

探索发现

GDNF 慢病毒载体感染食蟹猴骨髓间充质干细胞

王玉兰¹ 徐艳玲² 任振华^{2,3*}¹首都医科大学宣武医院中心实验室, 北京 100053; ²首都医科大学宣武医院细胞生物室, 北京 100053;³安徽医科大学人体解剖学教研室, 合肥 230032)

摘要 骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是基因工程和细胞治疗的种子细胞之一,本研究利用含胶质源性神经营养因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)基因的慢病毒载体感染成年食蟹猴MSCs,探讨转染后GDNF在MSCs中的体外表达水平及其影响因素。首先,通过密度梯度离心法分离食蟹猴骨髓单核细胞(marrow mononuclear cells, MNCs),体外培养食蟹猴MSCs。同时构建表达GDNF的慢病毒载体,并感染食蟹猴MSCs,分别利用酶联免疫吸附(ELISA)方法和Real-time PCR方法,测定感染不同拷贝数病毒和不同转染组细胞GDNF的蛋白分泌水平和基因表达水平。实验结果显示,表达GDNF基因的慢病毒载体成功转染成年食蟹猴MSCs,体外培养的MSCs持续表达分泌GDNF。感染慢病毒的拷贝数可以影响GDNF分泌水平,相同条件下感染拷贝数越高,GDNF分泌量越多,其基因表达水平越高。

关键词 食蟹猴;骨髓间充质干细胞;胶质源性神经营养因子;慢病毒载体;感染

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来自于骨髓的成体干细胞,因其具有增殖和多向分化潜能、造血支持、免疫调控等特点而备受关注^[1]。MSCs在体外可分化成为脂肪、成骨、软骨等间质细胞及多种中胚层以外的组织细胞。由于其良好的可塑性和不涉及伦理争议, MSCs成为组织工程和细胞治疗的最佳种子细胞^[2,3]。在遗传学上, MSCs易于转染与表达外源基因^[4]。不论是质粒还是病毒载体均可携带目的基因转导MSCs,在体内长期、高效地表达,而不影响干细胞的特性^[5]。因此, MSCs是基因工程理想的靶细胞。胶质源性神经营养因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)是一种具有神经营养和神经保护作用的神经营养因子,对多巴胺神经元具有特异性的促存活及损伤保护作用^[6],对神经损伤和神经退行性疾病的基因治疗, GDNF是很好的候选基因。

人类和非人灵长类(non-human primates, NHPs)具有非常相近的遗传背景^[7],实验显示NHPs与人类MSCs具有相似的生物学特征^[8]。NHPs模型在评价药物疗效和移植治疗等方面具有不可替代的价值^[9]。我们采用密度梯度离心法,分离培养食蟹猴MSCs,构建了表达GDNF的慢病毒载体,成功感染食蟹猴MSCs,并在体外可持续分泌GDNF,其分泌量随着

感染病毒的拷贝数增加而增加,为表达GDNF的食蟹猴MSCs移植治疗神经退行性疾病提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验动物包括6只3~4岁健康成年食蟹猴,猴泡沫病毒(simian foamy virus, SFV)检测阴性^[10],由广西南宁灵康赛诺生物科技有限公司提供,动物饲养按照国际AAALAC灵长类动物的标准,动物病原体检测和生物安全检验合格。

1.1.2 细胞和质粒 293T细胞由北京大学生命科学院惠赠。慢病毒载体转移质粒DUET101-GDNF、包装质粒CMV Δ 8.91和PMD.G由美国Johns Hopkins大学程教授惠赠。

1.1.3 实验试剂 细胞培养试剂DMEM、OPTI-MEM、MSC-Qualified FBS、0.25% Trysin-EDTA、GlutaMAX、青链霉素等购自Invitrogen公司。Ficoll-Paque TM Plus单核细胞分离液购自StemCell公司。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自R&D公司。

