

CCR5基因转染对骨髓源神经干细胞生物学行为的影响

胡 昱 郝海光 张晓丹 赵 丹 孙 东 杨静娴*

(辽宁中医药大学药学院, 大连 116600)

摘要 骨髓源神经干细胞(bone marrow-derived neural stem cells, BM-NSCs)具有自我更新和分化为神经元与神经胶质细胞的潜能, 可用于修复治疗多种神经系统退变与损伤性疾病。但由于其表面缺乏趋化因子受体, 移植后向中枢病变部位迁移的速度较慢, 疗效欠佳。该研究构建了趋化因子受体CCR5基因, 并转染BM-NSCs, 用免疫荧光细胞化学法、流式细胞仪法及Boyden小室细胞趋化实验, 体外研究了CCR5高表达对BM-NSCs增殖、分化与迁移能力的影响。结果表明, CCR5高表达能显著增强BM-NSCs的趋化能力, 而不影响其自我更新和分化为神经元与神经胶质细胞的能力, 说明其植入体内后可保持细胞替代与神经修复作用, 并能快速大量迁移到病灶部位, 显著增强疗效。

关键词 骨髓源神经干细胞; 趋化因子受体CCR5; 增殖; 分化; 迁移

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一类具有自我更新和神经系分化潜能的细胞, 能分化为神经元和神经胶质细胞, 替代修复损伤的神经组织, 为多种神经系统退变与损伤性疾病的治疗带来了希望^[1]。但目前用于移植的NSCs主要来源于胚胎或成体动物的脑组织, 取材困难、损伤较大, 胚胎来源的NSCs无法回避免疫排斥及道德伦理等问题, 降低了临床使用的可行性。目前, 寻找取材安全方便、来源丰富稳定且能快速有效发挥治疗作用的新型神经干细胞具有重要的意义。

骨髓间充质干细胞具有较强的增殖与分化能力, 在一定条件下可分化为神经干细胞^[1-2], 且取材容易, 可直接抽取病人自体骨髓、经体外分选而获得, 无免疫原性, 因而日渐受到人们的重视。本研究室已从成年动物骨髓间充质干细胞中成功诱导培养出神经干细胞, 并证实该骨髓源NSCs(bone marrow-derived NSCs, BM-NSCs)与脑源NSCs具有相同的增殖分化与神经修复能力, 移植入实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)动物模型脑内后可产生相同程度的细胞替代与免疫调节作用^[3]。但由于BM-NSCs表面缺乏趋化因子受体, 不能与中枢神经系统炎症部位的趋化因子产生有效的趋化反应, 因此移植后向中枢病变部位迁移的速度较慢, 需20~30 d才能到达病变部

位^[3-6], 起效缓慢, 疗效欠佳。

为了提高BM-NSCs的迁移能力以增强治疗效果, 本研究构建了趋化因子受体CCR5质粒, 并转染BM-NSCs, 体外研究了CCR5高表达对BM-NSCs增殖、分化与迁移能力的影响, 为其能成为集细胞替代与基因治疗为一体的理想种子细胞提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 C57BL/6小鼠购于大连医科大学实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(辽)2008-0002。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12培养基和B27为Gibco公司产品; 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及趋化因子为Peptide公司产品; 磁性细胞分选仪(QuadroMACS™ Separator)、系别细胞去除试剂盒(Lineage Cell Depletion Kit)和抗CD117微珠标记抗体[CD117(c-kit) Microbeads]为Miltenyi Biotec产品; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromouracil deoxyri-

收稿日期: 2012-04-24 接受日期: 2012-05-30

国家自然科学基金(No.81173580)、辽宁省自然科学基金(No.2011-02144)和沈阳市科技专项资金(No.F11-264-1-42)资助项目

*通讯作者。Tel: 0411-87586009, E-mail: jingxianyang@yahoo.com

boside, BrdU)、维甲酸(RA)和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)为Sigma产品;小鼠抗Nestin、BrdU、 β -tubulin、GalC、GFAP抗体、Boyden小室及Diff-Quik staining kit为BD产品;Cy3及Cy5-标记种属特异性免疫荧光二抗为Jackson ImmunoResearch Lab产品;Trizol、LipofectamineTM 2000、限制性内切酶*Bam*H I、*Hind* III和T4 DNA连接酶为Invitrogen产品;逆转录病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP(Catalog No.CD511B-1, SBI)为SBI公司产品。

