

干细胞研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000347

转染 CX3CR1 基因对小鼠骨髓间充质干细胞
向 Fractalkine 趋化能力的影响

郭晓书, 李法琦

(重庆医科大学附属第一医院老年科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究在 Transwell 共培养体系中, 转染 CX3CR1 基因对小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向趋化因子 Fractalkine(FKN)趋化能力的影响。**方法:**采用差速贴壁法分离纯化小鼠 MSCs, 体外培养、传代扩增, 流式细胞术检测细胞表面抗原标志和细胞周期; 将携带有趋化因子受体 CX3CR1 基因及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的慢病毒(LV-CX3CR1-EGFP)及空载体慢病毒(LV-CON-EGFP)转染小鼠 MSCs 细胞, RT-PCR 法分别检测空白对照组、实验组、阴性对照组细胞中 CX3CR1 mRNA 表达情况, Western blot 印记法检测 CX3CR1 蛋白的表达水平, 并通过 Transwell 共培养体系观察不同转染组细胞向趋化因子 FKN 的迁移情况。**结果:**成功获得了细胞形态均一, 生长状态良好的 MSCs; 细胞 CD29、CD44、CD34 有阳性表达; 阴性对照组和空白对照组小鼠 MSCs 不表达 CX3CR1 基因; 构建的慢病毒过表达载体 pUbi-MSC-CX3CR1-EGFP 能成功转染至小鼠 MSCs 中, 并使转染后的 MSCs 表达 CX3CR1 mRNA 及蛋白。在 Transwell 共培养体系中, 转染 CX3CR1 基因的小鼠 MSCs 向趋化因子 FKN 趋化能力明显强于各对照组($P=0.000$), 其中阴性对照组浸润至下室的细胞数为: (13.80 ± 2.17) 个每高倍镜视野($n=5$)。实验组浸润至下室的细胞数为: (35.80 ± 3.34) 个每高倍镜视野($n=5$)。FKN 抗体阻断组浸润至下室的细胞数为 (14.80 ± 1.92) 个每高倍镜视野($n=5$)。**结论:**转染 CX3CR1 基因能有效增加小鼠 MSCs 向趋化因子 FKN 趋化的能力。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 趋化因子 Fractalkine; 趋化因子受体 CX3CR1; 慢病毒载体; 基因转染; 细胞迁移

【中图分类号】Q872

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-02-24

作者介绍: 郭晓书, Email: 422862919@qq.com,

研究方向: 老年医学心血管疾病方向。

通信作者: 李法琦, Email: faqili_2006@yahoo.com.cn。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000347.html>

- [2] Brohlin M, Mahay D, Novikov LN, et al. Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells[J]. *Neurosci Res*, 2009, 64(1): 41-44.
- [3] 柯昌能, 郭小宝, 唐世杰. 真皮多能干细胞对皮肤创面神经修复的影响[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(12): 1931-1933.
- [4] Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2199-2204.
- [5] Kokaia Z, Lindvall O. Stem cell repair of striatal ischemia[J]. *Prog Brain Res*, 2012(201): 35-53.
- [6] 浦晓妹, 果磊, 汪正燕, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养鉴定以及向神经干细胞分化的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(3): 235-238.
- [7] Ziavara D, Makri G, Giompres P, et al. Neural stem cells transplanted in a mouse model of Parkinson's disease differentiate to neuronal phenotypes and reduce rotational deficit[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(7): 829-835.
- [8] Gincberg G, Arien-Zakay H, Lazarovici P, et al. Neural stem cells: therapeutic potential for neurodegenerative diseases[J]. *Br Med Bull*,

2012(104): 7-19.

- [9] Lu P, Wang Y, Graham L, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury[J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1264-1273.
- [10] Volarevic V, Erceg S, Bhattacharya SS, et al. Stem cell based therapy for spinal cord injury[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(8): 1309-1323.
- [11] Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, et al. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from IPS/ES cells[J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(4): 668-676.
- [12] Andres RH, Choi R, Steinberg GK, et al. Potential of adult neural stem cells in stroke therapy[J]. *Regen Med*, 2008, 3(6): 893-905.
- [13] 金澎, 徐如祥, 姜晓丹. 成人骨髓源性神经干细胞的致瘤性研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4(1): 10-15.
- [14] 王岩峰, 吕刚, 赵宇. 神经干细胞移植促进脊髓损伤后脑源性神经营养因子的表达[J]. *中国骨伤*, 2008, 21(11): 836-838.
- [15] Carletti B, Piemonte F, Rossi F. Neuroprotection: the emerging concept of restorative neural stem cell biology for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2011, 9(2): 313-317.

