

## 研究报告

# 表达神经营养因子 Neurturin 的骨髓间充质干细胞的构建及体外活性检测\*

王晚璞 孙茂盛 李鸿钧\*\* 谢天宏 严敏 周艳 尹娜

(北京协和医学院/中国医学科学院医学生物学研究所 昆明 650118)

**摘要** 研究神经营养因子 Neurturin (NTN) 在由于神经元损伤而造成的神经退行性疾病中对神经元的保护和修复作用。利用重组腺病毒载体将 NTN 基因转入恒河猴骨髓间充质干细胞(rMSC), 通过 RT-PCR、IF 及 Western blot 方法检测 NTN 的转录和表达, 并采用鸡胚背根神经节体外培养实验和胚胎大鼠中脑多巴胺能神经元存活实验对 NTN 进行体外活性检测。结果表明 NTN 在 rMSC 中稳定表达和分泌, 并具有体外生物学活性, 为由于神经元损伤造成的神经退行性疾病的干细胞移植治疗奠定了一定的基础。

**关键词** 恒河猴骨髓间充质干细胞 重组腺病毒 神经营养因子 Neurturin 活性检测

**中图分类号** Q784

神经营养因子由神经元产生, 是其生长、分化以及维持正常形态和功能所必需的一类因子。Neurturin (NTN) 于 1996 年由 Kotzbauer 等<sup>[1]</sup> 发现, 是一类能特异地作用于中脑多巴胺能神经元及运动神经元的神经营养因子, 并能够促进其对多巴胺高亲和力摄取。因此, 对于以多巴胺代谢紊乱为特征的神经系统疾病如帕金森氏病(Parkinson's diseases, PD) 的治疗具有重要的临床意义。运用基因工程技术所制备的重组人 NTN 对体外培养的鸡胚背根神经节及胚胎大鼠中脑多巴胺能神经元具有明显的营养作用, 并能在 MPTP 诱导的帕金森氏病模型的动物体内保护多巴胺能神经元变性、坏死。但由于 NTN 不能透过血脑屏障, 且注射 NTN 蛋白需要重复给药, 限制了其应用。

Kordower 等<sup>[2]</sup> 已成功将携带 NTN 的腺相关病毒直接注射至帕金森氏病猴模型脑内并使已损伤的多巴胺能神经元得到一定的修复。而如果将能分泌 NTN 蛋白的基因工程细胞移植入脑内, 则可持续作用于病灶区

受损的神经元, 从而促进其存活。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 又不同于其它常规的工程细胞, 它是一种具有多向分化潜能的成体干细胞, 已有报道可分化成心肌、骨骼肌、神经细胞、造血干细胞、肌腱、肝组织、肾组织和连接组织等<sup>[3-4]</sup>。临床上人们已经成功地将骨髓间充质干细胞移植到患者体内, 用于治疗骨组织缺损和心肌梗塞等疾病。由于其较强的增殖能力和较低的免疫原性, 间充质干细胞也很有可能为治疗帕金森综合征提供新的途径, 在细胞治疗和组织工程治疗退行性神经系统疾病方面显示出良好的前景。

基于此, 本研究利用重组腺病毒构建表达 NTN 的 rMSCs 工程干细胞, 为将来细胞移植治疗由于神经元损伤造成的神经退行性疾病做好前期的基础工作。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性健康恒河猴由中国医学科学院医学生物学研究所医学灵长类研究中心提供, 年龄 2~3 岁, 体重 3~5 kg。实验动物生产许可证号: SCXK-

收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2011-12-03

\* 国家自然科学基金(30971003)、云南省基础研究重点项目(2007C0012Z)资助项目

\*\* 通讯作者, 电子信箱: lihj6912@hotmail.com

(滇)2005-0005。

9 日龄鸡胚由昆明云岭广大种禽饲料有限公司提供,30 枚。

SD 孕鼠由昆明医学院实验动物中心提供,5 只。

1.1.2 重组腺病毒 Ad-NGF/NTN 及细胞 携带有 NGF/NTN 的重组腺病毒及人肾上皮细胞 293 系由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 DMEM/F12 培养基及特级胎牛血清购自 Gibco 公司;普通胎牛血清购自天津灏阳;青霉素、链霉素、MEM 培养基及胰酶由本所提供;细胞总 RNA 抽提试剂盒购自北京百泰克生物有限公司;M-MuLV Reverse Transcriptase 购自 Fermentas 公司;Anti-human Neurturin 单克隆抗体购自 R&D 公司;Alexa Flour 488 绿色荧光二抗购自 Invitrogen 公司;HRP 标记的二抗购自 KPL 公司;DNA rTaq 聚合酶购自 TaKaRa 公司;Luminate crescendo Western HRP Substrate 购自 Millipore。

