

人白细胞介素12腺病毒载体构建及在人骨髓间充质干细胞中的表达*[†]

陈媛媛^{1,2}, 谭晓华¹, 马晶莹¹

Construction and expression of an adenoviral vector encoding human interleukin-12 in human bone marrow mesenchymal stem cells

Chen Yuan-yuan^{1,2}, Tan Xiao-hua¹, Ma Jing-ying¹

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have suggested that interleukin-12 (IL-12) is a powerful anti-tumor cell factor. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are prone to introduction and expression of exogenous gene, and have weak immunizing antigen and immunological regulation functions. Therefore, mesenchymal stem cells (MSCs) carrying IL-12 gene possess great prospects for tumor treatment.

OBJECTIVE: To construct an adenoviral (Ad) vector encoding human IL-12 (hIL-12) gene, infect human BMSCs, and detect the expression of IL-12.

METHODS: The total RNA of human dendritic cells (DCs) was obtained. hIL-12 p35 and p40 cDNA were amplified from the total RNA by RT-PCR, and p35 and p40 fragments were linked by internal ribosomal entry sites (IRES), to construct the shuttle vector pDC515 p35/IRES/p40. Using Ad MaxTM adenovirus vector system, pDC515 p35/IRES/p40 and pBHGfrt Δ E1, 3FLP were cotransfected into 293 cells, and Ad hIL-12 was generated by FLP recombinase-mediated site-specific recombination. After Ad hIL-12 infection, hBMSCs were irradiated with γ -ray to lose proliferative activity. IL-12 levels were determined in cell supernatants utilizing hIL12p70 enzyme linked immunosorbent assay.

RESULTS AND CONCLUSION: The sequences of p35 and p40 fragments were identical with those provided by GenBank NM_000882 (762 bp) and NM_002187 (987 bp), respectively. Ad MaxTM was an efficiently and quickly packaging system of adenoviral vectors. hIL-12 gene in which the two subunits p35 and p40 were linked by IRES can efficiently express the protein of IL-12p70. The high expression of IL-12 is consecutively found after the infection of human BMSCs with Ad hIL-12, suggesting a potential application to the gene therapy of human BMSCs as a carrier.

Chen YY, Tan XH, Ma JY. Construction and expression of an adenoviral vector encoding human interleukin-12 in human bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(23): 4186-4190. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

¹Biotherapy Center, General Hospital of Beijing Military Area Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China;
²Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Chen Yuan-yuan^{*}, Studying for master's degree, Biotherapy Center, General Hospital of Beijing Military Area Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China; Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China yuanyuan840725@126.com

Correspondence to: Tan Xiao-hua, Doctor, Chief physician, Master's supervisor, Biotherapy Center, General Hospital of Beijing Military Area Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China xiaohua_t@hotmail.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30972804*

Received: 2010-02-04 Accepted: 2010-04-06

摘要

背景: 研究表明, 白细胞介素 12 是一种强有力的抗肿瘤细胞因子, 骨髓间充质干细胞易于外源基因的导入和表达, 且具有较弱的免疫原性和免疫调节功能, 因此, 利用携带白细胞介素 12 基因的间充质干细胞对于肿瘤的治疗具有极大的发展前景。

目的: 构建人白细胞介素 12 5 型腺病毒载体(Ad hIL-12), 感染人骨髓间充质干细胞, 检测白细胞介素 12 的表达。

方法: 提取成熟的树突状细胞的总 RNA, 用 RT-PCR 方法获得 hIL-12 p35 和 p40 基因 cDNA, p35 和 p40 cDNA 通过脑心肌炎病毒内部核酸进入位点连接, 构建 pDC515 hIL-12 p35/IRES/p40 腺病毒穿梭质粒。采用 Ad MaxTM 腺病毒载体体系, pDC515 hIL-12 p35/IRES/p40 穿梭质粒与 pBHGfrt Δ E1, 3FLP 骨架质粒共转染至 293 细胞, 通过重组酶位点特异性重组获得 Ad hIL-12。Ad hIL-12 感染人骨髓间充质干细胞后经 γ 射线照射使细胞失去增殖能力, 用 hIL-12p70 ELISA 试剂盒检测细胞上清中白细胞介素 12 的水平。