1.2 方法

1.2.1 骨髓源神经干细胞(BM-NSCs)的生成、培养与鉴定 从4~6周龄C57BL/6小鼠的腓骨中提取全骨髓细胞,按本研究室报道方法^[3]用磁性细胞分选仪(QuadroMACSTM Separator)和系别细胞去除试剂盒(Lineage Cell Depletion Kit)及抗CD117微珠标记抗体[CD117(c-kit) Microbeads]筛选出间充质干细胞[lineage⁻/CD117(c-kit)⁺],以 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 密度置于含有20 ng/mL bFGF、20 ng/mL EGF和2% B27的DMEM/F12中培养,每隔3天换液一次。3~5周后诱导形成神经干细胞球,取出细胞球,机械性分散为单个细胞、传代培养,第3~5代细胞用于以下实验。取第5代BM-NSCs球及打散的单个细胞,以抗小鼠Nestin抗体进行免疫细胞化学染色、倒置荧光显微镜检测鉴定^[3,7]。

1.2.2 构建CCR5和GFP共表达质粒、转染BM-NSCs及CCR5表达的检测 (1)构建CCR5和GFP共表达质粒:从C57BL/6小鼠腹腔巨噬细胞中提取总RNA;以此RNA为模板,用RT-PCR法扩增CCR5基因片段(根据GenBank中报道的小鼠CCR5 mRNA序列设计特异性引物,上游引物:5'-CTG GCC ATC TCT GAC CTG TTT TTC CTC C-3',下游引物:5'-CAG CCC TGT GCC TCT TCT TCT CAT TTC-3',并在两端分别引入*Bam*H I和*Hind* III酶切位点);扩增产物经凝胶纯化回收后,克隆入pMD18-T载体;再转化大肠杆菌感受态细胞,挑取经Ampr筛选的阳性克隆,置于LB培养基中振荡培养16 h,提取质粒,用限制性内切酶*Bam*H I、*Hind* III酶切,PCR法鉴定此重组质粒(命名为pT-CCR5),并测序;再将此pT-CCR5连接到携带绿色荧光蛋白(GFP)基因的反转录病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP中,构建CCR5-GFP共表达载体。用*Bam*H I、*Hind* III同时分别双酶切pT-CCR5

和病毒载体,再回收目的基因片段和载体片段,用T4 DNA连接酶连接,提取质粒,酶切鉴定此重组质粒(命名为L.v.-CCR5,共表达CCR5-GFP),证实CCR5基因片段正确插入载体中;以原载体(L.v.-GFP,只表达GFP)^[7]作为对照。(2)CCR5基因转染BM-NSCs及CCR5表达的检测:用Lipofectamine 2000介导构建的L.v.-CCR5-GFP转染293T包装细胞,对照组转染L.v.-GFP。培养293T细胞,24 h后荧光显微镜下观察两组细胞都呈现绿色荧光。分别收集72 h内上述293T细胞培养液上清(含病毒),离心、浓缩并检测病毒滴度;用浓缩的病毒上清转染第5代BM-NSCs;转染3 d后用免疫细胞化学法检测CCR5在BM-NSCs中的表达;再将两组转基因BM-NSCs分散成单细胞,PBS洗3次,分别加入anti-nestin和anti-CCR5抗体,4 °C孵育20 min后用流式细胞仪检测CCR5的表达^[3,7]。

1.2.3 CCR5基因转染对BM-NSCs增殖与分化能力的影响检测 (1)BM-NSCs增殖能力检测:将基因转染5 d后的CCR5-BM-NSCs和对照组GFP-BM-NSCs分别以 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于含DMEM/F12、bFGF、EGF和B27的96孔板中,每隔3 d换液一次。至第5, 9, 13, 16 d时,分别取出每孔神经干细胞球,吹打分散为单细胞,用血球计数器计数每孔细胞数,计算扩增倍数,绘制生长曲线,每组至少计数7孔细胞^[8-9];再将两种BM-NSCs以 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于上述增殖培养基中,加入BrdU(终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$),培养48 h后用BrdU免疫抗体染色,定量分析BrdU⁺细胞数占细胞总数的百分率^[9-10]。(2)BM-NSCs分化能力检测:将上述两种BM-NSCs单细胞以 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于含有15 $\mu\text{g/mL}$ RA和20 $\mu\text{g/mL}$ BDNF的DMEM/F12中诱导分化。两周后,用免疫细胞化学染色鉴定分化细胞中 β -tubulin(神经元)、GalC(少突胶质细胞)、GFAP(星形胶质细胞)及Nestin(未分化NSCs)等特异性蛋白的表达^[2,6]。

