

• 实验研究 •

# RNA 干扰神经干细胞中 NgR 基因的表达修复大鼠面神经缺损的体外实验研究\*

施勇<sup>1</sup> 周梁<sup>1</sup> 田洁<sup>1</sup> 汪洋<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:应用 RNA 干扰技术抑制神经干细胞中 NgR 基因表达,观察神经干细胞的体外分化,为体内面神经修复提供营养支持。方法:采用 PCR 扩增,限制性内切酶酶切,T4DNA 连接酶连接,将 NgR 与 pGCsi 载体连接,构建重组载体 NgR shRNA,通过测序鉴定。NgR shRNA 通过 Lipofectamine 2000 感染神经干细胞,荧光显微镜下观察 EGFP 的表达,Western Blot 检测 NgR 的表达,免疫细胞化学鉴定转染前后神经干细胞向神经元分化的比例,转染后的神经干细胞种植于 PLGA 管,扫描电镜观察。结果:成功构建 NgR shRNA 质粒,成功感染神经干细胞,Western Blot 结果表明干扰后的神经干细胞中的 NgR 表达减弱、免疫细胞化学结果显示干扰后的神经干细胞向神经元分化比例明显高于对照组( $P < 0.01$ ),差异有统计学意义。结论:成功构建 NgR shRNA 质粒,感染神经干细胞,使神经干细胞向神经元进一步分化,能更有效促进神经轴突的再生,为面神经损伤修复提供高效稳定的基因平台。

**[关键词]** 神经再生;神经干细胞;RNA 干扰;Nogo 受体;短发夹 RNA

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.10.017

**[中图分类号]** R338 **[文献标志码]** A

## Silenced NgR gene expression by RNA interference to promote rats facial nerve regeneration in vitro

SHI Yong ZHOU Liang TIAN Jie WANG Yang

(Department of Otolaryngology, Eye and ENT Hospital, Fudan University, Shanghai, 200031, China)

Corresponding author: ZHOU Liang, E-mail: zhoulent@126.com

**Abstract Objective:** To suppress NgR gene expression in neural stem cells and observe differentiation of neural stem cells in vitro after interfered which provide nutritional support for the facial nerve repair in vivo. **Method:** PCR amplification, restriction endonuclease digestion, T4DNA ligase connections were used to connected NgR with rector pGCsi, and constructed recombinant vector(NgR shRNA). Lipofectamine 2000 were used to transfect the NSC. The expression of NgR was examined by Western Blot. The proportion of neural stem cells transformed into neurons after transfection was tested by Immunocytochemistry. Neural stem cells were planted in PLGA tubes after transfected, and were scanned by electron microscopy. **Result:** NgR shRNA plasmid was constructed and infected neural stem cells successfully. Western Blot showed that the expression of NgR decreased in neural stem cells after interference. Immunocytochemistry showed that the rate of the neural stem cells transformed into neurons after interfered was significantly higher( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Neural stem cells were transformed into neurons after NgR shRNA plasmid infected neural stem cells, which promoted axonal regeneration more effectively and provided a efficient and stable gene platform for facial nerve repair.

**Key words** nerve regeneration; neural stem cells; RNA interference; NgR; shRNA

目前,应用神经组织工程学的方法来促进面神经的再生和修复已成为当今研究的新热点,我们在前期实验中应用神经干细胞(neural stem cells, NSCs)移植到可吸收的神经导管修复面神经的缺损取得的不错的效果<sup>[1]</sup>,但在实验中发现来源于中枢的髓磷脂相关抑制物(Nogo-A, myelin associated inhibitors Nogo),髓磷脂相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG),少突细胞-髓磷脂

糖蛋白(oligodendrocyte-myelinglycoprotein, Omgp)是阻碍神经再生的重要因素,这些因子都通过共同受体 Nogo 受体(Nogo receptor, NgR)起作用<sup>[2]</sup>,因此,我们应用 RNAi 抑制 NSCs 中 NgR 的表达来探讨修复大鼠面神经缺损。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料和试剂

pGCsi 载体、感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自上海吉凯公司、Lipofectamine<sup>TM</sup>2000、NgR、MAP-2 抗体购自 Invitrogen 公司,各种胎牛血清、EGF、bFGF 购自 R & D 公司,PLGA 导管购自上海天清生

