

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00160

· 论 著 ·

小鼠雌激素受体 α 重组慢病毒的构建及其感染神经细胞的鉴定

胡 晓¹, 王建怡², 袁 军³, 万 兴⁴, 黄伟琨⁵, 秦新月^{1*}

1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016

2. 贵州省人民医院小儿内科, 贵阳 550002

3. 贵州省人民医院中心实验室, 贵阳 550002

4. 贵州省人民医院肿瘤科, 贵阳 550002

5. 贵州省人民医院口腔科, 贵阳 550002

[摘要] **目的** 构建携带 C57BL/6 小鼠雌激素受体 α (estrogen receptor α , $Er\alpha$) 的重组慢病毒, 感染原代培养的小鼠神经细胞, 观察是否能提高 $Er\alpha$ 的表达, 为进一步研究 $Er\alpha$ 与神经系统疾病的关系奠定基础。 **方法** 将 $Er\alpha$ 基因片段插入慢病毒主体载体 LV-GFP-flag, 构建重组慢病毒载体 LV- $Er\alpha$ -flag。通过琼脂糖凝胶电泳 (agarose gel electrophoresis, AGE)、基因测序验证后, 将 LV- $Er\alpha$ -flag 与包装质粒 pHelper1.0、pHelper2.0 共同转染 293T 细胞, 测定病毒滴度, 获得携带 $Er\alpha$ 基因的重组慢病毒 V- $Er\alpha$ -flag。无血清培养 C57BL/6 小鼠的神经细胞, 对照病毒 V-GFP-flag 感染神经细胞, 在荧光显微镜下每天观察荧光表达情况, 用流式细胞仪检测感染效率和凋亡率以获得最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI)。然后用最佳 MOI 值的重组慢病毒 V- $Er\alpha$ -flag 感染神经细胞, 采用实时定量 PCR、蛋白质印迹方法检测感染后细胞中 $Er\alpha$ 的转录和蛋白表达水平。 **结果** AGE 及测序鉴定均表明重组慢病毒载体构建成功, 包装、扩增后得到 V- $Er\alpha$ -flag, 感染滴度为 2×10^8 TU/ml; MOI=5 的对照病毒 V-GFP-flag 能感染神经细胞, 感染效率达 $(89.8 \pm 4.03)\%$, 而凋亡率仅为 $(3.6 \pm 0.29)\%$ 。神经细胞至少能存活 8 周, 在此期间 GFP 能持续表达, 说明慢病毒能有效而稳定感染神经细胞。用 MOI=5 的 V- $Er\alpha$ -flag 感染神经细胞后, 能显著增强神经细胞中的 $Er\alpha$ mRNA 和蛋白表达水平。 **结论** 成功构建了携带 $Er\alpha$ 基因的重组慢病毒, 其能成功感染神经细胞, 使 $Er\alpha$ mRNA 和蛋白表达水平增高。

[关键词] 重组慢病毒; 神经元; 雌激素受体 α **[中图分类号]** Q 781 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)02-0160-07

Construction of recombinant lentivirus carrying mouse estrogen receptor α and identification in infected neurons

HU Xiao¹, WANG Jian-yi², YUAN Jun³, WAN Xing⁴, HUANG Wei-kun⁵, QIN Xin-yue^{1*}

1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Guizhou, Guiyang 550002, Guizhou, China

3. Central Laboratory, the People's Hospital of Guizhou, Guiyang 550002, Guizhou, China

4. Department of Oncology, the People's Hospital of Guizhou, Guiyang 550002, Guizhou, China

5. Department of Stomatology, the People's Hospital of Guizhou, Guiyang 550002, Guizhou, China

[Abstract] **Objective** To construct a recombinant lentivirus carrying C57BL/6 mouse estrogen receptor α ($Er\alpha$) and to infect mouse neurons, so as to pave a way for further studying the relationship of $Er\alpha$ with some nervous system diseases. **Methods** $Er\alpha$ gene was inserted into the main virus vector LV-GFP-flag to construct recombinant lentiviral vector LV- $Er\alpha$ -flag, which was confirmed by agarose gel electrophoresis (AGE) and DNA sequencing. Recombinant lentivirus V- $Er\alpha$ -flag was produced by 293T cells following the co-transfection of LV- $Er\alpha$ -flag with the packaging plasmids pHelper 1.0 and pHelper 2.0, and the virus titer was examined. The neurons of C57BL/6 mouse were cultured using a serum-free culture medium, and then control lentivirus V-GFP-flag was used to infect the neurons. The infection efficiency and apoptosis rate were examined by flow

