

构建携带人/鼠 *IFN- γ* 重组腺病毒体外转染人脐带间充质干细胞的实验研究*

李 慧^{1,2}, 胡琼英¹, 贾永前^{1 Δ}

1. 四川大学华西医院 血液科(成都 610041); 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院 血液科(成都 610072)

【摘要】 目的 构建人/鼠干扰素(*IFN- γ*)的重组腺病毒,体外转染人脐带间充质干细胞(human umbilical mesenchymal stem cells, HUMSCs),为研究 *IFN- γ* 在预防和治疗移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)中的作用提供实验依据。方法 采用 PCR 法从含有人/鼠 *IFN- γ* 基因的质粒中扩增出目的基因片段 *IFN- γ* ,然后定向克隆到穿梭质粒载体 pDC316 中,构建 pDC316-*IFN- γ* ,经酶切、PCR 及测序鉴定后,再将 *IFN- γ* 定向克隆至腺病毒骨架载体,从而构建携带 *IFN- γ* 的重组腺病毒载体,并转染人胚肾细胞系 293 细胞,进行重组腺病毒(Ad-*IFN- γ*)的包装、生产和纯化;用半数组织培养感染量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)法检测重组腺病毒滴度。将 Ad-*IFN- γ* 及空病毒(Ad-null,作为载体阴性对照)分别转染 HUMSCs,在荧光显微镜下观察细胞绿色荧光蛋白(GFP)的表达,采用 Western blot 与 ELISA 法鉴定 *IFN- γ* 蛋白的表达。结果 成功构建了携带 *IFN- γ* 的重组腺病毒,鼠 *IFN- γ* (Ad-*mIFN- γ*)的滴度为 1.0×10^{10} IU/mL,人 *IFN- γ* (Ad-*hIFN- γ*)的滴度为 1.6×10^{10} IU/mL,Ad-GFP 的滴度为 1.0×10^9 IU/mL。Ad-*IFN- γ* 转染 HUMSCs 后 24 h 开始观察到绿色荧光,72 h 时该荧光表达更强;Western blot 和 ELISA 法均证实 HUMSCs 表达 *IFN- γ* 蛋白。结论 成功构建了携带人/鼠 *IFN- γ* 基因的重组腺病毒载体,并证实其可有效转染 HUMSCs。

【关键词】 γ -干扰素 脐带间充质干细胞 腺病毒载体 转染

Construction of Recombinant Adenovirus Vector with Human/Mouse Interferon Gene and Its Transfection into Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells LI Hui^{1,2}, HU Qiong-ying¹, JIA Yong-qian^{1 Δ} . 1. Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Hematology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

Δ Corresponding author, E-mail: jia_yq@163.com

【Abstract】 Objective Construction and identification of recombinant adenovirus vector with human/mouse interferon (*IFN- γ*) and effectively transfection into human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUMSCs). **Methods** *IFN- γ* gene of human/mouse were amplified from the plasmid by polymerase chain reaction (PCR) and then inserted into the plasmid pDC316 to generate pDC316-*IFN- γ* . After being confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing, the DNA encoding *IFN- γ* in the new structure were inserted into the vector of recombinant plasmid adenovirus and confirmed by restriction enzyme digestion. Then the human embryonic kidney cell line 293 were transfected with confirmed Ad-*IFN- γ* , and the recombinant adenovirus were amplified, and the virus titer were detected using 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) assay. The expression of the green fluorescent protein (GFP) and *IFN- γ* were detected by fluorescent microscope and Western blot and ELISA after the recombinant adenovirus transfected HUMSCs. **Results** The recombinant adenovirus Ad-*hIFN- γ* were constructed successfully, and amplified with titer of 1.6×10^{10} IU/mL. The titer of Ad-*mIFN- γ* was 1.0×10^{10} IU/mL and the titer of Ad-GFP was 1.0×10^9 IU/mL. The green fluorescence proteins could be observed under fluorescent microscope in HUMSCs 24 h after transfection and with a stronger degree after 72 h, and *IFN- γ* expression in HUMSCs were confirmed by Western blot and ELISA. **Conclusion** Construction and identification of recombinant adenovirus vector of human/mouse *IFN- γ* and effectively transfection of HUMSCs were successful.

