DOI:10.16016/j.1000-5404.201607129

# 沉默 CX3CL1 基因对骨髓间充质干细胞生长及其趋化效应的影响

郝 磊,田 洪,牟长河,张玉波,周虎传,宋 川,刘 磊 (400020 重庆,解放军第 324 医院脑血管病中心)

[摘要] **目的** 构建大鼠趋化因子 CX3C 的配体 1(chemokine CX3C ligand 1,CX3CL1)基因慢病毒 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)载体,观测其沉默 CX3CL1 基因对骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, bMSCs)生长及其趋化效应的影响。**方法** 首先分离、培养大鼠骨髓 bMSCs,并予以流式细胞术检测鉴定。针对 CX3CL1 基因 mRNA 序列,筛选 3 个小干扰 RNA(small interfering RNA,siRNA)靶点并予以合成。把合成的 siRNA 导入 bMSCs,Western blot 检测其对靶基因编码蛋白的抑制效应,以此明确最佳 siRNA。设计与合成针对最佳 siRNA 序列的短发夹 RNA(short hair RNA,shRNA),连入 CD513B-1 慢病毒载体,构建 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 慢病毒,并行测序鉴定。测序正确者用 293T 细胞包装成具有高效感染力的 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 重组慢病毒,该重组病毒用于感染 bMSCs。分离培养大鼠脾巨噬细胞,将其与被感染的 bMSCs 共培养。倒置显微镜下观测被感染 bMSCs 的绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况;CCK-8 检测被感染 bMSCs 的生长变化;Real-time PCR 检测被感染 bMSCs 的 CX3CL1 与核抗原 PCNA 基因的表达变化;Western blot 检测被感染 bMSCs 的 CX3CL1 和 PCNA 蛋白,与被感染的 bMSCs 共培养的脾巨噬细胞的趋化因子 M-CSF 和 IL-8 的表达变化。**结果** 大鼠 bMSCs 得以分离、培养和鉴定。筛检得 CX3CL1 基因的最佳干扰序列:CTCTATGAGCAATTATTTA;测序证实,成功构建重组慢病毒载体 CD513B-1/CX3CL1 shRNA。荧光观察表明,被 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 病毒感染的 bMSCs 明显表达 GFP。CCK-8 检测结果显示,与对照细胞比较,沉默 CX3CL1 的 bMSCs 的生长减慢,48 h 开始更为明显($P<0.01$);Real-time PCR、Western blot 检测结果证实,CX3CL1 基因的 shRNA 慢病毒能有效沉默 bMSCs 的 CX3CL1,并下调其核抗原基因 PCNA 及其蛋白的表达,沉默 CX3CL1 的 bMSCs 能下调与其共培养的脾巨噬细胞的趋化因子 M-CSF、IL-8 的表达。**结论** 成功构建 CX3CL1 基因 RNAi 重组慢病毒载体。该病毒载体能有效沉默 bMSCs 的 CX3CL1 基因,使 bMSCs 的生长减慢并下调其核抗原 PCNA 基因及其编码蛋白的表达。沉默 CX3CL1 的 bMSCs 能下调与其共培养的脾巨噬细胞的趋化因子 M-CSF、IL-8 的表达。

[关键词] 趋化因子 CX3C 的配体 1 基因;短发夹 RNA;骨髓间充质干细胞;慢病毒;趋化效应
[中图法分类号] R329.2; R394-33; R394.2 [文献标志码] A

# Effect of lentivirus-mediated silencing of CX3CL1 gene on growth and chemotaxis effect in bone marrow derived mesenchymal stem cells

Hao Lei, Tian Hong, Mou Changhe, Zhang Yubo, Hou Huzhuan, Song Chuan, Liu Lei (Center of Cerebrovascular Diseases, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing, 400020, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct lentiviral vector-medicated RNA interference (RNAi) targeting rat chemokine CX3C ligand 1 (CX3CL1) and investigate its effect on the growth and chemotaxis effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells (bMSCs). **Methods** bMSCs were isolated from rat bone marrow, cultured and identified with flow cytometry. Three potential RNAi sites were screened based on the mRNA sequence of CX3CL1 gene and then synthesized. The 3 synthesized siRNAs were transferred into bMSCs, Western blotting was used to analyze the inhibitory effect of target gene so as to identify the optimal siRNA

[基金项目] 重庆市基础与前沿研究计划项目(CSTC 2014jcyjA10077)
[通信作者] 刘 磊,E-mail:shenjingneike324@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161021.1700.033.html

