

骨髓间充质干细胞对大鼠肺气肿模型治疗机制的探讨

王丽雁,吴倩,王叶芳,汪伟民

摘要 目的 通过研究骨髓间充质干细胞(BMSC)对大鼠肺气肿模型血清和肺泡灌洗液(BALF)中白介素-17(IL-17)、白介素-6(IL-6)的影响以及肺组织病理学变化,探讨BMSC对慢性阻塞性肺疾病(COPD)的干预机制。方法 30只健康雄性SD大鼠,随机分成3组:正常对照组、肺气肿模型组、BMSC治疗组。通过气管内注射猪胰蛋白酶诱导建立肺气肿模型后,经大鼠尾静脉注射BMSC进行治疗。两周后处死大鼠,观察肺组织病理学变化及血清和BALF中白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞百分比。使用ELISA方法检测血清和BALF中IL-17、IL-6水平。结果 与正常对照组相比,肺气肿模型组和BMSC治疗组BALF中白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞的百分比升高($P < 0.05$),BMSC治疗组较肺气肿模型组显著降低($P < 0.05$);ELISA法结果显示肺气肿模型组和BMSC治疗组血清和BALF中IL-17、IL-6水平较正常对照组显著升高,BMSC治疗组明显低于肺气肿模型组($P < 0.05$);病理观察肺气肿模型组和BMSC治疗组都可看到气肿样改变,BMSC治疗组与肺气肿模型组比较肺组织平均内衬间隔(MLI)降低,单位面积平均肺泡数(MAN)增加($P < 0.05$)。结论 BMSC可能通过调节炎细胞的增殖及趋化来干预IL-17、IL-6表达,以及促进受损肺组织的修复,来发挥对COPD的干预作用。

关键词 慢性阻塞性肺疾病;骨髓间充质干细胞;白介素-17;白介素-6

中图分类号 R 563.3;R 392.4;R 392.114

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0572-05

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)的发病与气道慢性炎症及自身免疫异常有关,患者体内及气道局部存在大量炎细胞和炎性介质,如白介素(interleukin,IL)-17、IL-6。IL-17诱导多种趋化因子的分泌,引起气道和肺组织的损伤。IL-6促进中性粒细胞氧化和诱导淋巴细胞分泌抗体,延迟炎细胞凋亡,加重气道炎症反应。研究^[1]表明,骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSC)可以通过全骨髓贴壁法获得,且经

2014-03-25 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金(编号:KJ2009A118)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院老年呼吸内科,合肥 230022

作者简介:王丽雁,女,硕士研究生;

汪伟民,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:
wangwm7@tom.com

此方法获得的细胞稳定性和活力佳,分化潜能与安全性良好。该实验通过将BMSC经尾静脉注入大鼠肺气肿模型体内,观察BMSC对肺气肿模型肺组织的修复以及对炎症因子IL-17、IL-6的调节作用,初步探讨BMSC对COPD的干预机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂 SPF级健康雄性SD大鼠33只,含3只体重80~100g的幼鼠,余大鼠体重180~220g,由安徽医科大学实验动物中心提供;猪胰蛋白酶(porcine pancreatic elastase,PPE)购自美国罗氏公司;胰酶、胎牛血清、L-DMEM培养基购自美国HyClone公司;大鼠IL-6、IL-17酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自美国R&D公司。

1.2 BMSC的采集、分离与培养 选择3只4周体重80~100g的雄性SD大鼠,脱臼处死后,75%乙醇溶液浸泡10min后,于超净工作台无菌分离双侧股骨,剪去包括骺板在内的两侧骺端,用DMEM液反复冲洗骨髓腔,收集骨髓。将获得的骨髓细胞悬浮液移入离心管,2000r/min离心10min,弃上清液,用含10%胎牛血清的DMEM培养液(10%FBS,100U/ml青霉素,100U/ml链霉素)重悬,接种于25cm²的塑料培养瓶,置于37℃、5%CO₂培养箱内培养。48h半量换液一次,去除未贴壁细胞,倒置相差显微镜观察细胞生长情况及形态特征。以后每3d换液一次。当细胞铺满瓶底约80%时,用0.25%胰蛋白酶37℃消化3min,待细胞形态由梭形变为圆形后,停止消化,按1:2传代培养。