(责任编辑: 冉明会)

Effects of transfection of CX3CR1 gene on migration of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells by fractalkine in vitro

Guo Xiaoshu, Li Faqi

(Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To investigate the roles of Fractalkine in triggering the migration of the mesenchymal stem cells (MSCs) in the Transwell co-culture system. **Methods:** MSCs were isolated and cultured through the whole bone marrow method and were amplified by the different-speed adherent method. The morphology and biological characteristics of MSCs were examined by flow cytometry. And then the recombinant adenovirus containing CX3CR1 and green fluorescent protein (GFP) (LV-CX3CR1-EGFP) or empty vector (LV-CON-EGFP) were transfected into MSCs. The expression of CX3CR1 mRNA in MSCs was examined by RT-PCR and the protein expression was detected by Western blot in LV-CX3CR1-EGFP infection group, LV-CON-EGFP infection group and non-infection group. The migration of MSCs was detected with Transwell co-culture system. **Results:** Obtained MSCs were homogeneous in cell morphology with good living condition and the cells showed positive with CD29, CD44, CD34. There was no expression of CX3CR1 in LV-CON-EGFP group and non-infection group but CX3CR1 can be expressed in LV-CX3CR1-EGFP group. Results of Transwell assays suggested that the migration level of MSCs was higher in LV-CX3CR1-EGFP group than in other groups ($P=0.000$). The migrated MSCs were $13.80 \pm 2.17/\text{HP}$, $35.80 \pm 3.34/\text{HP}$ and $14.80 \pm 1.92/\text{HP}$ in LV-CON-EGFP group, LV-CX3CR1-EGFP group and non-infection group respectively. **Conclusion:** The transfection of CX3CR1 gene could improve the level of migration of MSCs by FKN in vitro.

[Key words] marrow-derived mesenchymal stem cells; Fractalkine; CX3CR1; lentiviral vector; gene transfer; migration

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心血管系统疾病中常见的疾病,也是危害人类健康的疾病,其发病机制和治疗方法的研究一直是心血管疾病研究领域的热点。血管内皮损伤及炎症反应是 AS 发生发展的中心环节,因此保护血管内皮功能和抑制炎症反应在 AS 的治疗中显得尤为重要。在 AS 病变部位趋化因子 Fractalkin (FKN) 高表达,且其通过趋化高表达其受体 CX3CR1 的单核细胞向内膜下聚集,并释放各种炎症因子,在 AS 的发生发展中起着重要作用^[1-2]。骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs), 是一种存在于骨髓基质内的干细胞,是一种理想的种子细胞来源,已广泛应用于细胞替代治疗、基因治疗及组织器官再造^[3-4]。研究发现 MSCs 经静脉移植后能主动向损伤部位趋化、聚集从而发挥治疗作用^[5]。推测移植过表达 CX3CR1 的 MSCs 可通过 FKN-CX3CR1 轴促进 MSCs 归巢进而修复损伤内皮并竞争抑制单核细胞与内皮细胞的黏附及后续损伤。为 MSCs 移植治疗 AS 性疾病奠定基础。本实验旨在将前期成功构建的 CX3CR1 过表达慢病毒载体 pUbi-MSC-CX3CR1-EGFP, 转染于体外培养的小鼠 MSCs 中,建立稳定的细胞系,观察 CX3CR1-EGFP 在小鼠 MSCs 中的表达情况,探

索在体外条件下 FKN 对 MSC-CX3CR1-EGFP 的趋化作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 C57BL/6 小鼠由重庆医科大学动物实验中心提供,5~8 周龄,体质量 15~30 g,所有动物处置过程符合动物伦理学要求。

1.2 主要试剂

胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养基、胰蛋白酶购自 Gibco 公司;藻红蛋白 (PE) 标记的抗小鼠 CD29、CD34 单抗购自 BiotLegend 公司;异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗小鼠 CD44、CD117 单抗购自奥博森公司;CX3CR1 抗体 (ab8021)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG (ab6721) 购自 Abcam 公司;Trizol RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、扩增试剂盒、DNA marker 均购自 TaKaRa 公司;Western blot SDS-配胶试剂盒购自碧云天生物技术研究所;感染增强剂 ENi.S 购自上海吉凯基因技术有限公司;FKN 及其抗体购自 R&D Systems;Transwell 小室购自 Corning 公司。

1.3 小鼠 CX3CR1 基因慢病毒过表达载体

本课题组 2012 年 6 月于重庆医科大学神经病学实验室,成功构建慢病毒过表达载体 pUbi-MSC-CX3CR1-EGFP,及滴度为 2×10^8 TU/ml 的 LV-CX3CR1-EGFP 慢病毒液,并完成载体及病毒相关鉴定工作^[6]。