1.1.4 引物 PCR 扩增引物由 TaKaRa 公司合成,P1 和 P2 分别为 NTN 特异性鉴定引物,扩增片段大小为 194bp,序列如下:

P1:GTCCGACGAGACGCTGCTG

P2:TGTGGTAGCGGCTGTGCG

## 1.2 方 法

1.2.1 扩增 Ad-NTN 将 1ml 病毒液和 2ml 维持液 (DMEM 高糖,2% 胎牛血清,1% 双抗)加入具有 90% 融合度的 293 细胞的 25cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中,37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵育 2h 后加入 7ml 维持液 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养,待细胞完全病变后即可收获病毒。−80℃ 保存。

1.2.2 骨髓采集 挑选体型较大的 2~3 岁雄猴,肌肉注射速眠新麻醉实验恒河猴(0.05ml/kg),去除骨盆髂骨的髂前上棘顶部的被毛,用碘酊棉和 75% 的酒精棉消毒。用高压灭菌的 12 号骨髓穿刺针从髂前上棘顶部旋转插入髂骨中,穿刺深度为 1cm 左右,根据猴子体型的大小适当调整其距离。抽出内针,用肝素抗凝剂浸润过的 10ml 一次性注射器抽取骨髓,再把骨髓转入抗凝小管混匀后放入冰盒,每只猴子采集 4~6ml。

1.2.3 全骨髓法原代培养 rMSC 将骨髓液移至 15ml 离心管中,1:1 体积加入生理盐水,颠倒混匀,1 500r/min 离心 20min,吸取红细胞上的一层白膜至新的 15ml 离心管,1:1 体积加入生理盐水,颠倒混匀,1 500r/min 离心 5min,弃上清,重复洗涤一次,弃上清。将下层细胞移至含有 8ml DMEM/F12(15% 胎牛血清,1% 双抗)

生长液的培养瓶中,37℃,5% CO<sub>2</sub> 进行原代培养。48h 半量换液,72h 全量换液。以后 2 天换一次液,逐渐去除血细胞和其他贴壁不牢的细胞。

1.2.4 骨髓间充质干细胞的传代培养 0.125% 胰酶消化细胞,1:2 传代培养,2~3 天传代。

1.2.5 骨髓间充质干细胞的透射电镜鉴定 将第三代细胞用 0.125% 胰酶消化,用 PBS 重悬,1 500r/min 离心 5min 洗涤细胞,重复一次,弃上清,加入固定液,送电镜室包埋切片处理后进行透射电镜观察,拍照。

1.2.6 Ad-NGF/NTN 病毒滴度测定 取对数生长长期的 293 细胞接种至 96 孔板,每孔 100μl,10<sup>4</sup> 个细胞,5% CO<sub>2</sub>,37℃ 培养箱培养 24h,细胞贴壁并形成均匀单层。第一列加入培养液作为空白对照,梯度稀释病毒原液至 10<sup>-1</sup>~10<sup>-11</sup> 个梯度,每孔加 100μl,每列一个稀释度,共 11 列。37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 14d。每天显微镜下观察并记录细胞病变情况。依 Reed-Muench 公式计算病毒滴度。

1.2.7 RT-PCR 检测 Ad-NGF/NTN 感染 rMSC 后的转录情况 25cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶融合度为 90% 的 rMSC 中接种病毒 Ad-NGF/NTN,感染复数 MOI = 4.6,感染 48h 后,加入总 RNA 抽提试剂盒裂解液 1ml,抽提细胞总 RNA,用随机引物、逆转录酶 M-MLV 合成 cDNA(按操作说明书操作),以 cDNA 为模板,P1 和 P2 为上下游引物,PCR 扩增片段为 194bp。

1.2.8 免疫荧光检测 Ad-NGF/NTN 基因在 rMSC 中的表达情况 将 rMSC 接种至含有盖玻片的六孔板中,待细胞融合度达到 80% 将重组病毒接至玻片上,感染复数 MOI = 4.6,感染 48h。爬片细胞经多聚甲醛固定,进行免疫荧光检测,荧光显微镜下观察。

