

# 色素上皮衍生因子修饰的人脐带间充质干细胞构建方法

闻慧<sup>1</sup>, 张芸<sup>2</sup>, 纪惜奎<sup>2</sup>, 刘晓雷<sup>3</sup>, 杨顺<sup>2</sup>, 罗朝霞<sup>2</sup>, 谢亮<sup>2</sup>, 邹文文<sup>2</sup>, 李结明<sup>2</sup>, 姜舒<sup>2</sup>

基金项目: 深圳市未来产业专项资金技术开发项目 (No. CXZZ20140905095554702)

作者单位:<sup>1</sup>(518000) 中国广东省深圳市眼科医院眼底病区 深圳眼科学重点实验室 深圳市眼外伤治疗与干细胞定向分化公共服务平台 暨南大学附属深圳眼科医院深圳大学眼视光学院;<sup>2</sup>(518000) 中国广东省深圳市茵冠生物科技有限公司;<sup>3</sup>(518000) 中国广东省深圳市, 中国科学院深圳先进技术研究院

作者简介: 闻慧, 女, 毕业于第三军医大学, 医学硕士, 副主任医师, 眼底病区副主任医师, 研究方向: 眼底疾病临床治疗和基础研究。

通讯作者: 姜舒, 女, 毕业于吉林大学, 医学博士, 研究员, 深圳市茵冠生物科技有限公司首席科学家, 研究方向: 细胞生物技术研究和转化应用. jiangshu@wingor.net

收稿日期: 2017-03-10 修回日期: 2017-06-05

## Preparation of pigment epithelial-derived factor-modified human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

Hui Wen<sup>1</sup>, Yun Zhang<sup>2</sup>, Xi-Luan Ji<sup>2</sup>, Xiao-Lei Liu<sup>3</sup>, Shun Yang<sup>2</sup>, Zhao-Xia Luo<sup>2</sup>, Liang Xie<sup>2</sup>, Wen-Wen Zou<sup>2</sup>, Jie-Ming Li<sup>2</sup>, Shu Jiang<sup>2</sup>

**Foundation item:** Shenzhen Future Industries Funds-Technology Development Program (No. CXZZ20140905095554702)

<sup>1</sup>Department of Fundus Disease, Shenzhen Eye Hospital; Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology; Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation Public Service Platform of Shenzhen; Affiliated Shenzhen Eye Hospital of Jinan University, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Shenzhen Wingor Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>Shenzhen Institutes of Advanced Technology Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Shu Jiang. Shenzhen Wingor Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China. jiangshu@wingor.net

Received: 2017-03-10 Accepted: 2017-06-05

## Abstract

• **AIM:** To construct the recombined pLenti-CMV-PEDF-EYFP vector to be infected into human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUCMSCs), and then to identify the PEDF expression in hUCMSCs and the cell viability of hUCMSCs after infection with the recombined lentivirus.

• **METHODS:** The recombinant pLenti-CMV-PEDF-EYFP

vector was constructed with pLenti-CMV-hChR2-EYFP and PEDF gene, and then infected into hUCMSCs to obtain the PEDF-hUCMSCs. The expression of PEDF in hUCMSCs was identified by confocal microscopy and ELISA. The Cell Counting Kit (CCK8) was used to assess the cell viability of PEDF-hUCMSCs. The influences of pLenti-CMV-PEDF-EYFP infection on the passage and phenotypes of hUCMSCs were assessed by microscope and flow cytometry.

• **RESULTS:** The recombinant pLenti-CMV-PEDF-EYFP was successfully constructed and efficiently infected into hUCMSCs. The expression of PEDF was positively detected in the PEDF-hUCMSCs. No significant difference was observed on cell viability between PEDF-modified hUCMSCs and hUCMSCs ( $P > 0.05$ ). The infection of pLenti-CMV-PEDF-EYFP had no obvious influences on the proliferation, morphology and phenotypes of hUCMSCs.

• **CONCLUSION:** PEDF was expressed effectively in the hUCMSCs modified with the recombinant lentivirus. The preliminary results from this study provide more evidences for further study of using PEDF-hUCMSCs to treat retinitis pigmentosa.

