

嵌合Neurturin在恒河猴脂肪间充质干细胞中的表达及定向诱导作用

周 艳 孙茂盛 李鸿钧* 王晚璞 谢天宏

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

摘要 该研究通过重组腺病毒传递嵌合型Nerve growth factor(NGF)/Neurturin(NTN)至恒河猴脂肪间充质干细胞(rhesus adipose mesenchymal stem cells, rASCs)中, 评价嵌合型NGF/NTN在诱导该细胞为神经元细胞中的作用, 为进一步探讨ASC-NTN体内修复帕金森氏病猴模型潜能提供实验基础。用带有NGF/NTN嵌合基因的重组腺病毒感染rASCs, 通过RT-PCR、免疫荧光及ELISA检测重组NTN在rASCs的表达及产物定位, 在外源化学诱导剂协同作用下对rASCs进行诱导。rAd-NGF/NTN感染rASCs后检测到NGF/NTN转录产物, 表达产物可分泌到细胞外, 分泌出的NTN蛋白在体外能够促进鸡胚背根神经节长出神经突起, 维持胎鼠中脑神经元的存活。rASCs在内外源性诱导因素诱导下可向神经元样细胞分化。利用rAd-NGF/NTN可将NGF-NTN传递至rASCs中并表达, rASCs能够被定向诱导为具有分泌NTN作用的神经元样细胞。这些研究结果为将来rASCs-NTN移植进入帕金森氏病猴模型进行帕金森氏病治疗提供了重要依据。

关键词 Neurturin; 脂肪间充质干细胞; 重组腺病毒; 体外活性; 帕金森氏病

帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)是一种中老年常见的慢性神经系统退行性变性疾病。其主要病理特征是黑质多巴胺能神经元的选择性变性丢失和残存于神经元内含大量 α -突触核蛋白(α -synuclein)、synphilin-1和Parkin等成分的路易小体(Lewy bodies)形成^[1]。帕金森氏病(PD)的治疗包括药物治疗和基因治疗。基因治疗又可分为基因嵌入、基因转染和细胞治疗。在细胞治疗中, 干细胞移植治疗是目前研究的热点, 有实验表明, 来源于胚胎中脑的干细胞移植治疗PD确有疗效, 但来源有限^[2]。因此, 研究将成体干细胞诱导成具有神经元功能的细胞用于治疗PD及其他神经退行性疾病较为现实。脂肪间充质干细胞由于细胞来源丰富且取材方便易于自体移植治疗, 成为成体干细胞治疗的优先选择。在将成体干细胞诱导成神经元样细胞中选择合适的化学诱导剂和理想的基因至关重要。Neurturin(NTN)是1996年才发现的新的神经营养因子, 它与胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)有较高的同源性, 并具有相似的空间结构及生理功能。Neurturin(NTN)对多巴胺神经元具有明显的营养和保护作用; 有研究证明NTN能预防体内多巴胺能神经元的退行性改变, 除了具有保护神经元的作用外, 还对神经元所处的微

环境有修复和重建功能^[3-4]。本研究通过重组腺病毒将NTN导入恒河猴间充质干细胞, 以期从内源性转录信号通路控制其分化方向并结合外源性化学诱导剂将rASCs诱导为神经元样细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种、毒种及细胞株 pcDNA3.0-wt NTN、DH5菌株、Ad-293及Vero细胞系由本实验室保存, 嵌合型Ad-NGF/NTN由本实验室构建并保存^[5]。
1.1.2 工具酶和主要试剂 限制性内切酶Hind III、EcoR V和Taq酶购自TaKaRa公司, 限制性内切酶Pme I和Pac I购自NEB(北京), 质粒提试剂盒、胶回收试剂盒和PCR产物纯化试剂盒购自Omega公司, 细胞总RNA抽提试剂盒和cDNA第一链合成试剂盒购自Fermantas公司, Anti-human Neurturin单克隆抗体、CD抗体和二抗分别购自R&D、BD和KPL, Lipofectin2000、Opti-MEMI、FBS及DMEM培养基购自

收稿日期: 2011-08-26 接受日期: 2011-10-19

国家自然科学基金(No.30971003)、云南省基础研究重点项目(No.2007C0012Z)和北京协和医学院博士创新基金资助项目

*通讯作者。Tel: 0871-8335391, E-mail: lihj6912@hotmail.com

Invitrogen公司, 其他生化试剂均为国产分析纯或进口试剂。

1.1.3 引物 (1)NGF-NTN引物(产物大小为671 bp): PCR扩增引物由TaKaRa公司合成, P1和P2分别为嵌合NTN全长上下游引物。NGF上游引物: 5'-TGT CCA TGT TGT TCT AC-3'; NTN下游引物: 5'-TTA

CAC GCA GGC GCA CTC-3'; (2)实时定量PCR内参基因 β -actin引物(产物大小为146 bp): β -actin上游引物: 5'-CTT AGT TGC GTT ACA CCC TT-3'; β -actin下游引物: 5'-CAC CTT CAC CGT TCC AGT-3'; (3)干细胞多能性相关基因*Oct-4*(485 bp)、*Sox-2*(151 bp)、*C-myc*(277 bp)、*Nanog*(198 bp)引物(表1)。

表1 多能性基因引物序列
Table 1 Pluripotent gene primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
Oct-4 upstream primer(P3 up)	5'-GTT CAG CCA AAC GAC CAT C-3'
Oct-4 downstream primer(P3 down)	5'-GGA AAG GGA CCG AGG AGT A-3'
Sox-2 upstream primer(P4 up)	5'-CAG ATA CAG CCC ATA CAC CG-3'
Sox-2 downstream primer(P4down)	5'-GGG ACT TGA GCA CCG AAC-3'
C-myc upstream primer(P5 up)	5'-GCT GGC TTC ACT CTT ACC-3'
C-myc downstream primer(P5 down)	5'-GCC TTT GAG ATA CCC TTC C-3'
Nanog upstream primer(P6 up)	5'-AAG CCT GCC TTG CTC TGA-3'
Nanog downstream primer(P6 down)	5'-TTG CCT TTG GGA CTG GTA-3'