收稿日期: 2010-09-03 接受日期: 2010-10-25

北京市科委科技计划(No.D07050701350703)资助项目

*通讯作者。Tel: 010-83198269, E-mail: renzhenhua@tom.com

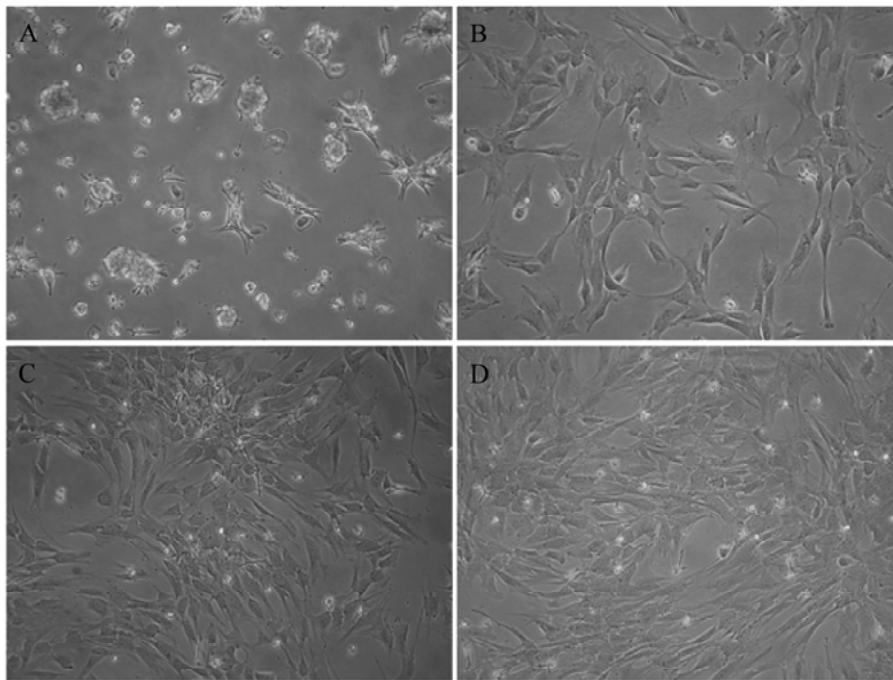


图 1 原代培养的食蟹猴骨髓间充质干细胞

A: 原代培养 2 天(200×); B: 原代培养 4 天(200×); C: 原代培养 6 天(200×); D: 第一代(200×)。

Fig.1 Cell morphology of cynomolgus monkey MSCs in primary culture

A: primary culture 2 d (200×); B: primary culture 4 d (200×); C: primary culture 6 d (200×); D: passage 1 (200×)。

转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。Polybrene、DMSO、Transferrin 购自 Sigma 公司。逆转录酶 SSII 和 TRIZOL 购自 Invitrogen 公司。rTaq 酶购自 TaKaRa 公司。DNA Mini Kit 购自 Qiagen 公司。GDNF 酶联免疫吸附检测试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 食蟹猴 MSCs 培养 无菌条件下从食蟹猴髂骨嵴抽取 5 ml 骨髓, 加入等体积的 DPBS 稀释, 贴壁缓慢加入离心管内盛有等体积的 Ficoll 分离液上, 2 500 r/min 离心 20 min, 小心吸取中间层细胞置于另一离心管中, PBS 洗涤 2 次, 5×10^5 /ml 单核细胞种植在 DMEM 低糖培养基, 包含 10% FBS、1% 青链霉素、1% GlutaMAX 和 20 ng/ml bFGF, 5% CO₂, 37°C 孵箱培养, 24 h 后更换培养基, 80% 长满后用 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 慢病毒载体包装和浓缩 慢病毒颗粒的包装采用脂质体介导的瞬时转染法, 293T 细胞培养在高糖 DMEM 培养基中, 包含 10% FBS、1% Glutamine 和 1% 青链霉素。将 293T 细胞传代于多聚赖氨酸包被的培养皿中, 待细胞 80% 汇合后转染。转染过程中, 首先将构建好的编码 GDNF 的转移质粒 DUET-

101, 包装质粒 CMV Δ 8.91 和 PMD.G 按一定比例溶于 OPTI-MEM 中, 同时将 Lipofectamine 2 000 溶于等体积的 OPTI-MEM 中, 室温放置 5 min。然后将两者混合, 轻柔混匀, 室温静置 20 min。用 OPTI-MEM 培养基更换 293T 细胞培养基后, 加入转染混合液。待转染混合液培养 8~12 h 后, 换成 ITS 培养基(DMEM 高糖培养基包含 10 μ g/ml Insulin、5 μ g/ml Transferrin、1% Glutamine 和 1% 的青链霉素), 分别于 24 h 和 48 h 后收集病毒上清, 用 0.45 μ m 滤器过滤细胞碎片, 4°C 保存。将病毒上清加入 Ultra-Plus 20 滤膜, 4°C, 4 000 g 离心 20 min, 所得浓缩病毒转染 293T 细胞进行滴度鉴定后, 用于下一步实验。

