

慢病毒介导KCNMA1体外转染大鼠间充质干细胞及功能测定

何 跃 肖明朝* 聂永华 何卫阳 秦国东 罗家宇

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

摘要 间充质干细胞具有高度增殖、自我更新和多向分化的潜能。大电导钙离子激活的钾通道M亚族 α 亚基(potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1, KCNMA1)介导细胞内 K^+ 的外流,使细胞膜超极化,降低细胞的兴奋性。该研究通过制备KCNMA1重组慢病毒载体和空白对照慢病毒载体,将其转染至间充质干细胞内,测定转染复数值(MOI),并通过RT-PCR和Western blot比较转染前后KCNMA1的表达变化情况,检测转染前后细胞微环境中电解质浓度变化。结果成功包装了KCNMA1慢病毒载体和空白病毒载体并转染入干细胞内;含有目的基因的慢病毒转染间充质干细胞后,RT-PCR和Western blot提示KCNMA1过表达,且细胞微环境中 K^+ 浓度升高。证实成功地将含KCNMA1的慢病毒载体转染进入大鼠间充质干细胞内,并在细胞内过表达且发挥功能,为体内研究KCNMA1结合干细胞治疗相关疾病奠定了基础。

关键词 大电导钙离子依赖的钾通道M亚族 α 亚基;骨髓间充质干细胞;慢病毒

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是由Fridenstein等^[1]于1969年发现的来源于中胚层的成体干细胞,具有高度增殖、自我更新和多向分化的潜能。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)是来源于骨髓的干细胞,其免疫原性低,分离及培养相对简单。目前, MSCs已广泛应用于动物和临床试验中,包括骨或软骨损伤、心脏疾病、中枢神经系统损伤、肝损伤、脊髓损伤等方面^[2]。

KCNMA1编码表达细胞膜上的大电导钙离子激活的钾离子通道M亚族的 α 亚基(potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1, KCNMA1)^[3]。其单独表达时就能形成功能性离子通道,介导细胞内 K^+ 的外流,使细胞膜超极化,降低细胞的兴奋性^[4]。 α 亚基与 β 亚基协调组合形成大电导钙离子激活的钾离子通道复合体BKca($\alpha\beta 4$)。BKca通道广泛分布于哺乳动物多种组织细胞中。对于BKca通道功能的研究,主要集中在维持细胞内外 K^+ 、 Ca^{2+} 浓度平衡、调节细胞收缩、维持细胞膜电位等方面^[5]。

在勃起功能障碍(erecile dysfunction, ED)治疗研究方面, Bivalacqua等^[6]发现将体外扩增培养的BM-MSC通过海绵体注射的方法移植到老龄大鼠

阴茎海绵体组织内,能改善老龄大鼠的勃起功能,且BM-MSC在局部微环境的刺激下具有向内皮细胞及平滑肌细胞分化的潜能。Christ等^[7]将带有KCNMA1基因的质粒注射入动脉粥样硬化的猕猴阴茎组织中,猕猴的勃起功能及性功能明显提高。故本课题组希望将骨髓间充质干细胞和KCNMA1结合起来治疗ED等相关疾病。本课题组前期已经培养并鉴定了大鼠BM-MSCs^[8]。本实验拟构建KCNMA1慢病毒表达载体,体外转染BM-MSCs,研究转染前后BM-MSCs中KCNMA1的表达差异,为进一步转基因结合干细胞移植治疗相关疾病的体内实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

3~4周龄SPF级健康雄性SD大鼠购自重庆医科大学实验动物研究中心; LG-DMEM细胞培养基购自美国Hyclone公司; 胰蛋白酶、优质胎牛血清购自美国Gibco公司; 大鼠KCNMA1(GenBank序列NM_031828.1)慢病毒表达载体pLV.EX2d.null-CMV>KCNMA1-T2A-EGFP购自广州Cyagen公司(载体结构图见图1)。兔抗

收稿日期: 2012-08-01 接受日期: 2012-08-28

重庆市自然科学基金(No.2009BB5411)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-89012505, E-mail: xzm.2004@163.com

