



靶向脐带间充质干细胞的构建及其 在小鼠脾脏内的定位

秦力维¹, 张宁坤², 路平³, 彭秀军¹, 王桂琴¹, 高原¹, 曹利群¹, 崔蓓¹, 郭建巍⁴

(海军总医院 1 眼科, 2 心脏中心, 3 病理科, 4 检验科, 北京 100048)

【摘要】 目的 构建含小分子肽 P1-GFP 融合基因慢病毒载体, 用携带 P1-GFP 融合基因的慢病毒感染 MSC, 使 MSC 具有靶向性, 将靶向 MSC 注入小鼠体内后观察 MSC 在小鼠脾脏的定位及与淋巴细胞的关系。方法 用组织片贴壁法培养健康人脐带间充质干细胞, 用基因工程技术构建含小分子肽 P1-GFP 融合基因慢病毒载体并感染人脐带间充质干细胞, 通过尾静脉将转入 P1-GFP 融合基因的 MSC 注入小鼠体内, 18 h 后免疫组化染色观察 GFP 在小鼠脾脏的定位。结果 培养的健康人脐带间充质干细胞生长良好, MSC 感染含 P1-GFP 融合基因的慢病毒 18 h 后 MSC 开始出现绿色荧光, 随着培养时间的延长, 荧光强度逐渐增强, 72 h 达高峰。靶向 MSC 表达髓系干细胞的表面标记 CD105(90.0%)/CD44(98%), CD73(85.0%)/CD90(98.5%)。将靶向 MSC 经尾静脉注入小鼠体内, 18 h 后小鼠脾脏出现大量 GFP 阳性细胞, 并与脾脏淋巴细胞密切接触。结论 本研究成功构建了含 P1-GFP 融合基因的靶向 MSC, 靶向 MSC 成功定向脾脏, 并与脾脏淋巴细胞密切接触, 可用于后续的实验研究。

【关键词】 靶向; 脐带间充质干细胞; 慢病毒; 脾脏

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0032-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.007

Construction of targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their distribution in the mouse spleen

QIN Li-wei¹, ZHANG Ning-kun², LU Ping³, PENG Xiu-jun¹, WANG Gui-qin¹,
GAO Yuan¹, CAO Li-qun¹, CUI Bei¹, GUO Jian-wei⁴

(1. Department of Ophthalmology, 2. Heart Center, 3. Department of Pathology,
4. Department of Clinical Laboratory, Chinese PLA Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

【Abstract】 Objective To construct lentiviral vectors containing peptide P1-GFP fusion genes. Umbilical cord derived mesenchymal stem cells were infected with lentivirus carrying peptide P1 and GFP fusion genes. To inject the targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells into mice and to detect GFP expression in the spleen. **Methods** Umbilical cord derived mesenchymal stem cells were cultured with adhered tissues of umbilical cord smaller than 1 mm³. Lentiviral vector containing P1-GFP fusion genes with engineering technology was constructed and infected the umbilical cord derived mesenchymal stem cells. Targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells were intravenously injected in the mouse tail vein and after 18 hours GFP expression was detected with immunohistochemical staining of the spleen tissues. **Results** Harvested umbilical cord derived mesenchymal stem cells grew well in culture medium. Green

[基金项目] 国家自然科学基金(30872394)及海军总医院创新培育基金资助(CXPY201312)。

[作者简介] 秦力维, 女, 副主任医师, 医学硕士, 主要从事视网膜疾病的免疫治疗。E mail: lwkin@sohu.com。

[通讯作者] 郭建巍, 男, 主任医师, 硕士生导师, 从事分子诊断临床及研究工作。E mail: jwkuo@sohu.com。

fluorescence on umbilical cord derived mesenchymal stem cells were observed under fluorescence microscope at 18 hours after infected with lentivirus. Green fluorescence intensity of umbilical cord derived mesenchymal stem cells was increasing over time and reached a peak at 72 hours. Umbilical cord derived mesenchymal stem cells highly expressed CD105 (90.0%)/CD44 (98%) and CD73 (85.0%)/CD90 (98.5%) molecules. GFP expression was detected in the spleen after intravenous injection of targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells in the mice 18 hours later. GFP expressing cells intimately contacted with lymphocytes. **Conclusions** Targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells contain P1-GFP fusion genes are constructed. Targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells can be targeted to mouse spleen and intimately contact with lymphocytes after intravenous injection. Our results lay the groundwork for further studies.

