doi:10.11659/jjssx.06E021141

·基础研究·

# 复合 CTLA4 的脱钙骨基质抑制 T 淋巴细胞免疫能力和增强骨髓间充质干细胞迁移能力的体外作用研究

宋 磊[1],周 锐[1],何 磊[1],肖 军[2],代 飞[1] (1.陆军军医大学第一附属医院骨科,重庆 400038;2.火箭军广州特勤疗养中心特勤生理训练科,广东 广州 515515)

[摘 要] **目的** 分析复合细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(CTLA4)的脱钙骨基质(DBM)对 T 淋巴细胞免疫能力和骨髓间充质干细胞(BMMSCs)迁移能力的体外调控作用。**方法** 通过特殊负压灌注装置将纤维蛋白凝胶复合 CTLA4 溶液灌注到 DBM,构建复合 CTLA4 的 DBM,并通过扫描电镜观察其微观形态。分离外周血单核细胞(PBMCs),通过植物血凝素(PHA)激活 T 淋巴细胞来构建免疫激活微环境。将复合 CTLA4 的 DBM 在培养基中孵育 5、10、20、30、40 d,ELISA 检测 CTLA4 的浓度,由此计算 CTLA4 的累积释放率。将 PHA 预处理的 PBMCs 与复合 CTLA4 的 DBM 进行 Transwell 共培养,ELISA 检测培养基中 IL-2 和 IFN-γ 的含量。分离 BMMSCs,Transwell 共培养法分析复合 CTLA4 的 DBM 对 BMMSCs 增殖和迁移能力的影响。**结果** 复合 CTLA4 的 DBM 结构完整有序,具有良好的三维网络结构。复合材料中 CTLA4 在 5、10、20、30、40 d 的累积释放率分别为(11.3% ±1.9%)、(27.9% ±3.7%)、(48.4% ±3.6%)、(62.8% ±3.8%)和(83.0% ±2.5%)。与单纯的 DBM 相比,与复合 CTLA4 的 DBM 共培养可显著减少培养基中 IL-2($P=0.000\ 4$)和 IFN-γ($P=0.000\ 7$)的含量,增强 BMMSCs 的增殖能力($P=0.000\ 6$)和迁移能力($P=0.000\ 4$)。**结论** 复合CTLA4 的 DBM 在体外环境下具有抑制 T 淋巴细胞免疫能力和增强 BMMSCs 迁移能力的作用。

[关键词] 脱钙骨基质;细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4;缓释效率;T 淋巴细胞;干细胞

[中图分类号] R318.08 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-06-29

[基金项目] 全军医学科技青年培育计划拔尖项目(16QNP104)

[通信作者] 代 飞,E-mail:david-feifei@163.com

[2] Pitotti C,David J. An evidence-based approach to nonoperative management of traumatic hemorrhagic shock in the emergency department[J]. Emerg Med Pract,2020,22(11):1-24.

[3] Levine B,Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. Cell,2008,132(1):27-42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018.

[4] Mizushima N,Levine B. Autophagy in human diseases[J]. N Engl J Med,2020,383(16):1564-1576. doi:10.1056/NEJMra2022774.

[5] Gu S,Tan J,Li Q,et al. Downregulation of LAPTM4B contributes to the impairment of the autophagic flux via unopposed activation of mTORC1 signaling during myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Circ Res,2020,127(7):e148-e165. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.316388.

[6] Xiao C,Wang K,Xu Y,et al. Transplanted mesenchymal stem cells reduce autophagic flux in infarcted hearts via the exosomal transfer of miR-125b[J]. Circ Res,2018,123(5):564-578. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.312758.

[7] Liu J,Gu Y,Guo M,et al. Neuroprotective effects and mechanisms of ischemic/hypoxic preconditioning on neurological diseases[J]. CNS Neurosci Ther,2021,27(8):869-882. doi:10.1111/cns.13642.

[8] Yu Y,Yan Y,Niu F,et al. Ferroptosis:a cell death connecting oxidative stress,inflammation and cardiovascular diseases[J]. Cell Death Discov,2021,7(1):193. doi:10.1038/s41420-021-00579-w.

[9] Dixon SJ,Lemberg KM,Lamprecht MR,et al. Ferroptosis:an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell,2012,149(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042.

[10] Jiang X,Stockwell BR,Conrad M. Ferroptosis:mechanisms,biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2021,22(4):266-282. doi:10.1038/s41580-020-00324-8.

