

·基础研究·

HGF与 CTLA-4Ig 双基因修饰增强脐带间充质干细胞的免疫抑制和促增殖作用

刘剑戎, 杨 扬, 张英才, 杨 卿, 潘国政, 台 艳, 陈规划, 张 琪*
(中山大学附属第三医院肝移植中心//广东省肝脏疾病研究重点实验室, 广东 广州 510630)

摘 要:【目的】探讨人脐带间充质干细胞(hUCMSC)经肝细胞生长因子(HGF)和细胞毒性 T 细胞相关抗原 4 免疫球蛋白(CTLA4-Ig)双基因修饰后免疫调节能力的变化及其促进肝细胞增殖作用的影响。【方法】酶联合消化法提取并鉴定人脐带间充质干细胞;对照组的 hUCMSC 转染携带绿色荧光蛋白(EGFP)基因的 Ad5-EGFP,实验组的 hUCMSC 转染携带 HGF 和 CTLA-4Ig 双基因的腺病毒 Ad5-HGF/CTLA-4Ig。流式细胞仪检测对照组 hUCMSC 转染 Ad5-EGFP 后 72 h 表达 EGFP 细胞比率;实验组 Ad5-HGF/CTLA-4Ig 转染 hUCMSC 72 h 后,CCK8 检测细胞存活率,同时再次检测 hUCMSC 免疫表型和向成骨细胞分化的能力,ELISA 检测细胞上清中 HGF 含量,Western blot 检测细胞中 CTLA4-Ig 蛋白的表达水平,通过 CCK8 法检测双基因修饰后 hUCMSC 对淋巴细胞增殖的影响及其上清对 L02 细胞增殖的影响。【结果】携带外源基因的腺病毒可有效转染 hUCMSC,不影响其干细胞特性和多向分化能力,经 HGF/CTLA-4Ig 基因修饰 hUCMSC 可分泌高浓度 HGF 并高表达 CTLA-4Ig,同时能有效地抑制淋巴细胞增殖,其上清能明显促进肝细胞增殖。【结论】hUCMSC 经 HGF/CTLA-4Ig 基因修饰后生物学特性无明显改变,并能高表达 HGF 和 CTLA-4Ig,其免疫调节及促进肝细胞增殖的能力进一步加强,为肝移植术后存在的肝细胞损伤的保护治疗提供了新思路。

关键词: 间充质干细胞;脐带;人肝细胞生长因子;细胞毒性 T 细胞相关抗原 4 免疫球蛋白;免疫耐受

中图分类号: R392 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)06-0709-07

Enhanced Immunomodulatory and Pro-proliferation Properties of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Modified by HGF-gene and CTLA-4Ig-gene

LIU Jian-rong, YANG Yang, ZHANG Ying-cai, YANG Qin, PAN Guo-zheng, TAI Yan, CHEN Gui-hua, ZHANG Qi*
(Department of Liver Transplantation, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To determine whether the human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSC) transfected with adenovirus carrying hepatocyte growth factor (HGF) and cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 immunoglobulin (CTLA-4Ig) genes still preserve immunosuppressive function as well as pro-proliferation activity. 【Methods】 hUCMSC were isolated from Wharton's Jelly tissue by combined enzymatic digestion and identified by immunophenotype and differentiation capacity analysis. The hUCMSC in experimental group were transfected by adenovirus-5 carrying HGF and CTLA4-Ig genes (Ad5-HGF/CTLA-4Ig) and the hUCMSC in control group were transfected by adenovirus-5 containing EGFP gene (Ad5-EGFP). Expression of EGFP and cell survival rate of hUCMSC transfected with Ad5-EGFP and Ad5-HGF/CTLA-4Ig were tested by Fluorescence Activating Cell Sorter and CCK8. Then the immunophenotype and differentiation capacity of hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) were further tested after adenoviruses transfection. The expression of HGF and CTLA-4Ig was assessed by ELISA and Western blot 72 h after hUCMSC adenoviral transfection. The proliferation ability of L02 cell by the condition medium of hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) and the suppression to T lymphocyte proliferation by hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) were tested by CCK8 analysis. 【Results】 The double genes modified hUCMSC preserved the same immunophenotype and differentiation capacity as un-transfected hUCMSC. The expression of HGF and CTA-4Ig genes in hUCMSC transfected with Ad5-HGF/CTLA-4Ig could be detected 72h after transfection. Proliferation test showed that the condition

