



论文

胶质源性神经生长因子在人胚胎神经干细胞中的表达调控

王淑艳, 任萍, 关云谦, 邹春林, 付琳琳, 张愚*

首都医科大学宣武医院, 北京市老年病研究所, 教育部神经变性病重点实验室, 细胞生物研究室, 北京 100053

* 联系人, E-mail: yaz@bjssap.org

收稿日期: 2011-09-13; 接受日期: 2012-09-02

摘要 胶质源性神经生长因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)对帕金森病等神经退行性疾病的治疗有广泛的应用前景, 而人胚胎神经干细胞已被证实是一种将 GDNF 安全而有效地携带到受损脑区的良好细胞载体. 本研究利用含有 GDNF 基因的可调控慢病毒载体转染人胚胎神经干细胞, 实现了 GDNF 在人胚胎神经干细胞在体外培养条件下的表达调控. 实验中首先利用含有 GDNF 基因的慢病毒载体成功转染人胚胎神经干细胞, 其中 GDNF 基因受四环素操纵子 7(tetracycline operator 7, tetO7)调控, 由延长因子 1(elongation factor 1, EF1- α)驱动; 转染后的神经干细胞经过潮霉素筛选后同时转入对下游基因起抑制作用的慢病毒载体 TTS(tetracycline repressor fusion protein, TTS), TTS 蛋白表达后可与 tetO7 相互作用抑制 GDNF 在人神经干细胞中的表达. 当加入强力霉素(doxycycline, DOX)后, TTS 与 tetO7 解离, GDNF 表达可恢复到未调控前水平. 转染 GDNF 后的人胚胎神经干细胞仍然表达神经干细胞特异性抗原 nestin, Sox2; 放线菌素 D 诱导凋亡后, 转染 GDNF 组较正常对照组凋亡细胞比例有显著降低; 同时, 转染 GDNF 的神经干细胞分化成神经元的比例有显著提高. 利用可调控的慢病毒调控 GDNF 在人胚胎神经干细胞中的表达为 GDNF 应用于神经退行性疾病的治疗提供了实验数据.

关键词神经干细胞
胶质源性神经营养因子
慢病毒载体
四环素调控

胶质源性神经营养因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)对多巴胺能神经元有特异性的营养作用^[1]. 帕金森动物模型实验和临床研究都表明在纹状体中注入 GDNF 能够阻止黑质多巴胺能神经元发生神经退行性变并促进其轴突生长^[2,3]. 但由于 GDNF 作为一种大分子蛋白难以通过血脑屏障, 其在临床应用方面的效果一直不尽人意. 目前已发现的几种将 GDNF 应用于帕金森病治疗的方法中, 以细胞作

为载体将 GDNF 注入病变部位被认为是一种最为有前景的方案. 人胚胎神经干细胞在体外分化和移植入动物模型脑内都具有分化成为神经元, 星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力^[4,5], 并能够很好的整合入移植宿主的脑区, 被认为是进行神经体系统修复和细胞替代治疗的理想选择^[6]. 几项利用过基因修饰后过表达 GDNF 的神经干细胞治疗帕金森病动物模型和脊髓侧索硬化动物模型的实验都表明, 人神经干细胞能够在

移植脑区内存活或并分泌 GDNF, 同时还能分化成不同的类型并且向其他部位迁移^[7-9].

尽管 GDNF 能够特异性地促进多巴胺能神经元存活, 但也有研究证实, 持续过量地表达 GDNF 会导致多巴胺能神经元轴突的异常增生和酪氨酸羟化酶表达量的降低^[10]. 因此, 在治疗性应用过程中控制 GDNF 在作用部位的表达量, 避免过量表达引发的副作用显得尤为重要. 而以经过 GDNF 基因修饰的细胞作为载体, 通过调控移植细胞的基因表达和蛋白分泌水平来实现应用剂量的调控被认为是一种较为理想的选择. 四环素操纵子开放(tetracycline on, tet-on)系统^[11]和四环素操纵子关闭(tetracycline off, tet-off)系统^[12]一直被广泛应用于基因表达调控的研究. tet-off 系统需要持续给予强力霉素来抑制目的基因的表达, 因此不适合用来控制 GDNF 的过量表达^[13]. tet-on 系统也一直存在一个难以克服的缺陷, 即在不给予强力霉素的情况下, 目的基因的表达不能完全被关闭, 存在一定的背景效应. 为精确可逆地控制 GDNF 的表达, 本实验选用了一种由 Zhou 等人^[14]利用四环素操纵子 7(tetracycline operator 7, tetO7)和一种四环素抑制蛋白复合物(tetracycline repressor fusion protein, TTS)相互作用的机制改建而来的新型慢病毒载体来尝试调控 GDNF 的表达. 该调控系统包含 2 种慢病毒载体, 一种载体表达 TTS 和红色荧光蛋白(red fluorescence protein, RFP), 另一种载体表达 GDNF(或 GFP)和潮霉素抗性基因. 当这 2 种载体同时转入细胞时, TTS 能够和 tetO7 结合, 抑制目的基因 GDNF(或 GFP)的表达. 加入 DOX 后, TTS 从 tetO7 上解离下来. 这一系统能因对目的基因调控的准确性和严格性被采用. 本研究探讨了应用上述可调控的慢病毒载体能否精确并可逆地控制 GDNF 在神经干细胞中的表达.