1.2 实验方法

1.2.1 恒河猴脂肪间充质干细胞(rASCs)的培养

手术刀、手术剪和镊子用0.1%的新洁而灭浸泡消毒, 氯胺酮麻醉恒河猴, 无菌条件下取恒河猴脂肪组织。PBS冲洗4遍, 分离可见的血管和纤维成分, 0.1% I型胶原酶, 37 °C消化1 h。消化完成后, 加入与I型胶原酶等体积的含10%新生小牛犊血清的L-DMEM培养液终止消化, 过滤, 1 500 r/min离心3 min, 弃上清, 吸取底部沉淀用于rASCs培养^[6-7]。

1.2.2 恒河猴脂肪间充质干细胞(rASCs)的初步鉴定

(1)电镜检测: 取rASCs第一代细胞, 感染Ad-NTN 6 h后, PBS洗两次, 1 500 r/min离心10 min, 2.5%戊二醛-0.2 mol/L二甲砷酸固定, 透射电镜观察细胞核以及细胞器特征; (2)PCR检测多能性相关基因表达: 取rASCs第一代细胞, PBS洗两次, 按试剂盒操作说明提取细胞总RNA并逆转录为cDNA, PCR检测相应*Oct-4*、*Sox-2*、*C-myc*及*Nanog*的表达。反应体系为: 1×LA Taq PCR Buffer(25 μ L), 50 ng模板(2 μ L), 上下引物各50 pmol(各1 μ L), 0.25 mmol/L dNTP Mix, 总体积50 μ L。反应条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s; 55 °C退火30 s; 72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C保存; (3)免疫荧光染色鉴定rASCs: 提前一天将rASCs传至含有盖玻片的6孔板中, 待细胞汇合率达90%时, 爬片细胞经4 °C预冷

的2%多聚甲醛/0.2% Triton X-100/PBS(pH7.4) 4 °C处理30 min, 再置于冰冷的甲醇中10 min, PBS清洗3次后加入封闭液(2% BSA) 37 °C封闭30 min后加入CD29(PE)、CD34(PE)、CD49d(PE)、CD45(PerCP)及HLA-DR(FITC)抗体, 37 °C结合90 min。经PBS清洗3次后, 免疫荧光显微镜下观察。

1.2.3 RT-PCR及Real Time PCR检测NGF/NTN嵌合基因在rASCs中的转录 当rASCs(T-25)贴壁率达90%时, 用重组腺病毒Ad-NGF-NTN感染rASCs, 感染复数MOI-5, 感染48 h后, 弃培养液, PBS洗两次, 直接加入裂解液, 取细胞总RNA(按试剂盒说明书操作), 以Oligo(dT)为引物, 逆转录酶M-MuLV合成cDNA第一链(按操作说明书操作)。再以合成的cDNA第一链为模板, 使用NGF-NTN上下游引物, PCR扩增嵌合基因NGF/NTN, 同时以感染了携带LacZ基因的重组腺病毒的rASCs逆转的cDNA第一链作为对照。利用逆转录得到的cDNA, 使用NGF-NTN上下游引物, 在Thermo Scientific Even Green Premix体系中进行Real Time PCR扩增, β -actin为内参。反应体系为2×Even Green premix buffer, 50 ng模板(2 μ L), 上下游引物各20 μ mol/L(各1 μ L), ddH₂O (22 μ L), 总体积为50 μ L。反应条件为95 °C 3 min预变性, 然后按95 °C 15 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 共35个循环, 在82 °C 5 s时读板, 融解曲线范围的最低温

度和最高温度分别为65 °C和95 °C, 每增加0.5 °C获取数据且维持时间为5 s, 结束时4 °C保存。

1.2.4 免疫荧光检测重组腺病毒Ad-NGF-NTN在rASCs细胞中的表达 提前一天将rASCs传至含有盖玻片的6孔板中, 待细胞汇合率达90%时用重组腺病毒Ad-NGF-NTN感染rASCs, 感染复数MOI=5, 37 °C、5% CO₂, 孵育48 h。爬片细胞经4 °C预冷的2%多聚甲醛/0.2% Triton X-100/PBS(pH7.4)、4 °C处理30 min, 再置于预冷的甲醇中10 min, PBS清洗3次后加入封闭液(2% BSA), 37 °C封闭30 min后加入一抗, 37 °C结合90 min经PBS清洗3次后加入FITC标记的二抗孵育30 min, PBS清洗后荧光显微镜下观察。

1.2.5 ELISA检测ASC胞外分泌情况 将24, 48, 72, 96 h收集得到的NTN条件培养上清(感染相同MOI Ad-NTN的rASCs换液为无血清L-DMEM)及rASCs阴性培养上清(未感染Ad-NTN的rASCs培养的无血清L-DMEM)每孔100 μL在96孔ELISA板中4 °C包被过夜, 空白孔以碳酸盐缓冲液(pH9.6)包被; 之后去除包被液, 用含0.5% Tween-20的PBS溶液(PBST溶液)洗板3次, 每次3 min; 用含有3%牛血清白蛋白的PBST溶液, 100 μL/孔, 37 °C封闭2 h; 去除封闭液, PBST洗板, 将山羊抗人的NTN一抗1:2 000稀释, 每孔100 μL加入ELISA板, 37 °C温育1 h; PBST洗板后, 加入HRP标记的1:2 500稀释的兔抗山羊二抗, 100 μL/孔, 37 °C结合1 h; PBST洗板, 用TMB, 100 μL/孔, 在室温显色15 min, 再用2 mol/L H₂SO₄终止显色; 用酶标仪在450 nm检测光密度值。当待测NTN样品的光密度值是阴性上清的2.1倍时, 认为该待测NTN样品为阳性。

