

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.19.004

慢病毒介导的 GFP 转染对大鼠骨髓间充质干细胞增殖、 细胞表型及脑脊液诱导后分化能力的影响 *

陈娟¹ 李福军¹ 方堃¹ 李松洋¹ 叶英^{2△}

(1 徐州医科大学附属徐州市立医院 江苏 徐州 221002; 2 徐州医科大学附属医院急诊科 江苏 徐州 221002)

摘要 目的:研究慢病毒(Lentivirus)介导的绿色荧光蛋白(Lentivirus-GFP)转染大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的可行性及稳定性,以及对人脑脊液诱导转染后 BMSCs(BMSCs-GFP)成神经分化能力的影响。**方法:**全骨髓贴壁法培养 BMSCs, Lentivirus-GFP 以 5、10、30、50 的感染复数(MOI)转染 BMSCs, 96h 后倒置显微镜下观察 GFP 转染效率和表达情况, 筛选最适 MOI; 流式细胞术检测细胞表型; CCK8 法检测细胞活力。人脑脊液诱导 BMSCs-GFP 向神经细胞分化, 蛋白印迹法检测神经细胞表面标记物 MAP-2 和 Nestin 表达。**结果:**全骨髓贴壁法分离培养的 BMSCs 生长旺盛。MOI 值为 5、10、30、50 的转染效率分别为 56.2%、87.3%、94.7% 和 95.1%, 当 MOI 为 30 时, Lentivirus-GFP 转染 BMSCs 效率较高, 且对 BMSCs 生长状态无显著性影响。BMSCs-GFP 表达 CD29、CD90, 较少表达 CD45、CD54, 符合干细胞特性。BMSCs-GFP 增殖活性与未转染 GFP 基因的 BMSCs 相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。人脑脊液诱导 BMSCs-GFP 成神经细胞分化后表达神经元标记物 MAP-2 和 Nestin。**结论:** Lentivirus-GFP 能高效稳定转染大鼠 BMSCs(最适 MOI 值为 30), 同时不影响其生物学特性, 人脑脊液能诱导 BMSCs-GFP 成神经细胞分化。

关键词:骨髓间充质干细胞; 慢病毒; 绿色荧光蛋白; 脑脊液

中图分类号:R-33; R331.2; Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)19-3617-05

Effects of Lentivirus-GFP Transfection System on Proliferation, Phenotype and Differentiation Ability of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Induced by Cerebrospinal Fluid*

CHEN Juan¹, LI Fu-jun¹, FANG Kun¹, LI Song-yang¹, YE Ying^{2△}

(1 Department of Emergency Medicine of Affiliated Xuzhou Municipal Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, 221002, China; 2 Emergency Center, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu, 221002, China)

ABSTRACT Objective: The object of this study is to evaluate the transfection efficiency and stability of lentiviral-GFP into rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and detect the differentiation ability of BMSCs carrying GFP (BMSCs-GFP) induced by Human cerebrospinal fluid. **Methods:** BMSCs derived from rat bone marrow were isolated and cultivated in vitro. Cells were transfected with lentiviral-GFP at different multiplicity of infection (MOI=5, 10, 30, 50). The GFP expression was observed under inverted fluorescence microscopy after 96h. Flow cytometry was used to evaluate the transfection efficiency at proper MOI and CD phenotype on the surface of BMSCs-GFP. Growth curve was acquired by CCK8 to compare the difference of the growth rate between BMSCs and BMSCs-GFP. BMSCs-GFP were induced by Human cerebrospinal fluid and the expression of neuron specific protein MAP-2 and Nestin were detected by western blot method. **Results:** Under the inverted fluorescence microscope, green fluorescent was found partly after 96h. The transfection rate were 56.2%, 87.3%, 94.7% and 95.1%, while the transfect MOI were 5, 10, 30 and 50, respectively. At transfect MOI 30, the transfection efficiency of BMSCs was the best, and there was no obvious effect on cell activity observed. The results of flow cytometry analysis are shown BMSCs-GFP expressed CD29 and CD90 and rarely express CD45 and CD54. The result of CCK8 measured growth curve showed that there was no significant difference in the proliferative capability between the BMSCs and BMSCs-GFP ($P>0.05$). BMSCs-GFP was induced to differentiate into neuron like cells by Human cerebrospinal fluid and could express nerve cell markers MAP-2 and Nestin. **Conclusion:** The most proper MOI is 30 in this experiment. The lentiviral-GFP could infect BMSCs efficiently and expressed stably, and BMSCs-GFP could be induced by Human cerebrospinal fluid to differentiate into neuron like cells.