• **KEYWORDS:** pigment epithelial-derived factor; lentiviral vector; human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell

**Citation:** Wen H, Zhang Y, Ji XL, et al. Preparation of pigment epithelial-derived factor-modified human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(7):1226-1231

## 摘要

**目的:** 构建携带色素上皮衍生因子 (pigment epithelial-derived factor, PEDF) 基因的重组慢病毒, 感染人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUCMSCs), 探讨 PEDF 在 hUCMSCs 中的表达及重组慢病毒对 hUCMSCs 活性的影响。

**方法:** 利用 pLenti-CMV-hChR2-EYFP 载体系统, 构建携带 PEDF 基因的重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP, 进一步感染 hUCMSCs, 获得携带 PEDF 基因的 hUCMSCs (PEDF-hUCMSCs), 激光共聚焦显微镜和 ELISA 法检测 PEDF-hUCMSCs 的 PEDF 蛋白表达情况, 采用 CCK8 法检测 PEDF-hUCMSCs 的活性。通过观察细胞形态和流式细胞术检测验证重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染 hUCMSCs 后对细胞传代、细胞表型的影响。

**结果:** 成功构建携带 PEDF 基因的重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP, 高效感染 hUCMSCs, 获得的 PEDF-hUCMSCs 能有效表达 PEDF 蛋白, 检测结果显示重组病

毒感染组细胞与空白对照组细胞活性无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染对 hUCMSCs 的增殖能力、细胞形态和细胞表型没有明显改变。

**结论:**携带 PEDF 基因的重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 修饰的 PEDF-hUCMSCs 能有效表达 PEDF 蛋白,为进一步探索应用 PEDF-hUCMSCs 治疗视网膜色素变性疾病奠定了实验基础和理论依据。

**关键词:**色素上皮衍生因子;慢病毒载体;人脐带间充质干细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.7.07

**引用:**闻慧,张芸,纪惜鑫,等.色素上皮衍生因子修饰的人脐带间充质干细胞构建方法.国际眼科杂志 2017;17(7):1226-1231

## 0 引言

色素上皮衍生因子 (pigment epithelial-derived factor, PEDF) 是广泛分布于人眼组织的糖蛋白,具有神经营养、抑制肿瘤生长<sup>[1]</sup>、抑制新生血管形成<sup>[2]</sup>等多种生物功能,目前已用于治疗眼部疾病和肿瘤疾病<sup>[3]</sup>。人脐带来源间充质干细胞 (human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 具有自我更新能力及多向分化潜能等特征<sup>[4]</sup>。本研究利用 PEDF 蛋白修饰 hUCMSCs,为应用 PEDF-hUCMSCs 治疗视网膜色素变性奠定实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂和细胞株** 大肠杆菌感受态细胞 (DH5 $\alpha$ , D9057S) 购自 Takara 公司;无内毒素质粒大提试剂盒 (12362) 购自 Qiagen 公司;无血清培养基 (12-725F) 购自 Lonza 公司;胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司 (10099141);DMEM (C11995500BT) 购自 Gibco 公司;丁酸钠 (B5887-5G) 购自 Sigma 公司;转染试剂 (E2311) 购自 Promega 公司;HEK 293 FT 细胞株 (R700-07) 购自 Invitrogen 公司;D10 培养基、Production 培养基、OPTI-MEM<sup>®</sup> I (31985-062) 购自 Gibco 公司;人色素上皮衍生因子 (PEDF) ELISA 试剂盒 (E1972Hu) 购自 Usen life Science Inc.。

**1.1.2 仪器** 制备型超速离心机 (Optimal-80XP)、高效离心机 (Avantij-26XP)、超速离心管 (344058) 均购自美国 Beckman 公司;二氧化碳培养箱 (MCO-175) 购自日本三洋公司;生物安全柜 (NU-430-400E) 购自 NUAIRE 公司;酶标仪 (synergy 4) 购自 BioTek;激光共聚焦显微镜 (Leica, TCS SP 5) 购自德国。

### 1.2 方法

**1.2.1 hUCMSCs 的分离、培养和表型鉴定** 取正常足月产健康新生儿脐带,将华通氏胶剪成 1mm $\times$ 1mm $\times$ 1mm 大小,经 0.1% 胶原酶和 1.25g/L 胰酶消化 30min,用 100 目和 200 目滤网过滤,接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养瓶内,放入 37 $^{\circ}$ C、50mL/L 二氧化碳培养箱中培养。倒置显微镜每天观察细胞生长情况。原代培养 12d 可生长融合达到 90%,胰酶常规消化后,按 5 000 个/cm<sup>2</sup> 接种传代扩增培养。当传代细胞生长接近单层汇合 80% 时,可继续传代<sup>[5]</sup>。倒置显微镜下观察培养过程中 hUCMSCs 的形态学特点。取第 2 代细胞检测细胞表型。

**1.2.2 人工合成 PEDF 基因** 从 NCBI 检索得到 Homo

sapiens pigment epithelium-derived factor (PEDF) mRNA (AB593013.1) 信息,其中 PEDF 基因 CDS 区 1256bp。人工合成 PEDF 基因单链小片段,通过 PCR 拼接成完整的双链 DNA 片段,扩增产物与 T-Vector pMD19 (Simple) 连接后转化至大肠杆菌感受态细胞 JM109,筛选阳性克隆,经 PCR 鉴定和 DNA 测序确定,得到预期的 DNA 片段,即 T-Vector pMD19 (Simple)-PEDF。