【Key words】 *IFN- γ* HUMSCs Adenovirus vector Transfection

造血干细胞移植(hematopoietic stem cell

transplantation, HSCT)已成为治疗恶性血液病、遗传缺陷病、自身免疫病及实体瘤的有效方法。但是移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)的发生严重影响和限制同种异体造血干细

* 863 计划项目(No. 2002AA205061)资助

Δ 通讯作者, E-mail: jia_yq@163.com

胞移植的疗效。目前常见的针对 GVHD 的治疗措施包括免疫抑制剂、单克隆抗体、去除供者 T 淋巴细胞等,但这些治疗方案都存在毒副作用^[1],因此,有必要探寻新的高效低毒的生物治疗策略,而干细胞的基因治疗成为热点。本研究拟采用携带鼠和人干扰素基因(*IFN-γ*)的腺病毒转染人脐带间充质干细胞(HUMSCs),为考察它们在体外对 T 淋巴细胞的调节效应及其在 GVHD 动物模型中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、腺病毒载体、细胞株及 HUMSCs

含人(h)/鼠(m)*IFN-γ* 基因的质粒及引物均由北京华大基因公司提供,穿梭载体 pDC316、AdMax 重组腺病毒系统为本元正阳基因技术有限公司产品,由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室提供。人胚肾 293 细胞也由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室提供,HUMSCs 由四川省脐带血干细胞库惠赠。

1.2 主要试剂和工具酶

间充质干细胞培养基(Lonza 公司),RPMI 1640 培养基、胎牛血清(Hyclone),DMEM 培养基(Gibco BRL 公司),胰蛋白酶(Sigma 公司),质粒小抽试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒(Omega 公司),PCR 反应体系(Solarbio 公司)、*EcoR* I 内切酶及 buffer、*Bgl* II 内切酶及 buffer、*Sal*I-HF 内切酶及 buffer、*T4* 连接酶(NEB 公司),脂质体 2000(Invitrogen 公司),兔抗人/鼠 *IFN-γ* 单抗(Epitomics 公司),HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(中杉金桥公司),ELISA 检测试剂盒(R&D 公司)。

1.3 PCR 法获取 *m/hIFN-γ* 基因

mIFN-γ 基因长度为 467 bp,*hIFN-γ* 基因长度为 501 bp,用 Primer Premier 5.0 软件设计相应的引物。*mIFN-γ* 基因上游引物:5'-GGAATT CATGAACGCTACACACTGCATC-3',下游引物:5'-GAAGATCTCAGCAGCGACTCCTTTTCCG-3'。内切酶为 *EcoR* I 及 *Bgl* II。*hIFN-γ* 基因上游引物:5'-TCGCGAATTCATGAAATATACAAG TTATATCTTG-3',下游引物:5'-TATATGTCGACTTACTGGGATGCTCTTCGACC-3',内切酶为 *EcoR* I 和 *Sal*I-HF。

PCR 反应的循环参数为 94 °C 3 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,共 25 个循环;72 °C 10 min。反应产物交北京华大基因测序鉴定。

1.4 pDC316-*m/hIFN-γ* 穿梭载体的构建

分别将获得的 *m/hIFN-γ* PCR 产物用对应的内切酶双酶切,琼脂糖凝胶电泳后回收基因片段,同时双酶切(鼠 *EcoR* I 和 *Bgl* II;人 *EcoR* I 和 *Sal*I-HF)含有 pDC316 的空载体,电泳回收线性载体,将基因片段分别与 pDC316 载体依据一定比例(鼠 11.5 : 0.5;人 7.5 : 1)用 *T4* 连接酶连接,采用氯化钙法转入含大肠杆菌和卡拉霉素的 LB 平板,通过 PCR 筛选出阳性克隆,提取质粒进行双酶切并测序鉴定,结果正确命名为 pDC316-*m/hIFN-γ*。

