

# 过表达 *Nanog* 基因的小鼠骨髓间质干细胞对 NF- $\kappa$ B 表达的影响

黄志新<sup>1,2</sup>, 张志坚<sup>1,2,3</sup>, 张阳<sup>1,2</sup>, 俞晓岚<sup>1,2</sup>, 吴秀丽<sup>2</sup>

- 1 福建医科大学附属第一医院神经内科, 福州 350005
- 2 福建省神经病学研究所, 福州 350005
- 3 福建医科大学神经生物学中心, 福州 350004

**摘要:** 核因子  $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 的激活被认为与中枢神经系统变性疾病的进展有关。新近报告 *Nanog* 能抑制 NF- $\kappa$ B 的表达, 为验证这一发现, 通过限制性内切酶酶切和基因重组的方法, 构建携带 *Nanog* 基因的重组慢病毒表达载体质粒 pNL-*Nanog*-IRES<sub>2</sub>-EGFP, 经 PCR 检测以及测序鉴定后, 在脂质体介导下与包装质粒 HELPER、包膜质粒 VSVG 共转染 293T 细胞包装生产慢病毒。所获慢病毒感染小鼠骨髓间充质干细胞 (mMSCs) 后, Western blotting 法检测在 mMSCs 中 *Nanog* 基因的表达, PCR、Western blotting 和免疫细胞化学法检测 NF- $\kappa$ B 基因的表达。结果显示所克隆的 *Nanog* 基因测序结果与 GenBank 报道序列完全一致。构建的慢病毒载体质粒 PNL-*Nanog*-IRES<sub>2</sub>-EGFP 经 *Sal* I 和 *Bam*HI 双酶切后电泳鉴定正确。所获慢病毒感染 mMSCs 后荧光激发 mMSCs 可见绿色荧光, Western blotting 检测显示 *Nanog*-mMSCs 组表达 *Nanog*, 其他两组基本不表达。RT-PCR 和 Western blotting 检测显示 *Nanog*-mMSCs 组的 NF- $\kappa$ B 表达较空载体-mMSCs 组及 mMSCs 组低, 差异有显著性意义。构建携带 *Nanog* 基因慢病毒载体并在小鼠骨髓间质干细胞中成功表达, *Nanog* 基因的表达可抑制 NF- $\kappa$ B 表达, 这结果为神经变性疾病的治疗提供了新思路。

**关键词:** *Nanog*, NF- $\kappa$ B, 慢病毒载体, 骨髓间充质干细胞

## Overexpression of *Nanog* gene in mouse mesenchymal stem cells and its influence on NF- $\kappa$ B expression

Zhixin Huang<sup>1,2</sup>, Zhijian Zhang<sup>1,2,3</sup>, Yang Zhang<sup>1,2</sup>, Xiaolan Yu<sup>1,2</sup>, and Xiuli Wu<sup>2</sup>

- 1 Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China
- 2 Fujian Institute of Neuroloscience, Fuzhou 350005, China
- 3 Center of Neuroscience, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

**Abstract:** The expression of NF- $\kappa$ B is considered to be involved in the progress of neurodegeneration. It has been reported that *Nanog* can suppress the expression of NF- $\kappa$ B. To inspect and verify this finding, we constructed lentivirus (LV) vector that overexpressed the *Nanog* gene, infected mouse mesenchymal stem cells (mMSCs), and examined the influence of *Nanog* overexpression on NF- $\kappa$ B gene expression. The plasmid pNL-*Nanog*-IRES<sub>2</sub>-EGFP was constructed by double digestion and genetic recombination. Sequencing results confirmed that our cloned *Nanog* gene in the PNL-*Nanog*-IRES<sub>2</sub>-EGFP plasmid was consistent with

**Received:** November 21, 2009; **Accepted:** March 12, 2010

**Supported by:** Fujian Provincial Health Project for Tring Forth New Ideas (No. 2007-CX-15).

**Corresponding author:** Zhijian Zhang. Tel/Fax: +86-591-87982028; E-mail: zzzjzfy@medmail.com.cn

福建省卫生厅医学创新课题 (No. 2007-CX-15) 资助。

the sequence reported in the GenBank. The three plasmids: pNL-Nanog-IRES<sub>2</sub>-EGFP, HELPER, and VSVG were cotransfected into 293T cells to produce LV particles. After co-transfection of the three lentiviral plasmids, green fluorescence was observed confirming successful transfection. The mMSCs were infected by the LV and the expression of Nanog was then also verified by the presence of green fluorescence. Nanog expression levels in the mMSCs were examined using Western blotting. Expression of NF- $\kappa$ B was also examined using RT-PCR and Western blotting, and in addition with fluorescent microscope after immunocytochemical staining. The levels of Nanog protein expression in Nanog-mMSCs were significantly increased, and the levels of NF- $\kappa$ B mRNA and protein expression in Nanog-infected mMSCs were significantly lower than those of Mock-mMSCs and the mMSCs control groups. Our findings suggest that mMSCs genetically modified to overexpress Nanog can lead to the suppression of NF- $\kappa$ B expression. This suppression of NF- $\kappa$ B could have important implications for the treatment of neurodegeneration, and hence further scientific investigations of these interactions will have significant impact on future clinical attempts to attenuate disease progression.