1.4 MSCs 的分离和原代培养

颈部脱臼处死小鼠,75%酒精浸泡 2 min。于超净台中无菌操作取出胫骨和股骨,在装有 PBS 的培养皿中去除表面附着的肌肉和结缔组织,PBS 冲洗 2 次。剪断两端骨髓,1 ml 无菌注射器吸取完全培养基(含 FBS10%DMEM 培养液)反复冲洗骨髓腔,直至骨髓腔发白,收集骨髓悬液,200 目细胞筛过滤再次去除块状组织和残余肌肉。过滤液均匀混合后反复轻轻吹打,制备成单细胞悬液,将细胞悬液收集入 10 ml 离心管,500 r/min,5 min 离心。弃上清,加入完全培养基(含 FBS10%DMEM 培养液)反复轻轻吹打,以 5×10^6 个/ml 的密度接种于 25 ml 培养瓶中,至于 37 ℃,5%CO₂ 的饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。24 h 后全量换液,去除悬浮的细胞、碎片、杂质,以后每 2~3 d 换液 1 次。每天在倒置相差镜下观察、记录。

1.5 MSCs 的传代、纯化和扩增

待原代细胞贴壁生长接近铺满瓶底约 80%时,去除培养液,PBS 洗涤 3 次,加入 3 ml 胰蛋白酶混合液(0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA),37 ℃消化 2~3 min,镜下观察,见细胞由梭形变为圆形、细胞间隙增宽迅速加入 3 ml 完全培养基,终止胰蛋白酶作用。吸管轻轻吹打,吹散细胞,以 1:2 或 1:3 的比例接种传代于 75 ml 的培养瓶中,置于 37 ℃,5%CO₂ 培养箱中培养。2~3 d 换液 1 次。此时的细胞为第 1 代细胞(P1),当细胞生长至 80%融合时,用上述方法再次传代,使细胞不断纯化和扩增。

1.6 MSCs 表面抗原标记及细胞周期的检测

1.6.1 流式细胞仪检测细胞表面抗原标志 取生长旺盛的第 3 代(P3)MSCs,胰蛋白酶混合液(0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA)消化 2~3 min 后完全培养基终止消化,吸管轻轻吹打成细胞悬液。细胞悬液经 100 目细胞筛滤过,取过滤液离心(2 000 r/min)5 min。弃上清,PBS 调整细胞浓度至 400 000 个/L,装入 3 支离心管中,分别加入 PE-抗小鼠 CD29 抗体、PE-抗小鼠 CD34 抗体、FITC-抗小鼠 CD44 抗体,充分混合后,至 37 ℃避光反应 20 min。PBS 洗涤未标记抗体,重悬细胞,上流式细胞仪检测细胞表面抗原 CD34、CD29、CD44 的表达($n=5$)。

1.6.2 流式细胞仪检测细胞周期 取生长旺盛的第 3 代(P3)MSCs,胰蛋白酶混合液(0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA)消化 2~3 min 后完全培养基终止消化,吸管轻轻吹打成细胞悬液。细胞悬液经 100 目细胞筛滤过,取过滤液离心(2 000 r/min)5 min。弃上清,PBS 调整细胞浓度至 400 000 个/L。4 ℃、70%乙醇固定过夜,PBS 重悬细胞后加入 500 μ l PI 溶液(0.1 mg/ml PI 含 0.1 mg/ml RNase),37 ℃孵育 30 min,上流式细胞仪检测细胞周期($n=5$)。

1.7 慢病毒感染 MSCs 及鉴定

1.7.1 LV-CX3CR1-EGFP 慢病毒感染小鼠 MSCs 取对数生长期的小鼠 MSCs 细胞,以 4 500 细胞/孔接种于 96 孔板内,每孔中均加入完全培养基 90 μ l 于孵箱中培养 24 h。将 96

板平均分为 3 组每组为 32 孔:(1)空白对照组:为不作转染的 MSCs 细胞;(2)实验组:LV-CX3CR1-EGFP 转染目的基因组的 MSCs。(3)阴性对照组:LV-CON-EGFP 空载体组,作为不携带目的基因只携带绿色荧光蛋白基因的慢病毒感染的 MSCs;实验组和阴性对照组去除原培养液,加入等量 ENLS 液,按感染复数(multiplicity of infection,MOI)20 感染 MSCs(每孔加入病毒液的总体积为 10 μ l);空白对照组更换新鲜完全培养基 100 μ l。24 h 后,3 组均更换为完全培养基 100 μ l,放于孵箱中。转染 72 h 后,荧光镜下观察转染情况。