Key words: BMSCs; Lentiviral vector; Green fluorescence protein gene; Human cerebrospinal fluid

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)19-3617-05

* 基金项目:江苏省高校自然科学研究重大项目(12KJA320002);江苏省青蓝工程资助

作者简介:陈娟(1989-),女,硕士研究生,主要研究方向:急救医学, E-mail: Joanne_chen@foxmail.com

△ 通讯作者:叶英(1970-),硕士生导师,教授,主要研究方向:急危重症医学, Email: xzmcy@163.com, 电话: 15205206866

(收稿日期:2021-01-27 接受日期:2021-02-23)

前言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是干细胞家族的重要成员, 具有稳定的增殖能力、多向分化潜能、免疫原性弱等特点^[1-4], 被认为是细胞替代治疗及基因治疗理想的靶细胞, 在神经系统损伤修复领域, 有着良好的应用前景^[5-8]。我们研究组已建立脑脊液诱导 BMSCs 定向分化神经干细胞^[9], 定向移植进而促进中枢神经损伤修复。为了更好地观察移植后细胞在体内的迁移及存活情况, 建立适当的生物标记方法, 同时不影响其细胞学特性, 是目前急需解决的问题。本研究采用 Lentivirus-GFP 转染大鼠 BMSCs (BMSCs-GFP), 观察 BMSCs-GFP 的细胞生物学特性, 并研究脑脊液对 BMSCs-GFP 诱导分化的影响, 为移植细胞的应用及研究提供安全有效的标记方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

Lentivirus-GFP 购于苏州吉玛基因公司; FBS 胎牛血清, DMEM/F12 培养基和胰酶购于美国 GIBCO 公司, FITC anti rat CD29、FITC anti rat CD90、PE anti rat CD45 购于美国 BioLegend 公司, FITC anti rat CD54 购于美国 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物 清洁级健康 4 周龄 SD 大鼠 10 只, 体重 80g~100g, 雌雄不限, 由徐州医学院实验动物中心提供(实验动物许可证号: 苏 SCXK2005-0005)。

1.2.2 大鼠 BMSCs 的分离及培养 根据文献^[10,11] 提取 BMSCs, 于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后首次半量换液, 以后每 3~4d 全量换液, 待细胞 90%融合时以 1:3 比例进行传代培养, 反复传代扩增, 并标记为 P1-P3。

1.2.3 BMSCs 的形态学鉴定 倒置相差显微镜观察原代及传代细胞生长状态和形态特征并拍照记录。

1.2.4 Lentivirus-GFP 基因转染大鼠 BMSCs 取 P3 代 BMSCs 制成单细胞悬液, 计数后以 1×10^5 细胞密度接种至 24 孔板, 分别以 5、10、30 和 50 的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 转染 Lentivirus-GFP, 转染 12 h 后换液, 采用 DMEM/F12 完全培养基继续培养, 于倒置荧光显微镜下观察细胞情况。转染 96 h 后, 收集 BMSCs 制成单细胞悬液, 以未转染的 BMSCs 作为对照, 倒置荧光显微镜下观察各孔细胞的 GFP 表达情况及细胞形态学变化, 随机选取 3 个非重叠视野 ($\times 100$), 计数 GFP 阳性细胞百分比, 筛选最适 MOI。

1.2.5 流式细胞仪检测 BMSCs 表面标记物 取最适 MOI 值的 Lentivirus-GFP 转染 P3 代 BMSCs, 96 h 后收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 按 1×10^6 /mL 重悬细胞, 分别加入适当稀释的流式抗体 (FITC-CD29、FITC-CD54、PE-CD90、PE-CD45), 充分混匀, 4℃避光孵育 30 min; 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬; 再次离心, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 500 μ L PBS 重悬细胞后流式细胞仪检测。一抗用 PBS 作为阴性对照。

1.2.6 CCK8 法检测 BMSCs-GFP 的增殖状态 采用最适 MOI 值的 Lentivirus-GFP 转染 P3 代 BMSCs, 以 96 孔板每孔铺 4000 个 BMSCs 细胞, 每孔加完全培养基 100 μ L, 四周加

