

基因修饰骨髓间充质干细胞脑源性神经营养因子的表达变化

谢茂松,徐国兴,黄礼彬

基金项目:福建省卫计委中青年骨干人才培养项目(No. 2014-ZQN-ZD-16)

作者单位:(350005)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院眼科 福建省眼科研究所

作者简介:谢茂松,博士,副教授,副主任医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:谢茂松. pandaxms1978@163.com

收稿日期:2016-05-09 修回日期:2016-09-05

Changes of brain - derived neurotrophic factor expression in gene modified bone marrow mesenchymal stem cells

Mao-Song Xie, Guo-Xing Xu, Li-Bin Huang

Foundation item: Young and Middle-aged Talent Training Project of Fujian Provincial Health and Family Planning Commission (No. 2014-ZQN-ZD-16)

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Mao-Song Xie. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. pandaxms1978@163.com

Received:2016-05-09 Accepted:2016-09-05

Abstract

• **AIM:** To study the changes of brain - derived neurotrophic factor (BDNF) expression in gene modified bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC).

• **METHODS:** BMSC were divided into blank control group (without transfected BMSC), negative control group (empty vector without BDNF gene transfected BMSC) and experimental group (BDNF gene transfected BMSC). The expression of BDNF mRNA in BMSC was measured by Realtime PCR, and the expression of BDNF in BMSC was measured by ELISA.

• **RESULTS:** The BDNF mRNA expressions of 3, 4, 5, 6, 7 and 8-generation BMSC cells in the experimental group were higher than those in the blank control group and negative control group. The differences were statistically significant ($P_3: F=491.788, P<0.05$; $P_4: F=380.112, P<0.05$; $P_5: F=1854.929, P<0.05$; $P_6: F=224.540, P<0.05$; $P_7: F=619.155, P<0.05$; $P_8: F=10.092, P<0.05$). As the BMSC cells in the experimental group passaging, the BDNF mRNA expressions in the experimental group decreased. The difference of BDNF mRNA expression among different passage cells was statistically significant ($F=298.603, P<0.05$). The BDNF secretion of 3, 4, 5, 6, 7

and 8-generation BMSC cells in the experimental group were higher than those in the blank control group and negative control group. The differences were statistically significant ($P_3: F=520.609, P<0.05$; $P_4: F=734.520, P<0.05$; $P_5: F=152.847, P<0.05$; $P_6: F=80.372, P<0.05$; $P_7: F=96.083, P<0.05$; $P_8: F=38.532, P<0.05$). As the BMSC cells in the experimental group passaging, the BDNF secretion decreased. The difference of BDNF secretion among different passage cells was statistically significant ($F=230.084, P<0.05$).

• **CONCLUSION:** Long-term expression of BDNF in BMSC can be enhanced by genetic engineering.

• **KEYWORDS:** bone marrow mesenchymal stem cell; brain-derived neurotrophic factor; gene modified; retinal degenerative diseases; therapy

Citation: Xie MS, Xu GX, Huang LB. Changes of brain-derived neurotrophic factor expression in gene modified bone marrow mesenchymal stem cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016;16(10):1816-1819

摘要

目的:研究基因修饰的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)分泌脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达变化。

方法:实验分为空白对照组(未经转染 BMSC 细胞)、阴性对照组(采用不含 BDNF 基因的空载体质粒转染的 BMSC 细胞)和实验组(采用含 BDNF 基因的质粒转染的 BMSC 细胞)。Realtime PCR 测定基因修饰的 BMSC 细胞 BDNF mRNA 表达, ELISA 测定基因修饰的 BMSC 细胞 BDNF 的分泌表达。

结果:实验组第 3、4、5、6、7 和 8 代 BMSC 细胞 BDNF mRNA 表达高于空白对照组和阴性对照组,组间差异具有统计学意义($P_3: F=491.788, P<0.05$; $P_4: F=380.112, P<0.05$; $P_5: F=1854.929, P<0.05$; $P_6: F=224.540, P<0.05$; $P_7: F=619.155, P<0.05$; $P_8: F=10.092, P<0.05$)。实验组 BMSC 细胞随着细胞传代, BDNF mRNA 表达逐渐下降,不同代数间差异具有统计学意义($F=298.603, P<0.05$)。实验组 3、4、5、6、7 和 8 代 BMSC 细胞 BDNF 的分泌表达高于空白对照组和阴性对照组,组间差异具有统计学意义($P_3: F=520.609, P<0.05$; $P_4: F=734.520, P<0.05$; $P_5: F=152.847, P<0.05$; $P_6: F=80.372, P<0.05$; $P_7: F=96.083, P<0.05$; $P_8: F=38.532, P<0.05$)。实验组 BMSC 细胞随着细胞传代, BDNF 的分泌表达逐渐下降,不同代数间差异具有统计学意义($F=230.084, P<0.05$)。