1.2.6 Western blot检测NTN在ASC胞外的分泌表达情况 当rASCs(T-25)贴壁率达90%时, 用重组腺病毒Ad-NGF-NTN感染rASCs, 感染复数MOI=5, 5~6 h将细胞培养液更换为无血清培养基。37 °C、5% CO₂, 孵育48 h, 收集培养液上清。取培养上清15 μL, 15% SDS-PAGE电泳后电转至PVDF膜上, 3% BSA封闭2 h后加入一抗37 °C孵育过夜, 次日PBST(pH7.4)清洗3次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, PBST(pH7.4)清洗3次后加入化学发光底物SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Scientific Pierce), 室温孵育5 min后使用Kodak胶片暗室曝光。

1.2.7 rASCs表达的NTN体外活性检测 (1)鸡胚背根神经节培养实验: 用重组腺病毒Ad-NGF-NTN

感染培养于T-25培养瓶中汇合率达到90%的rASCs, 感染复数MOI=5, 感染后加入无血清L-DMEM细胞培养液, 48 h后离心收集上清液, 0.22 μm滤膜过滤除菌, 即为NTN条件培养基。取9日龄鸡胚, 在无菌条件下剥离背根神经节, 置入经多聚赖氨酸包被的24孔培养板中, 培养液为Neural Basal(B27)+NTN条件培养基(1:1), 对照孔中加入感染Ad-LacZ的rASCs培养收获的条件培养基37 °C、5% CO₂孵育48 h后观察结果; (2)胎鼠中脑神经元实验: 取孕14 d的SD大鼠, 在无菌条件下取出子宫至于预冷的Hanks缓冲液中, 分离出SD胎鼠, 在解剖显微镜下找到腹侧中脑区, 加入0.025%胰酶, 37 °C消化10 min, 用DMEM/F12(10% FBS)终止消化, 吹匀, 1 500 r/min离心10 min, 用DMEM/F12(10% FBS)重悬细胞, 接种至已包被过多聚赖氨酸的6孔板中。2 d后细胞贴壁换液为Neural Basal培养基(含2% B27), 检测孔1:1加入NTN条件培养基上清。

1.2.8 rASCs感染Ad-NTN后神经元细胞的初步诱导 诱导前一天将rASCs以10⁶/孔接种于6孔板, 次日将浓缩纯化得到的Ad-NTN以MOI=6感染ASC, 感染后24 h, 加入诱导液^[8](含2% B27的Neural Basal培养基加入1.7 nmol/L的shh和20 ng/mL的bFGF)进行诱导, 10 d后出现神经元样细胞, 拍照。

2 结果

2.1 体外培养rASCs的形态学检测

2.1.1 普通相差显微镜下观察rASCs 培养的脂肪干细胞大部分于24 h内即贴壁, 在倒置显微镜下观察, 贴壁细胞呈梭形, 胞浆丰富、核大、核仁明显, 可见细胞呈克隆样生长。传代后, 于倒置显微镜下可见成纤维样细胞形态, 细胞呈平行排列生长或漩涡状生长, 在形态上与骨髓来源的MSCs类似(图1)。

2.1.2 rASCs透射电镜检测 细胞表面有许多微绒毛, 分布于胞体一侧, 胞核不规则, 细胞器丰富, 胞浆内核糖体、线粒体、粗面型内质网、高尔基体、溶酶体较多, 符合多能性细胞特征(图2)。

2.2 rASCs多能性基因检测及特异性标志分子免疫显色结果

Oct-4、Nanog、Sox-2以及C-myc是四种维持干细胞多能性和自我更新的转录因子, 它们通过结合靶基因调控区, 选择性抑制分化基因表达或促进多能性基因表达。它们通常只在多能干细胞中表达, 在

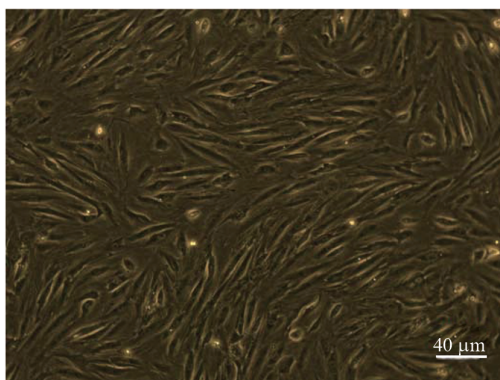


图1 恒河猴ASCs普通相差显微镜下形态

Fig.1 The image of ASCs under phase contrast microscope

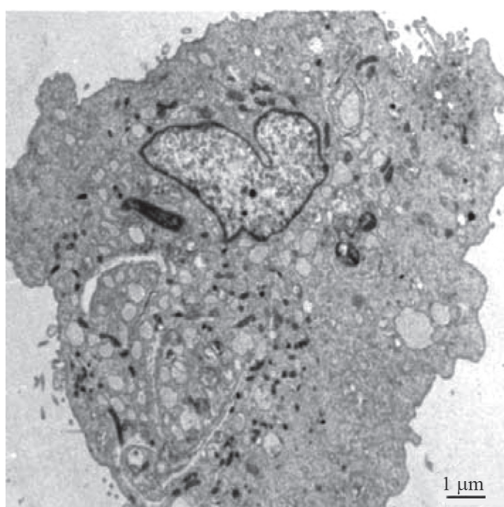


图2 透射电镜下ASCs形态

Fig.2 The pattern of ASCs under TEM

分化细胞中不表达。提取rASCs第一代细胞总RNA进行RT-PCR检测, Oct-4、Nanog、C-myc、Sox-2表达呈阳性, Oct-4不表达(非特异性条带)(图3)。免疫荧光染色检测细胞表面抗原CD29(PE)、CD34(PE)、CD49d(PE)、CD45(PerCP)及HLA-DR(FITC)在rASCs中的表达情况, CD29表达为阳性且可达90%以上, CD49d表达为部分阳性, CD45和CD34有部分表达, HLA-DR表达呈阴性(图4)。

