DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.015
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1284 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1284-03

# 腺病毒介导 CTLA4Ig 基因转染骨髓基质细胞及其对 $CD34^+$ 细胞粘附力的影响

王吉刚[1],梁后杰[1],史曦凯[1],陈洁平[1],张翼军[1],夏顺中[1],罗高兴[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]肿瘤血液科;[2]全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 通过腺病毒介导 CTLA4Ig 在骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSCs)中的表达,探讨 CTLA4Ig 基因修饰的 BMSCs 对 $CD34^+$ 细胞的粘附力的变化。方法 以 CTLA4Ig-重组腺病毒按感染复数(Mutiplicity of infection, MOI)50 转染 BMSCs,免疫组织细胞化学确定 CTLA4Ig 的表达,免疫磁珠(MACS)阳性选择分选骨髓 $CD34^+$ 细胞,流式细胞仪检测其纯度,通过测定粘附于 BMSCs 的 $^3$H-TdR 标记 $CD34^+$ 细胞的 cpm 值观察 CTLA4Ig 基因修饰的骨髓基质细胞的粘附力变化。结果 免疫细胞化学染色示 CTLA4Ig 表达阳性率达 85%(MOI=50),弥漫性定位于细胞质;免疫磁珠阳性选择获取的骨髓 $CD34^+$ 细胞纯度可高达 97.8%;转染组与对照组 BMSCs 对 $CD34^+$ 细胞的粘附力无显著差异($P>0.05$)。结论 CTLA4Ig-重组腺病毒能有效介导 CTLA4Ig 基因在 BMSCs 中表达,并对其粘附力无显著影响。

关键词:CTLA-4;骨髓基质细胞;腺病毒载体;免疫耐受;共刺激信号
中图法分类号:R331.2;R392.12;R394.2 文献标识码:A

# Transfection of CTLA4Ig-gene in BMSCs and its effects on adherence of the cells to $CD34^+$ cells

WANG Ji-gang, LIANG Hou-jie, SHI Xi-kai, CHENG Jie-ping, ZHANG Yi-jun, XIA Shun-zhong, LUO Gao-xing (Department of Tumor and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To study the changes of adhesion ability to $CD34^+$ cells of CTLA4Ig-modified bone marrow stromal cells(BMSCs) mediated by adenovirus vector. Methods The expression and location of CTLA4Ig in the transfected BMSCs were confirmed by immunocytochemical techniques. Values of cpm from the $CD34^+$ cell selected by MACS and marked by $^3$H-TdR after the adhesion to BMSCs were measured to evaluate the changes of adhesion ability due to transfection. Results The rate of CTLA4Ig expression in the transfected BMSCs (MOI=50) was as high as 85%, and the expression was located disseminatedly in the cytoplasm of BMSCs. But the adhesion ability of the transfected BMSCs to $CD34^+$ cells was not significantly different ($P>0.05$) from the untransfected BMSCs. Conclusion CTLA4Ig-recombinant adenovirus can effect the mediation of CTLA4Ig-gene expression in BMSCs but can not effect on the adhesion ability.

**Key words**: CTLA-4; bone marrow stromal cells; adenovirus vector; immunologic tolerance; co-stimulation

移植物抗宿主病(Graft-versus-host disease, GVHD)是异基因骨髓移植(Allogeneic bone marrow transplantation, Allo-BMT)的主要并发症和造成死亡的一个重要原因[1]。传统的防治方法是以破坏机体免疫机能或牺牲移植物抗白血病(Graft-versus-leukemia, GVL)作用为代价的[2]。研究发现,成熟 T 细胞在 GVHD 的发生与发展中起着核心作用[3],而 T 细胞活化必须同时存在 MHC/抗原肽-TCR 和共刺激信号,当缺少或阻断 T 细胞的共刺激信号,将导致 T 细胞的无反应(Anergy)、细胞凋亡(Apoptosis)或克隆丢失(Clone depletion)等的发生,从而诱导免疫耐受(Immune tolerance)[4]。研究证实,在众多的共刺激信号途径中,作用最明显、最肯定的是 B7/CD28 途径[5,6],因此,干预 T 细胞 B7/CD28 共刺激途径,诱导特异性免疫耐受成为 GVHD 防治的新思路,而 CTLA4Ig 是该途径最有效的免疫抑制剂。

骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSCs)是支持和调节造血细胞定居、增殖、分化、发育和成熟的内环境。另外,预处理导致的造血微环境(Hematopoietic inductive microenvironment, HIM)损伤是 Allo-BMT 造血损伤和免疫功能降低,甚至移植失败的重要原因之一。BMSCs 在体外易培养和扩增,在体内是个相对静止、更新率低的群体,外源基因的表达可以持续较长的时间,并且其代谢活力很高,有利于重组蛋白的分泌,所以成为基因治疗理想的靶细胞。

为此,本研究以探讨 CTLA4Ig 重组腺病毒转染 BMSCs 的可行性及其转染对其功能的影响,为该基因修饰的 BMSCs 联合造血干细胞移植(Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT),达到预防 GVHD 和纠正预处理损伤的 HIM 提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 骨髓来源

骨髓取自健康志愿者,骨髓穿刺术抽取 4 ml,以肝素抗凝(50 U/ml)。

### 1.2 腺病毒载体

CTLA4Ig 重组腺病毒载体由全军烧伤研究所构建[7],在 293 细胞扩增,收集并测定滴度,在-70℃冻存。

作者简介:王吉刚(1974-),男,云南省曲靖市人,硕士研究生,医师,主要从事造血干细胞移植方面的研究。电话:(023)65392577

收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

### 1.3 主要试剂

IMDM 细胞培养基(GIBCO 公司); 胎牛血清(Hyclone 公司); 马血清(北京邦定生物公司); 人淋巴细胞分离液(天津血液学研究所); DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司); 胰蛋白酶(Sigma 公司); 小鼠抗人 CTLA-4(CD152)单抗(Pharmingen); 2-巯基乙醇(Sigma 公司); L-谷氨酰胺(上海康达氨基酸厂); $CD34^+$ 细胞分选试剂盒(Miltenyi Biotec); CD34-FITC(Coulter 公司); IgG1-FITC(Coulter 公司); $^3$H-TdR(上海原子能研究所)。

### 1.4 BMSCs 的培养[8]

骨髓液与等量含 2% 胎生牛血清的 IMDM 培养液充分混合, 淋巴细胞分离液分离 MNC 连续洗涤细胞两次, 制成细胞悬液并计数, 将 MNC 接种于如下培养体系: IMDM 培养液, 内含(1~2)× $10^6$ MNC/ml, 12.5% 马血清, 12.5% 胎牛血清, 100 U/ml 的青霉素和 100 ng/ml 的链霉素, $10^{-6}$ mol/ml 氢化考的松注射液。以每瓶 5 ml 的量接种于培养瓶中, 然后置于 37 ℃, 5% $CO_2$ 细胞培养箱中培养, 培养 72 h 后全量换液去除悬浮细胞, 贴壁细胞继续培养, 每 4 d 换液 1 次, 80% 融合时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化基质细胞, 并扩瓶培养。直至进入对数生长期, 可以规则传代。

### 1.5 CTLA4Ig 重组腺病毒转染 BMSCs[9]

取生长状态良好的 BMSCs, 消化后制成细胞悬液, 计数, 并调节细胞浓度至 1× $10^5$/ml, 按 5× $10^3$/$cm^2$ 备有盖玻片的 24 孔板转染 24 孔板, 其中 21 孔用于转染组, 3 孔设为阴性对照, 用于免疫组化。按 2× $10^4$/$cm^2$ 接种于 6 孔板, 转染组、对照组各设 3 孔, 备测定粘附力用。以上各组 BMSCs 37 ℃, 5% $CO_2$ 培养 24 h, BMSCs 基本贴壁, 并达 85% 融合。转染组按 MOI 为 50 单位加入 CTLA4Ig 重组腺病毒, 轻轻摇晃使载体液均匀散布于所有细胞。将细胞置于细胞培养箱中培养, 每 15 min 轻轻摇晃 1 次, 使载体液均匀接触所有细胞。1 h 后吸出 CTLA4Ig 重组腺病毒, 并用培养液洗涤细胞两次, 加入 10%FCS-IMDM 细胞培养液继续培养。