1.7.2 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)检测 CX3CR1 mRNA 的表达 每组挑选生长良好的细胞,以 4×10^5 个/ml 分别接种于 6 孔板,待细胞融合度至 80%~90%后,按 Trizol 试剂盒说明书分别提取各组细胞总 RNA,用 TaKaRa 公司逆转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit)合成 cDNA,目的基因及内参引物用 premier 5 设计,经 blast 验证特异性,由上海生物有限公司合成。CX3CR1 上游引物 5'-TCACAAAGAGAAAGGACAACGA-3',下游引物 5'-AGGTGTCCCAGGTATCTTCTGA-3',产物大小:421 bp,内参 β -actin 上游引物上游 5'-GACCCAGATCATGTTTGA-GACC-3',下游引物 5'-GCTAGGAGCCAGAGCAGTAATCT-3',产物大小 613 bp。反应条件为:94 ℃预变性 3 min,然后 94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环 30 次,最后 72 ℃充分延伸 10 min。扩增产物以 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.7.3 Western blot 检测 CX3CR1 蛋白表达 取各组稳定转染的细胞,以 4×10^5 个/ml 分别接种于 6 孔板,待细胞融合度至 80%~90%时,采用全蛋白试剂盒提取各组细胞蛋白,-80 ℃冻存备用。采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,而后转膜。以 5%脱脂奶粉封闭液封闭 1 h,加入一抗,抗体的稀释比例为 1:1 000,4 ℃过夜孵育,PBST 洗膜(漂洗 3 次,每次 5 min)后加入相应的二抗进行杂交,稀释比例为 1:5 000,室温孵育 1 h,PBST 洗膜(漂洗 3 次,每次 5 min),ECL 发光(实验重复 5 次,即 $n=5$)。

1.8 FKN 对小鼠 MSCs 的趋化迁移作用及其特异性检测

用 Transwell 板(24 孔板、8 μ m 孔径、6.5 mm 膜直径)进行小鼠 MSCs 细胞的迁徙实验,评价 FKN 对各组细胞的趋化作用。实验分为 4 组每组实验各重复 5 次。①阴性对照组;②实验组;③FKN 抗体阻断组;④空白对照组。取①、②组状态良好的 MSCs,胰蛋白酶消化后,用完全培养基制成单细胞悬液,细胞浓度控制在 $(1 \sim 5) \times 10^5$ 个/ml 之间,分区接种于 Transwell 小室中。小室预先用浓度 0.3 mg/ml matrigel 铺胶。小室下层加入含浓度为 10 nmol/L FKN 的完全培养基 600 μ l^[7]。为验证趋化因子作用的特异性,设 FKN 抗体阻断组和空白对照组。Transwell 小室的上层加样方法及加样量同前 2 组,抗体阻断组小室下层加入含浓度为 10 nmol/L FKN 完全培养基的同时,加入 10 nmol/L 的 FKN 完全抗体;空白对照组下室直接加入完全培养基 600 μ l。将各组细胞置于 37 ℃、5%

CO₂ 的饱和湿度 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,取出 24 孔板,用棉签小心擦去小室上层未穿过的细胞和 matrigel 胶。立刻在倒置荧光显微镜下观察各组黏附在小室下层有荧光的细胞数。200 倍荧光显微镜下分别计数 5 个视野,取平均值。评估 FKN 对各组细胞的趋化作用。

1.9 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较使用单因素方差分析,并使用 LSD-*t* 进行两两间比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠 MSCs 形态学观察

倒置显微镜下观察,原代细胞在接种 24 h 后细胞开始贴壁,胞体为小圆形、多角形、梭形、扁平形,见图 1。培养至第 7 天多数细胞伸展成梭形并成集落式生长,在 11 d 左右,可融合达瓶底 80%~90%。传代培养至第 3 代(P3),细胞形态趋于统一,融合状态时细胞排列呈束状、漩涡状或放射状,梭形细胞胞浆丰富,核大。见图 2。

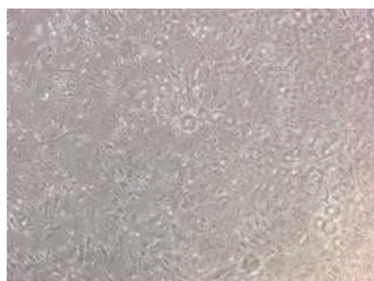


图 1 小鼠原代 MSCs (200 $\times$)

Fig.1 Morphology of primary MSCs (200 $\times$)

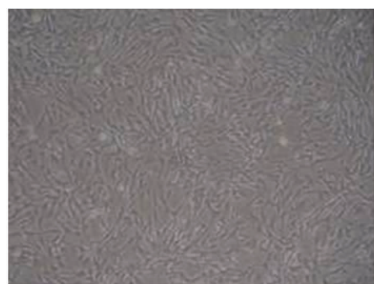


图 2 传至第 3 代小鼠 MSCs (200 $\times$)

Fig.2 Morphology of P3 MSCs (200 $\times$)