sequence. Then the short hair RNA (shRNA) oligonucleotide targeting the optimal siRNA sequence was designed, synthesized and inserted into CD513B-1 plasmid to form CD513B-1/CX3CL1 shRNA lentiviral vector. After identified by sequencing, CD513B-1/CX3CL1 shRNA plasmid was transfected into the 293T cells to produce lentiviral particles. The bMSCs were transfected with the lentiviral particles. After rat splenic macrophages were isolated and cultured, and the cells were co-cultured with the transfected bMSCs. The expression of green fluorescent protein (GFP) in the transfected bMSCs was observed by inverted microscopy. Cell count kit-8 (CCK-8) assay was employed to test the growth of transfected bMSCs. The expression of CX3CL1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the transfected bMSCs was detected by real-time PCR. The levels of the proteins in the transfected bMSCs and those of M-CSF and IL-8 in the splenic macrophages were detected by Western blotting respectively. **Results** Rat bMSCs were successfully isolated from bone marrow, cultured and identified. The optimal siRNA sequence CTCTATGAGCAATTATTTA was confirmed. The result of sequencing revealed that lentiviral vector CD513B-1/CX3CL1 shRNA was constructed successfully. The transfected bMSCs significantly expressed GFP. The results of CCK-8 assay showed that the growth of bMSCs were slower after CX3CL1 silencing, especially in 48 h after transfection ($P<0.01$). The results of real-time PCR and Western blotting revealed that the lentiviral vector CD513B-1/CX3CL1 shRNA effectively silenced CX3CL1 and down-regulated the expression of PCNA in the bMSCs. The bMSCs after CX3CL1 silencing down-regulated the protein levels of M-CSF and IL-8 in the splenic macrophages co-cultured with the MSCs. **Conclusion** The lentiviral vector-medicated RNAi targeting CX3CL1 is constructed successfully, and it can effectively silence CX3CL1 gene, down-regulate PCNA expression, and prevent the growth in bMSCs. The bMSCs with silenced CX3CL1 gene can down-regulate the expression of M-CSF and IL-8 protein in the splenic macrophages co-cultured with the MSCs.

[**Key words**] chemokine CX3C ligand 1 gene; short hair RNA; bone marrow derived mesenchymal stem cells; lentivirus; chemotaxis effect

Supported by the Project of Basic and Frontier Research Plan of Chongqing (CSTC2014jcyjA10077). Corresponding author: Liu Lei, E-mail: shenjingneike324@126.com

脑卒中是致人残疾、死亡的重要疾病之一[1],其中缺血性脑卒中占70%~87%。缺血性脑卒中时脑组织发生非特异性炎症反应,过度发生的炎症反应可进一步加剧脑组织继发性损伤[2]。合理控制脑缺血后炎症反应可减轻脑组织继发性损伤,在缺血性脑卒中的治疗中占重要地位。一些抗炎药物能抑制缺血后炎症反应,具有良好的神经保护作用,但其临床疗效并不显著。近年来,干细胞在组织再生修复中的作用越来越受到广泛关注,成为本领域的研究热点之一。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可促进脑卒中动物损伤脑组织与损伤神经的修复[3-4],但其机制尚不清楚。

趋化因子CX3C的配体1(chemokine CX3C ligand 1, CX3CL1)是内皮细胞表达的具有黏附和趋化双重活性的细胞因子。CX3CL1具有趋化与黏附作用,参与白细胞尤其是吞噬细胞与淋巴细胞的游走与活化,介导细胞间的黏附,在炎症反应中发挥重要作用,其受体CX3CR1表达于神经系统的小胶质细胞[5]。在炎症反应中,由于炎症信号的驱使,MSCs能显著增加小胶质细胞上与神经保护密切相关的CX3CR1的表达[5]。因此,MSCs促进脑卒中动物损伤脑组织与损伤神经修复的机制可能与其分泌CX3CL1调控炎症反应密切相关,但这尚需研究证实。

本实验首先分离、培养并鉴定大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, bMSCs),然后采用慢病毒RNA干扰(RNA interference, RNAi)、CCK-8、Real-time PCR及Western blot等实验,探讨沉默CX3CL1对bMSCs生长的影响以及沉默CX3CL1的bMSCs的趋化效应,以期为研究bMSCs可能通过分泌CX3CL1基因调控炎症反应在介导脑卒中神经功能恢复中的可能机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验使用的材料包括DMEM高糖培养基(HyClone);胎牛血清(Sigma);CD44、CD45及CX3CL1兔多克隆抗体(Santa Cruz);Anti-Mouse/Rat CD90 FITC抗体(Ebioscience);质粒抽提试剂盒与胶回收试剂盒(Roche);RT-PCR试剂盒(大连宝生物);寡核苷

酸 oligos、慢病毒载体 CD513B-1、干扰靶序列的 DNA oligo 合成、引物合成与测序(上海捷瑞);CCK-8 试剂盒(Toyobo);Lipofectamine® 2000(Invitrogen);PCNA 兔多克隆抗体(Millipore);PVDF 膜(Bio-Rad)。

22 只 SD 大鼠购自第三军医大学实验动物中心,体质量 190 g 左右,生产许可证号为 SCXK(渝)2012~0003,雌雄均有,于恒湿 50%~80% 与恒温 18~22 ℃条件的 SPF 级动物室饲养,自由摄取无菌水与标准饲料。

1.2 *方法*

1.2.1 bMSCs 的分离、培养及流式细胞术(FCM)检测鉴定 大鼠 bMSCs 的分离、培养参照文献[6-7]进行,具体如下。陆眠宁Ⅱ肌肉注射(0.25 mL/kg)麻醉大鼠后,颈椎脱臼处死,整体浸泡于 75% 的乙醇中 10 min,取其双侧股骨与胫骨,无菌条件下用 DMEM/F12 培养液反复冲洗其髓腔,获得细胞悬液,按 1∶1(容积比)加入 Percoll 细胞分离液(比重:1.073),2 500 r/min 离心 20 min,取其交界处白膜层,培养基洗涤 2 次。将细胞按约 $2\times10^7$/mL 的密度种植于 DMEM/F12 完全培养液(含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)中,于 37 ℃、5% $CO_2$ 及饱和湿度环境中培养,24 h 后换入新鲜完全培养液,以后每 2~3 天换液 1 次,培养 6~9 d,挑取单克隆细胞,放入 6 孔板,相同环境中培养,细胞生长至 80%~100% 汇片时,0.25% 的胰酶(含 0.02% EDTA)消化,按约 $6.5\times10^3/cm^2$ 的细胞的密度接种传代扩增。