结论:通过基因工程可增强 BMSC 细胞表达 BDNF。

关键词:骨髓间充质干细胞;脑源性神经营养因子;基因修饰;视网膜变性疾病;治疗

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.10.07

引用:谢茂松,徐国兴,黄礼彬. 基因修饰骨髓间充质干细胞脑源性神经营养因子的表达变化. 国际眼科杂志 2016;16(10):1816-1819

0 引言

视网膜变性疾病是严重的不可逆性致盲眼病。目前此类疾病尚无有效的治疗方法^[1-2]。细胞移植治疗为视网膜变性疾病的治疗点亮了希望。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)由于多向分化潜能、自体取材方便,无免疫原性等优点,是理想的种子细胞^[3-4]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)可增加突触可塑性及神经发生,促进神经细胞生存^[5-6]。干细胞治疗和基因治疗有望为视网膜变性疾病的治疗提供新的途径。本项目研究拟通过基因工程增强 BMSC 表达 BDNF 神经营养因子,研究基因修饰的 BMSC 细胞 BDNF 的表达变化。

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级雄性 SD 大鼠(福建医科大学实验动物中心),10 只,4~6 周龄,体质量 80~100g,排除眼部及全身疾病,按照正常昼夜节律,室内温度 25℃,相对湿度 40%~65%,置于独立笼内,可自由摄食、饮水,大鼠的实验条件及使用过程符合视光与眼科研究协会(Association for research in vision and ophthalmology, ARVO)相关的动物使用规定。纯化的 BDNF 过表达慢病毒液(上海吉玛制药技术有限公司)。FITC-小鼠抗 CD44 单克隆抗体、FITC-小鼠抗 CD34 单克隆抗体、FITC-小鼠抗 CD90 单克隆抗体(Santa Cruz 公司),DMEM/F12 培养液、胎牛血清、胰酶(Gibco 公司),大鼠 BDNF ELISA 试剂盒(R&D 公司),RNeasy Mini Kit(Qiagen),PrimeScript[®] 1st strand cDNA Synthesis Kit(Takara),SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Kit(Takara)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 BMSC 取材和培养鉴定 大鼠 BMSC 培养鉴定方法^[7]:健康清洁级 4 周龄雄性 SD 大鼠腹腔注射 100g/L 水合氯醛麻醉后无菌条件下取出双侧胫骨和股骨,无菌 PBS 冲洗备用。把胫骨和股骨从中间剪断,用完全培养液(DMEM/F12 培养液+200mL/L FBS+50U/mL 肝素)10mL 反复冲洗骨髓腔,冲洗液经 200 目不锈钢标准筛过滤掉大的团块后充分吹打混匀获取细胞悬液,接种于 25cm²培养瓶中,置于 37℃,50ml/L CO₂ 的培养箱(美国 Thermo Forma)内培养。3d 后首次换液,换液时倒除旧的培养液,加入含 0.4g/L EDTA 的 PBS 4mL 润洗,37℃ 孵育 10min,倒除 PBS 和未贴壁的细胞,加入新的完全培养液。采用 CD44、CD34、CD90 对细胞进行鉴定。当细胞融合率达 80% 时进行传代培养,取第 2 代细胞用于基因修饰。

1.2.2 BDNF 基因修饰的 BMSC 细胞 取生长状态良好的第 2 代的 BMSC,细胞融合率约 30%~50%,更换为新鲜完全培养液。调整慢病毒感染复制数 MOI 为 30 加入浓缩纯化的 BDNF 过表达慢病毒液(滴度为 2×10⁸TU/mL),

表 1 BDNF 和 GAPDH 的引物序列

基因	引物序列
BDNF	F:5'-GGAGCCTCTCTGCTCTTT-3'
	R:5'-TTTTGATACCGGACTTTCT-3'
GAPDH	F:5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3'
	R:5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'

