

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.06.002

文章编号: 1005-8982(2017)06-0006-04

慢病毒转染和电转染原代 C57BL/6 小鼠神经干细胞的比较*

加三三, 胡俊, 李美宁, 张凯丽, 刘志贞

(山西医科大学 生物化学与分子生物学实验室, 山西 太原 030001)

摘要:目的 比较慢病毒与电转染两种技术转染小鼠原代神经干细胞的优劣, 获得神经干细胞高效转染的方法。**方法** 从 C57BL/6 小鼠脑组织中提取神经干细胞, 进行原代培养; 分别进行慢病毒转染和电转染, 通过观察绿色荧光蛋白在细胞中的表达, 比较两种转染方法的转染效果, 并用噻唑蓝 (MTT) 法计算相对存活率, 比较两种方法转染后对细胞的影响。**结果** 慢病毒与电转染两种转染技术转染神经干细胞 48 h 后, 慢病毒的转染率为 $77.6 \pm 6.6\%$, 高于电转染法转染率 $[29.2 \pm 4.8\%]$, 两者比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 转染 72 h 后, 慢病毒转染的细胞荧光表达量为 $60.0 \pm 3.6\%$, 电转染细胞的荧光表达量仅剩 $12.8 \pm 2.4\%$; MTT 法结果显示, 电转染组细胞相对存活率为 $75.8 \pm 2.3\%$, 慢病毒转染组细胞相对存活率为 $70.1 \pm 1.4\%$, 两者比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 对于原代神经干细胞转染, 慢病毒转染法比电转染法具有更高的转染效率及长久稳定性, 转染后细胞存活率与电转染法接近, 因此慢病毒转染法更能满足研究者的需求。

关键词: 神经干细胞; 慢病毒转染; 电转染

中图分类号: R363

文献标识码: A

Comparison of lentivirus transfection and electroporation transfection in primary neural stem cells of C57BL/6 mice*

San-san Jia, Jun Hu, Mei-ning Li, Kai-li Zhang, Zhi-zhen Liu

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract: Objective To develop an efficient method to transfect mouse primary neural stem cells (NSCs). **Methods** Primary neural stem cells were isolated from brain tissue of C57BL/6 mice, then, lentivirus transfection and electroporation methods were used to transfect primary NSCs. By observing the green fluorescent protein expression the transfection effect of the two methods was compared. The survival rate of primary NSCs was assessed using MTT method, the effect of the two methods on primary NSCs were compared. **Results** The rate of lentivirus transfection $[(77.6 \pm 6.6)\%]$ was higher than that of electroporation $[(29.2 \pm 4.8)\%, P < 0.05]$ 48 h after transfection. After 72 h, the amount of green fluorescence expression was $(60.0 \pm 3.6)\%$ by lentivirus transfection and only $(12.8 \pm 2.4)\%$ by electroporation method. The survival rate of lentivirus transfection $[(70.1 \pm 1.4)\%]$ was not significantly lower than that of electroporation $[(75.8 \pm 2.3)\%, P > 0.05]$. **Conclusions** Lentivirus transfection is more efficient than electroporation for NSCs.

Keywords: neural stem cell; lentivirus transfection; electroporation

神经干细胞可分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞等, 是研究和治疗神经系统疾病的重要模型。由于神经干细胞特殊的成球悬浮生长方式及干

细胞膜的特异性, 使外源基因转染神经干细胞成为一个研究课题。本实验将采用慢病毒和电穿孔两种技术转染 C57BL/6 小鼠原代神经干细胞, 比较转染效

收稿日期: 2016-10-19

* 基金项目: 国家自然科学基金 No. 81300487; 山西省回国留学人员科研资助项目 No. 2016-51)

[通信作者] 刘志贞, E-mail: zhizhenliu2013@163.com; Tel: 15034198990

率、长期表达的稳定性、安全性,探索一种适合体外转染神经干细胞的最佳方法,为进一步研究神经干细胞基因转染及干细胞移植提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 神经干细胞的提取及原代培养

取怀孕 14.5 d 的 C57BL/6 孕鼠,解剖并取出胎鼠,在解剖显微镜下取出脑组织,用机械法将脑组织搅碎,胰酶消化 1~2 min,然后用 300 目滤膜过滤组织液,将滤液 1 000 r/min 离心 5 min,去上层液,加入培养液重悬,转移至培养瓶中培养。当细胞数量多,出现大量细胞球,细胞融合度为 50%~70%时,开始进行传代,当传至第 3 代时做细胞转染。分别做 Nestin 荧光染色鉴定,神经干细胞分化经胶质纤维酸性蛋白、神经微丝蛋白-H、半乳糖脑苷脂荧光染色鉴定,证实为神经干细胞(结果未显示)。