取培养 4~6 d 的第 3 代 bMSCs 制成细胞悬液,经 PBS 洗涤并计数,确保每组细胞不少于 $1\times10^5$ 个。在细胞样本中分别加入 CD44、CD45 及 CD90 抗体,避光,37 ℃孵育 1.5 h,以不加抗体的细胞为对照。PBS 再次重悬各待测细胞,流式细胞术分别检测不同抗体标记的细胞百分率,具体按各抗体说明书进行。实验重复 3 次。

1.2.2 CX3CL1 基因最佳 RNAi 靶点的确定 参照文献[8]进行最佳 RNAi 靶点的确定,具体如下。从大鼠 CX3CL1 基因 mRNA 序列中筛选出 3 个 RNA 干扰序列,分别为:①ACCCAGTTCATACTGATAT;②CTCTATGAGCAATTATTTA;③CAACTCGTTCTGTCTTTGC,并合成其相应 siRNAs。即:①5′-ACCCAGUUCAUACUGAUAUUU-3′/3′-UUUGGGUCAAGUAUGACUAUA-5′;②5′-CUCUAUGAGCAAUUAUUUAUU-3′/3′-UUGAGAUACUCGUUAAUAAAU-5′;③5′-CAACUCGUUCUGUCUUUGCUU-3′/3′-UUGUUGAGCAAGACAGAAACG-5′。分别将这 3 个 siRNAs 导入 bMSCs,以未导入 siRNAs 的细胞为对照,严格按其操作说明进行。采用 Western blot 分别检测 3 个 siRNAs 对 bMSCs 的 CX3CL1 蛋白的抑制情况,以此明确 CX3CL1 基因的最优 RNAi 序列。具体为将各细胞总蛋白转置 NC 膜上,置于含 CX3CL1 的兔多克隆抗体的封闭液中,抗体稀释度为 1∶800,置 4 ℃环境 24 h,随后与稀释度为 1∶700 的相应酶标二抗共同孵育约 1.5 h(室温),和发光底物作用 8 min 左右。以相对分子质量为 $4.3\times10^4$ 的 β-actin 作内参。

1.2.3 CX3CL1 shRNA 慢病毒载体的构建与鉴定

设计并合成能生成最佳 siRNA 的 CX3CL1 的短发夹 RNA(正义链:5′-AATTCCTCTATGAGCAATTATTTACTTCCTGTCAGATAAATAATTGCTCATAGAGTTTTTG-3′,反义链:5′-GATCCAAAAACTCTATGAGCAATTATTTATCTGACAGGAAGTAAATAATTGCTCATAGAGG-3′),并克隆至慢病毒载体 CD513B-1 的 *Eco*RⅠ及 *Bam*HⅠ位点间,构建重组慢病毒载体 CD513B-1/CX3CL1 shRNA。转化感受态菌。测序鉴定重组慢病毒载体 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 的正确性。

1.2.4 重组慢病毒 CX3CL1 shRNA 的包装及滴度测定 将 293T 细胞种植于 6 孔板,密度约 $4.5\times10^5$ 细胞/孔,待细胞生长至 60%~80% 汇片时,在基因转染试剂 Lipofectamine® 2000 与包装质粒的作用下,将测序正确的 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 的 DNA 导入病毒包装细胞 293T,8 h 后替换其培养基,再培养 40 h,显微镜下观察细胞的绿色荧光蛋白(GFP)的变化并拍照。再培养 32 h 后予以收集,离心 10 min(4 ℃,4 000×*g*),用 0.45 μm 滤器无菌过滤其上清液,滤液经浓缩后分装,于 -80 ℃存放备用。

用上述病毒液转染接种于 24 孔板中的 293T 细胞,倍比稀释方法测定并计算其病毒滴度,病毒滴度 = (P×N/100×V)/DF,N:$10^5$(每孔细胞数)、P:GFP 阳性克隆数、V:病毒液稀释体积(mL)、DF:稀释倍数。

1.2.5 bMSCs 的 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 病毒感染 以 1∶50 比例(病毒液和培养液体积比)感染种植于 6 孔板的第 2 或第 3 代 bMSCs,以未感染的 bMSCs 作对照,培养 24~72 h 后,用倒置显微镜观察被感染 bMSCs 的 GFP 的表达情况。

1.2.6 重组慢病毒 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 对 bMSCs 生长的影响 将第 2 或第 3 代 bMSCs 接种到 96 孔板中,每孔 150 μL 培养液中接种 3 000 个 bMSCs,5~7 d 后,按病毒液与培养基 1∶50 的体积比添加上述经浓缩的病毒液;正常对照采用空病毒感染的 bMSCs,空白对照采用常规培养的 bMSCs。加病毒液后 1、2、3 d 与 4 d 分别取 96 孔板 1 块,每孔替换新鲜培养基(含 10 μL 的 CCK-8),培养约 3 h 后,在酶标仪上检测其光密度值[*D*(450)]。以 *D*(450)值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制细胞增殖曲线图,该实验进行 3 次。