同时加入稀释好的 Polybrene 至终浓度为 5μg/mL。轻晃混匀,继续培养。感染 24h 后,更换为新鲜完全培养液。荧光显微镜下,计数表达绿色荧光的 BMSC,计算感染率。

1.2.3 实验分组 实验分为空白对照组(未经转染 BMSC 细胞)、阴性对照组(采用不含 BDNF 基因的空载体质粒转染的 BMSC 细胞)和实验组(采用含 BDNF 基因的质粒转染的 BMSC 细胞)。

1.2.4 Realtime PCR 测定基因修饰的 BMSC 细胞 BDNF mRNA 表达 取第 3 代、第 4 代、第 5 代、第 6 代、第 7 代、第 8 代和第 9 代细胞各 5×10⁵ 抽提各组细胞总 RNA,逆转录成 cDNA。BDNF 引物序列参照 GenBank 中的序列,用 primer 5.0 软件设计而成,具体序列见表 1。以 GAPDH 为内参,进行 Realtime PCR 检测,预变性 95℃ 10min,变性 95℃ 15s,退火延伸 60℃ 60s,共进行 40 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值。PCR 结束后,在 95℃ 变性 1min。然后冷却至 55℃ 1min,使 DNA 双链充分结合。收集获取荧光信号得到扩增曲线、溶解曲线和 CT 值,通过内参 GAPDH 校正,采用 2^{-ΔΔCT} 法分析数据,用相对表达量表示,实验重复 3 次。

1.2.5 ELISA 测定基因修饰的 BMSC 细胞 BDNF 的分泌表达 取第 3 代、第 4 代、第 5 代、第 6 代、第 7 代、第 8 代和第 9 代细胞调整 BMSCs 密度,按 3×10⁴/孔接种于 6 孔板,24h 后细胞约为 5×10⁴/孔,更换新鲜培养基(2mL/孔),培养 12h 后收集各组细胞上清液,按照 BDNF 的 ELISA 检测试剂盒说明书进行检测。每组设 3 个复孔。

统计学分析:所有数据采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析。各组 BDNF 基因的 mRNA 相对表达量、蛋白分泌量数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用随机区组的 ANOVA 检验分析组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因修饰的 BMSC 细胞 BDNF mRNA 表达 实验组第 3、4、5、6、7 和 8 代 BMSC 细胞 BDNF mRNA 表达高于空白对照组和阴性对照组,组间差异具有统计学意义($P_3: F = 491.788, P < 0.05$; $P_4: F = 380.112, P < 0.05$; $P_5: F = 1854.929, P < 0.05$; $P_6: F = 224.540, P < 0.05$; $P_7: F = 619.155, P < 0.05$; $P_8: F = 10.092, P < 0.05$, 图 1)。实验组 BMSC 细胞随着细胞传代,BDNF mRNA 表达逐渐下降,不同代数间差异具有统计学意义($F = 298.603, P < 0.05$);第 3 代与第 4 代,第 4 代和第 5 代,第 5 代与第 6 代,第 6 代和第 7 代组间两两比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);第 7 代与第 8 代,第 8 代和第 9 代组间两两比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 基因修饰的 BMSC 细胞 BDNF 的分泌表达 实验组第3、4、5、6、7和8代细胞 BMSC 细胞 BDNF 的分泌表达高于空白对照组和阴性对照组,组间差异具有统计学意义($P_3:F=520.609, P<0.05$; $P_4:F=734.520, P<0.05$; $P_5:F=152.847, P<0.05$; $P_6:F=80.372, P<0.05$; $P_7:F=96.083, P<0.05$; $P_8:F=38.532, P<0.05$,图2)。实验组 BMSC 细胞随着细胞传代, BDNF 的分泌表达逐渐下降,不同代数间差异具有统计学意义($F=230.084, P<0.05$);第3代和第4代、第4代和第5代、第5代和第6代组间两两比较差异具有统计学意义($P<0.05$);第6代和第7代、第7代和第8代、第8代和第9代组间两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