KCNMA1多克隆抗体购自美国Abcam公司;山羊抗兔的二抗购自北京中杉金桥生物工程公司;总RNA提取试剂Trizol(D9108S)、逆转录试剂盒Prime Script RT reagent Kit(DRR037S)、PCRMIX(D334A)、DL1 000 DNA Marker(D526A)购自大连宝生物工程有限公司;鼠抗 β -actin抗体、膜蛋白抽提试剂盒(P0033)、PMSF、BCA法蛋白定量试剂盒、凝胶配制试剂盒、ECL显影剂均购自碧云天生物技术研究所;PVDF膜、PBS、PCR引物购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;实验所需器材由重庆市神经病学重点实验室提供。

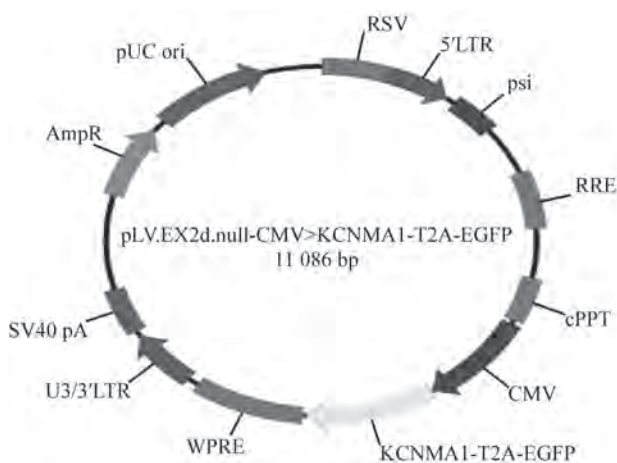


图1 *KCNMA1*载体结构图

Fig.1 *KCNMA1* plasmid carrier structure map

1.2 方法

1.2.1 慢病毒转染MSCs 按参考文献[8-9]的方法分离培养大鼠BM-MSCs细胞并传至第3代,复苏、消化、重悬并计数BM-MSCs细胞,每个12孔板接种 1×10^5 的细胞量,两板分别各接种5个孔。待细胞完全贴壁,细胞融合度达70%左右时,每孔换成500 μ L新鲜完全培养基。取Cyagen公司提供的慢病毒载体液,实验组(目的基因组)病毒滴度 7.2×10^7 TU/mL,对照组(空载体组)病毒滴度 8.1×10^7 TU/mL。实验组每孔分别加入10, 20, 40, 50, 60 μ L的含有目的基因的慢病毒液(Lenti-mKcnma1/hygro),对照组每孔分别加入2, 5, 10, 15, 20 μ L的空载体病毒液(Lenti-emGFP/hygro),充分摇匀后放入培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO_2)中过夜。16 h后去除含有病毒的旧培养液,并用PBS洗2遍,加入1 mL新鲜完全培养基后放入细胞培养箱中培养。48 h后,荧光显微镜下观察转染率,测出转

染效率最高时的转染复数值(multiplicity of infection, MOI)[当GFP表达率最高时, MOI=病毒颗粒数/细胞数=(病毒滴度 \times 病毒液体积)/细胞数]。

1.2.2 RT-PCR检测转染前后*KCNMA1*的表达情况 收集转染72 h的细胞,总RNA提取及反转录条件、步骤严格按照说明书操作。引物序列均采用上海生工生物工程技术有限公司设计合成。根据GenBank上报道的大鼠*KCNMA1*序列(NM_031828.1)设计引物,上游序列: 5'-TAC TTC GCT TCA GGA CAA GGA-3',下游序列: 5'-ACA ACC ACC ATC CCC TAA GTC-3',产物长度为550 bp;以 β -actin作为内参,上游序列: 5'-CAC CCG CGA GTA CAA CCT TC-3',下游序列: 5'-CCC ATA CCC ACC ATC ACA CC-3',产物长度为207 bp。*KCNMA1*的PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 59 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环30次;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。 β -actin的PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s,循环30次;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。反应结束后,所有PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色鉴定,应用BIO-RAD系统进行分析,保存图像。结果采用Quantity One软件进行图像分析。实验重复3次。mRNA指数(RI)=*KCNMA1* mRNA扫描值/ β -actin mRNA扫描值。