**Keywords:** Nanog, NF- $\kappa$ B, lentiviral vector, Marrow mesenchymal stem cells

骨髓间充质干细胞 (Marrow mesenchymal stem cells, MSCs) 是具有不断增殖和自我更新能力的成体干细胞之一, 在适当的条件下, 可分化为成骨细胞、软骨细胞、神经细胞等。因其分离培养较容易, 使其在组织器官缺陷性疾病、组织器官退行性疾病、某些遗传性疾病及恶性肿瘤的治疗以及基因治疗和生物工程领域具有良好的应用前景。利用慢病毒载体系统高效而稳定的基因转移效率、基因转导与细胞分裂无关和由慢病毒载体导入的目的基因可以在宿主细胞中得到长期稳定的表达等特点, 携带治疗基因修饰干细胞并体内移植, 从而使治疗基因更集中在病变部位, 达到减少病毒载体的使用量并减少不良事件发生的目的。近年来, 许多关于中枢神经系统变性疾病的实验研究发现, 在大脑炎症反应和神经细胞退变的部位可以检测到特异激活的 NF- $\kappa$ B。例如, 帕金森病(Parkinson's disease, PD) 是一种中枢神经系统退行性疾病, 主要病理变化是中脑黑质多巴胺能神经元进行性变性死亡, 导致其靶区尾状核与壳核内的多巴胺含量降低。尽管该病的发病机制仍不十分明确, 但大量的研究表明黑质纹状体的变性与炎症有关<sup>[1]</sup>。尸检研究还发现, 在帕金森病患者脑中, NF- $\kappa$ B 阳性的多巴胺能神经元数量是正常人的 70 倍, 提示 NF- $\kappa$ B 的激活与 PD 的病理机制有关<sup>[2]</sup>。Torres 等研究发现 Nanog 能抑制 NF- $\kappa$ B 蛋白的转录活性<sup>[3]</sup>, 从而提示可以利用 Nanog 的这一特性治疗临床相关疾病, 如帕金森病。由于慢病毒载体能够体内转导神经元并建立长期稳定的表达, 因此上述疾病的慢病毒载体基因治疗将极具潜力。Kumar 等比较了用胚胎成纤维细胞重建的猪

核移植胚胎和用间质干细胞重建的猪核移植胚胎, 发现后者增强了胚泡形成率, 降低细胞程序性死亡率, 表达 Nanog 的能力更强, 提出 MSCs 可以作为核移植的有效供体, 并能更有效被重组从而激活早期胚胎基因的表达<sup>[4]</sup>, 这为笔者提供了一个思路, 是否可以将 Nanog 基因重组入成年 MSCs, 使其可以持续表达 Nanog, 成为细胞治疗的良好供体。因此, 本课题组构建携带小鼠 Nanog 基因的慢病毒载体, 使目的基因在小鼠 MSCs (mMSCs) 中表达并观察其在体外对 mMSCs 中 NF- $\kappa$ B 表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

Top10 细菌由福建医科大学林建银教授惠赠。慢病毒载体质粒 pNL-IRES-EGFP、包膜质粒 VSVG、包装质粒 HELPER 和 293T 细胞均由美国杜兰大学陈一平教授惠赠。主要试剂有: 限制性内切酶 *Bam*H I、限制性内切酶 *Sal* I、M-MLV Reverse Transcriptase、dNTPs、dATP (Promega 公司); *Taq* DNA 聚合酶 (Stratagen 公司); Trizol Reagent、Oligo dT (Invitrogen 公司)、T4 DNA 连接酶 (NEB 公司); MOPS (Sigma 公司); 荧光标记小鼠单克隆抗体 CD<sub>34</sub>-PE、荧光标记小鼠单克隆抗体 CD<sub>45</sub>-FITC、荧光标记小鼠单克隆抗体 CD<sub>29</sub>-FITC (美国 Pharmacia 公司); 胰蛋白酶、酵母提取物 (Oxiod 公司); *Taq* DNA 聚合酶、琼脂粉、琼脂糖、IPTG、X-gal、氨苄青霉素(Amp)、DEPC (上海博亚生物公司); DNA 凝胶回收试剂盒 (OMEGA 公司); 质粒小量快速抽提试剂盒 (北京博大泰克生物基因技术有限公司)。其他试剂

均为进口或国产化学分析纯。引物合成、测序均由 Invitrogen 公司完成。兔抗鼠 *Nanog* 多克隆抗体 (Abcam), 兔抗鼠 NF- $\kappa$ Bp65 多克隆抗体、兔抗鼠酪氨酸羟化酶多克隆抗体 (Santa Cruz), 羊抗兔 IgG/HRP 试剂盒、FITC 标记的羊抗兔 IgG、TITC 标记的羊抗兔 IgG (北京中杉生物公司), 羊抗鼠  $\beta$ -actin 抗体 (GIBCO)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 含 *Nanog* 基因慢病毒载体质粒的构建