### 1.6 $CD34^+$ 细胞的分选

分离骨髓 MNC, 用抗 $CD34^+$ 免疫磁珠, 按试剂说明书对 MNC 进行磁标记, 洗脱阴性细胞, 将分离柱移出磁场, 加压洗脱 $CD34^+$ 细胞, 计数 $CD34^-$ 细胞及 $CD34^+$ 细胞, 0.4% 台盼蓝染色, 计数活细胞, 存活率> 96%。收获 $CD34^+$ 细胞一式两份, 一份加 FITC-$CD34^+$, 另一份加 IgG1-FITC 为阴性对照, 4 ℃孵育 30 min 后, 用 PBS 洗涤两遍, FACS 检测纯度。

### 1.7 免疫组化检测目的蛋白 CTLA4Ig 的表达及其在 BMSCs 中定位

转染后 48 h 取 1.5 中用于免疫组化的 BMSCs 以 4% 多聚甲醛固定, 将小鼠抗人 CTLA-4(CD152)单抗 1∶200 稀释, 按试剂说明书并参考蔡文琴等[10]方法进行免疫组化染色及铁苏木素复染。

### 1.8 CTLA4Ig 基因修饰的 BMSCs 的细胞粘附实验[11]

以 10%FCS-IMDM 细胞培养液调节 $CD34^+$ 细胞浓度为 5× $10^6$/ml, 加 100 μCi $^3$H-TdR, 37 ℃、5% $CO_2$ 培养 8 h, 0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min× 3 次, 以 10%FCS-IMDM 细胞培养液调节细胞浓度为 1× $10^6$/ml。每孔加入 1 ml 浓度为 1× $10^6$/ml 的 $^3$H-TdR 标记 $CD34^+$ 细胞到基质细胞层上, 37 ℃、5%$CO_2$ 培养 3 h。0.01 mol/L PBS 洗涤 5 min× 3 次, 去除未粘附到基质细胞层的 $CD34^+$ 细胞。用 0.25% 胰蛋白酶消化粘附有标记 $CD34^+$ 细胞的基质细胞层, 收集粘附细胞悬液, 吹打分散细胞。平行测定 3 份 1 ml 浓度为 1× $10^6$/ml 的 $^3$H-TdR 标记 $CD34^+$ 细胞的 cpm 值, 其结果作为掺入的 cpm 值; 分别测定转染组和对照组粘附细胞悬液的 cpm 值, 按如下公式计算 BMSCs 粘附率(%):

$$\text{BMSCs 粘附率}(\%)=\frac{\text{粘附细胞悬液的 cpm 值}}{\text{掺入的总 cpm 值}}\times 100\%$$

### 1.9 统计学处理

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 Microsoft Excel 2000 统计程序进行 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 BMSCs 培养

培养后 3 d, 可见少数细胞贴壁生长, 其上粘附有大量的造血细胞, 去除悬浮细胞后继续培养, 观察发现基质细胞为不均一的细胞群, 主要有成纤维细胞, 呈梭形, 胞质丰富, 呈平行或旋涡状生长; 上皮细胞有丰富的胞质和不规则的突起; 巨噬细胞胞体较大, 呈圆形, 胞质丰富, 见图 1。此外, 还可见一类细胞胞体大, 胞质丰富, 胞内有不少空泡, 可能是外膜网状细胞。传代后 BMSCs 呈均匀生长, 但传 4~5 代后 BMSCs 增殖减慢。

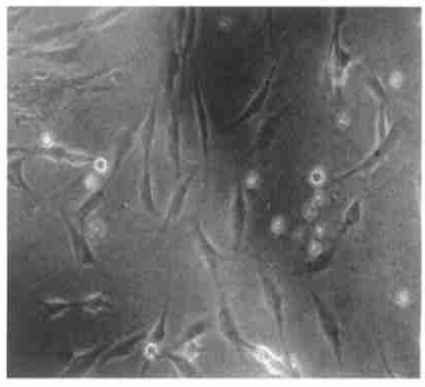


图 1　原代培养的 **BMSCs**　(× 100)
**Fig 1　Primary culture of BMSCs**　(× 100)

