

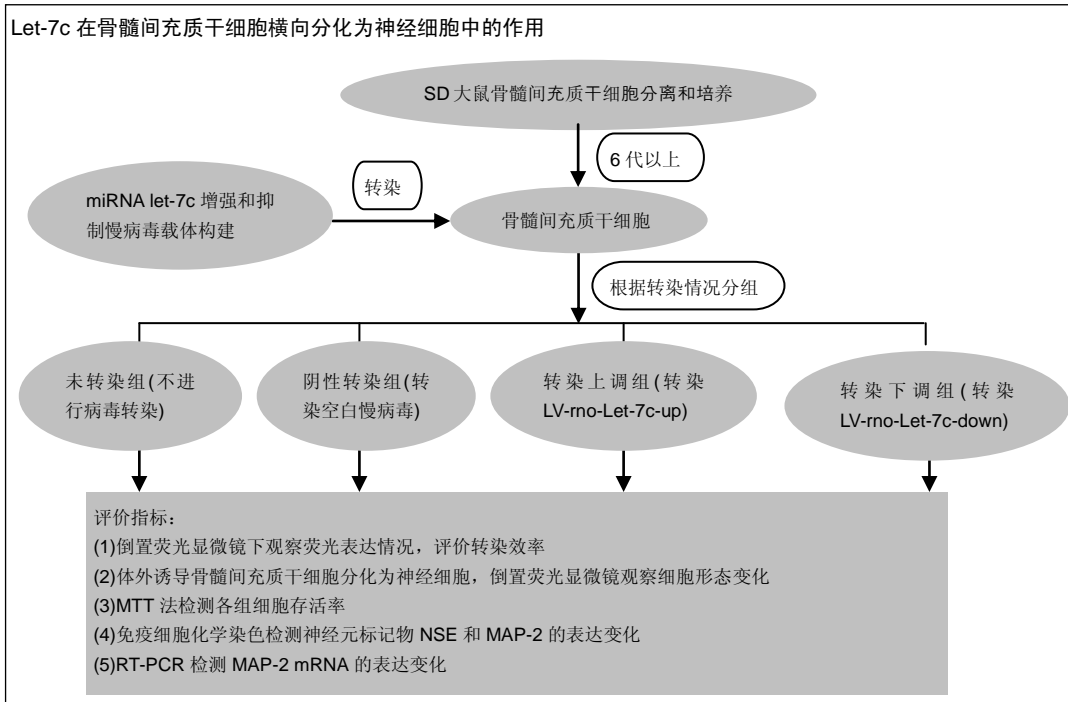
Let-7c慢病毒载体对骨髓间充质干细胞体外诱导分化为神经细胞的影响

王静, 赵绍云, 李明哲, 景黎君, 焦淑洁, 彭涛, 滕军放, 贾延劼(郑州大学第一附属医院神经内科, 河南省郑州市 450052)

引用本文: 王静, 赵绍云, 李明哲, 景黎君, 焦淑洁, 彭涛, 滕军放, 贾延劼. Let-7c 慢病毒载体对骨髓间充质干细胞体外诱导分化为神经细胞的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):20-25.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.004 ORCID: 0000-0003-4739-8143(王静)

文章快速阅读:



王静, 女, 1990年生, 河南省淅川县人, 汉族, 2016年郑州大学毕业, 硕士, 主要从事干细胞在神经系统疾病中的应用研究。

通讯作者: 贾延劼, 博士后, 主任医师, 郑州大学第一附属医院神经内科, 河南省郑州市 450052

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)01-0020-06

稿件接受: 2015-11-30

http://www.crter.org

文题释义:

微小RNA: 是一类内源性的长 20-25 个核苷酸的非编码 RNA, 通常靶向一个或者多个 mRNA, 通过翻译水平的抑制或断裂靶标 mRNAs 而调节基因的表达, 进而参与骨髓间充质干细胞的重要生物学进程, 包括发育、细胞增殖、分化、凋亡等多种过程。

慢病毒载体: 是目前分子及细胞生物实验中非常有效的工具, 在基因转染方面有着许多独特的优势, 可将其携带的外源基因整合到宿主基因组, 保证转基因长期稳定表达, 且不编码病毒蛋白, 并在中枢神经系统中不会引起免疫反应。

摘要

背景: 微小 RNA 参与调控干细胞增殖、分化、衰老等过程, 通过了解 Let-7 家族成员 Let-7c 对骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的影响可以为干细胞移植治疗提供新思路。

