考文献^[7]。

1.2 含 hGDNF 基因的腺病毒包装及鉴定

1.2.1 包装 将包装细胞人胚肾细胞(HEK293A)以 1×10^5 接种于 25ml 的细胞培养瓶中,待细胞密度达到 50%~70%时,以脂质体

lipofectamine2000(Invitrogen 公司)把 4 μ g 经 Pac I 酶切线性化的 pAdeasy-hGDNF 质粒转染入上述细胞,6h 后换完全 DMEM 培养基,继续培养 7~10d,期间于第 3、第 5 和第 7 天各换液一次,定期观察绿色荧光蛋白表达情况^[7]。

1.2.2 鉴定 转染后第 7 天,无菌条件下常规方法收集上述 HEK293A 细胞,PBS 重悬后-20℃和 37℃水浴反复冻融 4 次,于 4℃ 12000r/min 离心 10min 收集上清,取 5 μ l 上清用蛋白酶 K 在 55℃ 消化 1h,煮沸 5min,然后进行聚合酶链反应(PCR)鉴定。上游引物:5'-CCACCATGAAGT-TATGGGATGTCGT-3',下游引物:5'-TCAGAT-ACATCCACACCTT-3',扩增条件为:94℃ 3min 预变性;然后 94℃ 45s,60℃ 1min,72℃ 1min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 10min。

1.3 hGDNF 腺病毒感染神经干细胞

1.3.1 神经干细胞的培养 取 12 周龄流产人新鲜胚胎(经北京大学医学部伦理委员会及孕妇本人知情同意),75%酒精浸泡消毒,迅速于无菌条件下分离出胚胎大脑皮层组织,置于 4℃ D-Hanks 液中冲洗 3 次,剪成糜状,加入 DMEM/F12 轻柔吹打,200 目细胞筛过滤。以 5×10^5 接种于 25ml 的细胞培养瓶中。5%CO₂、37℃培养箱静置培养。细胞培养基组分为:DMEM/F12(1:1),辅助培养基 B27(均购自 Gibco 公司)及 20ng/ml 的 EGF 和 20ng/ml 的 bFGF(均购自 Pepro Tech 公司)。每 3d 更换培养液一次,每 7~10d 传代一次。传代方法为机械分离法,先将神经球用专用切割装置切割成小块,然后在培养基中轻微吹打使其成单细胞悬液,计数后接种到新的培养瓶中。

1.3.2 hGDNF 腺病毒感染神经干细胞 神经干细胞传代 48h 后,取其中两瓶分别加入含 1×10^8 PFU(集落形成单位)滴度 hGDNF 的病毒上清,另一瓶加入不含目的基因的空病毒上清。其中一瓶加 hGDNF 病毒上清的神经干细胞于加病毒后 2d,另两瓶于加病毒后第 5d 时分别收集细胞总蛋白(为增加 GDNF 在细胞中的含量,收获总蛋白前两天将细胞培养温度由 37℃变为 30℃,其余条件不变)。然后进行 Western blot 实验检测转入的外源基因 GDNF 在神经干细胞中的表达。收集蛋白之前,荧光显微镜观察感染神经干细胞的情况;流式细胞仪检测有绿色荧光表达的细胞数,以间接反应病毒感染效率。

1.4 神经干细胞及其分化鉴定

对神经球进行神经干细胞标记蛋白 Nestin 的免疫荧光染色;转基因后 4 周进行胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和 Tubulin 免疫荧光染色。方法依据文献及产品操作说明^[21];0.01M PBS 将神经球冲洗 3 次,4%多聚甲醛固定 15min,0.01M PBS 冲洗 3 次,然后 10% BSA 封闭 30min,分别加 Nestin 和 GFAP 一抗 4℃过夜;次日,0.01M PBS 冲洗 3 次,加二抗 37℃作用 30min~1h;再用 0.01M PBS 冲洗 3 次,然后镜下观察结果。

2 结果

2.1 hGDNF 重组腺病毒载体的构建与鉴定

pLNCX2/GDNF 质粒 Bgl II 和 Hind III 酶切鉴定,得到 hGDNF 片断的长度为 558bp(图 1,后插页 V)。测序结果与 Genebank 比对完全一致,然后将目的基因与腺病毒质粒重组,用 Pac I 酶切得到特异的 3.0kb 小片断(图 2,后插页 V)。

