

腺病毒介导神经营养索-3 基因转染施万细胞

郭家松¹, 曾园山¹, 黄文林², 刘然义², 吴立志², 胡金家³, 李海标¹
(中山大学 1. 基础医学院组织胚胎学教研室神经科学教研室; 2. 肿瘤防治中心;
3. 解剖学教研室, 广东 广州 510080)

摘要: **目的** 构建神经营养索-3 (NT-3) 基因转染的施万细胞。 **方法** NT-3 基因重组腺病毒 (AdvNT-3) 扩增、纯化和测定后, 转染体外培养的施万细胞 (SCs), 用免疫细胞化学和 ELISA 方法分别检测 NT-3 基因转染 SCs 的 NT-3 表达及培养液中 NT-3 的含量。 **结果** 实验中获得的 AdvNT-3 中外源基因序列与大鼠 NT-3 的 DNA 序列完全一致, 与未基因转染 SCs 相比, NT-3 基因转染 SCs 的 NT-3 阳性增强, 培养液中 NT-3 含量增高。 **结论** 通过腺病毒介导可以获得 NT-3 过量表达的基因转染 SCs。

关键词: 施万细胞; 神经营养索-3; 腺病毒; 基因转染

中图分类号: R511.8

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)04-0304-04

Transfection of Adenovirus-mediated Neurotrophin-3 Gene into Schwann Cells

GUO Jia-song¹, ZENG Yuan-shan¹, HUANG Wen-lin², LIU Ran-yi², WU Li-zhi²,
HU Jin-jia³, LI Hai-biao¹

(1. Division of Neuroscience, Department of Histology and Embryology, 2. Cancer Center, 3. Department of Anatomy, Preclinical Medicine School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: **Objective** To construct neurotrophin-3 (NT-3) genetically modified Schwann cells (SCs). **Methods** The NT-3 gene recombinant adenovirus (AdvNT-3) were amplified, purified, and determined. Then, it was used to genetically modify SCs. The NT-3 expression of the NT-3 genetically modified SCs (NT-3-SCs) was determined immunocytochemically, and the amount of NT-3 in the cultural media of NT-3-SCs was determined with ELISA method. **Results** The exogenous gene sequence of the obtained AdvNT-3 was equal to that of the NT-3 gene in rat. Compared to the normal SCs, the positive expression of NT-3 in NT-3-SCs was enhanced, and the amount of NT-3 in the cultural media of NT-3-SCs was increased. **Conclusion** Mediated by adenovirus, NT-3 overexpressed genetically modify Schwann cells can be obtained.

Key words: Schwann cells; neurotrophin-3; adenovirus; gene transfection

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(4): 304 - 307]

施万细胞 (Schwann cell, SCs) 是构成外周神经髓鞘的神经胶质细胞, 它自身能分泌多种神经营养类物质^[1]。现普遍认为 SCs 的存在是外周神经能够再生的一个关键因素, 实验也证明移植 SCs 可以创造有利于中枢神经再生的微环境^[2]。本实验室曾发现 SCs 移植到 T₁₀ 全横断性脊髓损伤腔后可存活 3

个月, 移植 SCs 能提高大脑躯体感觉运动区内锥体细胞层和脑干红核的神经元胞体存活率, 促进神经纤维再生和四肢功能恢复^[3,4]。然而, 人们并不满足于单纯 SCs 移植所发挥的作用, 希望它在基因治疗中枢神经损伤中发挥靶细胞的作用。神经营养索-3 (neurotrophin-3, NT-3) 具有较广泛的生物学活性,

收稿日期 2003-07-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270700); 广东省社会发展攻关基金资助项目 (2003C33808)

作者简介: 郭家松 (1970 -), 男, 江西赣州人, 博士, 讲师, 现在第一军医大学分校, 广州 510315; 曾园山, 教授, 博士生导师, 课题主持人, 通讯作者; 李海标, 教授, 博士生导师. E-mail: yzeng@gzsums.edu.cn

在神经再生过程发挥重要作用。它能有效地促进轴突损伤神经元的存活,抑制神经元萎缩,能促进运动神经纤维再生,对感觉神经纤维再生也有一定作用^[5-7]。本研究拟通过腺病毒介导获得 NT-3 基因转染的 SCs,为下一步移植治疗中枢神经损伤奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及动物