目的: 探讨 Let-7c 慢病毒载体在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化中的作用。

方法: 构建 Let-7c 上调及下调慢病毒载体并体外转染大鼠骨髓间充质干细胞, 筛选最适转染复数; 实验分为未转染组、阴性转染组(转染空白慢病毒)、转染上调组(转染 LV-rno-Let-7c-up)、转染下调组(转染 LV-rno-Let-7c-5p-inhibition); 采用法舒地尔诱导转染后的大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经细胞, 倒置荧光显微镜下观察骨髓间充质干细胞转染后荧光表达, 免疫细胞化学染色检测神经元标记物 NSE 和 MAP-2 的表达, RT-PCR 检测 MAP-2 mRNA 的表达, MTT 法检测细胞存活率。

结果与结论: 倒置荧光显微镜下观察大鼠 LV-rno-Let-7c-up 和 LV-rno-Let-7c-5p-inhibition 慢病毒载体转染成功。法舒地尔可以诱导骨髓间充质干细胞分化为神经细胞, 与阴性转染组相比, 转染上调组的诱导效率升高 ($P < 0.05$), NSE 和 MAP-2 表达率上升 ($P < 0.05$), 转染下调组的诱导效率下降, NSE 和 MAP-2 表达率下降 ($P < 0.05$)。转染 LV-rno-Let-7c-up 后骨髓间充质干细胞经法舒地尔诱导向神经细胞分化比率增加, Let-7c 可能具有促进骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的作用。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; let-7c; 神经元; 慢病毒; 转染; 神经分化; 国家自然科学基金

Wang Jing, Zhao Shao-yun,
Li Ming-zhe, Jing Li-jun, Jiao
Shu-jie, Peng Tao, Teng
Jun-fang, Jia Yan-jie
(Department of Neurology,
the First Affiliated Hospital of
Zhengzhou University,
Zhengzhou 450052, Henan
Province, China)

Wang Jing, Master,
Department of Neurology, the
First Affiliated Hospital of
Zhengzhou University,
Zhengzhou 450052, Henan
Province, China

Corresponding author: Jia
Yan-jie, M.D., Chief
physician, Department of
Neurology, the First Affiliated
Hospital of Zhengzhou
University, Zhengzhou
450052, Henan Province,
China

Subject headings: Bone
Marrow; Mesenchymal Stem
Cells; MicroRNAs; Neurons;
Cell Differentiation; Lentivirus
Infections; Tissue
Engineering

Funding: the National
Natural Science Foundation
of China, No. 81071114,
81371385

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 微RNAs; 神经元; 细胞分化; 慢病毒感染; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金项目(骨髓间充质干细胞神经命运决定中的自噬现象及其 mTOR 信号通路的作用/81071114; Lin28/let-7 调控的骨髓间充质干细胞移植治疗阿尔兹海默病的实验研究/81371385)

Effect of Let-7c on neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*

Abstract

BACKGROUND: The microRNAs are involved in regulation of stem cell proliferation, differentiation and aging. To study the effect of Let-7c, a member of Let-7, on the neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells provides new ideas for stem cell therapy.

OBJECTIVE: To investigate the role of Let-7c in the neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: The lentiviral vectors of Let-7c-up and Let-7c-inhibition were constructed and transfected into rat bone marrow mesenchymal stem cells. Optimal multiplicity of infection was screened. The cells were divided into non-transfected group, negative control group (transfected with empty virus), transfected enhancement group (transfected with LV-rno-Let-7c-up), transfected inhibition group (transfected with LV-rno-Let-7c-5p-inhibition). Bone marrow mesenchymal stem cells were treated with fasudil as an inducer for triggering the cells to differentiate into neurons. The fluorescence expressed by transfected cells was observed under inverted fluorescence microscope. The expression of neuron-specific markers, neuron-specific enolase and microtubule-associated protein 2, were measured by immunocytochemical method. The mRNA expression of microtubule-associated protein 2 was detected by RT-PCR. The cell viability was determined by MTT method.

RESULTS AND CONCLUSION: Under the inverted fluorescence microscope, the cells were successfully transfected with LV-rno-Let-7c-up and LV-rno-Let-7c-5p-inhibition. Fasudil induced bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into neurons. The transfection efficiency and expression levels of neuron-specific enolase and microtubule-associated protein 2 in the transfected enhancement group were significantly higher than those in the negative control group ($P < 0.05$), while in the transfected inhibition group, they were lower than those in the negative control group ($P < 0.05$). These findings indicate that the differentiation percentage of bone marrow mesenchymal stem cells is increased by fasudil after transfection with LV-rno-Let-7c-up, and Let-7c may promote the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neurons.

Cite this article: Wang J, Zhao SY, Li MZ, Jing LJ, Jiao SJ, Peng T, Teng JF, Jia YJ. Effect of Let-7c on neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016; 20(1):20-25.

