## 技术与方法

# 一种可分泌多种活化型因子的工程细胞的建立

周梦磊<sup>1</sup> 杨蓓蓓<sup>1\*</sup> 曹江<sup>2\*</sup> ('浙江大学医学院附属第二医院耳鼻咽喉科,杭州 310009; <sup>2</sup>浙江大学医学院附属第二医院临床研究中心,杭州 310009)

摘要 该研究目的是构建可分泌多种活化型因子的工程细胞,用于诱导干细胞分化为耳蜗神经元样细胞的共培养。首先将大鼠脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和神经营养因子3(neurotrophin 3, NT3)的成熟肽编码序列用内部核糖体进入位点序列(internal ribosome entry site, IRES)连接起来,再插入慢病毒表达载体pLVX-IRES-tdTomato,并包装成慢病毒,再将慢病毒分别感染HEK293T细胞和已有的表达活化型表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF1)和成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)的HEK293T/3GF细胞,采用有限稀释法获得稳定转染的细胞克隆,利用Western blot检测细胞培养液上清中的BDNF和NT3的表达情况,并通过检测人肺癌A549细胞和大鼠嗜铬细胞瘤PC-12细胞的增殖以及PC-12细胞的分化情况对细胞表达的因子活性进行鉴定。结果表明,可同时表达分泌活化型EGF、IGF1、FGF2、BDNF和NT3的工程细胞构建成功,为后续干细胞共培养和诱导分化研究提供了有力工具。

关键词 生长因子;神经营养因子;分泌;干细胞;工程细胞

# Establishment of an Engineered Cell Secreting Multiple Types of Active Factors

ZHOU Menglei<sup>1</sup>, YANG Beibei<sup>1\*</sup>, CAO Jiang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, the 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; <sup>2</sup>Clinical Research Center, the 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

**Abstract** The purpose of this work is to establish an engineered cell which secrets multiple types of active factors, and can be used in co-culture for the induction of stem cell differentiation towards cochlear neuron-like cells. The coding sequences of mature peptides of rat BDNF (brain-derived neurotrophic factor) and NT3 (neurotrophin 3) were linked by IRES (internal ribosome entry site), inserted into lentiviral expression vector pLVX-IRES-tdTomato and packaged into lentiviral particles, and used to infect HEK293T cells and HEK293T/3GF cells (which can express active form of EGF (epidermal growth factor), IGF1 (insulin-like growth factor 1) and FGF2 (fibroblast growth factor 2). Stable transfectants were cloned by limited dilution. Western blot was used to examine the expression of BDNF and NT3 in culture supernatant. The proliferation of human lung cancer A549 cells and rat pheochromocytoma PC-12 cells, as well as the differentiation status of PC-12 cells were used to assess the activity of the secreted factors. The results showed that the engineered cell expressing secretory active form of EGF, IGF1, FGF2, BDNF and NT3 was suc-

收稿日期: 2022-08-04 接受日期: 2022-09-29

浙江省重大科技专项重大社会发展项目(批准号: 2015C03035)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-87783525, E-mail: 2187006@zju.edu.cn; Tel: 0571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn

Received: August 4, 2022 Accepted: September 29, 2022

This work was supported by the Major Social Development Project of Zhejiang Province (Grant No.2015C03035)

<sup>\*</sup>Corresponding authors. Tel: +86-571-87783525, E-mail: 2187006@zju.edu.cn; Tel: +86-571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn

cessfully established, which provides a powerful tool for the subsequent co-culture with stem cells.

Keywords growth factor; neurotrophic factor; secretion; stem cell; engineered cell

耳聋是一种全球性的疾病,严重影响人们的学 习、工作和生活。根据WHO统计,2019年全球大约 有4.66亿人存在中、重度耳聋,预计到2030年这一 数字将达到6.3亿<sup>[1]</sup>。感染、颅脑外伤、耳毒性药物 等多种原因可引起耳蜗毛细胞和螺旋神经元受损, 导致感音神经性耳聋。人类的耳蜗螺旋神经元的数 量在33 600~45 700,一旦变性坏死后就不能自然再 生<sup>[2]</sup>。重度耳聋病人的耳蜗内残存的螺旋神经元数 量对人工耳蜗植入手术后的效果有重要影响。因此, 修复和保护足够多的耳蜗螺旋神经元至关重要<sup>[3-5]</sup>。

随着生物治疗技术的不断发展,干细胞治疗在内 耳神经元细胞的保护修复方面展现出了一些潜能<sup>[6-8]</sup>。 例如,通过致聋大鼠经肱静脉注射人脐带血间充质 干细胞或者通过将过表达CXCR4的骨髓间充质干 细胞移植至致聋豚鼠耳蜗鼓阶等实验方法均可显著 改善听力<sup>[9-10]</sup>。