**1.2.3 PCR 扩增 PEDF 基因片段和 EYFP 片段,克隆至 pLenti-CMV-hChR2-EYFP 载体中** 因 pLenti-CMV-hChR2-EYFP 载体中 hChR2 与 EYFP 之间没有合适的线性化酶切位点,故利用 BamH I/EcoR I 将 PEDF 和 EYFP 片段克隆至 pLenti-CMV-hChR2-EYFP 载体,以替换 hChR2-EYFP。以 T-Vector pMD19 (Simple)-PEDF 质粒为模板,PCR 扩增 PEDF 基因 CDS 区,以 pLenti-CMV-hChR2-EYFP 质粒为模板,PCR 扩增 EYFP 序列。反应体系为:T-Vector pMD19 (Simple)-PEDF 质粒和 pLenti-CMV-hChR2-EYFP 质粒 (50 倍稀释液) 分别为 1 $\mu$ L, 20pmol/ $\mu$ L T-Vector pMD19 (Simple)-PEDF 质粒引物 0.5 $\mu$ L (引物 F:5'-CGAAATTAATGGATCCCCGGGTACCGGTGC-3', R:5'-TGGCGGCCCGCGGGGCCCTGGGGTCCAGAACTTT-3'), 20pmol/ $\mu$ L pLenti-CMV-hChR2-EYFP 质粒引物 0.5 $\mu$ L (引物 F:5'-CAGGGGCCCGCGGCCGCCACCATGGTGAG-3', R:5'-GCTTGATATCGAATTCTTACTTGTACAGCT-3'), PrimeSTAR HS (Premix) 25 $\mu$ L, 添加 dH<sub>2</sub>O 至总体积为 50 $\mu$ L。反应条件:98 $^{\circ}$ C 10s, 55 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环。获得 PCR 产物 A、B,取 5 $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 Takara MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver 4.0 切胶回收目的片段,分别命名为 PEDF 片段、EYFP 片段。

酶切 pLenti-CMV-hChR2-EYFP 质粒载体。pLenti-CMV-hChR2-EYFP 10 $\mu$ L, 10 $\times$  K Buffer 5 $\mu$ L, 10U/ $\mu$ L BamH I 1.5 $\mu$ L, 10U/ $\mu$ L EcoR I 1.5 $\mu$ L, 添加 dH<sub>2</sub>O 至总体积为 50 $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 4h。取 5 $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用 Takara MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 切胶回收载体片段,命名为 Vector DNA。

将 PEDF 片段、EYFP 片段与 Vector DNA 连接,连接体系及条件为:50ng/ $\mu$ L Vector DNA 1 $\mu$ L, 80ng/ $\mu$ L PEDF 片段 1 $\mu$ L, 80ng/ $\mu$ L EYFP 片段 1 $\mu$ L, 5 $\times$  In-Fusion HD Enzyme Premix 2 $\mu$ L, 添加 dH<sub>2</sub>O 至总体积为 10 $\mu$ L, 50 $^{\circ}$ C 反应 15min。将连接产物取 1 $\mu$ L 热转化至大肠杆菌感受态细胞 JM109 中,涂布平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取阳性克隆,使用引物 (5'-TTGCAGGTCCAAGCGAGGGT-3', 5'-CCTCACTGTCCCCAAGCTGA-3', 5'-CCGTGCCCTGGCCCACCCTC-3') 对质粒进行测序。正确的克隆命名为 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 质粒。

**1.2.4 质粒提取、重组慢病毒制备及纯化** 质粒转化大肠杆菌感受态细胞 (DH5 $\alpha$ ), 并涂布 LB-Amp 固体琼脂平板,于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱倒置培养过夜。从转化平板挑取单克隆至约 5mL LB-Amp 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。过夜菌小量提取质粒,测定浓度,酶切鉴定质粒无误后,接种菌液至 500mL LB-Amp 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,扩大培养。第 2d 提取质粒,得到无内毒素质粒,并测定浓度,-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。用脂质体 (Fugene HD) 将重组慢病毒质粒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 和