0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞是骨髓中存在的非造血干细胞群体,具有多项分化潜能,可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉等多种组织细胞^[1-2]。许多研究证实骨髓间充质干细胞在碱性成纤维生长因子等不同诱导因素下可分化为神经细胞^[3-4],成为治疗帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病、多发性硬化等神经系统疾病的潜在选择^[5-8]。

在病理状态下,患者脑结构功能的改变可能影响骨髓间充质干细胞移植存活和神经分化进而降低治疗效果。微小RNAs(miRNAs)可通过阻遏靶mRNA的翻译或者降解靶mRNA影响靶蛋白的表达^[9],在转录、转录后、表观遗传学水平调控基因组表达,参与细胞增殖、分化、代谢、死亡等重要生物学进程^[10-11]。Lin28/Let-7被视为经典的发育调节子,两者互相调控,参与调控干细胞分化、增殖、凋亡、迁移、免疫应答等多种病理生理过程^[12]。基于此思路,设想可通过调节miRNAs的表达以提高骨髓间充质干细胞移植物的质量,为干细胞移植治疗提供新思路。

有研究证实Let-7家族在神经系统中呈现明显的组织表达特异性,可以调控干细胞的神经分化^[13-15]。Let-7c作为Let-7家族的重要一员,在前列腺癌、肺癌、急性髓细胞

样白血病、乳腺癌等多种疾病中发挥一定作用,但在骨髓间充质干细胞分化为神经细胞过程中的作用尚不清楚。实验根据确定的Let-7c序列分别构建目的miRNAs过表达和抑制慢病毒载体,观察Let-7c在大鼠骨髓间充质干细胞横向分化为神经细胞中的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年12月至2015年8月在郑州大学第一附属医院重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级SD大鼠2只,雌雄不限,6-8周龄,体质量100-120 g,由河南省实验动物中心提供,许可证号为SCXK(豫)2010-0002。研究中所有动物的使用均经过郑州大学动物保护委员会同意。骨髓间充质干细胞从大鼠股骨和胫骨骨髓中分离提取,连续传6代以上。

1.3.2 主要试剂 Age I、EcoR I和T₄ DNA ligase (NEB),病毒包装三质粒:GV重组载体系列(同时可表达绿色荧光蛋白)和pHelper 1.0和pHelper 2.0(上海吉凯基因化学有限公司),胎牛血清和DMEM高糖培养基(美国Gibco公

司), 神经元烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE, bs-1027R)和神经微管结合蛋白(microtubule-associated protein 2)兔抗小鼠多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司), Cy3标记山羊抗兔IgG(H+L)(上海碧云天公司), RNA提取试剂盒(康为), RT-PCR试剂盒(Oligo公司), L-多聚赖氨酸和噻唑蓝(美国Sigma公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞分离、纯化及扩增 取SD大鼠根据动物实验的相关规定, 颈椎脱臼处死后, 置体积分数为75%乙醇中浸泡5 min, 无菌条件下分离大鼠双侧股骨和胫骨, 暴露出骨髓腔, 以含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基缓慢反复冲洗骨髓腔直至发白, 收集骨髓液移至离心管中, 1 500 r/min离心3 min, 弃上清, 以培养基重悬细胞, 制成单细胞悬液, 以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于25 cm²的无菌培养瓶中, 置于37 °C、体积分数为5% CO₂的恒温培养箱内培养, 48 h半量换液, 96 h后完全换液, 之后每3 d换液1次, 倒置显微镜动态观察骨髓间充质干细胞生长情况, 待贴壁细胞融合度达到80%~90%时, 用0.25%胰蛋白酶+0.04%EDTA消化传代至6代以上备用。

1.4.2 Let-7c慢病毒载体的构建 根据miRBase数据库获得Let-7c(MIMAT0000776)序列, 合成双链DNA oligo和Pfu-GW-iRNA载体, 再将双酶切慢病毒载体和克隆好的双链DNA oligo进行链接; 构建后的pGC-LV载体与慢病毒包装质粒载体pHelper 1.0、pHelper 2.0通过Lipofectamine 2000共转染至293T包装细胞, 产生病毒液并采用孔稀法测定滴度。最后将制备好的慢病毒载体放至-80 °C冰箱冻存备用。

1.4.3 转染复数值测定 取培养6代以上的大鼠骨髓间充质干细胞, 以 1×10^5 /孔的密度接种至24孔板。培养两三天, 直至细胞融合度达50%左右, 按5个不同的转染复数值(1, 10, 20, 50, 100)添加病毒液和终质量浓度为5 mg/L的Polybrene。阴性转染组只添加含有EGFP的空病毒上清, 转染上调组添加let-7c慢病毒载体上清和EGFP, 转染下调组添加let-7c-inhibition慢病毒载体上清和EGFP, 终质量浓度为5 mg/L的Polybrene被添加到以上3组中, 而未转染组不做处理。共转染12 h后更换新鲜培养基。转染后每天在倒置荧光显微镜下观察各组细胞绿色荧光蛋白表达情况, 评估转染效率, 筛选最适转染复数值。