干细胞的生长和分化方向受多种因子的调控。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和神经营养因子3(neurotrophin 3, NT3)对 内耳神经元的发育和存活是必需的,可促进神经元 的分化成熟<sup>[11-13]</sup>。多种生长因子,如胰岛素样生长 因子(insulin-like growth factor 1, IGF1)、表皮生长 因子(epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生 长因子2(fibroblast growth factor, FGF2)等,与神经营 养因子的联合应用对神经元的生长和分化能够起到 很好的协同作用<sup>[14-15]</sup>。

传统的干细胞诱导实验都是通过不断添加外 源性因子实现的。如果利用持续表达多种因子的细 胞与干细胞进行共培养,则可以为干细胞的诱导分 化持续提供稳定的各种因子。因此,我们在前期已 构建的可以稳定表达三种活化型生长因子的细胞的 基础上<sup>[16]</sup>,进一步构建了还可持续稳定表达BDNF和 NT3的细胞,为研究干细胞向内耳神经元的定向诱 导分化提供有力的工具。

### 1 试剂和材料

#### 1.1 质粒、菌种和细胞株

慢病毒表达载体pLVX-IRES-ZsGreen1、pLVX-IRES-tdTomato及包装质粒 psPAX2质粒和 pMD2.G

质粒购自Clontech公司,大肠杆菌E. coli DH5α由本 实验室保存,人胚肾细胞HEK293T和人肺癌A549购 自ATCC,HEK293T/pLVX-3GF-ZsGreen1细胞由本 实验室构建并保存<sup>[16]</sup>,大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC-12 细胞购自中国科学院上海细胞库。

#### 1.2 试剂

质粒抽提试剂盒Plasmid Midi Kit、转染试剂 Attractene Transfection Reagent和切胶回收试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit购自QIAGEN公司;限 制性内切酶和碱性磷酸酶(CIP)购自New England Biolabs公司;T4 DNA连接酶购自Promega公司;高 糖DMEM、RPMI-1640培养液购自BOSTER公司; PC-12完全培养液购自中国科学院细胞库;CCK-8 试剂购自Dojindo公司;胎牛血清购自Biological Industries公司;Polybrene和NT3抗体购自Sigma公司; BDNF抗体购自Abcam公司;封闭液购自Bio Rad公 司;山羊抗兔IgG/辣根酶标记二抗购自北京中杉金 桥生物技术有限公司。

#### 1.3 方法

1.3.1 pLVX-BDNF-NT3-tdTomato重组质粒的构建 我们设计了如图1所示的序列,由杭州擎科生物技 术有限公司按照我们的设计合成相应序列片段,并 将其克隆于pUC57质粒。该序列由大鼠BDNF成 熟肽编码序列(GenBank accession number M61175, nt:463-822)、内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)和NT3成熟肽编码序列(GenBank accession number BC070504, nt:739-1098)组成,在 BDNF和NT3编码序列前均引入Kozak序列增强翻译 和Igκ信号肽序列引导因子分泌<sup>[16]</sup>。

将含有上述序列的重组质粒用 Spe I和 Xba I双 酶切,凝胶电泳分离并回收该序列,插入慢病毒表 达质粒pLVX-IRES-tdTomato的 Xba I位点,抽提转化 子质粒,利用四种方法鉴定插入片段的方向: Spe I 和 Xba I双酶切、EcoR I单酶切、BamH I单酶切以 及 Kpn I单酶切,将正确插入的质粒命名为pLVX-BDNF-NT3-tdTomato。

1.3.2 pLVX-BDNF-NT3-tdTomato重组质粒的构建 将含有成熟活性肽BDNF和NT3编码序列的重组质 粒pUC57用Spe I和Xba I双酶切, 慢病毒质粒pLVX-



A: 活化型BDNF和NT3表达载体插入片段示意图, Kz: Kozak序列; Igr: 免疫球蛋白Igr卷信号肽; IRES: 内部核糖体进入位点; BDNF: 脑源性神 经营养因子; NT3: 神经营养因子3; B: 活化型BDNF和NT3表达载体插入片段具体核酸序列图, 绿色: Kozak序列; 黑色: 免疫球蛋白Igr卷信号肽 序列; 褐色: 内部核糖体进入位点序列, 蓝色: 脑源性神经营养因子序列、神经营养因子3序列, 红色: 限制性核酸内切酶位点。

A: design of insert fragment for the active form of BDNF and NT3 expression vector, Kz: Kozak sequence; Igk: signal peptide of immunoglobulin Igk chain; IRES: internal ribosome entry site; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; NT3: neurotrophin 3; B: nucleic acid sequence for the inserted fragment, green: Kozak sequence; black: sequence for signal peptide of immunoglobulin Igk chain; brown: sequence for internal ribosome entry site; blue: sequences for brain-derived neurotrophin 3; red: restriction endonuclease sites.