[11] Yoshida M,Minagawa S,Araya J,et al. Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis[J]. Nat Commun,2019,10(1):3145. doi:10.1038/s41467-019-10991-7.

[12] Zhu J,Xiong Y,Zhang Y,et al. The molecular mechanisms of regulating oxidative stress-induced ferroptosis and therapeutic strategy in tumors[J]. Oxid Med Cell Longev,2020,2020:8810785. doi:10.1155/2020/8810785.

[13] Lei Y,Peng X,Hu Y,et al. The calcilytic drug calhex-231 ameliorates vascular hyporesponsiveness in traumatic hemorrhagic shock by inhibiting oxidative stress and miR-208a-mediated mitochondrial fission[J]. Oxid Med Cell Longev,2020,2020:4132785. doi:10.1155/2020/4132785.

[14] Yang G,Peng X,Wu Y,et al. Involvement of connexin 43 phosphorylation and gap junctional communication between smooth muscle cells in vasopressin-induced ROCK-dependent vasoconstriction after hemorrhagic shock[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2017,313(4):C362-C370. doi:10.1152/ajpcell.00258.2016.

[15] 雷 艳,彭小勇,李 涛,等. 抑钙剂 NPS 2143 对创伤失血性休克大鼠心血管功能的影响[J]. 局解手术学杂志,2018,27(6):387-390. doi:10.11659/jjssx.02E018036.

[16] Liu J,Kuang F,Kroemer G,et al. Autophagy-dependent ferroptosis:machinery and regulation[J]. Cell Chem Biol,2020,27(4):420-435. doi:10.1016/j.chembiol.2020.02.005.

[17] Mei Y,Thompson MD,Cohen RA,et al. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. Biochim Biophys Acta,2015,1852(2):243-251. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.005.

[18] Hariharan N,Zhai P,Sadoshima J. Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion[J]. Antioxid Redox Signal,2011,14(11):2179-2190. doi:10.1089/ars.2010.3488.

(编辑:魏 源)

**In vitro effects of demineralized bone matrix compounded with CTLA4 on inhibiting immune ability of T lymphocyte and enhancing migration ability of bone marrow mesenchymal stem cells**

SONG Lei[1], ZHOU Rui[1], HE Lei[1], XIAO Jun[2], DAI Fei[1] (1. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Special Service Physiological Training, Guangzhou Special Service Recuperation Center of Rocket Force, Guangzhou Guangdong 515515, China)

**Abstract: Objective** To analyze the regulatory effects of demineralized bone matrix (DBM) compounded with cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) on the immune ability of T lymphocyte and migration ability of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) in vitro. **Methods** The fibrin gel composite CTLA4 solution was poured into the DBM by a special negative pressure perfusion device to construct a DBM compounded with CTLA4, and its microscopic morphology was observed by a scanning electron microscope. The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated, and the T lymphocyte was activated by phytohaemagglutinin (PHA) to construct an immune-activated microenvironment. The DBM compounded with CTLA4 was incubated in the medium for 5, 10, 20, 30, and 40 days, and the concentration of CTLA4 was determined by ELISA to calculate the cumulative release rate of CTLA4. PBMCs pretreated with PHA were co-cultured with DBM compounded with CTLA4 by Transwell, and the contents of IL-2 and IFN-γ in the medium were detected by ELISA. The BMMSCs were isolated, and the Transwell co-culture method was used to analyze the effects of DBM compounded with CTLA4 on the proliferation and migration ability of BMMSCs. **Results** The structure of DBM compounded with CTLA4 was complete and orderly, with a good three-dimensional network structure. The cumulative release rates of CTLA4 in the composite material 5, 10, 20, 30, and 40 days were (11.3% ±1.9%), (27.9% ±3.7%), (48.4% ±3.6%), (62.8% ±3.8%), and (83.0% ±2.5%), respectively. Compared with DBM alone, co-culture with DBM compounded with CTLA4 could significantly reduce the contents of IL-2 ($P$ = 0.000 4) and IFN-γ ($P$ = 0.000 7) in the medium, enhance the proliferation ability ($P$ = 0.000 6) and migration ability ($P$ = 0.000 4) of BMMSCs. **Conclusion** The DBM compounded with CTLA4 can inhibit the immune ability of T lymphocytes and enhance the migration ability of BMMSCs in vitro.