1.4.4 大鼠骨髓间充质干细胞转染及实验分组 根据转染情况将同时点的骨髓间充质干细胞分为4组: 未转染组(不进行转染, 其他培养条件同各转染组), 阴性转染组(转染空白慢病毒, 只含EGFP), 转染上调组(转染LV-rno-Let-7c-up, 含Let-7c-up慢病毒和EGFP), 转染下调组(转染LV-rno-Let-7c-5p-inhibition, 含Let-7c-inhibition慢病毒和EGFP), 每组设3个重复孔。在倒置荧光显微镜下观察转染24, 48, 72 h和4, 5, 6, 7 d EGFP荧光表达情

况, 评价细胞转染效率。

1.4.5 体外诱导骨髓间充质干细胞分化为神经细胞 取各组细胞进行诱导实验, 弃去DMEM完全培养基, 用PBS洗3次, 加入含有法舒地尔(终浓度为200 μmol/L)的DMEM完全培养基, 置于37 °C、体积分数为5% CO₂培养箱内2 h。倒置荧光显微镜下观察30 min, 1 h, 2 h细胞形态变化。

1.4.6 MTT比色法 将转染LV-rno-let-7c-up、LV-rno-let-7c-inhibition和空白慢病毒各时点的骨髓间充质干细胞移入96孔培养板, 每孔加入MTT(5.0 g/L)50 μL, 置于培养箱孵育4 h, 离心弃上清, 加入二甲基亚砷200 μL, 采用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度, 评价细胞存活率。

1.4.7 免疫细胞化学染色法 各组细胞经PBS清洗后用40 g/L多聚甲醛固定于4 °C过夜, 用0.2%TritonX-100处理10 min, 用封闭液封闭1 h后去除封闭液, 然后分别用NSE抗体(1.0 mg/L)、MAP-2抗体(1.0 mg/L)在4 °C条件下孵育24 h。PBS清洗3遍后, 于室温下用Cy3标记山羊抗兔IgG(1:500)进行染色标记, 通过倒置荧光显微镜(用×10或×20)摄取细胞图像, 选取明视野下细胞数尽量相同的图像, 每组采集超过30个区域的细胞, 应用ImagePro Plus 6.0专业图像分析软件分析各实验组荧光图片单个细胞的累积吸光度值, 进行统计学分析。

1.4.8 RT-PCR 采用康为试剂盒分离纯化各组细胞的总RNA, 分光光度法测定计算提取的总RNA含量及浓度。参照oligo试剂盒实验操作说明进行RT-PCR, 总反应体积20 μL, 然后取RT-PCR产物10.0 μL, 加上样缓冲液2.0 μL, 在2%琼脂糖凝胶上电泳, 70 V 40 min, 凝胶图像成像系统拍摄保存实验结果, 凝胶图像分析系统(GelProAnalyzer 3.0)分析各目的基因与β-actin基因条带吸光度值。

1.5 主要观察指标 细胞转染效率, 法舒地尔诱导后细胞形态变化及神经元标记物NSE及MAP-2的表达情况。

1.6 统计学分析 用统计软件SPSS 19.0进行数据分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析(ANOVA)进行2组以上的组间比较, 最小显著性差异(LSD法)进行组间两两比较。P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 Let-7c过表达和抑制慢病毒载体的构建 Let-7c上调及下调慢病毒阳性重组克隆均通过测序, 证明载体构建成功。LV-rno-Let-7c-up和LV-rno-Let-7c-5p-down病毒滴度均为 3×10^{11} TU/L, 阴性对照病毒滴度为 3.5×10^{11} TU/L。

2.2 Let-7c过表达和抑制慢病毒转染 通过倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况评价细胞转染率。Let-7c上调慢病毒转染组48 h可观察到少量绿色荧光, 余各组24 h时可以观察到部分绿色荧光, Let-7c过表达慢病毒转染6 d时EGFP表达最佳, Let-7c抑制慢病毒转染4 d时EGFP表达最佳, 转染上调组和转染下调组与阴性转染组EGFP转染率无明显差异, 见图1。