#### 图1 活化型BDNF和NT3表达载体插入片段序列

#### Fig.1 Sequence of the inserted fragment for active form of BDNF and NT3 expression vector

IRES-tdTomato用Xba I单酶切,将整个目的片段克隆 至pLVX-IRES-tdTomato中,分别用四种酶切方法鉴 定插入片段的方向: Spe I和Xba I双酶切、EcoR I单 酶切、BamH I单酶切以及Kpn I单酶切,将符合要求 的重组质粒命名为pLVX-BDNF-NT3-tdTomato。

1.3.3 慢病毒包装 用QIAGEN Plasmid Midi Kit(100)抽提pLVX-BDNF-NT3-tdTomato, psPAX2 质粒和pMD2.G质粒。取5 μg psPAX2质粒、2.5 μg pMD2.G质粒,以及5 μg pLVX-BDNF-NT3-tdTomato 质粒稀释在300 μL不含双抗和血清的高糖DMEM 中,混匀,加入15 μL转染试剂Attractene Transfection Reagent,轻柔混匀后室温静置20 min。提前将人胚 肾HEK293T细胞接种至直径为10 cm的细胞培养皿 中,待细胞达70%融合度时,用不含双抗的含10% FBS的DMEM高糖培养液培养,吸去上清液,消化悬 浮制成1 mL细胞悬液(7×10<sup>6</sup>个/mL),将1 mL细胞悬 液与300 µL转染复合物轻柔混匀,并接种到直径为 10 cm细胞培养皿中,培养6 h后补液至10 mL,分别 于48 h和72 h离心收集病毒上清,0.45 µm滤器过滤, 用截留分子量为10K的超滤管将10 mL含病毒的上 清液浓缩至500 µL, -80 °C保存。以同样的方法包 装pLVX-IRES-tdTomato和pLVX-IRES-ZsGreen1的 空载慢病毒载体作为后续实验对照。

1.3.4 慢病毒感染 将HEK293T/3GF和HEK293T细 胞接种于直径为3.5 cm的细胞培养皿中,用不含抗生素的高糖DMEM培养液培养,细胞达到70%融合度时

吸去培养液,加入500 μL慢病毒浓缩液,同时加入终浓度为8 μg/mL的Polybrene, 6 h后补液至2 mL, 24 h后换液继续培养至48 h。采用有限稀释法,以0.8个细胞/孔转接至96孔板,继续培养筛选出稳定表达荧光蛋白的稳定转染的细胞克隆。将稳定转染的细胞分别命名为HEK293T/3GF/BDNF-NT3和HEK293T/ BDNF-NT3。用同样的方法获得HEK293T/tdTomato和HEK293T/ZsGreen1对照组细胞克隆。

1.3.5 Western blot检测目的蛋白表达 将上述构建 的4组细胞和HEK293T细胞按2×10<sup>6</sup>个/皿接种至直径 为10 cm的细胞培养皿,用含2.5% FBS的高糖DMEM 培养液培养72 h, 收集各组细胞上清各10 mL, 4 °C、 5 000 ×g离心10 min去除细胞碎片, -80 °C冷冻干 燥后溶于500 µL无菌水, 在4 ℃条件下经多次大量 PBS透析后,用0.22 µm的滤器除菌,取20 µL上述方 法得到的液体与5 µL的5× 上样缓冲液混匀, 热变性 后进行12% SDS凝胶电泳, 恒流20 mA至溴酚蓝跑 至胶的底部, 恒流250 mA转膜2 h, 转膜后将PVDF 膜用封闭液(含1%酪蛋白的1× Tris buffered saline)室 温封闭1 h, 分别加入BDNF抗体(1:1 000)和NT3抗体 (1:1 000), 4 °C孵育过夜。使用TBST洗膜3×5 min后 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000), 室温孵 育2h, TBST洗膜3次, 每次5min, 然后使用化学发光 法检测信号。

1.3.6 CCK-8检测A549细胞增殖实验 人肺癌A549 细胞接种于96孔板,密度为2×10<sup>3</sup>个/孔,24 h后吸去培养液,每孔分别加入50 μL之前提取的5组细胞的培养 液上清蛋白浓缩液和50 μL RPMI-1640培养液(含10% FBS)。培养48 h后加入10 μL CCK-8试剂,继续培养 2 h后用酶标仪检测波长为450 nm处的吸光度(D)值。