**Keywords**: demineralized bone matrix; cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; sustained release efficiency; T lymphocyte; stem cell

因创伤、感染、肿瘤、骨坏死及先天畸形等多种疾病引起的骨缺损在临床上较为常见,但治疗仍较为困难。近年来,骨组织工程的发展为骨缺损的修复开辟了新的途径,其中支架材料是骨组织工程研究的关键[1]。尽管支架材料在基础研究方面取得了较大进展,但在大规模临床应用中仍存在许多需要解决的问题,如慢性炎症反应和异物反应导致的骨修复失败等[2]。通过人工引入免疫调控因子将有可能克服支架材料带来的不利因素,营造有利于成骨的骨免疫微环境。细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, CTLA4)是一种 T 淋巴细胞表面蛋白,作为一类免疫抑制因子,对激活 T 淋巴细胞具有负性调控的作用[3]。研究发现,在体外免疫激活的环境下,过表达 CTLA4 可以显著提高骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)的成骨分化能力[4]。体内实验表明,与脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)复合的CTLA4 修饰的 BMMSCs 成骨分化能力明显增强[4-5]。另外,通过对相关机制的研究发现,在免疫激活环境下,CTLA4 可通过促进 BMMSCs 中骨膜蛋白(periostin, POSTN)和促红细胞生成素肝细胞受体 B4(erythropoietin-producing hepatocellular receptor B4, EphB4)的表达增强 BMMSCs 的成骨分化能力[4-5],且 CTLA4 修饰的 BMMSCs 可以在免疫激活环境下增强异体 BMMSCs 的迁移能力[6]。这些研究结果提示,CTLA4 修饰的 BMMSCs 具有免疫调控作用。但是目前异体间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植治疗在临床中的安全性及有效性尚无明确定论,导致其在临床上的推广应用受限。另外,构建携带异体 MSCs 的组织工程骨由于受细胞培养时间及无菌环境要求的限制,不能很好地满足战场环境大批量伤员及时救治的需要。因此,我们提出新的构想:去除异体 MSCs 这一因素,构建复合 CTLA4 的新型骨移植修复材料。本文通过分析复合 CTLA4 的 DBM 对 T 淋巴细胞免疫能力和 BMMSCs 迁移能力的体外调控作用,以期为该新型骨移植修复材料的临床应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

猪源纤维蛋白凝胶(广州倍绣生物)、人 CTLA4 蛋白(Abbexa)、DBM(北京鑫康辰)、植物血凝素(PHA, SIGMA)、EasySep 人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)全血直接分选试剂盒(上海珞焱生物)、Human IL-2 Quantikine ELISA Kit(R&D Systems)、Human IFN-γ Quantikine ELISA Kit(R&D Systems)、Cell Counting Kit-8 试剂盒(日本同仁化学)、Transwell 小室(Corning)、24 孔细胞培养板(Corning)、RPMI1640 和胎牛血清(Gibco)。

1.2 方法

1.2.1 复合 CTLA4 的 DBM 的制备 制备纤维蛋白凝胶复合 CTLA4 溶液,CTLA4 浓度为 100 μg/mL。将 DBM 制成直径 12 mm、厚度 5 mm 的圆片,使用前高温灭菌。通过特殊负压灌注装置(专利号:ZL2013 20058080.7)构建复合 CTLA4 的 DBM。按照常规方法进行扫描电镜样品的制备,观察复合 CTLA4 的 DBM 的微观形态。

1.2.2 PBMCs 分离 抽取健康成人(志愿者)外周血 10 mL,置于含有 3 000 U 肝素的 50 mL 离心管中;按照 EasySep 人 PBMC 全血直接分选试剂盒的方法步骤进行 PBMCs 分离;最后用 RPMI1640 + 10% 胎牛血清培养基重悬 PBMCs,计数备用。

1.2.3 T 淋巴细胞免疫激活诱导 在体外利用植物血凝素(phytohaemagglutinin,PHA)20 μg/mL 激活 PBMCs 中的 T 淋巴细胞,构建免疫激活微环境。

1.2.4 CTLA4 蛋白缓释实验 将制备的复合 CTLA4的 DBM 依次放入 24 孔细胞培养板中,加入约 1 mL的 RPMI1640 细胞基础培养基。放置于细胞培养箱中,分别于 5、10、20、30、40 d 后取约 200 μL 的培养基,通过 ELISA 检测培养基中 CTLA4 的浓度。根据以下公式计算 CTLA4 的累积释放率:CTLA4 的累积释放率 =(培养基中 CTLA4 的浓度 ×1 mL)/复合 DBM 中的 CTLA4 总量 ×100%。