1.2.9 制备条件培养基及 Western blot 检测 向 25cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶融合度为 90% 的 rMSCs 中接种病毒 Ad-NGF/NTN,感染复数 MOI = 4.6,感染 48h 后,收集培养液上清,即为条件培养基,一部分−20℃ 冻存,一部分超滤浓缩,15% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,电泳后电转至 PVDF 膜,Western blot 曝光检测。

1.2.10 鸡胚背根神经节体外培养实验检测 NTN 体外活性 取 9 日龄鸡胚,显微镜下无菌剥离背根神经节,置入经多聚赖氨酸包被的 24 孔板中,培养基为 DMEM + 20% 胎牛血清。37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 16h 后更换为 B27 无血清培养基,同时加入 1.2.9 中制备的条件培养基,对照组加入空白 rMSC 培养基上清,继续培养 30h,显微镜下观察。

**1.2.11 SD 胎鼠中脑多巴胺能神经元体外存活实验检测 NTN 体外活性** 取孕 14 天的 SD 大鼠,断颈处死,无菌条件下打开腹腔,取出子宫,放入含预冷的 HBSS 溶液的无菌平皿中,并将该平皿置于冰浴上,小心取出胎鼠,与胎盘分离,用眼科镊撕开颅腔,将整个脑组织分离,切下中脑腹侧区,放入预冷的 HBSS 溶液中,清理脑膜和血管等组织后将中脑组织剪碎,移入无菌离心管中,用预冷的 HBSS 溶液洗涤,加入预热的 0.125% 胰酶消化 20min,加入培养基反复吹打分散细胞。置入经多聚赖氨酸包被过的含盖玻片的 6 孔板中,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 24h 后换为 B27 无血清培养基,同时加入 1.2.9 制备的条件培养基继续培养,对照组加入空白 rMSC 培养基上清,每三天半量换液,于培养第 21 天观察结果。

## 2 结果

### 2.1 Ad-NGF/NTN 的扩增

种毒后 24h 可观察到明显病变。细胞出现变圆、肿胀并聚集成串珠状,最终多数的细胞脱落,漂浮于上清液中。图 1a 为正常 293 细胞,图 1b 为种毒后 24 小时的病变情况。

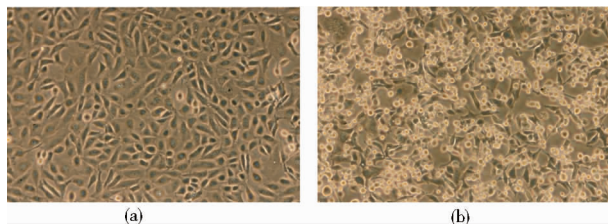


图 1 重组腺病毒扩增时的病变状况 (200X)

Fig.1 Cytopathic effect of 293 after transfection (200X)

(a) Control (b) 24 hours

### 2.2 rMSC 的原代培养和传代培养

rMSC 原代培养 96h 后可观察到培养的上清中有很多的漂浮红细胞及少量贴壁细胞,根据形态的不同,贴壁细胞可分为三种:小圆细胞、星形细胞和单集落生长的长梭形细胞(即 rMSC)(图 2a)。贴壁细胞前 4 天生长缓慢,之后迅速增殖,且以长梭形细胞占优势,8 天左右 95% 以上融合。通过间断摇动培养瓶,可使骨髓血中大量的红细胞、白细胞等漂浮细胞与贴壁细胞分离。由于梭形细胞的优势生长,第 3 代时,几乎全为梭形细胞(图 2b),随着传代次数的增加,rMSC 变得宽大扁平且增殖速度减慢(图 2c,2d)。

