

CTLA4 基因修饰骨髓间充质干细胞向肝细胞诱导分化及其免疫抑制功能研究*

罗海英^{1, 2)} 王韞芳^{1)**} 翟树森³⁾ 张玉君⁴⁾ 南 雪¹⁾ 白慈贤¹⁾
施双双¹⁾ 尉承泽³⁾ 岳 文¹⁾ 孔 维²⁾ 裴雪涛^{1)**}

(¹⁾军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850; ²⁾吉林大学生命科学学院, 长春 130012;

³⁾解放军 307 医院普外科, 北京 100071; ⁴⁾第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所, 重庆 400038)

摘要 用携带 CTLA4Ig 基因的重组腺病毒感染大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs), 体外向肝细胞诱导分化, 并检测其免疫抑制功能. 用含有 HGF 等细胞因子培养液诱导重组腺病毒 Ad-CTLA4Ig 感染大鼠 BMMSCs 向肝细胞分化. 诱导后的细胞可表达 AFP、Alb 和 CK18 等肝细胞标志, 同时还具有储存糖原和摄取、排泌靛青绿等肝细胞功能. 转基因 BMMSCs 在未经诱导和诱导后均可表达 CTLA4Ig, 诱导 14 天时表达量有所减弱. 单向混合淋巴细胞反应证实, 诱导 7 天的转基因 BMMSCs 具有明显的抑制淋巴细胞反应的作用, 其抑制作用明显高于未转基因 BMMSCs, 且 CTLA4Ig 基因修饰 BMMSCs 输注还可以明显延长肝移植大鼠的存活时间. 用重组腺病毒 Ad-CTLA4Ig 对 BMMSCs 进行基因修饰, 一方面不会影响 BMMSCs 的肝细胞分化潜能, 另一方面使 BMMSCs 的免疫抑制特性得到进一步强化.

关键词 间充质干细胞, CTLA4Ig, 腺病毒, 分化, 免疫抑制

学科分类号 Q786, Q254

由病毒、药物、毒物、肿瘤及遗传性疾病等原因所致急性慢性肝损伤严重威胁着人类的健康, 其治疗一直是一个全球性难题. 目前, 肝移植是解决这一问题最为有效的方法, 但是肝源严重短缺、免疫排斥反应的存在又限制了这一方法在临床上的广泛开展. 近年来, 肝损伤性疾病的干细胞治疗受到了广泛关注.

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)是一群不同于造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)的具有多分化潜能的干细胞, 在特定诱导条件下可分化为成骨细胞^[1]、软骨细胞^[2]、脂肪细胞^[3]、神经细胞^[4]以及心肌细胞^[5]等. 大量体外研究证实, 在肝生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等细胞因子存在时, BMMSCs 可以被诱导分化为有功能的肝细胞^[6, 7]. 而且, 在动物体内, BMMSCs 仍然具有修复肝脏化学损伤的功能^[7~9]. BMMSCs 取材容易, 可在体外大量扩增, 培养过程中始终保持其多向分化潜能, 遗传背景稳定, 是一种理想的干细胞治疗来源. 自体 BMMSCs 是较好的选择, 但因其数量有

限, 体外扩增需要较长时间, 难以满足临床治疗的需要. 异基因 BMMSCs 在来源和数量上不会受到限制, 但是异基因细胞移植治疗则需要考虑到免疫排斥的问题^[10, 11]. 尽管已证实 BMMSCs 在体外有显著的免疫抑制作用, 但在体内是否仍然具有同样的下调免疫反应作用还存在争议.

T 细胞是免疫排斥的主要效应细胞, 防止同种异型反应 T 细胞活化是防止排斥反应发生的主要途径. 细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic lymphocyte antigen 4, CTLA4)是主要表达在活化 T 细胞表面的免疫抑制分子, 可竞争性抑制 T 细胞膜上的 CD28 分子, 与 APC 表面的 B7 分子结合, 其亲和力较 CD28 高数十倍, 并传递负调控信号,

* 国家高技术研究发展计划(863)领域重大专项(2006AA02A107), 国家重点基础研究发展规划项目(973)(2005CB522702)和国家自然科学基金(30400415)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 010-66932240, Fax: 010-68164807

王韞芳. E-mail: wangyf1972@gmail.com

裴雪涛. E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2007-12-26, 接受日期: 2008-03-31

从而阻断 T 细胞活化. CTLA4Ig 是由 CTLA-4 胞外段与 IgG Fc 段融合而成, 为可溶性, 具有与 CTLA4 相似的生物学功能, 可与细胞表面的 B7 分子结合起到封闭作用, 通过阻断 B7/CD28 协同刺激通路而达到抑制 T 细胞活化的目的^[12]. 本研究是构建携带 CTLA4Ig 基因的重组腺病毒, 体外感染 BMMSCs, 观察经过免疫抑制修饰的 BMMSCs 向肝细胞分化的能力, 并检测其免疫抑制功能, 旨在利用 CTLA4Ig 的免疫阻断作用, 进一步增强 BMMSCs 的免疫下调功能, 使其得到更广泛的应用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种、细胞和实验动物. pIRES2-CTLA4Ig 质粒由干细胞与再生医学研究室构建. 腺病毒载体系统质粒 (pAdTrack-CMV 和 pAdEasy-1)、大肠杆菌 BJ5183 及 HEK293 细胞由干细胞与再生医学研究室保存. DH5 α 感受态菌购自北京天为时代公司. LEW 大鼠(Rt-1^l), 体重为 180~200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, DA 大鼠(Rt-1^a), 体重为 180~200 g, 购自哈尔滨医科大学实验动物中心.