1) 目的基因片段: 由广州复能基因公司代为合成 *Nanog* 基因 cDNA 片段 (GC-Mm 23751, 小鼠)。PCR 扩增目的基因片段: 上游引物: 5'-ACGCGTCC ACATGAGTGTGGGCTCT-3'; 下游引物: 5'-CGGGA TCCCATATTCACCTGGTGGGA-3'。PCR 反应条件: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 45 s, 61°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72°C 延伸 10 min, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2) PCR 产物纯化: ①取 PCR 产物 20  $\mu$ L 于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳; ②琼脂糖凝胶电泳结束后, 用干净的手术刀片在胶上切下所要回收的琼脂块, 置于无菌 1.5 mL EP 管中; ③每 1 000 mg 琼脂糖胶加入 1 000  $\mu$ L 溶胶液, 置于 65°C 水浴中 7 min, 使胶融化; ④加入上述溶解液到柱中, 在室温下以 10 000 r/min 离心 1 min, 倒去废液; ⑤每个柱子加 300  $\mu$ L 溶胶液洗管, 后在室温下以 10 000 r/min 离心 1 min, 倒去废液; ⑥加入已加 100 mL 无水乙醇稀释过的 SPW 洗涤液 700  $\mu$ L 至柱子, 室温静置 2 min 后, 以 10 000 r/min 离心 1 min; ⑦倒去废液, 重复第 6 步骤 1 次; ⑧倒去废液, 空柱 10 000 r/min 离心 1 min; ⑨将柱子放入 1 个新的 1.5 mL EP 管中, 在膜中央滴加 25  $\mu$ L 60°C 预热的灭菌水, 然后 10 000 r/min 离心 1 min, 洗脱液即为回收的 DNA 片段。

3) *Nanog* 与表达载体重组: 利用表达载体上自带的 *Sal* I 和 *Bam*HI 限制性内切酶酶切位点, 将酶切产物定向克隆到慢病毒载体质粒中 (图 1A)。①目的片段的双酶切: 用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam*HI 双酶切。②慢病毒载体质粒的线性化: 取一灭菌 0.5 mL EP 管, 加入 Buffer 2  $\mu$ L、BSA 0.2  $\mu$ L、

pNL-IRES<sub>2</sub>-EGFP 质粒 5  $\mu$ L、*Sal* I 限制性内切酶 1  $\mu$ L、*Bam*HI 限制性内切酶 1  $\mu$ L, 加入去离子水定容至 20  $\mu$ L, 37°C 水浴 4 h, 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。从胶上切下 10.5 kb 大小的线性化载体片段, 使用试剂盒纯化回收。③慢病毒真核表达载体质粒的构建: 将目的片段和线性化的载体质粒进行连接。反应体系如下: pNL-IRES<sub>2</sub>-EGFP 1  $\mu$ L、*Nanog* 15  $\mu$ L、10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ L、T4 DNA 连接酶 2  $\mu$ L, 总体积 20  $\mu$ L。4°C 连接过夜。

4) 转化: 先用 CaCl<sub>2</sub> 法制备大肠杆菌 Top10 感受态菌, 然后将重组 pNL-*Nanog*-IRES<sub>2</sub>-EGFP 质粒进行转化。

5) 小量抽提质粒进行酶切鉴定和 DNA 测序: ①经抗生素筛选后, 在 LB 琼脂平板上随机挑取 3 个独立菌落, 各接种于 5 mL 含氨苄青霉素 (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养液中, 振荡过夜。用质粒小量提取试剂盒抽提质粒。②双酶切鉴定与测序: 取一灭菌 0.5 mL EP 管, 建立以下酶切反应体系: Buffer 2  $\mu$ L、BSA 0.2  $\mu$ L、质粒 5  $\mu$ L、*Sal* I 限制性内切酶 1  $\mu$ L、*Bam*HI 限制性内切酶 1  $\mu$ L, 加入去离子水定容至 20  $\mu$ L, 37°C 水浴 4 h。取适量酶切产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳测序。

### 1.2.2 慢病毒的包装和浓缩

将慢病毒三质粒: pNL-*Nanog*-IRES<sub>2</sub>-EGFP 或 pNL-IRES<sub>2</sub>-EGFP、pHELPER、pVSVG, 以 1:1:1 的质量比例混合, 利用脂质体 Lipofectamine2000 共转染 293T 细胞。48 h 至 72 h 后观察有强绿色荧光及细胞融合现象时收集培养上清, 4 500 r/min 离心 15 min, 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤以去除细胞碎片, 50 000 $\times$ g、4°C 离心浓缩病毒 2 h, 所得浓缩病毒转染 293T 细胞进行滴度鉴定, 所测滴度为  $6.1 \times 10^6 \sim 6.8 \times 10^6$  TU/mL, -80°C 保存备用。

### 1.2.3 mMSCs 的分离和扩增培养

无菌条件下取出 C57BL 小鼠双侧股骨和胫骨, 剪去干骺端, 用 10 mL 低糖 DMEM 培养基反复冲洗骨髓腔, 充分吹打混匀。将骨髓以 5:3 比例小心叠加于小鼠淋巴细胞分离液上, 2 500 r/min 离心 30 min, 吸取中间絮状的单核细胞层, 再用 5 倍以上体积低糖 DMEM 培养基洗涤 2 次, 在细胞沉淀中加

入含 15% FBS、青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 mg/L 的低糖 DMEM 完全培养液进行培养。当细胞融合率达 90% 以上时用 0.25% 胰酶-EDTA 消化传代, 流式细胞术测定培养的细胞 CD34、CD45、CD29 表达。

#### 1.2.4 慢病毒感染 mMSCs

弃去 mMSCs 原培养液, 以无血清 DMEM 清洗一次, 取浓缩后病毒液 2 mL, 加入 polybrene 至终浓度为 8 mg/L 感染 mMSCs, 24 h 后更换为低糖 DMEM 完全培养液继续培养 48 h 后观察荧光。实验分组: Nanog-mMSCs 组为带有 *Nanog* 基因慢病毒感染的 mMSCs 组; Mock-mMSCs 组为未携带目的基因的慢病毒感染的 mMSCs 组; mMSCs 组为未经慢病毒感染的 mMSCs 组。