1.2.3 Western blot检测转染前后*KCNMA1*的表达情况 收集转染72 h的细胞,细胞膜蛋白及浆蛋白的提取严格按照说明书操作,用BCA法测定蛋白质浓度。配置不同浓度的SDS-PAGE \rightarrow 电泳 \rightarrow 转膜 \rightarrow 5%的脱脂奶粉封闭1.5 h \rightarrow 4 $^{\circ}$ C孵育一抗液过夜(稀释比例为1:1 000) \rightarrow TBS-T洗涤10 min \times 3次 \rightarrow 37 $^{\circ}$ C孵育二抗液(抗兔的二抗稀释比例为1:3 000) 1.5 h \rightarrow TBS-T洗涤10 min \times 3次 \rightarrow ECL化学发光、显影、定影,凝胶图像分析。用Quantity One软件进行数据分析。实验重复3次。蛋白指数(RI)=*KCNMA1*蛋白扫描值/ β -actin蛋白扫描值。

1.2.4 检测转染前后细胞微环境离子浓度变化 目的基因(*KCNMA1*)转染组、空载体转染组和未转染组细胞分别使用台盼蓝染色后在显微镜下计数,使三组细胞在培养瓶中的数量基本相同。分别保存转染后24, 48, 72 h的各組细胞培养液,并送重庆医科大学附属第一医院检验科检测细胞培养液中的 K^+ 、 Ca^{2+} 离子浓度。

1.3 统计学分析

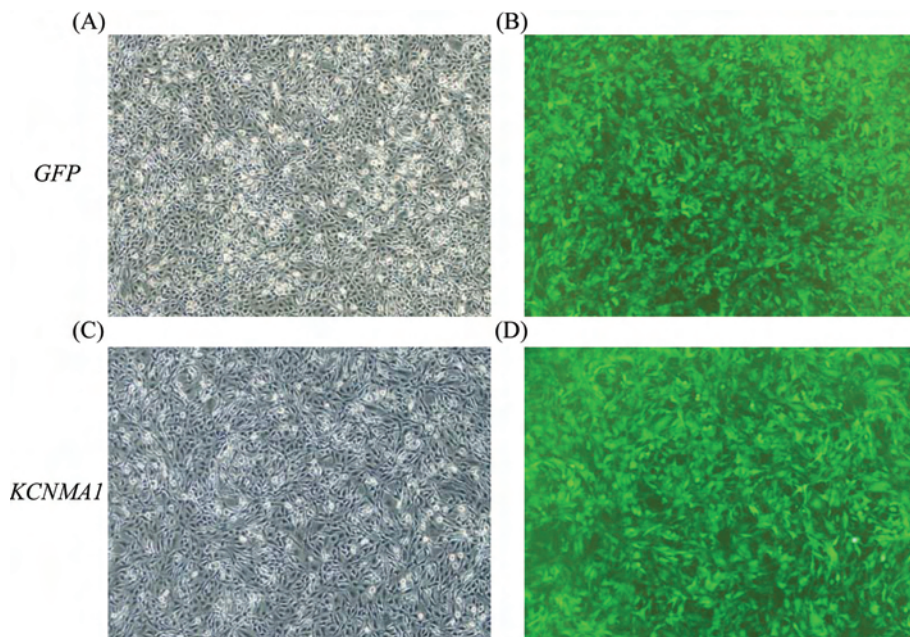
采用SPSS 19.0统计软件进行数据统计和分析。RT-PCR, Western blot, 细胞液 K^+ 、 Ca^{2+} 离子浓度的结果均采用独立样本的 t 检验。

2 结果

2.1 BM-MSCs-emGFP和BM-MSCs-mKCNMA1的MOI测定结果

细胞转染后48 h, 倒置荧光显微镜下观察病毒转染效率。空载体组中加入10 μ L慢病毒液的细胞转染效率及荧光强度最高, 结果见图2A和图2B; 目

的基因组中加入40 μ L慢病毒液的细胞转染效率及荧光强度最高, 结果见图2C和图2D。空载体组中15, 20 μ L慢病毒液处理的细胞转染效率及荧光强度与10 μ L慢病毒液处理的细胞比较不但没有增高, 细胞状态反而受到影响; 目的基因组中50, 60 μ L慢病毒液处理的细胞转染效率及荧光强度与40 μ L慢病毒液处理的细胞比较也没有增高, 细胞状态也同样受到影响。故细胞MOI的计算为 $MOI_{emGFP} = \text{病毒量} (10 \times 10^{-3} \times 8.1 \times 10^7) / \text{细胞数} (1 \times 10^5) = 8.1$, $MOI_{Kcnma1} = \text{病毒量} (40 \times 10^{-3} \times 7.2 \times 10^7) / \text{细胞数} (1 \times 10^5) = 28.8$ 。(目的基因组病毒滴度为 7.2×10^7 TU/mL, 空载体组病毒滴