1.1.2 主要试剂. TRIzol 试剂、lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; T4DNA 连接酶、dNTP、TaqDNA 聚合酶、AMV 逆转录试剂盒、DNA Marker DL2000、DNA Marker DL15000 以及限制性内切酶 *Sal* I、*Bgl* II 购自大连宝生物公司; *Pme* I、*Pac* I 购自 Biolab 公司; DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; L-DMEM 及 RPMI 1640 培养基、HGF、bFGF、FGF4、PAS 染色试剂盒、靛青绿均购自 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 HyClone 公司; Matrix 购自 BD 公司; ITS 购自 Gibco 公司; 兔抗大鼠 CTLA4、兔抗大鼠 CK18、山羊抗大鼠 AFP 多克隆抗体以及山羊抗大鼠 Alb 一抗、蛋白质印迹化学发光检测试剂盒购自 SantaCruz 公司; 封闭用的马血清、TRITC 标记的兔抗羊及羊抗兔荧光二抗、辣根过氧化物酶标记的兔抗羊和羊抗兔二抗均购自中杉金桥公司; 丝裂霉素 C 购自 MERK 公司; ³H 标记的脱氧胸腺嘧啶核苷酸(³H-TdR)购自中国科学院原子能研究所; 引物合成和 DNA 序列测定均由 Invitrogen 公司完成.

1.2 方法

1.2.1 构建重组腺病毒载体. 用 *Sal* I 和 *Bgl* II 双酶

切质粒 pIRES2-CTLA4Ig, 电泳回收 CTLA4Ig 片段, 与腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 于 16℃ 连接过夜, 将连接产物转化入 DH5 α 感受态菌, 提取质粒, 行双酶切鉴定. 选用 *Pme* I 线性化 1 μ g 穿梭质粒 pAdTrack-CMV-CTLA4Ig, 与 100 ng 超螺旋骨架质粒 pAdEasy-1 共同电转化至 BJ5183 感受态菌中进行同源重组, 经卡那霉素抗性筛选阳性克隆, 提取质粒作 *Pac* I 酶切鉴定.

1.2.2 重组腺病毒的包装及扩增. 选用 *Pac* I 酶切重组病毒质粒 pAd-CTLA4Ig, 用 lipofectamine 2000 包裹线性化质粒转染 293 细胞, 用含 5%胎牛血清 H-DMEM 培养液培养 7~10 天, 出现完全病理效应(cytopathic effect, CPE)时, 收集细胞, -70℃ 和 37℃ 反复冻融 3 次, 离心取上清. 用病毒上清再次感染 293 细胞 2~3 天后, 再次收集上清, 如此反复“感染-收集-冻融”3 次, 获得高滴度毒液. 用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度(参考 AdEasy Vector System 操作方法).

1.2.3 BMMSCs 的分离、纯化、扩增. 取 6~8 周雄性 LEW 大鼠, 分离股骨及胫骨, 用 L-DMEM 冲出骨髓, 用比重 1.083 的大鼠淋巴细胞分离液作梯度离心, 收集单个核细胞, 按 2×10^5 /ml 接种, 常规培养 48 h 后换液, 以后每 2~3 天换液. 待细胞接近 90%融合, 胰蛋白酶消化, 按 1×10^4 /ml 传代, 按此方法反复传代扩增, 并严格控制酶的量 and 消化时间, 纯化 BMMSCs. 用流式细胞仪检测 BMMSCs 表面分子.

1.2.4 重组腺病毒体外转染 BMMSCs. 取第 3 代 BMMSCs 按 2×10^5 /瓶接种 24 h 后, 按感染复数 (MOI 值)为 100 的毒液量感染细胞, 连续培养 14 天, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)的表达情况.

1.2.5 转基因 CTLA4Ig BMMSCs 向肝细胞诱导分化. 取重组腺病毒 Ad-CTLA4Ig 感染 24 h 后的第 3 代大鼠 BMMSCs, 以 2×10^4 个接种入预先铺有 Matrix 的 24 孔板中, 以 DMEM 常规培养, 24 h 后更换为诱导培养基, 诱导培养基为含 5%胎牛血清、 $1 \times$ ITS(含 1.0 g/L 胰岛素, 0.67 mg/L 亚硒酸钠, 转铁蛋白 0.55 g/L, 11.0 g/L 丙酮酸钠)、0.61 g/L 尼克酰胺、0.1 μ mol/L 地塞米松、2 g/L 牛血清白蛋白(BSA)、2 g/L 半乳糖、1 g/L 葡萄糖、0.1 g/L 鸟氨酸、0.03 g/L 脯氨酸、0.73 g/L 谷氨酰胺、1%双抗以及锌、锰、铜等微量元素的 L-DMEM, 使用前加入 20 μ g/L 的 HGF、20 μ g/L

的 FGF-4 和 20 $\mu\text{g/L}$ 的 bFGF. 3 天更换诱导培养基一次. 对照组用含 5% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基培养.

1.2.6 RT-PCR 检测基因表达. 分别取重组腺病毒感染 3 天的 BMMSCs 及诱导 7 天和 14 天转基因干细胞各 3×10^5 个, 应用 TRIzol 试剂并参照试剂盒说明书分别提取细胞总 RNA, 并以此为模板反转

录其中的 mRNA 为 cDNA. 分别设计并合成下述引物(表 1), 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 检测转基因干细胞在未诱导及不同诱导时间 CTLA4Ig、AFP、白蛋白和 CK-18 的基因表达情况, 并用 Alpha Imager3300 软件对结果进行分析.

Table 1 Primers of genes for RT-PCR

Gene	Primer	$T_m/^\circ\text{C}$	Fragment /bp
CTLA4Ig	S: 5' TCA AGATCTATGGGGTACTGCTCACACA 3'	53	1 170
	A: 5' ACTCTCGAGCTATTTACCAGGAGAGCGGGA 3'		
Alb	S: 5' CTGGGAGTGTGCAGATATCAGAGT 3'	50	142
	A: 5' GAGAAGGTACCAAGTGCTGTAGT 3'		
AFP	S: 5' GTCCTTTCTCCTCCTGGAGAT 3'	48	146
	A: 5' CTGTCCTGCTGATTCTCTGG 3'		
CK-18	S: 5' GCCCTGGACTCCAGCAACT 3'	50	70
	A: 5' ACTTTGCCATCCACGACCTT 3'		
β -Actin	S: 5' AGAAAATCTGGCACCACACC 3'	53	553
	A: 5' AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG 3'		

1.2.7 蛋白质免疫印迹检测. 分别取未诱导的转基因 BMMSCs 及诱导 7 天和 14 天转基因干细胞各 10^7 个, 用 RIPA 细胞裂解液裂解后提取胞浆蛋白, 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, 经兔来源抗 CTLA4 一抗和辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗孵育后, 用 ECL 化学发光检测试剂盒于暗室自显影, 用 β -actin 作为内参, 检测转基因 BMMSCs 在未诱导及不同诱导时间 CTLA4Ig 的表达, 并用 Alpha Imager3300 软件对结果进行分析.