1.2.3 慢病毒载体转染 MSCs 食蟹猴 MSCs 长满 80%, 更换新鲜培养基, 根据 GDNF 慢病毒滴度和细胞数量, 按不同病毒拷贝数(multiplicity of infection, MOI)(1, 5, 10, 15)加入病毒上清, 同时按培养基体积加入 8 μ g/ml 的 polybrene。孵育 20 h 后弃去转染液, 加入新鲜培养基。继续培养 1 w 后, 流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞比例。

1.2.4 MSCs 感染病毒前后 GDNF 分泌水平测定 感染病毒前后的 MSCs 以 1×10^5 /ml 的密度接种于 6 孔板

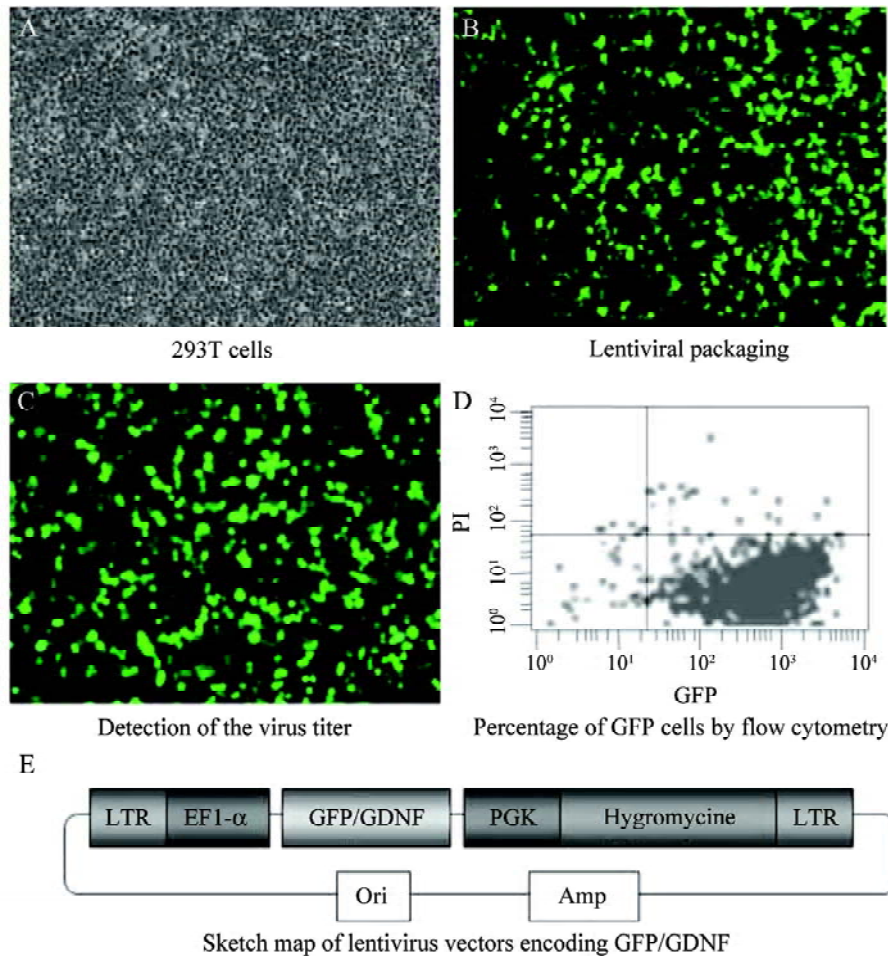


图 2 慢病毒包装及滴度检测

A: 293T 细胞(100 \times); B: 293T 细胞包装慢病毒(100 \times); C: 浓缩后的慢病毒感染 293T 细胞, 检测病毒滴度(100 \times); D: 流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞数比例(100 \times); E: 携带 GFP/GDNF 基因的慢病毒载体结构示意图。

Fig.2 Package and titer detection of lentiviral vectors

A: 293T cells (100 \times); B: package of lentiviral vectors in 293T cells (100 \times); C: detection of the lentiviral titer by infecting 293T cells with concentrated virus (100 \times); D: the percentage of GFP positive cells by flow cytometry; E: sketch map of lentiviral vectors encoding GFP/GDNF.