结果与结论: 经测序证实, RT-PCR 所获得的 hIL-12 p35 和 p40 基因 cDNA 序列与 GenBank NM_000882(762 bp)和 NM_002187(987 bp)提供的序列完全一致。用 Ad MaxTM 腺病毒载体体系可高效、快捷地获得所要包装的腺病毒载体, 通过 IRES 连接 hIL-12 的两个亚基 p40 和 p35 可有效地表达 IL-12p70 蛋白; Ad hIL-12 腺病毒载体感染人骨髓间充质干细胞后可持续高水平分泌白细胞介素 12, 在以人骨髓间充质干细胞为载体细胞的基因治疗中有潜在的应用前景。

关键词: 白细胞介素 12; 骨髓间充质干细胞; 腺病毒载体; 基因治疗; 干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.23.002

陈媛媛, 谭晓华, 马晶莹. 人白细胞介素 12 腺病毒载体构建及在人骨髓间充质干细胞中的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(23):4186-4190. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

人白细胞介素 12(human interleukin-12, hIL-12)又名自然杀伤细胞刺激因子(NKSF)或细胞毒性淋巴细胞成熟因子(CLMF), 由专职抗原提呈细胞产生, 如B淋巴细胞、树突状细胞和单核细胞^[1]。hIL-12蛋白是由p35和p40两个亚

基通过二硫键连接而成, 两个亚基同时在细胞内表达时才能发挥完整的生物学效应^[2]。hIL-12是目前发现的最有效的抗肿瘤细胞因子之一^[3], 并具有很强的抗感染作用。但临床研究表明^[4], 全身应用的毒副作用较大, 所以, 寻找一种可以局部持续产生IL-12的方法具有很重要的临床应用价值。

人骨髓间充质干细胞(human bone-marrow

mesenchymal stem cells, hBMSCs)是成人骨髓中存在的一种具有多向分化潜能的非造血多能干细胞, 这种细胞在一些化学物质或细胞因子的作用下, 可向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、脂肪细胞等间充质细胞及神经星形胶质细胞、少突胶质细胞等非间充质细胞谱系分化。并具有取材方便、容易培养、易于外源基因的导入和表达调控以及免疫原性低等特性, 被广泛应用于基因治疗、免疫治疗^[5-8]。本实验构建编码hIL-12的腺病毒载体, 用该载体感染hBMSCs, 检测IL-12在hBMSCs中的表达, 为hBMSCs介导IL-12的基因治疗提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 以细胞为对象, 开放性实验。

时间及地点: 实验于2009-05/11在解放军北京军区总医院生物治疗中心实验室完成。

材料: 健康人外周血来自本院输血科, 骨髓来源于本院血液科异基因造血干细胞移植中健康供者, 均无造血系统疾病, 均征得供者及家属同意。

主要试剂:

主要试剂	来源
各种限制性内切酶	日本TaKaRa公司
T ₄ DNA连接酶	美国NEB公司
RT-PCR试剂盒	美国Invitrogen公司
RNA提取试剂盒	北京博迈德生物科技有限公司
各种质粒提取和胶回收试剂盒	美国O-MEGA Bio-Tek公司
Ad Max TM FLP重组腺病毒系统	加拿大Microbix Inc.
hIL-12p70 ELISA试剂盒	法国Diacclone公司
各种培养基和胎牛血清	美国Gibco公司

实验方法:

人外周血来源的树突状细胞培养: 抽取健康人外周血, 用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离出人外周血单个核细胞, 采用黏附贴壁法从外周血CD14⁺单核细胞中用rhGM-CSF和rhIL-4培养获得树突状细胞, 培养方法参照文献[9]。

hIL-12基因的克隆: 将分离纯化的树突状细胞经细菌脂多糖(LPS)处理24 h, 刺激树突状细胞成熟。用细胞总RNA快速提取试剂盒提取树突状细胞的总RNA, 按ThermoScriptTM试剂盒说明书合成第一链cDNA。设计两对引物, 第一对引物用于扩增p40基因片段, 上游引物: 5'-ccg tct gag atg tgt cac cag cag ttg-3'(在5'端