1.2.8 细胞免疫荧光化学检测. 分别取未经诱导的转基因 BMMSCs 及诱导 7 天及 14 天转基因干细胞, 按 10^4 细胞 / 孔接种于 96 孔板中. 用 4% 多聚甲醛固定, 0.3% TritonX-100 破膜及马血清封闭, 分别用兔抗大鼠 CTLA4、兔抗大鼠 CK18、山羊抗大鼠 AFP 以及山羊抗大鼠 Alb 一抗和 TRITC 标记二抗孵育, 荧光显微镜下观察细胞内 CTLA4Ig、AFP、Alb 和 CK-18 的表达情况.

1.2.9 单向混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte response, MLR). 取未经诱导的转基因 BMMSCs 及诱导 7 天转基因干细胞, 经丝裂霉素 C (25 mg/L) 处理, 用含 10% 胎牛血清 L-DMEM 培养液重悬, 分别按 1×10^5 / 孔、 1×10^4 / 孔、 1×10^3 / 孔的密度接种到 96 孔板中, 培养过夜. 以同样密度的未转基因 BMMSCs 作为对照. 无菌剖取 LEW 大鼠及 DA 大

鼠脾脏分离脾细胞. 用丝裂霉素 C 37°C 处理 DA 大鼠脾细胞, 再用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 调整细胞浓度为 1×10^7 / ml, 用作 MLR 的刺激细胞. 将 LEW 大鼠脾细胞作为反应细胞, 调整细胞浓度为 1×10^7 / ml. 吸去上述 96 孔板中培养液, 每孔加入反应细胞和刺激细胞悬液各 100 μl , 置 37°C , 5% CO_2 培养 56 h, 加 ^3H 标记的脱氧胸腺嘧啶核苷酸, 37 kBq / 孔, 标记 16 h, 用细胞收集器收集细胞于滤纸上, 加入闪烁液, 用液体闪烁计数器检测 cpm 值, 并进行比较分析.

1.2.10 糖原 PAS 染色. 取诱导 14 天的转基因 BMMSCs, 用福尔马林 - 乙醇固定, 蒸馏水洗涤, 加入过碘酸室温放置 5 min, 充分洗涤后, 用 Schiff's 试剂染色 15 min, 苏木素溶液复染 90 s, 于光学显微镜下观察结果.

1.2.11 靛青绿 (ICG) 的摄取和排泌实验. 取诱导 14 天的转基因 BMMSCs, 加入 1 g/L 的 ICG, 37°C 孵育 15 ~ 30 min, 显微镜下观察细胞颜色变化, 换回含 5% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基, 继续培养 4 ~ 6 h, 显微镜下观察细胞颜色变化.

1.2.12 动物实验. 以雌性 LEW 大鼠为受体, 雌性 DA 大鼠为供体, 采用改良的 Kamada 方法^[13], 建立大鼠原位肝移植排斥模型. 将实验动物随机分为 3 组, A 组为对照组 ($n=7$), B 组为免疫抑制剂治疗组 ($n=5$) 则从术前 1 天开始给予 CsA (3 mg/kg · d) 肌肉注射, 连续用药 14 天. C 组为实验组 ($n=9$),

术中供肝植入后, 用 27G 针头注射器经门静脉缓慢输注 Ad-CTLA4Ig 感染 24 h 的第 3 代雄性 LEW 大鼠 BMMSCs 生理盐水重悬液 0.5 ml (含细胞 2×10^6 个), 对照组注入等量的生理盐水. 术后第 10 天活杀 C 组大鼠 1 只, 取肝组织做冰冻切片, 观察 GFP 表达, 并观察各组大鼠生存情况.

1.2.13 统计学分析. 所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示. 应用 spss11.0 统计软件包进行统计学分析.

2 结 果

2.1 重组腺病毒质粒载体鉴定及包装

用 *Sal* I 和 *Bgl* II 双酶切 pAdTrack-CMV-CTLA4Ig, 获得了 1 170 bp 的 CTLA4Ig 片段和 9.2 kb 的大片段(图 1a). 重组穿梭质粒与病毒骨架质粒(33 kb)在细菌内发生了同源重组, 因有两种重组方式, 故 *Pac* I 酶切可以产生 3.0 kb 或 4.5 kb 大小不同的小片段及 38.6 kb 的大片段(图 1b).

重组腺病毒载体在 293 细胞中包装形成完全 CPE, 荧光显微镜下可见 GFP 蛋白表达(图 1c). 经过 3 次扩增, TCID₅₀ 法测定病毒滴度为 6.21×10^7 PFU/ml.

2.2 BMMSCs 鉴定

分离的大鼠骨髓单个核细胞培养 48 h, 首次换液, 可见少量的贴壁细胞, 呈椭圆形、短梭形. 接

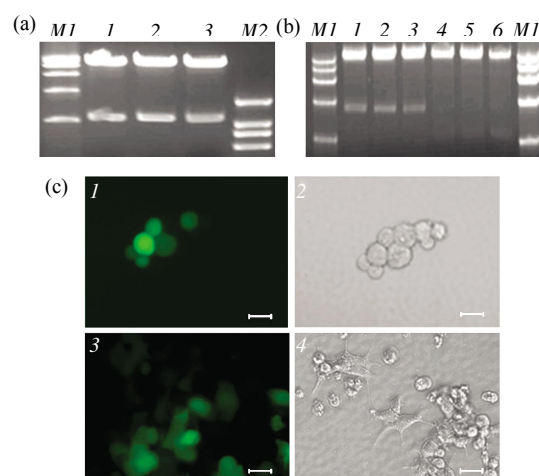


Fig. 1 Construction of recombinant adenovirus vector containing CTLA4Ig gene

(a) Identification of pAdTrack-CMV-CTLA4Ig by digestion with *Sal* I and *Bgl* II. M1: DL 15000 marker; M2: DL 2000 marker; 1~3: The digested fragments. (b) Identification of pAd-CTLA4Ig by digestion with *Pac* I. M1: DL 15000 marker; 1~6: The digested fragments. (c) Package of Ad-CTLA4Ig and GFP expression in 293 cells. (1, 2: Complete CPE; 3, 4: Part CPE). Scale bar: 50 μ m.

