

慢病毒介导 shRNA LINGO-1 质粒转染促进骨髓间充质干细胞向神经细胞转化的研究

刘峰¹, 李春胜², 李亚南³

摘要 目的:探究慢病毒介导 shRNA LINGO-1 质粒转染促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)向神经细胞转化的研究。方法:利用 shRNA 基因干扰技术,构建 shRNA LINGO-1 干扰载体,慢病毒转染 BMSCs,根据病毒转染情况分成空白对照组(未转染慢病毒的 BMSCs)、空载体病毒组(转染不含 shRNA LINGO-1 干扰载体慢病毒的 BMSCs)、干扰载体病毒组(转染 shRNA LINGO-1 干扰载体慢病毒的 BMSCs)。利用流式细胞仪检测 BMSCs 的表面蛋白,利用 RT-PCR 和 Western-Blot 检测胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经丝蛋白(NF)、巢蛋白的表达。结果: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%。慢病毒转染效率为 90%以上。空白对照组、空载体病毒组和干扰载体病毒组的 GFAP、NSE、NF 和巢蛋白 mRNA 的相对表达量比较差异有统计学意义($P<0.05$),其中空载体病毒组和空白对照组的比较差异无统计学意义($P>0.05$),干扰载体病毒组和空载体病毒组的差异有统计学意义($P<0.05$)。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 shRNA LINGO-1 干扰载体转染促进 BMSCs 可提高 BMSCs 向神经细胞转化的效率。

关键词 LINGO-1;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 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.07.001

刘峰, 李春胜, 李亚南. 慢病毒介导 shRNA LINGO-1 质粒转染促进骨髓间充质干细胞向神经细胞转化的研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(7): 325-329.

Lentivirus-Mediated shRNA LINGO-1 Plasmid Transfection Promotes Transformation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neurons LIU Feng¹, LI Chun-sheng², LI Ya-nan³. 1. Dezhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong 253000, China; 2. Shandong Zaozhuang Xinyuan Specialized Hospital for Lumbago and Leg Pain, Shandong 227100, China; 3. Department of Operating Room, Laoshan District, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong 266003, China

Abstract Objective: To investigate the effect of lentivirus-mediated shRNA LINGO-1 plasmid transfection on the transformation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into neural cells. **Methods:** The shRNA LINGO-1 interfering vector was constructed by shRNA gene interference technique. Lentivirus was transfected into BMSCs. According to outcome of transfection, BMSCs were assigned to the blank control group (not transfected), empty vector virus group (transfected with lentivirus not containing the shRNA LINGO-1 interfering vector), and interfering vector virus group (transfected with lentivirus containing the shRNA LINGO-1 interfering vector). The surface proteins on BMSCs was detected by flow cytometry. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), neuron-specific enolase (NSE), neurofilament protein (NF), and Nestin was detected by RT-PCR and Western-Blot. **Results:** In second generation BMSCs, the expression of CD44 and CD29 was 60.2% and 58.3%, respectively, and the expression of CD34 and CD45 was 3.4% and 2.6%, respectively. Lentivirus transfection efficiency was over 90%. The transfection efficiency was high. The relative expression of GFAP, NSE, NF, and Nestin mRNA in the blank control, empty vector virus, and interfering vector virus groups was significantly different ($P<0.05$), but there was no significant difference between the empty vector virus group and blank control group ($P>0.05$). There was a statistically significant difference between the interference vector virus group and the empty vector virus group ($P<0.05$). The protein expression level detected by Western-blot also showed the same expression characteristics. **Conclusion:** Lentivirus-mediated shRNA LINGO-1 interfering vector transfection promotes the transformation of BMSCs into neural cells.