引入Xho I位点), 下游引物: 5'-cgg gat cct aac tgc agg gca cag a-3'(在5'端引入BamH I位点); 第二对引物用于扩增p35基因片段, 上游引物: 5'-cta gcc atg ggg ccc cct ggg tca g-3'(在5'端引入Nco I位点), 下游引物: 5'-ccg tct gag gtc gac tta gga agc att cag ata gc-3'(在5'端引入Sal I和Xho I位点)。以上述RT产物为模板, 用相应的特异性引物PCR扩增p35和p40基因片段。p35片段用Xho I和BamH I双酶切后插入pcDNA3.1(-)质粒相应的多克隆位点中, 构建pcDNA3.1 p35; p40片段用Nco I和Xho I双酶切后插入pmRNA IRES质粒相应的多克隆位点中, 构建pmRNA IRES-p40。然后将p35片段和IRES-p40片段分别从相应的载体中切下, 顺序插入腺病毒穿梭质粒pDC515的多克隆位点中, 构建pDC515 hIL-12 p35/IRES/p40。克隆的基因片段送北京博迈德生物技术有限公司进行测序, 证明p40和p35基因序列的正确性。

编码hIL-12的5型腺病毒载体的构建: 按AdMaxTM FLP重组腺病毒系统说明书进行。将穿梭质粒pDC515 hIL-12 p35/IRES/p40与pBGHft△E1, 3 FLP腺病毒骨架质粒通过磷酸钙沉淀法共转染至293细胞中, 10 d左右形成空斑, 挑出空斑, 在293细胞中进一步扩增, 取部分细胞提取病毒DNA进行PCR鉴定, 正确克隆经2轮或3轮扩增后, 收集293细胞冻溶裂解, 用2次CsCl梯度离心和PD-10柱除去CsCl得到纯化的Ad hIL-12。

hBMSCs的分离、纯化和培养: 取健康供者骨髓5 mL, 用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离出人骨髓中单个核细胞, 采用黏附贴壁法从中培养获得hBMSCs, 详细的培养方法参照文献[10]。

Ad hIL-12感染hBMSCs: 取培养至第3代hBMSCs, 接种于12孔板中, 每孔5×10⁵个细胞, 24 h后弃去原培养液, 加入新鲜的含体积分数为10%胎牛血清的α-MEM培养液, 2 mL/孔, 按100 pfu/细胞的感染复数加入Ad hIL-12腺病毒, CO₂细胞培养箱37 °C孵育2 h后经10 Gy射线照射使hBMSCs失去增殖能力, 12 h首次更换培养基, 以后每24 h更换培养液, 并收集12, 24, 48, 72, 96, 120 h更换后的培养液, 同时收集未感染Ad hIL-12的hBMSCs上清作为阴性对照, 将收集的培养液冻存在-20 °C直至ELISA检测。

ELISA检测hIL-12的表达: 将上述收集的各个

¹ 解放军北京军区总医院生物治疗中心, 北京市100700; ² 山西医科大学, 山西省太原市 030001

陈媛媛★, 女, 1984年生, 山西省太原市人, 汉族, 山西医科大学在读硕士。
yuan yuan840725@126.com

通讯作者: 谭晓华, 博士后, 主任医师, 硕士生导师, 解放军北京军区总医院血液科, 北京市 100700
xiaohua_t@hotmail.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)23-04186-05

收稿日期: 2010-02-04
修回日期: 2010-04-06
(20100204031/M-Q)

时间点的培养液解冻, 所有样本稀释 10 倍后, 按 IL-12p70 ELISA 试剂盒的方法测定上清中 hIL-12 蛋白的水平。

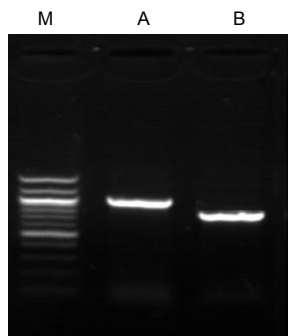
主要观察指标: IL-12p70 ELISA 试剂盒检测转染后的骨髓间充质干细胞的白细胞介素 12 表达。

设计、实施、评估者: 设计为通讯作者, 实施为第一、二、三作者。评估为通讯作者, 均经过正规系统培训。

2 结果

2.1 hIL-12 基因的克隆和 Ad hIL-12 的构建 体外培养的树突状细胞经细菌脂多糖刺激 24 h 后, 提取其总 RNA, 经 RT-PCR 扩增可分别获得两条大小约为 750 bp 和 1 000 bp 的片段, 分别插入质粒 pcDNA3.1 和 pmRNA IRES 中, 经 PCR 鉴定阳性的克隆送公司测序证实插入 pcDNA3.1 的片段为 hIL-12p35, 与 GenBank NM_000882(762 bp) 提供的序列完全一致; 同样, 插入 pmRNA IRES 的片段经测序证实为 hIL-12p40, 与 GenBank NM_002187(987 bp) 提供的序列完全一致, 构建质粒 pcDNA3.1 p35 和 pmRNA IRES-p40。然后分别将 p35 和 IRES-p40 片段用相应的内切酶切下顺序插入腺病毒穿梭质粒 pDC515 中, 构建 pDC515 hIL-12 p35/IRES/p40。