收稿日期:2012-02-27

基金项目:国家自然科学基金联合重点项目(U0932006);国家自然科学基金(30972915,81170451);广东省自然科学基金重点项目(9251008901000020);广东省科技计划项目(2009A030200006, 2011B031800103, 2010B050700003);广东省科技计划面上项目(10151008901000208);广州市科技计划项目(2010J-E121);中山大学校级基金(10ykjc03)

作者简介:刘剑戎,硕士研究生,研究方向:肝移植临床与基础, E-mail: douchong2004@126.com; *通信作者:张琪,教授,硕士生导师, E-mail: keekee77@126.com

medium of hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) can significant improve the proliferation of L02 cell. When co-cultured with hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig), the T lymphocyte proliferation was inhibited and the inhibition rate was hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) dosage-dependent. 【Conclusion】 hUCMSC modified by Ad5-HGF/CTLA-4Ig have the same immunophenotype and differentiation capacity as those untransfected cells. The hUCMSC transfect with HGF/CTLA-4Ig genes can efficiently suppress the proliferation of T cells but promote L02 proliferation by HGF and CTA-4Ig expression.

Key words: mesenchymal stem cells (hUCMSC); human umbilical cord; hepatocyte growth factor (HGF); cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 immunoglobulin (CTLA4-Ig); immune tolerance

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6): 709-715]

缺血再灌注损伤和免疫排斥反应导致的肝移植术后移植肝功能不全是肝移植患者预后不良的主要影响因素, 严重影响了活体肝移植以及小体积肝移植的进一步发展。免疫抑制剂的广泛应用推动了肝脏移植的发展, 但长期应用免疫抑制剂引起的多种毒副作用^[1]以及高昂的药物费用成为肝脏移植进一步发展的一大瓶颈。随着干细胞转化应用和基因治疗技术的日臻成熟, 采用病毒或非病毒载体将保护基因转移移植, 以期同时减轻缺血再灌注损伤和免疫排斥反应已经成为目前研究的热点, 其中选择合适的治疗基因和载体是影响基因治疗成功的重要因素^[1]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是来源于发育早期的中胚层和外胚层的成体干细胞, 它不仅具有多向分化和自我复制的生物学特性^[2-3]。而且还具有较强的免疫抑制特性, 体内外能抑制淋巴细胞增殖^[4-5]降低免疫反应并可促进细胞增殖以及损伤组织的修复^[6-7]。近期研究表明, MSC 可被外源基因修饰, 高效表达转入的目的基因, 成为组织工程学中良好的种子细胞。人肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是目前公认的促进肝脏再生的细胞因子, 它可以促进肝细胞 DNA、肝脏蛋白质的合成, 促进肝细胞增殖^[8-9]。细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 免疫球蛋白(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 immunoglobulin, CTLA-4Ig)是 Linsley 等于 1991 年用 CTLA-4 胞外段与人 IgG 恒定区重组合成的融合蛋白, 它能与 B7 特异性的结合并产生强烈的抑制信号^[10], 终止 T 细胞的增殖与活化, 进而抑制 T 细胞依赖的免疫反应。本研究中我们通过腺病毒将 HGF 和 CTLA-4Ig 转染人脐带间充质干细胞(Human umbilical cord mesenchymal stem cell, hUCMSC), 检测其生物学特性的改变, 旨在构建高表达 HGF、CTLA-4Ig 的 hUCMSC, 增强其免疫调节和损伤修复能力, 以期同时解决肝移植术后存在的肝细胞

损伤和免疫排斥问题, 以更有效地保护移植肝, 进一步提高肝移植的预后。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞与主要试剂

携带 HGF/hCTLA-4Ig、EGFP 基因的 Ad5 型腺病毒(由上海医元生物有限公司协助构建合成); 肝细胞(L02); LG-DMEM 培养基, 胎牛血清(FBS), MesenPro RSTM 培养基, I 型胶原酶购自美国 Invitrogen 公司; 透明质酸酶购自美国 Sigma 公司; 鼠抗兔 CTLA-4 抗体, 兔抗鼠二抗购自美国 RD 公司; 蛋白提取试剂盒, 蛋白定量试剂盒, HGF 试剂盒购自南京凯基公司; Human regulatory T cell staining Kit 购自美国 eBioscience 公司; CCK8 试剂盒购自上海同仁公司; CD44-FITC, CD73-PE, CD166-PE BD 购自美国 Pharmingen 公司; CD34-FITC, HLA-DR-FITC, CD29-FITC, CD31-FITC BD 购自美国 Bioscience 公司; CD90-FITC, CD105-PE, CD45FITC 购自美国 Biologend 公司。

