

利用 RNAi 建立脊髓性肌萎缩症的细胞模型

杨晓苏, 胡益民, 肖波, 杨期东, 赵惠敏

(中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:应用 RNA 干扰沉默 *SMN1* 基因的表达建立脊髓性肌萎缩症(SMA)的细胞模型。方法:将 pshRNA-SMN1 重组质粒转染人骨髓间充质干细胞(hMSCs),经 G418 筛选得到能稳定表达目的 shRNA 的单克隆细胞系后将其诱导分化为神经元样细胞(NLCs)建立 SMA 细胞模型组。同期设立转染重组质粒 pshRNA-0 的对照组和未转染重组质粒的空白对照组。观察 NLCs 的细胞形态,采用免疫细胞化学染色分析 NLCs 的 NSE 和 NF 蛋白表达,用 RT-PCR 和免疫印迹方法检测 NLCs 的 *SMN* mRNA 及其蛋白表达。结果:诱导后各组细胞呈典型的神经元样细胞形态且 NSE 和 NF 蛋白表达阳性;其 *fl-SMN* mRNA, $\Delta 7$ -*SMN* mRNA 及 fl-SMN 蛋白表达均较诱导前增加($P < 0.05$),但 SMA 细胞模型组的 *fl-SMN* mRNA 及蛋白表达仍明显低于对照组($P < 0.01$);而诱导后 $\Delta 7$ -*SMN* mRNA 的表达在各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:*SMN1* mRNA 及其蛋白被抑制的 MSCs 诱导分化为 NLCs 后可以作为 SMA 的细胞模型。

[关键词] RNA 干扰; 运动神经元生存蛋白; 脊肌萎缩症; 人间充质干细胞

[中图分类号] R744 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2008)12-1108-05

Establishment of spinal muscular atrophy cell model by RNAi

YANG Xiao-su, HU Yi-min, XIAO Bo, YANG Qi-dong, ZHAO Hui-min

(Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To establish spinal muscular atrophy (SMA) cell model by blocking the expression of *SMN1* gene with shRNA. **Methods** The recombinant *SMN1* shRNA expression vector was constructed. SMA cell model was established by human mesenchymal stem cells (hMSCs) that the vector was transfected into were differentiated to neuron like cells (NLCs). At the same time the control groups were established that the shRNA-0 vector was transfected into and no vector was transfected into. The expression of *fl-SMN* and $\Delta 7$ -*SMN* mRNA was observed by RT-PCR analysis. The expression of fl-SMN protein was detected by Western blot. **Results** The cells of all the groups were neuron like cells after being differentiated and the protein expression of NSE and NF was positive. The expression of *fl-SMN* and $\Delta 7$ -*SMN* mRNA and protein of NLCs in each group was upregulated ($P < 0.05$), but the expression of $\Delta 7$ -*SMN* mRNA and protein in SMA model group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The expression of $\Delta 7$ -*SMN* mRNA between the groups had no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** The NLCs, which recombinant *SMN1* shRNA expression vector was transfected into, can be regarded as SMA cell model.

Key words: RNAi; survival motor neuron protein; spinal muscular atrophy; human mesenchymal stem cells

[J Cent South Univ (Med Sci), 2008,33(12):1108-05]

大量研究表明^[1-4],儿童型脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)是由于运动神经元生存(survival of motor neuron, SMN)基因的 *SMN1* 基因缺失导致了脊髓前角 α 运动神经元变性,使肢体近端肌无力和肌萎缩,而患儿的 *SMN2* 基因保留。*SMN1* 基因的转录产物为全长(fl) *SMN* mRNA 及全长 SMN 蛋白;*SMN2* 基因的转录产物主要为跳过外显子 7 的 $\Delta 7$ -*SMN* mRNA 及截短 SMN 蛋白。然而 *SMN1* 基因缺失后为何导致了脊髓前角 α 运动神经元变性,至今机制仍不十分清楚,而 SMA 的转基因模型制作迄今技术不成熟且花费巨大,因此,若能应用 RNA 干扰技术特异性地封闭 *SMN1* 基因的表达,则可能为 SMA 的病因和发病机制的深入研究及 SMA 的治疗研究提供新的平台。

