论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0810-04

腺病毒介导的CTLA-4Ig基因转染人骨髓间充质干细胞成骨特性研究

石东文[1*],代 飞[2*],陈希炜[1],贺伟峰[1],胡晓红[1],罗高兴[1],吴 军[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室,[2]骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 通过腺病毒介导CTLA-4Ig基因转染人骨髓间充质干细胞(human marrow mesenchymal stem cells, hMSCs),观察被修饰细胞CTLA-4Ig蛋白表达情况,以及基因修饰对hMSCs诱导成骨特性的影响。**方法** 采用荧光显微镜观察腺病毒介导CTLA-4Ig基因转染hMSCs的绿色荧光蛋白表达,流式细胞术检测确定转染率,观察对比转染前后细胞形态和细胞周期,用免疫细胞化学方法检测转染hMSCs的CTLA-4Ig蛋白表达,转染hMSCs成骨诱导培养3周后进行成骨特异性标记检测。**结果** 分离培养的hMSCs CD105表达阳性,CD34表达阴性。重组腺病毒介导的CTLA-4Ig基因转染hMSCs的转染率为81.14%,CTLA-4Ig基因转染hMSCs(CTLA-4Ig-hMSCs)的形态无明显变化,生长良好。免疫细胞化学结果显示,CTLA-4Ig-hMSCs的CTLA-4Ig蛋白表达阳性,诱导培养3周的CTLA-4Ig-hMSCs,碱性磷酸酶染色呈强阳性,免疫细胞化学检测骨钙素表达阳性,钙的四环素荧光标记法显示细胞间有钙的沉积。**结论** 腺病毒介导的CTLA-4Ig基因转染hMSCs能够分泌CTLA-4Ig蛋白,并保持了成骨分化潜能,可用于异基因hMSCs作为骨组织工程种子细胞的应用研究。

关键词: hMSCs; CTLA-4Ig; 基因转染; 诱导成骨

中图法分类号: R329.2; R373; R394.2 **文献标识码:** A

Osteogenic characteristics of hMSCs transfected with adenovirus-mediated CTLA-4Ig gene

SHI Dong-wen[1], DAI Fei[2], CHEN Xi-wei[1], HE Wei-feng[1], HU Xiao-hong[1], LUO Gao-xing[1], WU Jun[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Chongqing Key Laboratory for Proteomics of Diseases, [2]Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe CTLA-4Ig protein expression in human marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) transfected with adenovirus-mediated CTLA-4Ig gene and the effect of gene modification on hMSCs induced osteogenesis. **Methods** hMSCs were transfected with adenovirus-mediated CTLA-4Ig gene. The transfection efficiency was identified by observing GFP expression and using FACS detection. The cell shape and cell cycle was compared before and after transfection. CTLA-4Ig protein expression in transfected hMSCs was detected by immunocytochemical method. After induction culture for 3 weeks, the specific markers for osteogenesis were examined. **Results** The isolated and cultured hMSCs were positive for CD105 and negative for CD34. The transfection efficiency of recombinant adenovirus-mediated CTLA-4Ig gene transfection was 81.14%. hMSCs with CTLA-4Ig gene (CTLA-4Ig-hMSCs) did not show marked changes in cell shape and growth. Immunocytochemical detection showed positive CTLA-4Ig expression in CTLA-4Ig-hMSCs and strongly positive alkali phosphatase staining, as well as positive expression of osteocalcin. Macrocyclin fluorescent labeling indicated there were calcium deposits among hMSCs. **Conclusion** hMSCs modified with CTLA4Ig gene can secrete target protein CTLA4Ig and maintain the characteristics of osteogenesis, which has the potential for repairing bone-defect in the bone tissue engineering.