【Key words】 Targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells; Lentivirus; Spleen; Mice

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是来源于胚胎中胚层的一类成体干细胞,除具有向多胚层细胞分化、促进损伤修复、抗炎以及神经营养等功能外^[1],MSC 还可减低以树突状细胞(dendritic cells, DC)DC 为代表的单核巨噬细胞抗原递呈能力,具有免疫抑制作用^[2]。我们在前期研究中获得了一种能与单核巨噬细胞特异性结合的小分子肽 P1,在 P1 肽的导向下,P1-绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白在粘膜免疫中可到达消化道免疫相关组织^[3]。本研究的目的旨在构建 P1-GFP 融合基因慢病毒载体,用携带 P1-GFP 融合基因的慢病毒感染 MSC,使 MSC 具有靶向性,希望通过小分子肽 P1 把 MSC 带到 DC 等抗原呈递细胞处,以期在后续的研究中提高 MSC 在自身免疫性疾病中的治疗效率。

1 材料和方法

1.1 试剂

BamHI / AgeI 限制性核酸内切酶(NEB),琼脂糖(赛百盛公司),In-Fusion™ PCR Cloning Kit (Clontech),Taq polymerase (SinoBio),dNTP (Takara),Plasmid 抽提 Kit(Promega),琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化),Primer 由瑞生物技术有限公司合成,兔抗 GFP 多克隆抗体(北京康为世纪有限公司);引物 KL6470-P1: GATCCCGCCACCA TGAGCAGTGAAAAGGCTGAACAACAGTGGGCTA, K L6470-P2: CCGGTAGCCCACTGTTGTTTCAGCCTTTTC ACTGCTCATGGTGGCGG。PCR 鉴定引物 KL6470-P3: GTGAAAAGGCTGAACAACAGTG, EGFP-N-R: CG TCGCCGTCCAGCTCGACCAG

1.2 仪器

PCR 仪(ABI 7600),稳压 DNA 电泳仪(Bio-Rad),凝胶成像仪(天能公司),HI-9211K 细菌摇床(华利达实验设备公司),细菌培养箱(上海一恒科

学仪器有限公司),TGL-16G-A 高速离心机(日立公司)。

1.3 载体信息

载体名称:GV287(上海吉凯基因化学技术有限公司提供),元件顺序:Ubi-MCS-3FLAG-SV40-P1-EGFP;Ubi-MCS-3FLAG-SV40-EGFP(图 1)。

1.4 动物

雌性 C57 小鼠,SPF 级,体重 18~20 g,购自军事医学科学院动物实验中心,动物生产合格证号:SCXK(军)2012-0004,由海军总医院动物实验中心饲养,使用许可证号:SYXK(军)2012-0012。

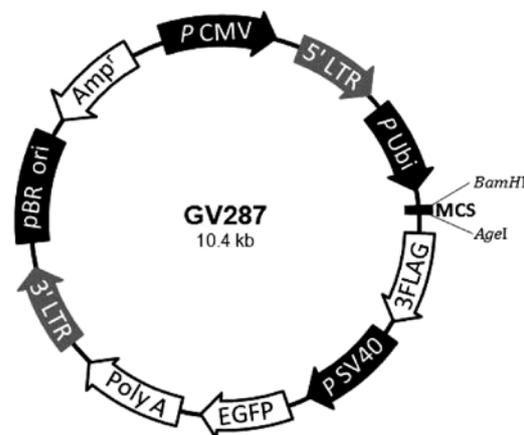


图 1 GV287 载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the construction of vector GV287

1.5 实验方法

1.5.1 人脐带间充质干细胞的高效分离与鉴定^[4]:无菌取剖腹产新鲜脐带,以平衡盐溶液洗去脐带残留血液,剪成 3~4 cm 的小段,取每一段沿静脉腔剪开,平铺后剔除脐带动、静脉,取血管之间血管与外膜之间的胶状物并剪切成小于 1 mm³ 小块,以平衡盐溶液冲洗后,把组织块放置含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中