[收稿日期] 2010-09-17 **[接受日期]** 2011-01-04**[基金项目]** 贵州省科技厅攻关项目[黔科合 sy(2009)3054], 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金[黔省专合字(2010)86号]. Supported by Key Technology Program of Science and Technology Department of Guizhou Province (Qiankehe sy[2009]3054) and Governor Special Fund for Outstanding Science and Technology Education Talents of Guizhou Province (QianShengzhuanhezi[2010]86).**[作者简介]** 胡 晓, 博士生. 现在贵州省人民医院神经内科, 贵阳 550002. E-mail: natasan520@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-89012478, E-mail: Qinxinyue@yahoo.com

cytometry to obtain optimal multiplicity of infection (MOI). GFP expression was detected daily under an inverted fluorescent microscope. After that, V-Er α -flag with the optimal MOI was used to infect neurons; the expression of Er α mRNA and protein in the neurons was detected by quantitative real-time PCR and Western blotting analysis. **Results** AGE and DNA sequencing confirmed that LV-Er α -flag was successfully constructed, and packaged into 293T cells with a titer of 2×10^8 TU/ml. Control lentivirus V-GFP-flag could infect neurons, with the infection efficiency being $(89.8 \pm 4.03)\%$ and the cell apoptosis rate being only $(3.6 \pm 0.29)\%$ when MOI=5. Neurons could survive in the culture for at least 8 weeks, during which the GFP was persistently expressed, indicating the lentivirus could efficiently and stably infect the neurons. The expression of Er α mRNA and protein was greatly increased in neurons infected with V-Er α -flag (MOI=5). **Conclusion** The recombinant lentivirus carrying Er α has been constructed successfully, which can infect neurons and lead to increase the expression of Er α mRNA and protein.

[Key words] recombinant lentivirus; neurons; estrogen receptor α alpha

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(2): 160-166]

雌激素及其受体不仅对性发育和生殖功能至关重要,而且在其他组织如脑和脊髓中,也发挥着重要的作用。雌激素及其受体可参与神经系统的多种功能调节,并对中枢神经系统有保护作用。使用雌二醇或雌激素受体(estrogen receptor, Er)配体治疗已被证明在多种神经系统疾病中具有抗炎^[1]和神经保护作用^[2]。以往研究报道雌激素可能有效治疗与急性或慢性损伤相关的多种神经退行性疾病,如老年痴呆症^[3]、多发性硬化^[4]、脊髓损伤^[5]、帕金森病^[6]、小脑共济失调^[7]、唐氏综合征^[8]、癫痫^[9]和短暂性脑缺血^[10]。

雌激素的细胞反应性和敏感性主要是由两个不同的 Ers 亚型介导: Er α 和 Er β 。Ers 属核受体超家族成员,是一种配体依赖的转录因子,通过调控基因的表达控制生物学效应。一般来说,在 Er 调节的基因启动子区有特定核苷酸序列,称雌激素反应元件(estrogen response elements, ERE)。配体与 Ers 连接可能导致受体二聚体形成(Er α /Er α 、Er β /Er β 或 Er α /Er β),再与 ERE 结合, Ers 与 ERE 的相互作用会导致靶基因转录的增加或减少^[11]。虽然这两个受体具有相似的 DNA 和配体结合区域^[12],但它们的组织/细胞分布特点既重叠却又不完全相同。在雌激素的靶组织/细胞中,不同配体的生物学特性和相应的转录方向与配体的浓度密切相关^[13]。因此, Ers 是雌激素产生生物效应的基本要素,在靶组织/细胞中 Ers 的数量和类型对雌激素的细胞反应性至关重要^[3, 14]。在中枢神经系统中,尽管 Er α 和 Er β 在多种细胞中表达,如神经细胞、巨噬细胞和胶质细胞,但它们的组织分布不同。一些研究表明, Er β 在成年小鼠中枢神经系统中表达广泛^[15],但雌激素在神经系统疾病中的神经保护作用 and 抗炎作用则主要通过 Er α 介导^[16]。因此本实验将 C57BL/6 小鼠的 Er α