穿梭质粒 pDC515 hIL-12 p35/IRES/p40 与 pBGHrt Δ E1, 3 FLP 腺病毒骨架质粒通过磷酸钙沉淀法共转染至 293 细胞中, 约 10 d 即有空斑形成, 约 14 d 挑出明显的空斑转移至新的 293 细胞中, 如此反复 2 轮或 3 轮后, 获得 Ad hIL-12 毒种, 将含 Ad hIL-12 毒种的 293 细胞反复冻融裂解后, 提取 DNA (含 293 细胞的基因组和 Ad hIL-12 基因组), 用 p35、p40 克隆引物进行 PCR 鉴定, 分别获得 hIL-12p35 和 p40 DNA 片段 (图 1)。



M: DNA marker; A: production of human interleukin-12 (hIL-12) p40 by PCR; B: production of hIL-12 p35 by PCR

Figure 1 Production of IL-12 p35 and p40 amplified by PCR using adenovirus hIL-12 DNA as a template
图 1 以 Ad hIL-12 DNA 为模板, PCR 扩增 IL-12 p35 和 p40 片段结果

由图 1 可见, DNA 模板中含有 hIL-12p35 和 p40 基因片段。由于 293 细胞基因组 DNA 不可能通过 PCR 扩增获得 p35 和 p40 基因片段, 从而推测 p35 和 p40 片段来自 Ad hIL-12 毒种, 表明所构建的病毒就是 Ad hIL-12。通过反复扩增, CsCl 纯化后可获得病毒滴度 $10^{10} \sim 10^{11}$ pfu。

2.2 hBMSCs 的形态特征 经密度梯度离心及黏附贴壁所得的单个核细胞培养 48~72 h 后开始有少量细胞贴壁, 呈梭形, 散在分布, 以后贴壁细胞逐渐增多。换液移除未贴壁细胞, 7 d 左右见大部分贴壁细胞呈纤维束状排列, 细胞质饱满, 细胞生长迅速。也有少量圆形细胞散在。约 14 d 时细胞达 70%~80% 融合, 呈放射状, 旋涡状走行, 首次传代。以后每次待贴壁细胞生长至 70%~80% 融合时传代, 连续传 8 代, 细胞形态无明显变化, 见图 2。



Figure 2 Human bone marrow mesenchymal stem cells cultured till the third passage ($\times 100$)
图 2 培养至第 3 代人骨髓间充质干细胞 ($\times 100$)

2.3 Ad hIL-12 在 hBMSCs 表达 见图 3。

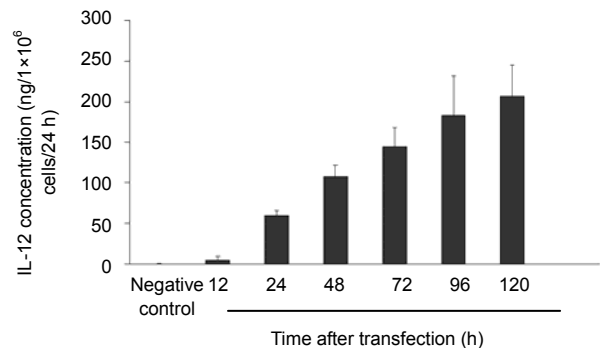


Figure 3 Expression of interleukin-12 (IL-12) at different time points in adenovirus human IL-12 (Ad hIL-12)-human bone marrow mesenchymal stem cells