2.2 小鼠 MSCs 表面标志及细胞周期

流式细胞仪检测结果显示:超过 90% 的小鼠 MSCs 可表达 CD29(整合素家族类抗原标志分子 VLAM)、CD44(黏附分子家族类抗原标志分子 HCAM)及 CD34,见图 3。小鼠 MSCs 细胞周期中 G0/G1 期的细胞为 $(75.19 \pm 0.25)\%$ ($n=5$), G2 期的细胞为 $(0 \pm 0)\%$, G3 期的细胞为 $(0 \pm 0)\%$,说明细胞处于静止期,此条件下的 MSCs 处于未分化状态,符合干细胞特征,见图 4。

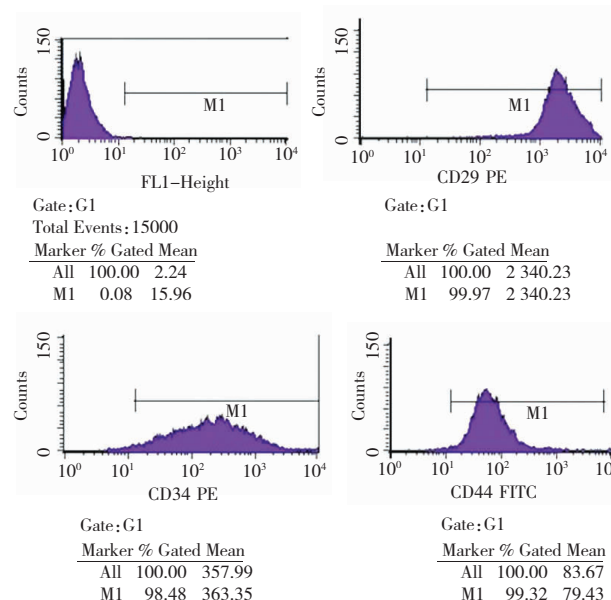


图 3 流式细胞仪检测小鼠 MSCs 表面标志

Fig.3 MSCs phenotypes in mice detected by flow cytometry

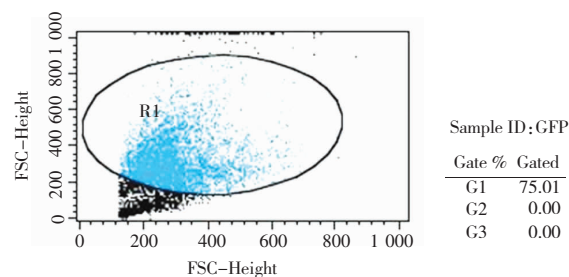


图 4 流式细胞仪检测小鼠 MSCs 细胞周期

Fig.4 MSCs cell cycle in mice detected by flow cytometry

2.3 重组慢病毒的转染 MSCs

荧光显微镜观察,实验组和阴性对照组在感染 2 d 后开始出现少量绿色荧光,5 d 后达最高峰;空白对照组未见荧光,见图 5、图 6。实验组 MOI=20 时, MSCs 细胞的慢病毒感染效率(GFP 阳性率)在 72 h 达 80%以上,3~7 d 基本能达到 90%,在此 3 周内作连续观察,荧光细胞数并未下降,感染效率仍维持在 80%~90%,见图 7。由此可知,重组慢病毒感染小鼠 MSCs 效率高且能长期稳定感染。

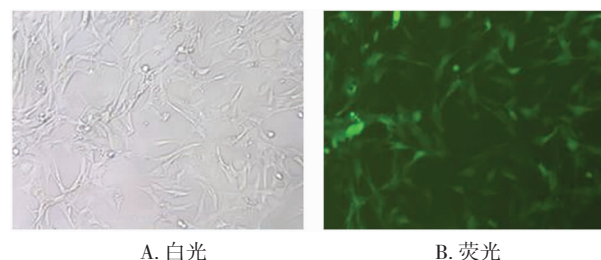


图 5 转染 5 d 后实验组小鼠 MSCs 细胞

Fig.5 Morphology of experimental group MSCs on the 5th d after the transfection

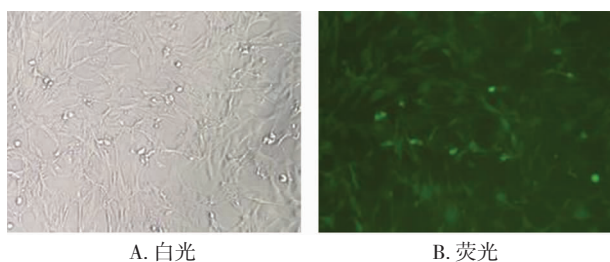


图 6 转染 5d 后阴性对照组小鼠 MSCs 细胞

Fig.6 Morphology of negative control group MSCs on the 5th d after the transfection