1.3 大鼠肺气肿模型的制备、实验分组及处理 30只雄性健康SD大鼠适应性饲养1周后,随机分为3组:正常对照组、肺气肿模型组、BMSC治疗组,每组各10只。将肺气肿模型组和BMSC治疗组大鼠分别称体重后,用体积分数为10%的水合氯醛(300mg/kg)腹腔内注射麻醉后,将大鼠固定于操作台上,常规消毒,纵向切开颈部皮肤,钝性分离皮下组织及胸骨舌骨肌,暴露气管,4号针头刺入气管内一次性滴入配制的PPE生理盐水溶液1U/g,并注入少量空气保证试剂或生理盐水全部进入气管,缝合皮肤,切口消毒,然后直立旋转大鼠,并按摩双侧胸

部,使试剂均匀分布于双侧肺。正常对照组依同样方法注入等体重比量的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)。将鼠放入独立盒中,注意保温,等清醒后放入原盒中,以普通饲料喂养12周后。待大鼠肺气肿模型成功后, BMSC治疗组大鼠经尾静脉注入浓度为 1×10^6 个/ml的第3代BMSC 1 ml,正常对照组及肺气肿模型组给予等量PBS处理,各组继续饲养2周后处死所有大鼠。

1.4 肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)细胞计数及IL-17、IL-6水平检测 大鼠称重、腹腔麻醉后固定,无菌条件腹主动脉取血,标本室温下静止2 h后3 000 r/min离心5 min,收集血清,分装储存于-80℃备用。暴露气管和肺门,于右主支管处结扎右肺,生理盐水2 ml×3次行左肺肺泡灌洗,回收的BALF存入硅塑管内,以1 500 r/min离心10 min,取上清液冻存-80℃备用。同时收集细胞并计算中性粒细胞和淋巴细胞百分率。按ELISA试剂盒说明书检测血清和BALF中IL-17、IL-6的浓度。

1.5 肺组织标本的留取 肺泡灌洗完毕后弃左肺,切取右侧肺组织,置于4℃PBS中洗去血液。所有大鼠取右肺组织浸入10%福尔马林液中固定24 h,制备蜡块。

1.6 肺组织病理学观察 各组大鼠肺组织切片行HE染色作常规病理学检查。每例标本选2张切片,每切片随机取上、下、左、右、中5个视野,测量时尽量避开支气管及大、中血管。观察肺平均内衬间隔(mean linear intercept, MLI)和单位面积平均肺泡数(mean alveolar numbers, MAN)。每只大鼠检测10个区域。

1.7 统计学处理 采用SPSS 13.0统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及SNK检验。

2 结果

2.1 BMSC的培养 原代培养24 h后,可见少量贴壁细胞,细胞大小及形态不均一,呈圆形或内皮细胞样;培养48 h半量换液,去除未贴壁的细胞,此时细胞开始融合,在集落中心密集,且集落间出现重叠,见图1A;约7 d细胞融合达80%以上,传代后细胞呈均匀分布的长梭形生长,平行或螺旋状排列,见图1B。本实验通过全骨髓贴壁法获得BMSC。

2.2 血清和BALF细胞计数 肺气肿模型组、BMSC治疗组血清和BALF中白细胞总数、中性粒细胞

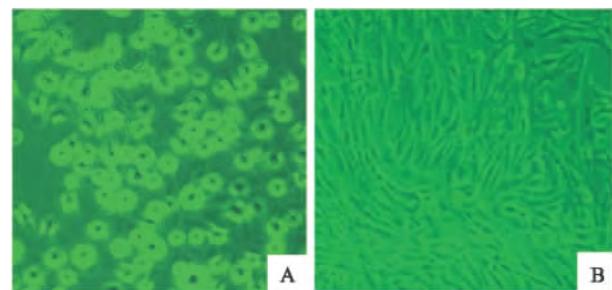


图1 体外培养BMSC的形态学观察 $\times 200$

A:原代细胞;B:第3代细胞

和淋巴细胞百分比显著高于正常对照组($P < 0.01$)。BMSC治疗组大鼠BALF中白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞百分比均低于肺气肿模型组($P < 0.05$),见表1。

2.3 血清及BALF中IL-17、IL-6水平 ELISA结果显示:肺气肿模型组与正常对照组比较,BALF和血清中IL-17、IL-6水平均明显升高($P < 0.01$);且BMSC治疗组与肺气肿模型组比较,BALF中IL-17、IL-6水平均下降($P < 0.05$),见表2。