1.2 细胞的分离与培养

1.2.1 hUCMSC 的提取 健康足月剖宫产胎儿脐带标本取自我院妇产科(产妇术前签署了知情同意书, 同意并自愿将胎盘、脐带等分娩废弃物交由医院处理或供科研所用)。酶联合消化法^[11]提取 hUCMSC, 原代细胞生长至 80% 融合时, 0.25% 胰酶消化, 按 1:3 传代。按此方法传代扩增。取生长状态良好的第 3-5 代细胞用于实验。BD FACSCalibur 流式细胞仪检测 hUCMSC 免疫表型, 通过成脂、成骨分化实验鉴定其多向分化潜能。

1.2.2 外周血淋巴细胞(PBMC)的提取 取健康自愿者外周血 50 mL, Ficoll 液密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞(PBMC), 洗涤后用含体积分数 10% 的 FBS 的 RPMI1640 将细胞重悬备用。

1.3 腺病毒转染 hUCMSC

1.3.1 病毒转染 hUCMSC 最佳 MOI 值 hUCMSC 以 1×10^5 /孔铺于 24 孔板, 分别按 MOI = 0、100、500、800、1 000 加入 Ad5-EGFP。荧光显微镜下连续观察细胞 EGFP 蛋白的表达, BD FACSCalibur 流式细胞仪检测 72 h 后 EGFP 阳性细胞率。hUCMSC 以 1×10^5 /孔铺于 24 孔板, 分别按 MOI = 0、100、500、800、1 000 加入 Ad5-HGF/CTLA-4Ig, 温箱孵育 72 h 后用 CCK8 法进行细胞染色, Biotek 酶标仪检测细胞 450 nm 处吸光度 D 值。

1.3.2 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 细胞中 HGF 的表达 hUCMSC 以 1×10^5 /孔铺于 24 孔板, 按 MOI = 800 实验组加入 Ad5-HGF/CTLA-4Ig, EGFP 组加入 Ad5-EGFP, 空白对照组不加病毒。72 h 后收取细胞培养上清, 按 HGF ELISA 试剂盒推荐方法进行 HGF 浓度的检测。

1.3.3 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 细胞中 CTLA-4Ig 的表达 hUCMSC 以 2×10^5 /孔铺于 6 孔板, A 组加入 Ad5-HGF/CTLA-4Ig; B 组加入 Ad5-EGFP; C 组不加病毒。72 h 后根据蛋白提取试剂盒中步骤提取细胞总蛋白, 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。进行不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 再用半干式转印的方法将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 经鼠来源抗 CTLA-4 一抗和辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠二抗孵育, ECL 化学发光液孵育 1 min, 暗室自显影, 用 β -actin 作为内参, 用 Imager scanner III 软件对胶片扫描分析。

1.3.4 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 细胞免疫表型及成骨分化能力的检测 调整 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 以 1×10^5 个/流式管, 分别加入 FITC 标记的 CD45、CD31、HLA-DR、CD29、CD90, PE 标记的 CD105、CD73 各 5 μ L, 室温避光孵育 30 min, 洗涤后再以 200 μ L PBS 重悬, BD FACSCalibur 流式细胞仪检测。hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 以 1×10^5 /孔铺于 24 孔板, 贴壁后更换成骨诱导培养基, 每隔 2 d 更换新鲜培养基, 连续培养 14 d 后 95% 乙醇固定 10 min, PBS 洗涤后 0.1% 茜素红染色 30 min, 镜下观察并拍照。

1.4 基因修饰后 hUCMSC 功能的检测

1.4.1 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 细胞对 L02 细胞增殖的影响 取 hUCMSC (EGFP)、hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 和 hUCMSC, 分别以 2×10^5 /孔

铺于 6 孔板, 贴壁后更换为不含血清的 RPMI1640, 温箱孵育 72 h 收取上清备用。L02 细胞以 1×10^4 /孔铺于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 每组 3 个复孔, 细胞贴壁后更换不同条件培养基: A 组 RPMI1640 100 μ L; B 组 RPMI1640 50 μ L + hUCMSC 上清 50 μ L; C 组 RPMI1640 50 μ L + hUCMSC (EGFP) 上清 50 μ L; D 组 RPMI1640 50 μ L + hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 上清 50 μ L。培养 12 h 后 CCK8 法行细胞染色, Biotek 酶标仪检测检测细胞 450 nm 处吸光度 D 值。