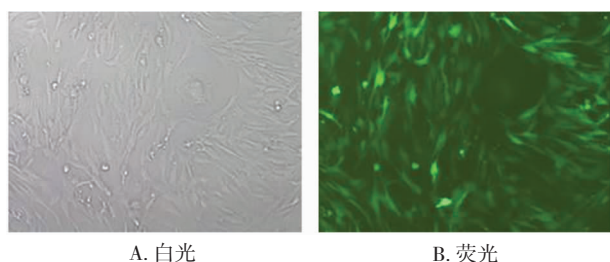
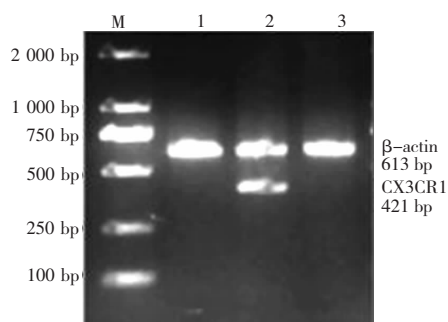


图 7 转染 3 周后实验组小鼠 MSCs 细胞

Fig.7 Morphology of negative control group MSCs on the 3th week after the transfection

2.4 CX3CR1 mRNA 在 MSCs 细胞的表达

实验组 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见约 421 bp 大小的特异性条带,与预计产物大小一致。空白对照组及阴性对照组未见明显条带,见图 8。阳性克隆送 TaKaRa 公司测序,结果与目的基因 CX3CR1 的基因序列完全匹配。实验组 CX3CR1 明显表达(0.84 ± 0.02)($n=5$)而空白对照组和阴性对照组无表达,与实验组相比,差异有统计学意义($F=8\ 199.388$, $P=0.000$; $P_{\text{空白对照组 vs 实验组}}=0.000$, $P_{\text{阴性对照组 vs 实验组}}=0.000$, $n=5$)。



1. 空白对照组; 2. 实验组; 3. 阴性对照组

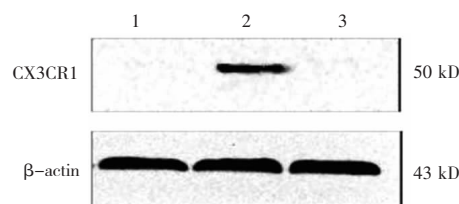
图 8 PCR 检测 CX3CR1 在小鼠 MSCs 中的转录情况

Fig.8 Transcription of CX3CR1 in MSCs

2.5 CX3CR1 蛋白在 MSCs 细胞的表达

Western blot 检测结果显示:实验组有明显蛋白表达条带(0.39 ± 0.04)($n=5$),空白对照组及阴性对照组无明显条带,与实验组相比,差异有统计学意义($F=418.553$, $P=0.000$; $P_{\text{空白对照组 vs 实验组}}=0.000$, $P_{\text{阴性对照组 vs 实验组}}=0.000$, $n=5$,图 9)。因此所构

建的慢病毒载体可有效地使小鼠 MSCs 细胞成功表达 CX3CR1 蛋白。



1. 空白对照组; 2. 实验组; 3. 阴性对照组

图 9 Western blotting 检测小鼠 MSCs CX3CR1 蛋白的表达情况

Fig.9 Protein expression of CX3CR1 in MSCs

2.6 FKN 介导 MSCs 在体外的迁移

Transwell 实验结果显示:阴性对照组细胞经 24 h 培养后浸润到聚碳酸盐微孔滤膜下的细胞数均值为: (13.80 ± 2.17) 个每高倍镜视野($n=5$)。实验组细胞经 24 h 培养后浸润到聚碳酸盐微孔滤膜下的细胞数均值为: (35.80 ± 3.34) 个每高倍镜视野($n=5$)。FKN 抗体阻断组细胞经 24 h 培养后浸润到聚碳酸盐微孔滤膜下的细胞数均值为: (14.80 ± 1.92) 个每高倍镜视野($n=5$),见图 10。实验证实, FKN 对实验组 MSCs 细胞的体外趋化活性明显强于对空载体组及空白组的活性,且当阻断性 FKN 抗体加入微孔隔离室的下室后可明显减少 FKN 诱导的 MSCs 趋化运动($F=118.112$, $P=0.000$; $P_{\text{阴性对照组 vs 实验组}}=0.000$, $P_{\text{FKN 抗体阻断组 vs 实验组}}=0.000$, $n=5$)。即在体外实验的条件下,过表达目的基因 CX3CR1 有利于 MSCs 向趋化因子 FKN 迁移,见图 11。