种 5~7 天后, 可见明显集落形成, 呈梭形, 16 天时细胞间相互融合基本铺满瓶底. 应用流式细胞仪检测第 3 代 BMMSCs 表面分子, 发现 CD29、CD90 呈阳性, CD44 呈弱阳性, 而 CD34 呈阴性, 这表明 BMMSCs 是骨髓中区别于造血干细胞的一群处于未分化状态的非定向干细胞(图 2).

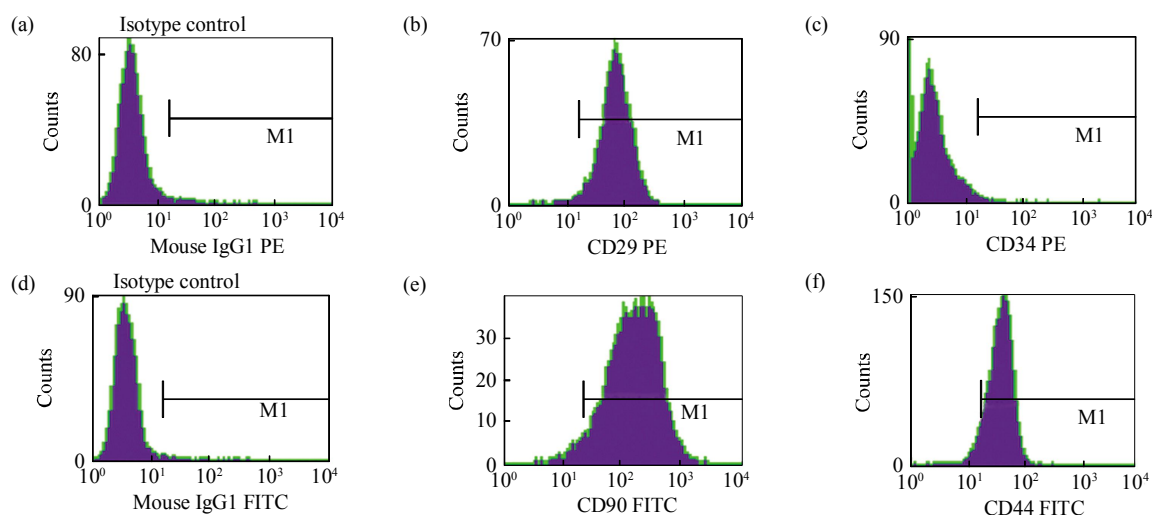


Fig. 2 Phenotype of rat BMMSCs from 3rd passage

Cells were incubated with the respective FITC- or PE-labeled antibodies and analysed by flow-cytometry. PE-mouse IgG1(a) and FITC-mouse IgG1(d) were used as control; expression of CD29(b), CD34(c), CD90(e) and CD44(f) was detected.

2.3 重组腺病毒 Ad-CTLA4Ig 体外感染 BMMSCs

按 MOI=100 的病毒量感染第 3 代 BMMSCs, 荧光显微镜下观察发现, 感染 24 h 时即有 GFP 表

达, 在第 3 天时表达最强, 感染效率可达到 99% 以上, 以后逐渐开始减弱, 在第 14 天时仍有表达(图 3).

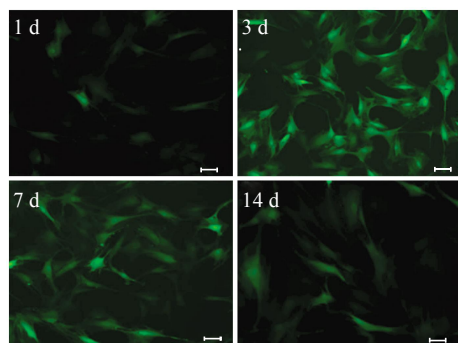


Fig. 3 The expression of GFP in transfected BMMSCs at 1 d, 3 d, 7 d and 14 d
Scale bar: 50 μm .

2.4 转基因 BMMSCs 向肝细胞诱导分化

转基因 BMMSCs 用条件诱导培养基培养 48h 后, 细胞形态多样, 呈三角形、梭形、圆形等. 第 5~7 天, 细胞的生长速度较前变慢, 可见多核的成纤维样细胞, 呈多边形、梭形等. 2 周后, 贴壁细胞分化为体积较大的多角形、圆形和部分梭形, 可见多核, 细胞生长变慢(图 4).

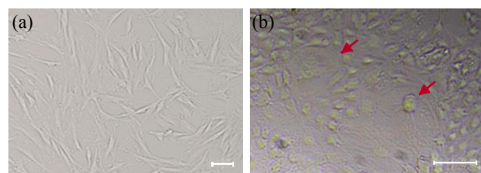


Fig. 4 The morphological change of transfected BMMSCs after cultured in differentiation medium
(a) Transfected BMMSCs cultured in normal DMEM medium. (b) Transfected BMMSCs change from fibroblast-like shape into hepatocyte-like shape after 14 d cultured in differentiation medium (red arrows). Scale bar: 50 μm .

用 RT-PCR 法检测转基因 BMMSCs 在诱导 7 天和 14 天时肝细胞相关基因 mRNA 水平的表达. 结果发现, 在诱导 7 天时即有原始肝细胞标志 AFP 基因表达, 诱导 14 天时出现了成熟肝细胞标志 Alb 和 CK18 基因表达, 而对照组未诱导的转基因及未转基因间充质干细胞没有这些基因的表达 (图 5).