1.3.7 CCK-8检测PC-12细胞增殖实验 PC-12细胞 接种于96孔板,密度为1×10<sup>4</sup>个/孔,24 h后吸去培养液, 每孔分别加入50 μL上述5组细胞的上清蛋白浓缩液 和50 μL RPMI-1640培养液(含10% FBS)。培养48 h 后加入10 μL CCK-8试剂,继续培养2 h后用酶标仪 检测波长为450 nm处的吸光度(*D*)值。

1.3.8 PC-12细胞形态学变化 将PC-12细胞接种于 直径为3.5cm的细胞培养皿,密度为1×10<sup>4</sup>个/皿,24 h 后吸去培养液,每皿分别加入500 μL的上述5组细胞 的上清蛋白浓缩液和500 μL的RPMI-1640培养液(含 10% FBS)。连续培养14天,隔天换液,显微镜下观察 PC-12形态学改变。每组选择3个具有代表性的视野 (200×),计数有树突状分化形态的细胞并计算比例 (有树突状分化形态细胞数/视野内总细胞数×100%)。

#### 1.4 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件。使用独立样本t检验 比较两组之间的差异性, 计量数据以*x*±s形式表示, 检 验标准α=0.05, 均以*P*<0.05表示差异有统计学意义。

#### 2 结果

#### 2.1 重组质粒构建

将合成的含BDNF和NT3编码序列的片段克隆至 pLVX-IRES-tdTomato载体的Xba I单酶切位点,采用酶 切方法对插入的片段及其方向进行鉴定,该片段正向 插入载体后经Xba I和Spe I双酶切后应产生大小分别 为1 471 bp和8 892 bp的片段,经EcoRI单酶切后应产生 大小分别为1 046 bp和9 317 bp的片段,经BamH I单酶 切后应产生大小分别为1 042 bp和9 321 bp的片段,经 Kpn I单酶切后应产生大小分别为1 049 bp、2 301 bp 和7 013 bp的片段。电泳结果如图2所示,所有条带



M: 1 Kb plus DNA ladder marker; 1: Xba I和Spe I双酶切片段; 2: EcoRI单酶切片段; 3: BamHI单酶切片段; 4: Kpn I单酶切片段。 M1: 1 Kb plus DNA ladder marker; 1: Xba I and Spe I double digestion; 2: EcoRI digestion; 3: BamHI digestion; 4: Kpn I digestion. 图2 pLVX-BDNF-IRES-NT3-tdTomato质粒酶切鉴定图

Fig.2 Characterization of plasmid pLVX-BDNF-NT3-tdTomato

(A)



A: HEK293T/3GF/BDNF-NT3细胞克隆荧光显微镜下照片。1: 明场下视野; 2: RHOD\_LP下视野; 3: FITC下视野。B: HEK293T/BDNF-NT3细胞 克隆荧光显微镜下照片。1: 明场下视野; 2: RHOD\_LP下视野。C: HEK293T/ZsGreen1细胞克隆荧光显微镜下照片。1: 明场下视野; 2: FITC下 视野。D: HEK293T/tdTomato细胞克隆荧光显微镜下照片。1: 明场下视野; 2: RHOD\_LP下视野。

A: fluorescent image of HEK293T/3GF/BDNF-NT3 cell clone. 1: microscopy under bright field (PH); 2: microscopy under fluorescent field (FITC). B: fluorescent image of HEK293T/BDNF-NT3 cell clone. 1: microscopy under bright field (PH); 2: microscopy under fluorescent field (RHOD\_LP). C: fluorescent image of HEK293T/ZsGreen1 cell clone. 1: microscopy under bright field (PH); 2: microscopy under fluorescent field (FITC). D: fluorescent image of HEK293T/tdTomato cell clone. 1: microscopy under bright field (PH); 2: microscopy under fluorescent field (FITC). D: fluorescent image of HEK293T/tdTomato cell clone. 1: microscopy under bright field (PH); 2: microscopy under fluorescent field (RHOD\_LP).

#### 图3 稳定转染细胞克隆荧光显微镜下照片 Fig.3 Fluorescent image of stable transfection cell clone

情况均与正向插入相符,表明重组质粒构建成功。

## 2.2 稳定转染细胞的获得

将各慢病毒表达载体包装为慢病毒后,分别感染相应的细胞,采用有限稀释法,通过观察载体所带的荧光蛋白表达情况筛选出各稳定转染的细胞克隆

(图3)。

#### 2.3 BDNF和NT3成功表达及分泌

收集各细胞培养上清,Western blot检测BDNF 和NT3的表达情况。HEK293T/3GF/BDNF-NT3和 HEK293T/BDNF-NT3的培养液上清中均有BDNF 和NT3的条带,而对照细胞HEK293T/ZsGreen1、 HEK293T/tdTomato和HEK293T均无相应条带,表明 HEK293T/3GF/BDNF-NT3和HEK293T/BDNF-NT3两 种细胞均成功表达BDNF和NT3两种神经营养因子, 并可分泌到培养液上清中(图4)。