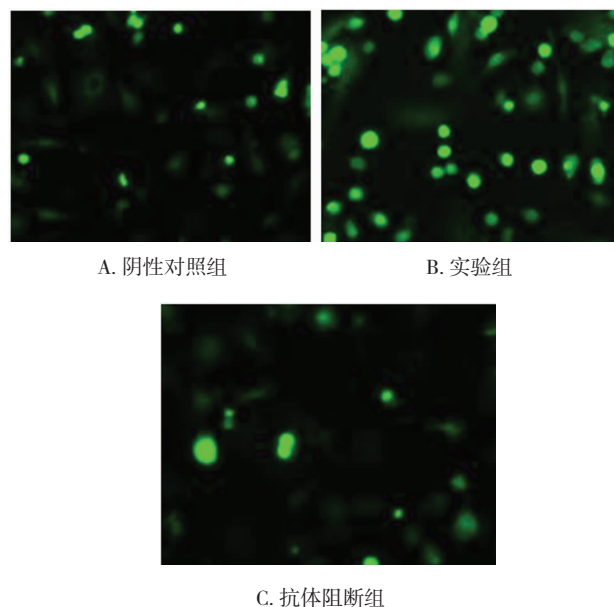
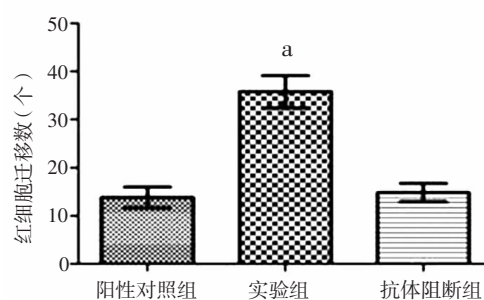


图 10 荧光镜下,不同组别 24 h 候浸润至聚碳酸盐微孔滤膜下的细胞数

Fig.10 Migration of MSCs in different groups at the 24th h after the culture under fluorescence microscopy



a, 与阳性对照组及抗体阻断组相比, 实验组细胞迁移个数差异有统计学意义

图 11 不同组别 24 h 浸润至聚碳酸盐微孔滤膜下的细胞数直条图

Fig.11 Column chart of the migration of MSCs in different groups at the 24th h after the culture

3 讨论

MSCs 来源于中胚层, 是骨髓组织中除造血干细胞外另一大类多能干细胞, 其具有跨系谱、跨胚层分化的潜能, 在一定的条件下可向脂肪细胞、成骨细胞、肌细胞、神经元、神经胶质细胞、肝细胞、内皮细胞等分化^[8-9]。其有着来源广、取材方便安全、损伤小、抗原性小、体外移植不发生排斥反应、体外基因转染率及基因的持久表达率高且不涉及医学伦理学问题等特点, 已广泛应用于细胞的代替治疗、基因治疗及组织器官再造的各项研究中, 成为了一种理想的基因治疗靶细胞及细胞治疗工具^[10-11]。目前 MSCs 的表面标志尚不确定, 其可表达间质细胞、内皮细胞、表皮细胞等多种细胞的表面标志, 一般认为 CD90、CD71、CD44、CD29、CD105、CD106 等是 MSCs 的重要表面标志物^[12]。小鼠 MSCs 相对于人和大鼠的培养条件及方法难度较高, 但由于许多基因治疗及临床课题均以小鼠为动物模型, 因此探求一种理想的小鼠 MSCs 细胞的纯化和扩增方法在干细胞的研究中显得尤为重要。有些研究者将全骨髓培养于完全培养基中, 通过不断的更新培养基对骨髓 MSCs 进行纯化, 在此过程中, 红细胞、白细胞及其他造血干细胞会因其无法贴壁随着不断的换液被清除, 留下贴壁的成纤维样细胞^[13-14]。本实验运用贴壁纯化法成功地提纯并扩增了小鼠 MSCs 细胞。通过流式细胞仪分析鉴定, 本实验培养的小鼠 MSCs 高表达 CD29 (整合素家族类抗原标志分子 VLAM)、CD44 (黏附

分子家族类抗原标志分子 HCAM) 且细胞周期鉴定显示大多数细胞处于未分化状态, 符合干细胞的特征。在形态学方面, 倒置显微镜下观察到, 体外培养的最初贴壁细胞为小圆形、多角形、梭形、扁平形。传代培养至第 3 代 (P3), 细胞形态趋于统一, 融合状态时细胞排列呈束状、漩涡状或放射状, 梭形细胞胞浆丰富、核大, 与国内外学者研究结论相符。