1.4.2 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 细胞对淋巴细胞增殖的影响 不同细胞铺于 96 孔板, 每组 3 个复孔, A 组空白; B 组 hUCMSC 1×10^4 个/孔; C 组 hUCMSC (EGFP) 1×10^4 个/孔; D 组 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 1×10^4 个/孔; E 组 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 5×10^3 个/孔。贴壁后以 25 μ g/mL 的撕裂霉素处理 30 min, 各组均加入 PBMC 细胞悬液 1×10^5 个/孔, PHA 浓度为 1 μ g/mL, 72 h 后 CCK8 法行细胞染色, Biotek 酶标仪检测细胞 450 nm 处 D 值, 计算间充质干细胞对淋巴细胞的抑制率。

1.5 统计分析

采用 SPSS 16.0 统计学软件分析数据, 统计学数据采用均数 \pm 标准差表示, 用单因素方差分析对资料进行统计。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 人脐带间充质干细胞的提取和鉴定

本实验经酶联合消化法提取原代细胞, 倒置显微镜下可见贴壁细胞形态呈梭形, 整体呈漩涡状生长。经流式细胞仪鉴定与文献报道间充质干细胞免疫表型相符 (图 1A), 并可诱导成骨细胞 (图 1B)、脂肪 (图 1C) 分化鉴定为脐带间充质干细胞。

2.2 腺病毒转染 hUCMSC 的最佳 MOI 值

hUCMSC 经 Ad5-EGFP 转染 72 h, 荧光显微镜下观察细胞出现明显荧光, 荧光强度随着 MOI 值增加而不断加强 (图 2A、B), 流式检测发现在 MOI 值 = 800、1 000 时 EGFP 细胞阳性率分别为 85% 和 92% (图 2C), 说明重组腺病毒可有效感染 hUCMSC。Ad5-HGF/CTLA-4Ig 转染 hUCMSC 后, 设未转染组即 MOI 值为 0 时病毒转染组细胞存活率为 100%, 则在 MOI = 100 时细胞存活率为

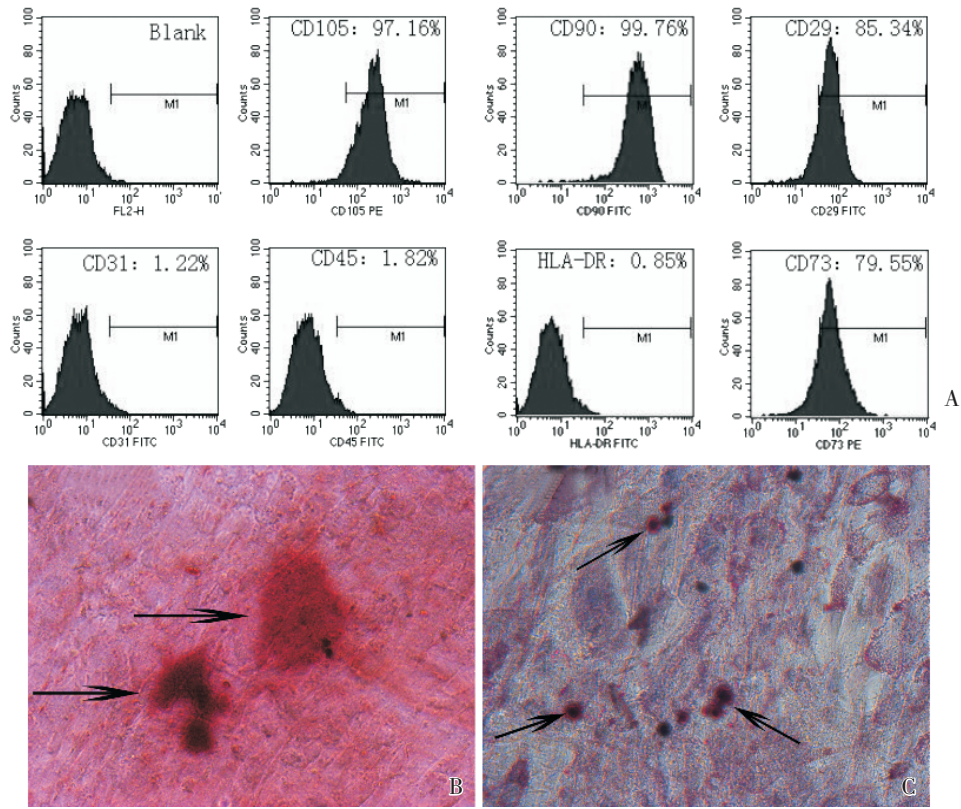


图 1 人脐带间充质干细胞镜下形态、免疫表型以及诱导分化结果

Fig.1 Immunophenotype and differentiation capacity of hUCMSC

A: The immunophenotype of hUCMSC; B: In osteogenic differentiation of hUCMSC, calcium deposition was observed by Alizarin red stain (black arrow), × 200; C: In adipogenic differentiation of hUCMSC, lipid vacuoles (purple) in the adipocytes were stained with Oil Red O (black arrows), × 200