1.2.4 免疫细胞化学检测 体外培养的BM-NSCs用4%的多聚甲醛固定15 min,PBS洗涤2次,用0.03% Triton X-100透化30 min,5%血清封闭1 h后,分别加入小鼠抗Nestin、CCR5、BrdU、 β -tubulin、GalC、GFAP等一抗,4 °C过夜,PBS洗涤2次后再分别加入相应的二抗,室温1 h,PBS洗涤2次,用含1% DAPI的封片剂核染及封片,荧光显微镜下观察摄片^[3,7]。

1.2.5 BM-NSCs的趋化性实验 微孔滤膜将Boyden小室分隔成上下两部分,将转染后5 d的CCR5-

BM-NSCs细胞悬液100 μL (含 1.0×10^5 细胞)加入上室,将含不同浓度趋化因子RANTES(0~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的培养基600 μL 加入下室,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育5 h。细胞沿着梯度穿过膜孔,粘附在膜的下面。迁移结束后取出滤膜稍稍水洗,用棉签擦去滤膜上表面未穿膜的细胞,Diff-Quik染色,显微镜下计数10个不同视野的穿膜细胞数,取平均值^[11]。

1.2.6 统计学处理 所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 10.0软件进行分析,组间比较用Student's *t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠BM-NSCs的生成与鉴定

成年小鼠骨髓间充质干细胞体外经bFGF和EGF诱导3~5周后,形成多个大小不等的神经干细胞球(每球约含20~200个NSCs),随着细胞数目不断增加,细胞球逐渐增大并悬浮起来(图1A)。取出细胞球,机械性吹打分散为单细胞,传代培养。图1B为第5代BM-NSCs球及分散的单细胞,免疫细胞化学染色显示其表达高水平的神经干细胞特异性标志蛋白Nestin(绿色),证明为未分化NSCs。

2.2 CCR5在BM-NSCs中表达的检测

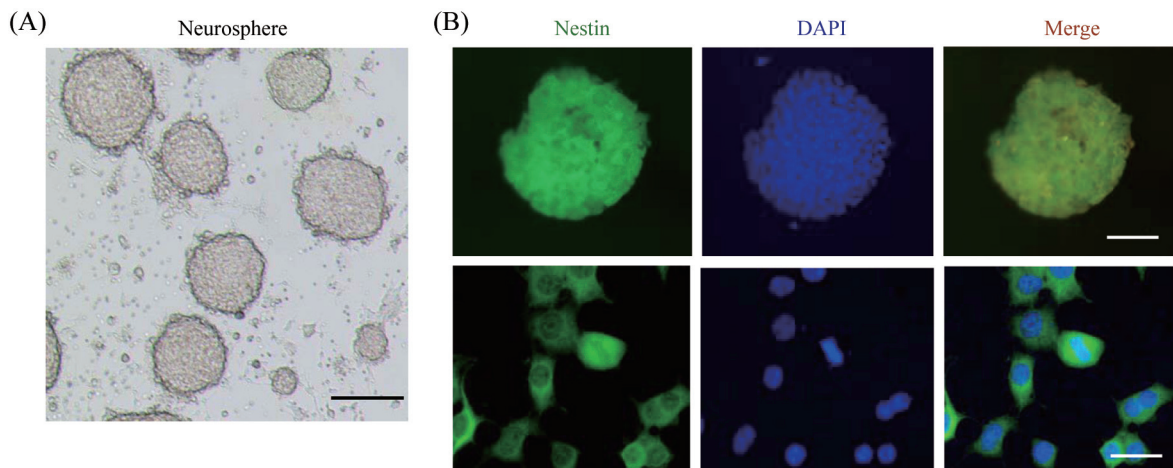
基因转染3 d后的BM-NSCs,用免疫细胞化学

法检测,结果显示,转染了CCR5-GFP共表达载体的CCR5-BM-NSCs和转染了原载体(含GFP)的对照组GFP-BM-NSCs都显著表达GFP(绿色),说明两组细胞都被病毒质粒有效转染;但CCR5(红色)只在CCR5-BM-NSCs中显著表达,而在对照组GFP-BM-NSCs中几乎不表达(图2A);流式细胞仪检测结果显示,在CCR5-BM-NSCs组中,Nestin⁺/CCR5⁺细胞数高达82.5%,而在对照组中只有7.1%(图2B),说明CCR5-BM-NSCs能高表达CCR5。