1.2.7　Real-time PCR 检测沉默 CX3CL1 基因的 bMSCs 的 PCNA 基因的表达变化　　设计并合成大鼠的 PCNA(NM_022381.3)基因引物,上游引物:5′-TGTCCCAGACAAGCAATGTT-3′,下游引物:5′-AGGAGACAGTGGAGTGGCTT-3′。以经 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 病毒液感染的 bMSCs 总 RNA 为模板,Real-time PCR 检测被感染 bMSCs 的 PCNA 基因的表达,对照采用空病毒感染或不感染的用 bMSCs,内参采用 β-actin。

1.2.8　Western blot 检测沉默 CX3CL1 基因的 bMSCs 的 PCNA 蛋白的表达变化　　采用 Western blot 把 1.2.7 的各组 bMSCs 总蛋白转移至 PVDF 膜,放入含 PCNA 的兔多克隆抗体(1∶600)的封闭液中,置 4 ℃环境 24 h,随后与稀释度为 1∶500 的相应酶标二抗共同孵育约 1.5 h(室温),和发光底物作用 8 min 左右。以相对分子质量为 $4.3\times10^4$ 的 β-actin 作内参。

1.2.9　沉默 CX3CL1 对 bMSCs 周期的影响　　参照文献[9]检测沉默 CX3CL1 对 bMSCs 周期的影响,具体为,密度为 $1\times10^6$ 个细胞/mL 的经上述病毒感染的 bMSCs 培养 48 h,经空病毒感染或未经感染的 bMSCs 作对照。

收集并计数各组 bMSCs,保证各 bMSCs 样品有 $1\times10^4$ ~ $2\times10^6$ 个细胞,75% 酒精固定各 bMSCs 样品 24 ~ 72 h,碘化丙啶(PI)染色,FCM 检测分析各 bMSCs 样品的周期变化情况,此实验重复 3 次。

1.2.10　沉默 CX3CL1 基因的 bMSCs 趋化效应的 Western blot 检测　　参照文献[10]分离培养大鼠脾巨噬细胞。以 $5\times10^5$ 个细胞/mL 种植第 2 或第 3 代经上述病毒感染的 bMSCs 于 6 孔板中培养 24 h,用与 bMSCs 相同密度的脾巨噬细胞接种于和 6 孔板孔匹配的 Transwell 培养小室,将该小室放入 6 孔板和经病毒感染的 bMSCs 共培养作第 1 实验组,在此共培养体系中加入细胞因子 CX3CL1 作第 2 实验组,两组 48 h 后收集脾巨噬细胞,采用 Western blot 检测其趋化因子 M-CSF、IL-8 的表达变化,分别以与空病毒感染的 bMSCs 相同密度共培养的脾巨噬细胞和单纯培养的脾巨噬细胞的相同检测作对照,具体方法与 1.2.8 的相同。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件的方差分析与 $t$ 检验分别被用于统计比较多组间与两组间数据差异,用 $\bar{x}\pm s$ 呈现统计比较结果,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结果

2.1　bMSCs 的分离培养及鉴定

倒置显微镜下,初接种的 bMSCs 呈散在集落,细胞由圆形变为不规则形,大部分细胞呈纺锤样、长梭形。培养 6 ~ 9 d 后,挑取其单克隆培养。经传代扩增的单克隆 bMSCs,长势良好,待生长至 80% ~ 100% 汇片时进行传代扩增,传代扩增的 bMSCs 分布均匀,形态较均一,以梭形为主(图 1),细胞分裂生长旺盛,生长速度较原代细胞明显加快,5 ~ 7 d 可传代扩增。流式细胞术检测结果显示,bMSCs 稳定表达中胚层来源细胞的表型标志 CD44、CD90,阳性率分别为 94.7% 和 86.5%,微弱表达或不表达造血细胞的表型标志 CD45,阳性率为 0.972%(图 2)。