2.3 重组Ad-NGF-NTN在rASCs中的转录及表达检测

Ad-NGF/NTN感染rASCs 24 h后提取RNA进行RT-PCR, 产物通过1%琼脂糖凝胶检测, 证实NTN能够在rASCs中进行转录(图5)。Real Time PCR检测结果显示rASCs不转录内源性NTN, 且基因表达差异分

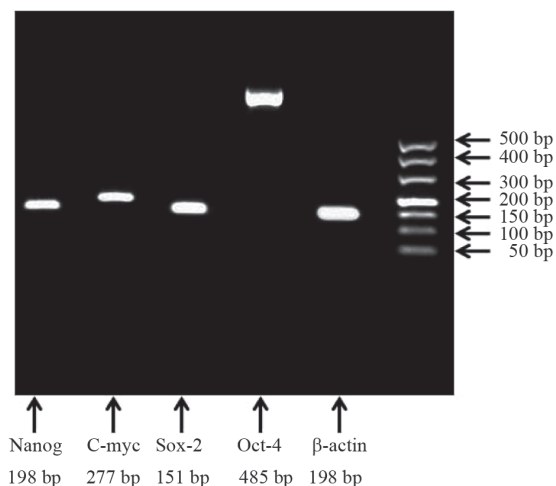


图3 RT-PCR检测第二代rASCs多能性基因表达情况

Fig.3 The expression of pluripotent gene of ASCs was detected by RT-PCR

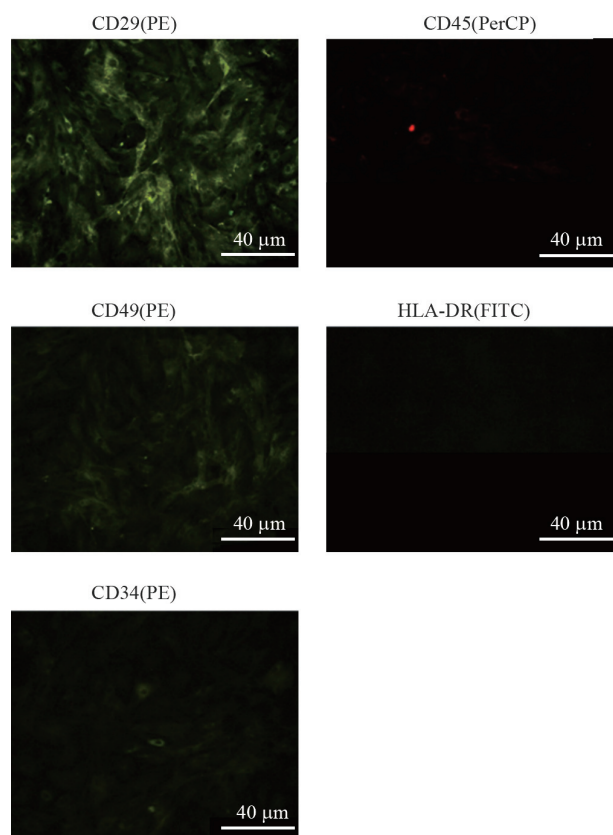
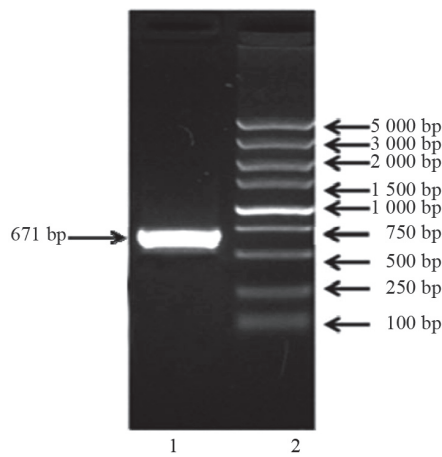


图4 rASCs特异性标志分子免疫显色结果

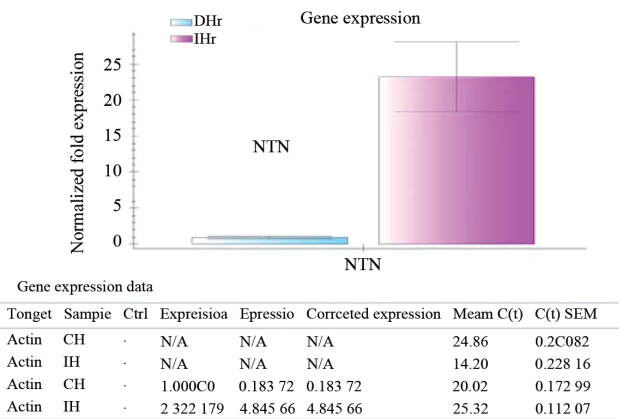
Fig.4 The immunofluorescence of specific markers in rASCs

析显示感染Ad-NTN组NTN转录明显强于rASCs对照组(图6)。通过免疫荧光方法检测到NTN蛋白能够



1: 嵌合NTN扩增产物; 2: DL 5 000 DNA marker。
1: PCR product of chimeric NTN; 2: DNA marker DL 5 000.