AdvNT-3、AdvLacZ 和复制缺陷性重组腺病毒载体包装细胞系 293 细胞(人胚肾细胞系)由中山大学肿瘤防治研究中心黄文林教授提供。X-gal (Sangon 公司),兔抗大鼠 NT-3 多克隆抗体(北京中山生物公司),HRP 标记山羊抗兔 IgG(北京中山生物公司),SABC 免疫组织化学试剂盒(武汉博士德公司),SD 新生大鼠(中山大学实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 NT-3 基因及 LacZ 报告基因腺病毒载体(AdvNT-3 及 AdvLacZ)的扩增、纯化及测定 扩增:取 293 细胞进行传代培养,当 293 细胞长至约 90% 时接种腺病毒:加入用无血清病毒培养液稀释的腺病毒(AdvNT-3 或 AdvLacZ),2 h 后加含 50 mL/L FBS 的病毒培养液继续培养 36~48 h。收集细胞,加病毒保存液,液氮冷冻 30 min,流水解冻,反复冻融 3 次将 293 细胞裂解以释放出腺病毒,1 000 × g 离心 20 min 去沉淀。重复上述步骤多次以获得含有大量 AdvNT-3 或 AdvLacZ 的细胞裂解液。纯化:上述细胞裂解液上清轻轻加入 CsCl 梯度离心管上层,180 000 × g 离心 90 min 后可见在离心管下 2/3 处有明显的白色病毒带,用注射针头从离心管侧壁扎入吸出病毒液。再将病毒液移入透析袋,浸入透析液,4 °C 下透析 12 h,中途换透析液 2 次。最后将纯化病毒液分装冻存于 -70 °C 备用。测定:制备成 15 × 10⁴/mL 的 293 细胞悬液,在 96 孔培养板每孔加入细胞悬液 200 μL,培养过夜。将纯化的病毒液制成梯度稀释液。吸去 96 孔培养板中原培养液,用 RPMI 1640 培养液洗后加入病毒稀释液,每个稀释度加 5 个培养孔,每孔加 50 μL。对照孔中则加无血清病毒培养液 50 μL。培养 2 h 后,各孔再加含 50 mL/L FBS 的病毒培养液 200 μL 继续培养,此后连续 14 d 每天观察并记录

各孔中 293 细胞的病变情况。然后参照 Reed-Muench 法^[8]计算病毒的滴度。取少量 AdvNT-3 或 AdvLacZ 感染病变的 293 细胞分别进行 β-半乳糖苷酶组织化学^[8]和 NT-3 免疫细胞化学鉴定。

1.2.2 AdvNT-3 中 NT-3 基因序列的测定 取少量上述扩增纯化的 AdvNT-3 进行基因测序,方法简介如下:AdvNT-3d 的 DNA 提取;PCR 扩增 DNA;电泳检测 PCR 产物;交上海博亚生物技术有限公司测序。测序引物序列分别为:上游引物,5'-GCG TAA CCG AGT AAG ATT TG-3',下游引物,5'-GGT CTC GTA GGT CAA GGT AG-3',上游引物,5'-CGC ATT GCA GAG ATA AT-3',下游引物,5'-GCT ATT GTC TTC CCA ATC C-3'。

1.2.3 SCs 的培养、纯化及鉴定 选用新生 1~2 d 的 SD 新生鼠,消毒后取臂丛神经和坐骨神经,剥去神经外膜,剪碎。用胶原酶和胰蛋白酶及 200 目滤器过滤后制成 1 × 10⁴/mL 细胞悬液,移入经多聚赖氨酸铺板的培养瓶,于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中进行培养。20 min 后将未贴壁的细胞移入另一培养瓶,再过 20 min 重复 1 次。培养 24 h 后在培养液中加入终浓度为 10⁻⁵ mol/L 的阿糖胞苷作用 12 h,细胞每 2~3 d 更换培养液。当细胞长至 90% 以上时用酶消化法进行细胞传代。取部分细胞进行 S-100 免疫细胞化学鉴定。

1.2.4 NT-3 基因转染 SCs 将培养纯化的 SCs 按每孔 5 × 10³ 个细胞接种到经多聚赖氨酸铺板的 24 孔培养板,培养 24 h 后接种 AdvLacZ。方法如下:用无血清病毒培养液将 AdvLacZ 制成梯度稀释液,将培养板各孔内原培养液吸去,用无血清 1640 培养液洗 2 次,每孔加入 AdvLacZ 稀释液 100 μL,培养 3 h 后吸去 AdvLacZ 稀释液,加 200 μL 含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液继续培养 48 h。然后进行 β-半乳糖苷酶组织化学显色,在显微镜下观察计数。根据 SCs 形态保持完好且 β-半乳糖苷酶阳性率达到 90%~95% 的培养孔的腺病毒用量接种 AdvNT-3。然后取部分 NT-3 基因转染的 SCs 和未经转染的 SCs 进行 NT-3 免疫细胞化学鉴定。