PBS 防止水分蒸发。置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24、48、72、96 h, 每个时间点设置 4 个复孔。24、48、72、96 h 后弃去 96 孔板中旧的培养基, 每孔加入无血清培养基 100 μ L, CCK-8 溶液 10 μ L, 混匀 2 种液体, 避光操作。放入培养箱中继续孵育 0.5、1、2、4 h。酶标仪测定 OD 值, 记录结果, 以时间为横坐标, OD 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.7 使用人脑脊液体外诱导 BMSCs-GFP 成神经细胞分化 取 BMSCs 和 BMSCs-GFP, 以 1×10^4 孔浓度接种于 24 孔细胞培养板, 培养 24h 换液。BMSCs 加入 0.5 mL DMEM/F12 完全培养基覆盖细胞; BMSCs-GFP 加入 0.5 mL 人脑脊液覆盖细胞; 放入 37℃、5%CO₂ 培养箱中继续培养 3 d。

1.2.8 Western blot 检测神经细胞标记物蛋白的表达 收集细胞加入 RIPA 缓冲液裂解、变性、离心、收集蛋白。根据 Bradford 法对蛋白进行定量分析。加热变性, SDS- 丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 以含 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗 4℃孵育 12 h, TBST 洗膜后加入二抗孵育 1 h, TBST 洗膜后进行曝光显影, 用 Image J 软件分析并求出相应灰度值。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 分离培养与鉴定

倒置相差显微镜下观察发现, 原代细胞接种 12h 后开始贴壁, 贴壁细胞呈长梭型, 培养 6d 左右, 细胞胞体变大呈典型纤维细胞样, 大量细胞向外放射状生长。原代细胞培养 9~10d 各集落逐渐融合到 80%, 经过 3~4 次传代, BMSCs 增殖速度明显加快, 形态均一(见图 1)。

2.2 Lentivirus-GFP 转染 BMSCs

倒置荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞百分比, 结果显示 MOI 为 5、10、30 和 50 时的转染效率分别为 25.6%、57.4%、94.7%和 95.1%, 见图 2-1。当 MOI 为 30, 转染效率较高, 细胞生长速度快, 且对 BMSCs 细胞形态无明显影响, 因此本研究选定最佳 MOI 为 30, 见图 2-2。

2.3 BMSCs-GFP 流式细胞仪检测细胞表面标记

流式细胞仪检测结果表明 BMSCs-GFP 表达 CD29、CD90 的阳性率分别为 96.5%和 95.2%, 表达造血干细胞标记物 CD54、CD45 阳性率分别为 1.9%和 3.8%, 符合 BMSCs 特征, 见图 3。

2.4 BMSCs-GFP 细胞增殖状态检测

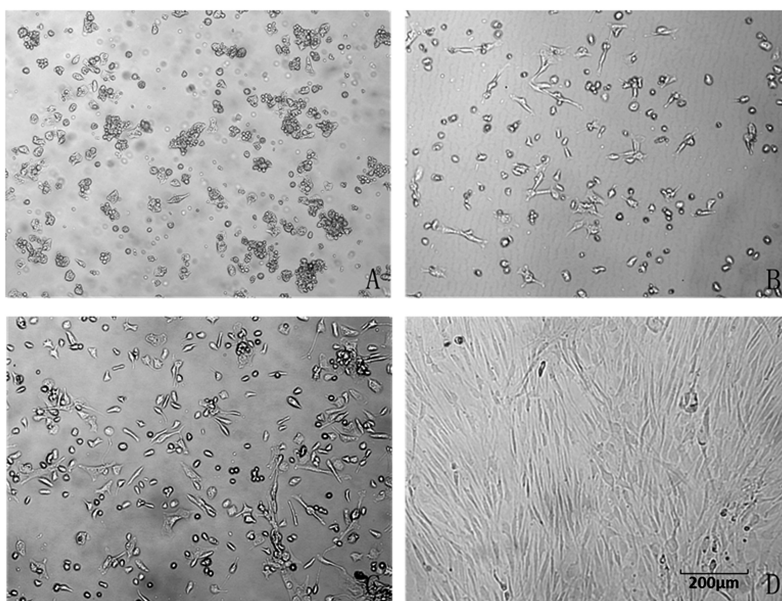
CCK8 检测结果显示 BMSCs-GFP 细胞增殖活性与未转染的 BMSCs 增殖活性相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明慢病毒转染对细胞的增殖活性无影响, 见图 4。