1.2.5 ELISA 检测 IL-2 和 IFN-γ 的表达 按照如下条件进行分组,构建 Transwell 共培养模型。DBM 组:在 Transwell 下室接种 PBMCs,PHA 预处理 24 h 后,在上室加入不复合 CTLA4 的 DBM,共培养 12 h 后,收集下室细胞培养基。CTLA4 + DBM 组:在 Transwell下室接种 PBMCs,PHA 预处理 24 h 后,在上室加入复合 CTLA4 的 DBM,共培养 12 h 后,收集下室细胞培养基。ELISA 检测:按照 Human IL-2 Quantikine ELISA Kit 和 Human IFN-γ Quantikine ELISA Kit 的方法检测 IL-2 和 IFN-γ 在上述培养基中的含量。

1.2.6 BMMSCs 增殖能力分析 参照本研究小组以往的实验方法分离 BMMSCs[7-8]。将 600 μL 含 $1 \times 10^5$ BMMSCs的细胞悬液加入到 Transwell 下室,上室中加入复合 CTLA4 的 DBM 或不复合 CTLA4 的 DBM,并加入 200 μL 含 10% 胎牛血清的培养基,置于 37 ℃培养箱中孵育,分别于 2 d 和 3 d 后按照 CCK8 试剂盒说明书测定每组样品的吸光度(optical density,OD)值,测定波长为 450 nm。

1.2.7 BMMSCs 迁移能力分析 将 100 μL 含 $1 \times 10^4$ BMMSCs 的细胞悬液加入到 Transwell 上室,下室中加入复合 CTLA4 的 DBM 或不复合 CTLA4 的 DBM,并加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的培养基,置于 37 ℃培养箱中孵育 24 h 后,取出 Transwell 小室,用 PBS 洗 2 次,5% 戊二醇固定,加入 0.5% 结晶紫染色液染色 5 min,PBS 洗 2 次,用棉花球擦去上表面未穿过的细胞,显微镜下观察穿过的细胞,计数 5 个 200 倍镜视野下细胞的数量,取平均值作为每组的迁移细胞数。

1.3 统计学分析

所有结果重复 3 次,以 3 次数据的均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示实验结果。采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据统计,ELISA 实验结果和 Transwell 细胞迁移数采用非配对 $t$ 检验,细胞增殖实验结果采用双因素方差分析。$P < 0.05$表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 复合 CTLA4 的 DBM 的电镜形态

制备的复合 CTLA4 的 DBM 结构完整有序,具有良好的三维网络结构(图 1)。

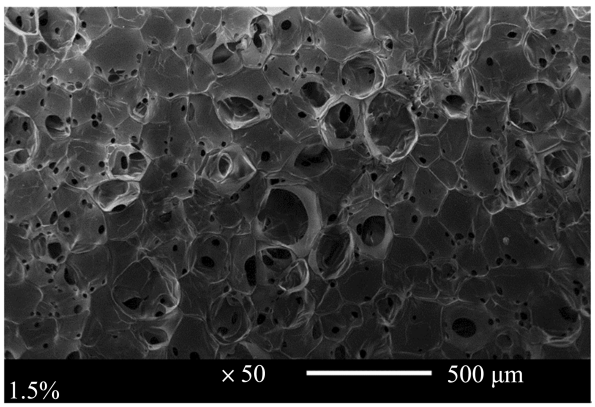



**图 1 复合 CTLA4 的 DBM 的扫描电镜形态图**

2.2 CTLA4 蛋白累积释放率

复合 CTLA4 的 DBM 在培养基中孵育 5、10、20、30、40 d 后,CTLA4 的累积释放率分别为(11.3% ± 1.9%)、(27.9% ± 3.7%)、(48.4% ± 3.6%)、(62.8% ±3.8%)和(83.0% ±2.5%),见图 2。