中, 培养 3 d, 更换新鲜培养基后, 分别取 24 h、48 h 后上清 1 ml, 以备测定 GDNF 浓度。不同的 MOI 值各接种 3 孔, 同样分别测定接种 3d、7d、10d、21d、40 d 时每 1×10^6 细胞的 GDNF 分泌量, GDNF 测定采用 ELISA 测定方法, 具体参照 Promega 公司提供的 GDNF 酶联免疫吸附检测试剂盒的实验步骤进行。

1.2.5 转染前后 GDNF 的基因表达水平测定 感染病毒前后的 MSCs 加入 TRIzol, 提取总 RNA, Oligo 反转录合成 cDNA。特异性引物进行 PCR 反应, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。用特异的 Real-time PCR 引物定量检测感染病毒前后和不同病毒拷贝数感染条件下 GDNF 基因表达量和 GAPDH 的表达量, 两者之间的比值表示基因的相对表达量。GDNF 扩增引物为: 上游: 5'-ACT GAC TTG GGT CTG GGC

TAT G-3'; 下游: 5'-TTT GTC ACT CAC CAG CCT TCT ATT T-3'。扩增片段大小为 134 bp。GAPDH 扩增引物为: 上游: 5'-ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG-3'; 下游: 5'-CAT ACC AGG AAA TGA GCT TG-3'。扩增片段大小为 177 bp。

1.3 统计分析

数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, SPSS16.0 软件进行统计分析。采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成年食蟹猴 MSCs 培养

骨髓单核细胞(MNCs)以 $2 \times 10^5/cm^2$ 接种于 $25 cm^2$ 的培养瓶, 48 h 后更换培养基, 2~4 d 后出现增殖克

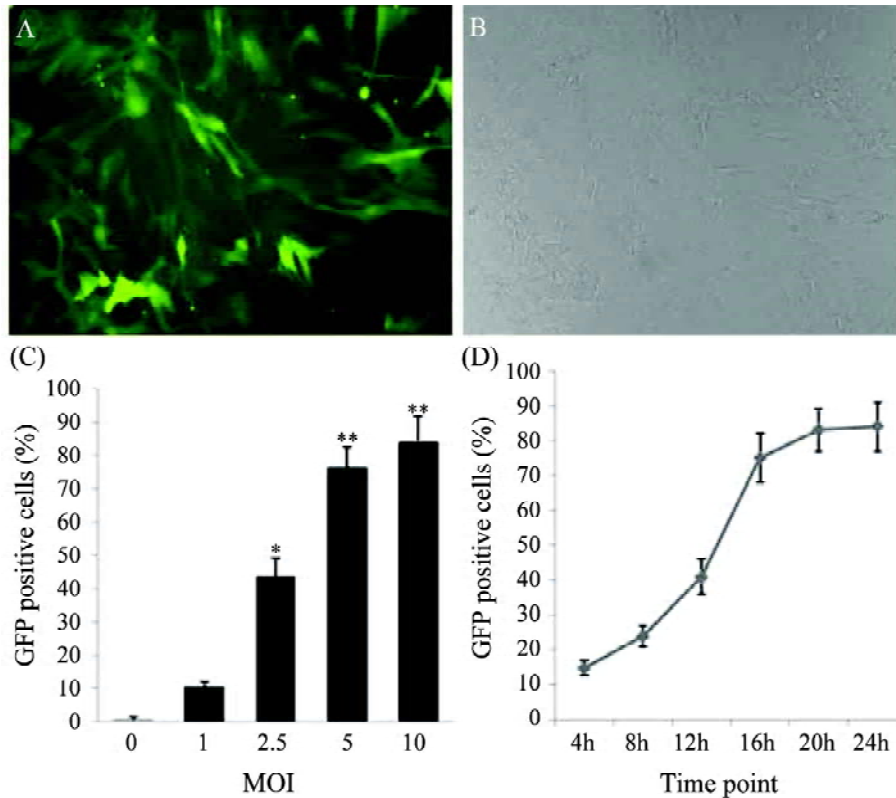


图3 慢病毒 MSCs 感染效率

A: 荧光显微镜下观察 MSCs 转染 GFP(200×); B: 对应的光学显微镜 MSCs 照片(200×); C: 不同 MOI 值的慢病毒感染 MSCs, GFP 阳性细胞的比例(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); D: MOI 值为 10, 感染慢病毒时间不同, GFP 阳性细胞的比例。

Fig.3 Lentiviral vectors infection efficiency at different MOI and infection time

A: MSCs expressing GFP under fluorescence microscope (200×); B: MSCs observed under light microscope (200×); C: the percentage of GFP positive cells at different MOI (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); D: the percentage of GFP positive cells at different infection time when MOI is 10.