2.5 人脑脊液诱导 BMSCs-GFP 后神经细胞标记物蛋白表达

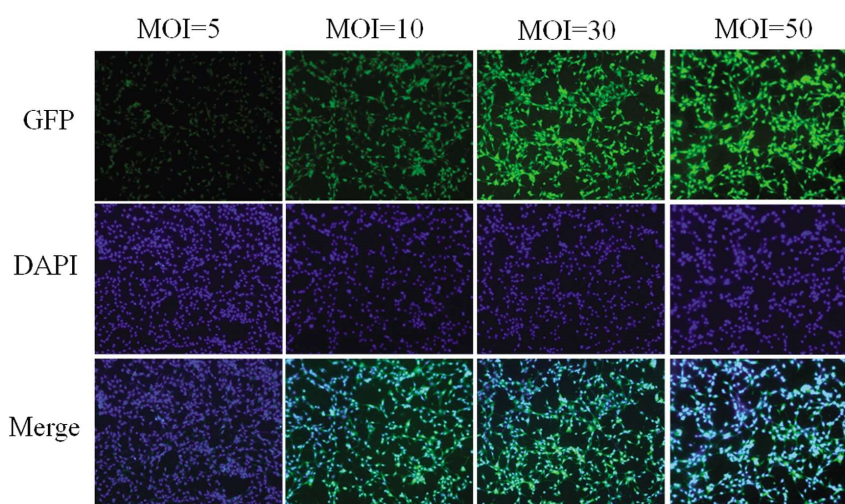
Western blot 检测显示 BMSCs-GFP 体外经人脑脊液诱导后细胞 MAP-2 和 Nestin 的表达显著高于 BMSCs, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (见图 5-1, 5-2)。

3 讨论

骨髓间充质干细胞为一种来源于中胚层的干细胞, 具有跨胚层分化为各类型细胞的能力, 因其可以向神经细胞分化, 故在治疗中枢系统疾病中具有重要意义。骨髓间充质干细胞治疗神经损伤的机制包括能够分化为神经元样细胞、促进轴突再

图 1 BMSCs 培养第 3 天、6 天、9 天及 P3 代细胞贴壁生长图($\times 100$)Fig.1 Primary BMSCs cultured for 3 days,6 days, 9 days and the third passage (P3) of BMSCs($\times 100$)

A: 3d BMSCs B: 6d BMSCs C: 9d BMSCs D: P3 BMSCs

图 2-1 不同 MOI 值感染 BMSCs 96h 后 GFP 表达情况($\times 100$)Fig.2-1 Expression of GFP in BMSCs infected with different MOI values for 96 hours($\times 100$)

生、营养神经及减轻炎症反应的作用。我们前期研究表明,侧脑室注射法移植 BMSCs 对大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤有显著的保护作用,显著改善动物的神经行为学指标和神经功能。研究表明,早期应用骨髓间充质干细胞治疗小鼠脊髓损伤,可抑制疼痛相关信号级联并可抑制脊髓横断损伤后胶质瘢痕形成,促进轴突再生和功能恢复^[12-14]。但骨髓间充质干细胞向神经细胞分化效率低,迁移和存活率低,这就意味着细胞移植在体内的定向趋化、定植分布和生存是干细胞治疗研究的一项重要内容^[15]。然而,BMSCs 缺少有效的特异性标记,如何对组织工程应用的 BMSCs 进行追踪观察,以探讨其在体内的生物学行为是目前的研究重点。因此寻找一种稳定高效的示踪标记物进行 BMSCs 活细胞追踪显得至关重要。本研究探索出慢病毒的高转染效率,转染 BMSCs-GFP,探究 BMSCs 向神经细胞高效率转化的实验方法,为临床中枢神经损伤和脊髓损伤提供新的种子细胞。

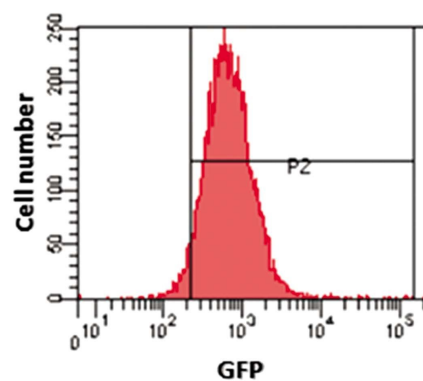


图 2-2 MOI 值为 30 时流式细胞术检测慢病毒转染效率

Fig.2-2 The transfection efficiency of lentivirus was detected by flow cytometry when MOI was 30