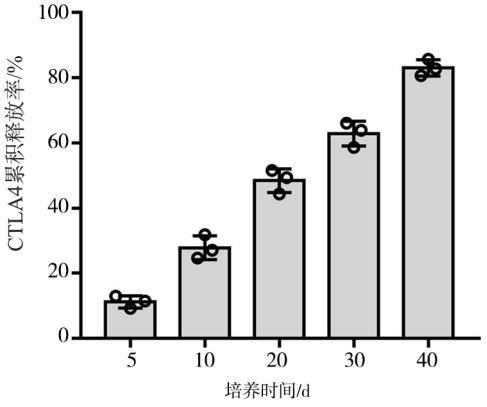
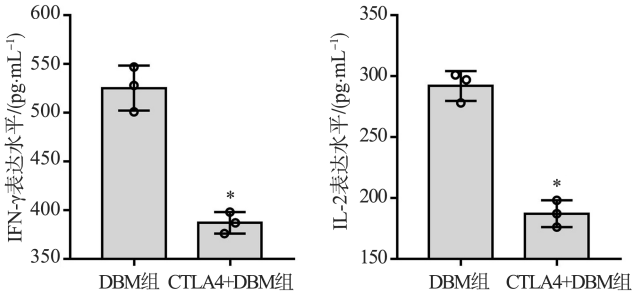



**图 2 复合 CTLA4 的 DBM 的 CTLA4 累积释放率**

2.3　复合 CTLA4 的 DBM 对 IL-2 和 IFN-γ 表达的影响

DBM 组培养基中 IL-2 的含量为(292.0 ± 12.3)pg·mL$^{-1}$,CTLA4 + DBM 组培养基中 IL-2 的含量为(187.0 ± 11.0)pg·mL$^{-1}$,二者比较差异有统计学意义($P$ = 0.000 4)。DBM 组培养基中 IFN-γ 的含量为(525.3 ± 23.1)pg·mL$^{-1}$,CTLA4 + DBM 组培养基中 IFN-γ 的含量为(387.0 ± 11.0)pg·mL$^{-1}$,二者比较差异有统计学意义($P$ = 0.000 7),见图 3。与单纯的 DBM 相比,复合 CTLA4 的 DBM 共培养可显著减少培养基中 IL-2 和 IFN-γ 的含量。

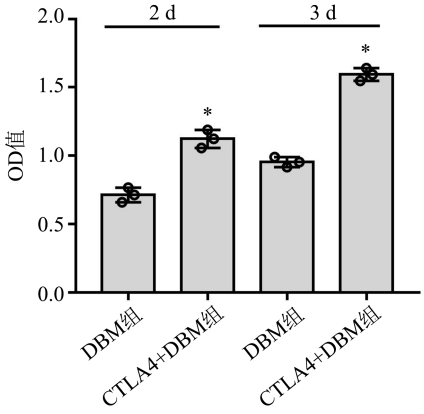



*:与 DBM 组比较,$P$ < 0.05

**图 3　复合 CTLA4 的 DBM 对 IL-2 和 IFN-γ 表达的影响**

2.4　复合 CTLA4 的 DBM 对 BMMSCs 增殖能力的影响

共培养 2 d 时,DBM 组的 OD 值为(0.71 ± 0.05),CTLA4 + DBM 组的 OD 值为(1.12 ± 0.07),二者比较差异有统计学意义($P$ = 0.003 1);共培养 3 d 时,DBM 组的 OD 值为(0.95 ± 0.04),CTLA4 + DBM 组的 OD 值为(1.59 ± 0.05),二者比较差异有统计学意义($P$ = 0.000 6),见图 4。与单纯的 DBM 相比,复合 CTLA4的 DBM 共培养可显著增强 BMMSCs 的增殖能力。