2.3 CCR5基因转染不影响BM-NSCs的增殖与分化能力

基因转染5 d后开始绘制CCR5-BM-NSCs、对照组GFP-BM-NSCs和未转基因的Mock-BM-NSCs三组细胞的生长曲线,结果表明三组细胞的扩增能力无显著差异($P > 0.05$,图3A);再将BrdU加入培养中标记增殖细胞,结果可见三组细胞中BrdU⁺细胞百分率亦无明显差异($P > 0.05$,图3B)。以上结果说明,CCR5基因转染对BM-NSCs的增殖能力无影响。

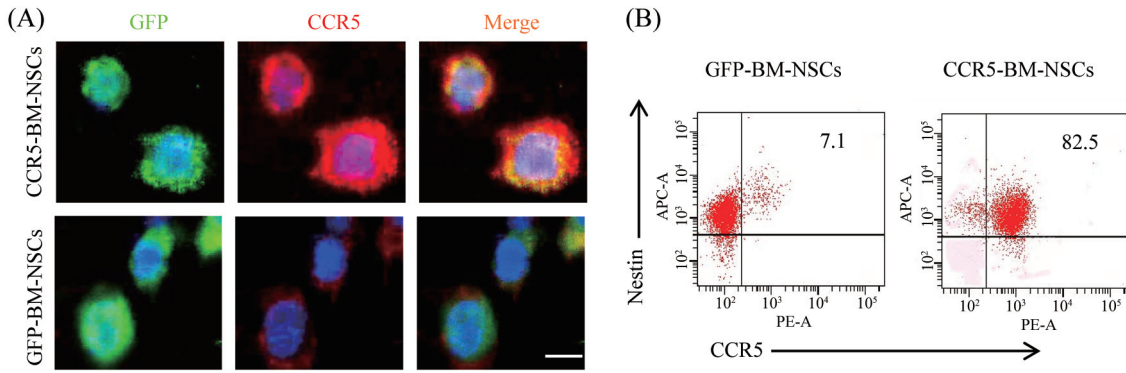
为检测CCR5高表达对BM-NSCs分化能力有无影响,将上述三组细胞接种于分化培养基中诱导分化。两周后用免疫细胞化学法检测,结果显示,三组BM-NSCs都分化为 β -tubulin⁺神经元、GalC⁺少突胶质细胞、GFAP⁺星形胶质细胞,少部分仍维持于Nestin⁺未分化状态(图4A);定量分析结果表明,三组



A: 原代BM-NSCs球,由成年小鼠骨髓间充质干细胞诱导培养4周后形成,标尺=50 μm ; B: 免疫细胞化学法鉴定,第5代BM-NSCs球(上排)及单细胞(下排),以抗小鼠Nestin抗体进行免疫染色、荧光显微镜检测;绿色: Nestin⁺,蓝色: DAPI⁺细胞核;标尺(上排)=25 μm ,标尺(下排)=15 μm 。

A: primary neurosphere derived from bone marrow mesenchymal stem cells of adult mice, scale bar=50 μm ; B: identification of BM-NSCs by immunocytochemistry staining, neurospheres(upper row) and single NSCs(lower row) at 5th passage were positive for nestin(green). Nuclei were stained with DAPI(blue). Scale bar=25 μm (upper), and 15 μm (lower).