2.2 含 hGDNF 基因的腺病毒包装及鉴定

基因重组后包含目的基因 hGDNF 的腺病毒质粒转染入 293A 细胞后第 5 天,荧光显微镜下观察到明显的绿色荧光蛋白(腺病毒骨架自带基因)表达,并有噬斑形成(图 3,后插页 V),第 8 天收集病毒上清后进行 PCR 鉴定,得到特异的 558bp 的目的条带(图 4,后插页 V)。

2.3 hGDNF 腺病毒感染神经干细胞

用 hGDNF 腺病毒感染神经干细胞 48h 后可以观察到神经球内有大量的绿色荧光蛋白表达(图 5,后插页 V),说明该病毒对神经干细胞有很好的感染效果,经过 western blot 检验,目的基因 hGDNF 在神经干细胞中能表达蛋白(图 6,后插页 V)。流式细胞仪检测该病毒载体对神经干细胞的感染效率为 67%(图 7,后插页 V)。

2.4 神经干细胞及其分化

神经球进行神经干细胞标记蛋白 Nestin 的免疫荧光染色,显示特异染色红色(图 8,后插页 V),表明保持神经干细胞的特性;转基因后 4 周进行 GFAP 免疫荧光染色,显示特异绿色,Tubulin 免疫荧光染色显示特异红色(图 9,后插页 V),表明神经干细胞分化为神经元并有轴突生长。

3 讨论

人 GDNF 基因由 3 个外显子组成,转录后形

成的 mRNA 全长为 4.6kb,其中编码区序列有 636bp 和 558bp 两种形式^[9],分别编码全长为 211 和 185 个氨基酸残基的 GDNF 前体蛋白,但两者在信号肽、成熟多肽序列、表达部位方面完全一致,生物学活性也相同^[9]。汉族人群中绝大多数为 558bp^[10],所以本研究也选择这一编码序列。并且,在起始密码 ATG 的上游添加了外源性 Kozak 序列(CCACC),该序列和起始密码共同构成 CCACCATG,这符合脊椎动物细胞 mRNA 表达的共有序列(consensus sequence),在真核细胞表达时可以使表达效率增高^[10]。

GDNF 作为 TGF- β 家族的一种多肽类生长因子,是分泌性蛋白,能够促进神经元的生长和神经纤维的增加,提高多巴胺的分泌水平^[11]。有研究证明^[12-15],GDNF 对多巴胺神经元及运动神经元损伤具有保护作用,可改善中枢神经系统功能;具体实验方法包括 GDNF 的直接中枢内注射^[12]、将胚胎中脑组织用 GDNF 处理后植入^[13]、移植局部注射 GDNF^[14]、病毒载体介导 GDNF 基因治疗^[15]等,结果都表现出持续时间不同的有益作用。

介导 GDNF 基因治疗的载体有多种,其中逆转录病毒载体作为现在应用最为广泛的载体之一,虽然其携带的外源基因能够整合到细胞基因组而稳定表达,但逆转录病毒只感染分裂期细胞,对神经干细胞感染效率太低^[16]。而重组腺病毒载体(Ad)对神经干细胞的感染效率较高,而且可以感染静止期细胞又可以感染分裂期细胞。此外脑和脊髓是部分免疫豁免器官,重组腺病毒能持续表达数周而不引起炎症反应^[15],所以本实验中采用腺病毒载体进行 GDNF 基因转移。结果表明,hGDNF 腺病毒感染神经干细胞 48h 后可以观察到神经球内有大量的绿色荧光蛋白表达,说明该病毒对神经干细胞有很好的感染效果。

病毒介导的 GDNF 基因表达检测有多种方法,包括原位杂交^[17]、免疫组化^[17]和免疫沉淀^[18]等,Western-blot 方法未见报道,可能主要是因为 GDNF 是分泌性蛋白因而胞内含量少,不易检测。但在进行低温培养时(30℃)可以大大减少其分泌,本研究采用这一方法,用 Western-blot 检测到目的蛋白的表达大大增加。