1.5 采用 AdMax 包装系统双质粒共转染入 HEK293 细胞

将 pDC316-*m/hIFN-γ* 质粒和 AdMax 通过脂质体 2000 共转染 HEK293 细胞,转染 14 d 左右,当 80% 以上细胞出现病变(cytopathic effect, CPE)后,收集细胞,经 -70 °C/37 °C 反复冻融,然后收集病毒(第 1 代毒种,P1),上清于 -70 °C 保存,作为随后大量病毒扩增的毒种。

1.6 重组腺病毒 Ad-*m/hIFN-γ* 的扩增、纯化

在 1 个 75 cm² 方瓶中接种 4.0 × 10⁶ 个 HEK293 细胞,待细胞生长至 90% 时,取 2 mL P2 代毒种接种培养瓶内,24 h 后显微镜下观察发现有 60% 细胞病变,44 h 后细胞完全病变。收获病变细胞混悬液后,冻融 3 次,离心,取上清,按同样方法接种于另外 4 个 75 cm² 方瓶中,44 h 完全出毒,收获病毒,用于接种转瓶。在每个转瓶中接种 1.8 × 10⁶ 个 HEK293 细胞,共接种 4 个转瓶,按 10 mL/转瓶[病毒感染复数(MOD)约为 1]接种第 2 步收获的病毒上清,染毒后 70 h 收获病变细胞混悬液。将混悬液 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,细胞沉淀用 Tris 缓冲液重悬,反复冻融 3 次,6 000 r/min 离心,取上清,用 DNase 酶消化后,用 0.45 μm 滤膜过滤,然后进行柱纯化。

1.7 重组腺病毒 Ad-*m/hIFN-γ* 的滴度测定

采用终点稀释法进行测定。培养 293 细胞,以 2% DMEM 将病毒液稀释成 10⁶ 开始连续 8 个稀释梯度,每个浓度重复 10 个孔,每孔加入病毒稀释液 100 μL,另留两排不加病毒液作为阴性对照。37 °C 下,5% CO₂ 孵箱培养 10 d,在 10 d 后观察 293 细胞,计数每排出现 CPE 的孔数,依据文献^[2]计算细胞病毒滴度(*T*)。对于 100 μL 样品,滴度 $T = 10^{1+d(s-0.5)}$, $d = \log_{10}$ 稀释度 = 1 (对于 10 倍的稀释度而言), $s =$ 阳性比率之和(从第 1 个 10 倍稀释度算起)。

1.8 选择腺病毒体外转染 HUMSCs 的最适 MOI 值

因为 HUMSCs 表面较少表达腺病毒受体,所以腺病毒直接感染 HUMSCs 的效率极低,我们选用阳离子脂质体 Lipofectamin 2000 介导腺病毒转染 HUMSCs 以提高腺病毒感染效率。当 HUMSC 细胞长至 80%~90% 时,胰蛋白酶消化细胞后按照 1×10^6 /孔的比例加入到 6 孔板中,37 °C、5% CO₂ 孵箱中过夜,0.8 μ g Lipofectamine 2000 加入到培养基中,同时用培养基配制 Ad-null[空载腺病毒但含有绿色荧光蛋白(GFP)]分别至 MOI=100/mL、MOI=200/mL、MOI=300/mL,之后缓慢加入相应 6 孔板中,混匀,24 h 之后,10 倍荧光镜下观测绿色荧光,每组设置 3 个复孔,每孔随机选取 5 个视野,每个视野均检测表达 GFP 细胞数目和明场下细胞数目,并计算表达 GFP 细胞的阳性比值。