Key words LINGO-1; bone marrow mesenchymal stem cells; lentivirus transfection; glial fibrillary acidic protein; neuron-specific enolase

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多向分化潜能,在特定环境下可分化成人体各种细胞^[1],如骨细胞、软骨细胞及神经细胞等^[2-4]。

新近研究表明,BMSCs可在特定诱导条件下转化成神经细胞,进而能促进中枢神经损伤的修复,而且BMSCs来源于患者自体,移植后可避免排斥反应,另外BMSCs能分泌多

作者单位

1. 山东省德州市中医院
山东 德州 253000
 2. 山东省枣庄新远大腰痛专科医院
山东 枣庄 277100
 3. 山东省青岛市青岛大学附属医院崂山院区手术室
山东 青岛 266003
- 收稿日期** 2018-11-05
通讯作者 刘峰
153033531@qq.com

种细胞因子,为神经修复提供一个新思路^[5]。

LINGO-1 (Leucine rich repeat and Ig domain containing 1)是由人体15号染色体编码,富含亮氨酸编码重复序列的基因单位,在进化上高度保守。该分子在神经发育、轴突再生和髓鞘形成方面有重要的作用^[6]。本研究将shRNA LINGO-1干扰载体以慢病毒为媒介导入BMSCs,探究是否慢病毒介导shRNA LINGO-1质粒转染促进BMSCs向神经细胞转化,从而为临床上中枢神经损伤患者提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清购自美国Gibco公司;DMEM、0.25%胰酶Trypsin、Trizol购自美国Invitrogen公司;氯仿、75%酒精及逆转录试剂盒购自美国ABI Applied Biosystems公司;Trizol RNA iso购自日本Takara公司;内参基因GAPDH和胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)引物由上海生工公司生产;Real-time PCR仪购自美国Bio-rad公司。

1.2 方法

1.2.1 人BMSCs的分离和培养 选取20例健康志愿者,男8例,女12例;年龄为(27.48±7.83)岁。实验方案获得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 cm²Hank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 d换一次细胞培养液。BMSCs细胞融合率达70%~80%后进行传代培养。

1.2.2 BMSCs的鉴定 采用流式细胞仪检测BMSCs的表面蛋白,CD29、CD44、CD71、CD90和CD106等。采用倒置光学显微镜观察BMSCs的细胞形态。

1.2.3 慢病毒shRNA LINGO-1干扰载体的构建 慢病毒shRNA LINGO-1干扰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shRNA LINGO-1干扰载体的克隆切入点是XhoI/BamHI,编号为ENST00000005893。采用基因测序证明序列的正确性。

1.2.4 慢病毒细胞转染和实验分组 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,MOI=50,慢病毒滴度为3×10⁷,根据病毒转染情况分成3组:空白对照组(未转染慢病毒的BMSCs)、空载体病毒组(转染不含shRNA LINGO-1干扰载体病毒的BMSCs)、干扰载体病毒组(转染shRNA LINGO-1干扰载体慢病毒的BMSCs)。

1.2.5 CCK-8试剂盒检测细胞活性 慢病毒转染BMSCs后,细胞计数,接种于96孔板,每孔细胞量为>5×10⁴个/孔,设置2个副孔,置于37℃细胞培养箱中孵育,分别于孵育时间点6 h、12 h、24 h、48 h和72 h每孔加入10 μL CCK-8溶液,测定450 nm吸光度;建议采用双波长进行测定,检测波长450~490 nm,参比波长600~650 nm。

1.2.6 实时荧光定量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 Trizol RNA iso,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℃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:预变性:95℃ 30 s,1个循环;PCR 95℃ 5 s,60℃ 30 s,40个循环;溶解曲线 95℃ 5 s;60℃ 1 min;降温 50℃ 30 s,1个循环。GFAP引物序列:正义链5'-CAAGAGGTCCTGTCTTCAGATGA-3',反义链5'-TCTGTTTCCGTTTCCTGGTTC-3';NSE引物序列:正义链5'-GTGATAAAGGTTTCGGTTGCTG-3',反义链5'-TGTTTTCTGTGGCTCCTCCTCTGG-3';神经丝蛋白(neurofilament, NF)引物序列:正义链5'-CCGATAAAGGTTATCGGTTGCAT-3,反义链5'-GGTTTTCAATGGCTCCTCCTCTCC-3';巢蛋白(nestin)引物序列:正义链5'-AGGATACAGGTTTCGGTTGCTG-3',反义链5'-ATGGTTCTATGGCTCCTCCTCTGG-3';hGAPDH引物序列:正义链5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',反义链5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。采用2^{-ΔΔCT}的方法计算目的基因的相对表达量。

1.2.7 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℃的离心机中离心,预设5 000 r/min,5 min后提取上清,经95℃煮沸后,收集蛋白备用。制备浓缩胶10 mL,分离胶20 mL。上样后电泳分离,转膜后在4℃冰箱避光孵育过夜(>12 h)。GFAP、NSE、NF和Nestin一抗经一抗稀释液1:10 000