编码区(CDS)插入慢病毒载体,构建携带 Er α 的重组慢病毒,并使其感染神经细胞,提高 Er α mRNA 和蛋白表达,为探讨 Er α 在中枢神经系统中的生物学效应及寻求神经系统疾病的基因治疗新方法奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞和质粒 质粒 pMD19-Er α 、大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和 293T 细胞由贵州省人民医院中心实验室保存,含绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)和 flag 标记物的慢病毒表达载体穿梭质粒 LV-GFP-flag 购自 Genechem 公司,慢病毒结构质粒 pHelper1.0 及慢病毒包膜蛋白质粒 pHelper2.0 购自 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂及仪器 Age I、Nhe I 酶购自 New England Biolab 公司; SYBR Master Mixture 试剂盒购自 TaKaRa 公司; In-Fusion 试剂盒购自 BD 公司; TRIzol、Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司; 小鼠抗人 Er α 单克隆抗体购自 LifeSpan Biosciences 公司; 羊抗小鼠二抗购自 Santa Cruz 公司; 蛋白定量试剂盒购自 HyClone-Pierce; ECL-Plus 试剂盒购自 Amersham 公司; PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司; 小鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体购自武汉博士德公司; D-Hank 缓冲液、DMEM-F12 购自 HyClone 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; B27 培养基购自 Gibco 公司; 胰蛋白酶购自 Ameresco 公司; L-多聚赖氨酸购自 Sigma 公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自 Usclife 公司; C57BL/6 新生鼠购自重庆医科大学实验动物中心; 引物合成和基因测序均由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3 带有 Age I 和 Nhe I 内切酶的 Er α CDS 区引物设计 上游引物 5'-GAG GAT CCC CGG GTA

CCG GTC GCC ACC ATG ACC ATG ACC CTT
CAC AC-3' (单下划线标记为 *Age* I 酶切位点, 双下划线标记为表达增强序列), 下游引物 5'-TCA TCC TTG TAG TCG CTA GCG ATC GTG TTG GGG AAG C-3' (双下划线标记为 *Nhe* I 酶切位点), 以 pMD19- $Er\alpha$ 为模板, PCR 扩增目的基因。扩增条件为 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 10 s, 56℃ 15 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。 *Age* I、*Nhe* I 酶分别酶切主载体 LV-GFP-flag 和上述 PCR 产物。纯化以上片段, 用 In-Fusion 试剂盒将回收的酶切 PCR 产物连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。具青霉素抗性的 LB 培养基于 37℃ 培养 16 h, 提取单克隆质粒。用 AGE 鉴定连接是否成功, 引物设计如下: 上游引物 5'-GAT CCA CCT GAT GGC CAA AG-3', 下游引物 5'-AGC GTA AAA GGA GCA ACA TAG-3'。扩增条件为 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 6 min。将 PCR 产物的阳性克隆命名为 LV- $Er\alpha$ -flag, 送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 重组慢病毒的包装、浓缩和滴度测定 常规方法培养 293T 细胞于 10 cm 细胞培养皿, 至细胞数大约为 5×10^5 个进行转染, 主体重组慢病毒载体 (LV- $Er\alpha$ -flag), 辅助质粒 pHelper1.0 和 pHelper 2.0 与同体积的 Lipofectamine 2000 混合, 转染 293T 细胞。于 37℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养 8 h 后更换为完全培养液, 继续培养 48 h 后收集含慢病毒颗粒的细胞上清液, 于 4℃、4 000 r/min (离心半径 $r=10$ cm) 离心 10 min 去除细胞碎片。以 0.45 μ m 过滤器过滤上清液, 得到高浓度的慢病毒浓缩液, 再于 4℃、4 000 r/min (离心半径 $r=10$ cm) 离心 10 min, 浓缩 2 次。最终的浓缩液为病毒原液, 命名为 V- $Er\alpha$ -flag。实时定量 PCR 检测 V- $Er\alpha$ -flag 的滴度。10 倍稀释法稀释病毒原液直到浓度为 10^{-5} , 用不同浓度的样本 1 μ l 分别感染 4×10^4 个 293T 细胞, 4 d 后用 TRIzol 提取每个样本的总 RNA, 经反转录合成 20 μ l cDNA, 取其中 1 μ l, 根据 SYBR Master Mixture 试剂盒的产品说明书进行实时定量 PCR 检测。 β -actin 作为看家基因。 $Er\alpha$ 的引物设计如下: 上游引物 5'-AAT TCC TGG TGT TGT CG-3', 下游引物 5'-AAG GTC CGC TGG ATT GAG-3'。 β -actin 的引物设计如下: 上游引物 5'-GTG GAC ATC CGC AAA GAC-3', 下游引物 5'-AAA GGG TGT AAC GCA ACT A-3'。