同时,利用流式细胞术进一步确定最适 MOI。首先按照上述操作不同 MOI 腺病毒(Ad-null, 100/mL、200/mL 和 300/mL)在 Lipofectamin 2000 辅助下感染 HUMSCs。24 h 后,弃去培养基,并用胰蛋白酶消化获取细胞悬液;PBS 洗涤 2 次,细胞沉淀用 300 μ L PBS 重悬,最后用流式细胞仪(BD FACS Calibur)检测绿色荧光强度,每组设置 3 个复孔,并以空白对照作为阴性对照统计 GFP 表达的阳性率。

1.9 HUMSCs 体外感染 Ad-*h/mIFN- γ* 后 *IFN- γ* 表达的检测

依据前期结果,我们采用转染率高、HUMSCs 细胞形态受损少的 MOI(MOI = 200/mL)感染 HUMSCs 细胞,复苏 HUMSCs 细胞培养至 80%~90%,消化后调整细胞数目至 1×10^6 /mL,接种 6 孔板,将 HUMSCs 分为 4 组,Ad-null 组、Ad-*mIFN- γ* 组和 Ad-*hIFN- γ* 组及空白对照组。各组缓慢滴入 1 mL 相应的病毒稀释液,37 °C、5% CO₂ 培养 6 h,弃去上清液,加入 2 mL HUMSCs 专用培养基,继续培养 18 h。收集上清,并用超滤浓缩管将上清液浓缩 20 倍至 100 μ L,制备蛋白电泳样品进行免疫印迹分析。具体方法如下:150 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳 1.5 h,之后转印到 PVDF 膜上,用含 5% (g/mL) 脱脂奶粉的 PBST 溶液封闭 1 h (37 °C);用 1:3 000 稀释的兔抗 *IFN- γ* 抗体孵育过夜(4 °C),之后 PBST 洗涤 3 次,15 min/次;用 1:5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体孵育 1 h(37 °C),之后 PBST 洗涤 3 次,15 min/次。之后

用 1:1 混合的显影液和定影液湿润,暗室成影并用冲洗仪冲洗。

同时,按照上述操作分组,在 HUMSCs 感染 24 h、48 h、72 h 及 96 h 后分别收集细胞上清,之后严格按照 ELISA 试剂盒操作检测上清中 *IFN- γ* 的含量。具体操作简述如下:取出 ELISA 板子,室温孵育 30 min;对应孔中分别加入 50 μ L 分析稀释液和 50 μ L 稀释液样品以及标准品,室温孵育 2 h;弃去上清液,洗涤液清洗 3 次,每孔加入 100 μ L 酶联抗 *IFN- γ* 抗体,室温孵育 1 h;弃去上清液,洗涤液清洗 3 次,每孔加入 100 μ L 显色液,室温避光孵育 30 min,每孔加入 50 μ L 终止液,450 nm 处检测吸光度值(A₄₅₀),并依据标准曲线计算上清中 *IFN- γ* 含量。

1.10 统计学方法

组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *h/mIFN- γ* 基因扩增的 PCR 产物

从含有目的基因 *h/mIFN- γ* 的质粒中获取到了 *h/mIFN- γ* 基因片段,经凝胶电泳检测得到 PCR 产物大小分别为 501 bp (*hIFN- γ*) 及 467 bp (*mIFN- γ*),与目的基因片段 cDNA 一致,见图 1。

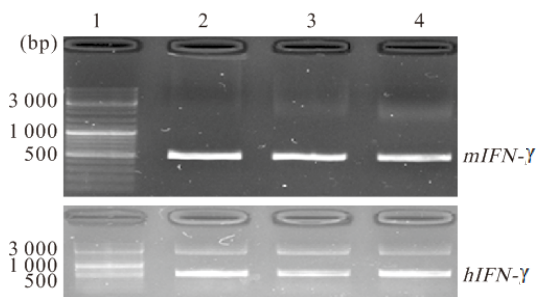


图 1 *h/mIFN- γ* 目的基因 PCR 结果

Fig 1 PCR results of *h/mIFN- γ* gene amplification

1: Marker; 2-4: PCR results, *h/mIFN- γ* at around 500 bp

2.2 重组穿梭质粒 pDC316-*m/hIFN- γ* 阳性克隆酶切及测序鉴定

图 2 显示 pDC316-*m/hIFN- γ* 成功插入了目的基因 *m/hIFN- γ* , 将其基因测序与 GenBank 数据库 *m/hIFN- γ* 基因 mRNA 全长进行比对,结果完全一致。