稀释后加入样本离子膜。第2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。采用Image J软件分析蛋白条带。

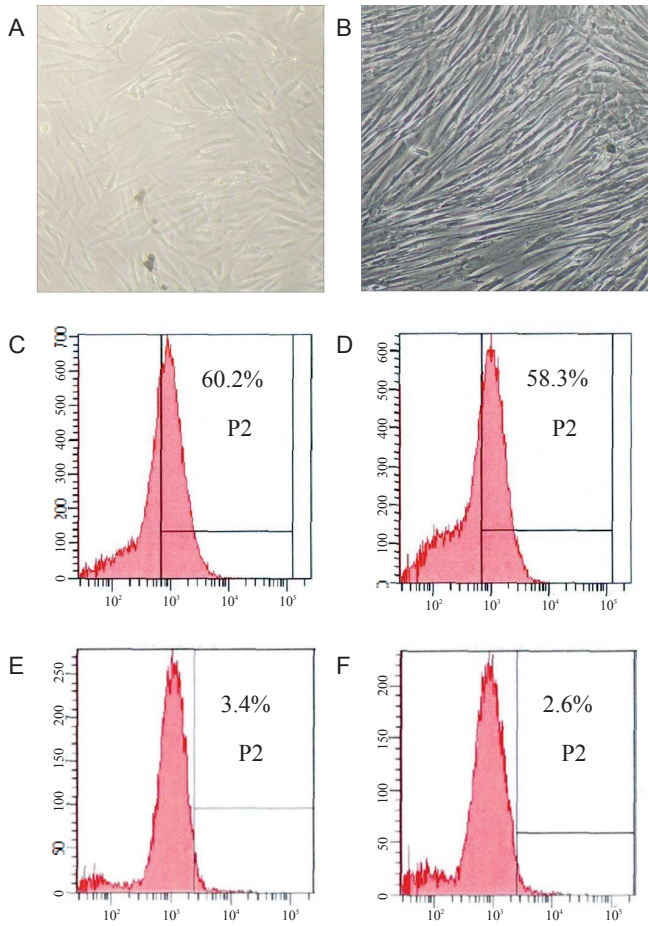
1.3 统计学处理

应用SPSS 16.0软件进行统计学分析,计量结果以($\bar{x}\pm s$)表示,单因素方差分析,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1);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的表面蛋白,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%。

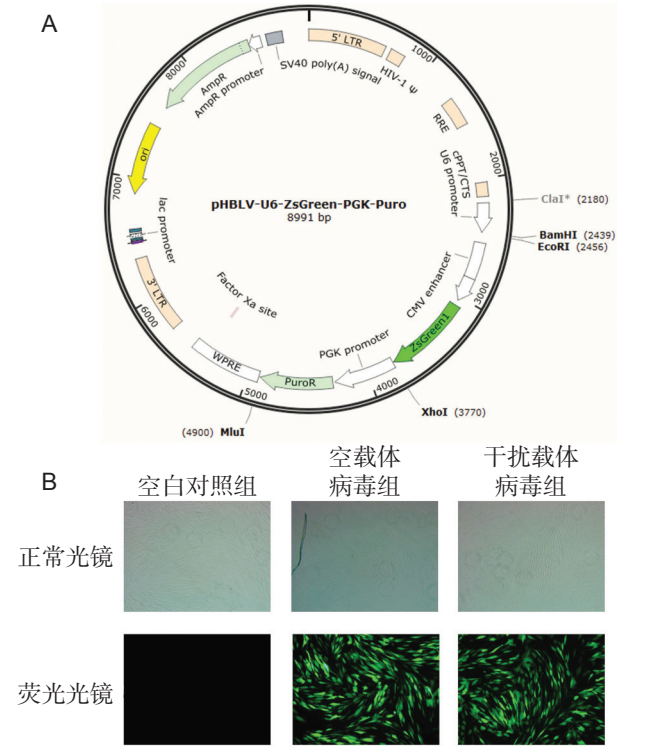


注:A:原代BMSCs($\times 200$);B:第2代BMSCs($\times 200$);C:第2代BMSCs表面蛋白CD44的表达;D:第2代BMSCs表面蛋白CD29的表达;E:第2代BMSCs表面蛋白CD34的表达;F:第2代BMSCs表面蛋白CD45的表达