慢病毒属逆转录病毒科, 是以人类免疫缺陷 1 型病毒为基础发展起来的基因治疗载体。其可感染分裂细胞的同时, 也能感染非分裂期的细胞^[15]; 其可以稳定地整合于宿主细胞的基因组中, 并能稳定表达; 在稳定地表达导入基因同时, 不易诱发宿主免疫反应, 安全性好; 其有强大的包装能力, 8~10 kb 的基因均适用; 与其他致癌逆转录病毒载体相比, 慢病毒载体更不易引起插入突变。本实验在前期构建慢病毒过表达载体 pUbi-MSC-CX3CR1-EGFP 的基础上, 将慢病毒过表达载体成功导入体外培养的小鼠 MSCs 中, 成功地获得了带有目的基因的小鼠 MSCs-CX3CR1-EGFP, 且得到了重组慢病毒载体 pUbi-MSC-CX3CR1-EGFP 感染小鼠 MSCs 感染的最适条件是在 EN1.S 中感染病毒, 所需 MOI 为 20。经过荧光显微镜、RT-PCR、Western blot 检测结果显示, 目的基因 CX3CR1-EGFP 可在小鼠 MSCs 细胞中表达。

炎症和氧化应激是 AS 发展和发生的核心因素, 其中炎症引起的血管内皮细胞损伤已被认为是心血管疾病发病的独立危险因素。趋化因子是由促炎细胞因子激活、多种细胞产生的、具有黏附和趋化双重作用的小分子细胞因子, 其可吸引免疫细胞到达免疫应答及炎症发生部位, 参与免疫调节和免疫病理反应。不规则趋化因子 FKN 是人类第四家族 CX3C 家族趋化因子唯一成员, 鼠的同系称为神经趋化因子, 其有膜结合型及可溶性分泌型 2 种存在形式, 前者能诱导内皮细胞的活化, 促使白细胞与这些活化的内皮细胞黏附, 后者则对单核细胞和 T 淋巴细胞等高表达其受体 CX3CR1 的细胞有强烈的趋化作用。CX3CR1 是 FKN 的高亲和力受体, 属于趋化因子受体超家族成员, 其主要表达在单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞和小胶质细胞中^[16]。而有研究显示, 在 AS 的发生发展过程中, 激活的内皮细胞、AS 斑块内的单核巨噬细胞以及激活的平滑肌细胞均高表达趋化因子 FKN, 通

过与其受体之间的FKN-CX3CR1轴,使得炎症细胞向动脉粥样部位聚集并导致斑块的不稳定性。本实验将CX3CR1-EGFP基因过表达于体外培养的小鼠MSCs上,使小鼠MSC-CX3CR1-EGFP成功表达CX3CR1和绿色荧光蛋白。Transwell小室是利用Matrigel胶模拟天然基底结构,观察具有侵袭性和迁移能力的细胞在趋化剂诱导下穿过多孔滤膜的情况。本实验将小鼠MSCs接种于上室,趋化因子FKN于下室,从而评估在非接触状态下FKN对实验中各组MSCs的趋化作用。实验结果显示:FKN对MSC-CX3CR1-EGFP有一定的趋化作用,且对实验组骨髓间充质干细胞的趋化能力明显强于空白对照组和阴性对照组的小鼠MSCs细胞,提示FKN-CX3CR1轴可能成为干细胞移植治疗AS新的动力及切入点。

本研究不但建立了一套理想的小鼠MSCs的原代提取和培养方法,还将CX3CR1-EGFP基因导入体外培养的小鼠MSCs中,并证实了通过过表达CX3CR1能提高MCSs向FKN迁移的能力,为下一步干细胞体内移植治疗AS提供了理论基础和丰富的种子细胞。

参 考 文 献

- [1] Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis[J]. Clin Invest, 2003, 111(3):333-340.
- [2] Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, et al. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(6):923-929.
- [3] Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, et al. Mesenchymal stem cells

immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration[J]. Cytotherapy, 2009, 11(4):377-391.

- [4] Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration; ten years of research and a literature review[J]. J Nippon Med Sch, 2009, 76(2):56-66.
- [5] Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL, et al. Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22(7):1292-1304.
- [6] 刘芳, 李法琦. 小鼠CX3CR1基因重组慢病毒过表达质粒的构建及鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(9):1247-1250.
- [7] Yoneda O, Imai T, Nishimura M, et al. Membrane-bound form of fractalkine induces IFN- γ production by NK cells[J]. Eur J Immunol, 2003, 33(1):53-58.
- [8] Goodman R. Psychometric properties of the strengths and difficulties questionnaire[J]. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 2001, 40(11):1337-1345.
- [9] Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2009(14):4281-4298.
- [10] Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective[J]. Circulation, 2003, 107(7):929-934.
- [11] Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(6):908-917.
- [12] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411):143-147.
- [13] Kuo CK, Tuan RS. Tissue engineering with mesenchymal stem cells[J]. IEEE Eng Med Biol Mag, 2003, 22(5):51-56.
- [14] Shin M, Yoshimoto H, Vacanti JP. In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold[J]. Tissue Eng, 2004, 10(1-2):33-41.
- [15] Romano G. Current development of lentiviral-mediated gene transfer[J]. Drug News Perspect, 2005, 18(2):128-134.
- [16] Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, et al. From basic research to clinical disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(1):34-40.

(责任编辑:冉明会)