图1 骨髓源神经干细胞(BM-NSCs)的生成与鉴定
Fig.1 Generation and characterization of BM-NSCs

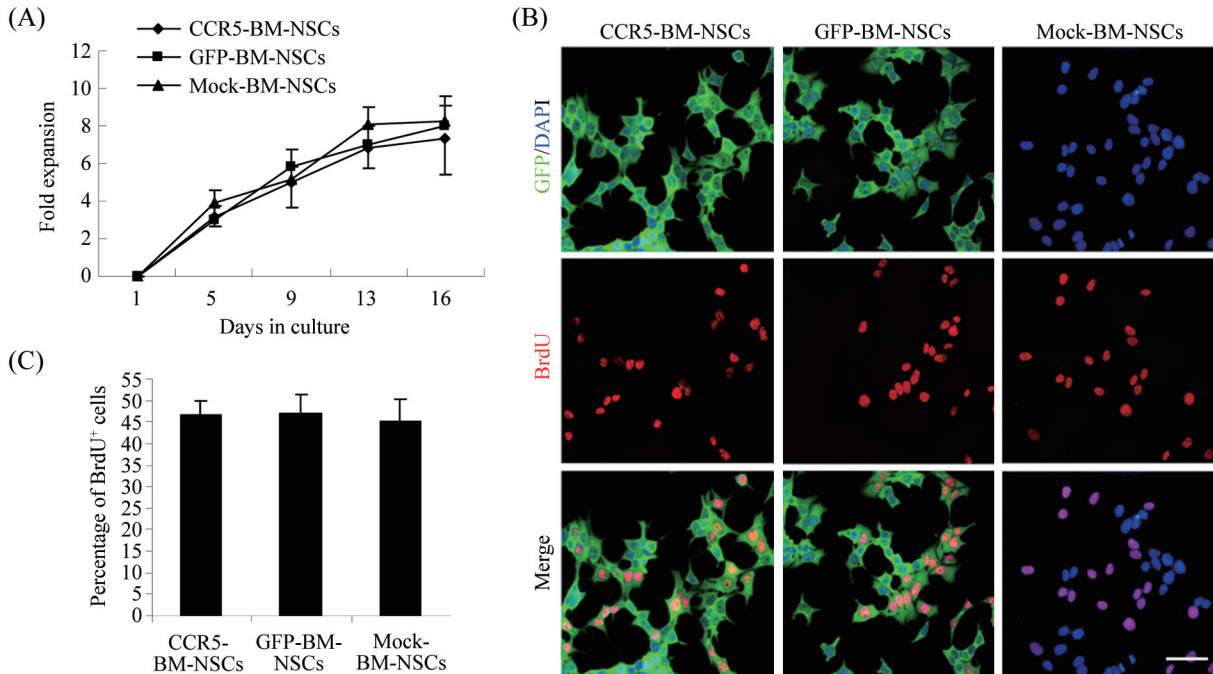


A: 免疫细胞化学染色, 绿色: GFP⁺; 红色: CCR5⁺; 蓝色: DAPI⁺细胞核; 标尺=10 μm; B: 流式细胞仪法检测Nestin⁺/CCR5⁺细胞百分率。A和B分别代表三次重复实验中的一次。

A: immunocytochemistry staining, green: GFP⁺; Red: CCR5⁺; Blue: DAPI⁺ nuclei; Scale bar=10 μm; B: percentages of Nestin⁺/CCR5⁺ cells were analyzed by flow cytometry. One representative experiment of three in A and B are shown.

图2 CCR5在基因转染BM-NSCs中表达的检测

Fig.2 Identification of CCR5 expression in CCR5-transduced BM-NSCs



A: 生长曲线(n=7); B: BrdU标记增殖细胞, 绿色: GFP⁺; 红色: BrdU⁺; 蓝色: DAPI⁺细胞核; 标尺=25 μm; C: 定量分析各组BrdU⁺细胞百分率(n=5)。

A: growth curve(n=7); B: *in vitro* BrdU labeling. Green: GFP⁺; Red: BrdU⁺; Blue: DAPI⁺ nuclei; Scale bar=25 μm; C: BrdU incorporation was quantified as the percentage of BrdU-positive cells to DAPI-labelled nuclei(n=5).