培养。24 h 后半量换液,待组织块周围均有贴壁细胞出现时,移出组织块,当细胞扩增占 80% ~ 90% 细胞瓶底面积时,用 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 液消化后传代,用 0.01 mol/L PBS 调整细胞浓度为 5×10^5 /mL, 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次后,加入 PBS 1 mL 重悬细胞,取 1×10^6 个细胞待用,本研究用第 3 代细胞进行实验。

1.5.2 过表达慢病毒载体构建:委托上海吉凯基因化学技术有限公司完成,实验组含 P1-GFP 融合基因,对照组只含 GFP 基因。病毒效价 $TU/\mu L = 2.00E + 8 TU/mL$ 。

1.5.3 用慢病毒载体感染 MSC:用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃ 5% CO_2 培养箱中培养 MSC,感染前保证 MSC 良好生长状态,进行病毒感染时细胞的融合率约为 30% ~ 50%,37℃ 5% CO_2 培养箱中培养过夜。预先从 -80℃ 取出病毒液在冰上融化,同时在培养基中添加 5 $\mu g/mL$ 的 polybrene,轻轻混匀,使培养基和病毒等试剂充分混匀,然后把细胞板放回培养箱孵育。8 ~ 12 h 以后观察细胞状态,弃去细胞上清液,更换为新鲜含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基。感染后每日观察荧光表达情况,72 h 后收获细胞用于后续实验。

1.5.4 MSC 经静脉输入小鼠体内后的分布:用无菌 PBS 调整慢病毒载体感染脐带间充质干细胞浓度至 1×10^6 /mL,随机数字法将 10 只雌性 BALB/C 小鼠分为实验组及对照组二组,每组 5 只。实验组和对照组每只小鼠尾静脉注射分别注入含 P1-GFP 和 GFP 融合基因的 MSCs 细胞液,每只 0.5 mL,分别于 6 h、12 h、18 h 后处死,取脾脏 30% 甲醛固定 24 h,常规免疫组化染色,显微镜下观察 GFP 在脾脏的分布及与淋巴细胞的关系。

2 结果

2.1 MSC 形态及病毒感染效果

培养的 MSC 细胞形态不规则长梭形,边缘较钝,细胞内外不见明显颗粒,表面光滑、状态良好,(图 2A)。慢病毒感染的含目的基因 MSC 形态细胞形态仍呈不规则长梭形,边缘光滑,细胞内外偶见颗粒,状态良好(图 2B)。用荧光显微镜每日观察慢病毒感染含目的基因 MSC,发现感染 18 h 后 MSC 开始出现绿色荧光,随着培养时间的延长,荧光强度逐渐增强(图 3A),到 72 h 达高峰(图 3B),以后逐渐下降,本研究选用感染后 72 h 的细胞用于动物

实验。(图 2,3 见文后彩插 3)。

慢病毒感染的含目的基因的 MSC 仍表达髓系间质干细胞的表面标记 CD105 (90.0%)/CD44 (98%), CD73(85.0%)/CD90(98.5%)(图 4)。

2.1 MSC 经静脉输入小鼠体内后的分布

将慢病毒载体感染脐带间充质干细胞经静脉途径输入小鼠体内,不同时间段取小鼠脾脏,经免疫组化染色,在 18 h 取出的小鼠脾脏发现了大量 GFP 阳性细胞(图 5C),空载体与 GFP 对照组阳性信号明显低于实验组(图 5A,图 5B),说明靶向 MSC 成功定向脾脏,并与脾脏淋巴细胞密切接触。(图 4,5 见文后彩插 4)。

3 讨论

脐带间充质干细胞(umbilical cord derived mesenchymal stem cells, UC-MSCs)是组织工程和再生医学理想的种子细胞^[1,2,4]。目前,用 MSC 治疗疾病的临床试验正在许多国家进行,但干细胞疗法的成功与否很大程度依赖足量的干细胞归巢到损伤组织,提高 MSC 归巢至靶器官是治疗疾病的关键。

巨噬细胞在胶原诱导的关节炎、肾炎、甲状腺炎、变应性脑脊髓炎等实验性自身免疫性疾病的组织损伤中发挥着重要作用。骨髓来源的活化的巨噬细胞是实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)^[5]组织损伤中主要的效应细胞。而巨噬细胞并未行使抗原呈递的功能,而是在组织损伤中发挥了效应细胞和清除死亡细胞的功能。目前所有研究结果均提示抑制树突状细胞和单核巨噬细胞功能,改变免疫应答类型将是治疗 EAU 的一个有效途径,并在最新的研究中得到了证明^[6]。