图5 Ad-NGF-NTN感染rASCs后RT-PCR产物电泳检测
Fig.5 1% agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR product of ASCs infected with Ad-NGF-NTN

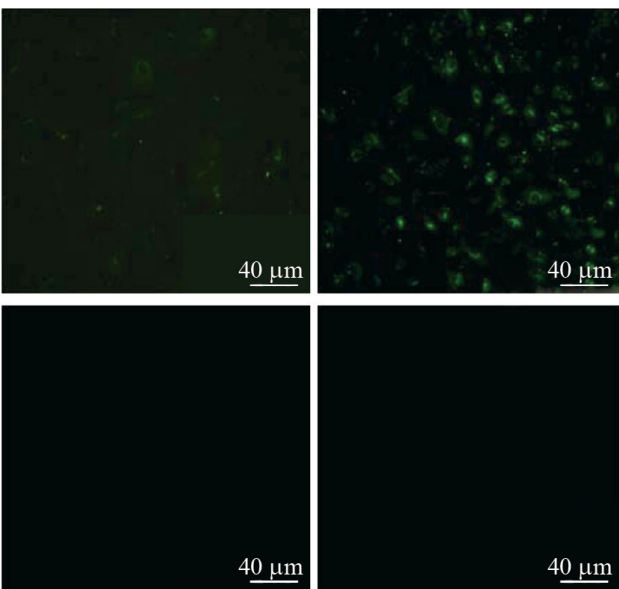


0 Hr: rASCs对照; 1 Hr: 感染了Ad-NGF-NTN的rASCs。
0 Hr: rASCs; 1 Hr: rASCs exposed by Ad-NGF-NTN。
图6 Real-Time PCR检测NTN在rASCs细胞对照和感染Ad-NGF-NTN的rASCs中的基因转录差异
Fig.6 The detection of NTN gene transcription in rASCs infected Ad-NGF-NTN and rASCs control by Real-Time PCR

在Ad-NTN感染24 h(图7A)后出现表达, 且48 h荧光(图7B)明显强于24 h。

2.4 Ad-NGF/NTN感染rASCs后NTN胞外分泌情况检测

Ad-NTN感染rASCs 6 h后换液为无血清的L-DMEM, 收集24, 48, 72, 96 h的条件培养上清及rASCs培养对照上清进行ELISA测定NTN表达情况, 条件培养上清与对照上清 D_{450} 均值经 t 检验后, 两组数据有显著差异(* $P<0.01$), 具有统计学意义。与24, 72, 96 h相比, 48 h时间点收集的条件培养基NTN表达最强



A: Ad-NGF/NTN重组腺病毒感染rASCs细胞后24 h免疫荧光结果; B: Ad-NGF/NTN重组腺病毒感染rASCs细胞后48 h免疫荧光结果; C: 未感染Ad-NGF/NTN的rASCs对照细胞24 h免疫荧光结果; D: 未感染Ad-NGF/NTN的rASCs对照细胞48 h免疫荧光结果。
A: the immunofluorescence of rASCs 24 h after Ad-NGF/NTN infection; B: the immunofluorescence of rASCs 48 h after Ad-NGF/NTN infection; C: the immunofluorescence of rASCs 24 h control; D: the immunofluorescence of rASCs 48 h control.

图7 Ad-NGF/NTN重组腺病毒感染rASCs细胞后24 h和48 h免疫荧光结果
Fig.7 The immunofluorescence of rASCs 24 h and 48 h after Ad-NGF/NTN infection

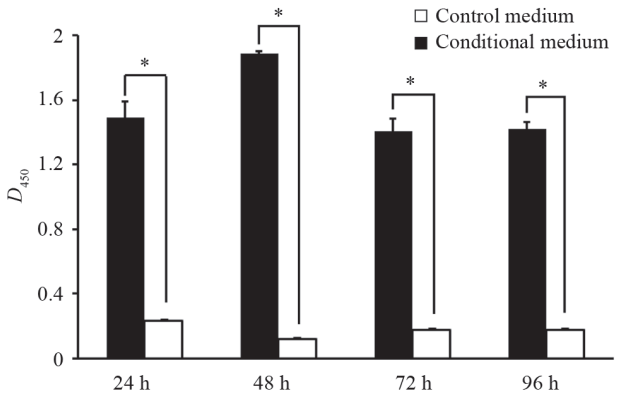


图8 ELISA检测感染Ad-NGF-NTN不同时间段收获的rASCs培养上清及对照上清中NTN分泌情况
Fig.8 The detection of NTN secretion in 24, 48, 72, 96 h of rASCs infected Ad-NTN and control rASCs by ELISA

(图8)。通过Western blot进一步检测感染Ad-NTN的rASCs条件培养基中有NTN的单体和二聚体, 证明

表2 ELISA检测rASCs感染Ad-NTN 24, 48, 72, 96 h后收获的条件培养液中NTN含量
Table 2 The detection of NTN secretion in 24, 48, 72, 96 h of rASCs infected Ad-NTN by ELISA

样品	24 h	48 h	72 h	96 h
Sample	24 h	48 h	72 h	96 h
NTN conditional medium	1.375	1.900	1.471	1.402
	1.517	1.888	1.442	1.468
	1.578	1.874	1.316	1.385
ASC culture medium	0.235	0.124	0.167	0.166
	0.236	0.109	0.181	0.179
	0.231	0.121	0.174	0.178

该嵌合基因所表达的NTN前体蛋白能够被rASs加工分泌至胞外并能以二聚体的活性形式存在于培养上清中(图9)。

2.5 rASCs表达的NTN体外活性检测

为检测分泌出rASCs胞外的NTN蛋白是否具有营养保护作用, 1:1加入条件培养基的鸡胚背根神经节实验组在培养基加入48 h后出现向四周辐射状发散的神经轴突。随培养时间延长, 轴突越明显(图10)。取孕14 d的SD胎鼠中脑神经元培养, 1:1加入条件培养基的神经元细胞在体外培养21 d后仍能存活80%并保持很好的形态, 而仅用Neural Basal培养基的神经元在14 d后出现凋亡, 21 d时存活数量很少(图11)。