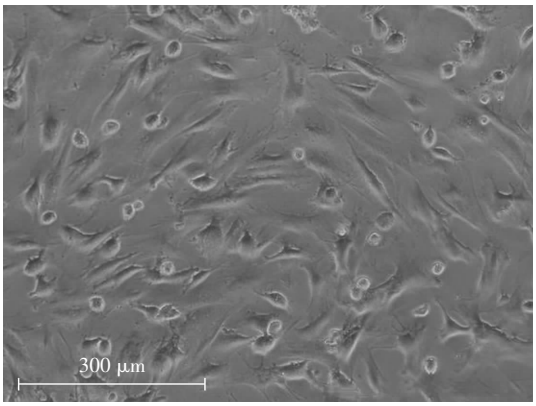
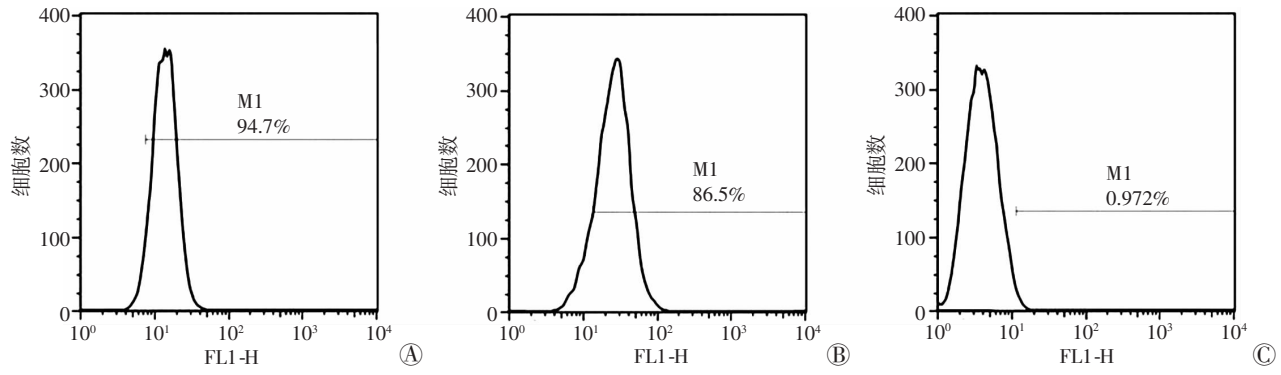



**图 1　倒置显微镜下传代扩增的 bMSCs**

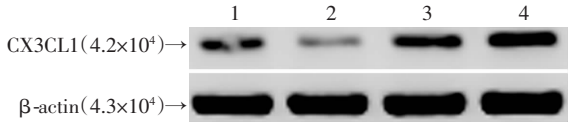



A:CD44;B:CD90;C:CD45

**图 2　流式细胞术检测骨髓间充质干细胞的 CD44、CD90 与 CD45 的阳性率变化**

2.2 CX3CL1 基因最佳 RNAi 靶点的确定

Western blot 检测结果显示，3 个小干扰 RNA 都能使 bMSCs 的 CX3CL1 的表达下调，下调程度：靶位 2 > 靶位 1 > 靶位 3（图 3）。可见最佳 RNA 干扰序列为 CTCTATGAGC AATTATTTA（靶位 2）。




1：靶位 1；2：靶位 2；3：靶位 3；4：对照

**图 3 Western blot 检测小干扰 RNA 对 bMSCs 的 CX3CL1 蛋白表达的影响**

2.3 慢病毒载体 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 的测序鉴定

重组慢病毒载体 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 经测序证实（图 4），携带 CX3CL1 shRNA 的重组慢病毒载体 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 被成功构建。

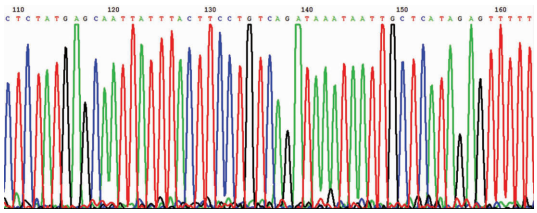
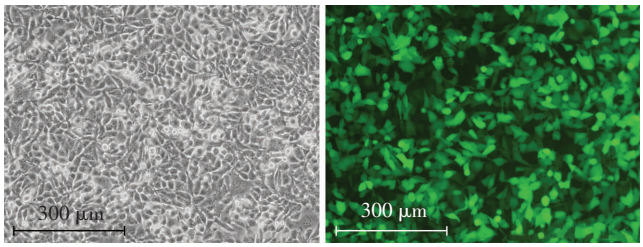


**图 4 重组慢病毒载体 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 的测序鉴定结果**

2.4 CX3CL1 shRNA 重组病毒的包装和滴度测定

把经测序鉴定的 CX3CL1 shRNA 重组病毒的 DNA 导入 293T 细胞（图 5A），48 h 后在显微镜下可见 GFP 的显著表达（图 5B）。倍比稀释法检测显示，其病毒滴度约为 $1.4\times10^8$ TU/mL。

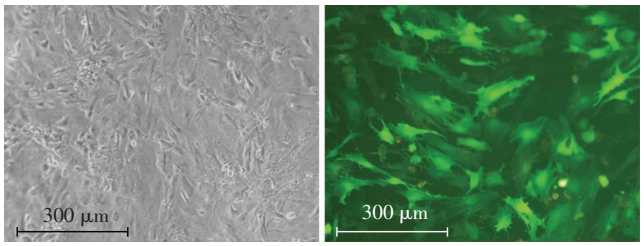



A：正常 293T 细胞；B：包装有重组慢病毒 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 的 293T 细胞

**图 5 荧光倒置显微镜观察包装有重组慢病毒 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 的 293T 细胞中 GFP 表达**

2.5 bMSCs 的 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 病毒感染

未经感染的 bMSCs 不表达 GFP（图 6A），经 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 病毒感染的 bMSCs，倒置荧光显微镜下可见 GFP 的明显表达（图 6B）。