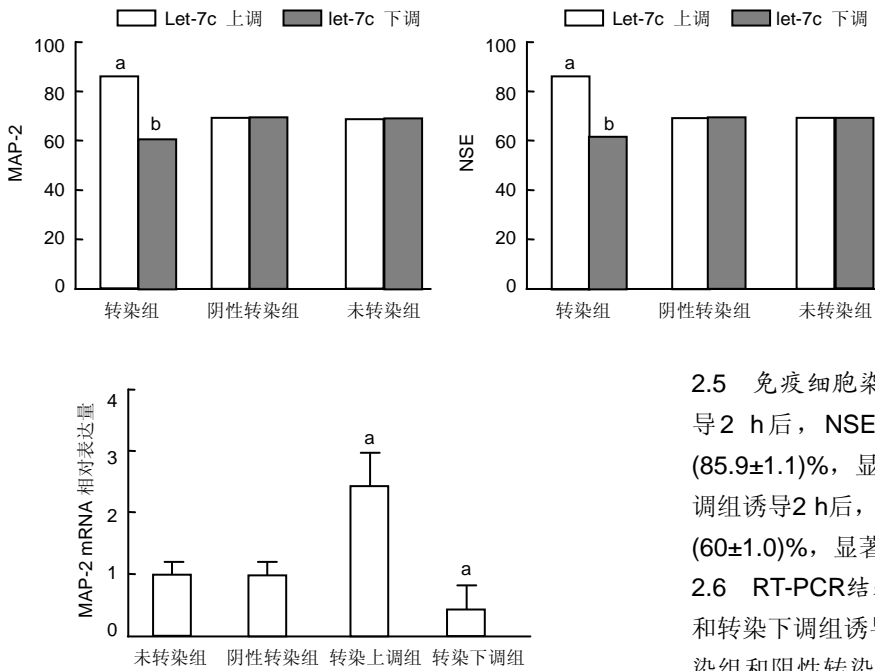


图 4 各组法舒地尔诱导后 2 h 细胞 NSE、MAP-2 表达情况
Figure 4 The expression of neuron-specific enolase and microtubule-associated protein 2 in each group at 2 hours after induction by fasudil
图注: 与阴性转染组比较, 转染上调组 MAP-2、NSE 荧光表达较阴性转染增加 (^a $P < 0.05$), 转染下调组 MAP-2、NSE 荧光表达较阴性转染组下降 (^b $P < 0.05$)。

图 5 RT-PCR 检测法舒地尔诱导后细胞 MAP-2 mRNA 表达情况
Figure 5 The expression of microtubule-associated protein 2 mRNA in cells after induction by fasudil detected by RT-PCR
图注: 与未转染组和阴性转染组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.5 免疫细胞染色法观察神经元标记物 转染上调组诱导 2 h 后, NSE 和 MAP-2 表达率分别为 (88.3±2.1)%、(85.9±1.1)%, 显著高于阴性转染组 ($P < 0.05$)。Let-7c 下调组诱导 2 h 后, NSE 和 MAP-2 表达率分别为 (62±1.5)%、(60±1.0)%, 显著低于阴性转染组 ($P < 0.05$), 见图 3, 4。
2.6 RT-PCR 结果 未转染组、阴性转染组、转染上调组和转染下调组诱导分化 2 h 后均表达 MAP-2 mRNA。未转染组和阴性转染组 MAP-2 mRNA 的表达差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。转染上调组表达 MAP-2 mRNA 较未转染组和阴性转染组明显升高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。转染下调组表达 MAP-2 mRNA 较未转染组和阴性转染组明显降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 5。

2.3 MTT 结果 转染前各组骨髓间充质干细胞的存活率差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 转染 24 h 后各转染组细胞存活率显著下降, 与未转染组比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 各转染组之间细胞存活率差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。随着时间推移各组细胞存活率上升, 转染 96 h 与转染 24 h 比较细胞存活率有所上升, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 但与未转染组比较细胞存活率仍下降, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组不同时间点细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)
Table 1 Survival rate of cells at different time points

组别	未转染组	阴性转染组	转染上调组	转染下调组
转染前	74.9±3.8	73.2±1.9	75.4±2.4	74.3±3.5
转染后 24 h	73.4±3.1	59.5±3.1 ^a	60.2±3.8 ^a	58.8±2.4 ^a
转染后 48 h	72.8±2.4	62.3±2.8	61.7±1.4	61.4±1.8
转染后 72 h	74.9±1.8	65.1±2.5	64.4±3.1	63.2±3.3
转染后 96 h	75.1±4.1	67.4±3.3 ^{bc}	69.7±2.6 ^{bc}	66.7±2.9 ^{bc}

表注: 与未转染组比较, ^a $P < 0.05$; 与转染 24 h 比较, ^b $P < 0.05$, 与未转染组相比, ^c $P < 0.05$ 。

2.4 法舒地尔体外诱导骨髓间充质干细胞分化为神经细胞 诱导 2 h 后, 阴性转染组部分骨髓间充质干细胞出现神经细胞改变, 胞体收缩成圆形, 出现细长的突起, 局部形成网络; 转染上调组细胞形态变化更快且更为显著, 诱导 2 h 后绝大多数细胞胞体收缩成锥形或圆形, 折光性强, 有较多的长突起, 分支增多, 交织成网状; 而 Let-7c 下调组细胞形态变化缓慢, 诱导 2 h 后仅少量细胞出现胞体收缩, 未见细长突起形成网络, 见图 2。