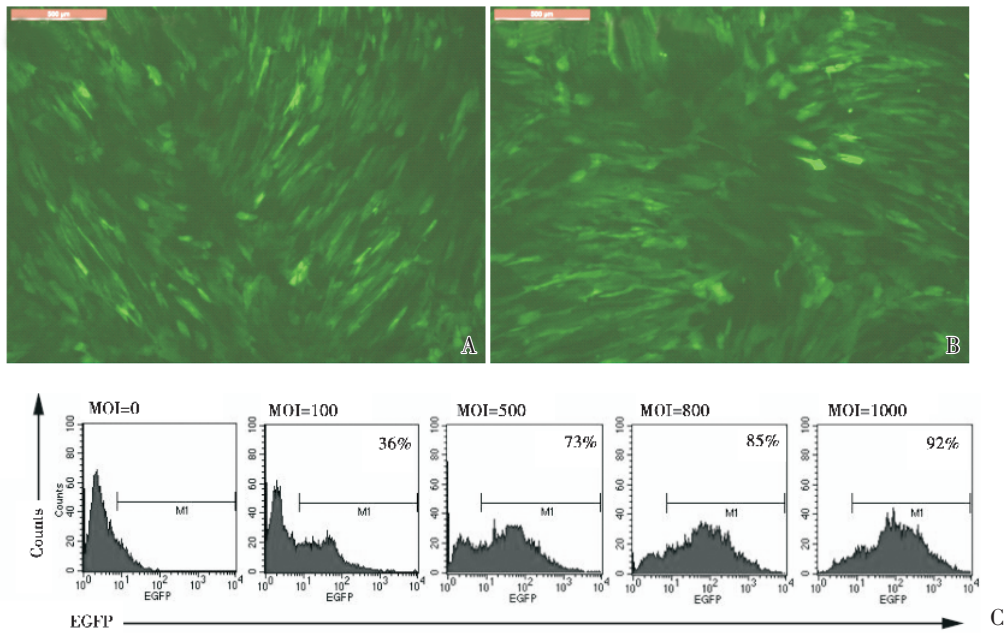


图 2 不同 MOI 值转染 72 h 后 hUCMSC 中 EGFP 表达情况

Fig.2 Detection of EGFP-positive cells at 72 h after hUCMSC were transfected with Ad5-EGFP at different MOIs

A, B: Morphology of hUCMSC under fluorescence microscope after transfection (MOI = 800, MOI = 1000) 72 h, × 200; C: Expression of EGFP at 72 h after hUCMSC were transfected with Ad5-EGFP at different MOIs.

90.02%低于未转染组,随着MOI值逐渐增加,细胞存活率升高,在MOI值为800时存活率可达139.2%明显高于未转染组($P < 0.05$),当MOI值=1000时细胞存活率为137.9%(图3),提示病毒转染对细胞造成损伤,随着MOI增大,HGF表达增强,并逐渐表现出对细胞的保护并促进细胞增殖,从而出现细胞存活率升高,在MOI值=800时这种保护作用效果最佳,进一步升高MOI值对细胞存活率无明显影响。

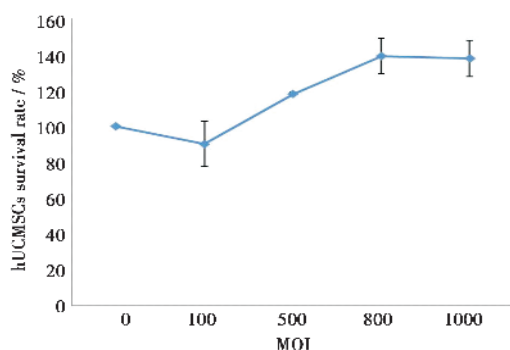


图3 hUCMSC经病毒转染后72h存活率

Fig.3 The survival rate of hUCMSC 72 h after adenovirus transfection

2.3 hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)的免疫表型及多向分化能力

流式检测结果hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)仍高表达间质细胞标记CD73、CD105,干细胞标记CD90以及粘附分子标记CD29,不表达内皮细胞和造血细胞标记CD45同时不表达白细胞相关抗原HLA-DR等(图4A)。经过成骨诱导14d,细胞