2.3 重组腺病毒 Ad-*m/hIFN- γ* 的鉴定及滴度

重组腺病毒 pDC316-*m/hIFN- γ* 转染 HEK293 细胞 10 d 后开始出毒,细胞变大变圆,并开始出现

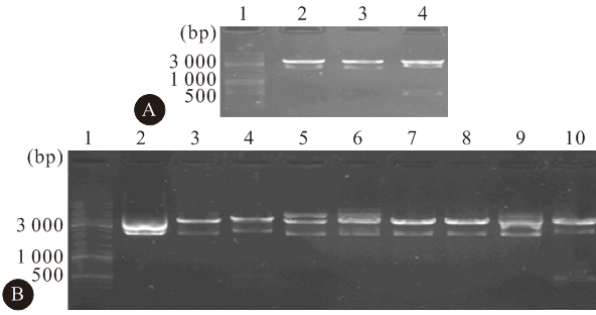


图 2 穿梭载体 pDC316-*m/hIFN- γ* 酶切后鉴定结果

Fig 2 The restricted enzyme digested maps of shuttle carrier pDC316-*m/hIFN- γ*

A: *mIFN- γ* ; B: *hIFN- γ* ; 1: Marker; Lane 4 in above figure, and lane 10 in below figure for bands after enzyme digestion around 500 bp, others bands for controls

明斑(图 3),待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒。第 13 d 收 P1,作为随后大量病毒扩增的毒种。P2 代毒种接种培养瓶内,培养 24 h 后,显微镜下观察发现有 60% 细胞病变,44 h 后细胞完全病变。经反复感染、扩增及纯化,获得高滴度的复制缺陷性重组腺病毒 pDC316-*m/hIFN- γ* ,采用终点稀释法进行病毒滴度测定,Ad-*mIFN- γ* 的滴度为 1.0×10^{10} IU/mL,Ad-*hIFN- γ* 的滴度为 1.6×10^{10} IU/mL。

2.4 腺病毒感染 HUMSCs 的最适 MOI

结果(图 4)显示:当 MOI 为 100/mL 时,镜下

可见表达 GFP 的 HUMSCs 细胞约占 49.82%,而流式细胞术分析阳性绿色荧光的强度约占 50.50%;随着 MOI 的增加,表达 GFP 的 HUMSCs 细胞数目也随之增加,当 MOI 为 200/mL 时,大约有 90.23% 的 HUMSCs 细胞表达绿色荧光蛋白,同时阳性的绿色荧光强度达到 89.12%;当 MOI 为 300/mL 时,大约有 91.64% 的 HUMSCs 细胞表达绿色荧光蛋白,同时阳性细胞的绿色荧光强度达到 92.77%,此时其荧光强度与 MOI 为 200/mL 时相比,无明显提高($P > 0.05$),但是在此条件下细胞形态影响受损严重,故后续实验中我们采用 MOI = 200/mL 的感染复数进行。

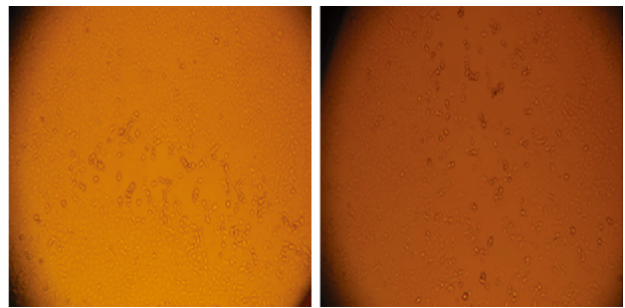


图 3 重组腺病毒 Ad-*m/hIFN- γ* 感染 HEK293 细胞培养 10 d 后噬斑现象

Fig 3 The plaques phenomenon for recombinant adenovirus Ad-*m/hIFN- γ* infection HEK293 cell at 10 d (left: Ad-*hIFN- γ* ; right: Ad-*mIFN- γ*)