3 讨论 Discussion

骨髓间充质干细胞可塑性强, 不仅可以分化为中胚层细胞, 还能打破胚层障碍在特定条件下分化为外胚层神经细胞^[3, 16-17], 同时具有获取方便、扩增迅速、可定向诱导分化、低免疫原性、可对其进行基因工程技术加工等优点, 已被视为神经系统疾病细胞和基因治疗的理想种子细胞^[18]。

慢病毒载体包容性大, 可感染多种类型细胞, 将其携带的外源基因整合到宿主基因组, 保证转基因长期稳定表达, 且不编码病毒蛋白, 并在中枢神经系统中不会引起免疫反应^[19]。Greco 等^[20]发现 miRNAs 在人骨髓间充质干细胞分化为神经细胞过程中起着重要调控作用。Let-7 家族成员主要在成人的胚胎及脑组织内高度表达, 在神经干细胞也是上调表达的^[21]。许多研究表明 Let-7 可能通过多种方式参与 Notch、Wnt、PI3K/Akt/mTOR、Ras-ERK/MAPK 等信号通路进而参与间充质干细胞神经分化过程^[22-24]。据此该研究采用三质粒表达系统即 pGC-LV 载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体来构建慢病毒载体, 建立 Let-7c 增强及抑制体外模型, 为探讨其在骨髓间充质干细胞诱导分化为神经细胞中的作用提供依据。

研究利用 Let-7c 上调和下调慢病毒载体转染骨髓间充质干细胞, 并观察其在骨髓间充质干细胞体外诱导分化为神经细胞中的作用。结果发现: ① Let-7c 上调及下调慢病毒载体转染大鼠骨髓间充质干细胞后, EGFP 可以稳定表达, 转染效率高。② 转染慢病毒载体后的细胞存活率与未转染组相比显著下降, 提示慢病毒载体可能影响细胞存活

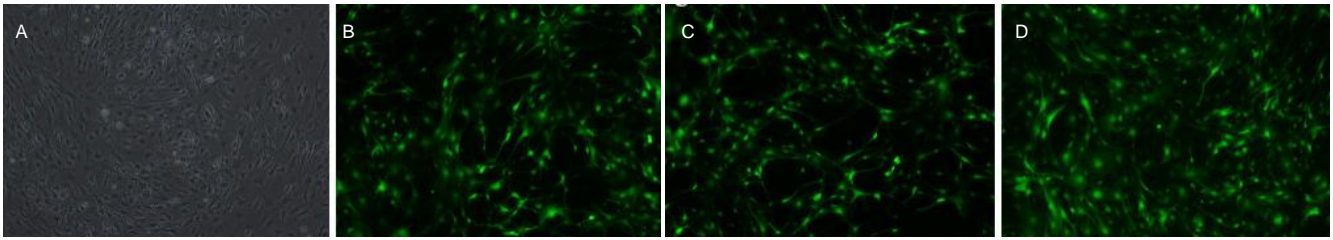


图2 法舒地尔诱导 2 h 后倒置荧光显微镜下观察表现($\times 100$)

Figure 2 Inverted fluorescence microscope view of the cells at 2 hours after cultured in fasudil medium ($\times 100$)

图注: 图中 A 为未转染组部分骨髓间充质干细胞胞体收缩呈圆形、锥形, 细胞突起细长; B 为阴性转染组部分骨髓间充质干细胞胞体收缩成圆锥形, 出现细长突起在局部形成网络; C 为转染上调组大部分骨髓间充质干细胞胞体收缩呈圆形、锥形, 细胞突起长、多, 交织成网, 形成较典型神经细胞结构; D 为转染下调组仅少数骨髓间充质干细胞出现胞体收缩, 未见网状结构。

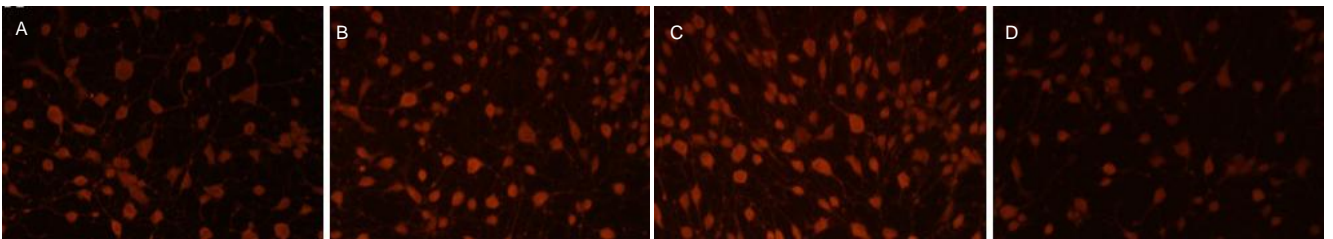


图3 法舒地尔诱导后倒置荧光显微镜下细胞 MAP-2 的表达情况($\times 200$)