目前,细胞转染主要包括非病毒介导的转染和以病毒介导的外源基因转染。非病毒载体的转染中较多应用脂质体或电穿

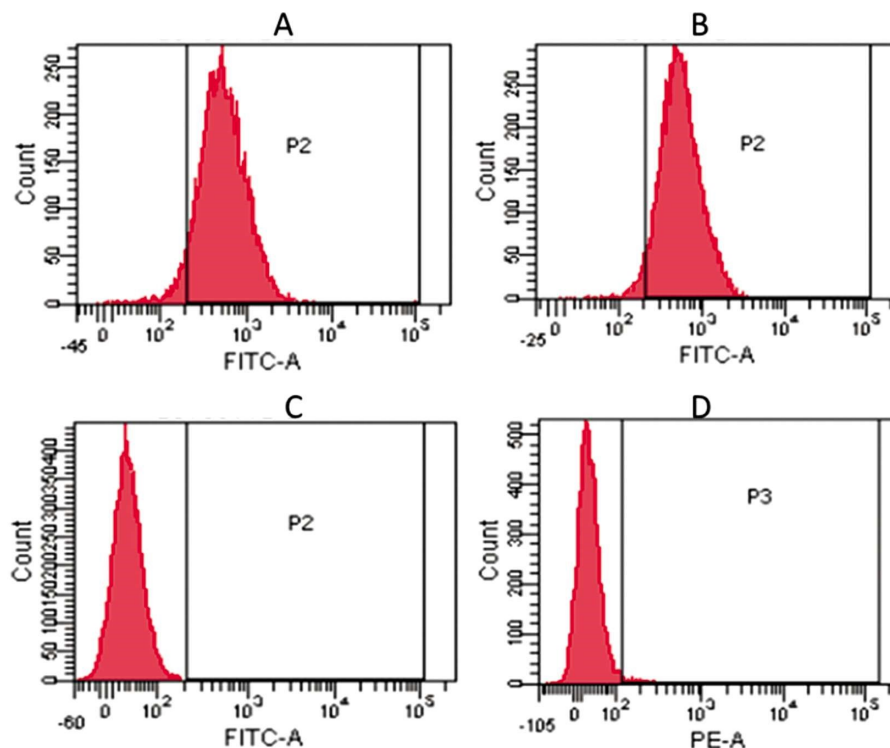


图 3 BMSCs-GFP 表面标志物流式细胞仪分析结果
Fig.3 Flow cytometry analysis of BMSCs GFP surface markers
A:CD29 B:CD54 C:CD90 D:CD45

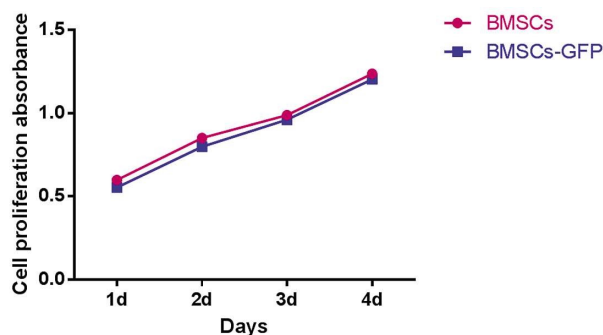


图 4 CCK8 法检测 GFP 转染 BMSCs 增殖活力
Fig.4 CCK8 method was used to detect the proliferation activity of GFP transfected BMSCs

Note: compared with the BMSCs group, $P > 0.05$.

孔法,但脂质体和电穿孔对细胞毒性较大,较常用于悬浮细胞,且对干细胞转染效率较低^[16]。病毒载体目前有逆转录病毒载体、腺病毒载体和慢病毒载体。慢病毒属于逆转录病毒的一种,为非致癌性病毒,可以高效感染处于分裂期和非分裂期的细胞,可将外源基因高效整合进宿主细胞基因组中,使基因持久稳定的在体内较表达,且免疫反应小,安全性较好。慢病毒与其他病毒载体相比较有着高效的转染率,尤其对难转染细胞,如原代细胞、干细胞,有研究表明慢病毒对 BMSCs 的具有更高的优越性^[17],显著高于腺病毒转染效率,成为当前转基因载体研究的热点^[18-23]。GFP 是一种从水母体内分离得到的生物发光蛋白,在蓝色波长范围的光线激发下,会发出绿色荧光,具有高度特异性、性质稳定、无细胞毒性的特点,作为一种新型的报告基

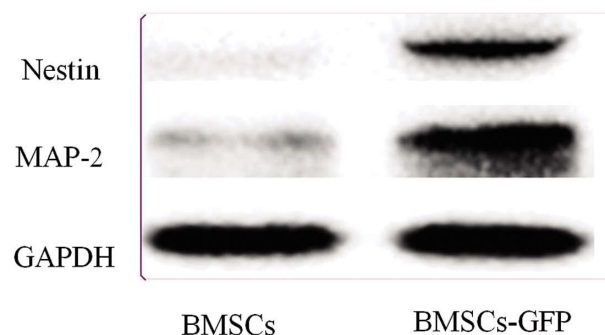


图 5-1 Western blot 检测细胞在诱导 3d 时神经细胞标记物的表达
Fig.5-1 Western blot was used to detect the expression of neural cell markers after 3 days transfection