#### 1.2.5 细胞免疫荧光染色

三组细胞均以  $2 \times 10^4$  /mL 传代于 24 mm×24 mm 玻片上培养, 80% 融合后以 4% 多聚甲醛固定后进行细胞免疫荧光检测 NF- $\kappa$ Bp65 表达情况。

#### 1.2.6 RT-PCR 检测 NF- $\kappa$ Bp65 mRNA 的表达

用 Trizol 提取各组细胞总 RNA, 电泳检测质量, 紫外分光光度计定量。以等量 RNA 为起始模板, 逆转录成 cDNA, 加入 NF- $\kappa$ Bp65 引物, 小鼠  $\beta$ -actin 引物作为内参, 进行 RT-PCR 反应以及灰度分析, 以检测各组 mMSCs 中 NF- $\kappa$ Bp65 基因在 mRNA 水平的表达情况。每组随机读取 5 次灰度分析数据, 取 NF- $\kappa$ Bp65 和  $\beta$ -actin 灰度比值平均值行单因素方差分析 (One-factor ANOVA), 再行 SNK-q (Student-Newman-Keuls) 检验,  $\alpha=0.05$ 。PCR 引物序列见表 1、2。

表 1 NF- $\kappa$ Bp65 基因的引物序列

Table 1 The primer sequences of NF- $\kappa$ Bp65 gene

NF- $\kappa$ Bp65	Primer sequence (5'-3')
Forward	ATGGCTACTATGAGGCTGACCTC
Reverse	TGCCGATGCACATCAGCTTGAG

表 2  $\beta$ -actin 基因的引物序列

Table 2 The primer sequences of  $\beta$ -actin gene

$\beta$ -actin	Primer sequence (5'-3')
Forward	TGCTGTCCCTGTATGCCTCT
Reverse	GGTCTTTACGGATGTC AACG

#### 1.2.7 Western blotting 检测 NF- $\kappa$ Bp65 与 Nanog 表达

分别取各组  $2 \times 10^6$  个细胞加入蛋白裂解液充分裂解, 测定蛋白浓度, 取等量的蛋白, 热变性后进行 10% SDS-PAGE。将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 封闭后加入 1:500 抗 NF- $\kappa$ Bp65 抗体, 洗膜, 以 HRP 标记的二抗 (1:1000) 结合, 显色, 曝光, 显影定影。解析硝酸纤维素膜, 封闭后再次加入 1:600 抗 Nanog 多克隆抗体结合, 洗膜, 以 HRP 标记的二抗 (1:1000) 孵育。同上再次解析硝酸纤维素膜, 封闭后再加入 1:500 抗  $\beta$ -actin 多克隆抗体结合, 洗膜, 以 HRP 标记的二抗 (1:1000) 孵育。每组随机读取 5 次灰度分析数据, 分别取 Nanog、NF- $\kappa$ Bp65 与  $\beta$ -actin 灰度值比值, 采用单因素方差分析 (One-factor ANOVA) 后, 再进行 SNK-q (Student-Newman-Keuls) 检验,  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 提取

Trizol 试剂抽提总 RNA 经测定  $A_{260}:A_{280}=1.93$ , 说明所提取 RNA 纯度好, 甲醛变性凝胶电泳显示 28S、18S、5S/5.8S/tRNA 三条条带, 28S 的亮度是 18S 的 2 倍。还看到一条由 tRNA、5.8S rRNA 和 5S rRNA 组成的, 较模糊迁移较快的带 (图 1B)。Nanog 基因片段经 PCR 扩增后进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 可见 918 bp 处明亮特异的目的条带 (图 1C)。

### 2.2 pNL-Nanog-IRES2-EGFP 重组质粒构建和鉴定

pNL-Nanog-IRES2-EGFP 重组质粒经 *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切后电泳可见 918 bp 处目的条带及 10.5 kb pNL-IRES2-EGFP 载体条带 (图 1D)。Nanog 基因测序结果与 GenBank 报道序列一致。

### 2.3 慢病毒包装结果

慢病毒载体三质粒共转染 293T 细胞 48~72 h 后, 荧光显微镜观察可见大量绿色荧光 (图 1E), 取病毒基因组 DNA 进行 PCR 后电泳检测可见 918 bp Nanog 基因片段 (图 2)。