Key words: hMSCs; CTLA-4Ig; gene transfection; induced osteogenesis

基金项目: 国家自然科学青年基金(30300090),疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室专项基金(2003)
Supported by the National Natural Science Foundation for Young Distinguished Scholars (30300090) and the Specific Funds for Chongqing Key Laboratory of Diseases Proteome (2003)

作者简介: 石东文(1965-),男,山东省济宁市人,博士,副教授,主要从事骨组织工程方面的研究。E-mail:shidongwen-1@163.com
*:同等贡献者
通讯作者: 吴 军,E-mail:junwupro@126.com
罗高兴,电话:(023)68754006

收稿日期: 2006-06-14;**修回日期:** 2006-10-30

新型免疫调节分子 CTLA-4Ig 通过阻断 B7-CD28 共刺激通路，可诱导特异性免疫耐受[1]。近年研究表明，CTLA-4Ig 的全身应用和局部基因导入在器官移植中均取得了良好的效果。本课题组前期研究曾经用逆转录病毒载体介导 CTLA-4Ig 基因转染人骨髓间充质干细胞（human marrow mesenchymal stem cells，hMSCs），被修饰细胞及其分化后代能够持续分泌 CTLA-4Ig 蛋白，保持了体外培养分化成骨能力，而且在异种动物体内能够成骨。提示 CTLA-4Ig 基因修饰的 hMSCs 可通过分泌 CTLA-4Ig 蛋白诱导特异性免疫耐受[2]。

但逆转录病毒载体介导的基因转染存在一定的生物安全问题。并且 CTLA-4Ig 在体内的长期持续表达也可能带来对全身免疫功能的不利影响。而腺病毒是一种安全，高效的转染方式，目的基因只在被转染细胞本身短暂表达。组织工程种子细胞只须在细胞移植入体内早期的一定时间内表达，诱导特异性免疫耐受即可达到降低免疫排斥反应的目的。因此，本研究选择腺病毒作为载体介导 CTLA-4Ig 基因转染 hMSCs，观察被修饰细胞 CTLA-4Ig 蛋白表达情况，以及基因修饰对 hMSCs 诱导成骨特性的影响。为异基因 hMSCs 作为骨组织工程种子细胞修复骨缺损的应用研究提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

骨髓取自健康成人自愿者；Adv-CTLA-4Ig-EGFP 病毒，本室构建保存；293 细胞购自中科院上海细胞库；DMEM/ F12 及胎牛血清购自美国 Hyclone 公司；Percoll 细胞分离液购自美国 Pharmacia 公司；FITC 标记鼠抗人 CD105 单抗，PE 标记鼠抗人 CD34 单抗，地塞米松、维生素 C、β-GP 购自美国 Sigma 公司，山羊抗人 CTLA-4 多克隆抗体，山羊抗人 Osteocalcin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司；S-P 免疫组化试剂盒购自北京中杉生物公司。

1.2　hMSCs 的分离、培养和表面标志鉴定[3]

取健康成人骨髓 10 ml，肝素抗凝（60 U/ml），Percoll 密度梯度离心法分离 hMSCs，DMEM/ F12 + 10% FBS 常规培养。胰酶消化第 3 代 hMSCs，分为 4 组，每组 5×10^5 个细胞。实验 1 组：加入 1∶50 FITC-CD105；对照 1 组：加入 1∶1 000 FITC-IgG_{2b}；实验 2 组：加入 1∶10 PE-CD34；对照 2 组：加入 1∶1 000 PE-IgG_1，4℃孵育 30 min；然后用 PBS 洗去多余的抗体，FACS 进行检测。

1.3　CTLA-4Ig 重组腺病毒转染 hMSCs

选择第 2 代 70% 密度的 hMSCs，PBS 冲洗 2 次，将 Adv-CTLA-4Ig-EGFP 病毒液（滴度为 1.4×10^9 pfu/ml）500 μl 和无抗无血清 DMEM 培养基 1.5 ml 混匀后加入培养瓶。37 ℃培养箱转染 1 h，加入 F12-DMEM + 10% FBS 完全培养基。通过观察绿色荧光蛋白的表达和 FACS 检测转染效率。

1.4　免疫细胞化学检测转染 hMSCs 细胞中 CTLA-4Ig 蛋白表达

分别将转染后 5 d 和 28 d 的 hMSCs 培养在载玻片上，待其生长至 70% 融合时，取出以丙酮固定 10 min，PBS 冲洗 3 次，2 min/次。用 S-P 法进行免疫组织化学染色。山羊抗人 CTLA-4Ig 多克隆抗体浓度：1∶400，阴性对照滴加 PBS，DAB 显色 20 min；自来水冲洗。梯度脱水封片。