1.5 神经细胞的培养及感染 用 C57BL/6 乳鼠

(出生 24 h 内) 大脑皮质培养原代神经细胞。剥离乳鼠的大脑皮质置于预冷的培养皿中, 预冷的 D-Hank 缓冲液将组织冲洗 3 次, 用微型手术镊剥离血管和脑膜, 然后用剪刀将组织剪成小块, 胰蛋白酶 37℃ 消化 15 min, 用等体积的基础培养液 (1:1 DMEM/F12, 加入 10% 胎牛血清, 10^3 U/ml 青霉素, 1 mg/ml 链霉素) 终止消化, 火抛光的移液管机械性吹打后, 通过 100 μ m 的细胞过滤器获得单细胞悬液。将 L-多聚赖氨酸包被过的盖玻片放入 6 孔板中, 以 1×10^5 个神经细胞/孔的密度接种于 6 孔板, 于 37℃、5% CO_2 的细胞培养箱内培养。24 h 后, 用无血清培养液 (1:1 DMEM/F12, 补充为 1% 生长因子 B-27, 10^3 U/ml 青霉素, 1 mg/ml 链霉素) 更换基础培养液, 在 37℃、5% CO_2 培养箱中持续培养, 每 3~4 d 更换一次培养液。NSE 抗体是神经元的标志物, 用该抗体的免疫组化方法鉴定神经细胞的纯度。神经细胞培养 7 d 后, 不同剂量的对照慢病毒 V-GFP-flag 与 0.5 ml 无血清培养液混合得到不同感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 0、1、2、5、10 和 20 的混合液, 用该混合液逐个更换原有的培养液以感染神经细胞, 在倒置荧光显微镜下每天观察 GFP 表达情况。感染后 5 h, 每孔神经细胞用预冷 PBS 洗 2 次, 0.25% 胰蛋白酶消化, 1 000 r/min (离心半径 $r=8$ cm) 离心 10 min 后收集细胞, 然后用火抛光的移液管机械吹打以获得单细胞悬液。根据 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒的产品说明书, 在流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 上检测神经细胞的凋亡率。同时, 用 FCM 计数 GFP⁺ 神经细胞的百分率检测感染效率。通过分析单细胞悬浮液的凋亡率和感染效率得到最佳的 MOI 值。根据上述实验结果, 用最佳 MOI 的 V- $Er\alpha$ -flag 在 6 孔板中感染神经细胞。感染后 5 d, 收集受感染的细胞, 通过 FCM 检测细胞凋亡率, 并利用实时定量 PCR 和蛋白质印迹法分别检测 $Er\alpha$ mRNA 和蛋白表达。

1.6 实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测受感染的神经细胞中 $Er\alpha$ mRNA 和蛋白表达 用 TRIzol 提取未感染和 V- $Er\alpha$ -flag 感染神经细胞的总 RNA, 经反转录合成 cDNA。实时定量 PCR 法与滴度检测时方法相同。同时, 用 PBS 洗受感染和未感染的神经细胞和 293T 细胞, 收集并用裂解液裂解, 用细胞刮刮下裂解产物, 14 000 r/min (离心半径 $r=8$ cm) 离心 5 min, 去除细胞碎片。使用蛋白定量试剂盒测定裂解产物的蛋白浓度为 2 μ g/ μ l。用 SDS-PAGE 分离等量的蛋白质, 然后电转移至 PVDF 膜。将膜浸入 TBST 5% 脱脂奶粉中室温放置 1 h, 与 1:500 稀释的小鼠抗 $Er\alpha$ 抗体和 1:2 500 稀释的抗 GAP-

DH 抗体共孵育,4℃过夜。与 1:5 000 稀释的羊抗鼠 IgG 在室温下孵育 1 h。经过多次清洗,用 ECL-Plus 试剂盒观察蛋白条带。实验至少重复 2 次。

1.7 统计学处理 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行数据分析,两组间比较用 t 检验;多组间参数比较采用单因素方差分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 重组慢病毒载体的构建与鉴定 以 pMD19- $Er\alpha$ 为模板,PCR 扩增获得带有 *Age* I 和 *Nhe* I 酶

切位点的 $Er\alpha$ CDS 区,纯化后用 AGE 鉴定。泳道 1 为 LV-GFP-flag 载体电泳结果。泳道 2 为 *Age* I 和 *Nhe* I 酶切去除 LV-GFP-flag 中 GFP 用 $Er\alpha$ CDS 区替代,PCR 产物的 GFP 长度约 700 bp(图 1A)。回收的 2 个片段连接后得到 LV- $Er\alpha$ -flag,AGE 鉴定泳道 3~10 是 LV- $Er\alpha$ -flag 的阳性单克隆质粒,仅有泳道 6 是阴性的,阳性克隆产物的长度为 504 bp(图 1B)。基因测序鉴定 LV- $Er\alpha$ -flag 的阳性克隆(图 1C),进一步证实插入片段与基因库中记录的 $Er\alpha$ 序列结果一致。