图1 人BMSCs的培养和鉴定

2.2 慢病毒 shRNA LINGO-1 干扰载体的构建和慢病毒转染 BMSCs

构建慢病毒 shRNA LINGO-1 干扰载体(图2A);进行空白对照组、空载体病毒组、干扰载体病毒组的慢病毒转染(图2B),慢病毒转染效率为90%以上,转染效率较高。

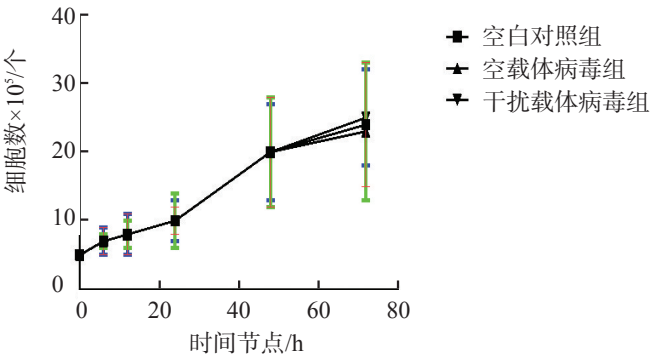


注:A:慢病毒载体构建的模式;B:3组转染BMSCs,可见转染效率为90%以上($\times 200$)

图2 慢病毒 shRNA LINGO-1 干扰载体的构建和慢病毒转染 BMSCs

2.3 CCK-8检测细胞增殖活性

以6 h、12 h、24 h、48 h和72 h为时间节点,检测3组BMSCs的细胞活性,可见3组在时间节点细胞量差异无统计学意义($P>0.05$,图3),说明慢病毒转染对细胞的增殖活性无影响。



注:3组间比较, $^{\text{①}}P>0.05$

图3 CCK-8检测细胞增殖活性

2.4 实时荧光定量PCR检测神经标志物GFAP、NSE、NF和Nestin mRNA的表达

3组的GFAP mRNA比较差异有统计学意义($F=17.903, P=0.018$,图4A),其中空载体病毒组和空白对照组的差异无统计学意义($q=0.942, P=1.923$),干扰载体病毒组和空载体病毒组的差异有统计学意义($q=1.922, P=0.022$)。干扰载体病毒组与空白对照组比较差异无统计学意义($q=0.107, P=1.215$)。

3组的NSE mRNA比较差异有统计学意义($F=10.213, P=0.028$,图4B),其中空载体病毒组和空白对照组的差异无统计学意义($q=0.179, P=0.484$);干扰载体病毒组和空载体病毒组的差异有统计学意义($q=2.752, P=0.012$)。干扰载体病毒组与空白对照组比较差异无统计学意义($q=0.039, P=1.691$)。

另外,NF和Nestin的mRNA水平检测中,空载体病毒组和空白对照组的差异无统计学意义($P>0.05$,图4C-D),干扰载体病毒组和空载体病毒组的差异有统计学意义($P<0.05$,图4C-D)。