隆, 部分细胞呈纺锤形或多角形, 大小长短不一。经 8~10 d 培养, 细胞 80% 融合, 细胞形态已转变成以长梭形为主, 呈涡旋状排列生长(图 1)。胰酶消化传代, 体外培养扩增。

2.2 慢病毒载体包装和滴度检测

慢病毒载体 DUET101 包含两个启动子结构 EF1- α 和 PGK, 分别驱动 GFP/GDNF 基因和潮霉素抗性基因(图 2E)。慢病毒载体系统的三个质粒 DUET101、CMV8.91 和 PMD.G 按一定比例共转染 293T 细胞(图 2A 和图 2B), 收集感染后 24 h、48 h 的上清, 浓缩后, 感染 293T 细胞(图 2C), 流式细胞仪计数 GFP 阳性细胞比例达 95%(图 2D), 计算病毒滴度为 1×10^7 TU/ml (TU, Transduction unit)。

2.3 食蟹猴 MSC 感染慢病毒

GDNF 和 GFP 的病毒分别以不同的 MOI 值条件感染食蟹猴 MSCs, 结果显示, 慢病毒载体可以成功感染食蟹猴 MSCs, 表达 GFP 和 GDNF(图 3A 和图

3B)。GFP 慢病毒 MOI 值为 5 和 10, 其感染效率可达到 80% 以上(图 3C)。在 MOI 值为 10 的条件下, 随着感染时间延长, 感染效率逐渐提高, 20 h 后到达平台水平, 感染效率为 85%(图 3D)。

2.4 感染前后 GDNF 蛋白表达分泌测定

不同 MOI 值 GDNF 病毒感染食蟹猴 MSCs, 体外培养 1 w 后, 1×10^6 细胞培养 24 h, 收集培养基, ELISA 测定培养基中 GDNF 的分泌量(图 4A)。不同 MOI 值 GDNF 的分泌量分别是: MOI(0): 364.80 ± 178.59 pg/ml; MOI(0.5): 413.22 ± 232.45 pg/ml; MOI(1): 553.39 ± 350.71 pg/ml; MOI(2.5): 1274.94 ± 579.2 pg/ml; MOI(5): 2683.63 ± 1189.08 pg/ml; MOI(10): 2815.19 ± 1293.97 pg/ml。GDNF 分泌水平与感染病毒的拷贝数有关, 相同条件下, 感染病毒拷贝数越高, GDNF 分泌水平越高(图 4B)。与 MOI 值 0、0.5 和 1 比较, MOI 值 2.5 的 GDNF 分泌水平较高(* $P < 0.05$), 而 MOI 值 5 和 10 的 GDNF 分泌水平明显升高(** $P < 0.01$)。MOI 值 5 和 MOI