1 材料与方法

1.1 人胚胎神经干细胞的培养

人胚胎神经干细胞取材于孕 16 周流产胎儿前脑皮层区. 取材步骤简单概括如下: 新鲜取材的流产胎儿皮层脑组织用无菌剪刀剪切成直径约 1 cm 的组织块, 加入 0.05%胰酶(Invitrogen)置于 37℃ 水浴中消化 15 min, 加入等体积的胰酶抑制剂(Sigma)终止反应. 加入 DNA 酶 37℃ 作用 5 min 去除组织消化过程中释

放出的 DNA. 离心去除上清后加入神经干细胞培养液重悬组织块, 用剖光的巴斯特管反复吹打得到单细胞悬液. 所得细胞混悬液过 400 目滤网去除细胞团块. 胎盘蓝染色后计数, 以 2×10^5 个细胞/cm² 的密度接种, 培养 3~5 天后可见小的神经球形成, 培养 1 周后可以传代扩增. 神经干细胞培养液成分为 DMEM/F12 (Invitrogen), N2(Invitrogen), 20 ng/mL EGF(R&D), 20 ng/mL bFGF(R&D)和 1% BSA(Invitrogen). 培养过程中每 3 天半量换液 1 次. 诱导分化时, 将生长状态良好的神经干细胞接种到 PDL/laminin 包被的培养板中, 加入神经干细胞分化培养基培养 2 周, 分化培养基成分为 DMEM/F12 (Invitrogen), N2(Invitrogen), B27(Invitrogen)和 1% BSA(Invitrogen).

1.2 慢病毒包装和用病毒上清感染人胚胎神经干细胞

含 GDNF 的慢病毒载体由 DUET101 载体改建而来^[14], 慢病毒包装过程采用瞬时转染的方法完成. 转染前 1 天, 将 293T 细胞以 6×10^6 /100 mm 密度接种于多聚赖氨酸包被的培养皿中培养过夜. 质粒转染过程参照转染试剂 lipofectamine 2000(Invitrogen)的说明书进行. 首先, 慢病毒载体的质粒 DUET101-GDNF/DUET101-GFP/TTS 与包装质粒 CMV Δ 8.91 和 VSVG 以 3:4:1 的比例与脂质体混合后室温孵育 20 min, 随后将质粒 DNA 和脂质体混合物加到准备好的 293T 细胞中, 培养 8 h 后弃去上清, 换成含 DMEM/F12 (Invitrogen)和 ITS 的病毒上清收集培养基. 收集换液后 24 和 48 h 的病毒上清, 超滤管浓缩后保存于 -80℃. 浓缩后病毒转染人胚胎神经干细胞前进行了病毒滴度鉴定. 滴度鉴定方法如下: 转染前 1 天, 将 293T 细胞以 1×10^5 个细胞每孔(6 孔板)的密度接种于多聚赖氨酸包被的六孔板中, 培养过夜后加入浓缩的 DUET101-GFP 和 TTS 病毒上清和 8 μ g/mL 聚凝胺, 感染过夜后弃去含病毒上清的培养液, 加入新鲜培养基继续培养 48 h 后收集细胞进行流式细胞分析, 计数 GFP 和 RFP 阳性细胞比例. 病毒滴度被定义为平均每毫升病毒上清中含有多少个有效的病毒转染单位(transfection unit, TU). 假设流式分析结果为 10% 293T 细胞为 GFP 阳性, 转染时加入的病毒上清为 20 μ L, 那么该病毒上清的滴度 = $10\% \times$ 目的细胞数 (2×10^5 293T 细胞, 假设 293T 细胞在转染时扩增了 1 倍)/0.02 mL = 1×10^6 TU/mL. 确定了病毒滴度后, 分

别按不同感染拷贝数(multiplicity of infection, MOI)感染了人胚胎神经干细胞. 感染前 1 天, 用 Accutase 将神经球消化成单细胞, 以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于六孔板中, 培养 72 h 后加入病毒上清和 $4 \mu\text{g/mL}$ 凝聚胺. 感染 24 h 后换成新鲜培养基. MOI 的计算方法为病毒的有效转染单位与细胞数目的比值(细胞数目为起始接种数目的 2 倍). 感染后细胞扩增两代后加入 $100 \mu\text{g/mL}$ 潮霉素进行筛选, 获得转染成功的人胚胎神经干细胞系用于 GDNF 表达量和生物学特性分析. 为调控 GDNF 在人胚胎神经干细胞中的表达, 经过筛选的神经干细胞再转染含有 TTS 和 RFP 的另一种病毒上清. 转染方法同上所述. 同时转染 DUET101-GDNF 和 TTS 载体的神经干细胞被用来做后续 GDNF 调控实验的数据分析.