1.2.5 ELISA 法检测 NT-3 基因转染 SCs 培养液中 NT-3 的含量 将培养纯化的 SCs 按每孔 5 × 10³ 个细胞接种到经多聚赖氨酸铺板的 24 孔培养板,培养 24 h 后按上述方法接种 AdvNT-3 基因转染后

继续培养 4 d, 中途不换液。以等量 SCs 不进行基因转染, 同条件培养作对照。4 d 后吸出培养液 $14\ 000 \times g$ 离心 30 min, 取上清作为抗原进行间接 ELISA 检测。方法如下: 在 96 孔可拆酶标板中用碳酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 9.6) 包被抗原 (NT-3 基因转染 SCs 或正常 SCs 的培养液上清), 其中每孔加碳酸盐缓冲液 150 μ L, 培养液上清 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 过夜; 0.01 mol/L PBS-Tween20 洗 3 次每次 5 min; 用含 10 mL/L FBS 的 0.01 mol/L PBS-Tween 20 封闭, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h; 0.01 mol/L PBS-Tween20 洗 3 次每次 5 min; 加 1:400 兔抗大鼠 NT-3 抗体, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h; 0.01 mol/L PBS-Tween20 洗 5 min \times 3 次; 加 1:2 000 HRP 标记山羊抗兔 IgG, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h; 0.01 mol/L PBS-Tween20 洗 5 min \times 3 次; 加 OPD 底物液, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min; 加 2 mol/L 的 H_2SO_4 50 μ L/孔终止反应; 酶联免疫检测仪 (波长 490 nm) 测吸光度值。阴性对照: 用普通 DMEM/F12 培养液代替 NT-3 基因转染 SCs 或正常 SCs 的培养液上清, 或用 0.01 mol/L PBS-Tween20 代替 NT-3 抗体。

1.3 统计学处理

所得数据用 SPSS10.0 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 293 细胞在腺病毒扩增时的变化及 NT-3 基因和 LacZ 基因的表达

293 细胞在正常培养条件下贴壁生长, 增殖迅速, 大部分细胞有 3 个短小突起, 另一些有 2 个或多个突起 (图 1)。接种腺病毒后, 293 细胞逐渐突起回缩、变圆、脱壁、并变得肿胀而透亮 (图 2)。接种了 AdvNT-3 的 293 细胞经免疫组织化学显示呈 NT-3 阳性 (图 3), 接种了 AdvLacZ 的 293 细胞经 β -半乳糖苷酶组织化学显示呈 β -半乳糖苷酶阳性 (图 4)。

2.2 AdvNT-3 基因测序结果

经测序, 结果显示本研究扩增、纯化所获得 AdvNT-3 中携带的外源基因的 DNA 序列与大鼠 NT-3 的 DNA 序列完全一致。

2.3 SCs 的鉴定

本实验获得的第二代培养细胞中绝大部分为轮廓清晰, 胞核明显, 体积小的长梭形细胞。少量细

胞为轮廓不清晰, 胞核浅淡, 体积大而不规则 (图 5)。S-100 免疫细胞化学显示前者为 S-100 阳性 (图 6), 经计数, 本实验获得的第二代 SCs 的纯度可达到 90% ~ 95%。

2.4 LacZ 基因及 NT-3 基因在 SCs 的表达

用 AdvLacZ 转染的 SCs 酶组织化学显示有 90% 以上的细胞可呈 β -半乳糖苷酶阳性 (图 7)。经 NT-3 免疫细胞化学显示, 未经 AdvNT-3 转染的正常 SCs 呈 NT-3 弱阳性 (图 8), 而经 AdvNT-3 转染后的 SCs NT-3 阳性表达明显增强 (图 9)。

2.5 ELISA 检测结果

经 ELISA 检测, 未经细胞培养的正常培养液、SCs 培养液及经 AdvNT-3 转染 SCs 培养液的吸光度值分别为 0.68 ± 0.01 、 2.14 ± 0.05 和 2.51 ± 0.12 。它们之间均有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