2.6 感染Ad-NGF/NTN后的rASCs诱导为神经元样细胞

以MOI=5的感染复数将Ad-NGF/NTN感染rASCs, 感染后 12 h, 加入外源性诱导剂Shh、FGF-8、bFGF

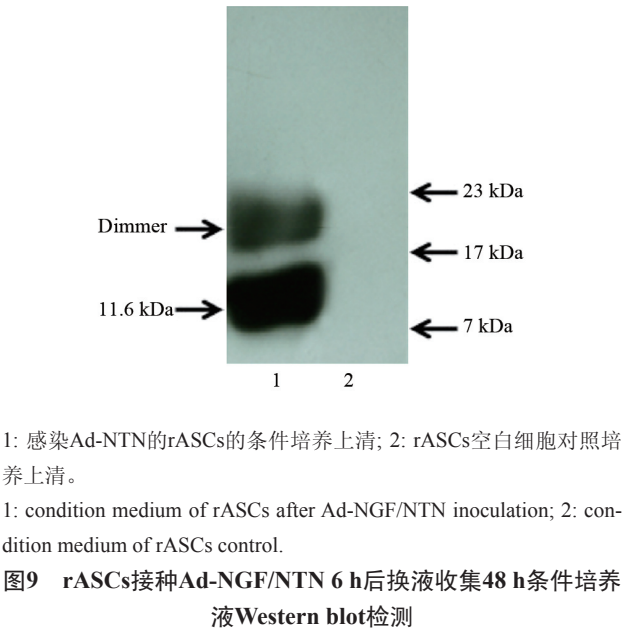
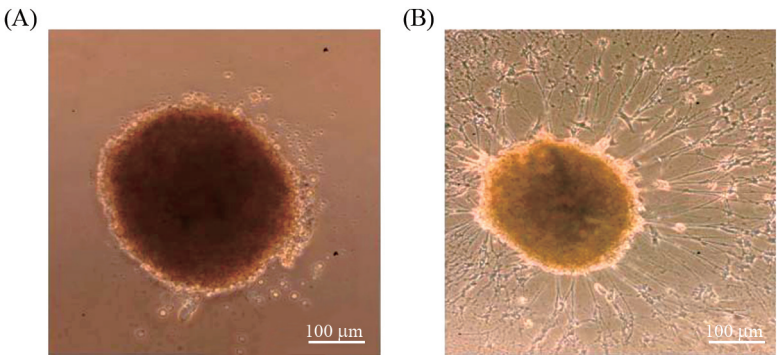


Fig.9 Western blot of the rASCs condition medium harvested at 48 h after Ad-NGF/NTN inoculation at rASCs

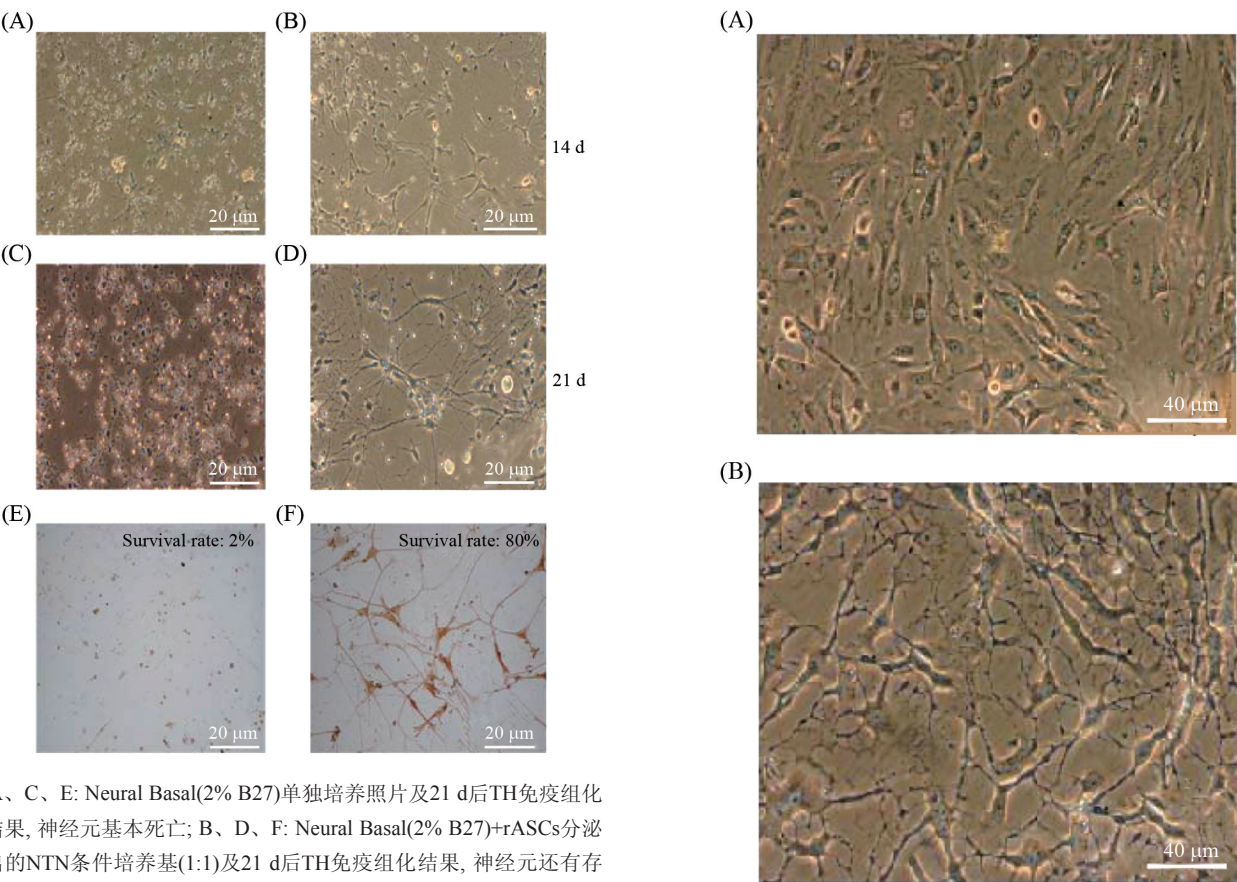


A: 感染Ad-lacZ的rASCs条件培养基; B: 感染Ad-NGF/NTN的rASCs条件培养基。
A: the dorsal root ganglia cultured with Ad-LacZ condition medium as control; B: the dorsal root ganglia cultured with Ad-NGF/NTN condition medium.