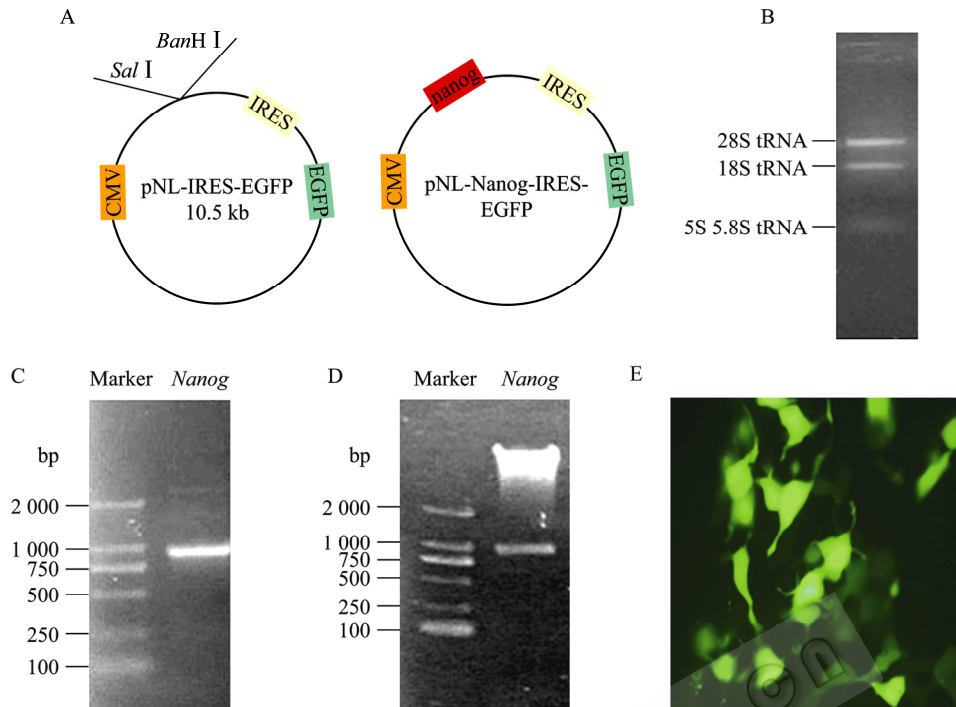


图 1 小鼠 *Nanog* 基因慢病毒载体的构建

Fig. 1 Construction of mouse *Nanog* gene lentiviral vector. (A) Plasmid maps of pNL-IRES-EGFP and pNL-Nanog-IRES-EGFP. (B) RNA denaturing gel electrophoresis. (C) Agarose gel electrophoresis pattern of the RT-PCR product of *Nanog* gene. (D) Recombinant plasmid pNL-Nanog-IRES<sub>2</sub>-EGFP was identified with restriction enzyme (*Sal* I and *Bam* H I). (E) EGFP expression of 293T cells after the lentiviral 3 plasmids co-transfected (200 $\times$ ).

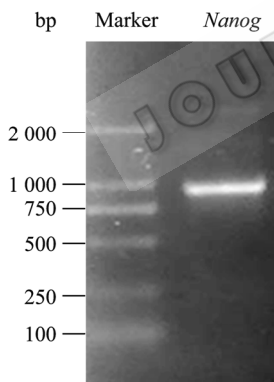


图 2 病毒基因组 PCR 结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis pattern of the PCR product of LV genome after construction.

#### 2.4 mMSCs 的培养扩增和流式细胞学鉴定结果

倒置相差显微镜观察发现, 原代细胞刚接种时呈圆形, 24 h 后大部分细胞都贴壁, 换液除去未贴壁的细胞后可见部分贴壁细胞形态不一, 伸出多个突起, 呈梭形的成纤维细胞样或多角形改变, 核较大, 位于细胞中央或边缘。贴壁细胞以分散的克隆集落方式增殖, 集落细胞增殖迅速, 10 d 左右每个集落约含有 100~200 个细胞, 细胞形态基本为纺锤

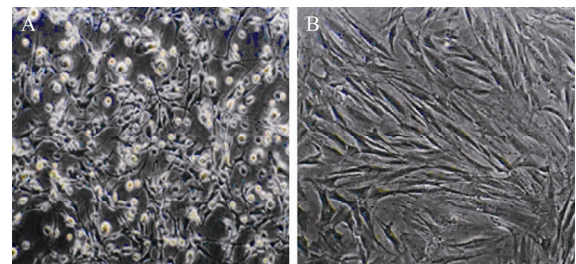


图 3 mMSCs 的体外培养扩增 (100 $\times$ )

Fig. 3 mMSCs were cultivated and expanded *in vitro* (100 $\times$ ). (A) Primary cells show different morphology with extend multiple processes. (B) Passaged cells show spindle shaped fibroblast-like morphology.

形的成纤维细胞样, 部分呈宽大扁平的多边形, 约 12~14 d 时融合成单层。传代细胞 24 h 内完全贴壁, 5~6 d 细胞达到完全融合, 呈均匀一致的纺锤形 (图 3)。mMSCs 体外扩增 4 代细胞数约为  $1 \times 10^{11} \sim 2 \times 10^{11}$  个。本实验对小鼠原代、第 2 代、第 4 代 mMSCs 分别进行检测, 结果显示原代细胞中 CD34、CD45 等有阳性表达, 经过传代后其表达效率接近于零, 呈阴性表达; CD29 表达呈阳性, 表达率随着细胞传代而逐渐升高 (图 4)。