内出现钙盐沉积,可以被茜素红染为红色(图4B)。说明基因修饰对hUCMSC免疫表型及多向分化能力无明显影响。

2.4 hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)细胞中HGF和CTLA-4Ig的表达

2.4.1 hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)细胞高表达HGF蛋白 细胞转染72h后ELISA检测发现hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)上清中HGF含量高达14.83 ng/mL,明显高于空白对照组的4.935 ng/mL和EGFP组的2.794 ng/mL。同时发现未经基因修饰的hUCMSC也可分泌少量HGF。本实验中经过HGF/CTLA-4Ig基因修饰后其HGF水平明显上调(图5)。

2.4.2 hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)细胞高表达CTLA-4Ig基因 细胞转染72h后Western Blot检测三组细胞蛋白结果显示C组细胞蛋白中在分子质量50~60 ku附近出现一条特异性条带,大小与CTLA-4Ig蛋白分子质量相符(图6),而A组和B组均无该蛋白表达,说明hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)细胞特异性表达CTLA-4Ig。

2.5 hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)生物学特性的改变

2.5.1 hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)分泌HGF促进L02增殖 实验中设A组细胞增殖率为100%,结果发现D组细胞增殖明显,细胞增殖率可达148%,明显高于B组的125.6%($P = 0.02$)和C组的127.6%($P = 0.04$),有统计学差异。该结果说明经HGF/CTLA-4Ig基因修饰hUCMSC的促进细胞增殖能力得到了进一步加强(图7)。

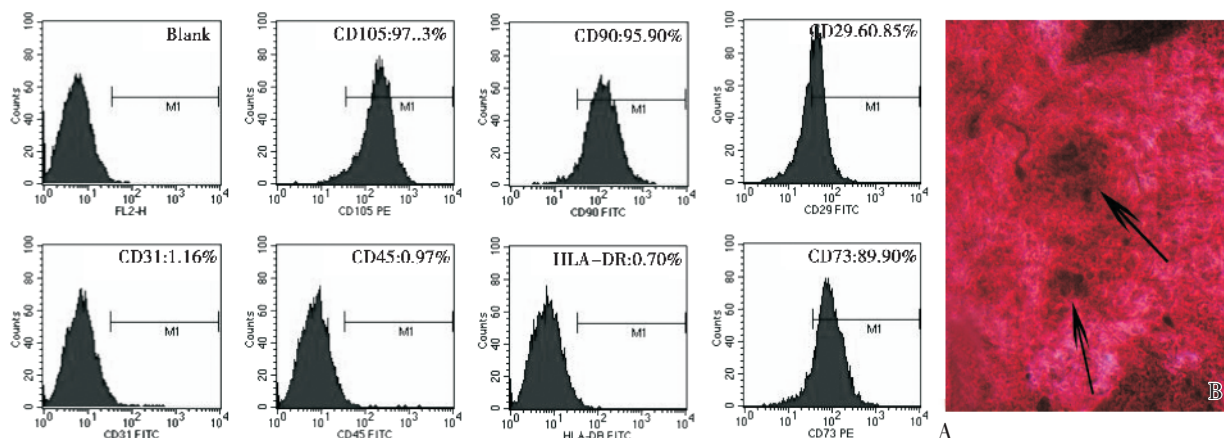


图4 hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)免疫学表型及其成骨分化

Fig.4 The immunophenotype and osteogenic differentiation of hUCMSC modified by HGF and CTLA-4Ig genes

A: The immunophenotype of hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig); B: The osteogenic differentiation of hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig) (black arrows)

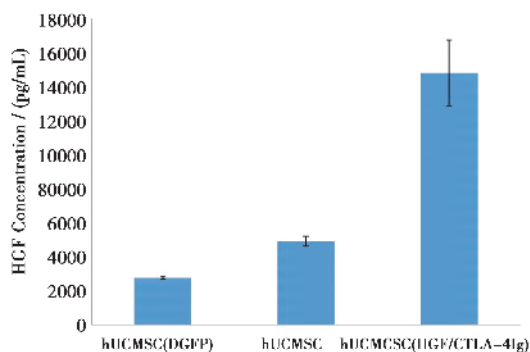


图 5 经不同 MOI 值转染 72 h 后 hUCMSC 细胞上清中 HGF 的水平

Fig.5 The expression of HGF from hUCMSC 72 h after Ad5-HGF/CTLA-4Ig transfection at an MOI of 800