\* 基金项目:上海市卫生局青年基金项目(No:2009Y013)

<sup>1</sup> 复旦大学附属眼耳鼻喉科医院耳鼻喉科(上海,200031)

通信作者:周梁, E-mail: zhoulent@126.com

物公司,其规格为内径 0.8 mm,外径 1.2 mm。

## 1.2 方法

**1.2.1 NSCs 培养及鉴定** 孕 10 d 左右的 SD 大鼠,取其胚胎海马组织,进行 NSCs 的原代培养、3~4 d 半量换液,5~7 d 传代。种植 NSCs 于涂有多聚赖氨酸的小玻片上,采用甲醛固定,血清封闭,分别加入相应抗体等步骤后在显微镜下观察染色情况。具体步骤见文献[1]。

**1.2.2 NgR shRNA 表达载体的构建、扩增及鉴定** 根据 shRNA 的设计原则、载体 pGCsi 的酶切位点以及 GenBank 中 NgR 的编码序列(12407650),参考文献[3]合成针对 NgR 编码区 360-380 bp 和 1205-1225 bp (AATCTTCCTG-CATGGCAACCG)(AAGCCTCAGTACTGGAA-CCCG)为小发夹的靶向的 DNA 片段。设计好的发夹送由上海生工有限公司定制合成,将人工合成的 DNA 序列的两条链,进行等浓度的退火结合,95℃加热 5 min,然后降至室温,形成具有粘性末端的互补双链,3 h 后与酶切后 pGCsi 载体产物在 T4 连接酶作用下连接,转化大肠杆菌感受态细胞,然后将 150 μl 已转化的感受态细胞转移到琼脂培养液上,37℃过夜培养,克隆产物测序鉴定。

**1.2.3 脂质体介导 NgR shRNA 转染 NSCs** 按照 Invitrogen Lipofectamine™ 2000 的说明书进行脂质体转染。转染前 1 d,于六孔板内接种  $1 \times 10^5$  细胞,加入 15% FBS 的 DMEM 2 ml 进行培养,将 2 μg NgR shRNA 质粒和 4 μl Lipofectamine™ 2000 先分别用 250 μl 不含抗生素和血清的 DMEM 稀释,后将稀释的质粒和 Lipofectamine™ 2000 混合,室温孵育 20 min。把这 500 μl 混合物加入六孔板的培养液中,来回摇晃以混匀。设立实验组、空质粒对照组。细胞于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养,转染 6 h 后更换为含抗生素和血清的 DMEM 培养液,3 d 后在荧光显微镜下观察 GFP 的表达,计算其转染效率。

**1.2.4 Western Blot 检测 NSCs 中 NgR 的表达** 分别取实验组和空质粒对照组的 NSCs,转染 3 d 后见明显荧光,用冰预冷的 PBS 洗 2 次,加入细胞裂解液裂解抽提蛋白,按照 Western Blot 实验技术操作说明分别进行蛋白定量,SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭,及加入羊抗的 NgR 抗体和兔抗羊的二抗进行杂交、洗膜等操作后,把膜与 Super Signal Western Blotting 化学发光底物室温孵育 5 min,曝光 X 光片,然后显影定影。

**1.2.5 经 NgR shRNA 干扰后 NSCs 的分化** 干扰后 3 d 把有明显荧光的 NSCs 直接接种于涂有多聚赖氨酸的盖玻片上,置于 35 mm 培养皿,待细胞贴壁后加入 NSCs 的分化培养液,2 周后进行干细

胞的分化鉴定,用甲醛固定,血清封闭,分别加入 MAP-2 抗体等方法进行神经元的鉴定,以未干扰的 NSCs 分化作为对照。在 Leica QW3 图像分析软件下在 200 倍视野下进行细胞计数,每组观察 5 张盖玻片,每张盖玻片观察 6 个不重复视野,计算各组神经元占总细胞数的比例,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 12.0 统计软件,两组间数据比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**1.2.6 干扰后 NSCs 移植入 PLGA 管,进行场扫描电镜观察** 干扰后的 NSCs 生长至培养瓶的 70%~80% 密度后,离心 5 min,去除上清液,加入 1 ml 培养液,吹打后,计数板计数,得到细胞数约为  $(0.5 \sim 1.0) \times 10^5$  /ml,取出细胞悬液 100 μl 加入细胞外基质 200 μl,形成混合液,将混合液注入培养液浸泡的 PLGA 管内,将 PLGA 管置于培养皿中,移入培养箱。种植后 4 h 后发现细胞贴壁后加入干细胞的分化培养液,2 周后,送至同济大学电镜室进行场扫描电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 NSCs 培养结果