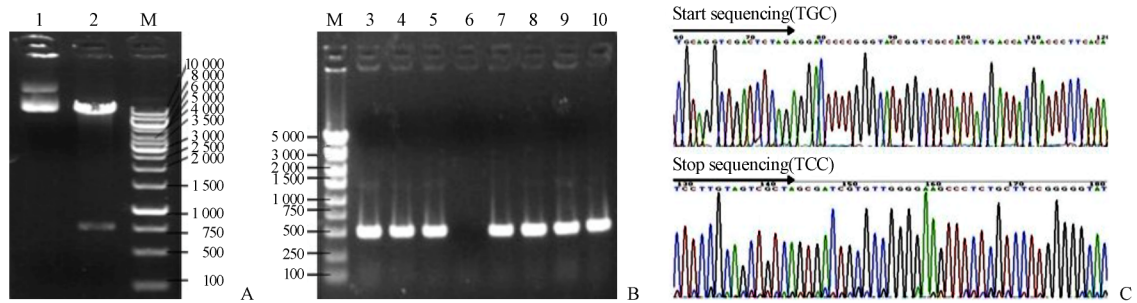


图 1 LV- $Er\alpha$ -flag 的构建和鉴定

Fig 1 Construction and identification of LV- $Er\alpha$ -flag

A, B: AGE results. 1: LV-GFP-flag vector; 2: LV-GFP-flag digested by *Age* I and *Nhe* I; 3-10: Transformants of LV- $Er\alpha$ -flag (504 bp); M: Marker. C: Gene sequencing results of LV- $Er\alpha$ -flag

2.2 重组慢病毒 V- $Er\alpha$ -flag 的滴度检测 实时定量 PCR 检测 V- $Er\alpha$ -flag 的滴度(图 2A 是实时定量 PCR 的扩增曲线图,图 2B 是 $Er\alpha$ 的熔解曲线,图 2C 是 β -actin 的熔解曲线),检测倍比稀释 10 倍的 7 个实验组和 1 个对照组,通过分析实验组之间 Ct 值的差异得到滴度值(表 1)。通常两个相邻的实验组之间 Ct 值差异超过 2 认为是差异有显著性,结果显

示浓度为 10^{-4} 和 10^{-5} μ l 的两实验组 Ct 值差异超过 2,因此认为浓度为 10^{-4} μ l 的实验组中存在病毒颗粒。病毒原液的滴度为 1×10^4 TU/ μ l = 1×10^7 TU/ml。由于每组只取 1 μ l 的 cDNA 用于实时定量 PCR,该结果只是总量的 1/20,因此最终重组慢病毒滴度为 1×10^7 TU/ml \times 20 = 2×10^8 TU/ml。

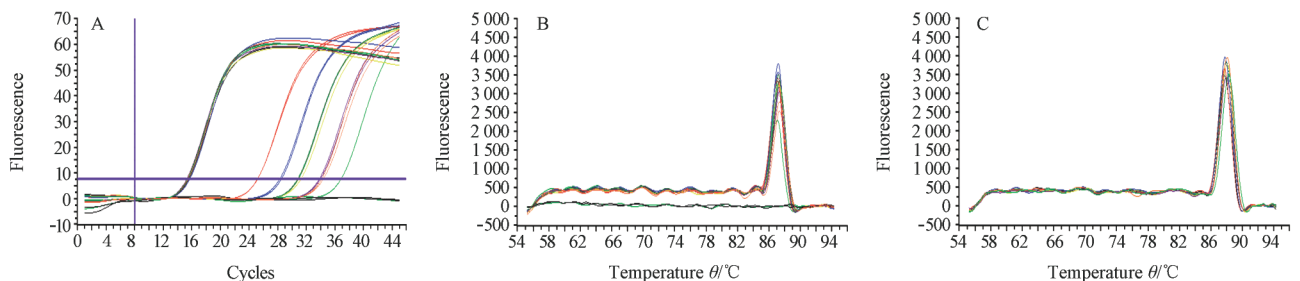


图 2 PCR 产物扩增和熔解曲线

Fig 2 PCR product and melting curve

A: PCR product curve; B: Melting curve of $Er\alpha$; C: Melting curve of β -actin

2.3 受感染神经细胞中 $Er\alpha$ 的 mRNA 及蛋白表达的检测 MOI 为 0、1、2、5、10 和 20 的对照慢病毒

V-GFP-flag 感染培养 7 d 的神经细胞,72 h 后,在倒置荧光显微镜观察下能见到 GFP 表达(图 3)。感染

后 5 d,用 FCM 检测 V-GFP-flag 感染的神经细胞凋亡率和感染效率以判断最佳 MOI 值。如图 4 所示, MOI=5 的对照病毒感染神经细胞得到的感染率高而毒性低,因此认为 MOI=5 是最佳 MOI 值。神经细胞至少能存活 8 周,在此期间慢病毒能有效感染神经细胞并稳定而持久表达 GFP。用 MOI=5 的 V-Era-flag 感染神经细胞后,FCM 检测的细胞凋亡率为 $(3.36 \pm 0.47)\%$ ($n=5$),同时检测 Era mRNA 和蛋白表达并与未受感染的神经细胞相比以明确 V-Era-flag 的感染效率。实时定量 PCR 结果显示, Era mRNA 表达与未受感染的神经细胞相比增高了 $(7.462 \pm 1.417) \times 10^3$ 倍(与受感染的神经细胞相比 $P < 0.001, n=5$,图 5A)。293T 细胞中 Era α 蛋白没有表达,而受感染的神经细胞中 Era α 蛋白表达明显高于未受感染的神经细胞(图 5B)。