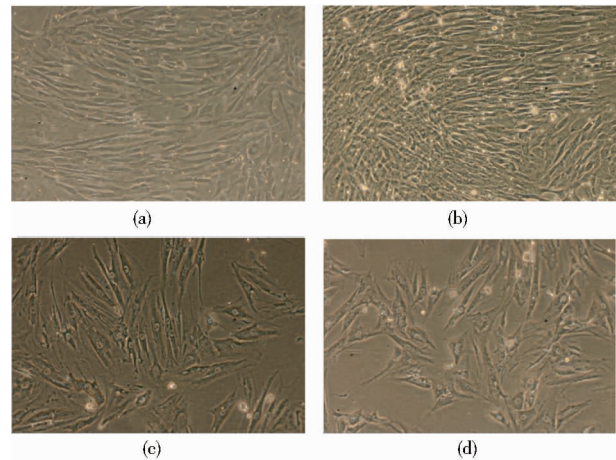


图 2 BMSCs 的原代培养和传代培养

Fig.2 Primary culture and subculture of rMSC

(a) The primary rMSC (b) The third generation rMSC (c) The fifth generation rMSC (d) The seventh generation rMSC

### 2.3 rMSC 的透射电镜结果

透射电镜观察提示该细胞为较幼稚低分化的原始细胞,以圆、类圆形细胞为主,细胞核为单核,大而不规则,呈卵圆形或不规则的多边形,有核裂;核表面的着色斑块分布不多,核比较透亮,说明以常染色体为主,分布稀疏、电子密度较低(图 3a)。微绒毛较多、向细胞内凹陷,胞浆内内质网丰富,游离的核糖体数量较多,线粒体小(图 3b)。

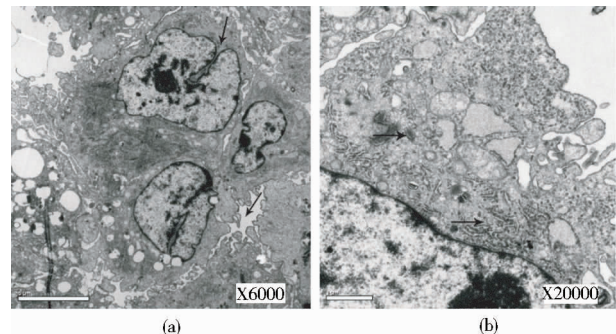


图 3 rMSC 透射电镜图

Fig.3 TEM pictures of rMSC

(a) TEM picture of rMSC (×6 000) (b) TEM picture of rMSC (×20 000)

### 2.4 Ad-NGF/NTN 感染 rMSC 后的 NTN 表达情况

RT-PCR 结果显示目的基因 NTN 能够在 rMSC 中发生转录(图 4)。免疫荧光结果显示种毒 48h 的 rMSC 中有目的基因 NTN 的表达(图 5)。通过 Western blot 检测到在接种重组腺病毒 Ad-NGF/NTN 的 rMSC 细胞

的条件培养液中有 NTN 蛋白,证明该基因所表达的 NTN 前体蛋白能够被细胞加工并能分泌至胞外,NTN 能以二聚体的活性形式存在于培养上清液中(图 6)。

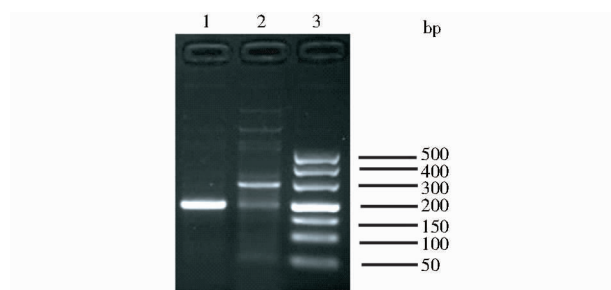


图 4 Ad-NGF/NTN 感染 rMSC 的 PCR 检测

Fig. 4 1% Agarose gel electrophoresis analysis of the PCR product of NTN

1: rMSC 48h after transfection; 2: rMSC without transfection; 3: DNA marker DL 500