1.2 慢病毒转染

慢病毒载体为第 2 代慢病毒载体,由 pMagiC 4.1 (包含有 GFP 表达基因)、慢病毒包装质粒 pCD/NL-BH*DDD 和膜蛋白表达质粒 pLTR-G 共转染 293T 细胞,获得病毒包装后的重组慢病毒载体,由上海世翱生物医药公司构建。

将神经干细胞 1 000 r/min 离心 5 min,用 1 ml 胰酶类似物 TrypLE Express 重悬,37℃消化 3 min,使神经球消化成单个细胞。再次 1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞。加入 1 ml 培养液,重悬并细胞计数,24 孔板每孔加入 5×10^5 个细胞。前期实验已摸索出感染滴度的大致范围,按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值 40 加入一定体积的病毒液,并加入 500 μ l 培养液,按照 1:200 的比例加入一定体积的 Ploybrene 转染增强剂,放入培养箱中培养。24 h 后离心细胞液,去含病毒的培养液,加入新鲜培养液继续培养。48 和 72 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。

1.3 电转染质粒

质粒由上海世翱生物医药公司构建提供,主要为

pMagiC 4.1 质粒。神经干细胞处理如上,加入一定量的电转液重悬。所使用的电转杯为 20 μ l 反应体系,20 μ l 电转反应体系中保证含约 3×10^6 个细胞、500 ng 重组质粒,再用电转缓冲液补充体积至 20 μ l。将电转杯放入电转仪中,选择电转模式 DS113 进行电转。将电转后的细胞液加入到提前放入培养箱中孵育过的培养液中混匀,加入 24 孔板中培养,48 和 72 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。

1.4 转染效率稳定性比较

转染 48 h 后,在显微镜下任意选取多个视野,计算表达绿色荧光蛋白的细胞数与白光镜下细胞数的比值,即转染效率。通过对比转染后 48 和 72 h 细胞绿色荧光强弱变化,比较两种转染方法细胞内绿色荧光维持时间。

1.5 细胞存活实验

经过不同转染方法处理过的神经干细胞,加入到 96 孔板 (5×10^3 左右) 中,并设立未经过转染处理的神经干细胞作为阴性对照组,转染 48 h 后,每孔加入约 20 μ l 噻唑蓝 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT], 继续培养约 4 h 后离心弃上清液,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO),再充分振荡 10 min,使结晶物充分的溶解。570 nm 波长测光密度 (optical density, OD) 时,用空白组调零,计算细胞的相对存活率。细胞相对存活率 = (实验孔 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照孔 OD 值 - 空白组 OD 值) \times 100%

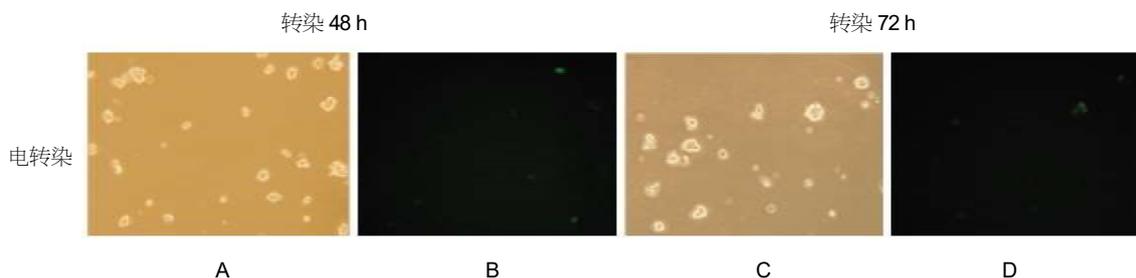
1.6 统计学方法

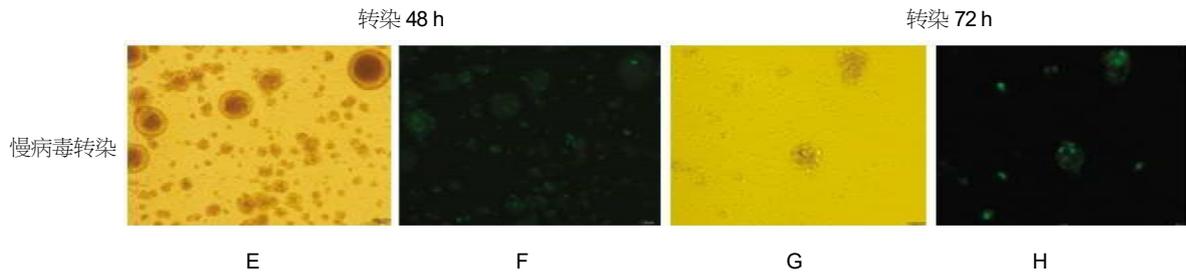
数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电转法和慢病毒转染法转染结果比较