自我更新和分裂增殖是神经干细胞的基本生物学特性,在 EGF 和 bFGF 等细胞因子存在的情况下能够长期保持这种特性。目前对神经干细胞

的研究主要集中在移植治疗脑部病变和脊髓损伤方面,要实现这些目标必须要解决好神经干细胞的长期存活和定向分化问题;而要解决这些问题,除了与移植神经干细胞密度依赖性有关外,移植细胞局部神经营养因子相对高浓度对细胞存活和定向分化都具有非常重要的意义^[9]。本研究表明,外源性 GDNF 基因能够被腺病毒载体导入神经干细胞,并实现 GDNF 基因在神经干细胞中的有效表达,这种神经营养因子在体外水平促进了(至少部分促进了)神经干细胞向神经元的分化。这与上述文献中其他神经营养因子的效应类似。因此 GDNF 和其他诸多神经营养因子类似,可通过基因转染的方式使神经干细胞处于一种高神经营养因子的环境中,促进其更多的向神经元分化,从而使神经干细胞移植到脊髓损伤部位后更好地促进脊髓的修复和神经通路联系,实现在脊髓损伤治疗中发挥出比单纯神经干细胞移植更好的作用。当然,转染有 GDNF 基因神经干细胞移植到脊髓损伤部位后是否分化为足够多的神经元,将是我们进一步研究的课题。

【致谢】 感谢北京大学医学部干细胞中心兰峰博士在干细胞培养方面提供的帮助和北京大学医学部分子生物学系毛泽斌教授的指导。

4 参考文献

1. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair[J]. Brain Res Bull, 1999, 49(6): 377-391.
2. Tuszynski MH, Gahriel K, Gage FH, et al. Nerve growth factor delivery by gene transfer induce differential growth of sensory, motor, and noradrenergic neuritis after adult spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 1996, 137(1): 157-173.
3. Grill R, Murai K, Blesch A, et al. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury [J]. J Neurosci, 1997, 17(14): 5560-5572.
4. Liu Y, Kim D, Himes BT, et al. Transplantations of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function [J]. J Neurosci, 1999, 19(11): 4370-4387.
5. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neuro trophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. Science, 1993, 260(5111): 1130-1132.
6. Trupp M, Ryden M, Jornvall H, et al. Peripheral expression and biological activities of GDNF: a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons [J]. J Cell Biol, 1995, 130(1): 137-148.
7. He TC, Zhou S, Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95(5): 2509-2514.
8. Villa A, Snyder EY, Vescovi A, et al. Establishment and properties of a growth factor-dependent perpetual neural stem cell line from the human CNS[J]. Exp Neurol, 2000, 161(1): 67-84.
9. Grimm L, Holinski-Feder E, Teodoridis J, et al. A nalysis of the human GDNF gene reveals an inducible promoter, three exons, a triplet repeat with in the 3'-UTR and alternative splice products[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(12): 1872-1886.
10. 段德义, 杨慧, 赵春礼, 等. 人 GDNF 在原代培养的大鼠成纤维细胞中的表达[J]. 解剖学报, 2001, 32(2): 101-104.
11. Sagot Y, Tan SA, Hammang JP, et al. GDNF slows loss of motoneurons but not axonal degeneration or premature death of pmn/pmn mice[J]. J Neuro sci, 1996, 16(7): 2335-2341.
12. Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, et al. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo[J]. Nature, 1995, 373 (6512): 335-339.
13. Rosenblad C, Martinez-Serrano A, Bjorklund A. Glial cell line -derived neurotrophic factor increases survival, growth and function of intrastriatal fetal nigral dopaminergic grafts[J]. Neurosci, 1996, 75(4): 979-985.
14. Mehta V, Hong M, Spears J, et al. Enhancement of graft survival and sensorimotor behavioral recovery in rats undergoing transplantation with dopaminergic cells exposed to glial cell line-derived neurotrophic factor[J]. J Neurosurg, 1998, 88(6): 1088-1095.
15. Horellou P, Mallet J. Gene therapy for Parkinson's disease[J]. Mol Neurobiol, 1997, 15(2): 241-256.
16. Yu SS, Han E, Hong Y, et al. Construction of a retroviral vector production system with the minimum possibility of a homologous recombination[J]. Gene Ther, 2003, 10(8): 706-711.
17. 杨慧, 段德义, 吴杰军, 等. 逆转录病毒载体 ex vivo 途径表达 TH 和 GDNF 基因[J]. 神经解剖学杂志, 2004, 20(3): 215-219.
18. 徐国恒, 凌雁, 万有, 等. 重组腺病毒介导 GDNF 在多种细胞中的表达[J]. 神经解剖学杂志, 1998, 14(4): 318-320.
19. Gage FH. Mammalian neural stem cells[J]. Science, 2000, 287(5457): 1433-1438.

(收稿日期: 2006-09-04 修回日期: 2007-01-22)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 彭向峰)