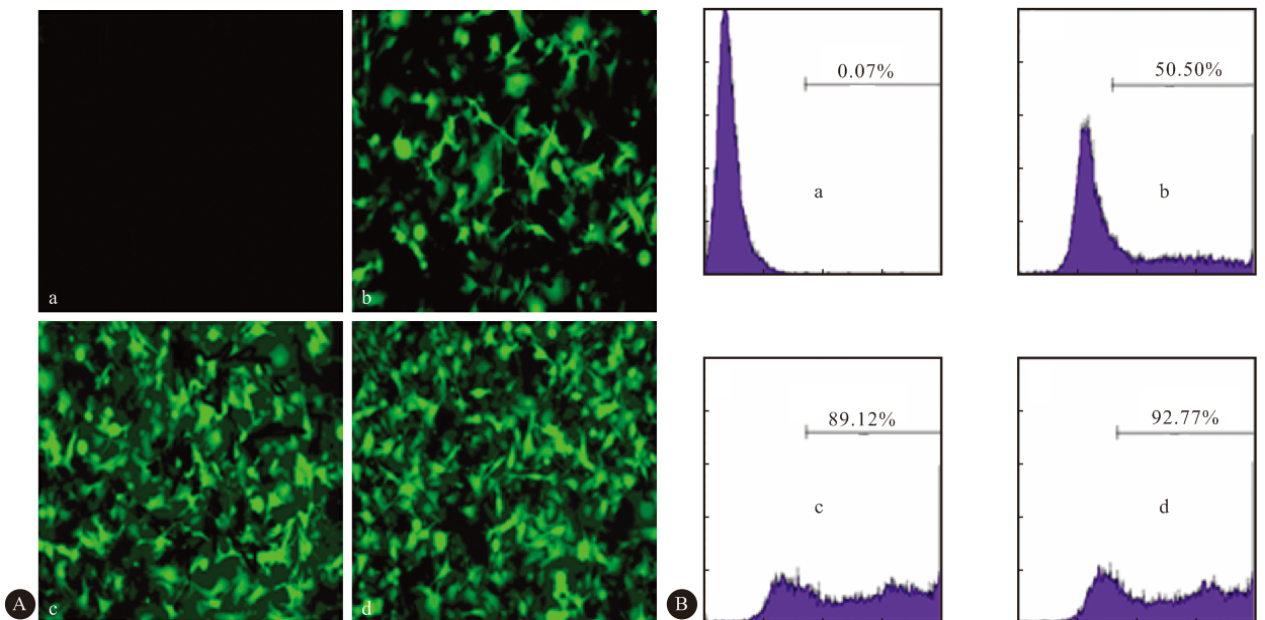


图 4 在不同的 MOI 时 Ad-GFP 感染 HUMSCs 后细胞形态改变(A)及绿色荧光强度变化(B)

Fig 4 The change of cell morpholog (A) and green fluorescence intensity (B) after Ad-GFP infected HUMSCs in different MOI

a: Blank control; b: MOI=100/mL; c: MOI=200/mL; d: MOI=300/mL

2.5 转染重组腺病毒后各组细胞 *IFN-γ* 蛋白的表达

Western blot 结果(图 5)显示,在 Ad-*hIFN-γ* 组和 Ad-*mIFN-γ* 组 HUMSCs 的培养上清液中,可见一条清晰的相对分子质量略小于 25×10^3 的条带;而在 Ad-null 组和空白对照组 HUMSCs 培养上清中,无任何特异性条带显示,说明构建的重组 Ad-*hIFN-γ* 和 Ad-*mIFN-γ* 能有效地感染 HUMSCs 细胞并表达 *IFN-γ* 蛋白。