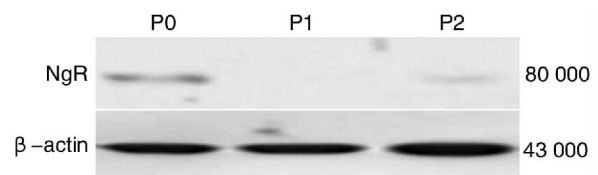
培养 7 d 左右可见数十个乃至数百个细胞组成的神经球,细胞免疫化学结果示 Nestin 阳性,诱导分化可见大量形态各异的神经细胞,这些结果证实了所培养的细胞为 NSCs<sup>[1]</sup>。

### 2.2 重组质粒的构建结果及转染结果

构建了 2 个 NgR-shRNA 表达载体质粒,分别命名为 P1、P2,并经测序鉴定证实,所含目的基因序列准确无误,重组质粒构建成功。NgR-shRNA 经脂质体介导转染 NSCs,Western Blot 检测结果:转染 72 h 后,脂质体组可抑制 NgR 蛋白的表达,而裸质粒组对 NgR 蛋白的表达无明显影响(图 1)。转染 72 h 后在倒置荧光显微镜下观察细胞,P1、P2、阴性对照组均可见较多细胞表达绿色荧光,初步计算转染效率为 40%~50%,各组间差异无统计学意义(图 2)。NSCs 转染后神经元的分化结果:沉默了 NgR 的 NSCs,分化 2 周后向神经元分化的比例明显高于未转染组(图 3),神经元比例分别为  $46.79 \pm 4.10$ 、 $22.26 \pm 4.54$ ,差异有统计学意义。

### 2.3 场扫描电镜观察

种植 NSCs 的 PLGA 管在分化 2 周后可见导管壁上生长着各种形态的神经细胞(图 4)。



P0:空白质粒组,P1、P2:干扰组。

图 1 RNA 干扰后 NgR 蛋白的表达

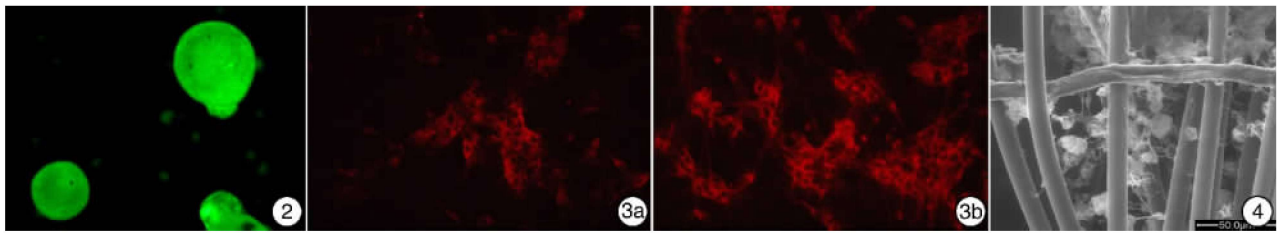


图 2 荧光显微镜下观察干扰 NgR 的神经干细胞 ×200; 图 3 RNA 干扰后神经干细胞向神经元分化 3a:干扰前; 3b:干扰后; 图 4 干扰后神经干细胞在扫描电镜下的观察 ×1 000

### 3 讨论

目前,面神经断伤后的再生与修复仍是一项挑战性难题。近年来组织工程修复神经缺损已越来越受到重视,我们在前期实验中应用 NSCs 移植到可吸收的神经导管修复面神经的缺损取得的不错的效果<sup>[1]</sup>,但在实验中发现来源于中枢的 Nogo-A、MAG、Omgp 是阻碍神经再生的重要因素,这些因子都通过共同受体 NgR 起作用<sup>[2,4]</sup>,现已经证实它们对损伤后中枢神经的再生具有抑制作用<sup>[5]</sup>,如果在基因水平下抑制 NgR 的表达,可直接减轻髓磷脂相关抑制物的抑制作用。