2.4 稳定转染细胞可表达并分泌活化型生长因子

由于活化的IGF1、EGF和FGF2可促进人肺癌 A549细胞增殖<sup>[16]</sup>,我们通过CCK-8法检测A549细胞 的增殖,对HEK293T/3GF/BDNF-NT3细胞表达并分 泌到培养液中的这些因子的活性进行了分析。结 果表明,该细胞上清条件培养液确实具有促进A549 细胞增殖的作用。如图5所示,与对照组HEK293T/ ZsGreen1、HEK293T/tdTomato和HEK293T相比,含 HEK293T/3GF/BDNF-NT3上清的条件培养液可明显 促进A549细胞的生长,差异有统计学意义(\*\*P<0.01), 即该细胞表达并分泌的这些生长因子具有活性。 2.5 稳定转染细胞可表达并分泌活化型神经营养 因子

由于活化型BDNF和NT3两种神经营养因子可促进大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC-12细胞增殖,并 诱导其分化,我们利用含稳定转染细胞上清的条件 培养液培养,通过CCK8法检测PC-12细胞的增殖 以及显微镜下形态变化情况,对稳定转染细胞所分 泌的这两种神经营养因子活性进行了分析。如图 6所示,与对照组HEK293T/ZsGreen1、HEK293T/ tdTomato以及HEK293T相比,含HEK293T/3GF/ BDNF-NT3上清和HEK293T/BDNF-NT3上清的条 件培养液均可促进PC-12细胞的生长,两组之间有显 著性差异(\*\*P<0.01)。而且HEK293T/3GF/BDNF-NT3的条件培养液促进PC-12细胞生长的作用比



M: precision plus protein<sup>™</sup> standards; 1: HEK293T/3GF/BDNF-NT3培养液上清; 2: HEK293T/BDNF-NT3培养液上清; 3: HEK293T/ZsGreen1培养 液上清; 4: HEK293T/tdTomato培养液上清; 5: HEK293T培养液上清。

M: precision plus protein<sup>™</sup> standards; 1: HEK293T/3GF/BDMF-NT3 supernatant; 2: HEK293T/BDNF-NT3 supernatant; 3: HEK293T/ZsGreen1 supernatant; 4: HEK293T/tdTomato supernatant; 5: HEK293T supernatant.





1: HEK293T/3GF/BDNF-NT3组; 2: HEK293T/BDNF-NT3组; 3: HEK293T/ZsGreen1组; 4: HEK293T/tdTomato组; 5: HEK293T组。*n*=3, 以**x**±s形 式表示, 独立样本*t*检验比较两组的差异, \*\**P*<0.01。

1: HEK293T/3GF/BDNF-NT3 group; 2: HEK293T/BDNF-NT3 group; 3: HEK293T/ZsGreen1 group; 4: HEK293T/tdTomato group; 5: HEK293T group. n=3, expressed in the form of  $\overline{x}\pm s$ , independent sample *t* test was used to compare the differences between the two groups, \*\*P<0.01.

图5 CCK-8检测A549增殖实验

Fig.5 A549 proliferation assay by CCK-8



A: HEK293T/BDNF-NT3条件培养液处理的PC-12细胞分别与HEK293T/ZsGreen1、HEK293T/tdTomato以及HEK293T条件培养液处理组细 胞增殖情况比较。1: HEK293T/BDNF-NT3组; 2: HEK293T/ZsGreen1组; 3: HEK293T/tdTomato组; 4: HEK293T组; B: HEK293T/3GF/BDNF-NT3条件培养液处理的PC-12细胞分别与HEK293T/ZsGreen1、HEK293T/tdTomato以及HEK293T条件培养液处理组细胞增殖情况比较。1: HEK293T/3GF/BDNF-NT3组; 2: HEK293T/ZsGreen1组; 3: HEK293T/tdTomato组; 4: HEK293T组。*n*=3, 以*x*±s形式表示, 独立样本*t*检验比较两 组的差异, \*\**P*<0.01。

