

· 论 著 ·

## GDNF 基因修饰的 BMSCs 对大鼠缺氧复氧神经细胞凋亡的实验研究\*

高小青<sup>1</sup>, 周玲<sup>2</sup>, 杜杰<sup>3</sup>, 杨朝鲜<sup>1△</sup>

(泸州医学院: 1. 神经生物学研究室; 2. 附属医院内分泌科; 3. 教务处, 四川 646000)

**摘要:**目的 研究腺病毒介导的外源性胶质细胞源性神经生长因子(GDNF)基因在大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)中的表达及其对缺氧复氧神经细胞凋亡的影响。方法 将 GDNF 基因重组腺病毒感染大鼠 BMSCs, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)技术检测外源性 GDNF 基因在 BMSCs 中的表达水平; 将 GDNF 基因修饰的 BMSCs 与缺氧复氧神经元共培养, 观察神经细胞的凋亡情况。结果 GDNF 基因感染组在感染后 3~12 d 能稳定表达 GDNF 蛋白, 空质粒载体感染组和未感染组基本上无 GDNF 蛋白的表达; 与 BMSCs 共培养组相比, BMSCs/GDNF 分泌的 GDNF 能显著降低缺氧复氧神经细胞的凋亡率(复氧 12 h 至 5 d,  $P < 0.05$ )。结论 腺病毒介导的基因感染技术能够有效地将 GDNF 基因转至 BMSCs 中, 表达和分泌有生物学活性的 GDNF 蛋白, 这为进一步研究 GDNF 基因修饰的 BMSCs 应用于中枢神经系统疾病的治疗研究奠定了基础。

**关键词:** 胶质细胞源性神经生长因子; 大鼠; 骨髓间充质干细胞; 神经细胞; 缺氧复氧

**中图分类号:** R742.05; R446.61

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2010)13-1634-03

## Effects of GDNF gene modified BMSCs on apoptosis of neurons induced by hypoxia reoxygenation\*

GAO Xiao-qing<sup>1</sup>, ZHOU Ling<sup>2</sup>, DU Jie<sup>3</sup>, et al.

(1. Department of Neurobiology; 2. Department of Endocrinology Affiliated Hospital; 3. Dean's Office, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To study the expression of exogenous glial cell line derived neurotrophic factor(GDNF) gene mediated by adenovirus in bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) of rats, and the effect of GDNF on apoptosis of neurons induced by hypoxia reoxygenation. **Methods** The expression level of exogenous GDNF gene in BMSCs was detected by Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) technology after GDNF gene recombinant adenovirus transfected BMSCs of rats; To observe apoptosis of hypoxia reoxygenation neurons when cocultured with GDNF gene modified BMSCs. **Results** GDNF gene infection group could express exogenous GDNF protein during the following 3-12 days, empty plasmid vector infection group and not infection group basically has not the expression of GDNF protein; compared to BMSCs group, GDNF secreted by BMSCs/GDNF could significantly reduce the apoptosis rate of hypoxia reoxygenation neurons(12 h to 5 d,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The gene infection technology mediated by adenovirus could effectively transfect GDNF gene to BMSCs, express and secrete bioactive GDNF protein, which will provide foundation for the further research GDNF gene modified BMSCs therapy of Central nervous system diseases.

**Key words:** glial cell line-derived neurotrophic factor; rat; bone marrow mesenchymal stem cells; neuron; hypoxia reoxygenation

胶质细胞源性神经生长因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是 Lin 等<sup>[1]</sup>于 1993 年从大鼠胶质细胞株 B49 中分离获得的一种多巴胺能神经元营养因子, 其相对分子质量为 20 KD, 以二硫键连接的二聚体形式存在, 属 TGF- $\beta$  超家族成员。研究表明, GDNF 不仅可促进多种神经元的存活与分化, 而且对多种原因造成的神经损伤具有明显的保护作用<sup>[2-5]</sup>。但 GDNF 作为一种外源的大分子蛋白质, 难以透过血脑屏障, 并且在体内容易降解, 故 GDNF 的基因治疗被认为是最有前途的给药途径。为此, 本实验利用骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的多向分化潜能和其作为基因治疗的良好载体的生物学特点, 将腺病毒介导的 GDNF 基因重组质粒感染 BMSCs, 检测外源性 GDNF 基因在 BMSCs 中的表达, 并初步探讨对缺氧复氧神经细胞凋亡的影响, 以期为进一步研究 GDNF 修饰的 BMSCs 移植治疗中枢神经系统疾病提供依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠由四川大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 和胰蛋白酶(Gibco), 胎牛血