A: 空载体转染后的细胞(10 μ L慢病毒液处理)光镜观察; B: 空载体转染后的细胞(10 μ L慢病毒液处理)荧光显微镜观察; C: 目的基因转染后的细胞(40 μ L慢病毒液处理)光镜观察; D: 目的基因转染后的细胞(40 μ L慢病毒液处理)荧光显微镜观察。

A: the empty vector(treated with 10 μ L lentivirus) transfected under the light microscope; B: the empty vector(treated with 10 μ L lentivirus) transfected under the fluorescence microscope; C: KCNMA1(treated with 40 μ L lentivirus) transfected under the light microscope; D: KCNMA1(treated with 40 μ L lentivirus) transfected under the fluorescence microscope.

图2 MSCs细胞转染结果(100 \times)

Fig.2 Lentiviral tranfected into MSCs(100 \times)

度为 8.1×10^7 TU/mL。)

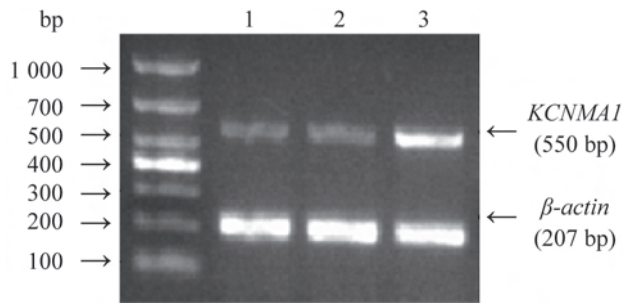
2.2 RT-PCR检测转染前后KCNMA1 mRNA的表达结果

细胞转染后, 未转染组与空载体转染组细胞内KCNMA1 mRNA的表达量无明显差异($P > 0.05$), 目的基因转染组细胞内KCNMA1 mRNA的表达量明显高于未转染组及空载体转染组($P < 0.05$), 有统计学差异

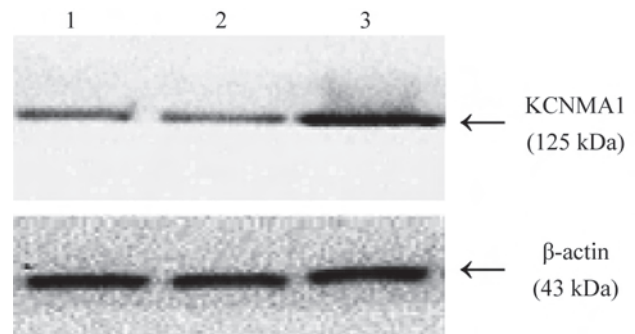
(图3和表1)。

2.3 Western blot检测转染前后KCNMA1蛋白的表达结果

细胞转染后, 未转染组与空载体转染组细胞内KCNMA1蛋白的表达无明显差异($P > 0.05$), 目的基因转染组细胞KCNMA1蛋白的表达明显高于未转染组及空载体转染组($P < 0.05$), 有统计学差异(图4和表1)。



1: 未转染组; 2: 空载体转染组; 3: 目的基因转染组。

1: untransfected group; 2: empty vector transfected group; 3: *KCNMA1* transfected group.图3 *KCNMA1* mRNA在三组细胞中的转录水平Fig.3 *KCNMA1* mRNA transcription level in the three groups of cells

1: 未转染组; 2: 空载体转染组; 3: 目的基因转染组。

1: untransfected group; 2: empty vector transfected group; 3: the purpose gene(*KCNMA1*) transfected group.图4 *KCNMA1*蛋白在三组细胞中的表达Fig.4 *KCNMA1* expression in the three groups of cells表1 *KCNMA1* mRNA和蛋白在三组细胞中的表达($\bar{x} \pm s$)Table 1 *KCNMA1* mRNA and protein levels in three groups of cells($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	目的基因转染组 <i>KCNMA1</i> transfected group	空载体转染组 Empty vector transfected group	未转染组 Untransfected group
<i>KCNMA1</i> mRNA	1.389±0.031 ^a	0.570±0.033 ^b	0.641±0.040
<i>KCNMA1</i> protein	1.602±0.020 ^a	0.922±0.013 ^b	0.952±0.025

a: $P < 0.05$, 目的基因转染组与空载体转染组、未转染组比较有统计学差异; b: $P > 0.05$, 空载体转染组与未转染组比较无统计学差异。a: $P < 0.05$, *KCNMA1* transfected group compared with empty vector transfected group and untransfected group, there were significant differences; b: $P > 0.05$, empty vector transfected group compared with untransfected group, there was no significant difference.