将状态较好的神经干细胞接种到 24 孔板中,分别进行电转染和慢病毒转染,细胞转染后 48 和 72 h 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。见图 1。





A、C、E、G: 白光镜下的神经干细胞; B、D、F、H: 荧光显微镜下同一个视野中表达绿色荧光的神经干细胞

图 1 两种技术转染神经干细胞 48 和 72 h 后绿色荧光蛋白的表达 (× 100)

2.2 两种方法转染神经干细胞转染效率的比较

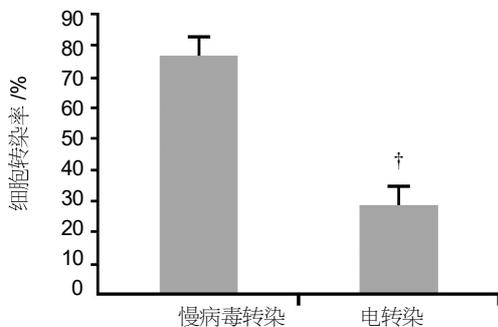
转染后表达绿色荧光蛋白的细胞为转染成功的细胞。转染 48 h 后,慢病毒转染神经干细胞的效率为 $(77.6 \pm 6.6)\%$,电穿孔转染效率为 $(29.2 \pm 4.8)\%$,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t=10.372, P=0.023$),慢病毒转染效率更高。见图 2。

2.3 转染稳定性比较

转染 72 h 后,慢病毒转染神经干细胞的效率为 $(60 \pm 3.6)\%$,电穿孔转染效率为 $(12.8 \pm 2.4)\%$,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t=18.827, P=0.049$),慢病毒转染表达的稳定性和持久性更好。见图 3。

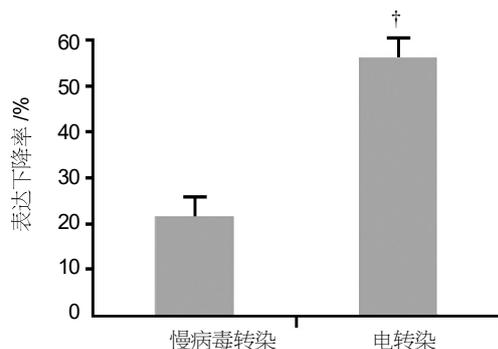
2.4 细胞存活实验结果

电穿孔组细胞相对存活率为 $(75.8 \pm 2.3)\%$,慢病



† 与慢病毒转染比较, $P < 0.05$

图 2 两种转染方法 48 h 转染效率比较



† 与慢病毒转染比较, $P < 0.05$

图 3 两种转染方法荧光蛋白表达持久性比较

毒转染组细胞相对存活率为 $(70.1 \pm 1.4)\%$,经 t 检验,差异无统计学意义 ($t=3.814, P=0.058$)。见图 4。

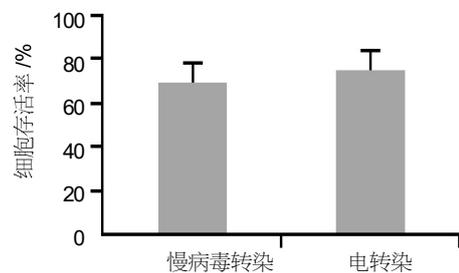


图 4 两种转染方法细胞存活率比较

3 讨论

神经干细胞是一种悬浮于培养液中生长的多潜能干细胞,用普通的脂质体转染方法很难进行有效的转染。根据文献检索,慢病毒转染和电穿孔为目前神经干细胞备选的转染方案^[1-2]。其是高效的神经干细胞转染方法,为中枢神经系统疾病的治疗应用研究提供技术支持^[3],对于后期进行各项基因相关功能研究,以及信号通路研究具有重要的意义。

电穿孔转化细胞的方法是利用瞬间高压造成细胞膜不稳定,形成电穿孔使得 DNA 进入细胞。电穿孔转染法是一种物理方法,无生物与化学毒性副作用,安全性高。电穿孔适用细胞范围广,特别是脂质体难以介导转染的细胞,如干细胞等^[4]。文献检索表明,对于神经干细胞来说,电穿孔的转染效率明显高于脂质体转染^[4-5]。

电穿孔操作方便,只需细胞和质粒即可,但需要专用设备而且转染效率受多种因素,如电压、脉冲时间、电穿孔次数等的影响,要确定神经干细胞的最佳转染条件就必须对其进行优化。通过实验确定合适的电压和脉冲时间,使转染效率才能达到最大。