清(Hyclone), ELISA 试剂盒(武汉博士德), 神经元培养基、神经生长添加物和青霉素-链霉素(美国 Sciencell 公司), 细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒(碧云天生物技术研究所), 双层培养板(美国 Corning 公司)。GDNF 重组腺病毒载体(pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-GDNF)由本研究室构建。

## 1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 的培养和纯化 取 SD 大鼠(100~120 g)引颈处死, 双后肢用 75%乙醇消毒并分离出双侧胫骨和股骨, 将两端骨骺剪除后, 用 DMEM/F12 培养液冲洗骨髓腔, 将骨髓冲洗液缓慢加入同体积的淋巴细胞分离液(密度为 1.077 g/cm<sup>3</sup>)上方, 2 000 r/min 离心 20 min, 收集交界面细胞层, 接种于含 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境中培养。24 h 换液以去除未贴壁的造血干细胞, 此后每 3~4 天换液 1 次, 待贴壁的成纤维样细胞达到 80%融合时按 1:2 传代。

1.2.2 实验分组 将第 3 代 BMSCs 接种( $1 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup>)入 6 孔培养板, 并随机分为 GDNF 基因感染组、空质粒载体感染组和未感染组; GDNF 基因感染组和空质粒载体感染组按感染后再培养的时间(3、6、9、12 d)分为 4 个亚组。待细胞生长到

\* 基金项目: 四川省科技厅基金资助项目(2006J13-005-1); 四川省教育厅基金资助项目(2006A155)。△ 通讯作者, 电话: 13882732407; E-mail: yangchaoxian2006@tom.com.

约 80% 融合时, GDNF 基因感染组每孔加入 1 : 50 稀释的 GDNF 重组腺病毒 (pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-GDNF) 上清液 0.5 mL (滴度为  $5.1 \times 10^8$  V. P./mL), 空质粒载体感染组加入 1 : 100 稀释的空载体重组腺病毒 (pAdEasy-1-pAdTrack-CMV) 上清液 0.5 mL (滴度为  $1.0 \times 10^9$  V. P./mL), 未感染组加入 PBS 液。不时缓慢晃动培养板, 孵育 3 h 后, 补足正常培养基继续培养 48 h, 然后在相应时间点收取细胞培养上清液。

**1.2.3 ELISA 定量检测 BMSCs 分泌的 GDNF 蛋白** 细胞培养上清液用 1 500 r/min 离心 10 min, 去除细胞和细胞残渣, 取 500  $\mu$ L 于  $-80^\circ\text{C}$  冷冻保存备用。上清液 GDNF 蛋白含量测定按 ELISA 试剂盒说明书操作。

**1.2.4 BMSCs/GDNF 对缺氧复氧神经细胞凋亡的影响**

**1.2.4.1 大脑皮质神经细胞的培养** 将 1 d 内新生大鼠用 75% 乙醇消毒, 断头取脑, 解剖显微镜下剥离软脑膜, 取大脑皮质并剪碎, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶,  $37^\circ\text{C}$  消化 20 min; 再加入含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养液终止消化, 1 000 r/min 离心 8 min, 吸去上清液, 加入 20% FBS 的 DMEM/F12, 重悬细胞, 静置 2 min; 取  $1 \times 10^6$  个细胞于 6 孔双层培养板的上层中培养, 24 h 全量换液, 改用为神经元培养基培养, 并加入终浓度为 10  $\mu$ mol/L 阿糖胞苷抑制胶质细胞生长, 3 d 后进行实验。