### 2.2 免疫组化检测 CTLA4Ig 在 BMSCs 中的表达

取转染后 48 h 的细胞爬片固定, 经免疫组化染色和铁苏木素复染, 镜下观察发现, 转染组呈阳性结果, BMSCs 形态完整, 阳性细胞染色与少许阴性细胞染色相互交杂分布, 阳性染色呈弥漫性分布于整个胞质, 见图 2, 未转染组呈阴性结果。在 MOI 为 50 时, 腺病毒对 BMSCs 的转染效率可达 85% 以上。

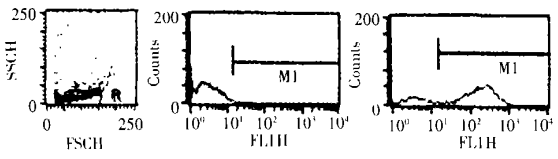


图 2　免疫组化检测 **CTLA4Ig** 在 **BMSCs** 中的表达　(× 400)
**Fig 2　Expression of CTLA4Ig in the BMSCs confirmed by immunocytochemistry**　(× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 FACS 检测分离的骨髓 $CD34^+$ 细胞纯度

骨髓单个核细胞经 MACS 分选后，流式细胞仪检测获得的 $CD34^+$ 细胞的纯度为 97.8%，见图 3。




| Marker | Left, | Right | % Gated |
|---|---|---|---|
| All | 1, | 9847 | 100.00 |
| M1 | 10, | 9847 | 3.12 |

| Marker | Left, | Right | % Gated |
|---|---|---|---|
| All | 1, | 9847 | 100.00 |
| M1 | 10, | 9847 | 97.80 |

图 3 FACS 检测经 MACS 分选的骨髓 $CD34^+$ 细胞纯度

**Fig 3 Purity of $CD34^+$ cells selected by MACS detected with FACS**

2.4 CTLA4Ig 基因修饰组与对照组的细胞粘附实验

结果见表 1。转染组与对对照组 BMSCs 对 $CD34^+$ 细胞粘附力无显著性差异（$P>0.05$）。

表 1 CTLA4Ig 基因修饰组与对照组的细胞粘附率

**Tab 1 Adhesion rate of the CTLA4Ig－modified and control group**

| Group | cpm | Adhersion rate% |
|---|---|---|
| Incorporation | 2 504±538.37 | —— |
| Control | 1 433.67±360.81 | 57.26 |
| Transfected | 1 275±232.78 | 50.92 |