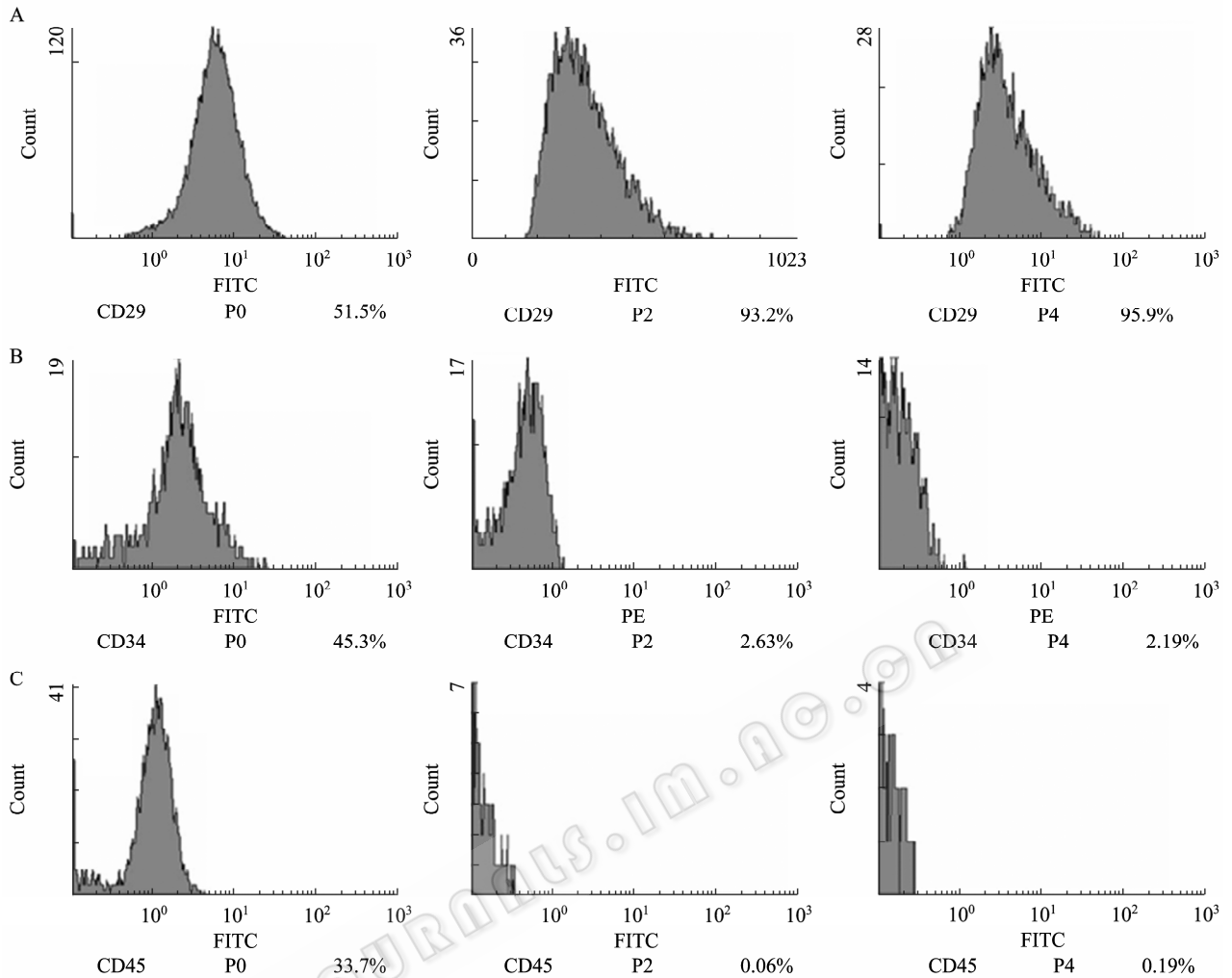


图4 mMSCs 流式细胞学鉴定结果

Fig. 4 Flow cytometric identification of mMSCs. (A) CD29 expression increased gradually with cell passing. (B) CD34 expression declined with cell passing. (C) CD45 expression declined with cell passing, the expression was nearly negative after P4.

## 2.5 慢病毒感染 mMSCs 的结果

慢病毒感染 mMSCs 48 h 后 Nanog-mMSCs 组与 Mock-mMSCs 组的 mMSCs 在荧光显微镜下均可见大量绿色荧光 (图 5), 荧光可随着细胞传代而持续存在, 而 mMSCs 组未见特异绿色荧光 (图略)。

## 2.6 Nanog 及 NF- $\kappa$ Bp65 在各组的表达情况

细胞免疫荧光检测可见 Mock-mMSCs 组及 mMSCs 组 NF- $\kappa$ Bp65 表达阳性, 胞浆内均可见大量红色荧光, 而 Nanog-mMSCs 组为弱阳性, 胞浆内仅有少量红色荧光 (图 6)。分别抽提 3 组细胞总 RNA, 同时以小鼠 NF- $\kappa$ Bp65 基因引物以及小鼠  $\beta$ -actin 基因引物作为内参进行 RT-PCR, 结果显示: 与 Mock-mMSCs 组及 mMSCs 组相比, Nanog-mMSCs

组的灰度明显低, 差异有显著性意义 ( $P < 0.001$ )。而 Mock-mMSCs 组与 mMSCs 组之间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。说明 Nanog-mMSCs 组在 mRNA 水平 NF- $\kappa$ Bp65 的表达降低 (图 7)。提取 3 组细胞蛋白先后以抗  $\beta$ -actin 抗体、抗 Nanog 抗体及抗 NF- $\kappa$ Bp65 抗体进行 Western blotting, 可见 42 kDa 大小  $\beta$ -actin 蛋白、35 kDa 大小 Nanog 蛋白及 65 kDa NF- $\kappa$ Bp65 蛋白条带。灰度分析结果显示, 与 Mock-mMSCs 组及 mMSCs 组相比, Nanog-mMSCs 组的 NF- $\kappa$ Bp65 蛋白条带灰度值降低, 差异有显著性意义 ( $P < 0.001$ ); 而 Nanog 蛋白条带灰度值增高, 差异有显著性意义 ( $P < 0.001$ )。Mock-mMSCs 组与 mMSCs 组之间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