1.3 DOX 酶联免疫吸附(ELISA)实验

实验前, 以合适密度接种相同数量的转染 GDNF 的人胚胎神经干细胞, 分别在培养后 24 和 48 h 收集不同转染拷贝数组细胞的培养上清液用于 ELISA 的检测. 为检测转染后细胞能否连续性表达分泌 GDNF, 分别收集了转染后 3, 7, 14, 21 和 40 天时相同数量细胞同一培养时间内的培养上清, 用于后续的 ELISA 检测. GDNF 表达调控实验中, 分别收集了转入 TTS 病毒上清后第 1, 3, 5 天时培养上清用于 ELISA 检测; 同时也测定了转染 TTS 后, 分别收集加入不同剂量的 DOX(2, 5, 10, 20, 50 ng/mL)后 1, 3, 5, 7, 9 天时相同数量相同时间内 GDNF 的分泌量. 培养上清中 GDNF 分泌量用 GDNF Immunoassay Kit (Promega)进行测定, 具体步骤参照产品说明书.

1.4 实时定量 PCR

用 Trizol(Invitrogen)裂解法处理不同实验组神经干细胞, 提取总 RNA, 用无 RNA 酶的 DNA 酶处理所得总 RNA 去除基因组 DNA 污染. 取 $2 \mu\text{g}$ RNA 用 Superscript II(Invitrogen)进行逆转录反应, 操作步骤参照说明书进行. 实时定量 PCR 用 SYBR Green Premix Taq kit(TaKaRa)完成. 内参为 18S RNA, GDNF 和 18S RNA 的 PCR 引物序列见表 1. 不同实验组件 GDNF 表达量分析采用内参校正后 C_t 值的对比分析完成.

1.5 细胞免疫组化

取正常转染前后和分化 2 周的神经干细胞, 弃去

表 1 实时定量 PCR 引物序列

引物名称	引物序列 5'→3'
GDNF forward	ACTGACTTGGGTCTGGGCTATG
GDNF reverse	TTTGTCACCTACCAGCCTTCTATTT
Human 18S forward	ACTCAACACGGGAAACCTCA
Human 18S reverse	AACCAGACAAATCGCTCCAC

原有培养基, 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 次, 加入 4%多聚甲醛室温固定 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入 3%驴血清和 0.1% Triton 的 PBS 在室温下封闭 1 h, 分别加入一抗 4℃孵育过夜, 一抗稀释比例为 nestin (1:400, chemicon), Tuj-1(1:200, Chemicon), GFAP (1:200, Chemicon). PBS 洗 3 遍后加入羊抗鼠和羊抗兔的荧光二抗 Cy3(Jackson)和 Cy2(Jackson). PBS 漂洗 3 遍, 加入 DAPI(1:500; Jackson)进行细胞核染色.

1.6 细胞凋亡检测

转染组和未转染组的神经干细胞中加入具有诱导凋亡作用的防线菌素-D($1 \mu\text{mol/L}$)作用 12 h. 处理后细胞用细胞凋亡检测试剂盒(Invitrogen)进行 Annexin V 和 PI 染色, 流式细胞学对比分析转染组和未转染组 Annexin V 阳性细胞即凋亡细胞的百分比. 具体操作过程参照试剂盒说明书进行.

2 结果

2.1 感染 DUET101-GDNF 的人胚胎神经干细胞 GDNF 的表达分泌量明显高于对照组且随 MOI 值增加成比例提高

实验中构建的慢病毒载体中 GDNF 基因由 EF-1 α 驱动, 受四环素操纵子 tetO7 调控, 载体可以同时表达潮霉素抗性基因, 可以在感染成功后用潮霉素进行筛选, 载体示意图见图 1A. 病毒包装后首先用浓缩的 DUET101-GFP 病毒上清转染 293T 细胞, 分析了 GFP 阳性细胞的比例, 进行了病毒滴度测定, 所得病毒滴度约为 5×10^7 TU/mL. 首先, 利用已知病毒滴度的 DUET101-GFP 病毒进行了不同转染拷贝数的转染(0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10), 流式细胞学方法分析转染后 GFP 阳性细胞比例为 44.5%(MOI=1), 如图 1E 所示. 转染后细胞加入潮霉素筛选后分析 GFP 阳性细胞比例为 99.5%, 如图 1F 所示. 这表明经过潮霉素筛选可以得到较纯的转染成功人胚胎神经干细胞系, 相同条

件下转染 DUET101- GDNF 病毒上清的神经干细胞经过潮霉素筛选后分别进行了不同转染拷贝数(MOI=0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10)组培养上清中 GDNF 含量的测定, ELISA 检测的结果表明, 相同时间相同数量的人胚胎神经干细胞感染 DUET101-GDNF 后 GDNF 分泌量明显高于对照组(MOI=0), 且随着转染拷贝数 MOI 值的增加, GDNF 分泌水平也成比例升高, 统计学分析有显著性差异(* $P<0.01$; 图 2A). 用实时定量 PCR 方法分析不同转染拷贝数组 GDNF 基因 mRNA 表达水

平, 结果表明, 转染 DUET101-GDNF 能够显著提高 GDNF 基因的 mRNA 表达水平, MOI 值越高, GDNF 基因 mRNA 表达水平越高(* $P<0.01$; 图 2B). 为观察转染后神经干细胞是否能够长期稳定表达和分泌 GDNF, 本实验对筛选后不同转染拷贝数组细胞的 GDNF 分泌水平进行了连续性测定. 结果表明, 接种后第 3, 7, 14, 21 和 40 天时, 转染组 GDNF 的分泌维持在相对稳定的水平, 分泌量明显高于对照组, 且 MOI 值越高, GDNF 分泌量越大(图 2C). 上述实验结果表明,