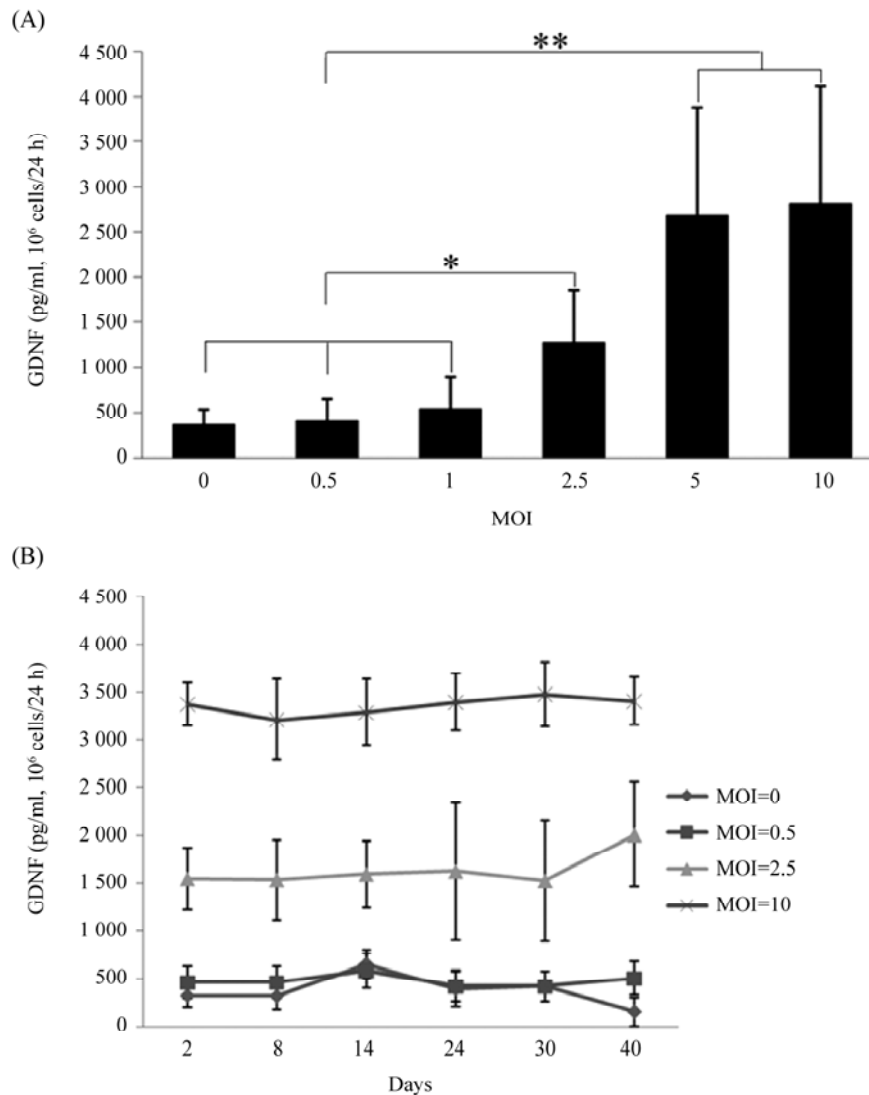


图4 ELISA 检测 MSCs 的分泌水平

A: 与对照组比较, 转导 GDNF 基因后, MSCs 过度表达 GDNF, 分泌水平与慢病毒 MOI 值正相关(* $P<0.05$, ** $P<0.01$); B: 转导 GDNF 基因后, 持续培养 MSCs, 在不同的时间点检测 GDNF 的分泌水平, 转导 GDNF 基因后的 MSCs 持续分泌 GDNF 一个月以上, 没有明显变化。

Fig.4 ELISA results about GDNF secretion level of cynomolgus monkey MSCs under different MOI and different time after GDNF transfection

A: GDNF secretion levels of MSCs were tested using ELISA method. The results indicated that MSCs transfected GDNF over-expressed GDNF significantly compared with control. GDNF secretion level increased accompanied by MOI's improvement (* $P<0.05$, ** $P<0.01$); B: after GDNF transfection, MSCs were continuously cultured for more than one month, GDNF secretion levels at different time were tested. The results were indicated that LV-GDNF modified MSCs over-expressed GDNF continuously, the GDNF secretion level and the relationship between GDNF secretion level and MOI were stable.

值 10 之间没有统计学差别($P>0.05$)(图 4A)。转导 GDNF 后, 食蟹猴 MSCs 连续培养 40 d, GDNF 持续表达, 随时间延长 GDNF 分泌量无明显改变(图 4B)。

2.5 PCR 检测食蟹猴 MSCs 转导 GDNF 基因

GDNF 特异性引物扩增, RT-PCR 检测 GDNF 表达(图 5A)。Real-time PCR 检测 GDNF 基因 mRNA 的表达水平。扩增 GAPDH 和 GDNF 的标准曲线分

别为, $Y=-0.30X+7.22$, $R^2=0.991$ 和 $Y=-0.29X+8.64$, $R^2=0.996$ 。通过内参 GAPDH 的标准化, GDNF mRNA 的表达水平与慢病毒 MOI 值有关, 随着 MOI 值增加, GDNF mRNA 的表达水平相应升高(图 5B)。MOI 值为 0、0.5 和 1, GDNF mRNA 相对表达量未见明显差异; 与 MOI 值为 0 比较, MOI 值为 2.5, 平均增高 4.13 倍(** $P<0.01$); MOI 值为 5, 平均增高 7.37 倍(** $P<0.01$);