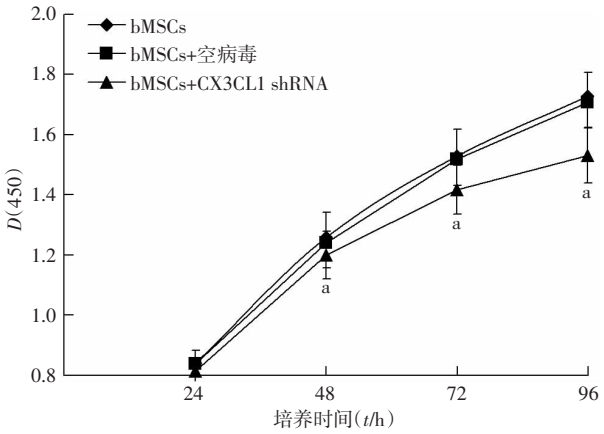



A：未感染的 bMSCs；B：经重组病毒 CX3CL1 shRNA 感染的 bMSCs

**图 6 荧光倒置显微镜观察经 CX3CL1 shRNA 病毒感染的 bMSCs 中 GFP 表达**

2.6 沉默 CX3CL1 对 bMSCs 生长的影响

CCK-8 检测结果显示，经重组病毒 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 感染的 bMSCs 生长慢于经空病毒感染或未经感染的 bMSCs，48 h 开始表现更加明显（$P<0.01$，图 7）。



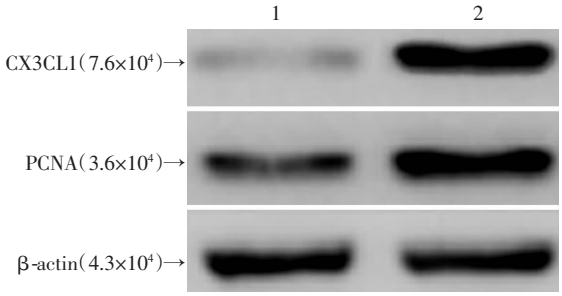

a：$P<0.01$，与各对照组比较

**图 7 CCK-8 检测重组病毒 CX3CL1 shRNA 沉默 CX3CL1 基因对 bMSCs 生长的影响**

2.7 沉默 CX3CL1 对 bMSCs 的 PCNA 基因及其蛋白表达的影响

Real-time PCR 结果表明，以经病毒 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 感染 48 h 的细胞总 RNA 作模板，分别检测结果显示 CX3CL1 微弱表达，PCNA 较弱表达；用空病毒感染 48 h 的细胞总 RNA 作模板，均可检测到 CX3CL1 与 PCNA 基因的较强表达。Western blot 检测

结果显示,与空病毒感染的 bMSCs 相比,病毒 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 感染 48 h 的细胞,也能检测见 CX3CL1 的微弱和 PCNA 较弱表达(图 8)。这些结果提示,重组病毒 CD513B-1/CX3CL1 shRNA 可较好的使 bMSCs 的 CX3CL1 基因及其编码蛋白得以沉默,还可下调 bMSCs 的 PCNA 基因及其编码蛋白的表达。

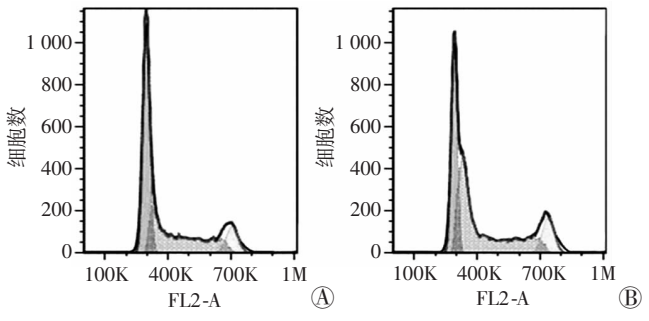



1:CX3CL1 shRNA 病毒感染的 bMSCs;2:空病毒感染的 bMSCs

**图 8 Western blot 检测各组 bMSCs 的 CX3CL1 与 PCNA 蛋白表达**

2.8 沉默 CX3CL1 对 bMSCs 周期的影响

细胞周期的 FCM 检测结果显示,与正常对照细胞[$G_1$期:(49.31±1.68)%;S 期:(38.27±1.17)%,图 9A]比较,沉默 CX3CL1 的 bMSCs,其 $G_1$ 期降低[(16.16±0.43)%,S 期细胞增加(14.20±0.25)%,图 9B],可见,沉默 CX3CL1 的 bMSCs 被阻滞于 S 期,其差异有统计学意义($P<0.01$)。由此提示,沉默 CX3CL1 阻抑 bMSCs 增殖的机制之一可能是将 bMSCs 阻滞于 S 期。

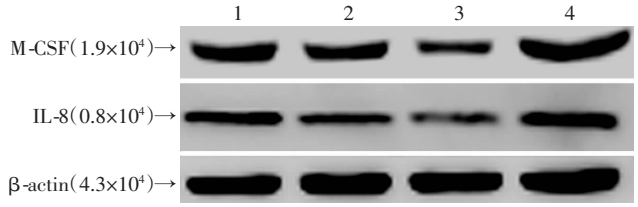



A:对照 bMSCs;B:沉默 CX3CL1 的 bMSCs

**图 9 FCM 检测沉默 CX3CL1 对 bMSCs 周期的影响**

2.9 沉默 CX3CL1 基因的 bMSCs 趋化效应的 Western blot 检测

Western blot 检测结果显示,和单纯培养的脾巨噬细胞相比,与经病毒感染的 bMSCs 共培养的脾巨噬细胞(第 1 实验组)能检测见其趋化因子 M-CSF、IL-8 的最弱表达(图 10);共培养体系中加入细胞因子 CX3CL1 时,脾巨噬细胞(第 2 实验组)的 M-CSF、IL-8 的表达最强;与空病毒感染的 bMSCs 共培养的脾巨噬细胞的 M-CSF、IL-8 的表达次强。此结果提示,bMSCs 能分泌 CX3CL1 在炎症反应的趋化效应中发挥重要作用。