1.5　CTLA-4Ig-hMSCs 成骨诱导培养

用成骨诱导培养基对 CTLA-4Ig-hMSCs 进行诱导培养，成骨诱导培养 3 周后进行成骨特异性标志检测。成骨诱导培养基配制方法[4]：含 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 加入地塞米松（终浓度：100 nmol/L）、维生素 C（终浓度：0.05 mmol/L）和 β-GP（终浓度：10 mmol/L）。

1.6　CTLA-4Ig-hMSCs 成骨特异性标记检测

1.6.1　碱性磷酸酶染色（改良钙钴法）　用诱导培养 3 周的 CTLA-4Ig-hMSCs 制备细胞爬片，丙酮固定，PBS 洗 3 次，放入基质液中静置 4 h（37 ℃），蒸馏水速洗，2% 硝酸钴处理 4 min，水洗 1 min，1% 黄色硫化铵处理 3 min，水洗 2 ~ 3 min，1% 伊红复染 5 min，水洗，梯度脱水，封片。

1.6.2　骨钙素免疫细胞化学检测　用诱导培养 3 周的 CTLA-4Ig-hMSCs 制备细胞爬片，丙酮固定 10 min，PBS 洗 3 次，2 min/次。用 S-P 法进行免疫组织化学染色。鼠抗人骨钙素多克隆抗体浓度：1∶500，DAB 避光显色 10 min；自来水振洗终止反应。梯度脱水封片。

1.6.3　钙的四环素荧光标记法　诱导培养至出现结节后，以含 0.1 mg/ml 四环素的成骨诱导培养液培养 30 min；更换成骨诱导培养液培养 30 min；取出细胞爬片，PBS 洗 3 次；75% 酒精固定 30 min；荧光显微镜观察、照相。

2　结果

2.1　hMSCs 分离培养和鉴定

24 h 后可见少量梭形细胞贴壁，10 ~ 12 d，细胞生长达到 80% ~ 100% 融合，细胞呈梭形，漩涡样排列（图 1），传代后细胞生长迅速。第 3 代细胞 FACS 检测结果显示：分离培养的细胞 90.8% 表达 CD105 表达，96.2% CD34 为阴性。



图 1　分离培养 10 d 的 hMSCs（倒置显微镜 ×200）

2.2　重组腺病毒 CTLA-4Ig 基因转染 hMSCs

转染后 48 h 可见少量细胞表达绿色荧光，随后逐渐增多，

第5天达高峰，FACS检测转染率为81.14%（图2），第28天明显减弱。

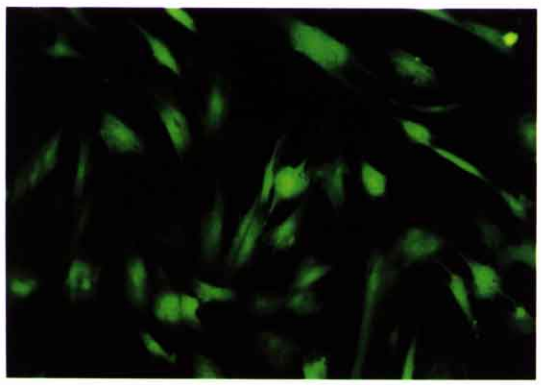


图2 AdvCTLA4Ig-EGFP感染hMSCs 5 d绿色荧光蛋白的表达（荧光显微镜×200）

2.3 CTLA-4Ig蛋白在hMSCs中的表达

多数转染后5 d的hMSCs细胞在细胞质中可见CTLA4-Ig蛋白阳性表达，核周围最明显（图3），根据表达强弱和范围分为3个等级："++"深棕色，充满整个细胞，"+"浅棕色，主要表达在细胞浆，"-"无表达。计数10个高倍镜视野下各表达强度细胞的百分率，结果见表1。