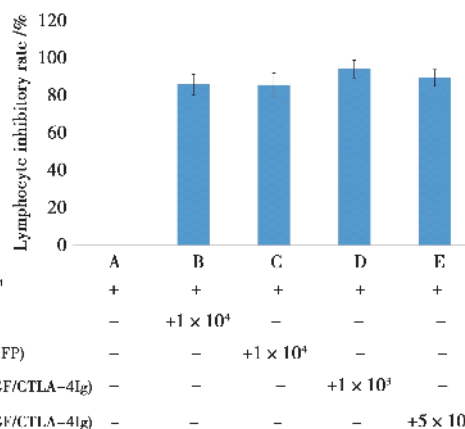


图 8 hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)对淋巴细胞增殖的抑制
Fig.8 The suppression of lymphocyte proliferation by hUCMSC(HGF/CTLA-4Ig)

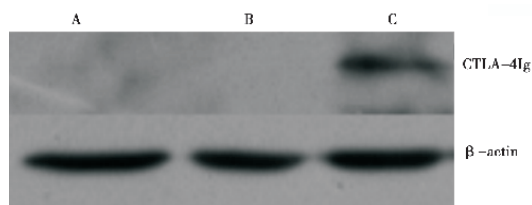


图 6 经 Ad5-HGF/CTLA-4Ig 病毒转染后 72 h 后 hUCMSC 中 CTLA-4Ig 蛋白的表达

Fig.6 The expression of CTLA-4Ig protein in hUCMSC 72 h after Adenovirus transfection

A: hUCMSC; B: hUCMSC (EGFP); C: hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig)

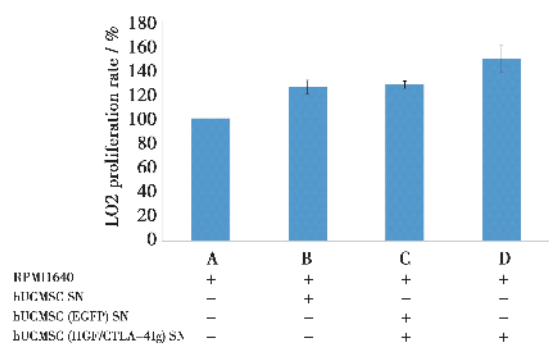


图 7 不同条件培养基对 L02 增殖的影响

Fig.7 The proliferation capacity of L02 cell under different culture condition medium

SN: supernatant

2.5.2 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 抑制淋巴细胞增殖 研究显示 MSC 能抑制非特异性丝裂原引起的淋巴细胞增殖, 这种作用呈 MSC 数量依赖性。首先设 A 组单独 PBMC 培养时增殖抑制率为 0, 实验显示在 B 组 hUCMSC:PBMC 为 1:10 时可

抑制淋巴细胞增殖达 84.8%。而在相同比例下 D 组 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 可抑制淋巴细胞增殖达 92%, 当 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig): PBMC 为 1:20 时仍可抑制淋巴细胞增殖达 87.99%, 高于 hUCMSC: PBMC 为 1:10 时的细胞抑制率(图 8)。但 D 组与 B、C 两组间差异无统计学意义($P = 0.08 > 0.05$)。

3 讨论

目前间充质干细胞可以从多种成体组织中获得, 如脐血^[11]、脐带^[12]、胎盘^[13]、脂肪^[14]等, 其中脐带来源的间充质干细胞(hUCMSC)因其来源量大, 取材方便, 安全, 干细胞含量充足等优点正逐渐成为组织工程学中良好的种子细胞。本实验所获的脐带间充质干细胞高表达间质细胞标记 CD73、CD105, 干细胞标记 CD90 以及粘附分子标记 CD29, 不表达内皮细胞和造血细胞标记 CD45, 同时不表达白细胞相关抗原 HLA-DR 等, 在成骨成脂诱导下可向成骨细胞、脂肪细胞分化, 证实其同骨髓间充质干细胞具有一致的生物学特性^[15]。

HGF 可以与细胞膜上的特异性跨膜受体 C-Met 结合, 不仅可以促进细胞增殖, 还可提高肝细胞抗毒性物质损伤的能力, 以及抗肝细胞凋亡和抗肝纤维化的效应, 对肝细胞的损伤进行有效的保护。本实验中发现随着病毒转染 MOI 值的增大, Ad5-EGFP 转染 hUCMSC 后, 细胞 EGFP 阳性率逐渐增多, 在 Ad5-HGF/CTLA-4Ig 以 MOI =