视网膜变性疾病是严重的不可逆性致盲眼病。视网膜变性疾病如黄斑变性、光感受器细胞变性、视网膜色素上皮变性、Stargardt 病等最终均可致盲^[1-2]。由于体内视网膜神经细胞不能再生,目前此类疾病尚无有效的治疗方法。寻找再生能力强、非视网膜来源的、可替代视网膜细胞功能的自体细胞是移植的理想种子细胞,也是近年视网膜变性疾病治疗的研究热点和焦点。干细胞治疗和基因治疗有望为视网膜变性疾病的治疗提供新的途径。自体 BMSC 是理想的种子细胞^[3-4]。BMSC 可能通过固有的再生能力分化替代变性的视网膜细胞、上调神经营养因子表达、修复变性的视网膜细胞等途径综合治疗视网膜变性疾病。van Velthoven 等^[8]研究发现, BMSC 可通过分泌 BDNF、类表皮生长因子、persephin (PSP) 或 sonic hedgehog 调节神经干细胞增生和分化,改善新生儿缺血缺氧性脑病的预后。BMSC 不仅可通过分化替代变性的视网膜细胞,还可通过分泌神经营养因子,挽救修复周围神经细胞,发挥神经保护作用^[5-6]。通过基因工程,可增强 BMSC 的神经保护功能。

本项目研究在体外成功构建了 BDNF 过表达的慢病毒载体,将目的基因 BDNF 导入 BMSC 中,转染效率较高。BDNF 基因的质粒转染的 BMSC 细胞实验组第3、4、5、6、7和8代 BMSC 细胞 BDNF 的 mRNA 表达高于空白对照组和阴性对照组;ELISA 证实了第3、4、5、6、7和8代 BMSC 细胞 BDNF 的分泌表达高于空白对照组和阴性对照组。BDNF 表达于中枢和周围神经系统。主要在脑组织合成,上丘和视皮质有丰富的 BDNF 分布。视网膜 Müller 细胞、神经节细胞自身和移位的无长突细胞可以分泌 BDNF,视网膜的外丛状层、外核层、内丛状层、内核层和神经节细胞层均有表达。BDNF 的受体主要有两种:高亲和力受体酪氨酸蛋白激酶 (Trk) 和低亲和力的 P75^{NTR} 受体。视网膜的 TrkB 受体主要位于内丛状层和神经节细胞层。BDNF 与 TrkB 受体结合后引起 Trk 蛋白及多种蛋白的磷酸化,激活胞内信号转导通路(主要包括 MAPK/ERK 和 PI3K/AKT),营养突触后的神经元,促进神经元的生长、发育、功能维持,调节轴突和树突的生长、突触的形成与功能、细胞的迁移和增生及神经元的存活^[9-10]。含有 BDNF 的培养液中成活的 RGC 比例多于不含 BDNF 的培养基^[9-10]。视神经夹伤动物模型于造模后立即玻璃体腔注射不同剂