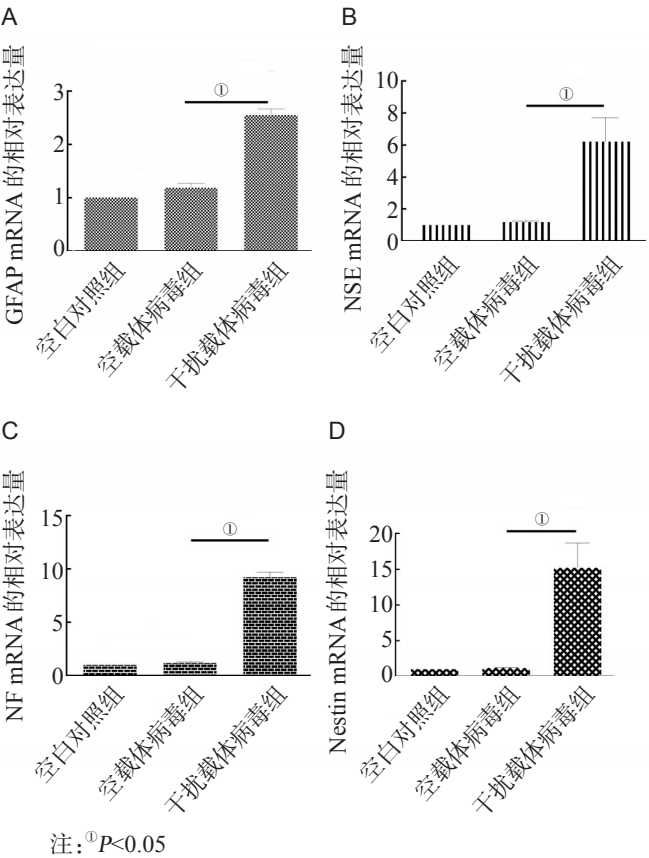


图4 PCR检测3组GFAP(A)、NSE(B)、NF(C)、Nestin(D) mRNA的相对表达

2.5 Western-blot检测神经标志物GFAP、NSE、NF和Nestin的蛋白表达水平

3组的GFAP相对蛋白表达量比较差异有统计学意义($F=11.731, P=0.0174$,图5),其中空载体病毒组与空

白对照组比较差异无统计学意义($q=0.227, P=0.721$),干扰载体病毒组与空载体病毒组比较差异有统计学意义($q=1.389, P=0.0291$)。干扰载体病毒组与空白对照组比较差异无统计学意义($q=0.413, P=0.669$)。

3组的NSE相对蛋白表达量比较差异有统计学意义($F=9.483, P=0.0261$),其中空载体病毒组与空白对照组比较差异无统计学意义($q=0.327, P=0.971$);干扰载体病毒组与空载体病毒组比较差异有统计学意义($q=2.001, P=0.002$)。干扰载体病毒组与空白对照组比较差异无统计学意义($q=0.113, P=1.003$)。另外,NF和Nestin的蛋白水平检测中,空载体病毒组和空白对照组的组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),干扰载体病毒组与空载体病毒组的组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。干扰载体病毒组与空白对照组比较差异无统计学意义($q=0.094, P=1.973$)。

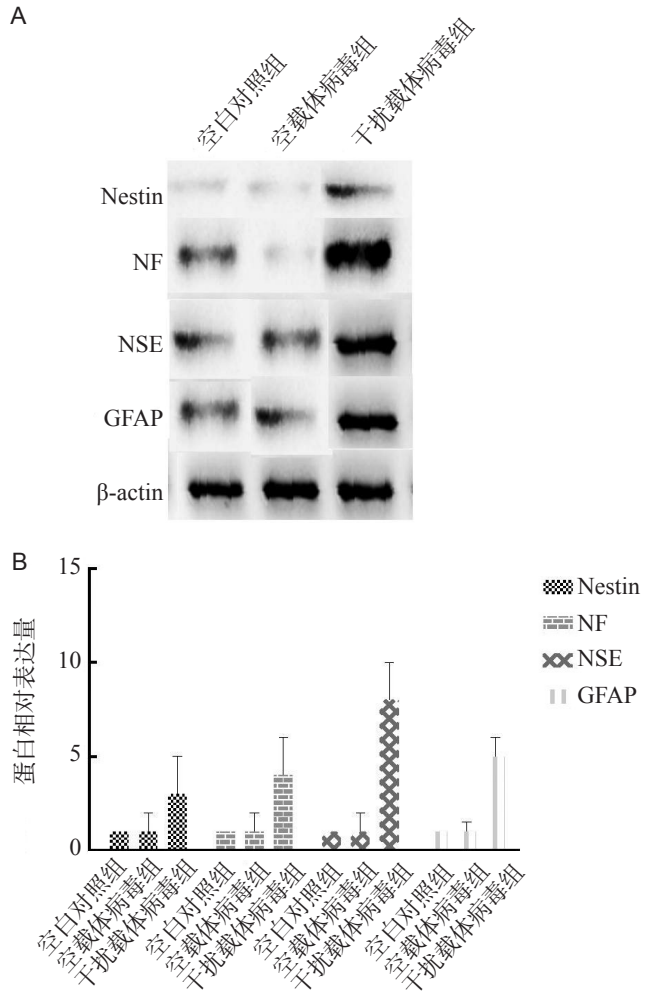


图5 Western-blot检测3组GFAP、NSE、NF、Nestin的蛋白印迹(A)和蛋白相对表达(B)