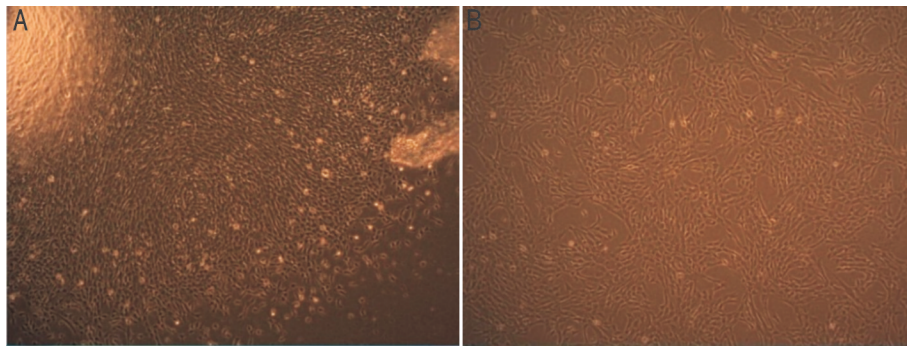


图1 hUCMSCs 形态变化( $\times 400$ ) A:原代培养第10d;B:第1代培养第3d。

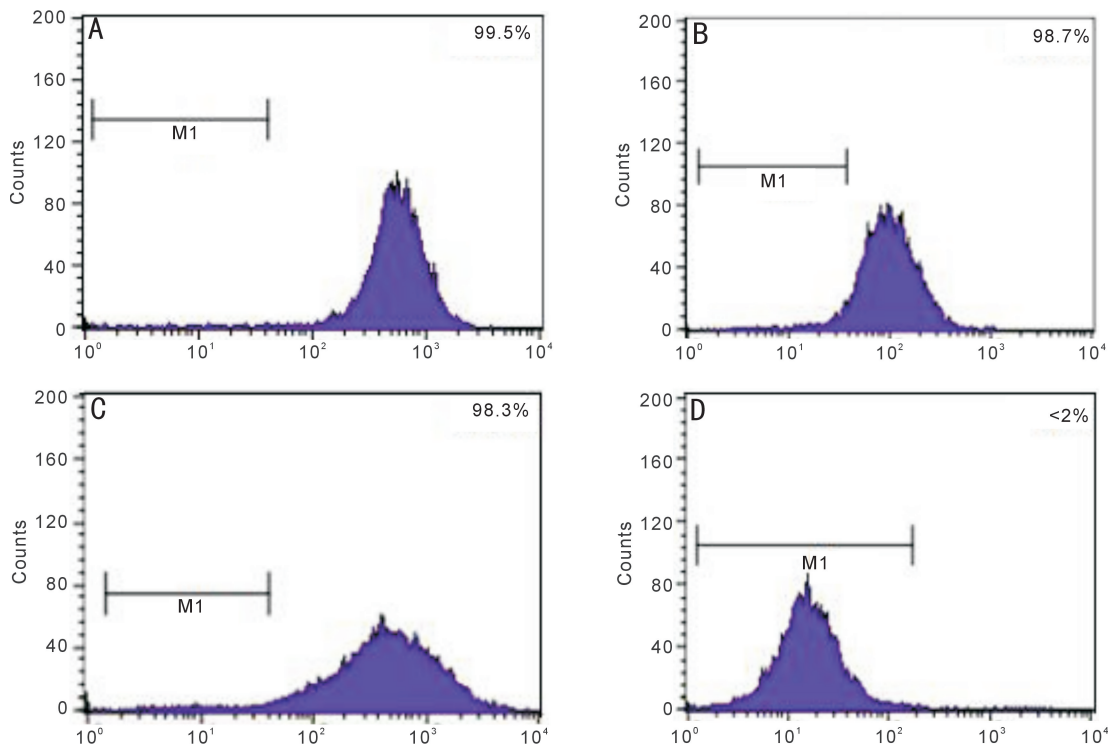


图2 hUCMSCs 流式细胞术检测结果 A:CD90;B:CD73;C:CD105;D:阴性标记物(包括 CD34、CD45、CD14、CD19 和 HLA-DR)。

包装质粒 pDelta 8.74、pMD2.G 质粒(VSVg, 外壳蛋白)转染 HEK293FT 细胞,48h 后超速离心收集病毒。分装  $10\mu\text{L}/\text{管}$ ,冻存  $-80^\circ\text{C}$  备用。

**1.2.5 重组慢病毒感染人脐带来源间充质干细胞后 PEDF 蛋白表达** 重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染 hUCMSCs 72h 后,激光共聚焦显微镜观察感染后细胞荧光蛋白表达情况,倒置显微镜下观察感染后细胞形态变化,MTT 法检测细胞活性,激光共聚焦显微镜下观察 PEDF 蛋白的表达,ELISA 法检测重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染 hUCMSCs 24、48、72、96h 后 PEDF 蛋白浓度(根据试剂盒说明书操作)。