表1 3组大鼠BALF中细胞计数及分类($n=10 \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 白细胞总数 ($\times 10^9/L$) | 中性粒细胞 百分比(%) | 淋巴细胞 百分比(%) |
|--------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 正常对照 | 2.41 ± 0.68 | 7.96 ± 3.7 | 6.42 ± 1.45 |
| 肺气肿模型 | $5.33 \pm 0.57^{**}$ | $24.01 \pm 4.91^{**}$ | $12.50 \pm 2.39^{**}$ |
| BMSC治疗 | $3.73 \pm 0.77^{\Delta}$ | $15.32 \pm 2.27^{\Delta}$ | $8.23 \pm 1.54^{\Delta}$ |

与正常对照组比较: $^{**} P < 0.01$;与肺气肿模型组比较: $^{\Delta} P < 0.05$

表2 3组大鼠BALF和血清中的IL-17和IL-6水平($ng/L n=10 \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 血清 | | BALF | |
|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | IL-17 | IL-6 | IL-17 | IL-6 |
| 正常对照 | 41.31 ± 3.12 | 11.64 ± 0.89 | 54.61 ± 4.12 | 15.89 ± 1.52 |
| 肺气肿模型 | $60.50 \pm 5.24^{**}$ | $23.22 \pm 1.42^{**}$ | $72.42 \pm 4.48^{**}$ | $32.12 \pm 2.23^{**}$ |
| BMSC治疗 | $50.60 \pm 3.62^{\Delta}$ | $17.24 \pm 3.04^{\Delta}$ | $60.83 \pm 3.76^{\Delta}$ | $24.14 \pm 3.42^{\Delta}$ |

与正常对照组比较: $^{**} P < 0.01$;与肺气肿模型组比较: $^{\Delta} P < 0.05$

2.4 大鼠肺组织病理学结果 正常对照组大鼠肺组织肉眼观表面光滑淡红色,质地较软,且富有弹性,指压无痕,镜下见肺组织均匀一致。肺气肿模型组大鼠肺组织肉眼见肺组织体积增大表面有囊泡状突起,色泽苍白,质地较硬且弹性差,指压后见压痕,切面可见肺组织形态大小不均一。HE染色结果显示:除正常对照组以外,肺气肿模型组和BMSC治疗组的肺组织均出现肺泡壁不同程度的变薄,部分断裂,肺泡腔扩大。BMSC治疗组较肺气肿模型组肺

气肿明显减轻,见图2。单位面积内肺气肿模型组和BMSC治疗组的MAN小于正常对照组,而MLI大于正常对照组($P < 0.05$);BMSC治疗组与肺气肿模型组相比,MAN大于肺气肿模型组,MLI小于肺气肿模型组($P < 0.05$),见表3。

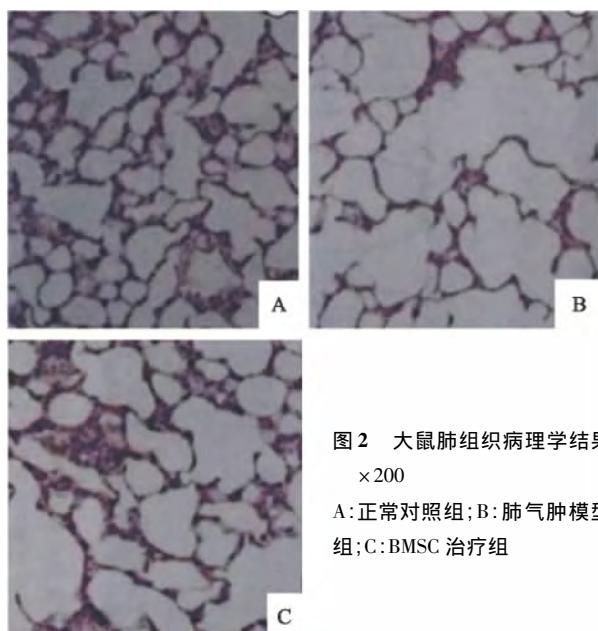


图2 大鼠肺组织病理学结果
×200
A:正常对照组;B:肺气肿模型组;C:BMSC治疗组

表3 3组大鼠肺组织病理学比较($n=10$ $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | MLI(μm) | MAN(个/ 10^2 mm) |
|--------|---------------------------|--------------------------|
| 正常对照 | 40.38 ± 3.14 | 4.73 ± 1.01 |
| 肺气肿模型 | $50.88 \pm 2.34^*$ | $2.28 \pm 0.89^*$ |
| BMSC治疗 | $45.63 \pm 1.60^{\Delta}$ | $3.90 \pm 0.62^{\Delta}$ |