A: comparison of cell proliferation between PC-12 cells treated with HEK293T/BDNF-NT3 conditioned medium and HEK293T/ZsGreen1, HEK293T/tdTomato and HEK293T treated group. 1: HEK293T/BDNF-NT3 group; 2: HEK293T/ZsGreen1 group; 3: HEK293T/tdTomato group; 4: HEK293T group; B: comparison of cell proliferation between PC-12 cells treated with HEK293T/3GF/BDNF-NT3 conditioned medium and HEK293T/ZsGreen1, HEK293T/tdTomato and HEK293T treated group. 1: HEK293T/3GF/BDNF-NT3 group; 2: HEK293T/ZsGreen1 group; 3: HEK293T/ZsGreen1, HEK293T/tdTomato group; 4: HEK293T/tdTomato and HEK293T treated group. 1: HEK293T/3GF/BDNF-NT3 group; 2: HEK293T/ZsGreen1 group; 3: HEK293T/tdTomato group; 4: HEK293T/dTomato group; 4: HEK293T/dTomato group; 4: HEK293T/dTomato group; 4: HEK293T/dTomato group; 4: HEK293T group. n=3, expressed in the form of  $\overline{x}\pm s$ , independent sample *t* test was used to compare the differences between the two groups, \*\*P<0.01.

#### 图6 CCK-8检测PC-12增殖实验 Fig.6 PC-12 proliferation assay by CCK-8

HEK293T/BDNF-NT3更强(P=0.038)。图7显示,经 3GF/BDNF-NT3和BDNF-NT3条件培养液处理的 PC-12细胞的树突状分化的比例指标明显高于对照 组(\*\*P<0.01)。因此,HEK293T/3GF/BDNF-NT3和 HEK293T/BDNF-NT3均可表达并分泌具有活性的 BDNF和NT3两种神经营养因子。

#### 3 讨论

耳蜗螺旋神经元的变性坏死可导致不可逆的 感音神经性聋。对于双耳重度和极重度感音神经性 聋患者来说,残存的螺旋神经元数量与人工耳蜗植 入手术的治疗效果呈正相关。耳蜗螺旋神经元细胞 属于高度分化的终末细胞,一旦损伤后不能自然再 生<sup>[17]</sup>,因此,保护和修复耳蜗螺旋神经元对听力的恢 复具有重要意义。

神经营养因子在神经元保护修复方面发挥了重要作用。BDNF和NT3属神经营养因子家族,可促进神经元的生长发育以及新生神经元突触的生长<sup>[18]</sup>。已有研究表明,BDNF和NT3对耳蜗螺旋神经元细胞的生长存活和保护修复也有重要作用。ERNFORS 等<sup>[12]</sup>和FRITZSCH等<sup>[13]</sup>发现,把BDNF基因和NT3基 因双敲除或将其受体基因双敲除都可导致耳蜗螺 旋神经元完全丧失。QUN等<sup>[19]</sup>发现,BDNF和NT3 可保护豚鼠耳蜗神经元免受氨基糖苷类药物和噪 声造成的损伤。除此之外,生长因子与神经营养因 子的联合应用对神经元的生长分化起到协同作用。 GLUECKERT等<sup>[15]</sup>发现,对致聋豚鼠同时注射BDNF 和酸性成纤维生长因子(acid fibroblast growth factor, aFGF)可明显提高耳蜗螺旋神经元的数量,而且可使 神经元周围突的数量也明显增加。

除了保护和修复受损的耳蜗神经元外,神经营养因子还可刺激干细胞向耳蜗螺旋神经元样细胞分化,使耳蜗螺旋神经元的再生成为可能。移植具有一定分化潜能的干细胞对修复受损的耳蜗结构以及听力重建都具有重要的意义。但是传统的干细胞诱导培养方式都是在二维的细胞培养皿上进行的,干细胞只能平面生长,不能像体内细胞一样具有立体三维空间环境,这会影响干细胞诱导分化的效果,而且需要不断地添加各种外源性因子,很难做到在诱导过程中因子浓度保持稳定<sup>[16,20]</sup>。因此,为达到更好的干细胞诱导分化的效果,保证诱导过程中诱导因子浓度的稳定,本工作在前期获得的可同时表达





A: morphology of PC-12 cells under microscope treated by conditioned medium. B: percentage of differentiated cells with dendritic morphology treated by conditioned medium (n=3, expressed in the form of  $\bar{x}\pm s$ , independent sample *t* test was used to compare the differences between the two groups, \*\*P<0.01). 1: HEK293T/3GF/BDNF-NT3 conditional medium; 2: HEK293T/BDNF-NT3 conditional medium; 3: HEK293T/ZsGreen1 conditional medium; 4: HEK293T/tdTomato conditional medium; 5: HEK293T conditioned medium.