图3 CCR5基因转染BM-NSCs增殖能力的检测

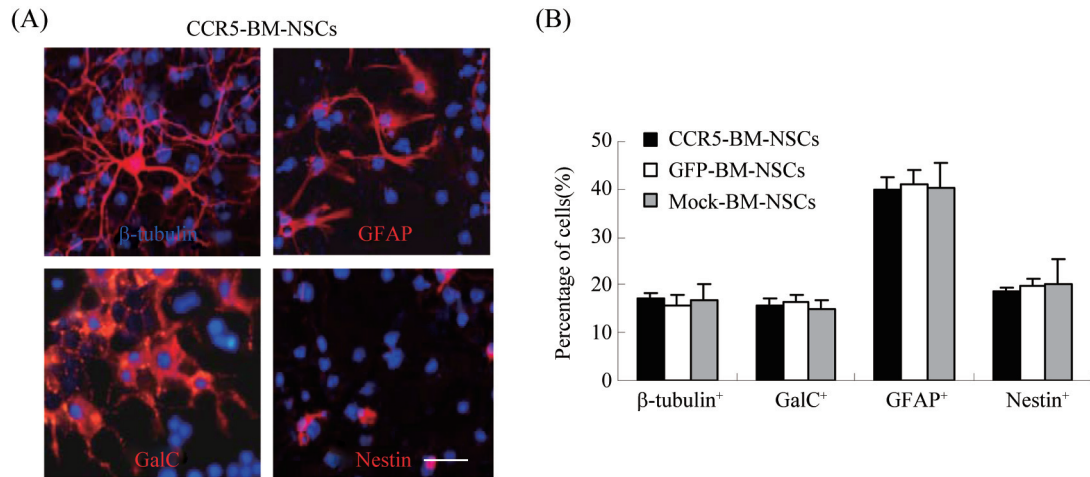
Fig.3 Assay for self-renewal capacity of CCR5-transduced BM-NSCs

BM-NSCs的分化率无明显差异($P>0.05$, 图4B), 说明 CCR5转染对BM-NSCs的分化无影响。

2.4 CCR5高表达增强了BM-NSCs的迁移能力

为检测CCR5高表达对BM-NSCs趋化能力的影响, 本研究将基因转染5 d后的CCR5-BM-NSCs (1.0×10^5 细胞)置于48孔Boyden小室的上室, 趋化因

子RANTES($0 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}$)置于下室。迁移5 h后取出滤膜染色(穿膜细胞为蓝色, 图5A), 并定量分析穿膜细胞百分率。结果表明, CCR5-BM-NSCs组的细胞迁移率显著高于对照组GFP-BM-NSCs, 并呈RANTES剂量依赖性(图5B), 说明高表达的CCR5具有生物学功能, 能显著增强BM-NSCs向趋化因子迁移的能力。

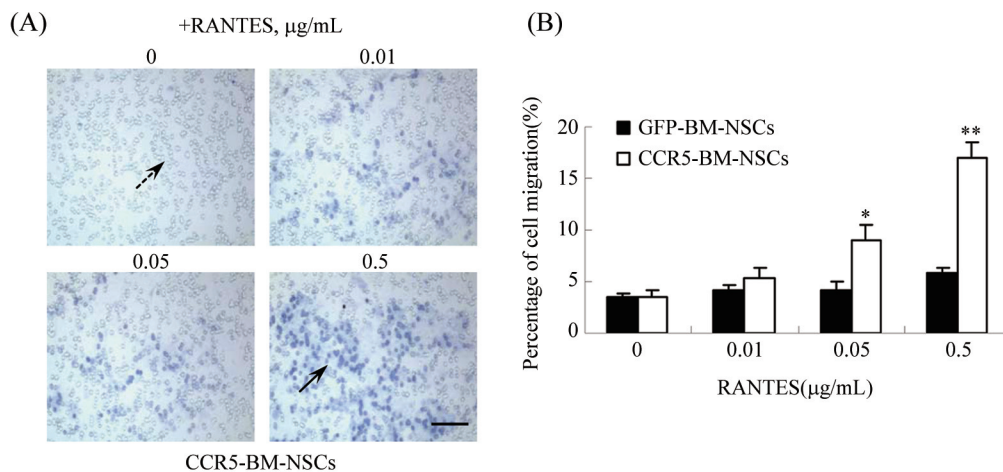


A: 用免疫细胞化学染色鉴定分化细胞中 β -tubulin⁺神经元、GalC⁺少突胶质细胞、GFAP⁺星形胶质细胞及Nestin⁺未分化NSCs等特异性蛋白的表达(红色);蓝色: DAPI⁺细胞核;标尺=25 μ m; B: 定量分析各组分化细胞百分率。

A: *CCR5*-BM-NSCs differentiated into neurons(β -tubulin⁺), oligodendrocytes(GalC⁺), astrocytes(GFAP⁺) or remained undifferentiated NSCs(Nestin⁺) as verified by immunostaining. Red: neural cell markers; Blue: DAPI. Scale bar=25 μ m; B: percentages of NSCs differentiated into these neural cells.