与正常对照组比较:^{*} $P < 0.05$;与肺气肿模型组比较:^Δ $P < 0.05$

3 讨论

COPD 的发病与机体肺组织接触有害气体和微小颗粒引起的异常炎症反应有关。吸烟是 COPD 主要的危险因素,但也只有 20%~30% 的吸烟者最终发展为 COPD^[2]。这些人共同的特点是具有严重的气道炎性反应,最重要的是在停止吸烟的情况下,这种炎症反应不会因此停止。Agusti et al^[3]首先提出 COPD 存在自身免疫应答假说。目前认为,COPD 是由 T 淋巴细胞参与的慢性炎症反应和自身免疫反应所引起的疾病。

IL-17 是由 T 淋巴细胞及多种细胞分泌的一类炎性介质。研究^[4~5]表明,COPD 患者呼吸道 IL-17A/F 的表达是上调的,且 IL-17A 基因缺失将会降低香烟烟雾引起的炎症和肺泡Ⅱ型细胞凋亡。IL-17 诱导呼吸道上皮细胞分泌中性粒细胞趋化因子 IL-8,增强 ICAM-1 表达促进炎细胞的活化及黏

附使支气管上皮细胞变性、坏死、脱落,黏液分泌亢进,纤毛运动减退,炎症反复发作迁延不愈。另外,IL-17 诱导中性粒细和肺泡巨噬细胞释放弹性蛋白酶,造成肺泡壁的断裂,肺大泡形成。本实验中肺气肿模型组血清与 BALF 中 IL-17 浓度较正常对照组明显增高,BMSC 干预后 IL-17 水平的降低,表明 IL-17 与 COPD 形成过程有着密切联系。

IL-6 是由淋巴细胞、单核/巨噬细胞等多种细胞产生的炎性介质。IL-6 水平升高是 COPD 急性加重期的一个重要特征^[6~7],与小气道的炎症严重程度有关,且 IL-6 降低肺功能^[8]。IL-6 促进 B 细胞的分化及分泌抗体,使中性粒细胞氧化延缓凋亡,增加炎细胞的黏附作用及细胞外蛋白酶的活性。本研究结果显示,肺气肿模型组血清及 BALF 中 IL-6 的显著增高,与以往的研究相同,表明 IL-6 与 COPD 发生发展有相关性。

研究^[1]表明通过全骨髓贴壁法可以获得 BMSC。Weiss et al^[9]对接受 BMSC 治疗的 COPD 患者进行为期 2 年的随访,结果显示 BMSC 对 COPD 的治疗具有安全性。BMSC 分化为气道上皮细胞和肺泡Ⅱ型细胞修复受损的肺组织,分泌各类生长因子诱导细胞增生,增加肺小动脉的数量,缓解肺动脉高压和减轻肺血管的重塑^[10];BMSC 作为免疫调节细胞,减轻肺局部异常免疫反应,从而为损伤肺组织的修复提供有利环境。体外实验^[11~12]表明,BMSC 和 T 淋巴细胞共培养,可抑制淋巴细胞、NK 细胞的增殖,降低其分泌的炎性介质水平,从而减轻局部的炎症反应。

研究^[13]表明,用熏烟和注射胰蛋白酶两种方法诱导的肺气肿模型病理学特点和血液中的 IL-17 无明显差异。本研究通过气管内注入 PPE 诱导 COPD 模型,病理学观察肺气肿模型组和 BMSC 治疗组肺组织均出现肺泡壁变薄,部分断裂,肺泡腔扩大。肺气肿模型组 BALF 中白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞百分比均有不同程度增高,表明中性粒细胞和淋巴细胞在 COPD 患者气道及肺泡局部聚集。肺气肿模型组血液和 BALF 中的 IL-17、IL-6 较正常组对照组明显升高,经 BMSC 干预后降低,表明 BMSC 可能是通过抑制淋巴细胞和中性粒细胞等炎细胞产生 IL-17、IL-6,从而抑制 COPD 的慢性炎症反应。本研究显示,BMSC 干预后 MAN 较肺气肿模型组增大,MLI 减小,表明 BMSC 对肺小叶有修复作用。但这种对肺小叶的修复机制是通过抑制局部炎性反应,还是通过 BMSC 的定向分化为肺泡上皮产生,亦