2.4 各组细胞培养液中 K^+ 、 Ca^{2+} 离子浓度结果

新鲜的细胞培养液中 K^+ 、 Ca^{2+} 离子浓度分别为5.5, 1.81 mmol/L。慢病毒转染后24 h, 目的基因转染组细胞培养液中 K^+ 、 Ca^{2+} 浓度与空载体转染组和未转染组比较无统计学差异($P > 0.05$); 转染后48 h和72 h, 目的基因转染组细胞培养液中 K^+ 浓度明显高于空载体组和未转染组, 有统计学差异($P < 0.05$); 转

染后48 h, 目的基因转染组细胞培养液中 Ca^{2+} 浓度低于空载体组和未转染组, 有统计学差异($P < 0.05$); 转染后72 h, 目的基因转染组细胞培养液中 Ca^{2+} 浓度高于空载体组和未转染组, 有统计学差异($P < 0.05$); 转染后24, 48, 72 h, 空载体转染组与未转染组细胞培养液中 K^+ 、 Ca^{2+} 离子浓度均无统计学差异($P > 0.05$) (表2)。

表2 三组细胞培养液中 K^+ 、 Ca^{2+} 浓度(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)Table 2 Concentrations of K^+ , Ca^{2+} in cell culture medium(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

离子 Electrolyte	目的基因转染组 <i>KCNMA1</i> transfected group			空载体转染组 Empty vector transfected group			未转染组 Untransfected group		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
K^+	5.23±0.06 ^c	5.07±0.06 ^a	4.30±0.17 ^a	5.17±0.56 ^b	4.93±0.06 ^b	2.90±0.01 ^b	5.03±0.12	4.80±0.10	2.83±0.06
Ca^{2+}	1.31±0.01 ^c	1.36±0.02 ^a	1.48±0.02 ^a	1.30±0.01 ^b	1.44±0.02 ^b	1.16±0.03 ^b	1.29±0.01	1.48±0.03	1.11±0.04

a: $P < 0.05$, 目的基因转染组与空载体转染组、未转染组比较有统计学差异; b: $P > 0.05$, 空载体组与未转染组比较无统计学差异; c: $P > 0.05$, 目的基因转染组与空载体组比较无统计学差异。a: $P < 0.05$, *KCNMA1* transfected group compared with empty vector transfected group and untransfected, there were significant differences; b: $P > 0.05$, empty vector group compared with untransfected group, there was no significant difference; c: $P > 0.05$, *KCNMA1* transfected group compared with empty vector group, there was no significant difference.

3 讨论

近年来,随着干细胞工程技术和基因技术的不断发展和应用,为两者联合治疗许多疾病提供了新选择。MSCs在骨髓中含量最丰富,其免疫原性低,能在宿主体内长期存活,且具有很强的多向分化潜能,可分化出各种体内具有特定功能的细胞。Song等^[10]发现,人MSCs细胞移植入大鼠阴茎组织中能够转化为内皮细胞和平滑肌细胞。MSCs已经被用作理想的基因治疗的载体,一旦干细胞与外源基因整合,单个稳定表达外源基因的细胞就能无限扩增成为能稳定表达外源基因的细胞系,从而避免了体细胞增殖能力有限、需要反复导入的问题。故MSCs以种子细胞广泛应用于诸多领域^[11]。KCNMA1的主要功能是参与细胞兴奋的电活动,神经递质的释放,激素的分泌,血管、气管、子宫、胃肠道、膀胱及阴茎海绵体等多种器官平滑肌组织的收缩以及很多其它重要生理活动的调节^[12]。KCNMA1联合MSCs可治疗许多疾病,包括泌尿科勃起功能障碍(ED)、膀胱过度活动症(overactive bladder, OAB)等。