**1.2.4.2 大脑皮质神经细胞分组及缺氧复氧实验** 将培养的神经细胞随机分为 4 组: A 组 (正常对照组), 不进行缺氧复氧实验; B 组 (缺氧对照组), 不加入其他细胞, 仅作缺氧复氧培养; C 组 (共培养对照组), 加入 BMSCs 于双层培养板的下层进行共培养; D 组 (实验组): 加入 GDNF 修饰的 BMSCs 于双层培养板的下层进行共培养。将后 3 组神经细胞置于 94%  $\text{N}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、1%  $\text{O}_2$  的培养箱中缺氧 4 h 复氧继续培养, C 组和 D 组在神经细胞复氧 0 h 加入共培养细胞。各组均根据不同的培养时间分为 12 h 和 1、2、3、5 d 共 5 个亚组。

**1.2.4.3 Hoechst 33258 检测 BMSCs/GDNF 分泌的 GDNF 对神经细胞缺氧复氧后细胞凋亡的影响** 按细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒说明书操作, 荧光显微镜下观察并计数。

**1.3 统计学方法** 用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用配对 *t* 检验, 组内比较用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

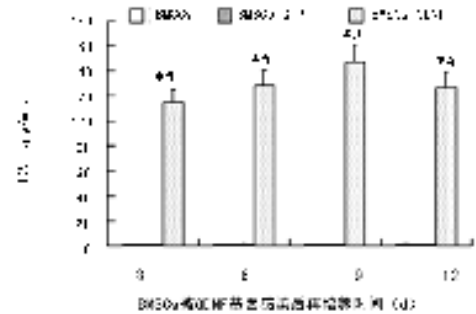
**2 结 果**

**2.1 BMSCs 的培养及腺病毒感染** 原代细胞接种 24 h 后换液可见少数贴壁细胞, 随着时间的推移和换液次数的增多, 悬浮的造血干细胞逐渐被清除, 贴壁细胞增多并形成集落; 细胞形态多样, 以梭形细胞为主, 也有多角形、圆形和星形细胞, 并可见长短不一的胞质突起。传代至第 3 代, 细胞形态较为一致, 主要为梭形成纤维细胞样形态 (封 3 彩图 1)。腺病毒感染 2 d 后, GDNF 基因感染组和空质粒载体感染组的 BMSCs 在荧光显微镜蓝色激光模块下均可观察到绿色荧光 (封 3 彩图 2), 而未感染组的 BMSCs 无此现象。

**2.2 ELISA 和免疫细胞化学检测 GDNF 蛋白的表达** GDNF 基因感染组细胞上清液中 GDNF 蛋白含量稳定在  $(129.28 \pm 12.39)$  pg/mL, 其随时间变化规律见图 3。空质粒载体感染组和未感染组 GDNF 蛋白表达基本呈阴性。GDNF 基因感染组与另两组相比, GDNF 蛋白表达的差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但组内相邻两时间点比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

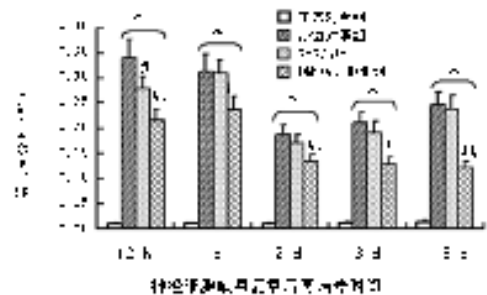
**2.3 BMSCs/GDNF 分泌的 GDNF 对神经细胞缺氧复氧后细胞凋亡的影响** 原代培养的神经细胞随着培养时间的增加, 突

起明显伸长, 第 3 天后神经细胞突起开始相互交织形成网状 (封 3 彩图 4), 经缺氧复氧处理将引起大量细胞凋亡 (封 3 彩图 5, 图 6)。由图 6 可知, 与 B 组相比, BMSCs 共培养仅在 12 h 时间点能降低缺氧复氧神经细胞的凋亡率; 与 C 组相比, BMSCs/GDNF 分泌的 GDNF 能显著降低缺氧复氧神经细胞的凋亡率 (12 h 至 5 d,  $P < 0.05$ )。



与 BMSCs 组比较, \* :  $P < 0.05$ ; 与 BMSCs/GFP 组比较, # :  $P < 0.05$ 。

**图 3 GDNF 基因修饰的 BMSCs 分泌 GDNF 蛋白的定量分析**



与正常对照组比较, \* :  $P < 0.05$ ; 与缺氧对照组比较, # :  $P < 0.05$ ; 与 BMSCs 组比较, ## :  $P < 0.05$ 。