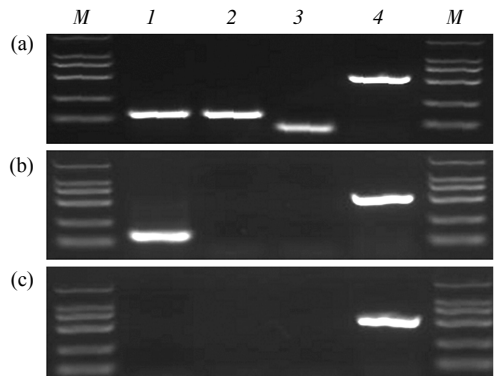


Fig. 5 Analysis of RT-PCR for hepatocyte-specific genes expression in transfected BMMSCs after cultured in differentiation medium
M: DL 2000 marker; 1: AFP; 2: Alb; 3: CK18; 4: β -Actin. (a) Culture in differentiation medium for 14 d. (b) Culture in differentiation medium for 7 d. (c) Culture in normal DMEM medium.

免疫荧光检测发现, 转基因 BMMSCs 以肝细胞条件诱导培养基培养 7 天, 部分细胞即有 AFP 表达, 诱导 14 天时部分细胞开始表达 Alb 和 CK18, 而未诱导的转基因和未转基因间充质干细胞 AFP、Alb 和 CK18 表达阴性(图 6).

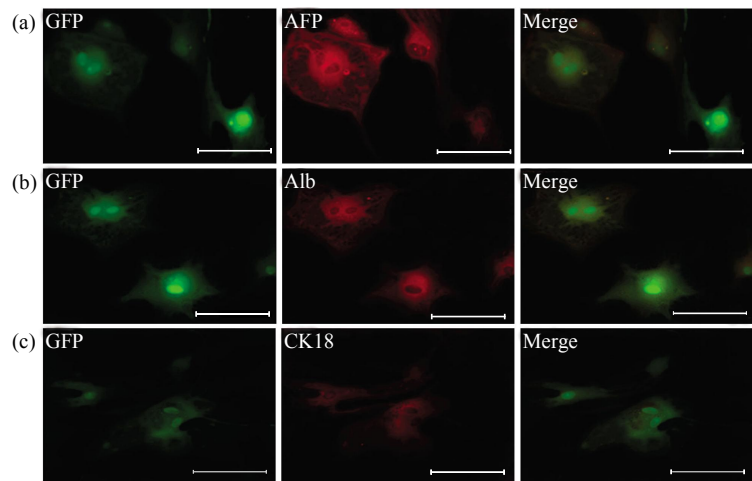


Fig. 6 Expression of hepatocyte-specific proteins in transfected BMMSCs after cultured in differentiation medium, detected by fluorescent immunocytochemistry
(a) AFP expression at 7 d. (b) Alb, (c) CK18 expression at 14 d. Scale bar: 50 μm .

肝细胞具有储存糖原的功能, 对诱导 14 天的转基因间充质干细胞进行 PAS 糖原染色, 光学显微镜下发现部分细胞染色阳性, 可见 PAS 阳性物呈红色颗粒弥散分布, 定位于胞浆, 糖原含量多呈深红色, 糖原含量少则呈淡红色(图 7a).

ICG 的摄取和排泌实验是评价肝细胞储备功能的经典实验, 通常用来检测肝细胞的染料排泄能力. 诱导 14 天的转基因 BMMSCs 加入 1 g/L 的 ICG 孵育 15~30 min, 显微镜下可见半数以上的细胞染成深绿色(图 7b), 换回完全培养基继续培养 4~6 h, 可见着色细胞完全退色(图 7c).

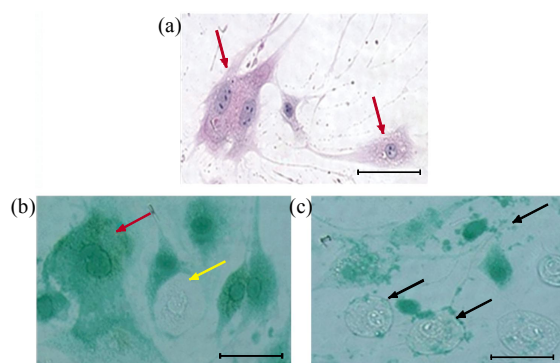


Fig. 7 Hepatocyte-specific function in transfected

BMMSCs after 14 d of culture in differentiation medium

(a) Glycogen was detected by PAS staining in cells (red arrows show the positive cells, 50). (b) ICG uptake (red arrow shows the positive cell, yellow arrow shows negative cell). (c) ICG excretion (black arrows). Scale bar: 50 μ m.

2.5 转基因 BMMSCs 诱导前后 CTLA4Ig 的表达

应用 RT-PCR 法检测转基因 BMMSCs 在未诱导、诱导 7 天和诱导 14 天时 CTLA4Ig 融合基因

mRNA 水平的表达, 以空载体感染的 BMMSCs 作为对照. 结果证实, 转基因 BMMSCs 定向肝细胞诱导前后均有 CTLA4Ig 融合基因的表达, 而且随着诱导时间的增加, 表达量有减弱的趋势(图 8a), 这与腺病毒载体瞬时表达特性相一致.

蛋白质免疫印迹法检测转基因 BMMSCs 在未诱导、诱导 7 天和诱导 14 天时 CTLA4Ig 融合蛋白 (大小在 50~60 ku 之间) 的表达. 在空载体感染的细胞中没有 CTLA4Ig 的表达, 而在诱导 14 天的细胞中表达量明显低于未诱导和诱导 7 天的细胞, 未诱导和诱导 7 天细胞中的表达量分别是诱导 14 天的 3.06 倍和 2.52 倍(图 8b).