**1.2.6 重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染对 hUCMSCs 的影响** 重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染 hUCMSCs 72h 后,进行细胞传代,传代后 72h 观察细胞增殖情况、形态,并检测细胞表型。

统计学分析:采用 SPSS16.0 统计分析软件,所有数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用单因素方差分析或重复测量资料方差分析进行统计学检验,重复测量资料两两比

较采用 LSD-*t* 或 Bonferroni 法分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 hUCMSCs 的形态及表型鉴定** 原代接种 24h 后半量换液,可见细胞贴壁,圆形或短梭形,大小不一,第 4d 开始细胞逐渐伸展呈长梭形,第 7d 开始呈漩涡状生长,第 13d 可达到 80% 融合度,2.5g/L 胰酶消化并传代后 4d,细胞可达 80% 融合,细胞为长梭形,大小均一(图 1)。流式细胞仪检测第 2 代 hUCMSCs 的免疫表型 CD90、CD73、CD105 均呈阳性表达( $>98\%$ ,图 2),而 CD34、CD45、CD14、CD19 和 HLA-DR 呈阴性表达( $<2\%$ ,图 2)。

**2.2 获取 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 质粒** 以 BamH I/EcoR I 酶切 pLenti-CMV-hChR2-EYFP 质粒获得载体片段 Vector DNA。以 T-Vector pMD19(Simple)-PEDF 质粒为模板,PCR 扩增获得 PEDF 基因片段,以 pLenti-CMV-hChR2-EYFP 质粒为模板,PCR 扩增获得 EYFP 片段(图 3)。重组慢病毒载体 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 测序结果经序列比对后,证实质粒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 构建成功。

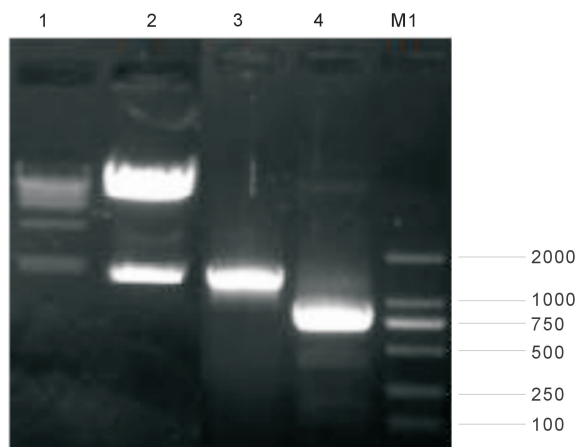


图3 PCR 鉴定图 1:λ-Hind III digest;2:pLenti-CMV-hChr2-EYFP-BamH I/EcoR I;3:PEDF 基因片段;4:EYFP 基因片段;M1:DL2000 DNA Marker。

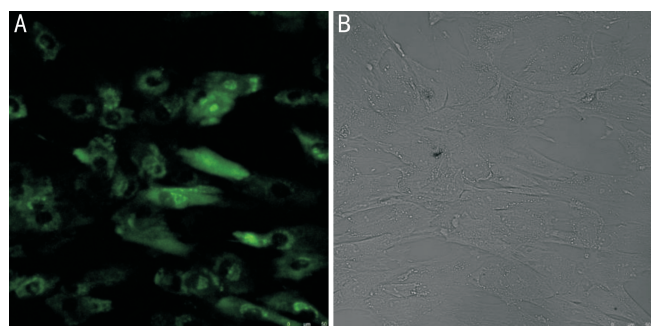


图4 重组慢病毒高效感染 hUCMSCs 后形态学变化 ( $\times 400$ )