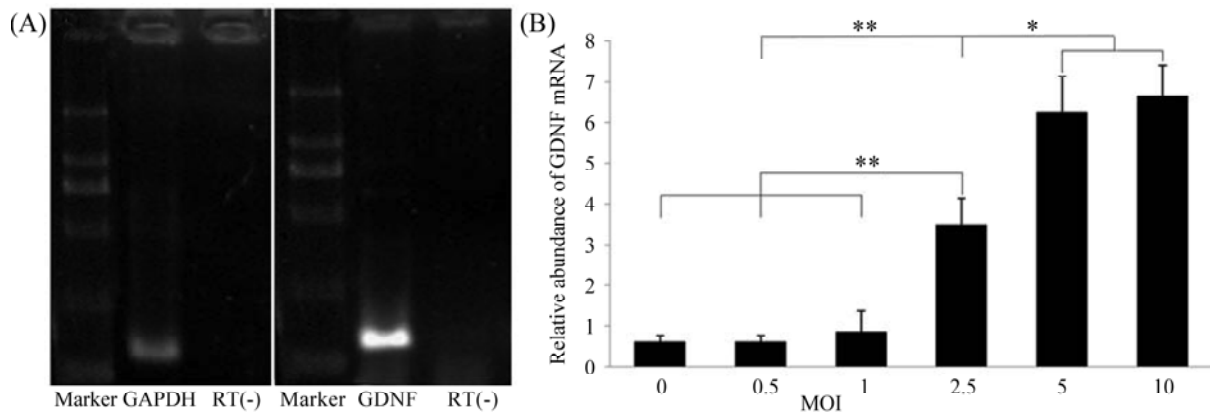


图5 食蟹猴 MSCs 转导 GDNF 基因表达

A: RT-PCR 检测 MSCs 的 GDNF 基因表达; B: 不同 MOI 值慢病毒转染后, 定量 PCR 检测 GDNF 基因的表达量, GDNF 基因表达量与病毒 MOI 值呈正相关(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

Fig.5 Expression level of GDNF gene in cynomolgus monkey MSCs after GDNF lentiviral vectors transfection

A: expression of GDNF in MSCs was tested using RT-PCR; B: after GDNF transfection, the level of GDNF gene at different MOI was tested by real time PCR. The results indicated that relative abundance of GDNF mRNA in MSCs transfected with GDNF increased significantly compared with control. Relative abundance of GDNF increased accompanied by MOI's improvement (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

MOI 值为 10, 平均增高 7.82 倍(** $P < 0.01$); MOI 值 5 和 10 之间没有统计学差别($P > 0.05$), 而两者与 MOI 值 2.5 之间有统计学差别(* $P < 0.05$)(图 5B)。

3 讨论

MSCs 可以自体取材, 体外扩增, 可作为基因工程改造细胞, 不存在免疫排斥, 上述优点使 MSCs 成为各种疾病基因治疗中不可替代的重要载体^[11-13]。研究显示, 在遗传学上, MSCs 易于转导、表达外源基因。不论是质粒、还是病毒载体均可携带目的基因转导 MSCs, 而不影响干细胞的特性^[14]。胶质源性神经营养因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)是 1993 年 Lin 等^[17]从鼠胶质细胞系 B49 分离出的一种神经营养因子, 对多巴胺能神经元、运动神经元、感觉神经元、肠道神经元等多种神经元均具有促存活及损伤保护作用^[6]。而在神经系统的损伤或病变部位实行细胞替代或基因移植治疗是极具发展前景的神经病学治疗策略。利用自体 MSCs 作为载体, 脑内移植转导 GDNF 基因的 MSCs 对于研究中枢神经损伤修复具有很大的意义。

研究显示 3 岁以上的灵长类动物感染猴泡沫病毒(simian foamy virus, SFV)的比例高达 100%^[16], 我们之前的研究显示^[10], 体外培养 8~10 岁食蟹猴 MSCs 均感染 SFV, 体外培养扩增 MSCs 必须添加抗病毒药物, 影响慢病毒感染 MSCs 的效率。因此, 本实验选

用的 MSCs 来源于 SFV 阴性食蟹猴。

慢病毒属于逆转录病毒科, 为 RNA 病毒^[17], 病毒基因均包括 *gag*、*pol* 和 *env* 3 个基本结构基因。目前, 现有的慢病毒载体来源于多个物种, 如 HIV-1、2 型和 SIV 等。对 HIV 来源的慢病毒载体构建研究最广泛深入, 它区别于一般的逆转录病毒载体, 对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力, 可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上, 从而达到持久性表达^[18]。之前的研究显示, 病毒类载体转染 MSCs 具有更高的效率, 而与腺病毒比较, 慢病毒具有更高的感染效率^[19,20]。对于中枢神经系统疾患的基因治疗, 慢病毒载体由于高效地转导非分裂细胞, 把基因整合到靶细胞基因组, 使之长期、稳定和安全地表达, 成为最理想的基因转移载体^[21]。本研究发现, 体外构建的慢病毒载体, 感染食蟹猴 MSCs 效率高达 85% 以上, 并能在体外持续表达外源性基因。GDNF 慢病毒载体感染食蟹猴 MSCs, 在体外表达 GDNF, 其分泌量随着感染病毒的拷贝数增加而增加, 且持续稳定分泌 GDNF 超过 40 d。本研究为日后的脑内移植转导 GDNF 基因的 MSCs, 修复中枢神经损伤奠定了实验基础。

参考文献(References)