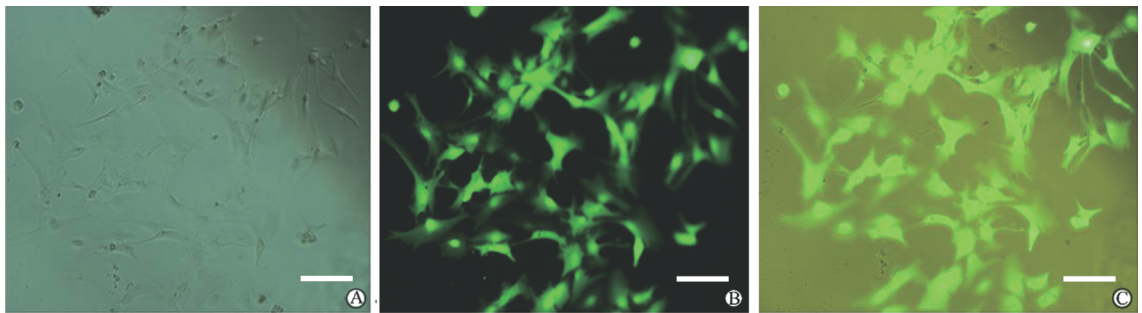


图 3 V-GFP-flag 感染神经细胞后 GFP 的表达 (MOI=5)

Fig 3 GFP expression in V-GFP-flag infected neurons when MOI was 5

A: Under light microscope; B: Under fluorescence microscope; C: Under light and fluorescence microscope. The scale bar indicates 0.1 mm

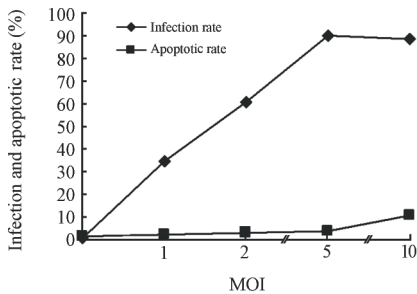


图 4 感染效率和凋亡率线性关系图

Fig 4 Linear relationship of infection efficiency with apoptotic rate

3 讨论

使用雌二醇和选择性雌激素受体调节剂对相关疾病进行药物治疗,由于药物生物半衰期短且作用不持久,临床应用因许多不良反应(如发生子宫内膜癌、乳房癌及血栓形成)而受限。与药物治疗相比,基因疗法可通过受感染的细胞在特定部位持久释放

表 1 实验组和对照组 Ct 值分析
Tab 1 Analysis of Ct value in control group and experimental groups

Group	Ct of β -actin	Ct of Era	The mean Ct of Era
Control	15.43	-	-
10 μ l	15.38	25.16 25.04	25.1
1 μ l	15.62	28.57 28.45	28.51
10 ⁻¹ μ l	15.21	30.75 30.88	30.815
10 ⁻² μ l	15.17	30.91 31.3	31.105
10 ⁻³ μ l	15.09	33.89 34.05	33.97
10 ⁻⁴ μ l	15.24	34.23 34.48	34.355
10 ⁻⁵ μ l	15.28	36.99	36.99
	15.43	-	-

所需蛋白,避免药物引起的不良反应,可能是更好的治疗选择。然而使用病毒载体直接在体内感染可能引起较强的免疫反应且感染效率低,因此本实验选择了体外转染方法,避免生理因素的影响和直接在体感染的弊端,提高了转染效率。

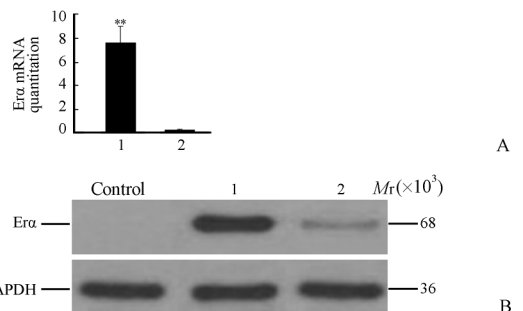


图 5 检测受感染的神经细胞中 Era mRNA(A)和蛋白(B)表达

Fig 5 Era mRNA (A) and protein(B) expression in infected neurons

Control: 293T cell; 1: Infected neurons; 2: Uninfected neurons. ** $P < 0.01$ vs Uninfected neurons; $n=5, \bar{x} \pm s$