图10 鸡胚背根神经节培养实验
Fig.10 The culture of dorsal root ganglia of chick embryo test

等对 ASCs进行诱导, 细胞在诱导后 10 d出现神经元样, 轴突明显, 细胞呈网状且相互连接(图12)。对诱

导后的神经元样细胞进行NSE免疫组化染色, 实验组出现较多阳性细胞, 对照组虽有个别染色, 应为非



A、C、E: Neural Basal(2% B27)单独培养照片及21 d后TH免疫组化结果, 神经元基本死亡; B、D、F: Neural Basal(2% B27)+rASCs分泌出的NTN条件培养基(1:1)及21 d后TH免疫组化结果, 神经元还有存活且状态良好。

A,C,F: the image of neurons cultured in Neural Basal (2% B27) alone and the result of TH immunohistochemistry after 21 d. Neurons are almost dead. B,D,F: the image of neurons cultured in Neural Basal (2% B27) and NTN condition medium (1:1). The result of TH immunohistochemistry reveals some neurons are alive and grow well.

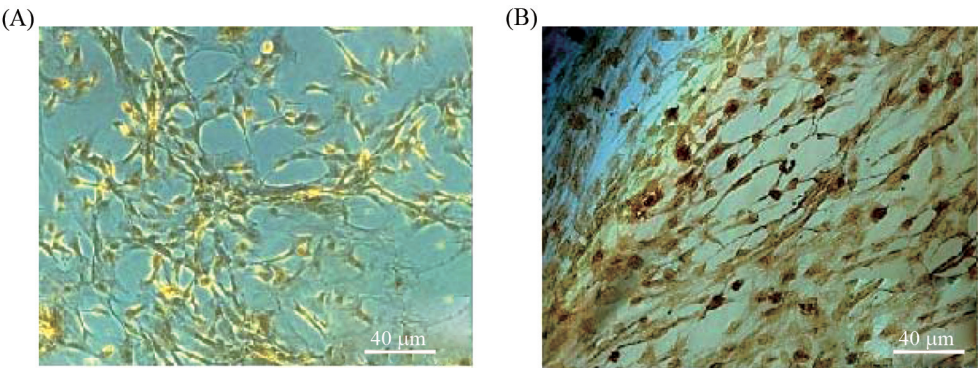
图11 孕14周SD胎鼠中脑多巴胺能神经元培养实验

Fig.11 The culture of neurons isolated from the mesencephalic tissue of *Sprague dawley* rat embryos at embryonic day 14.5

A: rASCs未诱导细胞对照组; B: 感染Ad-NGF/NTN后诱导组。
A: rASCs control; B: infected rASCs cultured in neuron inducing medium.

图12 感染Ad-NGF/NTN的rASCs在外源诱导剂环境中分化为神经元样细胞

Fig.12 rASCs are able to differentiate into neuron like cells when infected with Ad-NGF/NTN cultured in an appropriate exogenous chemical microenvironment



A: 细胞对照NSE染色; B: 诱导成的神经元样细胞NSE染色。
A: rASCs control; B: NSE staining of neuron-like cells.

图13 NSE免疫组化染色结果
Fig.13 NSE immunohistochemical staining

特异性染色。

3 讨论

研究表明, 帕金森氏病起始病因是中脑单一细胞群——多巴胺能神经元的选择性变性缺失, 特异性的神经营养因子在成体脑中支持和营养保护着这一特异的神经元细胞群。本实验室前期工作中重组嵌合型NTN腺病毒能够在Vero细胞中表达并能分泌出胞外, 分泌出的NTN蛋白能够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起到明显的营养作用, 并在MPTP诱导的帕金森氏病(PD)模型的恒河猴体内, 能保护多巴胺能神经元进一步变性、坏死^[5]。实验证明^[9-10], Neurturin具有选择性地促进多巴胺神经元存活的效应, 且还能促进神经元轴突纤维的生长, 所以, 与GDNF相比, NTN对帕金森氏病的治疗作用更加明确^[11]。

近来的研究表明, 脂肪组织是MSCs的另一个来源^[12]。脂肪来源的干细胞(ASCs)来源于脂肪组织中非脂肪细胞即间充质血管成分(SVF)。无论体外还是体内实验均证明ASCs能诱导分化成多种细胞系, 包括脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、神经细胞、内皮细胞及肝细胞。经研究, 三种来源的间充质干细胞(MSC), 即骨髓来源的间充质干细胞(BM-MSC)、脐带血来源的间充质干细胞(UCB-MSC)、脂肪来源的间充质干细胞(AD-MSC)相比较, ASC在分离成功率、培养周期、增殖力以及分化能力方面占有优势^[13], 并且由于资源丰富、取材方便、易实行自体移植。因此, ASCs成为我们实验的首选成体干细胞资源。恒河猴属非人灵长类动物, 与人同源性较高, 其实验结果为今后可能应用于临床提供了更为可靠的依据, 故我们选用恒河猴大网膜脂肪组织进行ASCs分离培养, 取材方便, 且细胞数量较多, 增殖周期短, 约4~5 d即可长满培养瓶底。分离培养的ASCs在体外可传代培养8代左右, 后慢慢出现老化。电镜检测结果显示ASCs胞内细胞器丰富, 且细胞核不规则, 表面绒毛较多, 具有原始细胞的一系列特征。多能性基因通常只在多能干细胞中表达, 在分化细胞中不表达。在不同发育阶段, 表达量受到特异性的调控。RT-PCR结果显示, ASC表达Nanog、Sox-2和C-myc, 不表达Oct-4。分析Oct-4主要表达于全能性的ES细胞, 且与细胞未分化表型密切相关, 在脂肪间充质干细胞中可能不表达。