IGF1、EGF和FGF2三种生长因子的细胞的基础上, 进一步建立了还可分泌BDNF和NT3两种神经营养 因子的细胞,以期通过共培养方式为干细胞定向诱 导分化稳定地提供所需的各种因子。

A549细胞对三种生长因子IGF1、EGF、FGF2 敏感,三种生长因子均可促使A549细胞增殖<sup>[21-23]</sup>,因 此我们利用CCK-8法检测A549的生长来验证建立 的细胞所分泌的生长因子活性。结果明确显示,在 HEK293T/3GF/BDNF-NT3组中A549细胞增殖比对 照组明显增高,以此证明我们构建的HEK293T/3GF/ BDNF-NT3细胞分泌的IGF1、EGF、FGF2可促进 A549细胞的增殖,且这些因子具有生物学活性,可 用于后续干细胞诱导分化的实验。

PC-12细胞是一种来自大鼠肾上腺髓质的嗜铬 细胞瘤细胞,常被用于神经元分化机制的研究<sup>[24-25]</sup>,也被用作BDNF等神经营养因子的活性检测。在 本工作中,我们发现了经3GF/BDNF-NT3和BDNF-NT3条件培养液处理的PC-12细胞的增殖能力比对 照组明显增强,其中3GF/BDNF-NT3条件培养液处 理组的细胞数量多于BDNF-NT3条件培养液处理组, 说明三种生长因子与两种神经营养因子在PC-12细 胞的增殖中可能存在协同作用。BDNF-TrkB/Ras/ Raf/ERK和IGF-1R/PI3K/AKT等相关信号通路的激活可促使PC-12细胞出现神经元样的改变<sup>[26]</sup>。NT3可通过与其特异性受体TrkC结合激活下游信号蛋白Dok5,促使PC-12细胞出现细长突起<sup>[27]</sup>。我们在本工作中也同样发现了经3GF/BDNF-NT3条件培养液处理的PC-12细胞周围会出现明显较多的树突状结构,这再次证明了BDNF和NT3蛋白可促进PC-12细胞出现神经元样的改变。结合PC-12细胞的增殖和形态学的变化两项指标,证明了我们所建立的HEK293T/3GF/BDNF-NT3细胞和HEK293T/BDNF-NT3细胞分泌的BDNF和NT3具有相应的活性。

因此,我们在本文的工作中成功地建立了 HEK293T/3GF/BDNF-NT3细胞,证明了其表达并分 泌的五种蛋白因子具有生物学活性,该工程细胞可 进一步用于干细胞的诱导分化和受损耳蜗螺旋神经 元的保护修复,进而使得耳蜗螺旋神经元的损伤修 复甚至再生成为可能。

#### 参考文献 (References)

- VERMA R R, KONKIMALLA A, THAKAR A, et al. Prevalence of hearing loss in India [J]. Natl Med J India, 2022, 34(4): 216-22.
- [2] 肖茜,刘洋,闵美平,等.耳蜗螺旋神经节细胞形态及计数的研究进展[J].听力学及言语疾病杂志(XIAO Q, LIU Y, MIN M P, et al. Research progress on the morphology and counting of spiral ganglion cells in cochlea [J]. Journal of Audiology and Speech Disorders), 2016, 24(2): 203-6.
- [3] KANZAKI S, BEYER L A, CANLON B, et al. The cytocaud: a hair cell pathology in the waltzing Guinea pig [J]. Audiol Neurootol, 2002, 7(5): 289-97.
- [4] SHEPHERD R K, ROBERTS L A, PAOLINI A G. Long-term sensorineural hearing loss induces functional changes in the rat auditory nerve [J]. Eur J Neurosci, 2004, 20(11): 3131-40.
- [5] PETTINGILL L N, RICHARDSON R T, WISE A K, et al. Neurotrophic factors and neural prostheses: potential clinical applications based upon findings in the auditory system [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2007, 54(6 Pt 1): 1138-48.
- [6] PETTINGILL L N, WISE A K, GEANEY M S, et al. Enhanced auditory neuron survival following cell-based BDNF treatment in the deaf guinea pig [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18733.
- [7] REJALI D, LEE V A, ABRASHKIN K A, et al. Cochlear implants and *ex vivo* BDNF gene therapy protect spiral ganglion neurons [J]. Hear Res, 2007, 228(1/2): 180-7.
- [8] 王新兰,田海月,钟翠萍,等.基因与干细胞治疗感音神经性 聋的研究现状[J]. 中华耳科学杂志(WANG X L, TIAN H Y, ZHONG C P, et al. Research status of gene and stem cell therapy for sensorineural hearing loss [J]. Chin J Otology), 2020, 18(2): 404-8.