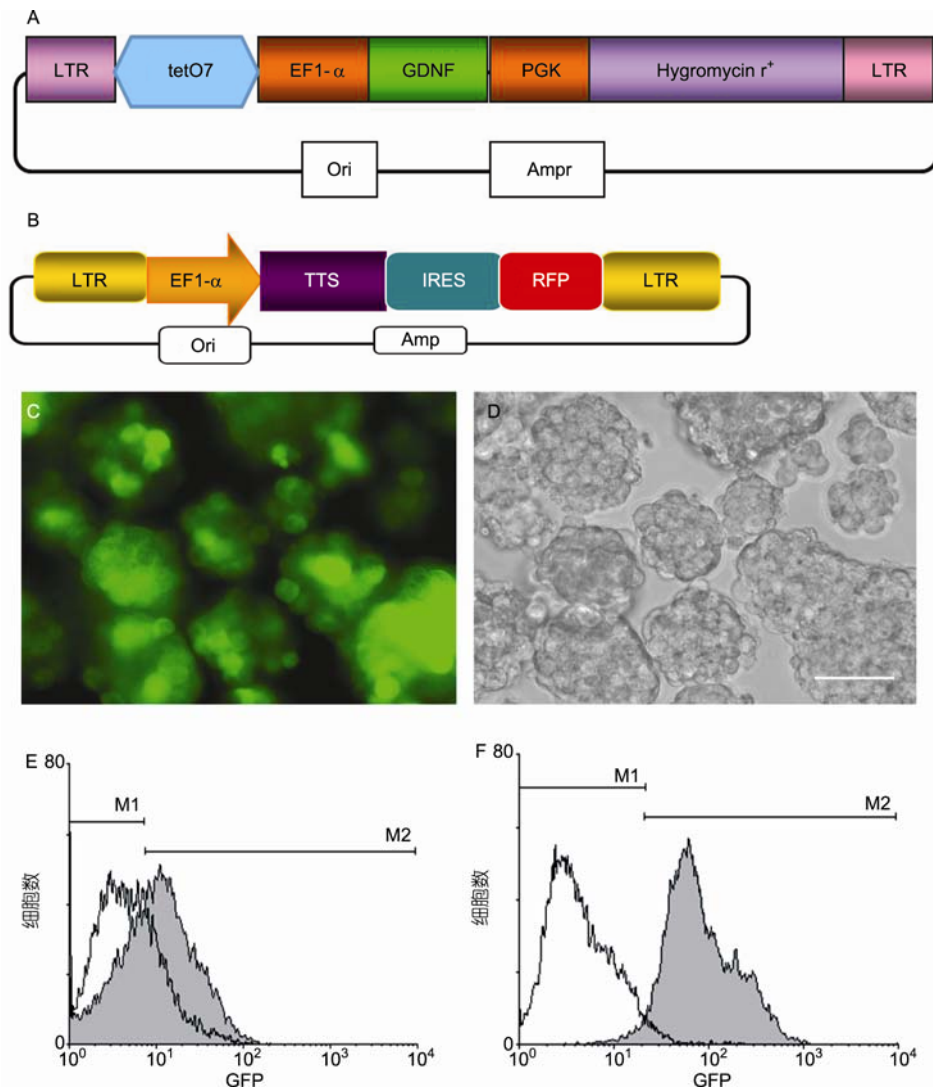


图 1 GDNF 可调控慢病毒载体的结构示意图和转染效率测定

A: 慢病毒载体 DUET101-GDNF 同时表达 GDNF 和潮霉素抗性基因, 二者分别由启动子 EF1- α 和 PGK 驱动. 在启动子 EF1- α 上游插入了四环素操纵子 tetO7; B: TTS 载体表达 TTS 蛋白(四环素抑制蛋白和 KRAB 结构的融合蛋白)和红色荧光蛋白; C: 感染 DUET101-GFP 的神经球光镜下形态; D: 感染 DUET101-GFP 的神经球在荧光显微镜下观察呈 GFP 阳性; 标尺: 50 μm ; E: 潮霉素筛选前, 流式细胞学分析, 约 44.5% 细胞为 GFP 阳性; F: 潮霉素筛选后, 约 99.5% 的细胞为 GFP 阳性