在国家自然科学基金的资助下,本课题组获得了一种具有自主知识产权的、能与单核巨噬细胞特异性结合的小分子肽 P1,在 P1 肽的导向下,P1-绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白在粘膜免疫中可到达消化道免疫相关组织。P1-GFP 融合蛋白免疫小鼠后,小鼠脾脏中的 $CD4^+$ 细胞通过分泌 $TGF\beta$ 和非成熟 DC 共同发挥了免疫调节作用^[3,7,8]。

本研究通过分子克隆技术,将前期研究获得的能特异性靶向抗原呈递细胞的小分子肽 P1 与 GFP 融合蛋白成功克隆入慢病毒病毒载体,通过慢病毒感染使 MSC 获得融合蛋白基因^[9],制备了靶向

MSC。将慢病毒载体感染脐带间充质干细胞经静脉途径注入小鼠体内, 18 h 后在小鼠脾脏发现了大量 GFP 阳性细胞, 说明靶向 MSC 成功定向脾脏, 并与脾脏淋巴细胞密切接触。

脾脏是体内重要的外周淋巴器官, 是免疫应答发生的主要场所, 脾脏主要通过单核巨噬细胞系统发挥吞噬作用而实现在非特异性免疫调控, 在抗感染免疫和肿瘤免疫中具有重要的作用。我构建的靶向 MSC 成功定向脾脏, 并与脾脏淋巴细胞密切接触, 说明我们构建的靶向 MSC 功能良好, 可用于后续的实验研究。

由于 MSC 在体外还可减低 DC 抗原递呈能力, 抑制 T 细胞增殖, 抑制 Th1 和 Th17 细胞因子分泌, 增强 Th2 细胞因子分泌, 上调 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞^[10-13], 通过靶向 MSC 改善脾脏中 DC 和巨噬细胞免疫微环境, 重建免疫平衡, 抑制 EAU 的进展将是我们下一步要做到的工作。

参考文献:

- [1] Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status [J]. *Stem Cells*. 2010, 28 (3): 585-96.
- [2] Xue Q, Luan XY, Gu YZ, et al. The negative co-signaling molecule b7-h4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity [J]. *Stem Cells Dev*. 2010, 19(1): 27-38.
- [3] 郭建巍, 秦力维, 冯健男, 等. 基于蓖麻毒素 B 链的新型粘膜免疫佐剂设计及靶向效果初步评价 [J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(9): 974-988.
- [4] 秦力维, 张宁坤, 郭建巍, 等. 人脐带间充质干细胞的高效分离及对小鼠免疫功能的影响 [J]. *转化医学杂志*, 2014, 3 (6): 333-336.
- [5] Sanui H, Redmond TM, Kotake S, et al. Identification of an immunodominant and highly immunopathogenic determinant in the retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) [J]. *J Exp Med*. 1989, 169(6): 1947-60.
- [6] Suzuki J, Yoshimura T, Simeonova M, et al. Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide ameliorates experimental autoimmune uveitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012, 53(7): 4158-4169.
- [7] 郭建巍, 秦力维, 冯健男. 一种诱导 Th1 型免疫应答的粘膜免疫佐剂及应用 [P]. 中国发明专利: 201210017786.9.
- [8] 郭建巍, 秦力维, 冯健男, 等. 基于 RTB 的新型免疫增强剂构建、表达及免疫效果评估 [J]. *免疫学杂志*, 2013, 29 (11): 966-969.
- [9] Treacy O, Ryan AE, Heinzl T, et al. Adenoviral transduction of mesenchymal stem cells: in vitro responses and in vivo immune responses after cell transplantation [J]. *PLoS ONE*. 2012, 7 (8): e42662.
- [10] Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives [J]. *Cell Res*. 2010, 20(1): 24-33.
- [11] Zhang X, Ren X, Li G, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis by comprehensive modulation of systemic autoimmunity [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011, 52(6): 3143-3152.
- [12] Spaggiari GM, Moretta L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity [J]. *Immunol Cell Biol*. 2013, 91(1): 27-31.
- [13] English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation [J]. *Immunol Cell Biol*. 2013, 91(1): 19-26.

[修回日期] 2015-04-25