近 2 年来发展迅速的小分子 RNA 干扰技术,提供了这种可行性。RNA 干扰是指通过人为地引入与内源靶基因具有相同序列的小的双链 RNA,诱导内源性靶基因降解,达到阻止基因表达的目的,如何干扰 NgR 成为当前研究的重点<sup>[6]</sup>。以 siRNA 实现基因沉默是将关于髓磷脂相关抑制因子的基础研究转化为基因干扰策略,NgR 被认为是目前的最佳干预靶点<sup>[7]</sup>。Li 等<sup>[8]</sup>将可溶性的大鼠 NgR1 蛋白进行膜内注射,该蛋白融入了大鼠的 IgG1 区,观察脊髓脊髓胸段半切断的大鼠脊髓轴突变化。发现经 sNgR1-Ig 治疗后轴突再生明显,而且功能明显的。Kim 等<sup>[9]</sup>的研究也发现 NgR 基因缺陷小鼠脊髓全部横断 14 周后行为学评估有了很大改善。在周围神经损伤修复中,有文献报道坐骨神经切断后局部应用 MAG 可以减少损伤促进能够的恢复<sup>[10]</sup>,但较少涉及到 NgR 的表达。我们前期实验应用 NSCs 移植修复周围性面神经的损伤,虽然实验证实有较好的神经修复结果,但由于原代培养的细胞来自于中枢的海马组织,体内外分化成胶质细胞的比例要大于神经元,髓磷脂相关抑制物的存在也进一步抑制了神经修复的结果。因此我们在本实验中成功构建了 NgR-shRNA 表达载体质粒,并通过稳定的脂质体介导成功转染 NSCs,Western Blot 的结果显示干扰后 NSCs 中 NgR 基因的表达较前减弱,转染后神经元的分化比例也明显高于转染前,从而为我们下一步的体内实验提供更好的神经营养支持。

总之,本研究成功干扰了 NSCs 中 NgR 的表

达,使 NSCs 向神经元进一步分化,能更有效促进神经轴突的再生,为促进周围性面神经再生修复提供更好的种子细胞。

### 参考文献

- [1] 施勇,周梁,田洁,等. 神经干细胞移植到神经导管修复大鼠面神经缺损的研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2012,26(22):1040-1042.
- [2] GRANDPRE T, NAKAMURA F, VARTANIAN T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein[J]. Nature,2000,403:43-44.
- [3] 王朝鲁,孙红辉,杨有庚. Nogo 受体基因干扰 RNA 表达载体的构建[J]. 中国实验诊断学,2006,10(11):1253-1254.
- [4] WANG Y T, LU X M, ZHU F, et al. The use of a gold nanoparticle based adjuvant to improve the therapeutic efficacy of hNgR-Fc protein immunization in spinal cord-injured rats[J]. Biomaterials, 2011, 32: 7988-7998.
- [5] SARAH C, BORRIE BASTIAN E, BAEUMER CHRISTINE E, et al. The Nogo-66 receptor family in the intact and diseased CNS[J]. Cell Tissue Res, 2012,349:105-117.
- [6] GITLIN L, KARELSKY S. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells[J]. Nature,2002,418:430-434.
- [7] MCDONALD C L, BANDTLOW C, REIND M. Targeting the nogo receptor complex in diseases of the central nervous system[J]. Current Medicinal Chemistry, 2011,18:234-244.
- [8] LI W, WALUS L, RABACCHI SA, et al. A neutralizing anti-Nogo66 receptor monoclonal antibody reverses inhibition of neurite outgrowth by central nervous system myelin[J]. J Biol Chem,2004,279:43780-43788.
- [9] KIM J E, LIU B P, PARK J H, et al. Nogo-66 receptor prevents raphe spinal and rubro spinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury[J]. Neuron, 2004, 44: 439-451.
- [10] KOICHI T, TATEKI K, KEN M, et al. Myelin-associated glycoprotein reduces axonal branching and enhances functional recovery after sciatic nerve transection in rats[J]. Glia, 2007, 55: 1498-507.

(收稿日期:2013-12-09)