细胞转染目前使用的载体有非病毒载体和病毒载体两类。非病毒载体应用最多的是脂质体表达载体,但由于其对细胞毒性较大,特别是对干细胞转染效率低,目前已不受青睐。病毒载体目前有腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体几大类。腺病毒属于双链DNA病毒,其转染后病毒基因游离于宿主细胞基因组外,瞬时表达外源基因。慢病毒和逆转录病毒属于RNA病毒,其转染后病毒基因能够整合到宿主细胞基因组内,能够稳定、长时间表达外源基因。但是反转录病毒只转染分裂细胞,不转染静止期细胞,且对干细胞转染效率低。因此,本实验设计并构建了慢病毒表达载体pLV.EX2d.null-CMV>KCNMA1-T2A-EGFP并转染至MSCs内。从转染后结果看,目的基因组MOI为28.8,转染效率低于空载体组的8.1,这可能跟KCNMA1片段较长有关,但本实验的MOI值较其他实验研究偏低^[13]。

本实验利用RT-PCR和Western blot技术测定显示,转染KCNMA1的细胞组与空载体转染组、未转染组比较,KCNMA1过表达。RT-PCR显示,目的基因组的KCNMA1 mRNA RI值高出空载体组、未转染组2倍;但Western blot结果提示,目的基因组的KCNMA1蛋白RI值虽然明显高于空载体组和未转染组,但是

并未大于2倍。这说明虽然KCNMA1基因已经转入细胞,但是蛋白的表达还要受转录后剪切、翻译调控、多种β亚基辅助调节等诸多因素的调控^[14]。这就需要进一步实验研究证实。

在可兴奋细胞中,胞内升高的钙离子水平或者细胞膜去极化会选择性激活细胞膜上的BKca通道,细胞内钾离子(K⁺)外流,使细胞膜电位复极化,从而降低细胞的兴奋性和动作电位的爆发频率,参与负反馈调节。BKca通道在维持机体内环境和内耳淋巴循环离子浓度的稳定中起重要作用^[15]。本实验中,各组细胞24, 48, 72 h后培养液中的K⁺、Ca²⁺离子浓度变化提示:目的基因组24 h后K⁺、Ca²⁺浓度变化与空载体组、未转染组比较无统计学差异,48 h和72 h后有统计学差异。目的基因组细胞48 h和72 h微环境K⁺浓度下降的幅度明显小于空载体组和未转染组细胞微环境K⁺浓度下降的幅度。这说明转入的外源KCNMA1在细胞中表达并发挥功能,使细胞内K⁺外流,也可以推测说明转染后24 h,转入的外源KCNMA1才逐渐开始发挥功能。这就为细胞移植治疗的时间选择提供了依据。目的基因组72 h后Ca²⁺浓度升高,空载体和未转染组Ca²⁺浓度降低。这可能与细胞内的KCNMA1有关,因为细胞内Ca²⁺作为第二信使能够激活KCNMA1。目的基因组细胞KCNMA1过表达,细胞为了避免激活更多的KCNMA1通道,就使细胞内的Ca²⁺外流,从而降低了细胞内的Ca²⁺浓度,细胞微环境中的Ca²⁺浓度也就升高了。这可能是细胞自身调节保护的机制。另外,细胞微环境中离子浓度的变化,还受很多因素的影响,譬如细胞的增殖状况、细胞的代谢状态、其他离子通道相互作用等,所以,细胞在KCNMA1的调控下,微环境中K⁺、Ca²⁺浓度关系的变化及因果关系还需要进一步实验研究证明。

综上所述,本实验成功构建了含KCNMA1的慢病毒载体并转染进入大鼠BM-MSCs内,证实转染后的干细胞KCNMA1过表达,且发挥了其蛋白功能,为进一步体内实验治疗相关疾病提供了依据和策略。

参考文献 (References)

- 1 Fridenstein A, Piatetskii S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Arkh Anat Gistol Embriol* 1969; 56(3): 3-11.
- 2 Jamnig A, Lepperdinger G. From tendon to nerve: An MSC for