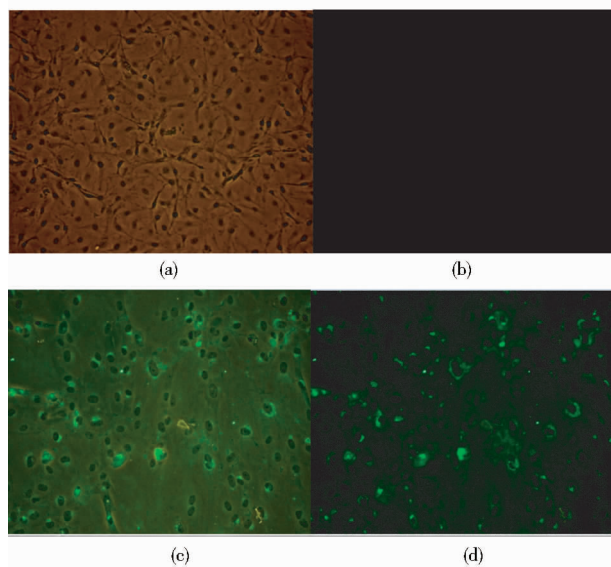


图 5 Ad-NGF/NTN 感染 rMSC 48h

免疫荧光检测 NTN 蛋白

Fig. 5 The immunofluorescence of rMSC 48h after Ad-NGF/NTN infection

(a) Control rMSC under bright field (b) Control rMSC under dark field (c) rMSC 48h after Ad-NGF/NTN under bright field (d) rMSC 48h after Ad-NGF/NTN under dark field

## 2.5 NTN 体外活性检测结果

2.5.1 鸡胚背根神经节的体外培养 体外培养的鸡胚背根神经节实验组可见神经节周围有放射状的神经突起生长(图 7a),对照组无突起产生(图 7b)。

2.5.2 胎鼠中脑多巴胺能神经元的体外培养 培养

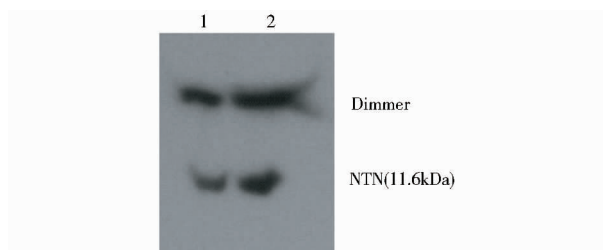


图 6 Ad-NGF/NTN 感染 rMSC Western blot

检测 NTN 蛋白

Fig. 6 Western blot of rMSC 24h and 48h after Ad-NGF/NTN infection

1:NTN expression 24h after infection; 2:NTN expression 48h after infection

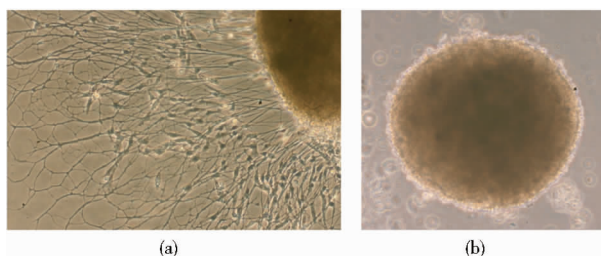


图 7 鸡胚背根神经节体外培养

Fig. 7 Chicken embryonic dorsal root ganglion cultured *in vitro*

(a) The dorsal root ganglia cultured with Ad-NGF/NTN condition medium (b) The dorsal root ganglia cultured with control rMSC condition medium

第 21 天观察,实验组神经元胞体周围突起增长,变粗,胞体较大呈梭形,生长状况良好(图 8a),对照组细胞已死亡(图 8b)

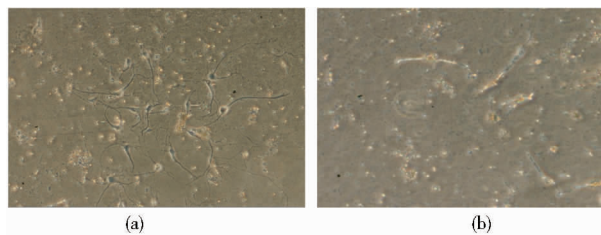


图 8 胎鼠中脑多巴胺能神经元体外培养

Fig. 8 Fetal rats midbrain dopaminergic neurons cultured *in vitro*

(a) The neurons cultured with Ad-NGF/NTN condition medium (b) The neurons cultured with control rMSC condition medium



### 3 讨 论

骨髓间充质干细胞来源充足,取材方便,损伤小,免疫原性低,移植排斥反应小,而且还可避免胚胎干细胞和神经干细胞涉及的伦理问题,目前临床前和临床试验尚未见致畸作用的发生。已有报道称可将其在体外培养、增殖、诱导后转化为骨、软骨组织等,为骨、软骨组织等的损伤提供潜在的修复能力<sup>[5,6]</sup>。并且它可经过不可逆的终末分化过程产生子代细胞,通过各种子代细胞、前体细胞的分化谱系产生多种细胞表现型的表达,因此 BMSC 成为组织工程较为理想的种子细胞来源<sup>[7]</sup>。