**图 6 神经细胞缺氧 4 h 复氧 12 h 至 5 d 细胞凋亡百分率**

**3 讨 论**

中枢神经系统疾病的基因治疗是近年来神经科学研究领域最具活力的研究方向之一, 目前基因治疗常用的载体干细胞主要有胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC)、神经干细胞 (neural stem cell, NSC) 和 BMSCs 等。由于 ESC 和 NSC 在研究或将来的临床应用中会不可避免地遇到供体来源困难、排斥反应及伦理学等问题, 使其很难广泛应用于临床<sup>[6]</sup>; BMSCs 则具有来源广泛、易于取材、外源基因耐受性好、无宿主的免疫排斥反应和可自体移植等优点, 并且在一定条件下可以定向分化为神经细胞<sup>[7]</sup>。因此, BMSCs 是一种极有前景的基因载体细胞。

本研究结果显示空质粒感染组和未感染组基本上不分泌 GDNF 蛋白, 而 GDNF 基因感染 BMSCs 3 d 后, 培养上清液中就分泌有 GDNF 蛋白, 以后逐渐升高, 第 9 天达峰值, 平均维持在  $(129.28 \pm 12.39)$  pg/mL 水平。高明勇等<sup>[8]</sup>将 GDNF 基因转染脊髓源神经干细胞, 转基因细胞 3 周内 GDNF 表达量稳定在  $(93.0 \pm 6.5)$  pg/mL 水平。推测 GDNF 表达量的差异可能与 GDNF 基因重组质粒的构建和载体细胞不同有关。

缺氧复氧触发一系列级联反应, 包括兴奋性谷氨酸毒性作用、细胞能量代谢障碍、钙离子超载、氧自由基生成和脂质过氧化等都能激活 Caspase, 最终导致神经元坏死或者凋亡<sup>[9]</sup>。其中凋亡是细胞程序性死亡, 是由基因控制的一个主动的、高度有序的死亡过程, 也是一种可以逆转的过程, 及时治疗可能逆

转这一过程,从而减轻功能损害<sup>[10]</sup>。以往研究显示 GDNF 可以通过多种途径抑制细胞凋亡,李昕华等<sup>[11]</sup>对脑缺氧大鼠给予 GDNF 治疗能使额叶皮层、海马的 Caspase-3 阳性细胞数明显减少。本实验结果显示神经细胞缺氧 4 h 复氧 12 h 至 5 d 时有大量细胞凋亡;与单纯 BMSCs 相比,GDNF 基因修饰的 BMSCs 与神经细胞共培养时能使其凋亡率明显降低,证实 BMSCs/GDNF 分泌的 GDNF 蛋白具有生物学活性。已有研究表明 BMSCs 在体外诱导培养中能分泌出脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种生长因子<sup>[12]</sup>。因此,如果将 GDNF 基因修饰的 BMSCs(BMSCs/GDNF)移植到中枢神经系统病变或损伤部位,BMSCs/GDNF 分泌的包括 GDNF 在内的多种细胞因子将改善病损部位的微环境和有利于残存神经细胞的存活。但感染 GDNF 基因后的 BMSCs 向神经细胞分化的潜力如何等问题,还需进一步鉴定和探索。

#### 参考文献:

- [1] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons[J]. *Science*, 1993, 260: 1130.
- [2] Brunet N, Tarabal O, Portero-Otin M, et al. Survival and death of mature avian motoneurons in organotypic slice culture: trophic requirements for survival and different types of degeneration[J]. *J Comp Neurol*, 2007, 501: 669.
- [3] Cheng H, Huang SS, Lin SM, et al. The neuroprotective effect of glial cell line-derived neurotrophic factor in fibrin glue against chronic focal cerebral ischemia in conscious rats[J]. *Brain Res*, 2005, 1033: 28.
- [4] Bakshi A, Shimizu S, Keck CA, et al. Neural progenitor cells engineered to secrete GDNF show enhanced survival,

neuronal differentiation and improve cognitive function following traumatic brain injury [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23: 2119.