- all seasons. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90(3): 295-306.
- 3 Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A, Salkoff L. mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* 1993; 261(5118): 221-4.
 - 4 Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(12): 921-31.
 - 5 Dinardo MM, Camerino G, Mele A, Latorre R, Conte Camerino D, Tricarico D. Splicing of the rSlo gene affects the molecular composition and drug response of Ca²⁺-activated K⁺ channels in skeletal muscle. *PLoS One* 2012; 7(7): e40235.
 - 6 Bivalacqua TJ, Deng W, Kendirci M, Usta MF, Robinson C, Taylor BK, *et al.* Mesenchymal stem cells alone or *ex vivo* gene modified with endothelial nitric oxide synthase reverse age-associated erectile dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(3): H1278-90.
 - 7 Christ GJ, Andersson KE, Williams K, Zhao W, D'Agostino R Jr, Kaplan J, *et al.* Smooth-muscle-specific gene transfer with the human maxi-k channel improves erectile function and enhances sexual behavior in atherosclerotic cynomolgus monkeys. *Eur Urol* 2009; 56(6): 1055-66.
 - 8 聂永华, 肖明朝, 苟欣, 汤为学, 陈力学, 蔡贤福. 骨髓间充质干细胞改善糖尿病大鼠勃起功能障碍的研究. *重庆医科大学学报*(Nie Yonghua, Xiao Mingzhao, Gou Xin, Tang Weixue, Chen Lixue, Cai Xianfu. The effect of MSC on erectile dysfunction in diabetic rats. *Journal of Chongqing Medical University*) 2012; 37(7): 56-60.
 - 9 Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, Li H, Wang XY, Yao HY, *et al.* A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc* 2010; 5(3): 550-60.
 - 10 Song YS, Lee HJ, Park IH, Kim WK, Ku JH, Kim SU. Potential differentiation of human mesenchymal stem cell transplanted in rat corpus cavernosum toward endothelial or smooth muscle cells. *Int J Impot Res* 2007; 19(4): 378-85.
 - 11 任振华, 王佳茵, 朱宛宛, 邹春林, 张愚. 食蟹猴胚胎干细胞向间充质前体细胞诱导分化及鉴定. *中国细胞生物学学报* (Ren Zhenhua, Wang Jiayin, Zhu Wanwan, Zou Chunlin, Zhang Yu. Induction and identification of mesenchymal precursor cells from cynomolgus monkey embryonic stem cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2011; 33(11): 1197-203.
 - 12 Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST. Large conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 2006; 110(1): 103-16.
 - 13 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.
 - 14 Poulsen AN, Jansen-Olesen I, Olesen J, Klaerke DA. Neuronal fast activating and meningeal silent modulatory BK channel splice variants cloned from rat. *Pflugers Arch* 2011; 461(1): 65-75.
 - 15 Lang F, Vallon V, Knipper M, Wangemann P. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293(4): 1187-208.

Transfection of the KCNMA1 Lentiviral into the Mesenchymal Stem Cells *in vitro* and Its Function Assay

He Yue, Xiao Mingzhao*, Nie Yonghua, He Weiyang, Qin Guodong, Luo Jiayu

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

Abstract Mesenchymal stem cells have a high degree potential of proliferation, self-renewal and multi-directional differentiation. Large conductance calcium-dependent potassium channel, subfamily M, alpha member 1 (KCNMA1) mediated intracellular K^+ outflow, so that it made the membrane hyperpolarization and reduced cell excitability. The study through the preparation *KCNMA1* recombinant lentivirus and blank vectors lentivirus to transfected into the stem cells, tested the multiplicity of infection (MOI), detected the expression changes of *KCNMA1* and the microenvironment electrolyte concentration before and after *KCNMA1* transfected into cells. Results showed that we transfected *KCNMA1* and blank vectors lentiviral successfully into the stem cells. The results of RT-PCR and Western blot showed that KCNMA1 over-expressed in the transfected *KCNMA1* cells compared with the blank vector cells and untransfected cells, and K^+ concentration in the microenvironmental of transfected *KCNMA1* cells was higher than blank vector cells and untransfected cells. It is confirmed that we had successfully transfected the lentiviral containing *KCNMA1* into the BM-MSCs and the cells over-expressed *KCNMA1* and performed its functions, laying the foundation for *in vivo* studies about KCNMA1 and stem cell therapy related diseases.

Key words KCNMA1; BM-MSCs; lentiviral

Received: August 1, 2012 Accepted: August 28, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of CQ CSTC (No.2009BB5411)

*Corresponding author. Tel: 86-23-89012505, E-mail: x mz.2004@163.com