或两者的协同作用,尚需进一步研究证实。而BM-SC对COPD的进展发挥了明显的干预作用却是显而易见的。

综上所述,由于肺组织的特殊结构促使BMSC能够高比例的定植于受损的肺组织,BMSC对COPD的治疗作用可能是通过抑制炎性细胞的增殖分化,调节炎细胞和炎症介质水平来减少肺组织的损害。这将为临床探索治疗COPD的新方法提供重要参考。

参考文献

- [1] 宋小莲,白冲.骨髓间充质干细胞移植对慢性阻塞性肺病气道及肺实质损伤的修复作用[D].上海:第二军医大学 2009.
- [2] Kohansal R, Soriano J B, Agusti A. Investigating the natural history of lung function: facts, pitfalls, and opportunities [J]. *Chest*, 2009, 135(5):1330-41.
- [3] Agusti A, Macnee W, Donaldson K, et al. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? [J]. *Thorax* 2003, 58(10):832-4.
- [4] Chang Y, Nadig J, Boulais N, et al. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Respiratory research* 2011, 12(1):43.
- [5] Chang Y, Al-Alwan L, Audusseau S. Genetic deletion of IL-17A reduces cigarette smoke-induced inflammation and alveolar type II cell apoptosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014, 306(2):132-42.
- [6] Agusti A, Edwards L D, Rennard S I, et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype [J]. *PLoS One* 2012, 7(5):e37483.
- [7] Ropeke S, Holz O, Lauer G. Repeatability of and relationship between potential COPD biomarkers in bronchoalveolar lavage, bronchial biopsies, serum and induced sputum [J]. *PLoS One* 2012, 7(10):e46207.
- [8] Kherbeck N, Tamby M C, Bussone G, et al. The role of inflammation and autoimmunity in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension [J]. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011, 44(1):31-8.
- [9] Weiss D J, Casaburi R, Flannery R. A Placebo-controlled randomized trial of mesenchymal stem cells in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chest* 2013, 143(6):1590-8.
- [10] Huh J W, Kim S Y, Lee J H, et al. Bone marrow cells repair cigarette smoke-induced emphysema in rats [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011, 301(3):255-66.
- [11] Prockop D J. Stemness does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MCSs) [J]. *Clin Pharmacol Ther* 2007, 82(3):241-3.
- [12] Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin [J]. *Tissue Antigens* 2007, 69(1):1-9.
- [13] 陈辉,屈晓娜,吴世满.豚鼠肺气肿模型肺组织Foxp3、ROR γ 及IL-17的表达及意义[J].中国呼吸与危重监护杂志,2012,11(3):223-6.

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on cytokines of IL-17, IL-6 in rat model of emphysema

Wang Liyan, Wu Qian, Wang Yefang, et al

(Dept of Geriatric Pulmonary Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To explore the mechanism of MSC treatment for COPD by studying the effect of bone marrow mesenchymal stem cells on IL-6 and IL-17 in BALF and serum of emphysema model, as well as lung pathological changes. **Methods** Thirty healthy male SD rats were randomly divided into 3 groups, normal control group, emphysema model group, BMSC treatment group. After establishing rat models of COPD through endotracheal injection which induced in porcine trypsin, biological treatment was given by injecting BMSC via rat caudal vein. All rats were executed two weeks later, observing the pathological changes of lung tissues and the total number of white blood cells, the percentage of neutrophils and lymphocytes in BALF and serum. Using the ELISA method to detect the level of IL-17 and IL-6 in serum and BALF. **Results** Compared with normal control group, the WBC total number, percentage of neutrophil and lymphocyte increased in BALF of emphysema model group and BMSC treatment group ($P < 0.05$), and BMSC treatment group was significantly lower than that in emphysema model group ($P < 0.05$); ELISA results showed that the level of IL-17, IL-6 in serum and BALF of emphysema model group and BMSC treatment group was significantly higher than normal control group, BMSC treatment group was lower than that in emphysema model group ($P < 0.05$). Emphysema-like changes could be seen in emphysema model group and BMSC treatment, compared with emphysema model group the average lung tissue lining interval (MLI) in BM-SC treatment group was decreased, while the mean alveolar number (MAN) per unit area was increased, and the