3 讨论

近年来,随着交通事故的多发,在交通事故中发生的中枢神经损伤和脊髓损伤较常见^[7],针对中枢神经损

伤的治疗一直是临床难点。BMSCs具有多向分化潜能,可分化成骨细胞、软骨细胞及神经细胞^[8-11]。有研究表明,抑制LINGO-1的表达,可促进轴突生长,进而改善脊髓损伤^[12]。本研究利用shRNA干扰技术,构建LINGO-1的shRNA LINGO-1干扰载体,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,为临床上中枢神经损伤和脊髓损伤提供新的种子细胞。有研究表明,LINGO-1只在脑和脊髓中表达,且大脑皮质的表达水平最高,脊髓中表达最低,利用siRNA干扰技术将LINGO-1阻断后,可促进大鼠脊髓损伤的修复^[13]。本研究利用shRNA干扰技术,构建LINGO-1的shRNA LINGO-1干扰载体,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,为90%以上,可在最大程度上利用shRNA LINGO-1干扰载体对BMSCs的转化作用。

GFAP、NSE和NF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^[14],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^[15]。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^[16]。NF是构成神经细胞轴突中间丝的主要成分,由三种特定的蛋白亚基(NF-L、NF-M、NF-H)组装而成^[17],其功能是提供弹性使神经纤维易于伸展和防止断裂。Nestin是神经干细胞、胰腺干细胞的标志分子,是中间纤维家族的成员,被列为第Ⅵ类中间纤维,其结构和分子量与其他中间纤维成员有差异^[18]。本研究选用以上4种神经细胞(包括神经胶质细胞和神经元细胞)的特异性标志物,采用RT-PCR和Western-blot的实验方法,从基因和蛋白两个层面上检测空白对照组、空载体病毒组和干扰载体病毒组的GRAP和NSE的表达水平,结果显示,空白对照组、空载体病毒组和干扰载体病毒组的GFAP mRNA的相对表达量比较差异有统计学意义($P<0.05$),其中空载体病毒组和空白对照组组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),干扰载体病毒组和空载体病毒组组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。同样,NSE mRNA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shRNA LINGO-1干扰载体通过慢病毒介导的方法转染BMSCs,可提高BMSCs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。然而GFAP是神经胶质细胞的标志物,而NSE、NF和Nestin是神经元细胞的特异标志物,故此,shRNA LINGO-1干扰载体对于BMSCs的促神经细胞转化作用是无序的,并没有特异性的分

化方向,至于特异性分化方向需要进一步进行探究。另外从蛋白水平上,将shRNA LINGO-1干扰载体通过慢病毒介导的方法转染BMSCs,可提高其向神经细胞的转化效率,故而,神经细胞的标记物GFAP、NSE、NF和Nestin的表达量明显增高。

综上所述,构建shRNA LINGO-1干扰载体通过慢病毒介导的方法转染BMSCs,可提高其向神经细胞的转化效率,为临床上中枢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: R65-72.
- [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: e88794.
- [3] Zhang H, Ma X, Zhang L, et al. The ability to form cartilage of NPMSC and BMSC in SD rats [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8: 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: 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: 106-117.
- [6] Mj S, Miller RH, Lee X, et al. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes [J]. Nat Neurosci, 2005, 8: 745-751.
- [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: 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, 6: 4082-4087.
- [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: 1237-1241.
- [10] Ma S, Xie N, Li W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells [J]. Cell Death Differ, 2014, 21: 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: 8056-8061.
- [12] Zhao XH, Jin WL, Ju G. An in vitro study on the involvement of Lingo-1 and Rho GTPases in Nogo-A regulated differentiation of oligodendrocyte precursor cells[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 36: 260-269.
- [13] Mi S, Sandreck A, Miller RH, et al. LINGO-1 and its role in CNS repair[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40: 1971-1978.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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: 156-165.
- [17] 汪静,朱雨岚. 蛋白激酶C的生理功能及其与神经系统年龄相关疾病研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2017, 12: 52-54.
- [18] Rizzi C, Tiberi A, Giustizieri M, et al. NGF steers microglia toward a neuroprotective phenotype[J]. Glia, 2018, 66: 1395-1416.

(本文编辑:王晶)