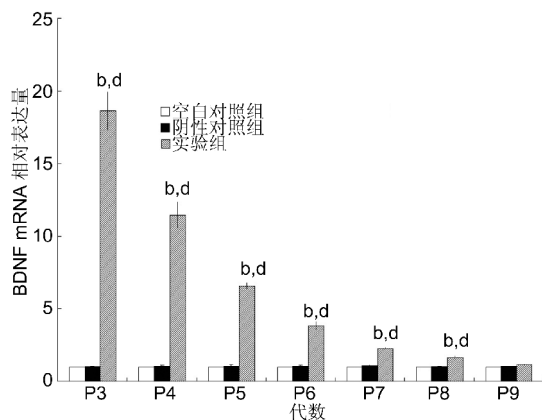


图1 各组 BMSC 细胞 BDNF mRNA 表达变化 ^b $P<0.01$ vs 空白对照组; ^d $P<0.01$ vs 阴性对照组。

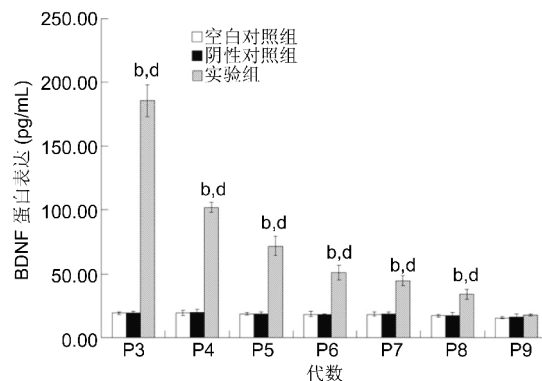


图2 各组 BMSC 细胞 BDNF 的分泌变化 ^b $P<0.01$ vs 空白对照组; ^d $P<0.01$ vs 阴性对照组。

量的 BDNF, BDNF 注射量为 $30\mu\text{g}$ 时 RGC 的存活率最高, 大的 RGC 数目较多; 而 BDNF 注射量为 $90\mu\text{g}$ 时, 可最大程度减少中等大小 RGC 的缺失, 保持小、中、大 3 种 RGC 的正常比例^[11-12]。这提示 RGC 对不同治疗剂量的反应不同。注射 1wk 后与未处理组比较, 玻璃体腔注射 BDNF, 视神经横切显示存活的 RGC 增多, 细胞凋亡延缓^[13]。但是外源性 BDNF 半衰期短, 反复眼内注射可能造成眼球损伤, 增加眼内感染风险。我们研究发现 BDNF 基因的质粒转染的 BMSC 细胞分泌的 BDNF 明显增强, 且可持续表达 5~6 代。这为进一步研究其对视网膜的保护作用奠定了基础。Saito 等^[14]用腺相关病毒将 BDNF 基因转入虹膜色素上皮细胞, 然后将细胞移植入光损伤的大鼠模型视网膜下腔, 移植细胞对感光细胞有显著的保护作用, 视乳头附近多个位置的外核层较对照组厚, 抑制 TrkB-T1 可降低移植细胞的保护作用。这提示通过基因工程增强眼内细胞长期表达 BDNF, 减少反复注射的风险。

本研究发现, 实验组 BMSC 细胞随着细胞传代, BDNF mRNA 表达和蛋白分泌逐渐下降。第7代与第8代, 第8代和第9代的 BDNF mRNA 表达, 组间两两比较差异无统计学意义, 第6代和第7代, 第7代和第8代, 第8代和第9代的 BDNF 的蛋白分泌组间两两比较差异无统计学意义。这可能是由于体外传代培养时细胞快速增殖, 细胞内 BDNF 基因的表达减弱或携带 BDNF 基因的细胞比例减少。这提示一方面可通过传代的代数来控制移植细胞在

眼内 BDNF 的分泌表达。另一方面用于移植的转染细胞不宜传代 5 代以上。

综上所述,通过基因工程增强 BMSC 细胞长期表达 BDNF,减少反复注射的风险。干细胞治疗和基因治疗有望为视网膜变性疾病的治疗提供新的途径。

参考文献

- 1 Holz FG, Schmitz - Valckenberg S, Fleckenstein M. Recent developments in the treatment of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 2014;124(4):1430-1438
- 2 Chacón-López H, Pelayo FJ, López-Justicia MD, et al. Visual training and emotional state of people with retinitis pigmentosa. *J Rehabil Res Dev* 2013;50(8):1157-1168
- 3 Siy Uy H, Chan PS, Cruz FM. Stem Cell Therapy: a Novel Approach for Vision Restoration in Retinitis Pigmentosa. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* 2013;2(2):52-55
- 4 Chen AK, Reuveny S, Oh SK. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. *Biotechnol Adv* 2013;31(7):1032-1046
- 5 Xu W, Xu GX. Mesenchymal stem cells for retinal diseases. *Int J Ophthalmol* 2011;4(4):413-421
- 6 Sun C, Lin H, Yu W, et al. Neurotrophic effect of bone marrow mesenchymal stem cells for erectile dysfunction in diabetic rats. *Int J Androl* 2012;35(4):601-607

7 谢茂松,徐国兴,李琼,等.大鼠骨髓间充质干细胞分离培养方法的比较. *国际眼科杂志* 2007;7(5):1285-1287

8 van Velthoven CT, Braccioli L, Willems HL, et al. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells after neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Mol Ther* 2014;22(3):645-654

9 Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(2):974-985

10 Harada C, Azuchi Y, Noro T, et al. TrkB Signaling in Retinal Glia Stimulates Neuroprotection after Optic Nerve Injury. *Am J Pathol* 2015;185(12):3238-3247

11 Chen H, Weber AJ. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(5):966-974

12 Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, et al. BDNF Rescues RGCs But Not Intrinsically Photosensitive RGCs in Ocular Hypertensive Albino Rat Retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(3):1924-1936

13 Watanabe M, Fukuda Y. Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats. *Prog Retin Eye Res* 2002;21(6):529-553

14 Saito T, Abe T, Wakusawa R, et al. TrkB-T1 receptors on Muller cells play critical role in brain-derived neurotrophic factor-mediated photoreceptor protection against phototoxicity. *Curr Eye Res* 2009;34(7):580-588