A:激光共聚焦显微镜下 hUCMSCs 内绿色荧光表达;B:倒置显微镜下 hUCMSCs 形态。

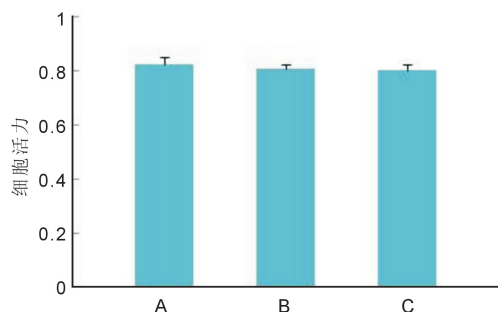


图5 重组慢病毒感染对 hUCMSCs 活性的影响 A:空白对照组;B:空载病毒感染组;C:重组病毒感染组。

### 2.3 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 在 hUCMSCs 中的表达

重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染 hUCMSCs 72h 后,激光共聚焦显微镜下观察到 hUCMSCs 的细胞质中大量的绿色荧光(图 4A),细胞形态未发生明显的变化(图 4B)。CCK8 法检测重组病毒感染组、空载病毒感染组与未进行病毒感染的空白对照组的细胞活性,结果显示三组细胞活性无统计学差异( $F=0.98, P>0.05$ ,图 5)。激光共聚焦显微镜下观察到重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染的 hUCMSCs 的细胞质中有大量 PEDF 蛋白表达(图 6)。ELISA 法检测重组慢病毒感染 hUCMSCs 24、48、72、96h 后上清液中 PEDF 蛋白分泌情况,结果显示 PEDF 蛋白浓度分别为  $10.98 \pm 0.73$ 、 $13.56 \pm 1.24$ 、 $81.99 \pm 7.45$ 、 $132.37 \pm 12.68$  ng/mL(图 7),表明重组慢病毒感染

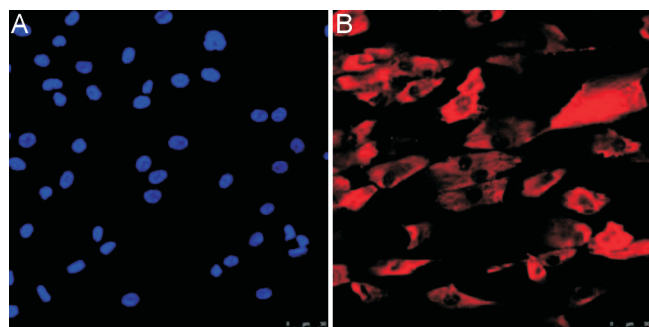


图6 PEDF 在重组慢病毒感染 hUCMSCs 的表达 ( $\times 400$ )

A:DAPI 染色;B:PEDF 表达。

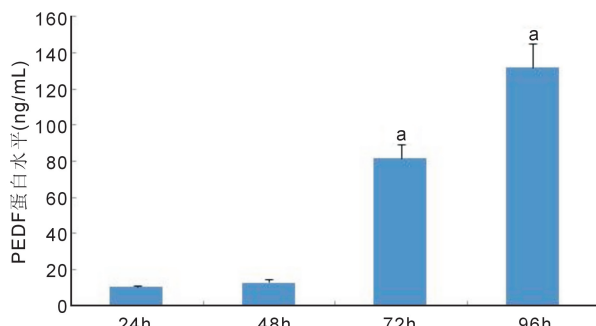


图7 ELISA 法检测重组慢病毒感染后 PEDF 蛋白情况  $^a P < 0.05$  vs 24h、48h。

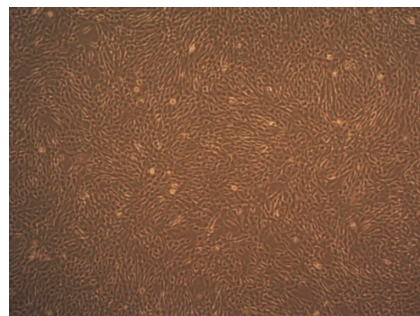


图8 重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染 hUCMSCs 后细胞形态 ( $\times 400$ )。

hUCMSCs 后,PEDF 蛋白分泌水平随时间持续增加。经重复测量资料的方差分析,不同时间点的 PEDF 蛋白分泌水平差异有显著统计学意义( $F=11020.90, P<0.001$ ),经 Bonferroni 法进行两两比较,24、48、72、96h 四个时间点的 PEDF 蛋白分泌水平差异有统计学意义( $P<0.001$ )。

2.4 重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染对 hUCMSCs 的影响 重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染 hUCMSCs 72h,再进行细胞传代 72h 后倒置显微镜下观察细胞增殖能力和细胞形态,细胞增殖能力没有受到影响,细胞达到 80% 以上融合度,细胞形态无明显变化(图 8)。流式细胞术检测细胞表型,结果显示 CD90、CD73、CD105 均呈阳性表达 ( $>98\%$ ),而 CD34、CD45、CD14、CD19 和 HLA-DR 呈阴性表达 ( $<2\%$ ),表明重组慢病毒感染并未影响 hUCMSCs 的细胞表型(图 9)。

### 3 讨论

视网膜色素变性是一组以进行性感光细胞及色素上皮功能丧失为共同表现的遗传性视网膜变性疾病<sup>[6]</sup>,以夜盲、进行性视野损害、眼底色素沉着和视网膜电图异常或