为了更好地模拟病变细胞,本研究拟采用 RNA 干扰(RNAi)技术,在获得 *SMN1* 基因表达下调的人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)后,再使之诱导分化为神经元样细胞(neuron like cells, NLCs),通过细胞形态学的观察、神经元相关表面抗原检测,评价诱导后细胞是否符合 NLCs 的特征;同时通过检测细胞 *SMN* mRNA 及蛋白的表达,评价诱导后细胞的病理状态,以建立儿童型 SMA 的细胞模型。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞及质粒 原代培养的骨髓间充质干细胞来自湘雅医院胸外科非 SMA 且无血液疾病及骨肿瘤病人手术中废弃的肋骨骨髓。pshRNA-SMN1(所针对的靶序列为 ctatcactaggctattat,位于外显子 7,该序列对 *SMN2* mRNA 无影响)及 pshRNA-0 重组质粒已在之前的实验中构建^[5]。

1.1.2 主要试剂 G418, DMSO, BHA 及碱性成纤维生长因子为美国 Sigma 公司产品,兔抗人 SMN1 多抗为美国 Proteintech 公司产品,兔抗人 NSE 单抗、兔抗人 NF 单抗系美国 Santa Cruz 公司出品,羊抗兔 IgG-TRITC 系美国 KPL 公司出品, M-MLV 逆转录酶系美国 Promega 公司产品, Lipofectamine 2000, Trizol 系美国 Invitrogen 公司产品,引物由上海博亚生物技术公司合成。

1.1.3 主要仪器设备 荧光显微镜系日本 NIKON 公司生产,二氧化碳培养箱系美国 HARIS 公司产品,低温离心机系德国 Hettich 公司生产, PCR 仪系美国 MJ Research 公司产品, ABI 377 型测序仪系美国 Perkin Elmer 公司产品,紫外线透射

仪系美国 Stratagene 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 骨髓间充质干细胞的分离和培养 在无菌条件下用含 10% 胎牛血清的 L-DMEM 冲出骨髓,离心后去上层脂肪和上清液,加入 L-DMEM 培养基,将离心沉淀下来的细胞吹打均匀。加入淋巴细胞分离液,离心后吸取单个核细胞层,洗涤两次。分离后的细胞按 1×10^6 /mL 密度接种于 50 mL 培养瓶,4 d 后更换培养液,弃去未贴壁的细胞,3~4 d 换液 1 次,12 d 后细胞接近融合,按 1:3 比例传代。

1.2.2 转染 待细胞生长到占培养板约 95%~100% 时,分别转染重组质粒 pshRNA-SMN1 和重组质粒 pshRNA-0,以作为 SMA 细胞模型组和阴性对照组,同时与未转染的空白对照组进行比较。转染过程按 Invitrogen 转染试剂盒说明书操作。

1.2.3 G418 筛选获得单克隆株 G418 能和细胞核糖体作用抑制蛋白合成,带有新霉素抗性基因(质粒中的片段)的细胞能分解进入细胞的 G418 而继续生长并同时表达 GFP,而转染阴性的细胞生长被抑制并最终死亡。上述细胞转染后普通培养基培养 24 h,待细胞达到 80% 的融合时,再用含有 500 mg/L 的 G418 培养基继续培养 2 周筛选抗药克隆株。将筛选抗药克隆株放大培养(普通培养基),冻存备用。

1.2.4 定向诱导 MSCs 分化为 NLCs 及鉴定 细胞 80% 融合时,用预诱导液(L-DMEM, 15% FBS, 10 μ g/L bFGF)预诱导 24 h,再用诱导液(L-DMEM, 2% DMSO, 200 mmol/L BHA),诱导 5 h。正常培养基(L-DMEM, 15% FBS)培养 24 h。诱导后的细胞经固定、封闭后,分别加入兔抗人 NSE(1:100)多抗,兔抗人 NF(1:100)多抗。4 $^{\circ}$ C 过夜后,加入荧光二抗山羊抗兔 IgG-TRITC(1:150),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,以 80% 缓冲甘油封片。