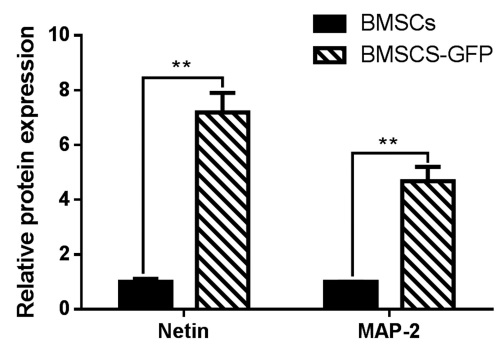


图 5-2 各组细胞在感染 3d 神经细胞标记物蛋白表达灰度分析图
Fig.5-2 Gray scale analysis of neural cell marker protein expression in each group after 3 days transfection

Note: compared with the BMSCs group, $**P < 0.01$ ($n=3$).

因能与目的基因相融合,通过载体转染入细胞表达,可在细胞或活体内示踪标记目的蛋白^[24],因此近年来已作为报告基因或标记分子被广泛应用于活体组织和细胞学的检测^[25,26]。

基于以上特点,本实验选用慢病毒 Lentivirus 作为载体,GFP 作为报告基因,观察 Lentivirus-GFP 对大鼠 BMSCs 的转染效率,结果显示,随着 MOI 值的增加,GFP 表达也增强。以 30 MOI 感染 P3 代 BMSCs,96h 后 GFP 阳性细胞率可达 94.7%,同时流式细胞检测结果显示转染 Lentivirus-GFP 后其对细胞表型亦无影响。虽然 50 MOI 时感染效率有所提高,但效果不甚明显,且转染过程中需要使用更多的阳离子聚合物聚凝胺(Polybrene)来提高慢病毒载体的转染效率,而过多的使用 Polybrene 可导致 BMSCs 增殖率降低,在满足实验要求的前提下,应尽可能减少慢病毒的使用量^[27],因此选择对细胞毒性小效果好的 30MOI 作为本实验的最适 MOI 值。且本研究中采用 30MOI 的病毒浓度时转染效率已达 90%以上,比常用的 100MOI 低,细胞毒性小,转染后细胞活力正常,CCK8 结果表明,Lentivirus-GFP 转染 BMSCs 后不影响细胞的增殖活性。

神经前体细胞表面标志有巢蛋白(Nestin)、多唾液酸神经节苷脂(A2B5)、半乳糖脑苷脂(GC)等,神经元细胞表面标志有神经元核抗原(NeuN)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、微管结合蛋白 2(MAP-2)等,神经胶质细胞表面标志有星形胶质原性蛋白(S100 β)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)。Nestin^[28]主要分布于细胞质,表达于未分化、具有分裂能力的细胞中。在中枢神经系统发育过程中,胚胎早期的神经上皮即有 Nestin 表达,出生后表达即停止,故在哺乳动物的中枢神经系统,Nestin 是中枢神经系统发育过程中神经前体细胞的标志^[29],发育成熟的神经系统 Nestin 表达降低。微管结合蛋白 2(MAP-2)是一种热稳定的磷蛋白,属于结构性微管相关蛋白家族的一员,主要表达于神经元细胞胞体、树突、树突棘和突触后密度中^[30,31],是大脑中枢神经系统主要表达含量丰富的蛋白之一。MAP-2 还可通过细胞骨架连接一些信号蛋白或膜受体的突触后膜,促进微管形成、保持微管稳定、诱导微管成束,还可参与神经元发育、突起形成和生长、轴突和树突的细胞器运输、稳定结构、传导信号等。本实验选用 Nestin 和 MAP-2 作为神经细胞表面标志的检测指标,创新性的使用人脑脊液诱导 BMSCs-GFP 体外成神经分化,Western blot 结果显示诱导后的细胞能有效表达神经细胞表面标记物 MAP-2 和 Nestin,表明 BMSCs-GFP 仍具有分化潜能,可向神经元样细胞分化,且可能形成神经突触,转染 Lentivirus-GFP 对 BMSCs 分化能力无明显影响,可作为转基因研究中的理想转染介质。