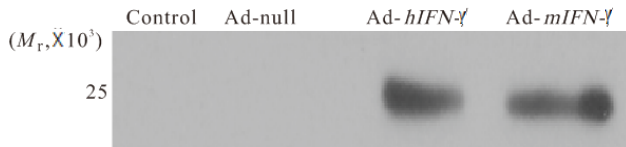


图 5 Western blot 检测 *IFN-γ* 的表达

Fig 5 The expression of *IFN-γ* detected with Western blot

ELISA 结果(图 6)显示:无论是 Ad-*hIFN-γ* 组还是 Ad-*mIFN-γ* 组,感染 HUMSCs 细胞 24 h 后,细胞上清中均可检测到 *IFN-γ* 蛋白的表达,平均浓度分别为 (265.3 ± 8.58) pg/mL 和 (296.8 ± 7.6) pg/mL;之后,随着时间的推延,其水平上升,72 h 后 *IFN-γ* 的表达达到顶峰,平均浓度分别为 (879.2 ± 6.4) pg/mL 和 (879.2 ± 6.1) pg/mL;随后,其表达水平在 96 h 时略有下降,但仍维持在一个较高的水平〔分别为 (620.5 ± 4.5) pg/mL 和 (702.0 ± 8.5) pg/mL〕,两组 *IFN-γ* 蛋白水平在 24 h、96 h 时差异有统计学意义($P < 0.05$)。而另外两组细胞上清中基本检测不到 *IFN-γ* 的表达。

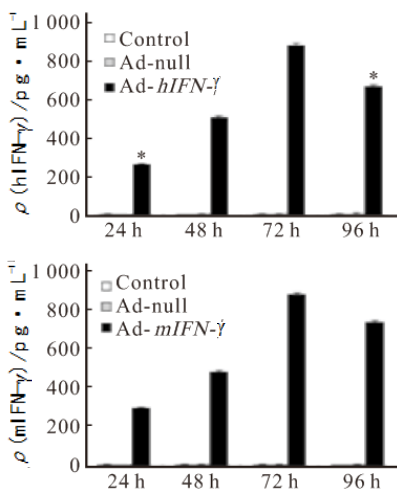


图 6 转染后不同时间 Ad-*h/mIFN-γ* 在 HUMSCs 细胞中的表达

Fig 6 The expression of Ad-*h/mIFN-γ* in HUMSCs cells at different time

* $P < 0.05$, vs. Ad-*mIFN-γ* at the same time

3 讨论

GVHD 的发生是宿主和供者的抗原提呈细胞 (APC) 及炎症因子一起触发和激活供者来源的 T 细胞,后者增殖分化为效应细胞而产生的,目前国内外的研究表明 HUMSCs 具有支持造血、抑制异体 T 细胞增殖的作用,从而抑制 GVHD 的发生^[3,4]。HUMSCs 来源于脐带华通胶分离所得,含量丰富,可稳定在体外分离,并且扩增迅速,无伦理道德限制,成本低,相对纯净^[5],它同骨髓 MSCs 一样不会随着传代次数的增加和机体年龄的增长导致增殖能力和分化能力降低^[6],因 HUMSCs 具有低免疫原性和无致瘤活性,并易转染外源基因,是细胞治疗和基因治疗的良好载体^[7]。

IFN-γ 是一个重要的免疫调节因子,对 T 细胞的抑制作用可以通过抑制供者 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 活化和扩增,诱导它们凋亡和阻滞细胞周期来完成^[8,9]。还能明显上调吲哚胺 2,3-加双氧酶 (indoleamine, 3-dioxygenase, IDO) 基因,通过 STAT1 和 IRF-1 结合位点 (GAS 和 ISRE) 的启动子依赖途径或激活 PI3K、JNK 或 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 来实现^[10,11]。*IFN-γ* 有助于 MSCs 活化,活化的 MSCs 抑制 GVHD 的效率较未活化的 MSCs 高 5 倍^[12]。*IFN-γ* 和 HUMSCs 两者相互作用,为其用于临床预防和治疗 GVHD 提供了依据。