Figure 3 Inverted fluorescence microscope view of microtubule-associated protein 2 expression in cells under fasudil induction ($\times 200$)

图注: 图中 A, B, C, D 分别为未转染组、阴性转染组、转染上调组及转染下调组骨髓间充质干细胞分化为神经细胞 MAP-2 表达情况。

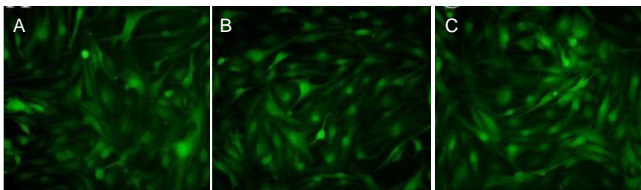


图1 慢病毒载体转染骨髓间充质干细胞第 6 天倒置荧光显微镜下观察细胞荧光表达情况($\times 200$)

Figure 1 Fluorescence expression of bone marrow mesenchymal stem cells under inverted fluorescence microscope at 6 days after lentivirus transfection ($\times 200$)

图注: 图中 A 为阴性转染组; B 为转染上调组; C 为转染下调组。3 组接近 80% 以上细胞表达绿色荧光蛋白, 3 组之间无明显差异。

率, 但各转染组即阴性转染组、转染上调组和转染下调组之间细胞存活率无明显差异, 因此可以转染空白慢病毒作为对照以实现阴性对照, 这也提示 *Let-7c* 可能对骨髓间充质干细胞存活率影响不大, 有待进一步的实验来验证。

③骨髓间充质干细胞在法舒地尔诱导 30 min 后细胞开始出现胞体收缩, 细胞间隙增宽, 诱导 2 h 后细胞的胞体收缩成锥形或圆形, 折光性强, 有较多的长突起, 分支增多, 交织成网状, 其机制为 ROCK 抑制剂法舒地尔通过抑制 Rho 激酶活性, 从而调控细胞骨架重建, 启动细胞分化过程, 同时通过干扰 ROCK 信号通路与其他信号传导通路之间本来相对平衡稳定的内环境, 关闭或激活下游途径中与细胞分化相关的基因, 从而促进骨髓间充质干细胞向神经细胞分化^[25]。④与阴性对照组比较, 转染上调组骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的效率明显增高, 神经细胞早、中期标志物 NSE 及成熟神经元特异性标志物 MAP-2 表达增高显著, 而转染下调组骨髓间充质干细胞向神经细胞分化

的效率下降, NSE 和 MAP-2 的表达下降。这提示 *Let-7c* 可能在骨髓间充质干细胞横向分化为神经细胞中发挥重要作用, 提高 *Let-7c* 的表达可使骨髓间充质干细胞更容易向神经细胞分化, 而抑制 *Let-7c* 的表达则不利于其向神经细胞分化。

Let-7c 影响骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的机制尚不清楚, 有研究证实 *let-7c* 可以靶向调控 RAS 信号通路, 通过与 RAS 的 3'-UTR 相应位点结合对 Ras-ERK/MAPK 进行负性调控^[24], 而 Ras-ERK/MAPK 信号通路在骨髓间充质干细胞神经分化过程中起重要作用^[26], 因此 *let-7c* 可能通过 Ras-ERK/MAPK 信号通路影响骨髓间充质干细胞的神经分化。体外诱导骨髓间充质干细胞神经分化过程还涉及 Notch 信号通路, 通过抑制 Notch1 可提高分化效率^[27]; 有研究发现 Notch1 高表达时检测 *let-7c* 表达减低^[28], 提示 *let-7c* 可能参与调控 Notch1 表达, 而且根据靶基因检索 (mirbase) 发现大鼠 *let-7c* 靶基因中包含 Notch1, 因此推断 *let-7c* 可能通过抑制 Notch 信号通路来影响骨髓间充质干细胞向神经细胞的分化, 具体机制需要进一步实验证明。

综上所述, 研究发现 *let-7c* 可以增加骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的效率, 提示 *Let-7c* 在骨髓间充质干细胞神经分化过程中可能起促进作用。