腺病毒 (adenovirus) 是一种无包膜的 DNA 病毒。基因组为约 36 kb 的线状双链 DNA。分为早期基因和晚期基因两部分, 其中早期基因有 E1、E2、E3 和 E4 等 4 种。早期基因 E1a、E1b 表达其它早期基因表达所必需的蛋白质, 早期基因 E2 表达的蛋白质是晚期基因表达的反式因子和病毒复制必需的因子。晚期基因主要表达病毒的结构蛋白。通过缺损 E1 基因, 腺病毒可以作为基因转移的载体。E1 复制缺陷腺病毒在普通细胞中不能复制形成病毒粒子而包装细胞如人胚肾 293 细胞系染色体上整合了腺病毒左臂完整的 E1 区, E1a、E1b 的表达产物可为腺病毒的复制提供反式因子。通过重组将外源的治疗基因插入在 E1 基因位置, 在 E1 启动子或异源启动子的驱动下即可进行表达外源基因。腺病毒载体的优点是: 具有较广的敏感谱, 既能转染分裂细胞, 也可以用于转染分化后非分裂状态的细胞, 能获得较高的转导效率; 无外源基因插入靶细胞基因组引起基因突变的危险故可采用高滴度。由于腺病毒携带的基因组主要以游离附加体形式存在于细胞质, 不能整合到靶细胞的基因组, 所以一般认为不能形成永久性的基因表达。

1997 年 Liu 等^[9]将携带报告基因的腺病毒注射到成年大鼠脊髓内, 发现注射处附近有大量细胞被转染, 不少细胞直到 2 个月仍有报告基因的表达。1998 年 Lou 等^[10]也成功地利用腺病毒将 Bcl-2 基因导入到损伤后的脊髓组织中的细胞。同年

Zhang 等^[11]将脊髓大鼠脊髓 L4~L6 脊神经切断,然后向脊髓前角注射含 NT-3 基因的腺病毒,注射后 4~40 d,大量胶质细胞和运动神经元能表达 NT-3。以上实验提示腺病毒可以介导外源基因转染在体的神经元和神经胶质细胞,并能在靶细胞较长时期的表达外源基因产物。

本研究结果显示,经 AdvLacZ 转染的 SCs 有 90% 以上呈 β -半乳糖苷酶阳性表达。AdvNT-3 转染的 SCs 经免疫细胞化学显示其 NT-3 阳性比未转染的正常 SCs 表达明显增强,ELISA 结果也是 AdvNT-3 转染的 SCs 的培养液中 NT-3 的含量明显高于未转染的正常 SCs。本实验结果提示经重组腺病毒载体介导能较好地将外源 NT-3 基因转染到 SCs 中并能表达其基因产物。下一步将其移植到脊髓损伤处,我们希望过量表达 NT-3 的基因转染 SCs 能更好地促进脊髓内受损伤神经元的存活及其轴突再生。

(本文图见封 2 Figures were shown in inside front cover)

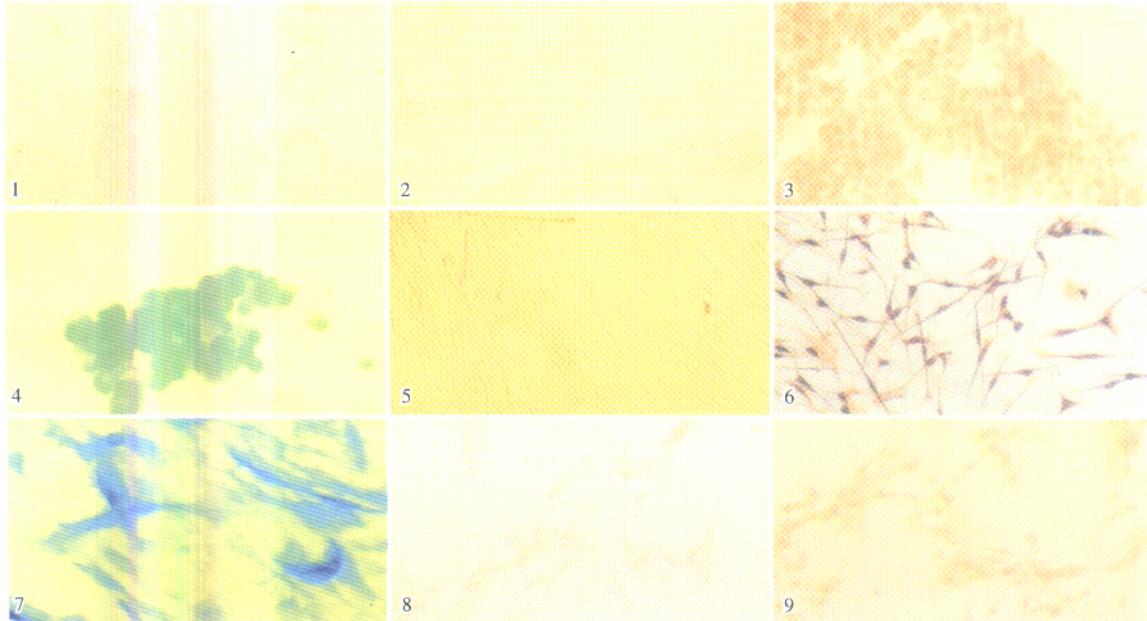
参考文献:

- [1] Bixby J L, Lilien J, Reichardt L F. Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells *in vitro* [J]. *J Cell Biol*, 1988, 107(1): 353-61.
- [2] Xu X M, Zhang S X, Li H, *et al.* Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord [J]. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(5): 1723-40.
- [3] 吴立志,曾园山,丁英,等. 施万细胞移植促进大鼠脊髓全横断损伤后大脑皮质锥体神经元和红核神经元的存活 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(1): 10-4.
- [4] 吴立志,曾园山,李海标,等. 胶原或明胶吸附施万细胞移植促进全横断脊髓损伤修复的研究 [J]. *解剖学报*, 2003, 34(6): 297-301.
- [5] Novikova L N, Novikov L N, Kellerth J O. Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(2): 776-80.
- [6] Bradbury E J, King V R, Simmons L J, *et al.* NT-3, but not BDNF prevents atrophy and death of axotomized spinal cord projection neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 1998, 10(10): 3058-68.
- [7] Bradbury E J, Khemani S, Von R, *et al.* NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in dorsal columns of the spinal cord [J]. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(11): 3873-83.
- [8] 傅继华. 病毒学实用实验技术 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001. 60-4.
- [9] Liu Y, Himes B T, Moul J, *et al.* Application of recombinant adenovirus for *in vivo* gene delivery to spinal cord [J]. *Brain Res*, 1997, 768(1-2): 19-29.
- [10] Lou J, Lenke L G, Xu F, *et al.* *In vivo* Bcl-2 oncogene neuronal expression in the rat spinal cord [J]. *Spine*, 1998, 23(5): 517-23.
- [11] Zhang Y, Dijkhuizen P A, Anderson P N, *et al.* NT-3 delivered by an adenoviral vector induces injured dorsal root axons to regenerate into the spinal cord of adult rats [J]. *J Neurosci Res*, 1998, 54(4): 554-62.

(编辑 张恩健)

腺病毒介导神经营养素-3 基因转染施万细胞 (正文见第 304 页)

Transfection of Adenovirus-mediated Neurotrophin-3 Gene into Schwann Cells (Text in page 304)



- 图 1 正常体外培养的 293 细胞
图 2 接种腺病毒后的 293 细胞
图 3 接种 AdvNT-3 的 293 细胞呈 NT-3 阳性
图 4 接种 AdvLacZ 的 293 细胞呈 X-gal 阳性
图 5 正常体外培养的施万细胞
图 6 体外培养的施万细胞呈 S-100 阳性
图 7 接种 AdvLacZ 的施万细胞呈 X-gal 阳性
图 8 正常体外培养的施万细胞呈 NT-3 弱阳性
图 9 接种 AdvNT-3 的施万细胞呈 NT-3 阳性增强

- Fig. 1 Normal cultured 293 cells *in vitro* (inverted phase-contrast microscopy, $\times 100$)
Fig. 2 293 cells infected by adenovirus (inverted phase-contrast microscopy, $\times 100$)
Fig. 3 293 cells infected by AdvNT-3 showed NT-3 positive (immunocytochemistry, $\times 100$)
Fig. 4 293 cells infected by AdvLacZ showed X-gal positive
Fig. 5 Normal cultured Schwann cells (SCs) *in vitro* (inverted phase-contrast microscopy, $\times 100$)
Fig. 6 SCs showed S-100 positive *in vitro* (immunocytochemistry, $\times 100$)
Fig. 7 SCs infected by AdvLacZ showed X-gal positive (enzyme-histochemistry, $\times 200$)
Fig. 8 The normal cultured SCs showed NT-3 weakly positive (immunocytochemistry, $\times 100$)
Fig. 9 SCs infected by AdvNT-3 showed NT-3 intensely positive (immunocytochemistry, $\times 100$)