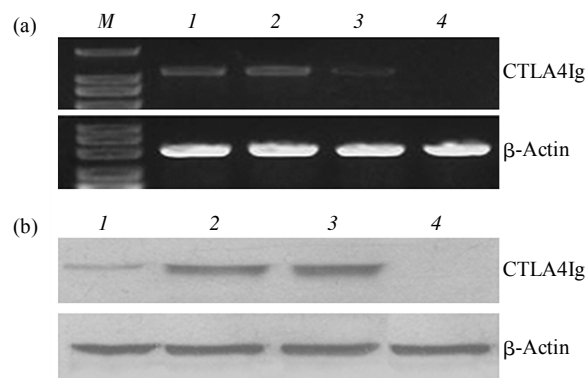


Fig. 8 Gene and protein expression of CTLA4Ig

in transfected BMMSCs

(a) Analysis of RT-PCR. *M*: DL 2000 marker; *1*: Culture in normal DMEM medium; *2*, *3*: Culture in differentiation medium for 7 d and 14 d; *4*: Ad-GFP transfected BMMSCs. (b) Analysis of Western blot. *1*, *2*: Culture in differentiation medium for 14 d and 7 d; *3*: Culture in normal DMEM medium; *4*: Ad-GFP transfected BMMSCs.

免疫荧光检测同样发现, 转基因 BMMSCs 在未诱导和诱导 14 天时均有 CTLA4Ig 的表达(图 9).

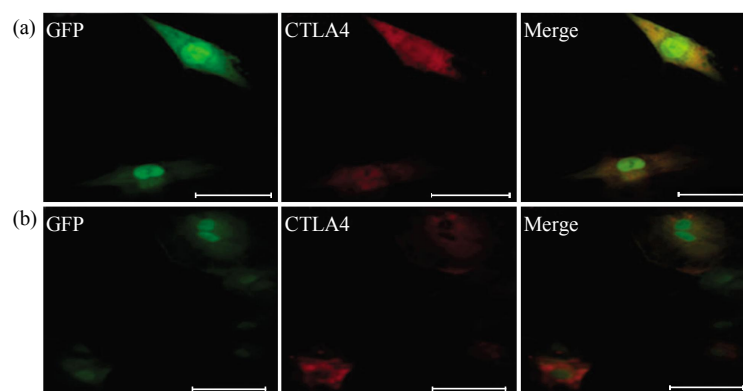


Fig. 9 Expression of CTLA4Ig in transfected BMMSCs detected by fluorescent immunocytochemistry

(a) Transfected BMMSCs cultured in normal DMEM medium. (b) Transfected BMMSCs cultured in differentiation medium for 14 d. Scale bar: 50 μ m.

2.6 转基因 BMMSCs 诱导前后免疫抑制功能鉴定

以雄性 LEW 大鼠脾细胞为反应细胞, 以 DA 大鼠的脾细胞作为刺激细胞, 建立 MLR 体系, 结果发现, 诱导前及诱导 7 天的转基因 BMMSCs 均具有抑制淋巴细胞增殖作用, 随着细胞数量增加抑制作用也逐渐增强, 且抑制作用均明显强于未转基因的 BMMSCs ($P < 0.05$), 而诱导后与未经诱导的转基因 BMMSCs 免疫抑制作用没有显著性差异 ($P > 0.05$) (图 10).

2.7 重组腺病毒在移植肝内的表达

取 B 组肝移植术后肝组织做冰冻切片, 荧光显微镜下可见在汇管区周围的肝组织内有 GFP 的表达, 证明输注的转基因 BMMSCs 驻留在肝脏内并有外源基因的表达 (图 11a).

2.8 大鼠肝移植术后存活时间

截止到观察结束时, A 组 7 只, 平均存活 (13.71 ± 2.21) 天, B 组 5 只, 平均存活 (98.88 ± 29.43) 天, C 组 8 只, 平均存活 (104.20 ± 25.63) 天, C 组与 A 组比较差异有显著性 ($P < 0.05$), C 组与 B 组比较没有显著性差异 ($P > 0.05$) (图 11b).

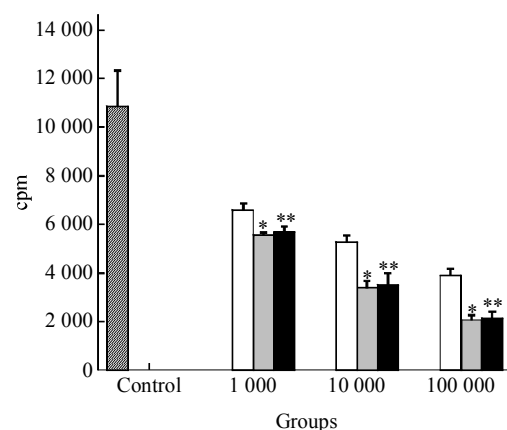


Fig. 10 MLR in the presence of either BMMSCs or transfected BMMSCs

Transfected BMMSCs cultured either in normal DMEM medium or in differentiation medium had a significantly stronger inhibitory capacity for immune response than BMMSCs in the model of MLR. *cpm of transfected BMMSCs in normal medium was statistically lower than that of BMMSCs at the same number ($P < 0.05$). **cpm of transfected BMMSCs in differentiation medium for 7 d was statistically lower than that of BMMSCs at the same number ($P < 0.05$). ■: Control; □: MSC; ▒: CTLA4Ig-MSCs in DMED medium; ■: CTLA4Ig-MSCs in differentiation medium.

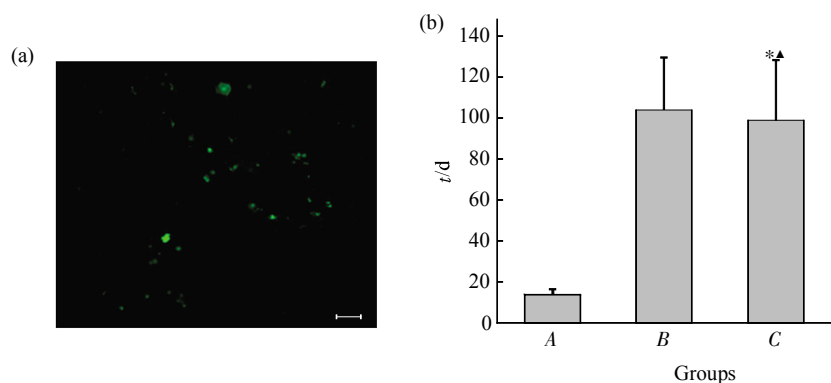


Fig. 11 Survival of recipients with CTLA4Ig gene transfected BMMSCs infusion after rat liver transplantation

(a) Expression of GFP from recombinant adenovirus transfected BMMSCs in the transplanted liver at 3 d after operation (scale bar: 50 μ m). (b) Survival of recipients after rat liver transplantation. *The Survival time of C group was statistically higher than that of A group ($P < 0.01$). ▲There was no statistical difference between C group and B group ($P > 0.05$).