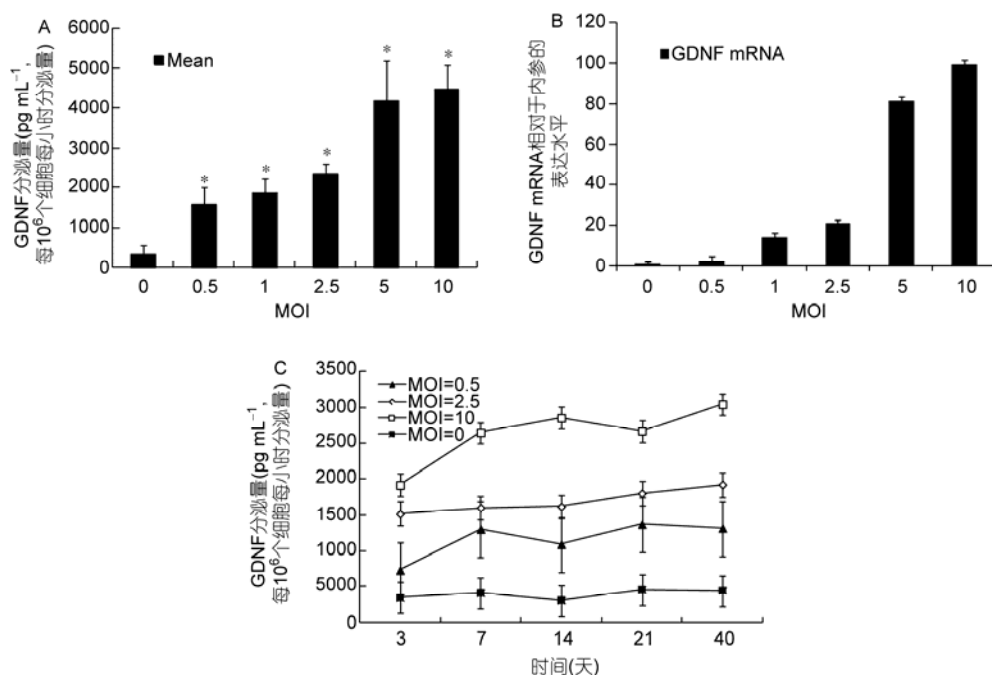


图2 感染 DUET101-GDNF 的人胚胎神经干细胞 GDNF 表达量显著提高且表达水平的高低与转染拷贝数呈正相关

A: ELISA 方法分析转染不同拷贝数 DUET101-GDNF 病毒上清的人胚胎神经干细胞培养基中 GDNF 的分泌量. 与未转染组相比, 转染 DUET101-GDNF 后, 人胚胎神经干细胞 GDNF 分泌量较未转染组有显著提高, 且随转染拷贝数增加, GDNF 分泌量也逐渐增加(ANOVA 分析, $*P<0.01$); B: 实时定量 PCR 方法检测不同转染拷贝数 GDNF 基因 mRNA 的表达水平, 转染 DUET101-GDNF 病毒上清后, 人胚胎神经干细胞 GDNF 的 mRNA 表达水平经内参校正后较对照组有显著提高, 且与 MOI 值呈正相关, MOI 值越高, GDNF mRNA 表达水平越高(ANOVA 分析, $*P<0.01$); C: 转染 DUET101-GDNF 后连续 40 天内对不同转染拷贝数组 GDNF 分泌量的连续监测. 转染后, 人胚胎神经干细胞能够持续稳定的分泌 GDNF, 其分泌量未发生明显变动

人胚胎神经干细胞感染慢病毒载体 DUET101-GDNF 后, 其 GDNF 分泌水平显著性提高, 与转染拷贝数成正相关. 转染后细胞可以经过抗生素筛选获得纯的高表达 GDNF 的人胚胎神经干细胞系, 能够稳定持续的表达分泌 GDNF, 为以神经干细胞作为细胞载体, 进行 GDNF 表达量的调控奠定了实验基础.

2.2 人胚胎神经干细胞中 GDNF 表达分泌的严格调控

在获得了纯的高表达 GDNF 的人胚胎神经干细胞系的基础上, 将 TTS 载体转入该细胞系, 进行了 GDNF 在该细胞中的表达调控研究. TTS 载体中含有一种融合蛋白 TTS 和 RFP, 其中 TTS 中含有四环素抑制蛋白 tetR(tetracycline repressor protein, tetR), 其结构如图 1B 所示. 实验结果表明, TTS 病毒上清感染成功后, 人胚胎神经干细胞荧光显微镜下观察呈 RFP 阳性(图 3A 和 B). 将转染后神经球打散成单细胞, 荧光显微镜下观察和流细胞学分析表明, 约 96.65%

细胞为 RFP 阳性(图 3C 和 D). 以上结果证明, 所得人胚胎神经干细胞同时转入了 DUET101-GDNF 和 TTS 两种慢病毒载体. 理论上讲, 在不存在 DOX 的情况下, TTS 蛋白中的 tetR 可以与 DUET101-GDNF 载体启动子上游的四环素操纵子 tetO7 结合, 抑制 GDNF 基因的表达. 实验中收集了转入 TTS 载体后第 1, 3 和 5 天培养上清, 用 ELISA 方法测定了其中 GDNF 的含量. 结果表明, 转入 TTS 载体后第 1 天 GDNF 分泌量就有显著下降, 在第 3~5 天时, 其分泌量已经与未转染细胞分泌量相近(图 3F), 说明转入 TTS 载体能够抑制 GDNF 在人胚胎神经干细胞中的表达. 当加入 DOX 后, 可以促使 TTS 从 tetO7 上解离下来, GDNF 的表达被恢复. 在确认 GDNF 的表达被抑制后, 在培养基中加入了不同剂量的 DOX(2, 5, 10, 20, 50 ng/mL), 收集了加入后第 1, 3, 5, 7, 9 天时的培养上清并进行了 GDNF 蛋白的 ELISA 检测. 实验结果表明, 加入 5 ng/mL 及以上的 DOX 后培养上清中的 GDNF 分泌量逐渐升高, 在加入 DOX 后第 7 天 GDNF 的分