1.2.5 RT-PCR 检测细胞内 fl-SMN mRNA 的表达 *SMN1* 上游引物,5'-CCACTTACTATCATGCTGGCTG-3',下游引物,5'-ACTAAAGAAACGATCAGACAG-3',产物全长 266 bp; *GAPDH* 上游引物,5'-CGGAGTCAACCGATTGCTGCTAT-3',下游引物,5'-AGGCTTCTCCATGGTGGTAGAGAC-3',产物长度 306 bp。半定量分析用凝胶成像系统软件测定各电泳带光密度值,按公式“mRNA 表达丰度值=目的条带光密度值/内参 *GAPDH* 光密度值”计算,将表达量化。

1.2.6 免疫印迹法检测细胞内 fl-SMN 蛋白的表达 胰酶消化诱导后的神经元样细胞,离心收

集细胞沉淀,加入 RIPA 蛋白裂解液,离心取上清,用考马斯亮蓝法检测蛋白浓度。取等量蛋白加样于 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳后使用电转移系统将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,兔抗人 SMN1 多抗 (1:500) 孵育过夜, TBST 液振荡漂洗 10 min \times 3 次,加 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:1 000) 孵育 1 h, TBST 液振荡漂洗 10 min \times 3 次。以 DAB 显色,无明显背景着色时蒸馏水终止反应。应用 Syngene Bio Imaging 检测系统观察并照相。半定量分析用 Image-Pro Plus 软件测定各电泳带光密度值,按公式“蛋白表达丰度值 = 目的条带光密度值/内

参 GAPDH 光密度值”计算,将表达量化。

1.3 统计学处理 统计学分析用 SPSS10.0 统计软件包处理。测定数值用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间均数比较用 t 检验;多组均数间多重比较采用 F 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。图表用 Excel 2003 绘制。

2 结 果

2.1 G418 筛选前后 MSCs GFP 表达的变化

结果显示,经 G418 筛选后,几乎所有 MSCs 都能表达 GFP (图 1)。

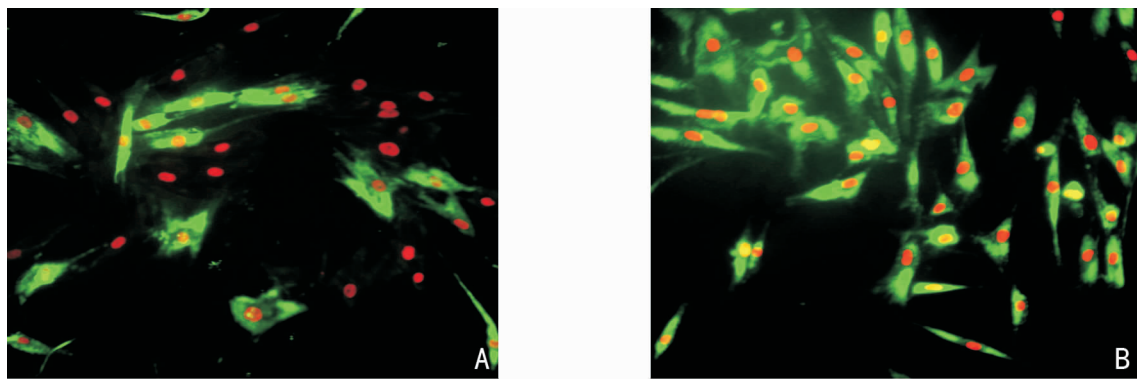


图 1 G418 筛选前后 MSCs GFP 表达的变化 (PI 染色, $\times 100$)。A: G418 筛选前; B: G418 筛选后。

Fig. 1 Expression of GFP before and after the screening by G418 (PI, $\times 100$). A: Untreated by G418; B: Treated by G418.