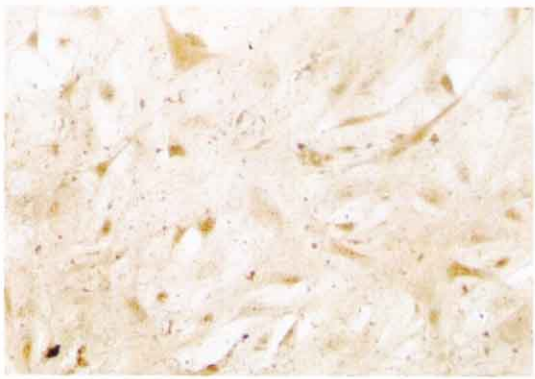


图3 CTLA4Ig在hMSCs中的表达（S-P ×100）

表1 CTLA4-Ig蛋白在hMSCs细胞中的表达率（%）

转染时间	CTLA4-I蛋白表达分级		
	++	+	-
CTLA4-Ig转染hMSCs 5 d	48	37	15
CTLA4-Ig转染hMSCs 28 d	26	29	45

2.4 hMSCs成骨诱导培养和成骨特异性标记检测

诱导培养的CTLA-4Ig-hMSCs，第12天可以见到细胞聚集成团现象。诱导2周内细胞形态和生长速度无明显的变化，2周后细胞逐渐变大，变短，多角形细胞增多。诱导3周的细胞碱性磷酸酶染色显示多数细胞呈阳性（图4）。免疫细胞化学检测见到骨钙素阳性表达细胞，骨钙素表达在细胞质中，核周围呈强阳性（图5）。在细胞聚集成团区域钙的四环素荧光标记法显示有钙的沉积（图6）。



图4 诱导3周的hMSCs碱性磷酸酶染色（钙-钴法×200）

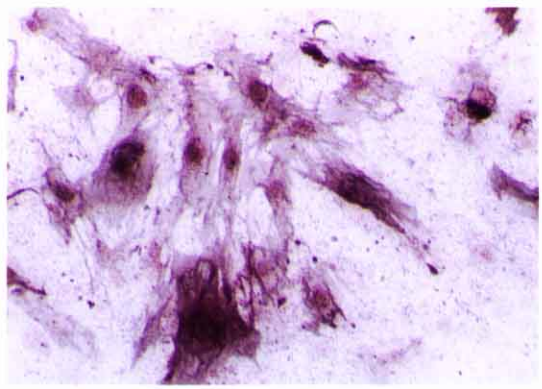


图5 诱导3周的hMSCs骨钙素免疫组化染色（S-P×200）

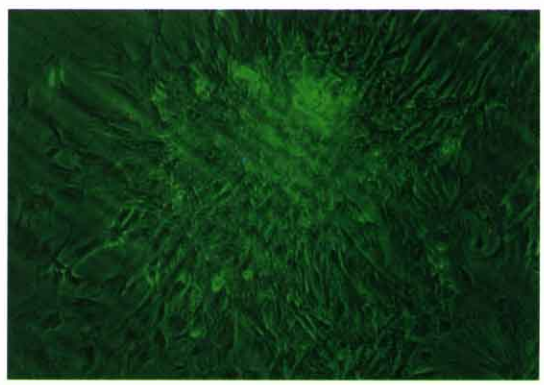


图6 诱导培养3周hMSCs聚集成团，四环素荧光标记显示有钙沉积（四环素荧光标记×100）

3 讨论

在hMSCs生物学特性的研究中，尽管有证据表明，hMSCs的免疫原性较低，但其并非完全的免疫赦免细胞[5,6]。代飞等[7]研究还证明，hMSCs的成骨分化后代的免疫原性增加，一定数量细胞在体外能够刺激PBMCs增殖，其在异基因宿主体内可能引起免疫排斥反应。因此，异基因组织工程骨移植必然要面临免疫

排斥反应问题。

CTLA-4Ig是细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4)与IgGFc段的基因重组融合蛋白,可阻断抗原特异性T细胞活化过程起重要作用的B7-CD28共刺激通路,从而导致这类T细胞的无能或凋亡,对控制器官移植排斥反应的发生具有重要作用[1]。实验研究表明,CTLA-4Ig在心脏移植,肢体复合组织移植中,全身应用和局部基因导入均取得了良好的效果[8,9]。而局部应用则可避免同时存在的病原体的耐受和诱发感染。因此,我们认为用分子生物学手段,使组织工程种子细胞在移植局部表达CTLA-4Ig,诱导局部特异性免疫耐受可能会成为解决异基因移植免疫反应的良好策略。