1:与空病毒感染的 bMSCs 相同密度共培养的脾巨噬细胞;2:单纯培养的脾巨噬细胞;3:第 1 实验组;4:第 2 实验组

**图 10 Western blot 检测沉默 CX3CL1 基因的 bMSCs 趋化效应**

## 3 讨论

本研究首先分离、培养大鼠 bMSCs 并予以其表面标志的 FCM 检测鉴定,结果证实,所获得的 bMSCs 具有干细胞的形态与表面标志特性,可用于后续实验。其次构建大鼠 CX3CL1 基因的 shRNA 重组慢病毒载体,实现了慢病毒介导 shRNA 对 bMSCs 的 CX3CL1 基因的有效沉默。

趋化因子是结构与功能相关的一类超家族多肽,其分子序列中大多具有 4 个半胱氨酸残基(C 或 Cys),根据其 N 末端保守的 2 个 Cys 排列情况,可分成 C、CC、CXC 及 CX3C 4 个亚家族。CX3CL1 是 CX3C 的配体,其独特的结构(黏蛋白样杆状)决定了其以膜结合型与游离型方式存在,还具有黏附与趋化活性[11]。在炎症过程中,CX3CL1 显著表达于血管内皮细胞表面,促使中性粒细胞的黏附、趋化并跨越内皮细胞,迁徙到作用靶位[11-12],其受体 CX3CR1 主要在内皮细胞与白细胞表面表达,为一种特异受体(7 次跨膜 G 蛋白偶联受体)[13-14]。CX3CR1 是一特殊的黏附分子,其介导细胞黏附无需其他分子参与。CX3CL1 作为趋化因子结合 CX3CR1 参与免疫反应与细胞间信号转导[15]。CX3CL1 还与神经系统关系密切,在大脑内广泛分布,但主要集中在神经元。CX3CL1 在神经元

发育和分化过程中扮演了一定的角色[16]。

缺血性脑卒中是严重危害人类健康和生命安全的常见难治性疾病,由血栓或栓塞导致血管阻塞引起脑组织缺血、缺氧,脑组织神经元发生不可逆性死亡,同时启动了以局部固有免疫细胞的激活和外源性白细胞的浸润为特征的组织非特异性炎症。炎症主要通过以下几方面介导脑组织损伤:白细胞机械性堵塞微循环通道,造成"无再流"现象,缺血区得不到氧和营养物质的供应;大量蛋白水解酶与氧自由基等可经活化的白细胞释放而损伤内皮细胞,破坏血脑屏障,导致脑水肿、脑出血及神经元损伤;白细胞释放的大量炎性介质和细胞因子,可直接导致脑组织细胞坏死或凋亡。可见,炎症是缺血性脑卒中病理生理过程中的重要因素,贯穿了疾病发展的始终,与患者病情严重程度和预后直接相关。因此,针对炎症反应作用机制的关键环节加以干预,有可能成为治疗缺血性脑卒中新的治疗途径。

MSCs 具有自我更新和多向分化的潜能,能在不同的微环境中分化为其环境所需要的细胞,特别是其能横向分化为神经细胞的特性,使其广泛应用于神经系统性疾病的研究[5,17]。MSCs 主要以旁分泌的方式释放可溶性因子影响组织内细胞的功能行为,展现其显著的免疫炎症反应调节与中枢神经系统保护能力[5,17]。在炎症反应中,MSCs 可明显上调小胶质细胞的 CX3CR1 的表达,而 CX3CR1 又是 CX3CL1 的受体[5]。因此,脑缺血时 MSCs 能否通过分泌 CX3CL1,以调控其炎症反应,减轻脑卒中缺血脑组织损伤,促进神经修复,尚不十分清楚。

为了干预缺血性脑卒中的关键环节——炎症反应,我们首先把广泛应用于神经系统性疾病研究的 bMSCs 与 CX3CL1 基因(和炎症反应的趋化效应密切相关)相结合,并将沉默 CX3CL1 基因的 bMSCs 与巨噬细胞共培养,以探讨 CX3CL1 基因对 bMSCs 生长的影响及沉默 CX3CL1 基因的 bMSCs 的趋化效应,为 bMSCs 负载 CX3CL1 基因调控炎症反应,治疗脑卒中奠定基础。CCK-8 检测结果显示,与对照细胞比较,沉默 CX3CL1 基因的 bMSCs 的生长明显减慢。细胞的生长、增殖与其核抗原基因 PCNA 密切相关。PCNA 合成并存在于胞核内,有可溶性与不溶性两种类型。不溶性 PCNA 相当稳定,在细胞周期的 $G_1$ 晚期表达明显增加,其量的变化和 DNA 合成相一致。PCNA 在细胞中的表达检测是反映细胞增殖的良好指标。Real-time PCR、Western blot 检测结果表明,沉默 CX3CL1 基因后,bMSCs 的 PCNA 基因及其编码蛋白的表达明显下调。细胞周期检测显示,沉默 CX3CL1 的 bMSCs 其周期被阻滞于 S 期,其生长、增殖减慢。这些结果提示,沉默 CX3CL1 的 bMSCs,其 PCNA 表达下调、DNA 合成减少、细胞周期被阻是 bMSCs 生长、增殖受抑的可能机制之一。实验结果还显示,与沉默 CX3CL1 的 bMSCs 相比,经空病毒感染或未经感染的 bMSCs,其生长、增殖能力明显较强,其细胞周期亦未受抑,且还能上调巨噬细胞的趋化因子 M-CSF、IL-8 的表达,因此,bMSCs 的 CX3CL1 可能会以自分泌的形式促进其增殖。上述结果提示,bMSCs 可能通过分泌 CX3CL1 基因调控炎症反应在介导脑卒中的损伤组织与神经等的修复过程中发挥重要作用。