- [5] 张恒, 骆文龙. GDNF 在面神经再生中的作用[J]. *重庆医学*, 2007, 36(1): 83.
- [6] Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349: 570.
- [7] Choi CB, Cho YK, Prakash KV, et al. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350: 138.
- [8] 高明勇, 郑启新, 肖建德, 等. 大鼠脊髓源神经干细胞胶质细胞源性神经营养因子基因转染实验研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(5): 474.
- [9] Blaine C, Whitea B, Jonathon M, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury[J]. *J Neurol Sci*, 2000, 179: 1.
- [10] Sanchez-Alonso JA, Lopez-Aparicio P, Recio MN, et al. Polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) induce apoptosis via Bcl-2, Bax and caspase-3 proteins in neuronal cell cultures[J]. *Toxicol Lett*, 2004, 153(3): 311.
- [11] 李昕华, 徐忠信, 王晓明, 等. 慢性脑缺血致认知功能障碍大鼠神经细胞 Caspase-3 表达及 GDNF 给药的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(3): 224.
- [12] Chen X, Katakowski M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69: 687.

(收稿日期: 2009-09-29 修回日期: 2010-03-08)

(上接第 1633 页)

幼儿抽取动脉血困难时,可用静脉血替代动脉血判断酸碱失衡,只是将静脉血参数按上述替换关系,变为动脉血参数。

**2.2 判断呼吸功能一定要用动脉血参数** 健康人动脉血  $PO_2$  ( $PaO_2$ ) 为 80~100 mm Hg, 静脉血  $PO_2$  ( $PvO_2$ ) 为 40 mm Hg, 但必须牢记  $PO_2$  有两个特点: (1)  $PaO_2$  正常参考值随着年龄增长而下降,其预计公式为  $PaO_2$  值(mm Hg) =  $102 - 0.33 \times$  年龄(岁)  $\pm 10.0$ , 提示老年人的  $PO_2$  较低,但低氧对机体损伤和判断呼吸衰竭的  $PaO_2$  标准对于任何年龄段患者均为  $PaO_2 < 60$  mm Hg, 这意味着老年人呼吸功能代偿能力差,易引起呼吸衰竭,如临床上常见老年患者高热、肺部感染等即可引起呼吸衰竭; (2)  $PvO_2$  受呼吸和循环功能双重影响,呼吸功能正常的患者,当休克微循环障碍时,由于血液在毛细血管停留时间延长、组织利用氧增加,可出现  $PaO_2$  正常,而  $PvO_2$  明显降低。因此,在判断呼吸功能时,一定要用  $PaO_2$ , 决不能用  $PvO_2$  替代。

### 3 经皮血氧饱和度( $StO_2$ )检测不能替代动脉血气分析检查

$StO_2$  监测已广泛应用于临床,在危重患者救治中发挥了重要作用,但必须牢记: $StO_2$  无正常参考值,个体间差异较大,但就个人而言,动态监测有非常重要价值。 $StO_2$  为 90% 时,  $PaO_2$  约为 60 mm Hg。因此,在监测时应将  $StO_2$  90% 作为判断有无呼吸衰竭的临界点。同时一定要牢记临床的 2 种情况:

(1) 危重患者监测过程中出现  $StO_2$  变化不大,但患者病情恶化,一定要想到  $PaCO_2$  升高的可能,必须及时进行动脉血气分析检查,排除  $PCO_2$  升高; (2) 休克患者  $StO_2$  监测没有意义。

#### 参考文献:

- [1] 钱桂生. 临床血气分析[M]. 北京:人民军医出版社, 2002: 133.
- [2] Ashbaugh DG, Bigelovv DR, Petty TL, et al. Acute respiratory distress in adult[J]. *Lancet*, 1967, 2: 319.
- [3] Petty TL. How we discovered acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 136: 602.
- [4] Qaartin AA, Compos MA, Maldonafu DA, et al. Acute lung injury out side of the ICU. Incidened in respiratory isolation on a general nare[J]. *Chest*, 2009, 135(2): 261.
- [5] 钟南山. 临床技术操作规范呼吸病学分册[J]. 北京:人民军医出版社, 2008: 74.
- [6] 钱桂生. 内科学与野战内科学[J]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 153.

(收稿日期: 2010-04-08 修回日期: 2010-05-30)