本课题组前期研究[2]表明,用逆转录病毒载体介导CTLA-4Ig基因转染hMSCs,被修饰细胞及其分化后代能够持续分泌CTLA-4Ig蛋白,异种移植动物体内能够成骨。提示CTLA-4Ig基因修饰的可能通过分泌CTLA-4Ig蛋白诱导特异性免疫耐受,使其分化后代免疫原性降低或抗排斥反应能力增强,有利于异基因移植时的定植和分化。逆转录病毒载体介导的基因转染能够将外源基因整合到细胞基因组中并传向子代,使目的蛋白得以持续表达。对于细胞基因改造,筛选获得新细胞株和某些疾病的基因治疗是一种理想的转染方式,但若有辅助病毒的产生,则存在诱导成肿瘤的生物安全问题。并且CTLA-4Ig在体内的长期持续表达也可能带来对全身免疫功能的不利影响。

复制缺陷型腺病毒是一种安全,高效的转染方式[10],目的基因只在被转染细胞本身表达。组织工程种子细胞只须在细胞移植入体内早期的一定时间内表达,诱导特异性免疫耐受即可达到降低免疫排斥反应的目的,因此,本研究选择腺病毒作为载体介导CTLA-4Ig基因转染hMSCs,转染率达81.14%。在本实验中,转染28 d的hMSCs中仍能检测到CTLA-4Ig蛋白的表达,并且基因转染对hMSCs细胞的形态没有明显的影响,保持了体外培养分化成骨能力。如果将这种细胞用于异种移植体内动物实验,持续28 d的CTLA-4Ig蛋白表达,可在成骨早期阶段诱导局部特异性免疫耐受。并且不存在CTLA-4Ig在体内的长期持续表达可能带来的对全身免疫功能的不利影响。

本研究结果表明,腺病毒介导的CTLA-4Ig基因转染hMSCs,转染效率高,可持续表达CTLA-4Ig蛋白4周以上,保持了诱导成骨分化的潜能。为异基因hMSCs作为组织工程骨种子细胞修复骨缺损的应用研究提供了依据。

参考文献:

[1] Lin H, Wei R Q, Goodman R E, *et al*. CD28 blockade alters cytokine mRNA profiles in cardiac transplantation[J]. Surgery, 1997, 122(2): 129-137.

[2] 代　飞,吴　军,许建中,等. 基因修饰人骨髓间充质干细胞作为骨组织工程种子细胞异种移植的实验研究[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(11): 838-844.

[3] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[4] Jaiswal N, Haynesworth S E, Caplan A I, *et al*. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*[J]. J Cell Biochem, 1997, 64(2): 295-312.

[5] Niemeyer P, Seckinger A, Simank H G, *et al*. Allogenic transplantation of human mesenchymal stem cells for tissue engineering purposes: an *in vitro* study[J]. Orthopade, 2004, 33(12): 1346-1353.

[6] Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, *et al*. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice[J]. Blood, 2005, 106(13): 4057-4065.

[7] 代　飞,吴　军,许建中,等. 体外成骨诱导增加人骨髓间充质干细胞刺激PBMCs增殖[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(16): 1652-1655.

[8] Guillot C, Mathieu P, Coathalem H, *et al*. Tolerance to cardiac allografts *via* local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression[J]. J Immunol, 2000, 164(10): 5258-5268.

[9] Kanaya K, Tsuchida Y, Inobe M, *et al*. Combined gene therapy with adenovirus vectors containing CTLA4Ig and CD40Ig prolongs survival of composite tissue allografts in rat model[J]. Transplantation, 2003, 75(3): 275-281.

[10] Hendrie P C, Russell D W. Gene targeting with viral vectors[J]. Mol Ther, 2005, 12(1): 9-17.

(编辑　张大春)

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》,本刊实行三位分节法(即从小数点算起,向左向右每3位分1节,节间留出一定空隙),废除千分撇分节法(如2,431改为2 431)。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字,凡属计数数值,一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部