tumstatin 基因修饰的 CD34⁺ 造血干细胞生成抗血管生成活性的血小板

李娟¹, 罗以勤¹, 丁邦胜¹, 贺学姣¹, 周明², 赵亮¹, 姚丽娟¹

摘要 目的 以慢病毒为基因载体, 将 tumstatin cDNA 导入 CD34⁺ 造血干细胞, 在体外诱导生成 tumstatin 基因修饰的巨核细胞 (MKs) 和血小板, 检测产生的血小板对血管内皮细胞管状结构形成的作用。方法 构建 pLVX-tumstatin-mCMV-ZsGreen 重组载体后转染 293T 细胞进行病毒包装。用密度梯度离心法结合免疫磁珠分离法富集脐血中 CD34⁺ 造血干细胞。用慢病毒感染 CD34⁺ 造血干细胞, 在细胞因子组合培养液中诱导 MKs 生成, 流式细胞仪和形态学检测 MKs 的生成及产血小板情况。应用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测 tumstatin 基因的表达, 通过人脐静脉血管内皮细胞管状结构形成抑制试验研究血小板内容物生物学活性。结果 选择最佳感染复数 (MOI) 30:1 感染干细胞时效率最高; 流式细胞术检测结果显示, 细胞在诱导过程中, 转染组与未转染组细胞都有 MKs 与血小板的生成, 且生长速度和分化趋势基本相同。在转染的 MKs 基因组里, RT-PCR 法检测到 738 bp tumstatin 基因片段。Western blot 法检测到 tumstatin 在转基因细胞来源的血小板中稳定表达, 血小板可明显抑制人脐静脉内皮细胞管状结构形成。结论 基因修饰的 CD34⁺ 造血干细胞在体外成功诱导分化为 MKs 和血小板并表达 tumstatin 蛋白, 且这种血小板在体外显著抑制人脐静脉血管内皮细胞的管状结构形成。

关键词 tumstatin; 慢病毒载体; CD34⁺ 造血干细胞; 血管内皮细胞; 巨核细胞; 血小板

中图分类号 R 349.63; R 331.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0576-06

2013-12-10 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号:11040606M208); 安徽省高等学校省级自然科学研究项目(编号:KJ2011A163)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 检验科、² 输血科, 合肥 230001

作者简介: 李娟, 女, 硕士研究生;
罗以勤, 男, 副教授, 主任技师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: luoyiqin2003@163.com

difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Bone marrow mesenchymal stem cells may have intervention effect on COPD by regulating inflammation cell proliferation and chemotaxis to intervene the expression of IL-47 and IL-6, as well as promote the damaged lung tissue to repair.

Key words chronic obstructive pulmonary disease; bone marrow derived mesenchymal stem cell; IL-47; IL-6

血小板中含有许多血管新生促进因子如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 等以及血管生成抑制因子如凝血酶敏感蛋白-1 (thrombospondin-1, TSP-1) 等, 这些因子在血管生成中起到重要的调节作用^[1]。研究^[2]显示, 尽管血管生成抑制因子和促进因子均存在于血小板 α 颗粒内, 但血小板在影响血管生成过程中, 总的趋势是促进血管生成。肿瘤细胞可释放血小板活化因子诱导循环中的血小板活化和聚集, 使其释放颗粒里的内容物, 为肿瘤血管生成提供了丰富的血管生成促进因子, 从而影响肿瘤的生长和转移^[3]。研究^[4]显示 tumstatin 是一种内源性血管生成抑制剂, 大量来源于肾、肺、睾丸基底膜上的 IV 胶原 α 3 链。tumstatin 通过功能性受体特异性地诱导血管内皮细胞凋亡、抑制血管内皮细胞增殖, 从而抑制肿瘤的生长。

该研究以慢病毒为基因载体, 将 tumstatin cDNA 导入 CD34⁺ 造血干细胞, 进一步在体外诱导其大量生成 tumstatin 基因修饰的巨核细胞 (megakaryocytes, MKs) 和血小板, 并检测产生的血小板对血管内皮细胞管状结构形成的抑制作用。基因修饰的 MKs / 血小板过表达血管生成抑制因子 tumstatin, 有可能改变血管生成过程中血小板促进因子作用持续地占主导的地位。这种过表达目的蛋白的 MKs / 血小板, 或可称之为“治疗性” MKs / 血小板, 对肿瘤治疗以及化疗引起的血小板减低症治疗可能有着重要的价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 模板质粒 tumstatin 由安徽医科大学附属省立医院检验科实验室保存; pLVX-mCMV-