致谢: 感谢郑州大学第一附属医院贾延劼教授在实验过程中给予的帮助, 感谢郑州大学第一附属医院重点实验室提供的良好实验平台。

作者贡献: 第一、二、八作者进行实验设计, 第一、二、三作者进行实验实施, 第二作者进行实验评估, 第四、五、六作者

提供技术支持, 第一作者成文, 第二作者审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Fu X, Chen Y, Xie FN, et al. Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(3-4):616-626.
- [2] Zuo D, Tang Q, Fan H, et al. Modulation of nuclear factor- κ B-mediated pro-inflammatory response is associated with exogenous administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of experimental colitis. *Mol Med Rep*. 2015;11(4):2741-2748.
- [3] Jiang J, Lv Z, Gu Y, et al. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci Res*. 2010;66(1):46-52.
- [4] Liu Q, Cheng G, Wang Z, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into nerve-like cells in vitro after transfection with brain-derived neurotrophic factor gene. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015;51(3):319-327.
- [5] Kitada M, Dezawa M. Parkinson's disease and mesenchymal stem cells: potential for cell-based therapy. *Parkinsons Dis*. 2012;2012:873706.
- [6] Godoy MA, Saraiva L, Vasconcelos-dos-Santos A, et al. Treatment with bone marrow mesenchymal stem cells in an in vitro model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2012; 122: 18.
- [7] Pollock K, Stewart H, Cary W, et al. Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells Engineered to Produce Brain-derived Neurotrophic Factor for the Future Treatment of Huntington's Disease. *Neurotherapeutics*. 2015; 12(1):264.
- [8] Naderi N. The Perspectives of Mesenchymal Stem Cell Therapy in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Iran J Pharm Res*. 2015;14(Suppl):1-2.
- [9] Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int*. 2015;15:38.
- [10] Rizo E, Sifakas N, Katsantoni E, et al. Let-7, mir-98 and mir-183 as biomarkers for cancer and schizophrenia. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123522.
- [11] Li T, Yang GM, Zhu Y, et al. Diabetes and hyperlipidemia induce dysfunction of VSMCs: contribution of the metabolic inflammation/miRNA pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;308(4):E257-269.
- [12] Thornton JE, Gregory RI. How does Lin28 let-7 control development and disease. *Trends Cell Biol*. 2012 22(9): 474-482.
- [13] Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, et al. Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB J*. 2007;21(2):415-426.
- [14] 张静, 徐小隔, 贾延劫, 等. Let-7b 慢病毒载体构建及对大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化为神经细胞的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2014, 17(23):1-4.
- [15] 徐小隔, 张静, 贾延劫, 等. Let-7d 慢病毒载体体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经细胞 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(41): 6603-6608.
- [16] Hermann A, List C, Habisch HJ, et al. Age-dependent neuroectodermal differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells: limitations for autologous cell replacement strategies. *Cytotherapy*. 2010;12(1):17-30.
- [17] 高慧丽, 张广宇, 贾延劫, 等. 阿尔茨海默病小鼠模型中骨髓间充质干细胞的神经分化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(3): 467-472.
- [18] Yu JM, Wu X, Gimble JM, et al. Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow. *Aging Cell*. 2011;10(1):66-79.
- [19] Simmons A, Whitehead RP, Kolokoltsov AA, et al. Use of recombinant lentivirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein G for efficient generation of human anti-cancer chimeric T cells by transduction of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Viro J*. 2006;3:8.
- [20] Greco SJ, Rameshwar P. MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(39):15484-15489.
- [21] 段冉冉, 李燕飞, 贾延劫. Let-7 家族在阿尔茨海默病发病机制中的作用 [J]. *国际生物医学工程杂志*, 2013, 36(5):307-310.
- [22] Jing L, Jia Y, Lu J, et al. MicroRNA-9 promotes differentiation of mouse bone mesenchymal stem cells into neurons by Notch signaling. *Neuroreport*. 2011;22(5):206-211.
- [23] Chen YN, Liu H, Zhao HB, et al. Salidroside via ERK1/2 and PI3K/AKT/mTOR signal pathway induces mouse bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neural cells. *Yao Xue Xue Bao*. 2013;48(8):1247-1252.
- [24] Whelan JT, Hollis SE, Cha DS, et al. Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2012;227(3):1235-1241.
- [25] 彭涛, 滕军放, 关文娟, 等. 盐酸法舒地尔体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化的可行性 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2010, 45(4):559-562.
- [26] Zheng B, Wang C, He L, et al. Neural differentiation of mesenchymal stem cells influences chemotactic responses to HGF. *J Cell Physiol*. 2013;228(1):149-162.
- [27] 赵二义, 王留东, 文全庆, 等. Notch 信号在盐酸法舒地尔诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经元分化过程中的作用 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2010, 26(4):428-432.
- [28] Bao B, Wang Z, Ali S, et al. Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett*. 2011; 307(1):26-36.