图4 *CCR5*基因转染BM-NSCs分化能力的检测

Fig.4 Assay for differentiation of *CCR5*-BM-NSCs



A: *CCR5*-BM-NSCs体外趋化实验;实线箭头:穿膜细胞;虚线箭头:膜孔;标尺=50 μ m; B: 细胞迁移定量分析,数据以平均数 \pm 标准差表示, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *CCR5*-BM-NSCs组与GFP-BM-NSCs组比较。

A: chemotaxis assay of *CCR5*-BM-NSCs *in vitro*. Solid arrow: cells(blue); Dash-line arrow: holes in membrane. Scale bar=50 μ m; B: quantitative analysis of cell migration. Data are represented as mean \pm S.D., $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, comparison between *CCR5*-BM-NSCs and GFP-BM-NSCs.

图5 *CCR5*基因转染BM-NSCs的体外趋化实验

Fig.5 Chemotaxis assay for *CCR5*-transduced BM-NSCs

3 讨论

NSCs具有较强的自我更新能力和神经系分化潜能,可分化为神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞等,修复替代缺损的神经组织,用于治疗阿尔茨海默病、帕金森氏病、多发性硬化和脊髓损伤等神经系统难治性疾病。但这些细胞多分离自胚胎组织

或成体动物的脑组织,取材困难、损伤较大,有免疫排斥及道德伦理等问题,降低了临床治疗的可行性。因此,学者们一直从脑外组织中寻求分离扩增NSCs的新方法^[3,7]。近年来,本研究室已从成年小鼠骨髓细胞中成功诱导培养出NSCs(BM-NSCs),经与脑源NSCs比较研究,证实两者具有相同的增殖和分化能

力, 移植入多发性硬化症动物模型EAE脑内后可产生相同程度的治疗作用^[3]。BM-NSCs可取材于病人自体骨髓, 相较于脑源或胚胎源NSCs取材容易, 来源丰富, 无免疫原性, 是一个理想的NSCs新来源^[1,3]。

但本室在实验研究中发现, BM-NSCs静脉移植入EAE动物体内后, 需20~30 d才能到达脑内病变部位^[3], 起效缓慢, 疗效有限。其主要原因是BM-NSCs表面缺乏趋化因子受体, 不能向炎症部位的趋化因子快速迁移^[4-7,12]。在多发性硬化症急性期, CNS炎症部位产生高水平趋化因子MIP-1 α/β 、RANTES等, 与炎症细胞表面的趋化因子受体CCR5结合, 引起炎症细胞的聚集与激活^[6,12-13]。但NSCs表面只表达微量的CCR5, 不能向炎症部位快速、大量迁移^[4-6,12-13]。因此我们推测, 将CCR5基因转入BM-NSCs, 使其高表达CCR5, 可能加快迁移速度、缩短起效时间, 从而增强疗效。

为验证此假设, 我们筛选出成年小鼠骨髓间充质干细胞, 体外经bFGF和EGF诱导形成神经干细胞球(图1A), 免疫细胞化学染色显示其表达高水平的神经干细胞特异性标志蛋白Nestin(图1B), 证明为未分化NSCs。为增强此BM-NSCs的迁移能力, 我们构建了CCR5-GFP共表达载体并转染了BM-NSCs, 3 d后免疫荧光染色显示其高表达CCR5(图2A); 流式细胞仪检测结果也显示其中Nestin⁺/CCR5⁺细胞数高达82.5%, 而对照组只有7.1%(图2B)。体外细胞增殖与分化实验表明, CCR5-BM-NSCs和对照组GFP-BM-NSCs及Mock-BM-NSCs的生长曲线及BrdU掺入率均无明显差异, 分化为神经元和胶质细胞的比率也基本相同, 说明CCR5基因转染不影响BM-NSCs的增殖与分化能力。Boyden小室细胞趋化实验结果表明, CCR5-BM-NSCs组的细胞迁移率显著高于对照组GFP-BM-NSCs, 并呈RANTES剂量依赖性(图5A和图5B), 说明过表达CCR5能显著增强BM-NSCs向趋化因子迁移的能力。

综上所述, CCR5高表达能显著增强BM-NSCs的趋化能力, 而不减弱其自我更新和神经系分化潜能, 说明植入体内后不仅可保持其原有的细胞替代与神经修复作用, 而且可快速大量地向病灶部位的迁徙, 显著增强治疗作用, 是治疗多发性硬化症及其