2.2 定向诱导 MSCs 分化为 NLCs 后的形态变化及鉴定

预诱导早期细胞形态无明显变化,24 h 镜下观察,细胞体积缩小,立体感增强,少部分胞体收缩成锥形或球形,突起收缩或变得细长,少量细胞脱落死亡。加入诱导液后细胞急速向具有神经元特点的细胞转化,扁平的胞浆向胞核收缩,胞膜向外周伸出突起。随着时间的延长,细胞逐渐变圆且折旋光性增强,突起继续延长出

现一级分支和二级分支,部分 MSCs 在 5 min 时即呈现为典型的神经细胞形态,神经元样细胞明显增多,至第 5 小时,90% 以上细胞的形态发生变化,细胞突起末端发出次级分支,突起与相邻细胞胞体或突起相连,形成网络样结构 (图 2)。

用神经元特异性标志物 NSE 和 NF 免疫荧光染色鉴定,结果显示分化后的细胞 NSE 和 NF 均为阳性 (图 3, 4)。

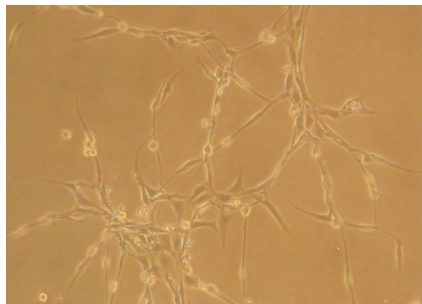


图 2 诱导 5 h 后神经元样细胞形态 ($\times 40$)。

Fig. 2 Morphous of NLCs at 5 h after the induction.

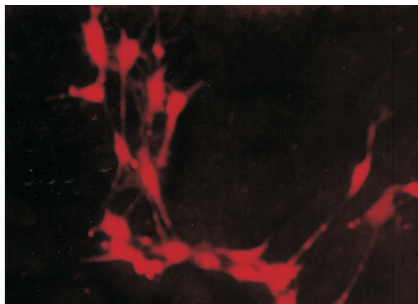


图 3 诱导后 NSE 阳性细胞 (TRITC 染色, $\times 100$)。

Fig. 3 NSE positive cells after the induction (TRITC, $\times 100$).

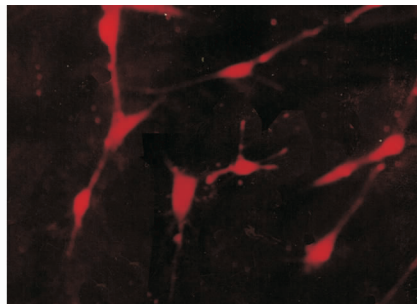


图 4 诱导后 NF 阳性细胞 (TRITC 染色, $\times 100$)。

Fig. 4 NF positive cells after the induction (TRITC, $\times 100$).

2.3 NLCs 的 *fl-SMN*, $\Delta 7-SMN$ mRNA 及 fl-SMN 蛋白表达和比较 诱导后各组细胞的 *fl-SMN* mRNA, $\Delta 7-SMN$ mRNA 及 fl-SMN 蛋白表达均较诱导前增加 ($P < 0.05$), 但 SMA 细胞模型组 *fl-SMN* mRNA 及其蛋白表达量明显低于阴性对照

组和空白对照组 ($P < 0.01$); 而阴性对照组与空白对照组相比, *fl-SMN* mRNA 及其蛋白的表达量无统计学差异 ($P > 0.05$); 3 组间 SMN $\Delta 7-SMN$ mRNA 的表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1, 图 5, 6)。

表 1 诱导分化前后各组细胞 *fl-SMN* mRNA, $\Delta 7-SMN$ mRNA 及蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Expression of SMN mRNA and protein before and after the differentiation in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>fl-SMN</i> mRNA		$\Delta 7-SMN$ mRNA		fl-SMN 蛋白	
	诱导前	诱导后	诱导前	诱导后	诱导前	诱导后
pshRNA-SMN1-1 组	0.21895 \pm 0.03139	0.31080 \pm 0.04381 * ^{ΔΔ}	0.48463 \pm 0.05286	0.57931 \pm 0.04861 *	0.30618 \pm 0.03651	0.44762 \pm 0.04786 * ^{ΔΔ}
pshRNA-0 对照组	0.59874 \pm 0.04221	0.73143 \pm 0.03735 *	0.50204 \pm 0.03770	0.54363 \pm 0.03578 *	0.66634 \pm 0.05163	0.80813 \pm 0.05007 *
未转染空白对照组	0.62988 \pm 0.03477	0.69293 \pm 0.05133 *	0.49132 \pm 0.02378	0.54765 \pm 0.04157 *	0.69397 \pm 0.06492	0.78213 \pm 0.04709 *