- 1 Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther* 2008; 15(2): 109-16.
- 2 Agata H, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki

- M, *et al.* Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382(2): 353-8.
- 3 Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 2006; 39(4): 678-83.
- 4 Bartholomew A, Patil S, Mackay A, Nelson M, Buyaner D, Hardy W, *et al.* Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2001; 12(12): 1527-41.
- 5 Chan J, O'Donoghue K, de la Fuente J, Roberts IA, Kumar S, Morgan JE, *et al.* Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Stem Cells* 2005; 23(1): 93-102.
- 6 Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signaling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(5): 383-94.
- 7 Boffelli D, McAuliffe J, Ovcharenko D, Lewis KD, Ovcharenko I, Pachter L, *et al.* Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome. *Science* 2003; 299(5611): 1391-4.
- 8 Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC, Bunnell BA. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev* 2005; 14(4): 440-51.
- 9 Inaba M, Adachi Y, Hisha H, Hosaka N, Maki M, Ueda Y, *et al.* Extensive studies on perfusion method plus intra-bone marrow-bone marrow transplantation using cynomolgus monkeys. *Stem Cells* 2007; 25(8): 2098-103.
- 10 任振华, 王淑艳, 张颖, 邹春林, 张愚. 慢病毒载体感染成年食蟹猴骨髓间充质干细胞. *生物工程学报* 2010; 26(6): 787-93.
- 11 Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, Kushner R, Swanger SA, Kopen GC, *et al.* Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair* 2006; 20(2): 278-96.
- 12 Lee RH, Hsu SC, Munoz J, Jung JS, Lee NR, Pochampally R, *et al.* A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice. *Blood* 2006; 107(5): 2153-61.
- 13 Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 2005; 306(2): 330-5.
- 14 Chan J, O'Donoghue K, de la Fuente J, Roberts IA, Kumar S, Morgan JE, *et al.* Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Stem Cells* 2005; 23(1): 93-102.
- 15 Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260(5111): 1130-2.
- 16 Jones-Engel L, Steinkraus KA, Murray SM, Engel GA, Grant R, Aggimarangsee N, Lee BP, *et al.* Sensitive assays for simian foamy viruses reveal a high prevalence of infection in commensal, free-ranging Asian monkeys. *J Virol* 2007; 81(14): 7330-7.
- 17 Lai Z, Brady RO. Gene transfer into the central nervous system *in vivo* using a recombinant lentivirus vector. *J Neurosci Res* 2002; 67(3): 363-71.
- 18 Chang LJ, Gay EE. The molecular genetics of lentiviral vectors-current and future perspectives. *Curr Gene Ther* 2001; 1(3): 237-51.
- 19 Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, *et al.* Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood. *J Lab Clin Med* 2005; 146(5): 271-8.
- 20 McMahon JM, Conroy S, Lyons M, Greiser U, O'shea C, Strappe P, *et al.* Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem Cells Dev* 2006; 15(1): 87-96.
- 21 Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998; 72(11): 8463-71.

GDNF Lentivirus Infection of Cynomolgus Monkey Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Yu-Lan Wang¹, Yan-Ling Xu², Zhen-Hua Ren^{2,3*}

¹Central Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China;

²Cell Biology Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China;

³Department of Anatomy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) have received considerable attention for various therapeutic approaches in recent years. MSCs are also easy to genetically modify to express therapeutic genes using lentiviral vectors. In this study, we transfected cynomolgus monkey mesenchymal stem cells (MSCs) using lentiviral vectors encoding glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) to study its expression level *in vitro*. First, Lentiviral vectors encoding GDNF were packaged by 293T cells through three plasmids transient co-transfection method using standard lipofectamine reagent. The viral titers were tested by the transfection efficiency of 293T cells. At the same time, MSCs were transfected under different multiplicity of infection. GDNF gene expression level and protein secretion level of MSCs were tested by real-time PCR and ELISA methods after transfection. The results indicated lentiviral vectors encoding GDNF successfully transfected cynomolgus monkey MSCs, and over-expressed GDNF *in vitro* for over 1 month. Furthermore, GDNF expression was influenced by the multiplicity of infection. It might provide technical assistance for cynomolgus monkey MSCs and GDNF as gene therapy applied to the treatment of neurodegenerative diseases.

Key words cynomolgus monkey; mesenchymal stem cells; glial cell derived neurotrophic factor; lentiviral vectors; transduction

Received: September 3, 2010 Accepted: October 25, 2010

This work was supported by Scientific Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission (No.D07050701350703)

*Corresponding author. Tel: 86-10-83198274; E-mail: renzhenhua@tom.com