本研究成功构建了重组腺病毒,病毒滴度高达 1.0×10^{10} IU/mL,且毒性稳定,感染 HUMSCs 后 Ad-*h/mIFN-γ* 表达水平在 24 h 就出现升高,96 h 时才略有下降,但仍维持在一个较高的水平。分析重组效果好、病毒滴度高、*IFN-γ* 表达稳定的原因如下:①系统的构建选择了腺病毒。腺病毒是目前基因治疗中应用最广泛的一种病毒载体,宿主细胞范围广泛,易制备高滴度病毒粒子;在感染细胞内不发生整合,因此没有致癌和致突变的危险,腺病毒相对稳定,经得起纯化、浓缩^[13,14]。②采用了 AdMax 包装系统而非传统的 AdEasyTM 系统。该系统有多种优势,包括操作简便、在共转染前不需要进行质粒线性化,重组效率高、获得的病毒产率高,目的基因的表达水平高等^[15]。AdMax 包装系统是通过 Cre/loxP 获得重组病毒,这个过程发生在 293 细胞中,并避免在细菌中重组,将克隆了外源基因的腺病毒穿梭质粒与携带了腺病毒大部分基因组的包装质粒共转染 293 细胞而实现的,而 pDC316 质粒适用于该系统的穿梭质粒。③采用间接方法提高了感染

率。腺病毒直接感染 HUMSCs 的效率极低,是因为 HUMSCs 表面较少表达腺病毒受体,同时腺病毒表面带负电荷,故我们选用阳离子脂质体 Lipofectamin 2000 介导腺病毒转染 HUMSCs 以提高腺病毒感染效率。

本实验成功构建了含鼠和人 *IFN- γ* 基因的腺病毒载体及有效地感染 HUMSCs,并在细胞外分别通过 Western blot 及 ELISA 法进行 *IFN- γ* 基因表达产物的定性和定量检测,结果理想,对进一步研究 *IFN- γ* 和 HUMSCs 在预防和治疗 GVHD 中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Canninga-van Dijk MR, van der Straaten HM, Fijnheer R, *et al.* Anti-CD20 monoclonal antibody treatment in 6 patients with therapy-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood*,2004;104(8):2603-2606.
- 2 Darling AJ, Boose JA, Spaltro J. Virus assay methods: accuracy and validation. *Biologicals*,1998;26(2):105-109.
- 3 Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*,2004;363(9419):1439-1441.
- 4 Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*,2006;81(10):1390-1397.
- 5 Ianus A, Holz GG, Theise ND, *et al.* *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*,2003;111(6):843-850.
- 6 Lu LL, Liu YJ, Yang SG, *et al.* Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem Cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*,2006;91(8):1017-1026.
- 7 Kita K, Gauqlitz GG, Phan TT, *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem cells Dev*,2009;19(4):491-506.
- 8 Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, *et al.* IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol*,2001;22(10):556-560.
- 9 Asavaroengchai W, Wang H, Wang S, *et al.* An essential role for IFN-gamma in regulation of alloreactive CD8 T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*,2007;13(1):46-55.
- 10 King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol*,2007;39(12):2167-2172.
- 11 Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signaling and non-canonical NF-kappa B activation. *Nat Rev Immunol*,2007;7(10):817-823.
- 12 Yoo KH, Janq IK, Lee MW, *et al.* Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol*,2009;259(2):150-156.
- 13 Alden TD, Pittman DD, Beres EJ, *et al.* Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein-2 gene therapy. *J Neurosurg*,1999;90(1 Suppl):109-114.
- 14 李 戈. 重组人 KGF 腺病毒载体的构建及其对 A549 细胞低氧化应激的影响. 兰州:甘肃农业大学,2012.
- 15 周建民,王勤章,丁国富等. AdMax 系统构建腺病毒载体介导 SCL 基因转染 Cajal 样间质细胞及其表达. *临床与实验病理学杂志*,2012;28(1):33-37.

(2015-02-24 收稿,2015-06-28 修回)

编辑 汤 洁