3 讨 论

近年来, 全球掀起的干细胞研究热潮使成体干细胞受到了广泛关注. 成体干细胞存在于哺乳动物的多种组织内, 并具有在特定条件下跨系、跨胚层分化的潜能. 目前认为, 骨髓是成体中干细胞含量最丰富的组织, 包括多种具有向不同组织细胞分化潜能的干细胞群体, 其中以 HSCs 和间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 为主.

BMMSCs, 不同于 HSCs, 体外培养贴壁生长, 梭形, 是骨髓基质细胞的祖细胞. BMMSCs 不仅可分化为外胚层的神经元和神经胶质细胞^[4]以及中胚层的成骨细胞和脂肪细胞^[1, 3], 还可以分化为内胚层的肝细胞. 大量体外研究证实, 在特定细胞因子 (HGF, bFGF, FGF4) 组合的条件下培养, BMMSCs 可以定向分化为有功能的肝细胞^[6, 7]. 而且动物实验也进一步证实, 移植的 BMMSCs 在化学损伤肝脏内^[7~9]以及小肝移植体内^[14]均可分化为

肝细胞,促进肝损伤的修复.这就为BMMSCs移植治疗肝脏损伤性疾病的临床应用奠定了基础.但MSCs在骨髓中的含量很少,仅占成年骨髓单个核细胞的0.001%~0.01%,并随着年龄增长而减少^[15].因此,自体BMMSCs的临床应用会受到来源和数量的限制,于是研究者们开始把目光转向了异基因BMMSCs. Sato等^[6]将人BMMSCs移植入异丙醇损伤的大鼠肝脏内,结果这些细胞可在肝损伤环境里分化为肝细胞,参与损伤修复,促进肝功能恢复,这就证明在受体内异基因BMMSCs同样具有治疗肝损伤的作用.相对于自体BMMSCs而言,异基因BMMSCs在采集和体外扩增培养方面不会受到来源和时间的限制,这些优势使得异源BMMSCs可能成为治疗肝损伤更为重要的细胞来源.新近还有人将胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)诱导成具有多分化潜能的MSCs,这也可能成为治疗肝脏疾病的另一个细胞来源^[16].但值得注意的是,既然是异源的,应用时就要考虑到免疫排斥的问题.

目前认为, MSCs具有低免疫原性,调节免疫反应的特性,其表面只表达MHC I类分子和VCAM-1、LFA-3等免疫相关分子,而不表达MHC II类分子和B7-1、B7-2、CD40及CD40L等共刺激分子^[17,18].研究表明, MSCs在体外具有抑制T细胞增殖^[19]、抑制树突细胞增殖、分化及发挥功能^[20]和特定条件下抑制NK细胞^[21]的作用.在狒狒体内异基因BMMSCs还可延长皮肤移植存活时间,尽管不能维持移植物的长期存活^[22],但足以说明BMMSCs的免疫下调作用.基于BMMSCs的这一特性,是否可以将异基因BMMSCs直接应用于体内肝损伤治疗?近年来有学者发现, BMMSCs在异基因受鼠体内是具有免疫原性的^[11],并不能逃脱免疫系统的监视,最终被主要组织相容性抗原(MHC I类及II类抗原)不符的受鼠免疫系统所排斥^[10].纵观异基因BMMSCs移植治疗肝损伤的体内实验研究,发现受体动物或者是免疫缺陷小鼠或者是在移植后应用环孢素A进行治疗^[7,8].这就提醒我们,在临床上如果不对受体进行免疫抑制治疗,这些异基因细胞的移植可能会导致免疫排斥反应的发生.这也可能是单纯异基因BMMSCs移植不能维持皮肤移植长期存活的原因.所以要将异基因BMMSCs应用于肝损伤性疾病的治疗,首先就要解决免疫排斥的问题.

本研究中用腺病毒将CTLA4Ig基因导入

BMMSCs,一方面应用含有HGF的条件培养基诱导转基因BMMSCs向肝细胞分化,结果表明,CTLA4Ig基因修饰的MSCs经诱导后不仅可以表达AFP、Alb、CK18等肝细胞的特异性标志,而且还具有储存糖原和摄取、排泌靛青绿染料的肝细胞功能.另一方面,本研究还对CTLA4Ig基因转移的BMMSCs在未经诱导和肝向诱导后的免疫抑制功能进行了检测.我们的实验结果同样证实了MSCs本身就具有一定的下调免疫反应的作用,而CTLA4Ig基因修饰的BMMSCs免疫抑制作用要明显强于未修饰的MSCs,而且在不应用免疫抑制剂的情况下,转基因BMMSCs输注可以使肝移植术后大鼠长期存活,这说明导入的CTLA4Ig在抑制免疫反应的过程中发挥了相当的作用,并且进一步强化了BMMSCs的免疫抑制功能. CTLA4Ig基因修饰BMMSCs一方面可能通过细胞本身与免疫细胞的接触以及产生前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)来抑制免疫反应^[19],另一方面又可以通过分泌性表达CTLA4Ig融合分子阻断CD28/B7协同刺激通路而下调免疫反应.而且,即使在向肝细胞诱导分化培养的第7天,转基因细胞仍然具有相同的免疫抑制作用,这就为异基因BMMSCs在临床移植治疗肝损伤性疾病的应用中开拓了道路.