我们下一步研究拟将过表达与沉默 CX3CL1 基因的 bMSCs 从尾静脉分别注入脑卒中模型大鼠,观察该 bMSCs 在脑卒中损伤部位的分布、迁移,对损伤部位炎症及损伤神经等的影响,以期探明 bMSCs 可通过分泌 CX3CL1 调控脑卒中损伤部位炎症反应,促进其组织与神经等的修复。

**参考文献:**

[1] Liu L, Wang D, Wong K S, *et al*. Stroke and stroke care in China: huge burden, significant workload, and a national priority[J]. Stroke, 2011, 42(12): 3651-3654. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.635755

[2] Shafi N, Levine J M. Emergency management of acute ischemic stroke[J]. Curr Atheroscler Rep, 2010, 12(4): 230-235. DOI: 10.1007/s11883-010-0116-5

[3] Mochizuki N, Moriyama Y, Takagi N, *et al*. Intravenous injection of neural progenitor cells improves cerebral ischemia-induced learning dysfunction[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(2): 260-265. DOI: 10.1248/bpb.34.260

[4] Wang S P, Wang Z H, Peng D Y, *et al*. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(4): 848-854. DOI: 10.3892/mmr.2012.997

[5] Giunti D, Parodi B, Usai C, *et al*. Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1[J]. Stem Cells, 2012, 30(9): 2044-2053. DOI: 10.1002/stem.1174

[6] Xia J 1, Luo M, Ni N, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate proliferation and neuronal differentiation of retinal progenitor cells[J]. PLoS One, 2013, 30; 8(9):

e76157. DOI: 10.1371/journal.pone.0076157

[7] 郝磊, 邹仲敏, 王军平, 等. hPD GF2A /hBD2 双基因共表达腺病毒载体的构建及表达[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 859 - 862. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-5404.2007.10.001

[8] 刘晓丽, 马阳, 梁源, 等. 慢病毒介导 shRNA 沉默 E2-2 基因促进内皮前体细胞增殖[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(22): 2261 - 2266. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201503187

[9] Xiang Y, Li Q, Huang D, *et al*. Preparation and antitumor effect of a toxin-linked conjugate targeting vascular endothelial growth factor receptor and urokinase plasminogen activator [J]. Exp Biol Med, 2015, 240(2): 160 - 168. DOI: 10.1177/15353 70214547154

[10] Dombrink-Kurtzman M A, Gomez-Flores R, Weber R J. Activation of rat splenic macrophage and lymphocyte functions by fumonisin B1[J]. Immunopharmacology, 2000, 49(3): 401 - 409.

[11] Wojdasiewicz P, Poniatowski L A, *et al*. The chemokine CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1: occurrence and potential role in osteoarthritis[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014, 62(5): 395 - 403. DOI: 10.1007/s00005-014-0275-0

[12] ZuJovic V, Benavides J, Vige X, *et al*. Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation[J]. Glia, 2000, 29(4): 305 - 315. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1136

[13] Njerve I U, Pettersen A, Opstad T B, *et al*. Fractalkine and its receptor (CX3CR1) in patients with stable coronary artery disease and diabetes mellitus[J]. Metab Syndr Relat Disord, 2012, 10(6): 400 - 406. DOI: 10.1089/met.2012.0052

[14] Zanchi C, Zoja C, Morigi M, *et al*. Fractalkine and CX3CR1 mediate leukocyte capture by endothelium in response to Shiga toxin[J]. J Immunol, 2008, 181(2): 1460 - 1469. DOI: 10.4049/jimmunol.181.2.1460

[15] Bazan J F, Bacon K B, Hardiman G A, *et al*. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif[J]. Nature, 1997, 385(6617): 640 - 644. DOI: 10.1038/385640a0.

[16] Goda S, Imai T, Yoshie O, *et al*. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and independent mechanisms [J]. Immunol, 2000, 164(8): 4313 - 4320. DOI: 10.4049/jimmunol.164.8.4313

[17] Sheikh A M, Nagai A, Wakabayashi K, *et al*. Mesenchymal stem cell transplantation modulates neuroinflammation in focal cerebral ischemia: contribution of fractalkine and IL-5 [J]. Neurobiol Dis, 2011, 41(3): 717 - 724. DOI: 10.1016/j.nbd.2010.12.009

(收稿:2016-07-19;修回:2016-09-23)

(编辑 王 红)