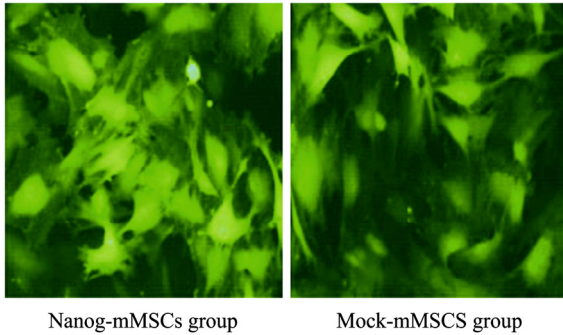


图 5 慢病毒感染 mMSCs 后 48 h 荧光显微镜观察结果 (200 $\times$ )  
 Fig. 5 Intensive green fluorescence was observed by fluorescence microscopy after lentivirus infecting for 48 h (200 $\times$ ).

上述结果证明了 *Nanog* 可以明显地抑制 NF- $\kappa$ Bp65 的表达 (图 8、9)。

### 3 讨论

慢病毒是一种免疫缺陷病毒, 其典型代表为人类免疫缺陷病毒 1 型 (Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)。HIV-1 病毒与其他逆转录病毒相比, 其基因组结构相似, 也含 *gag*、*pol* 和 *env* 基因, 除此外, 还包括一些在 HIV 病毒复制过程中有重要功能的基因, 例如 *Rev* 基因可与病毒基因组中的 *Rev* 反应元件作用, 促使病毒 RNA 从细胞核转移至胞浆。

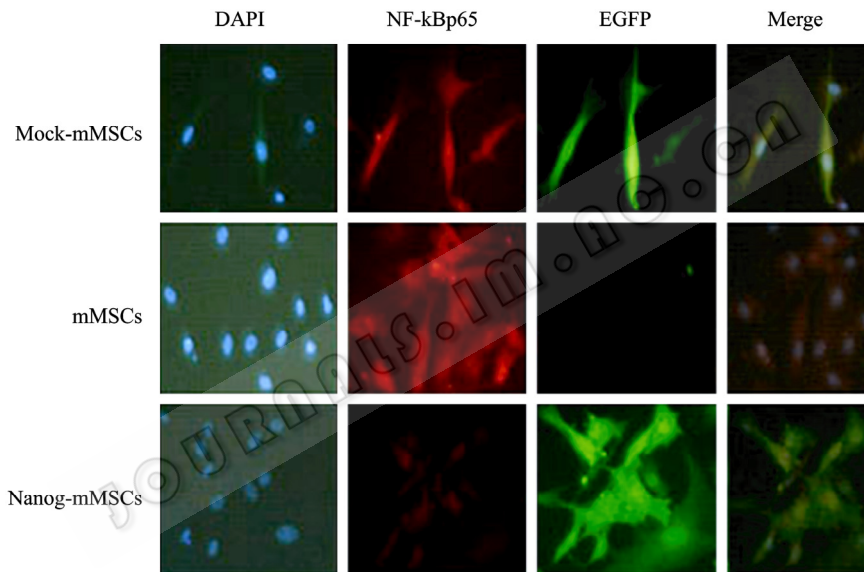


图 6 荧光显微镜观察 NF- $\kappa$ Bp65 在各组干细胞的表达情况 (200 $\times$ )  
 Fig. 6 NF- $\kappa$ Bp65 expression in the three group cells under fluorescent microscope (200 $\times$ ). The NF- $\kappa$ Bp65 was highly expressed in Mock-mMSCs and mMSCs groups, and weakly expressed in Nanog-mMSCs group.

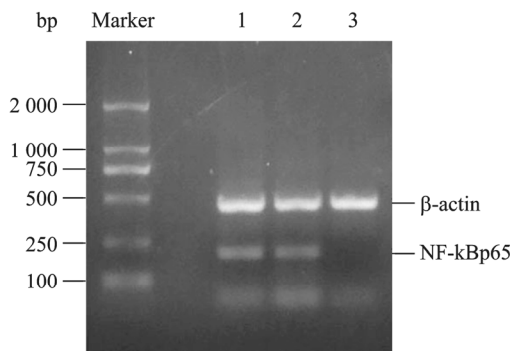


图 7 mMSCs、Mock-mMSCs 与 Nanog-mMSCs 组 RT-PCR 结果  
 Fig. 7 Agarose gel electrophoresis pattern of the RT-PCR products of mMSCs, Mock-mMSCs and Nanog-mMSCs groups. 1: mMSCs; 2: Mock-mMSCs; 3: Nanog-mMSCs.

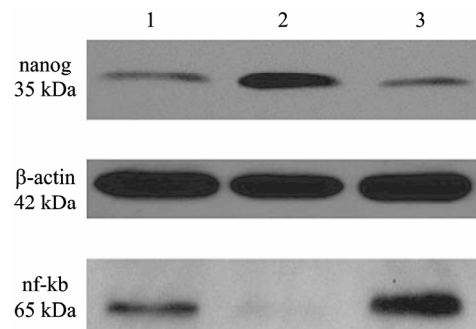


图 8 各组的 Western blotting 结果  
 Fig. 8 Western blotting results of three groups. 1: mMSCs; 2: Nanog-mMSCs; 3: Mock-mMSCs.