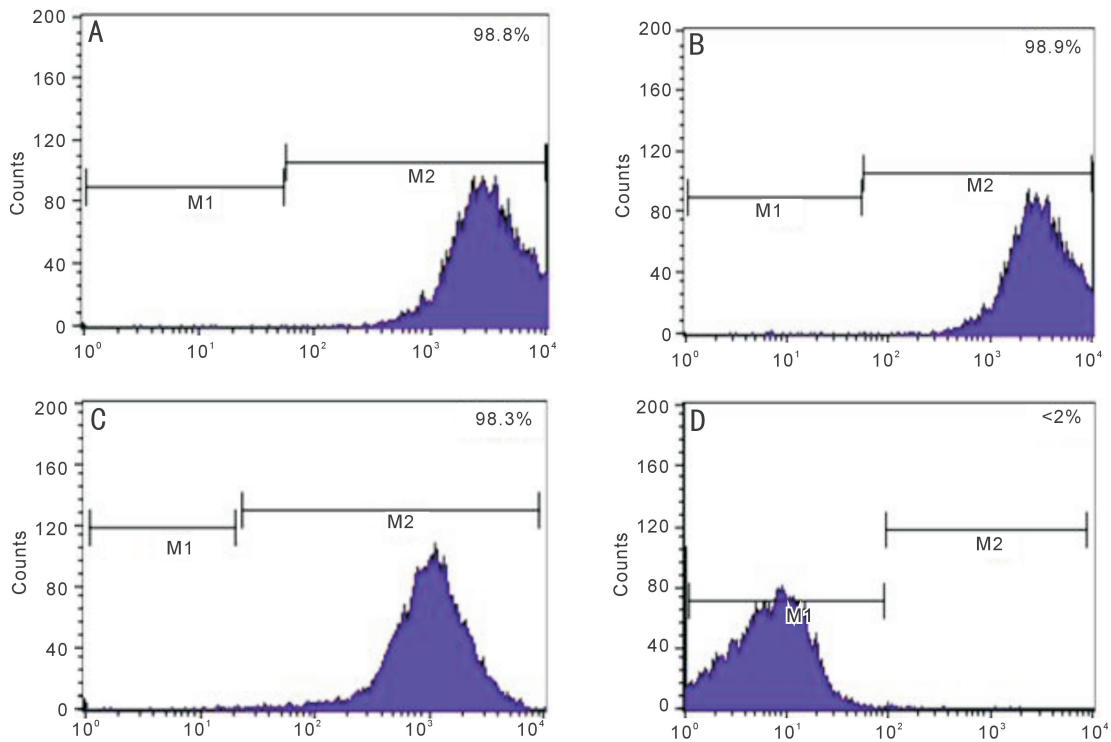


图9 重组慢病毒 pLenti-CMV-PEDF-EYFP 感染 hUCMSCs 后流式细胞术检测结果 A:CD90;B:CD73;C:CD105;D:阴性标记物(包括 CD34、CD45、CD14、CD19 和 HLA-DR)。

无波为主要临床特征,大多数患者病变仅在眼部。研究认为视网膜色素变性发生的主要原因是视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE) 的变性、坏死和丢失<sup>[7]</sup>。据估计全世界约有 300 多万患者。目前尚无有效治疗 RPE 变性的方法,相关治疗研究还处于探索阶段,如药物治疗、手术治疗、基因治疗、细胞移植治疗等。

PEDF 在人体中广泛分布,在中枢和外周神经系统中的许多神经元和一些非神经组织如肝脏、心脏、骨骼肌等均有表达, PEDF 在人眼组织中也广泛分布,角膜、晶状体、睫状体、视网膜和脉络膜中均检测到 PEDF 的表达。眼部 PEDF 主要由 RPE 细胞产生,分泌至光感受器间基质,包绕光感受器外节,发挥生理功能。PEDF 在视网膜的生长发育及许多疾病中起着神经分化、神经营养、神经保护和抑制新生血管形成等作用,可对抗缺血、长期光照、 $H_2O_2$  和视网膜脱离等所致的视网膜变性损伤,并可对抗视网膜和脉络膜等新生血管的形成,给视网膜变性疾病和新生血管性疾病等的治疗带来希望。作为一种可溶性糖蛋白, PEDF 一旦被分泌到细胞外之后,很快便代谢分解,难以持续发挥生理作用。给药途径是 PEDF 治疗的一个关键问题,单次眼内注射难以维持持久疗效,反复注射又存在眼内感染及其他并发症的风险。因此,寻找一种使 PEDF 在眼内持续表达的新方法已越来越获得广大科研工作者的关注。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 具有自我更新能力和多向分化潜能,属于非终末分化细胞,缺乏特异性分化标记,高表达细胞表面标记物 CD73、CD90、CD105,低表达 CD34、CD45、CD14、CD19、HLA-DR 等<sup>[8]</sup>。其中 CD73、CD90、CD105 属于间充质干细胞相关抗原, CD34 和 CD45 是造血干细胞的表面标记物, CD19 是 B 淋巴细胞表面标记物, HLA-DR 是外周血单核细胞表面标