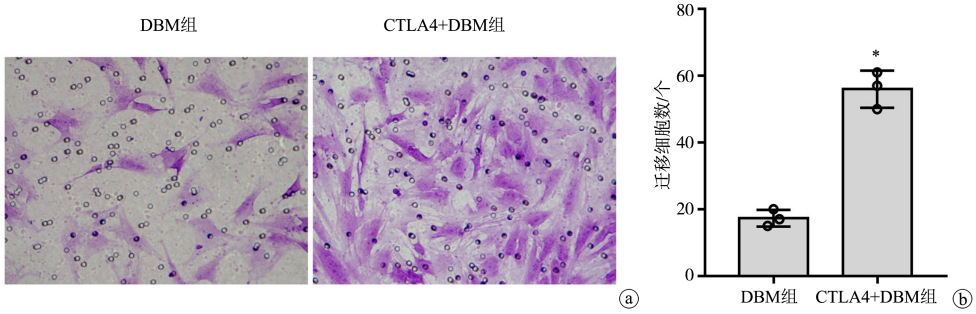



*:与 DBM 组比较,$P$ < 0.05

**图 4　复合 CTLA4 的 DBM 对 BMMSCs 增殖能力的影响**

2.5　复合 CTLA4 的 DBM 对 BMMSCs 迁移能力的影响

DBM 组迁移细胞数为(17.3 ± 2.5)个,CTLA4 + DBM 组迁移细胞数为(56.0 ± 5.6)个,二者比较差异有统计学意义($P$ = 0.000 4),见图 5。与单纯的 DBM 相比,复合 CTLA4 的 DBM 共培养可显著增强 BMMSCs 的迁移能力。




a:显微镜下迁移细胞数(×200);b:迁移细胞数统计结果　*:与 DBM 组比较,$P$ < 0.05

**图 5　复合 CTLA4 的 DBM 对 BMMSCs 迁移能力的影响**

## 3　讨论

目前,对于异体 MSCs 移植治疗在临床中的安全性及有效性尚无明确定论,导致其在临床上的推广运用十分受限[9-10]。与此同时,考虑到在战场环境中需要及时大批量的进行伤员救治,而构建携带异体 MSCs 的组织工程骨由于受细胞培养时间及无菌环境要求的限制,不能很好地满足战场救治的需要。有研究提示,作为免疫负调控因子的 CTLA4 可能具备骨微环境免疫调控的能力[11]。因此,本研究去除异体 MSCs 这一因素,通过将 CTLA4 复合于 DBM 中,以此来构建复合 CTLA4 的新型组织工程骨,以期优化骨免疫微环境,营造有利的成骨微环境,解决骨支架材料存在的“骨微环境调控缺陷”[12]。

本研究发现,复合 CTLA4 的 DBM 具有 CTLA4 缓释的特点,在长达 40 d 的孵育过程中,CTLA4 一直有缓慢的释放。相比携带异体 MSCs 的组织工程骨,该材料更加易于保存和运输,有更加广阔的应用前景。

免疫反应与骨再生的过程密切相关。免疫细胞是骨再生微环境的中心调控者,其创造的免疫微环境对

成骨与破骨活动具有显著影响,在骨再生过程中发挥了关键作用[13]。T 淋巴细胞是免疫系统的重要成员。IL-2 是促进 T 淋巴细胞增殖和分化的关键分子,被称作 T 淋巴细胞生长因子[14-15]。本研究结果显示,复合 CTLA4 的 DBM 对 IL-2 的表达具有抑制作用,说明复合 CTLA4 的 DBM 对 T 淋巴细胞的活化具有抑制作用。在干细胞促骨形成方面,促炎的 T 淋巴细胞通过 IFN-γ 降低干细胞内 Runx-2 通路并增强 TNF-α 信号,抑制外源性 BMMSCs 介导的骨修复能力[16-17]。本研究结果显示,复合 CTLA4 的 DBM 可以抑制 T 淋巴细胞分泌 IFN-γ,说明 CTLA4 可以改善 DBM 的成骨免疫微环境,促进成骨。去除 MSCs 这一因素,重组 CTLA4 蛋白仍可发挥免疫抑制的作用。因此,重组 CTLA4 蛋白有可能替代 CTLA4 修饰的 MSCs 成为新的组织工程骨成骨效能优化因子。

我们前期的研究表明,即使在免疫激活的微环境下,过表达 CTLA4 的 BMMSCs 的成骨能力仍明显增强[4],且能增强异体 BMMSCs 的迁移能力,提示过表达 CTLA4 的 BMMSCs 可能具有诱导宿主干细胞归巢的能力[6]。本研究结果显示,复合 CTLA4 的 DBM 能增强 BMMSCs 的迁移能力。提示去除 MSCs 这一因素,重组 CTLA4 蛋白仍具有促进干细胞迁移的能力。本研究结果还显示,复合 CTLA4 的 DBM 能增强 BMMSCs 的增殖能力。因此我们推测,在体内环境下,复合 CTLA4 的 DBM 可能具有诱导宿主 BMMSCs 迁移至损伤部位并促进其增殖的功能,在今后的体内实验中将进一步验证该材料的功能,为其临床应用提供更加扎实的理论基础。