## 3 讨论

本课题出发点是以 CTLA4Ig 基因修饰的 BMSCs 回输受体，通过目的蛋白的表达，阻断 B7/CD28 共刺激途径，同时 BMSCs 还可以纠正或改善预处理所致的微环境损伤，从而促进造血重建，但其前提必须是 CTLA4Ig 重组腺病毒介导 CTLA4Ig 基因转染对 BMSCs 的功能无明显影响。BMSCs 是支持和调节造血干/祖细胞定居、增殖、分化、发育和成熟的内环境，在这些过程中 BMSCs 与造血干/祖细胞的粘附分子或粘附结构起着重要作用。CD34 抗原为细胞表面的磷酸化蛋白，无系特异性，选择性的表达于早期造血干/祖细胞，小血管内皮细胞和胚胎成纤维细胞，能使造血祖细胞粘附于基质上。最早期的造血干/祖细胞 CD34 表达最高，随着细胞分化成熟，CD34 抗原逐渐减少直至消失。CD38 抗原是造血干细胞向多系定向分化的标志之一，并随分化过程其表达水平增高。$CD34^+CD38^-$ 被认为是最早期的造血干细胞。$CD34^+$ 细胞几乎包含了所以造血干/祖细胞，但并不排斥 CD34 阴性为早期造血干/祖细胞的重要标志[12]。目前，$CD34^+$ 细胞仍是大多数体外扩增研究的靶细胞，目前应用得较多的还是以单克隆抗体标记的细胞免疫分离法，包括流式细胞仪细胞分选、生物素-亲合素免疫亲合层析和免疫磁珠微粒分离等方法，其中通过细胞表面 CD34 抗原的表达与否分离 $CD34^+$ 干/祖细胞和 $CD34^-$ 细胞的过程亦称为 CD34 阳性和阴性选择[8]。本实验采用免疫磁珠对骨髓中的 $CD34^+$ 细胞进行阳性选择，经 FACS 检测纯度，发现 $CD34^+$ 细胞约占分离前 MNC 的 1%，分离后纯度达 90%以上，我们所得的纯度高达 97.8%，且可以通过更换新的分离柱获得更高的纯度。因此，我们以 $^3$H-TdR 标记经 MACS 分选的骨髓 $CD34^+$ 细胞进行基质细胞层细胞粘附实验，以观察基因转染对基质细胞粘附功能的影响。结果发现，当 MOI 为 50 时，转染基质细胞层对骨髓 $CD34^+$ 细胞的粘附力较对照组无显著差异（$P>0.05$）。我们在转染预实验中发现，当 MOI 过高时，虽然可获得更高的表达阳性率，但 BMSCs 的形态可发生变化，如胞质出现空泡，有的 BMSCs 变圆脱壁漂浮，生长受到明显抑制。免疫组化提示目的蛋白 CTLA4Ig 弥漫性表达于 BMSCs 胞质中，当 MOI 为 50 时能获得高达 85%的表达阳性率，并且基质细胞的形态及生长未受明显影响，为此，我们选择 MOI 为 50 进行实验，粘附实验结果也同样说明这一点。一般细胞粘附实验是通过细胞计数来观察粘附力的变化，但由于造血细胞粘附于 BMSCs 后，难以将两者分开，即使利用 BMSCs 贴壁的特性，也不能将 BMSCs 完全从造血细胞中分离，因此，本研究采用放射性标记的方法。其优点在于标记 $CD34^+$ 细胞粘附于 BMSCs 后，连同 BMSCs 制成细胞悬液进行 cpm 值测定，而无需将两者分离，能更准确地反映粘附力的变化。

参考文献：

[1] 曹履先. 临床骨髓移植[M]. 北京：军事医学科学出版社，1999.7.

[2] Roy J, McGlave P B, Filipovich A H, *et al*. Acute graft-versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation: failure of conventional therapy[J]. Bone Marrow Transplant, 1992, 10(1): 77－82.

[3] Cahn J Y, Deconinck E, Tiberghien P, *et al*. Low dose T-cell lymphocyte infusion combined with marrow T-cell depletion as prophylaxis of acute graft-versus-host disease for HLA identical sibling bone marrow transplantation [J]. Hematol Cell Ther, 1999, 41(2): 31－37.

[4] Guerder S, Flavell R A. Costimulation in tolerance and autoimmunity[J]. Int Rev Immunol, 1995, 13(2): 135－146.

[5] Konieczny B T, Dai Z, Elwood E T, *et al*. IFN-gamma is critical for long－term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligang T cell costimulation pathway[J]. J Immunol, 1998, 160(5): 2 059－2 064.

[6] Hakim F T, Cepeda R, Gray G S, *et al*. Acute graft-versus-host reaction can be aborted by blockade of costimulation molecules[J]. J Immunol, 1995, 157(3): 1 757－1 763.

[7] 罗高兴，吴 军，易绍萱. 重组腺病毒载体局部介导 CTLA4Ig 延长小鼠异体移植皮肤的存活[J]. 中华烧伤杂志，2000, 16(1): 37－39.

[8] 郑德先，吴克复，楮建新. 现代血液学研究方法与技术[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1999.4.

[9] 张明徽，陶 群，于益芝. IL-3 基因修饰的 BMSCs 辅助大剂量化疗后造血功能恢复[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，1997, 4(4): 259－263.

[10] 蔡文琴，王泊云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 119－121.

[11] Harinder S J, Frank C S, Sang L, *et al*. Vascular cell adhesion molecule-1 and VLA-4 are obligatory adhesion proteins in the heterotypic adherence between human leukemia/lymphoma cells and marrow stromal cells[J]. Exp Hematol, 1993, 21(3): 444－448.

[12] Gupta P, Blazar B R, Gupta K, *et al*. Human $CD34^+$ bone marrow cells regulate stromal production of interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factors and increase the colony-stimulating activity of stroma[J]. Blood, 1998, 91: 3 724－3 733.

（编辑 张 宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net