综上所述,Lentivirus-GFP 可高效感染大鼠 BMSCs,且对细胞表型、细胞活性和分化潜能无影响,使用人脑脊液诱导仍可使其成神经分化,是一种有效的细胞示踪方法,从而为后续进行携带外源性基因的功能研究及体内生物学行为观察奠定了坚实的基础,为中枢神经系统疾病的干细胞治疗提供新策略。但骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞是否具有神经传递功能及具体机制尚不足够清楚,需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Sanjurjo-Rodríguez C, Martínez-Sánchez AH, Hermida-Gómez T, et al. Differentiation of human mesenchymal stromal cells cultured on collagen sponges for cartilage repair [J]. Histology and histopathology, 2016, 31(11): 1221-39
- [2] Mead B, Logan A, Berry M, et al. Concise Review: Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair[J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2017, 35(1): 61-7
- [3] Aquino-Mart NEZ R, Angelo A P, Pujol F V. Calcium-containing scaffolds induce bone regeneration by regulating mesenchymal stem cell differentiation and migration [J]. Stem cell research & therapy, 2017, 8(1): 265
- [4] Mostafa Soleimannejad, Somayeh Ebrahimi-Barough, Masoud Soleimani, et al. Fibrin gel as a scaffold for photoreceptor cells differentiation from conjunctiva mesenchymal stem cells in retina tissue engineering[J]. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2018, 46(4): 805-14
- [5] Ritfeld G J, Nandoe Tewarie R D, Vajn K, et al. Bone marrow stromal cell-mediated tissue sparing enhances functional repair after spinal cord contusion in adult rats [J]. Cell transplantation, 2012, 21 (7): 1561-75
- [6] Xu L, Wang Q, Xu F, et al. Mesenchymal stem cells downregulate articular chondrocyte differentiation in noncontact coculture systems: implications in cartilage tissue regeneration [J]. Stem cells and development, 2013, 22(11): 1657-69
- [7] Yan J, Tie G, Xu T Y, et al. Mesenchymal stem cells as a treatment for peripheral arterial disease: current status and potential impact of type II diabetes on their therapeutic efficacy[J]. Stem cell reviews, 2013, 9 (3): 360-72
- [8] Brown C, Mckee C, Bakshi S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential [J]. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2019, 13(9): 1738-55
- [9] Ye Y, Feng T T, Peng Y R, et al. The treatment of spinal cord injury in rats using bone marrow-derived neural-like cells induced by cerebrospinal fluid[J]. Neuroscience letters, 2018, 666: 85-91
- [10] Ye Y, Zeng Y M, Wan M R, et al. Induction of human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neural-like cells using cerebrospinal fluid[J]. Cell biochemistry and biophysics, 2011, 59(3): 179-84
- [11] 叶英, 谢熙, 刘筱, 等. 脑脊液诱导的骨髓源性神经样细胞移植的安全性研究[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2015, 6: 521-5
- [12] Watanabe S, Uchida K, Nakajima H, et al. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment [J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2015, 33(6): 1902-14
- [13] Okuda A, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, et al. Bone marrow stromal cell sheets may promote axonal regeneration and functional recovery with suppression of glial scar formation after spinal cord transection injury in rats[J]. Journal of neurosurgery Spine, 2017, 26(3): 388-95
- [14] Ruzicka J, Machova-Urdzikova L, Gillick J, et al. A Comparative Study of Three Different Types of Stem Cells for Treatment of Rat Spinal Cord Injury[J]. Cell transplantation, 2017, 26(4): 585-603
- [15] Salem H K, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status [J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2010, 28(3): 585-96