泌量恢复到未转入 TTS 载体时的分泌水平, 进入稳定分泌的平台期(图 3G). 转入 DUET101-GFP 和 TTS 的对照组细胞在加入 DOX 后荧光显微镜下观察, 也

可以观察到部分细胞由 RFP 阳性转变为 GFP 阳性(图 3E). 在去除 DOX 后, *GDNF* 的表达会再次被快速抑制. 这种调控过程可以被多次重复. 上述实验结果说

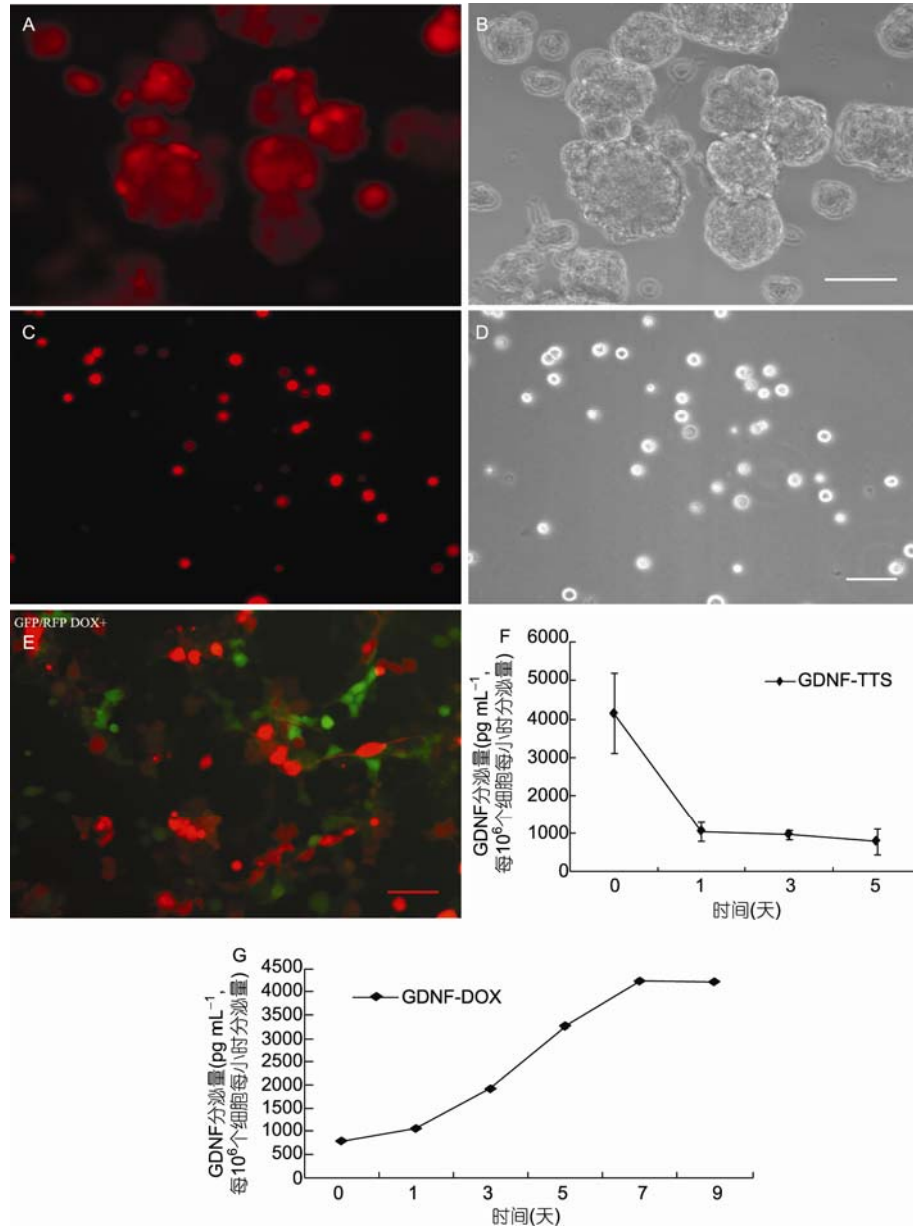


图 3 利用可调控慢病毒载体严格调控 *GDNF* 在人胚胎神经干细胞中的表达

A: 荧光显微镜下观察, 感染了 DUET101-GDNF 病毒上清的神经干细胞再次感染 TTS 载体病毒上清后, 呈 RFP 阳性; B: 与图 A 相同视野下神经球光镜下形态; 标尺: 50 μ m; C: 转染 TTS 后神经球打散成单细胞荧光显微镜下观察, 90% 以上的细胞为 RFP 阳性; D: 与图 C 相同视野神经球打散所得单细胞光学显微镜下形态; 标尺: 100 μ m; E: 在给予 DOX 后, 同时转染 DUET101-GFP 和 TTS 载体的对照组神经干细胞由 RFP 阳性逐渐转变为 GFP 阳性; F: ELISA 法分析转入 TTS 载体后 DUET101-GDNF 感染组人胚胎神经干细胞 *GDNF* 分泌情况. 成功感染 DUET101 载体的人胚胎神经干细胞在转入 TTS 载体后 *GDNF* 分泌水平较转染前显著降低, 并在 TTS 转入后 48 h 下降到相同条件下未转染组 *GDNF* 分泌水平; G: ELISA 法分析给予 DOX 后人胚胎神经干细胞 *GDNF* 分泌水平的变化. 在同时转染 DUET101-GDNF 和 TTS 的人胚胎神经干细胞培养基中加入 5 ng/mL 及以上浓度的强力霉素 DOX 后, 其 *GDNF* 分泌水平会逐渐升高, 在 DOX 加入后 5~7 天, *GDNF* 分泌升高到为转染 TTS 前水平, 进入稳定分泌的平台期