我们假设内源性转录因子的表达能够激活ASCs向神经元细胞分化的信号途径, 从而在外源性化学诱导微环境中进一步分化为神经元细胞。重组腺病毒作为基因递送载体具有载体容量大、安全、遗传毒性较低等特点, 因此是基因治疗的理想选择, 也是向ASCs中导入外源性转录因子的理想载体。实时定量PCR实验结果表明, 恒河猴脂肪间充质干细胞(rASCs)中不转录内源性的Neurturin, 我们推测ASCs中不具备表达和分泌Neurturin的相关酶类, 故我们将外源性NTN导入rASCs中, 发挥内源性诱导作用。一方面, 在rASCs胞内表达的NTN可以激活神经元分化信号; 另一方面, 分泌出rASCs胞外的NTN能够对诱导出来的神经元细胞起到营养保护作用, 维持其生存。实验结果表明培养出的恒河猴脂肪间充质干细胞(rASCs), 经腺病毒Ad-NGF-NTN感染后能够在细胞中得到很好的表达并分泌至胞外, 分泌出的蛋白质Neurturin具有良好的生物学活性, 能够使鸡胚背根神经节长出轴突, 营养保护胎鼠中脑神经元。在内源性结合外源性诱导作用下, rASCs能够向NSE表达阳性的神经元样细胞分化。当然, 该诱导方案还值得我们进一步深入探索, 得出的实验结果为下一步将要开展的脂肪干细胞诱导后移植治疗帕金森氏病动物实验打下了良好的基础。

参考文献 (References)

- 1 Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 57-87.
- 2 Hall, VJ. Embryonic stem cells and Parkinson's disease: Cell transplantation to cell therapy. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37(3): 163-72.
- 3 Li H, Ma Y, Su T, Che Y, Dai C, Sun M. Expression, purification, and characterization of recombinant human neurturin secreted from the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2003; 30(1): 11-7.
- 4 Kordower JH, Herzog CD, Dass B, Bakay RA, Stansell J 3rd, Gasmi M, *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): 706-15.
- 5 王文举, 孙茂盛, 严敏, 李鸿钧. Neurturin嵌合神经营养因子重组腺病毒的构建及体外活性测定. *中国生物工程杂志* 2010; 30(9): 7-12.
- 6 Zuk PA, Zuh M, Ashjian P, de Uqarte DA, Huang JI, Mizuno H, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
- 7 Schaffler A, Buchler C. Concise review: Adipose tissue-derived

- stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 818-27.
- 8 Morizane A, Darsakia V, Guloglu MO, Hjalt T, Carta M, Li JY, *et al.* A simple method for large-scale generation of dopamine neurons from human embryonic stem cells. *J Neurosci Res* 2010; 88(16): 3467-78.
- 9 Li HJ, Ma YB, Su T, Dai C, Sun M. Expression, purification and characterization of recombinant human neurturin secreted from the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expres Purif* 2003; 30(2): 11-7.
- 10 Li HJ, He ZL, Su T, Ma YB, Lu SY, Dai C, Sun MS. Protection of nigrostriatal dopaminergic neurons by recombinant neurturin in a rhesus monkey model of Parkinson's disease. *Neurol Res* 2003; 25(3): 263-7.
- 11 Oiwa Y, Yoshimura R, Nakai K, Itakura T. Dopaminergic neuroprotection and regeneration by neurturin assessed by using behavioral, biochemical and histochemical measurements in a model of progressive Parkinson's disease. *Brain Res* 2002; 947(2): 271-83.
- 12 Schaffler A, Buchler C. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 818-27.
- 13 Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Biebacka K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-301.

The Expressing and Inducing Activity of Chimeric Neurturin in Rhesus Adipose Stem Cells

Zhou Yan, Sun Maosheng, Li Hongjun*, Wang Wanpu, Xie Tianhong

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract In this study, we have shown that forced expressions of chimeric Nerve growth factor (NGF)/Neurturin (NTN) in adult rhesus adipose mesenchymal stem cells (rASCs) facilitate dopaminergic neuron differentiation following adenovirus vector transduction *in vitro*. The repair potential of ASC-NTN in gene therapy in Rhesus model of Parkinson's disease will be sought in the further work. In this study, rhesus ASCs were exposed to a recombinant chimeric NGF/NTN adenovirus which constructed and conserved in this lab expressing the NTN. The expression and location of chimeric NGF/NTN could be identified using RT-PCR, immunofluorescence staining and ELISA technology. rASCs were induced in the microenvironment combined with other chemical inducer. We detected the NTN transcripts in rASCs. Expression product could be secreted into the extracellular. The culture of dorsal root ganglia of chick embryo test had indicated that Neurturin secreted by rASCs had positive biological activity in nervous ramification forming. The ventral mesencephalic neurons of embryo rat survived with chimeric Neurturin in the culture. rASCs are able to differentiate into neuron like cells involving exogenous and endogenous factors. Our results demonstrated that rhesus adipose mesenchymal stem cells were able to specifically differentiate into neuron like cells by a mechanism involving NTN of the neuron developmental pathway when infected with Ad-NGF/NTN cultured in an appropriate exogenous chemical microenvironment. The operation of rASCs-NTN transplantation in Rhesus Parkinson's disease model would be researched in the future based on this work.

Key words Neurturin; rASCs; recombinant adenovirus; *in vitro* activity; Parkinson's disease

Received: August 26, 2011 Accepted: October 19, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30971003), the Key Basic Research Project of Yunnan Province (No.2007C0012Z) and the Research Fund for Doctor Innovation of Beijing Union Medical College

*Corresponding author. Tel: 86-871-8335391, E-mail: lihj6912@hotmail.com