记物, HLA-DR 与免疫排斥反应有关, HLA-DR 阴性表达提示 MSC 免疫原性低。目前,已从人体的脂肪、外周血、骨髓、脐带、胎盘等多种组织中分离获得 hMSCs,并可在体外大量扩增,且具有分化为脂肪细胞、软骨细胞等多种分化潜能。hMSCs 易于外源基因的转染和表达,并能有效分泌多种蛋白,是多种基因工程蛋白获取的理想细胞载体<sup>[9]</sup>。鉴于上述 MSC 的生物学特性, MSC 被广泛应用于多种疾病的研究。因此本研究选取了 hUCMSCs 作为基因载体,通过流式细胞术对体外培养扩增的 hUCMSCs 进行表型鉴定,检测结果显示 hUCMSCs 高表达 CD73、CD90、CD105,低表达 CD34、CD45、CD14、CD19、HLA-DR,符合国际细胞治疗行业对 MSC 的定义标准。

本研究采用的慢病毒载体相比其他载体,在感染干细胞方面具有较大的优势:其宿主细胞范围非常广泛,包括一些较难感染的细胞,如原代细胞、干细胞、未分化的细胞等;使用慢病毒载体能大大提高目的基因的感染效率,且目的基因整合到宿主细胞基因组的几率大大增加,能够实现目的基因的长期、稳定表达<sup>[10]</sup>。

本实验设计构建携带 PEDF 基因的重组慢病毒载体 pLenti-CMV-PEDF-EYFP,能高效感染 hUCMSCs,感染后的 hUCMSCs 进行传代培养观察,细胞活力、形态、增殖能力和细胞表型无明显影响,表明慢病毒本身对 hUCMSCs 无毒性作用。慢病毒可延长目的基因在细胞内的表达,本研究中重组慢病毒成功感染后的 hUCMSCs 能有效稳定表达高浓度的 PEDF 蛋白。根据 ELISA 检测结果,重组慢病毒感染 72h 与 96h 后, hUCMSCs 培养上清液中 PEDF 蛋白的浓度显著提升,对比 24h 与 48h,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),表明重组慢病毒感染后随着感染时间的延长, PEDF 蛋白分泌逐步增加,后续需要通过动物实验进行相关结果的进一步验证。

本研究结果获得能稳定分泌高浓度 PEDF 蛋白的 hUCMSCs 细胞株,可应用于治疗视网膜色素变性等视网膜相关疾病的临床前安全性和有效性评估,为进一步探索 PEDF-hUCMSCs 应用于治疗视网膜色素变性等眼科疾病奠定了实验基础和理论依据。

#### 参考文献

1 Nwani NG, Deguiz ML, Jimenez B, *et al.* Melanoma Cells Block PEDF Production in Fibroblasts to Induce the Tumor - Promoting Phenotype of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Res* 2016; 76(8): 2265-2276

2 Ishibashi Y, Matsui T, Taira J, *et al.* Protective Role of PEDF-Derived Synthetic Peptide Against Experimental Diabetic Nephropathy. *Horm Metab Res* 2016;48(9):613-619

3 Belkacemi L, Zhang SX. Anti-tumor effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF): implication for cancer therapy. A mini-review. *J Exp Clin Cancer Res* 2016;35:4

4 宋希拿,孟恒星,张宇光,等. 低氧对人脐带间充质干细胞生物学特性及增殖的影响. *生物医学工程与临床* 2014;18(2):106-112

5 王黎明,周建军,白雯,等. 脐带间充质干细胞治疗 17 例类风湿性关节炎患者的临床疗效观察. *中国免疫学杂志* 2010;26(7): 659-662

6 Jinda W, Pongvarin N, Taylor TD, *et al.* A novel start codon mutation of the MERTK gene in a patient with retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 2016;22:342-351

7 Mitamura Y, Mitamura - Aizawa S, Nagasawa T, *et al.* Diagnostic imaging in patients with retinitis pigmentosa. *J Med Invest* 2012; 59(1-2):1-11

8 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotentmesenchymal stem cells. The International Society for Cellular Therapy positionstatement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-317

9 Bexell D, Scheduling S, Bengzon J. Toward brain tumor gene therapy using multipotent mesenchymal stromal cell vectors. *Mol Ther* 2010;18(6):1067-1075

10 Leon-Rico D, Aldea M, Sanchez-Baltasar R, *et al.* Lentiviral Vector-Mediated Correction of a Mouse Model of Leukocyte Adhesion Deficiency Type I. *Hum Gene Ther* 2016;27(9):668-678