明, 通过转入 DUET101-GDNF 和 TTS 两种慢病毒载体, *GDNF* 在神经干细胞中的表达可以通过 DOX 被抑制和恢复进行严格的调控。

2.3 感染 DUET101-GDNF 的人胚胎神经干细胞较未感染组相比抗凋亡能力显著性增加且向神经元方向分化的能力显著提高

为检测高表达 *GDNF* 是否对人胚胎神经干细胞的生物学特性有影响, 本实验对比分析了转染 DUET101-GDNF 前后细胞的特异性抗原表达情况、细胞增殖情况、抗凋亡情况和分化情况。免疫组化实验结果表明, 高表达 *GDNF* 的人胚胎神经干细胞仍然表达神经干细胞特异性表达的抗原 nestin 和 sox2, 增殖速度和增殖细胞比例与未转染组无显著性差异。放线菌素诱导凋亡实验结果表明, 高表达 *GDNF* 的神经干细胞 Annexin V 阳性细胞的比例明显低于未转染组(* $P < 0.01$; 图 4A), 说明转染 *GDNF* 的人胚胎神经干细胞具有更强的抗凋亡能力。神经干细胞自然分化实验结果表明, 高表达 *GDNF* 的神经干细胞分化成为 Tuj-1 阳性神经元的比例明显高于未转染组(* $P < 0.05$; 图 4B)。上述实验结果表明, 高表达 *GDNF* 对人胚胎神经干细胞抗原表达和增殖特性无显著性影响, 但可以提高其抗凋亡的能力和向神经元方向分化的能力, 对神经干细胞在神经退行性疾病治疗中的应用具有积极影响。

3 讨论

鉴于 *GDNF* 对黑质多巴胺能神经元的营养功能

和保护作用, 很多研究小组都在试图寻找一种安全而有效的方法使 *GDNF* 能够避开全身应用难以通过血脑屏障的局限直接作用到受损脑区, 这种方法应同时能对 *GDNF* 的作用剂量和作用时间进行调控以避免过量的应用带来的副作用^[15]。与脑组织具有良好相容性的神经干细胞载体被认为具有很好的应用前景。本研究表明, 利用可调控的慢病毒载体可以严格调控 *GDNF* 基因在人胚胎神经干细胞中的表达。实验结果提示, *GDNF* 分泌量和转染拷贝数成正相关, 即通过控制人胚胎神经干细胞感染过程中含 *GDNF* 基因慢病毒载体的病毒颗粒数来控制 *GDNF* 的总体分泌水平, 可以作为利用细胞载体携带 *GDNF* 时, 选择合适 MOI 值和控制合适剂量的参考依据。所用慢病毒载体中含有由 DOX 调控的四环素调控元件, 可以对感染细胞中 *GDNF* 的表达进行可重复性的调控, 利用这一特点, 可以根据治疗需要来决定 *GDNF* 给予的剂量和时间, 从而避免 *GDNF* 持续和过量应用带来的副作用。该慢病毒调控体系是在四环素操纵子的基础上改建而来的, 利用由 KRAB 结构和 tetR 的融合蛋白 TTS 作为抑制性作用元件, 通过与 tetO7 结合抑制 *GDNF* 的表达。在给予 DOX 后, 通过 TTS 和 tetO7 的解离来开启 *GDNF* 的表达。有研究表明, KRAB 结构介导的抑制性调控具有更强的敏感性, 能够避免调控过程中由于疏漏和非特异性带来的不良影响^[16-18]。实验中发现, 应用该系统调控 *GDNF* 在人胚胎神经干细胞中的表达, 未加入 DOX 的情况下, *GDNF* 的表达被严格抑制在未转染 DUET101 载体前的分泌水平; 给予 DOX 后, *GDNF* 的表达水平逐渐稳步升高, 在 5~7 天后达到稳定分泌的平台期,