- pathway is required for inflammation and cell death induced by cerulein in A R42J cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(4): 1770-1777
- [9] Guan X, Wang Q, Liu M, et al. Possible Involvement of the IL-6/JAK2/STAT3 Pathway in the Hypothalamus in Depressive-Like Behavior of Rats Exposed to Chronic Mild Stress [J]. *Neuropsychobiology*, 2020, 1-9
- [10] Lee B, Sur B, Yeom M, et al. Gastrodin reversed the traumatic stress-induced depressed-like symptoms in rats [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(4): 749-759
- [11] Zhang R, Peng Z, Wang H, et al. Gastrodin ameliorates depressive-like behaviors and up-regulates the expression of BDNF in the hippocampus and hippocampal-derived astrocyte of rats [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(1): 172-179
- [12] Yang L, Chen H, Wang D, et al. PDTC Alleviates Depressive Symptoms and Colon Tissue Injury via Inhibiting NO Overproduction in CUMS Rats[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1327
- [13] Huang Y L, Zeng N X, Chen J, et al. Dynamic changes of behaviors, dentate gyrus neurogenesis and hippocampal miR-124 expression in rats with depression induced by chronic unpredictable mild stress[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(6): 1150-1159
- [14] Antoniuk S, Bijata M, Ponimaskin E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101-116
- [15] Zhong X, Li G, Qiu F, et al. Paeoniflorin Ameliorates Chronic Stress-Induced Depression-Like Behaviors and Neuronal Damages in Rats via Activation of the ERK-CREB Pathway[J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9: 772
- [16] Wang H, Zhang R, Qiao Y, et al. Gastrodin ameliorates depression-like behaviors and up-regulates proliferation of hippocampal-derived neural stem cells in rats: involvement of its anti-inflammatory action [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 266: 153-160
- [17] 孟松, 周耀柱, 马永超, 等. 龙胆苦苷对人胰腺癌细胞 PANC-1 凋亡及 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路的影响 [J]. *中国药房*, 2020, 31(15): 1836-1841
- [18] Huang C, Ma R, Sun S, et al. JAK2-STAT3 signaling pathway mediates thrombin-induced proinflammatory actions of microglia in vitro[J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 204(1-2): 118-125
- [19] Micheli L, Ceccarelli M, D'Andrea G, et al. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise[J]. *Brain Res Bull*, 2018, 143: 181-193
- [20] Treadway M T, Waskom M L, Dillon D G, et al. Illness progression, recent stress, and morphometry of hippocampal subfields and medial prefrontal cortex in major depression[J]. *Biol Psychiatry*, 2015, 77(3): 285-294
- [21] Seo J S, Wei J, Qin L, et al. Cellular and molecular basis for stress-induced depression[J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(10): 1440-1447

(上接第 3621 页)

- [16] Seo S J, Kim T H, Choi S J, et al. Gene delivery techniques for adult stem cell-based regenerative therapy [J]. *Nanomedicine (London, England)*, 2013, 8(11): 1875-91
- [17] 苏玉金, 赵育梅, 顾漪. 腺相关病毒及慢病毒载体对骨髓间充质干细胞基因转染效率的比较 [J]. *中国康复理论与实践*, 2014, 12: 1117-21
- [18] Seo J H, Jeong E S, Choi Y K. Therapeutic effects of lentivirus-mediated shRNA targeting of cyclin D1 in human gastric cancer [J]. *BMC cancer*, 2014, 14(175)
- [19] Jiang G L, Wang F, Lin F, et al. Lentivirus-mediated overexpression of TGF-beta inducible early gene 1 inhibits SW1990 pancreatic cancer cell growth [J]. *Cell biology international*, 2011, 35(9): 891-6
- [20] Jiaong W, Shuang L, Hongjuan P, et al. Lentivirus vectors mediated eGFP transfected into rat ovary in vivo [J]. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, 2013, 40(1): 101-5
- [21] Dreyer J L. Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions [J]. *Molecular biotechnology*, 2011, 47(2): 169-87
- [22] Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential [J]. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 2010, 58(2): 107-19
- [23] Matrai J, Chuah M K, Vandendriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications[J]. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2010, 18(3): 477-90
- [24] 管小俊, 宋琳, 郭雪君, 等. 携带绿色荧光蛋白基因慢病毒转染的大鼠骨髓间充质干细胞的干细胞特性检测[J]. *诊断学理论与实践*, 2011, 10(6): 527-30
- [25] Xiong T, Li Y, Li Z, et al. In vivo monitoring the process of tumor growth, metastasis and bacterial infection expressing GFP via real-time optical imaging [J]. *Journal of biomedical nanotechnology*, 2013, 9(2): 274-80
- [26] Sahni G, Gopinath P, Jeevanandam P. A novel thermal decomposition approach to synthesize hydroxyapatite-silver nanocomposites and their antibacterial action against GFP-expressing antibiotic resistant *E. coli*[J]. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 2013, 103: 441-7
- [27] Thrasher A J. Progress in lentiviral vector technologies [J]. *Human gene therapy*, 2013, 24(2): 117-8
- [28] Lendahl U, Zimmerman L B, McKay R D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. *Cell*, 1990, 60(4): 585-95
- [29] Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells[J]. *Cancer Science*, 2015, 106(7): 803-11
- [30] Berezikov E, Guryev V, Van DE Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 21-4
- [31] Joseph M, Das M, Kanji S, et al. Retention of stemness and vasculogenic potential of human umbilical cord blood stem cells after repeated expansions on PES-nanofiber matrices [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(30): 8566-75