综上,复合 CTLA4 的 DBM 在体外环境下具有 T 淋巴细胞免疫抑制的能力,是一种新型骨移植修复材料,这种材料可以提前构建,在无菌封装后进行冷冻保存,可保证在战场条件下满足携带方便、随时补给、高效简洁的需求。但其临床应用效果仍需要大量的实验数据支撑。我们将在今后的实验中探讨其在体内环境下对免疫微环境的调控功能以及是否具有促进成骨的效能。

## [参考文献]


[1] Orciani M, Fini M, Di Primio R, et al. Biofabrication and bone tissue regeneration: cell source, approaches, and challenges[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2017, 5: 17. doi: 10.3389/fbioe.2017.00017.

[2] Longoni A, Knezevic L, Schepers K, et al. The impact of immune response on endochondral bone regeneration[J]. NPJ Regen Med, 2018, 3: 22. doi: 10.1038/s41536-018-0060-5.

[3] Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4[J]. Science, 2011, 332(6029): 600-603. doi: 10.1126/science.1202947.

[4] Zhang F, Zhang Z, Sun D, et al. EphB4 promotes osteogenesis of CTLA4-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells through cross talk with Wnt pathway in xenotransplantation[J]. Tissue Eng Part A, 2015, 21(17-18): 2404-2416. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0012.

[5] Zhang F, Rong Z, Wang Z, et al. Periostin promotes ectopic osteogenesis of CTLA4-modified bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Cell Tissue Res, 2017, 370(1): 143-151. doi: 10.1007/s00441-017-2655-3.

[6] Song L, Zhang F, Zhou R, et al. hCTLA4-gene-modified human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBMMSCs) maintain POSTN secretion to enhance the migration capability of allogeneic hBMMSCs through the integrin αvβ3/FAK/ERK signaling pathway[J]. Stem Cells Int, 2020, 2020: 3608284. doi: 10.1155/2020/3608284.

[7] Dai F, Zhang F, Sun D, et al. CTLA4 enhances the osteogenic differentiation of allogeneic human mesenchymal stem cells in a model of immune activation[J]. Braz J Med Biol Res, 2015, 48(7): 629-636. doi: 10.1590/1414-431x20154209.

[8] Dai F, Shi D, He W, et al. hCTLA4-gene modified human bone marrow-derived mesenchymal stem cells as allogeneic seed cells in bone tissue engineering[J]. Tissue Eng, 2006, 12(9): 2583-2590. doi: 10.1089/ten.2006.12.2583.

[9] Kiernan CH, Wolvius EB, Brama PAJ, et al. The immune response to allogeneic differentiated mesenchymal stem cells in the context of bone tissue engineering[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2018, 24(1): 75-83. doi: 10.1089/ten.TEB.2017.0175.

[10] Yuan X, Qin X, Wang D, et al. Mesenchymal stem cell therapy induces FLT3L and CD1c$^+$ dendritic cells in systemic lupus erythematosus patients[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2498. doi: 10.1038/s41467-019-10491-8.

[11] Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy[J]. Blood, 2018, 131(1): 58-67. doi: 10.1182/blood-2017-06-741033.

[12] 陈泽涛,王小双,张琳珺. 基于“骨免疫微环境调控”的骨替代材料研发理念[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(11): 688-698. doi: 10.7694/jldxyxb20130541.

[13] Chen Z, Klein T, Murray RZ, et al. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials[J]. Mater Today, 2016, 19(6): 304-321. doi: 10.1016/j.mattod.2015.11.004.

[14] Raker VK, Becker C, Landfester K, et al. Targeted activation of T cells with IL-2-coupled nanoparticles[J]. Cells, 2020, 9(9): 2063. doi: 10.3390/cells9092063.

[15] Abbas AK, Trotta E, R Simeonov D, et al. Revisiting IL-2: biology and therapeutic prospects[J]. Sci Immunol, 2018, 3(25): eaat1482. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1482.

[16] Liu Y, Wang L, Kikuiri T, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-γ and TNF-α[J]. Nat Med, 2011, 17(12): 1594-1601. doi: 10.1038/nm.2542.

[17] Amarasekara DS, Kim S, Rho J. Regulation of osteoblast differentiation by cytokine networks[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 2851. doi: 10.3390/ijms22062851.


(编辑:魏 源)