他多种神经系统疾病理想的种子细胞, 具有重要的开发应用价值。

参考文献 (References)

- 1 Yang J, Rostami A, Zhang GX. Cellular remyelinating therapy in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009; 276(1/2): 1-5.
- 2 Song S, Zhang H, Cuevas J, Sanchez-Ramos J. Comparison of neuron-like cells derived from bone marrow stem cells to those differentiated from adult brain neural stem cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16(5): 747-56.
- 3 Yang J, Yan Y, Ciric B, Yu S, Guan Y, Xu H, *et al.* Evaluation of bone marrow- and brain-derived neural stem cells in therapy of central nervous system autoimmunity. *Am J Pathol* 2010; 177(4): 1989-2001.
- 4 Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, *et al.* Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003; 422(6933): 688-94.
- 5 Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, *et al.* Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 2005; 436(7048): 266-71.
- 6 Zhang GX, Baker CM, Kolson DL, Rostami AM. Chemokines and chemokine receptors in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2000; 6(1): 3-13.
- 7 Yang J, Jiang Z, Fitzgerald DC, Ma C, Yu S, Li H, *et al.* Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. *J Clin Invest* 2009; 119(12): 3678-91.
- 8 Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, *et al.* Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 19): 4411-22.
- 9 Goffin D, Aarum J, Schroeder JE, Jovanovic JN, Chuang TT. D1-like dopamine receptors regulate GABAA receptor function to modulate hippocampal neural progenitor cell proliferation. *J Neurochem* 2008; 107(4): 964-75.
- 10 Zhao M, Janson Lang AM. Bromodeoxyuridine infused into the cerebral ventricle of adult mice labels nigral neurons under physiological conditions—a method to detect newborn nerve cells in regions with a low rate of neurogenesis. *J Neurosci Methods* 2009; 184(2): 327-31.
- 11 Man S, Ubogu EE, Williams KA, Tucky B, Callahan MK, Ransohoff RM. Human brain microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells differentially facilitate leukocyte recruitment and utilize chemokines for T cell migration. *Clin Dev Immunol* 2008; 2008: 384982.
- 12 Segal BM. CNS chemokines, cytokines, and dendritic cells in autoimmune demyelination. *J Neurol Sci* 2005; 228(2): 210-4.
- 13 Aloisi F, Columba-Cabezas S, Franciotta D, Rosicarelli B, Magliozzi R, Reynolds R, *et al.* Lymphoid chemokines in chronic neuroinflammation. *J Neuroimmunol* 2008; 198(1/2): 106-12.

Effects of *CCR5* Gene Transfection on Biological Behavior of Bone Marrow Derived Neural Stem Cells

Hu Yu, Hao Haiguang, Zhang Xiaodan, Zhao Dan, Sun Dong, Yang Jingxian*

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract Bone marrow-derived neural stem cells (BM-NSCs) possess the self-renewal and neural differentiation potential, which can be used to repair a variety of nervous system degeneration and traumatic diseases. However, the rate of BM-NSCs migrate to the inflammatory sites was relatively slow and correlated with a moderately slow and limited clinical benefit. Lack of, or low expressing of particular chemokine receptors on NSCs could be an important factor underlying the slow migration of NSCs. To enhance the therapeutic effect of BM-NSCs, we constructed chemokine receptor *CCR5* gene and transduced it into BM-NSCs, then assessed their capacity of proliferation, differentiation and migration with immunocytochemistry staining, flow cytometry and chemotaxis assay. It showed that overexpression of *CCR5* enhanced chemotactic capacity of BM-NSCs significantly without affecting their ability of self-renew and differentiate into neurons and glial cells, indicating that gene-modified cells can not only maintain their potential of cell replacement and neural repair, but also possess rapid and mass migration to the lesion site, significantly enhance therapeutic efficacy.

Key words bone marrow-derived neural stem cells(BM-NSCs); chemokine receptor *CCR5*; proliferation; differentiate; migration

Received: April 24, 2012 Accepted: May 30, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81173580), Natural Science Foundation of Liaoning Province (No.2011-02144) and Special Fund Project for Technology Innovation of Shenyang City (No.F11-264-1-42)

*Corresponding author. Tel: 86-411-87586009, E-mail: jingxianyang@yahoo.com