- [9] CHOI M Y, YEO S W, PARK K H. Hearing restoration in a deaf animal model with intravenous transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427(3): 629-36.
- [10] 黄少鹏, 王晓燕, 方超, 等. 过表达CXCR4的骨髓间充质干细胞 移植对抗庆大霉素耳毒作用的研究 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外 科杂志(HUANG S P, WANG X Y, FANG C, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing CXCR4 against gentamicin ototoxicity [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery), 2018, 32(5): 355-9.
- [11] EVANS A J, THOMPSON B C, WALLACE G G, et al. Promoting neurite outgrowth from spiral ganglion neuron explants using polypyrrole/BDNF-coated electrodes [J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 91(1): 241-50.
- [12] ERNFORS P, VAN DE WATER T, LORING J, et al. Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development [J]. Neuron, 1995, 14(6): 1153-64.
- [13] FRITZSCH B, NICHOLS D H, ECHELARD Y, et al. Development of midbrain and anterior hindbrain ocular motoneurons in normal and Wnt-1 knockout mice [J]. J Neurobiol, 1995, 27(4): 457-69.
- [14] 管明, 徐娅苹, 雷云秋, 等. 骨髓间充质干细胞分化为内耳毛细胞前体细胞的研究[J]. 浙江医学(GUAN M, XU Y P, LEI Y Q, et al. Study on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into the precursors of inner ear hair cells [J]. Zhejiang Medical Journal), 2010, 32(7): 1031-3,9.
- [15] GLUECKERT R, BITSCHE M, MILLER J M, et al. Deafferentation-associated changes in afferent and efferent processes in the guinea pig cochlea and afferent regeneration with chronic intrascalar brain-derived neurotrophic factor and acidic fibroblast growth factor [J]. J Comp Neurol, 2008, 507(4): 1602-21.
- [16] 郑丹丹, 叶景佳, 杨蓓蓓, 等. 同时表达活化型IGF1、EGF和 FGF2的慢病毒载体的构建[J]. 中国细胞生物学学报(ZHENG D D, YE J J, YANG B B, et al. Construction of a lentiviral vector expressing activated IGF1, EGF and FGF2 simultaneously [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2014, 36(11): 1497-505.
- [17] 赵振鹿,乔月华,丛涛,等. 耳蜗螺旋神经节细胞的损伤和再 生[J]. 中华耳科学杂志(ZHAO Z L, QIAO Y H, CONG T, et al. Damage and regeneration of spiral ganglion cells in cochlea [J]. Chin J Otology), 2016, 14(1): 43-8.
- [18] HU Z, ULFENDAHL M, OLIVIUS N P. NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear [J]. Neurobiol Dis, 2005, 18(1): 184-92.
- [19] QUN L X, PIRVOLA U, SAARMA M, et al. Neurotrophic factors in the auditory periphery [J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 884: 292-304.
- [20] 彭韬, 高水超, 周媛, 等. 骨髓间充质干细胞治疗感音神经性耳 聋相关实验技术体系建设概要[J]. 中华耳科学杂志(PENG T, GAO S C, ZHOU Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of sensorineural hearing loss [J]. Chinese Journal of Audiology), 2017, 15(3): 350-6.
- [21] FRITZ J M, DWYER-NIELD L D, MALKINSON A M. Stimulation of neoplastic mouse lung cell proliferation by alveolar macrophage-derived, insulin-like growth factor-1 can be blocked by inhibiting MEK and PI3K activation [J]. Mol Cancer, 2011, 10: 76.

- [22] ZHOU Y, LI S, LI J, et al. Effect of microRNA-135a on cell proliferation, migration, invasion, apoptosis and tumor angiogenesis through the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(4): 1431-46.
- [23] FAN J M, ZHENG Z R, ZENG Y M, et al. MiR-323-3p targeting transmembrane protein with EGF-like and 2 follistatin domain (TMEFF2) inhibits human lung cancer A549 cell apoptosis by regulation of AKT and ERK signaling pathways [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e919454.
- [24] XIE J, JIN B, LI D W, et al. Effect of laminin-binding BDNF on induction of recurrent laryngeal nerve regeneration by miR-222 activation of mTOR signal pathway [J]. Am J Transl Res, 2015,

7(6): 1071-80.

- [25] ATTIAH D G, KOPHER R A, DESAI T A. Characterization of PC12 cell proliferation and differentiation-stimulated by ECM adhesion proteins and neurotrophic factors [J]. J Mater Sci Mater Med, 2003, 14(11): 1005-9.
- [26] CHENG L, MUROI M, CAO S, et al. 3beta,23,28-trihydroxy-12-oleanene 3beta-caffeate from desmodium sambuense-induced neurogenesis in PC12 cells mediated by ER stress and BDNF-TrkB signaling pathways [J]. Mol Pharm, 2019, 16(4): 1423-32.
- [27] SHI L, YUE J, YOU Y, et al. Dok5 is substrate of TrkB and TrkC receptors and involved in neurotrophin induced MAPK activation [J]. Cell Signal, 2006, 18(11): 1995-2003.