本实验电穿孔转染效率数据有波动性,转染效率低于相关研究^[3-4],其原因可能是神经球致密,虽

经吹打,仍有大小及数量不等的细胞团,而且电穿孔是瞬时完成,质粒能否在这一瞬间进入细胞具有一定的偶然性。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷病毒为基础改造得到的基因治疗载体,与传统技术相比,具有转染效率高、可以转染分裂期和静止期细胞的特点^[6],而且慢病毒转染可以使目的基因整合至宿主细胞的染色体当中,稳定、持久的表达。

本研究通过机械法和酶法从孕 14.5 d 的胎鼠脑组织中提取、纯化原代神经干细胞,并采用电穿孔法和慢病毒感染两种方法将 *GFP* 基因表达载体转入纯化的神经干细胞。转染 48 h 后观察结果,可见慢病毒转染神经干细胞的效率为 $(77.6 \pm 6.6)\%$,高于电穿孔转染效率 $[29.2 \pm 4.8]\%$ 。转染 72 h 后观察神经干细胞荧光表达,发现慢病毒转染组仍然能够检测到绿色荧光蛋白的表达,表达率为 $(60.0 \pm 3.6)\%$,荧光表达减少 22%。说明其转染表达的稳定性与持久性,能满足研究者的进一步研究需求。电转染组荧光蛋白表达只剩 $(12.8 \pm 2.4)\%$,荧光表达减少 56.2%,说明电转染的稳定、持久性较差。

进一步用 MTT 法检测两种转染方法对细胞存活率的影响,发现电转染组细胞存活率为 $(75.8 \pm 2.3)\%$,高于慢病毒转染组的细胞存活率 $[70.1 \pm 1.4]\%$,但是差异无统计学意义。

从电转染和慢病毒转染的操作而言,慢病毒转染的实验过程更加繁琐。虽然转染用的慢病毒属于安全病毒,但是在实验过程中也要注意实验安全问题:^①慢病毒转染实验最好在安全柜中进行,如果是在超净台中进行转染实验,则不能开吹风机,因为病毒很容易扩散到空气中;^②实验中用过的枪尖、吹管等必须在 84 消毒液中浸泡消毒;^③做完实验后要用消毒液擦拭台面,最好用紫外线照射 30 min。而电转染就没有这么多的实验细节要求,电转染时,只需对电转仪进行模式设定即可。由于转染过程中细胞会变得比较脆弱,因此用于培养转染后细胞的培养液都要事先放入细胞培养箱中孵育,对于青、链霉素比较敏

感的细胞,则要用无青、链霉素的培养液进行培养。

由于神经干细胞在体外培养时容易聚成团,形成大的神经球,这会影响细胞的转染效率。因此在进行转染实验之前,需要进行处理,将神经球处理成单个的悬浮细胞。转染完成之后,经过 12 h 左右的培养,单个的神经干细胞又会聚团形成神经球,因此笔者会看到成团的发绿色荧光的神经球。转染效率还受到神经干细胞状态的影响,为获得好的转染效果,转染用的细胞要尽可能挑状态好的细胞。原代神经干细胞传代次数多以后活力会下降,因此要尽量用 3 代以前的细胞进行转染。

通过不断地优化两种转染方法并进行比较发现,虽然慢病毒转染后神经干细胞的存活率比电转染略低,但是慢病毒转染的效率更高而且持续时间较长,更能满足研究者的需要,所以相对而言,慢病毒载体更适合用于神经干细胞的转染。

参 考 文 献:

- [1] TANG Y, GARSON K, LI L, et al. Optimization of lentiviral vector production using polyethylenimine mediated transfection[J]. *Oncology Letters*, 2015, 9(1): 55-62.
- [2] MCLENACHAN S, ZHANG D, PALOMO A B A, et al. mRNA transfection of mouse and human neural stem cell cultures[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): DOI: 10.1371/journal.pone.0083596.
- [3] ARTEGANI B, LANGE C, CALEGARI F. Expansion of embryonic and adult neural stem cells by in utero electroporation or viral stereotaxic injection[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2012, 6(68): 3791-4093.
- [4] ZHANG Y, LIU N, TANG Y, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from rat adipose derived stem cells after lentiviral transduction with green fluorescent protein[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(2): 647-654.
- [5] HUGHES S M, MOUSSAVI-HARAMI F, SAUTER S L, et al. Viral-mediated gene transfer to mouse primary neural progenitor cells[J]. *Mol Ther*, 2002, 5(1): 16-24.
- [6] ZHU C H, LEI W, CHEN Z R. Construction of a lentiviral vector encoding heme oxygenase 1 and its introduction into mouse adipose tissue-derived stem cells[J]. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2015, 14(3): 10705-10716.

(童颖丹 编辑)