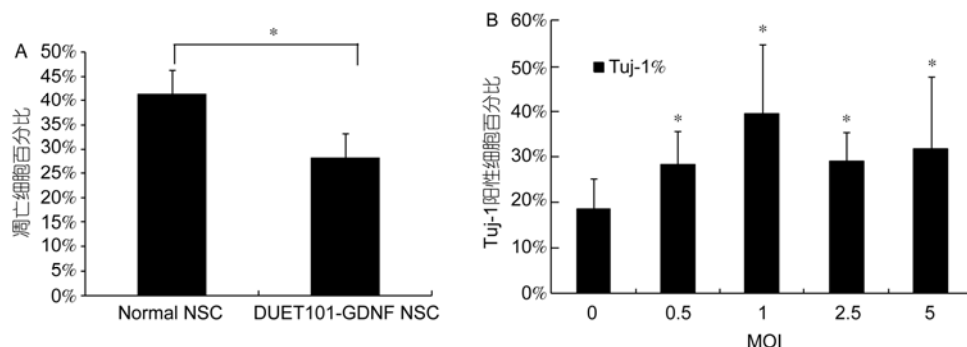


图4 过表达 *GDNF* 的人胚胎神经干细胞表现出更强的抗凋亡能力和向神经元方向分化的能力

A: 流式细胞学分析放线菌素 D 诱导凋亡后 Annexin V 阳性细胞的比例。放线菌素 D 处理后流式细胞学分析结果表明, 转染 DUET101-GDNF 的人胚胎神经干细胞 Annexin V 阳性细胞比例较未转染组降低约 13.2%, * $P < 0.01$; B: 免疫组化方法分析 tuj-1 阳性细胞比例对比转染前后人胚胎神经干细胞向神经细胞方向分化的能力。转染 DUET101-GDNF 的人胚胎神经干细胞在自然诱导分化后分化成为 tuj-1 阳性细胞的比例明显高于未转染组; ANOVA 分析, * $P < 0.05$

整个调控过程灵敏有效而严格. *GDNF* 在人胚胎神经干细胞中的表达调控研究为其进一步的临床应用奠定了实验基础.

由于慢病毒载体属于逆转录病毒, 其载体序列和外源基因会整合到宿主的基因组 DNA 中, 因此利用慢病毒载体进行各种形式基因治疗的安全性问题一直存在很多争议. 在对比分析过表达 *GDNF* 前后人胚胎神经干细胞生物学特性的实验中, 其抗原表达情况和增殖特性未发生显著性变化, 说明转入含 *GDNF* 基因的慢病毒载体是想对安全的方法, 并没有改变人胚胎神经干细胞的基本生物学特性. 也曾有

大量研究报道利用慢病毒载体介导的基因治疗并未引起动物模型发生显著的病理学改变和免疫反应的发生^[19]. 且研究发现, 高表达 *GDNF* 的人胚胎神经干细胞其对放线菌素诱导的细胞凋亡有更强的保护作用, 并在诱导分化实验中表现出更强的向神经元方向分化的能力, 原因可能是由于 *GDNF* 作为一种神经营养因子能够对凋亡的神经干细胞和诱导分化的早期神经元起到保护作用 and 神经营养作用. 如果将这种高表达 *GDNF* 的神经干细胞移植入帕金森动物模型的受损部位, 对于移植细胞的存活和向神经细胞方向分化都具有非常积极的影响.

参考文献

- 1 Lin L F, Doherty D H, Lile J D, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 1993, 260: 1130–1132
- 2 Kordower J H, Emborg M E, Bloch J, et al. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, 2000, 290: 767–773
- 3 Gill S S, Patel N K, Hotton G R, et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med*, 2003, 9: 589–595
- 4 Svendsen C N, Clarke D J, Rosser A E, et al. Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol*, 1996, 137: 376–388
- 5 Carpenter M K, Cui X, Hu Z Y, et al. *In vitro* expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol*, 1999, 158: 265–278
- 6 Svendsen C N, Caldwell L M A, Shen J, et al. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 1997, 148: 135–146
- 7 Klein S M, Behrstock S, McHugh J, et al. Neurospheres modified to produce glial cell line-derived neurotrophic factor increase the survival of transplanted dopamine neurons. *J Neurosci Res*, 2002, 69: 955–965
- 8 Klein S M, Behrstock S, McHugh J, et al. GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gene Ther*, 2005, 16: 509–521
- 9 Behrstock S, Ebert A, McHugh J, et al. Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to Parkinsonian rodents and aged primates. *Gene Ther*, 2006, 13: 379–388
- 10 Georgievska B, Kirik D, Bjorklund A, et al. Aberrant sprouting and downregulation of tyrosine hydroxylase in lesioned nigrostriatal dopamine neurons induced by long-lasting overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in the striatum by lentiviral gene transfer. *Exp Neurol*, 2002, 177: 461–474
- 11 Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 1995, 268: 1766–1769
- 12 Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5547–5551
- 13 Koponen J K, Kankkonen H, Kannasto J, et al. Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2^S-M2 shows a tight control of gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther*, 2003, 10: 459–466
- 14 Zhou B Y, Ye Z H, Gao P, et al. Inducible and reversible transgene expression in human stem cells stably transduced by novel lentiviral vectors. *Stem Cells*, 2006, 24: 779–789
- 15 Kirik D, Georgievska B, Bjorklund A, et al. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 2004, 7: 105–110
- 16 Judith F M, Josh R F, Wolfram K H, et al. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4509–4513
- 17 Deuschle U, Meyer W K, Thiesen H J. Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 1907–1914
- 18 Moosmann P, Georgiev O, Thiesen H J, et al. Silencing of RNA polymerases II and III-dependent transcription by the KRAB protein domain of KOX1, a Kruppel-type zinc finger factor. *Biol Chem*, 1997, 378: 669–678
- 19 Mark A K, Joseph C G, Luigi N. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, 2001, 7: 33–40