基因转染的细胞实验可选择的载体有多种:如质粒、脂质体、反转录病毒、腺病毒和腺相关病毒。然而,这些载体各有优缺点,例如,使用质粒和脂质体转染的物理方法如电穿孔,其转染效率低,细胞毒性强并难以得到稳定转染效率^[17];反转录病毒只能在可分裂细胞中整合外源基因;腺病毒感染效率较低且需较高的病毒量^[18]。相比之下,慢病毒具有很多优势:(1)慢病毒能够感染不分裂细胞或缓慢分裂细胞^[19];(2)感染后能够持续表达目标基因^[20];(3)受感染的细胞正常功能不受影响^[21]。在未来中枢神经系统的基因治疗中,慢病毒将成为具有重要作用的载体^[22]。慢病毒基因治疗的临床应用也是相对安全的^[23],一方面,慢病毒的包装系统没有病毒复制所必需的4个辅助基因(vif、vpr、vpu和nef);另一方面,构建慢病毒载体采用三质粒系统,包括转移质粒、包装质粒和包膜蛋白质粒,降低了病毒重组后复制的可能性。因此,慢病毒载体是目前理想的基因治疗载体系统^[24]。

理论上慢病毒载体能够携带8 kb大小的基因片段进入靶细胞,但根据我们的经验并非如此。本研究中C57BL/6小鼠的Er α 有599个氨基酸,相对分子质量为66 000,其编码序列的大小约为1 800 bp^[25]。起初我们试图将Er α 和GFP基因同时连接于慢病毒载体,这意味着转录区的长度将超过2 kb。插入片段越大,重组病毒滴度越低,而本实验所需重组慢病毒的滴度为 2×10^8 TU/ml,因此去除了长度为725 bp的GFP片段仅插入Er α 的编码序列以保证得到较高滴度。以带有GFP的慢病毒作为对照病毒,其滴度为 2×10^8 TU/ml,检测其感染效率和凋亡率以摸索最佳MOI值。

本实验成功培养原代神经细胞。神经细胞是一种非分裂细胞,慢病毒可有效的感染此类细胞^[26],且稳定而长期在大脑中表达,与腺病毒相比感染效率更高。Blomer等^[27]研究表明,人类免疫缺陷病毒(HIV)的慢病毒在大鼠神经细胞内是表达GFP最有效的载体,其转染效率高达88.7%,与腺病毒、腺相关病毒、莫洛尼鼠白血病毒相比,其细胞毒性也较低。以往我们构建了Er α 重组腺病毒^[28],用该腺病毒感染神经细胞得到感染效率为(84.42 \pm 5.47)%,细胞凋亡率为(3.62 \pm 0.72)%^[29]。本研究中,MOI=5的V-GFP-flag感染神经细胞的感染效率高达(89.8 \pm 4.03)%,V-Er α -flag感染神经细胞凋亡率为(3.36 \pm 0.47)%,且不会影响细胞的活性和基因功能,因此MOI=5的V-Er α -flag感染神经细胞比Er α 重组腺病毒更具优势,并能使Er α 在神经细胞中的转录和表达增高,外源基因与基因整

合稳定且持久。

[参考文献]

- [1] Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Eteri S, Maggi A. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation [J]. *Endocrinology*, 2006, 147: 2263-2272.
- [2] Niino M, Hirofani M, Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H. Estrogens as potential therapeutic agents in multiple sclerosis [J]. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2009, 9: 87-94.
- [3] Heikkinen T, Kalesnykas G, Rissanen A, Tapiola T, Iivonen S, Wang J, et al. Estrogen treatment improves spatial learning in APP+PS1 mice but does not affect beta amyloid accumulation and plaque formation [J]. *Exp Neurol*, 2004, 187: 105-117.
- [4] Ito A, Buenafe A, Matejuk A, Zamora A, Silverman M, Dwyer J. Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF- α and recruitment of TNF- α ⁺ T cells and macrophages into the CNS of mice developing experimental encephalomyelitis [J]. *Clin Immunol*, 2002, 102: 275-282.
- [5] Sribnick E A, Wingrave J M, Matzelle D D, Ray S K, Banik N L. Estrogen treatment of spinal cord injury attenuates calpain activation and apoptosis [J]. *J neurosci Res*, 2006, 84: 1064-1075.
- [6] Leranath C, Roth R H, Elsworth J D, Naftolin F, Horvath T L, Redmond D Jr. Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates; implications for Parkinson's disease and memory [J]. *J Neurosci*, 2000, 20: 8604-8609.
- [7] Sierra A, Azcoitia I, Garcia-Segura L. Endogenous estrogen formation is neuroprotective in model of cerebellar ataxia [J]. *Endocrine*, 2003, 21: 43-51.
- [8] Granholm A C, Ford K A, Hyde L A, Bimonte H A, Hunter C L, Nelson M, et al. Estrogen restores cognition and cholinergic phenotype in animal model of Down syndrome [J]. *Physiol Behav*, 2002, 77(2-3): 371-385.
- [9] Pereira M Jr, Soares J M Jr, Valente S G, Oliveira P B, Cavaleiro E A, Amado D, et al. Estrogen effects on pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in rats [J]. *Maturitas*, 2009, 62: 190-196.
- [10] Suzuki S, Brown C M, Dela Cruz C D, Yang E, Bridwell D A, Wise P M. Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 6013-6018.
- [11] Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 1535-1565.
- [12] Hall J M, Couse J F, Korach K S. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 36869-36872.
- [13] Leung Y K, Mak P, Hassan S, Ho S M. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 13162-13167.
- [14] Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs [J]. *Science*, 2002, 295: 2465-2468.
- [15] Merchenthaler I, Lane M V, Numan S, Dellovade T L. Distribu-