100时转染 hUCMSC, 细胞存活率低于未转染组, 提示病毒对细胞造成一定损伤, 引起载体细胞凋亡。随着 MOI 值增大, 转入的 HGF 基因表达增强, 其对细胞的保护和促进细胞增殖的作用得到体现, 在 MOI = 800 时 hUCMSC 细胞存活率达 139.2%, HGF 促进细胞增殖作用达最大, 因此选定为病毒转染最佳 MOI 值。实验结果也表明腺病毒在此 MOI 值下转染 hUCMSC, 对其免疫表型以及成骨分化能力无影响, 与有关文献报道相符^[16-18]。而 L02 细胞是 1980 年由中国科学院上海细胞生物研究所人在正常肝细胞原代培养的基础上经过一定处理而获得的, 可以连续传代并保留有正常肝细胞特征和超微结构的肝细胞。本实验用 L02 作为研究对象, 观察基因修饰对脐带间充质干细胞生物学特性的影响, 实验发现成功转染后 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 分泌高浓度 HGF, 与单纯 hUCMSC 相比能明显促进 L02 细胞增殖, 一方面增强了 hUCMSC 分泌 HGF 的能力, 另一方面弥补了外源性 HGF 蛋白在人体内半衰期短, 体外输注难以维持高水平 HGF 表达的缺陷。

在移植后的免疫排斥中 T 细胞是主要效应细胞, 因此防止 T 细胞活化是防止排斥反应发生的主要途径。CTLA-4 属于免疫球蛋白超家族, 是主要表达在活化 T 细胞表面的免疫抑制分子, CTLA-4 与 B7 结合后通过传递免疫负调控信号, 使抗原刺激的 T 细胞进入免疫无反应状态, 阻断 T 细胞活化, 从而诱导耐受的发生。CTLA-4Ig 具有与 CTLA-4 相似的生物学功能, CTLA4Ig 同样可以竞争性抑制 CD28 与 B7 的结合, 从而阻止 T 细胞活化所必需的协同刺激信号的传递, 达到抑制免疫反应及诱导免疫耐受的作用。有研究显示携带 CTLA-4Ig 的骨髓间充质干细胞能明显减轻肝移植受体大鼠的排斥反应, 延长受体生存期^[19]。本实验中经 Western blot 证实双基因修饰后 hUCMSC 特异性表达 CTLA-4Ig 蛋白。与单纯 hUCMSC 相比 hUCMSC (HGF/CTLA-4Ig) 对淋巴细胞增殖有更强的抑制作用, 提示 HGF/CTLA-4Ig 基因修饰进一步加强了 hUCMSC 的免疫抑制特性, 优化了其免疫调节功能。

简而言之, 本实验证实, 对 hUCMSC 进行多基因修饰不影响其免疫原性和多向分化功能, 经 HGF/CTLA-4Ig 基因修饰后的 hUCMSC 能高表达 HGF 和 CTLA-4Ig, 促 L02 细胞增殖、损伤修复能

力进一步增强; 同时 hUCMSC 的免疫抑制特性亦得到很好的优化, 能更有效地抑制淋巴细胞增殖, 为肝移植术后肝细胞的缺血再灌注损伤及免疫排斥损伤保护提供新策略, 同时为干细胞临床转化应用提供了新思路。本实验目前为体外研究, 双基因修饰 hUCMSC 的体内效果评估尚需要进一步动物模型验证。

参考文献:

- [1] Penn I. Posttransplant malignancy: the role of immunosuppression[J]. *Drug Saf*, 2000, 23(2): 101-113.
- [2] Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys[J]. *Stem Cells* 2007, 25(2): 319-331.
- [3] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1330-1337.
- [4] Chen K, Wang D, Du WT, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSC exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism[J]. *Clin Immunol*, 2010, 135(3): 448-458.
- [5] Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. McIntosh, Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(11): 2865-2874.
- [6] Mobasher A, Csaki C, Clutterbuck AL. Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: application in cartilage repair and osteoarthritis therapy[J]. *Histol Histopathol*, 2009, 24(3): 347-366.
- [7] Fu X, Li H. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and re-generation: possibilities and questions[J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335(2): 317-321.
- [8] Ha X, Ren J, Bi J, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in dog hindlimb ischemia models[J]. *Chn Sci Bull*, 2003, 48(7): 676-680.
- [9] Ha X, Yuan B, Li Y, et al. Gene therapy for pathological scar with hepatocyte growth factor mediated by recombinant adenovirus vector[J]. *Sci China C Life Sci*, 2003, 46(3): 320-327.
- [10] Linsley PS, Brady W, Urnes M, et al. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7[J]. *J Exp Med*, 1991, 174(3): 561-569.

(下转第 722 页 to page 722)