与同组诱导前的 *fl-SMN* mRNA 及其蛋白和 $\Delta 7-SMN$ mRNA 水平比较, * $P < 0.05$; 与 psh-RNA-0 对照组及未转染空白对照组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

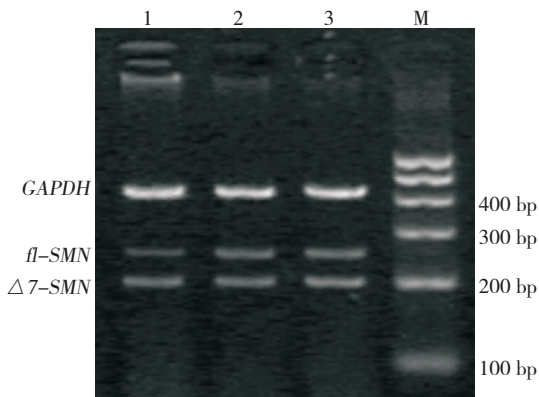


图 5 诱导分化后各组细胞 SMN mRNA 表达电泳图。1: pshRNA-SMN1-1 组; 2: pshRNA-0 对照组; 3: 未转染空白对照组。

Fig. 5 Electropherogram of SMN mRNA expression. 1: pshRNA-SMN1-1 group; 2: pshRNA-0 control group; 3: Blank control group.

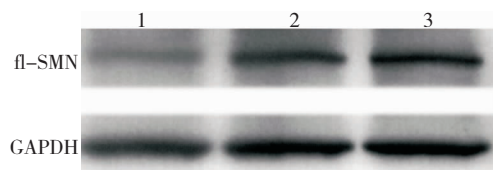


图 6 诱导分化后各组细胞 fl-SMN 蛋白表达电泳图。1: pshRNA-SMN1-1 组; 2: pshRNA-0 对照组; 3: 未转染空白对照组。

Fig. 6 Electropherogram of fl-SMN protein expression. 1: pshRNA-SMN1-1 group; 2: pshRNA-0 control group; 3: Blank control group.

3 讨 论

大量实验证实, MSCs 在一定的环境诱导下能分化成为神经元样细胞并一定程度上发挥神经元的功能^[6]。本研究应用 Bfgf, DMSO 和丁羟茴醚作为诱导剂, 结果显现 MSCs 诱导后出现神经元样形态学改变, 表现为细胞由铺展状变为胞浆向胞核收缩、立体感增强, 胞膜向外周伸出突起。随着时间的延长, 神经元样细胞明显增多, 突起继续延长并出现一级分支和二级分支, 突起与相邻细胞胞体或突起相连, 形成网络样结构。这提示体外培养的 MSCs 经诱导后可向神经元样细胞分化。为明确这种神经元样细胞是否具有神经元的某些特性, 笔者又采用免疫细胞荧光方法, 对细胞进行了神经元特异性标志物 NSE 和 NF 检测, 结果发现未诱导的 MSCs 没有 NSE 和 NF 表达; 诱导 5 h 后 NSE 和 NF 的表达明显上调, 提示诱导后的 MSCs 在形态及生理上均有某些神经元特征, 可以作为体外神经细胞模型。

真核生物所有组织均表达 SMN 蛋白, 说明 SMN 蛋白是所有细胞基本活动的必需物质。但 SMN 蛋白在哺乳动物的组织和细胞中的表达水平差异很大, 它在脑、肾脏、肝脏, 尤其在运动神经元中高水平表达, 在骨骼肌和心肌中中等水平表达, 在成纤维细胞和淋巴细胞中则表达水平较低^[7]。SMN 蛋白在运动神经元中稳定的高水平表达说明运动神经元的生存及其功能发挥严格