tion of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system; *in vivo* autoradiographic and immunocytochemical analyses[J]. *J Comp Neurol*,2004,473:270-291.

[16] Morales L B, Loo K K, Liu H B, Peterson C, Tiwari Woodruff S, Voskuhl R R. Treatment with an estrogen receptor alpha ligand is neuroprotective in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Neurosci*,2006,26:6823-6833.

[17] Kusumawati A, Combes Liautard J P, Widada J S. Transfection of myelomonocytic cell lines; cellular response to a lipid-based reagent and electroporation[J]. *Anal Biochem*,1999,1:219-221.

[18] Pereboeva L, Komarova S, Mikheeva G, Curiel D T. Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles[J]. *Stem Cells*,2003,21:389-404.

[19] Trobridge G, Russell D W. Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors[J]. *J Virol*,2004,78:2327-2335.

[20] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, Sievers C, Yang L, Kopinja J, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. *Nat Genet*,2003,33:401-406.

[21] Wang L F, Goodnead L, Prat C, Mitrophanous K A, Kingsman S M, Mazarakis N D. Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system; therapeutic and research applications[J]. *Hum Gene Ther*,2006,17:1-9.

[22] Yip P K, Wong L F, Pattinson D, Battaglia A, Grist J, Bradbury E J, et al. Lentiviral vector expressing retinoic acid receptor beta2 promotes recovery of function after corticospinal tract injury in the adult rat spinal cord[J]. *Hum Mol Genet*,2006,15:3107-3118.

[23] Philippe S, Sarkis C, Barkats M, Mammeri H, Ladroue C, Petit C, et al. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci*,2006,103:17684-17689.

[24] Vigna E, Naldini L. Lentiviral vectors; excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy [J]. *Gene Med*,2000,2:308-316.

[25] Mural R J, Adams M D, Myers E W, Smith H O, Miklos G L, Wides R, et al. A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome [J]. *Science*,2002,296:1661-1671.

[26] Zhang Y Z, Wang H S, Pan H, Bao X H, Li M R, Jin J, et al. Gene delivery into primary cerebral cortical neurons by lentiviral vector[J]. *Cell Biol*,2006,30:777-783.

[27] Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma I M, Gage F H. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector[J]. *J Virol*,1997,71:6641-6649.

[28] 胡晓, 万兴, 娄磊, 王建怡. 小鼠雌激素受体 α 基因重组腺病毒载体的构建及鉴定[J]. *第四军医大学学报*,2009,30:2773-2777.

[29] Hu X, Lou L, Yuan J, Wan X, Wang J, Qin X. Use of adenovirus vector expressing the mouse full estrogen receptor α gene to infect mouse primary neurons[J]. *Neural Regan Res*,2010,5:1138-1143.

[本文编辑] 孙岩

• 书 讯 •

《健康评估》已出版

本书由陈宜刚、罗惠媛主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0167-3,16开,定价:32.00元。

本书是高等职业教育护理专业核心技能教材,是根据“三年制高等职业教育护理专业领域技能紧缺人才培养指导方案”编写的,编写中,尤其注重职业能力和岗位技能培训的内容。本教材内容包括健康评估方法、常见症状评估、身体评估、心电图检查、实验室检查及其他辅助检查,护理病历书写及举例等。教学目标是培养学生以人为中心,利用各种评估方法,全面了解患者的健康状况,提出护理诊断及在临床护理中评判性思维能力。本教材可作为高等职业院校、高等专科学校、成人高校护理专业的教材或学习参考用书。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通信地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>