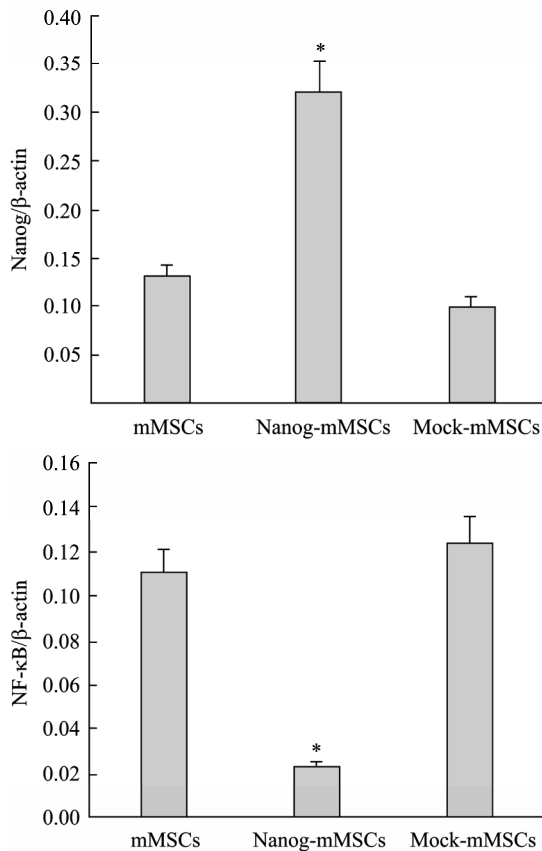


图9 各组的 Western blotting 灰度值比较结果

Fig. 9 Comparison of the gray levels among three groups. \* $P < 0.01$  vs Mock-mMSCs and mMSCs groups.

慢病毒既可感染分裂细胞，又可以感染非分裂细胞。尤其在需要感染非分裂（如造血干细胞、神经细胞等）细胞，而且又要求目的基因稳定表达的情况下得到了广泛的应用<sup>[5-6]</sup>。本课题组构建的 pNL-Nanog-IRES<sub>2</sub>-EGFP 重组质粒中带有绿色荧光蛋白标记基因，便于病毒包装时的转染效率及感染靶细胞的效率观察。

本研究采用的慢病毒载体主要由三质粒系统组成，其中转移质粒中除含有包装、逆转录及整合所需的顺式序列，还保留 350 bp 的 gap 和 RRE，可在其中插入目的基因；包装质粒在 CMV 启动子的控制下，表达 HIV-1 复制所需的全部反式激活蛋白，但不产生病毒包膜蛋白及辅助蛋白 vpu；包膜蛋白质粒编码水泡性口炎病毒 G 蛋白 (VSV-G)，应用 VSV-G 包膜的假构型慢病毒载体扩大了载体的靶细胞嗜性范围，而且增加了载体的稳定性，允许通过高速离心对载体进行浓缩，提高了滴度。将载体系统分成 3 个质粒最大的益处是使序列重叠的机会大

大减少，减少载体重组过程中产生有复制能力野生型病毒的可能性。通过三质粒共转染 293T 细胞，超速离心后病毒滴度可达  $10^9$  U/mL<sup>[7]</sup>。

小鼠的 *Nanog* 基因序列全长 7.1 kb，包含 4 个外显子，位于 6 号染色体上，在胚胎干细胞 (ES)、胚胎生殖细胞以及胚胎癌细胞中表达，但在造血干细胞、腔壁内胚层、成纤维细胞、成体组织或分化的 ES 细胞中不表达。*Nanog* 对于维持干细胞的多潜能性起着重要作用，但机制不详<sup>[8-9]</sup>。本研究成功构建了携带 *Nanog* 基因的慢病毒载体质粒并转染干细胞，证实 *Nanog* 能抑制宿主细胞 NF- $\kappa$ B 的表达，这为下一步基因治疗神经变性等疾病的研究提供了很好的基础。

## REFERENCES

- [1] Gao HM, Liu B, Zhang W, *et al.* Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, **24**(8): 395-401.
- [2] Hunot S, Brugg B, Ricard D, *et al.* Nuclear translocation of NF- $\kappa$ B is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 7531-7536.
- [3] Torres J, Watt FM. *Nanog* maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NF- $\kappa$ B and cooperating with stat3. *Nat Cell Biol*, 2008, **10**(2): 194-201.
- [4] Kumar BM, Jin HF, Kim JG, *et al.* Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells. *Dev Dyn*, 2007, **236**(2): 435-446.
- [5] Wu LC, Sun CW, Ryan TM, *et al.* Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *Blood*, 2006, **108**(4): 1183-1188.
- [6] Yip PK, Wong L-F, Pattison D, *et al.* Lentiviral vector expressing retinoic acid receptor beta2 promotes recovery of function after corticospinal tract injury in the adult rat spinal cord. *Hum Mol Genet*, 2006, **15**(21): 3107-3118.
- [7] Xu K, Ma H, McCown TJ, *et al.* Generation of a stable cell line producing high titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2001, **3**(1): 97-104.
- [8] Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, **113**(5): 643-655.
- [9] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, *et al.* The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 2003, **113**(5): 631-642.