帕金森氏病(PD)是中枢神经系统疾病基因治疗的最佳模型,其病变部位明确,病变范围局限,变性细胞单一<sup>[8]</sup>,主要是黑质多巴胺(DA)能神经元变性、缺失导致纹状体内 DA 水平下降,因此在黑质纹状体系统内移植能够分泌 DA 的细胞,恢复 DA 的神经环路,成为一种针对“病因”的理想治疗方法。NTN 与胶质细胞源性神经营养因子(Glial derived neurotrophic factor, GDNF)属于同一家族,对 DA 能神经元具有营养、支持、保护和损伤修复作用,这使其成为 PD 潜在有效的治疗因子。

以往的大多数研究是将 BMSCs 作为非遗传修饰细胞应用治疗 PD,即不含体外导入的外源性目的基因,天然具有治疗作用的细胞。Liu 等<sup>[9]</sup>将 BMSCs 直接移植到受损的纹状体,依赖脑内的环境信号诱导这些细胞分化为多巴胺能神经元。而随着对 BMSCs 研究的进一步加深及基因转移技术的探索,目前越来越多的是将 BMSCs 作为遗传修饰细胞,应用获得了体外导入外源性目的基因的细胞进行 PD 的治疗。

携带 NTN 基因的 BMSCs 工程细胞不仅可以持续表达 NTN 蛋白,在移植至脑内后对病灶区已损坏的神经元起到保护的作用,并且由于 BMSCs 的分化潜能自身在体内微环境中也可被诱导分化为神经元,为机体补充新生的神经元,从而解决凋亡的神经元无法再生

的问题。

建立携带有外源基因的干细胞系不同于其他普通细胞系,因为基于干细胞的多向分化潜能,在其自身持续表达引入的外源基因蛋白的同时,体外加入一定的外源诱导剂,使其在内外诱导的共同作用下向某种细胞定向分化,再将已分化的细胞移植到病灶区,从而达到根治疾病的目的。

### 参考文献

- [1] Kotzbauer P T, Lampe P A, Heukeroth R O, et al. Neurturin, a relative of glial cell line derived neurotrophic factor. *Nature*, 1996, 384(6608):467-470.
- [2] Kordower J H, Herzog C D, Biegl D, et al. Delivery of Neurturin by AAV2 (CERE-120)-Mediated Gene Transfer Provides Structural and Functional Neuroprotection and Neurorestoration in MPTP-Treated Monkeys. *Ann Neurol*, 2006, 60(6):706-715.
- [3] Pereira R, Halford K, O' Hara M, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(11):4857-4861.
- [4] Prockop D. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276(5309):71-74.
- [5] Pittenger M, Mackay A, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284(5411):143-147.
- [6] Richards M, Huijbregtse B, Caplan A, et al. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res*, 1999, 17(6):900-908.
- [7] Li Y, Chen J, Wang L, et al. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2001, 316(2):67-70.
- [8] Beal M. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(5):325-334.
- [9] Liu S, Yu Y, An H, et al. Cloning and identification of a novel ubiquitin-like protein, BMSC-UbP from human bone marrow stromal cells. *Immunol Lett*, 2003, 86(2):169-175.

## Establishment of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expressing Neurotrophic Factor Neurturin and Activity Detection *in Vitro*

WANG Wan-pu SUN Mao-sheng LI Hong-jun XIE Tian-hong YAN Min ZHOU Yan YIN Na

(Laboratory of Biomolecular, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences,  
Institute of Medical Biology, Kunming 650118, China)

**Abstract** Study the protection and repairation of damaged neurons which leads to neurodegenerative diseases, neurotrophic factor Neurturin gene was transfected into Rhesus bone marrow mesenchymal stem cells (rMSC) by recombinant adenovirus. The NTN gene could be transcribed and expressed in cytoplasm of rMSC and be secreted which was detected by RT-PCR、immunofluorescence、Western blotting, and then, the culture of Chicken embryonic dorsal root ganglion test and the culture of Fetal rats midbrain dopaminergic neurons test had indicated that the NTN protein had good biological activity *in vitro*. The results gave a new method for stem cell transplantation to treat the neurodegenerative diseases caused by neurons damage.

**Key words** Rhesus bone marrow mesenchymal stem cells Recombinant adenovirus Neurotrophic factor Neurturin Activity detection