综上所述,我们发现, Ad-CTLA4Ig基因转移既可以使BMMSCs的免疫抑制特性得到更好的优化,而且又不影响BMMSCs的肝向分化潜能,同时BMMSCs又是CTLA4Ig免疫抑制基因治疗的良好细胞载体,二者相辅相成,这将为同种异体的BMMSCs应用于肝脏疾病的临床治疗奠定基础,并提出了新的诱导免疫耐受的思路和方法.

参 考 文 献

- 1 Bruder S P, Jaiswal N, Ricalton N S, *et al.* Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. Clin OrthopRelat Res, 1998, **355** (Suppl): S247~S256
- 2 Ogueta S, Munoz J, Obregon E, *et al.* Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Mol Cell Endocrinol, 2002, **190**(1~2): 51~63
- 3 Murphy J M, Dixon K, Beck S, *et al.* Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. Arthritis Rheum, 2002, **46**(3): 704~713
- 4 Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, *et al.* Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. J Clin Invest, 2004, **113**(12): 1701~1710

- 5 Duan H F, Wu C T, Wu D L, *et al.* Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. *Mol Ther*, 2003, **8** (3): 467~474
- 6 Ong S Y, Dai H, Leong K W. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *Biomaterials*, 2006, **27**(22): 4087~4097
- 7 Aurich I, Mueller L P, Aurich H, *et al.* Functional integration of human mesenchymal stem cell-derived hepatocytes into mouse livers. *Gut*, 2007, **56**(3): 405~415
- 8 Sato Y, Araki H, Kato J, *et al.* Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 2005, **106**(2): 756~763
- 9 Oyagi S, Hirose M, Kojima M, *et al.* Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol*, 2006, **44**(4): 742~748
- 10 Nicoletta E, John S, Laurence L, *et al.* Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I -and class II -mismatched recipient mice. *Blood*, 2005, **106**(13): 4057~4065
- 11 Alma J N, Geert W, Alwine B K, *et al.* Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*, 2006, **108** (6): 2114~2120
- 12 June C H, Bluestone J A, Nadler L M, *et al.* The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today*, 1994, **15**(7): 321~331
- 13 Kamada N, Calne R Y. A surgical experience with five hundred thirty liver transplantation in the rats. *Surg*, 1983, **93**(1): 64~69
- 14 Yue Y, Ai-Hua Y, Nian C, *et al.* Mesenchymal stem cells over-expressing hepatocyte growth factor improve small-for-size liver grafts regeneration. *The American Society of Gene Therapy*, 2007, **15**(7): 1382~1389
- 15 Wada M R, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, *et al.* Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development*, 2002, **129**(12): 2987~2995
- 16 Qizhou L, Elias L, Keng S Y, *et al.* Derivation of clinically compliant MSCs from CD105⁺, CD24⁻ differentiated human ESCs. *Stem Cells*, 2007, **25**(2): 425~436
- 17 Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, *et al.* HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 2003, **31**(10): 890~896
- 18 Hua L, David Michael K, Boon Chin H, *et al.* The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J Immunology*, 2006, **176**(5): 2864~2871
- 19 Sudeepta A, Mark F P. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005, **105**: 1815~1822
- 20 Xiao-Xia J, Yi Z, Bing L, *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 2005, **105**(4): 4120~4126
- 21 Grazia M S, Andrea C, Stelvio B, *et al.* Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 2006, **107** (4): 1484 ~ 1490
- 22 Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol*, 2002, **30**(1): 42~48

The Function Identification of Hepatocyte Differentiated From CTLA4-Gene Modified Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*

LUO Hai-Ying^{1,2}, WANG Yun-Fang¹**, ZHAI Shu-Sen³, ZHANG Yu-Jun⁴, NAN Xue¹, BAI Ci-Xian¹,
SHI Shuang-Shuang¹, YU Cheng-Ze³, YUE Wen¹, KONG Wei², PEI Xue-Tao¹**

¹Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850;

²College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012;

³Department of Surgery, 307 Hospital of PLA, Beijing 100071;

⁴Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Besides differentiating into multiple mesenchymal tissues, bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) can also develop into hepatocyte-like cells *in vitro* and *in vivo*. CTLA4Ig-gene modified BMMSCs have a strong immunosuppressive function cultured in both normal and hepatic differentiation medium and this gene modification improves the biological function of BMMSCs. Recombinant adenovirus containing CTLA4Ig gene was constructed, and transferred into rat BMMSCs *in vitro*. The transfected BMMSCs, cultured in hepatic differentiation medium containing HGF for 14 days, could express hepatocyte-specific markers including AFP, Alb and CK18, and these differentiated cells from BMMSCs also had the capabilities of glycogen deposition and ICG uptake and excretion, which are hepatocyte-specific functions. Expression of CTLA4Ig in the transfected BMMSCs cultured in the normal growth medium or the differentiation medium was confirmed by RT-PCR, Western blot and fluorescent immunocytochemistry, and the expression at 14 d was weaker than that at 7 d. In the model of MLR, the transfected BMMSCs could suppress immune response, and the suppression was statistically stronger than that of BMMSCs at the same number. Even if cultured in hepatic differentiation medium, the transfected BMMSCs also had the same immunosuppression function. In rat liver transplantation model, the CTLA4Ig-gene modified BMMSCs infused into liver graft after operation could prolong the survival time of the recipients. Adenovirus-mediated CTLA4Ig gene transfer into BMMSCs can not change the potential of BMMSCs to differentiate into hepatocytes, and on the other hand, this gene transfer can improve the immunosuppressive function of BMMSCs, which can broaden the applying space of BMMSCs in the clinical therapy for liver diseases.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells, CTLA4Ig, adenovirus, differentiation, immunosuppression

*This work was supported by National Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A107), the Major State Basic Research Program of China (2005CB522702) and The National Nature Science Foundation of China (30400415)

**Corresponding author. Tel: 86-10-66932240, Fax: 86-10-68164807

PEI Xue-Tao. E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

WANG Yun-Fang. E-mail: wangyf1972@gmail.com

Received: December 26, 2007 Accepted: March 31, 2008