依赖于 SMN 蛋白。儿童型 SMA 患者也正是由于脊髓前角运动神经元 fl-SMN 蛋白的表达量不足,细胞生理功能缺陷从而导致其变性脱失^[8]。因此,通过抑制神经元样细胞 fl-SMN 蛋白的表达可以模拟儿童型 SMA 患者细胞的病理状态。本实验结果显示,与诱导前的 MSCs 相比,诱导分化后的神经元样细胞中 *fl-SMN* mRNA 及蛋白表达量明显增加,这支持神经元的生存及其功能的发挥依赖于高水平 SMN 蛋白的表达。但诱导后各组间比较显示,SMA 细胞模型组 *fl-SMN* mRNA 及蛋白表达量明显低于阴性对照组和未转染空白对照组,而后两组比较差异无统计学意义,且 3 组间 $\Delta 7$ -*SMN* mRNA 的表达量比较差异无统计学意义。这些结果表明,诱导分化后的 SMA 细胞模型组 NLCs 符合 SMA 细胞的病理状态,可以作为 SMA 的模型细胞进行实验研究。

2004 年 Trulzsch 等^[9]利用双链小干扰 RNA (siRNA)直接抑制鼠畸胎瘤细胞 *Smn* 基因表达制作 SMA 细胞模型。本研究是利用 shRNA (以质粒为载体)沉默人 *SMN1* 基因制作的细胞模型,能更加稳定持久地发挥干扰作用,且建立细胞系后可直接用于科学研究,同时采用人骨髓间充质干细胞诱导神经元样细胞,更接近临床,因此意义更大。

参考文献:

- [1] Hausmanowa-Petrusewicz I, Vrbova G. Spinal muscular atrophy: a delayed development hypothesis [J]. *Neuroreport*, 2005, 16(7): 657-661.
- [2] Garcia-Cabezas M A, Garcia-Alix A, Martin Y, et al. Neonatal spinal muscular atrophy with multiple contractures, bone

fractures, respiratory insufficiency and 5q13 deletion [J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2004, 107(5): 475-478.

- [3] Ogino S, Wilson R B. Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004, 4(1): 15-29.
- [4] Federici T, Boulis N M. Gene-based treatment of motor neuron diseases [J]. *Muscle Nerve*, 2006, 33(3): 302-323.
- [5] 杨晓苏, 胡益民, 肖波, 等. shRNA 抑制人骨髓间充质干细胞 *SMN1* 基因表达的研究 [J]. *中华医学杂志*, 2007, 9(4): 2369-2371.
- YANG Xiao-su, HU Yi-ming, XIAO Bo, et al. shRNA suppression of human mesenchymal stem cells *SMN1* gene expression [J]. *National Medical Journal of China*, 2007, 9(4): 2369-2371.
- [6] 林竞初, 郭坤元, 李江琪, 等. 人骨髓基质干细胞克隆的培养及其向神经元样细胞的定向诱导分化 [J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(3): 251-253, 264.
- LIN J R, GUO K Y, LI J Q, et al. In vitro culture of human bone marrow mesenchymal stem cell clones and induced differentiation into neuron-like cells [J]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(3): 251-253, 264.
- [7] Su Y N, Hung C C, Li H, et al. Quantitative analysis of *SMN1* and *SMN2* genes based on DHPLC: a highly efficient and reliable carrier-screening test [J]. *Hum Mutat*, 2005, 25(5): 460-467.
- [8] Lefebvre S, Burglen L, Frezal J, et al. The role of the *SMN* gene in proximal spinal muscular atrophy [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(10): 1531-1536.
- [9] Trulzsch B, Davies K, Wood M. Survival of motor neuron gene downregulation by RNAi: towards a cell culture model of spinal muscular atrophy [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 120(2): 145-150.

(本文编辑 陈丽文)