图 3 Ad hIL-12 转染人骨髓间充质干细胞不同时间点 IL-12 表达量

由图3可见, 感染复数为100的Ad hIL-12感染hBMSCs后, 经 γ 射线照射使其失去增殖能力, 分别在12, 24, 48, 72, 96, 120 h收集细胞上清用ELISA检测hIL-12p70表达量, 结果24 h分别为 (4.91 ± 1.09) ng/ 10^6 细胞、 (59.40 ± 1.17) ng/ 10^6 细胞、 (106.88 ± 4.64) ng/ 10^6 细胞、 (144.53 ± 6.10) ng/ 10^6 细胞、 (182.72 ± 12.14) ng/ 10^6 细胞和 (205.83 ± 10.26) ng/ 10^6 细胞, 而在未感染Ad hIL-12的骨髓间充质干细胞上清中检测不到IL-12。表明Ad hIL-12感染hBMSCs后可持续表达IL-12。

3 讨论

IL-12是目前肿瘤免疫治疗中最为常用的细胞因子之一^[11], 具有多种生物学功能。通过介导细胞免疫、单独或诱导其他细胞因子生成发挥其生物学功能, 在炎症和抗肿瘤免疫中扮演重要角色。早期实验证明, IL-12可以促进CD4⁺辅助性T细胞向Th1细胞分化, 同时还可以促进Th1细胞增殖和分泌IL-2、IFN- γ 等细胞因子^[3], 在诱导机体Th1细胞介导的免疫应答中发挥重要作用, 成为调节肿瘤患者肿瘤免疫的重要环节之一。在天然免疫中IL-12通过NK细胞发挥作用, Marcenaro等^[12]将外周血来源的NK细胞与IL-12共培养12 h后, IL-12可诱导NK细胞分泌大量的IFN- γ 、GM-CSF和TNF- α , 发挥细胞毒性作用。同时IL-12具有抑制肿瘤新生血管生成的作用^[13], 这一特性在抑制肿瘤生长的过程中尤为重要。因此, IL-12作为一种强有力的抗肿瘤细胞因子, 在发现的早期便被用于肿瘤的基础研究与临床应用。但IL-12全身应用仍存在很多问题, 如毒副作用大、体内效应时间短等。Ohe等^[14]对IL-12治疗肿瘤患者的临床病例作了回顾性的报道: IL-12治疗临床上可观察到IL-10产生和NK细胞、LAK活性短暂增高, 少数患者能取得部分疗效, 但有许多毒副作用, 如发热、疲劳、流感样反应、关节痛、肌痛、白细胞减少、肝功能损害等。IL-12的抗肿瘤效应为剂量依赖性^[15], 但全身大剂量应用导致毒副作用明显的增加, 因此, 寻求一种肿瘤局部产生高浓度的IL-12的给药方式可能具有更大的临床应用价值。

有研究表明, 利用反转录病毒和腺病毒载体携带鼠白细胞介素12(mIL-12)基因能够在体外产生具有生物学活性的mIL-12, 并在动物实验中证明具有抗肿瘤作用^[16-17]。Alves等^[18]用单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV1-TK)或更昔洛韦(GCV)联合携带IL-12基因的反转录病毒治疗大鼠DHDK12结肠癌的多灶性肝转移模型, 不仅观察到肿瘤体积明显缩小, 而且大鼠存活率显著提高。Jia等^[19]利用Th1细胞缺陷的尤文氏肉瘤动物模型, 瘤内注射鼠IL-12腺病毒载体, 证实肿瘤组织IL-12表达48 h达到高峰且持续表达7 d, 并且肿瘤组织体积明

显缩小。但是这两种载体应用于人体均有一定的缺陷, 如反转录病毒不能感染非分裂细胞, 并有病毒DNA整合至宿主基因组的风险; 而腺病毒免疫原性很强, 容易诱发机体产生免疫反应, 直接应用容易被机体免疫系统排斥, 导致表达时间短, 不能达到治疗目的^[20]。骨髓间充质干细胞是骨髓中存在一种具有多向分化潜能的非造血多能干细胞, 具有取材方便、容易培养、易于外源基因的导入和表达调控以及免疫原性低等特性, 目前已被广泛地用于基因治疗和组织修复的种子细胞^[21-22]。文献报道, 5型腺病毒载体对hBMSCs有较高的感染效率^[23], 并不影响hBMSCs的表型和分化^[24]。因此, 以腺病毒为载体、以hBMSCs为细胞载体的基因治疗, 已广泛引入各种类型的疾病的基础研究与临床应用。Gao等^[25]将小鼠IL-12的重组腺病毒载体转染人骨髓间充质干细胞后, 瘤内注射至小鼠肾细胞癌(RCC)中, 证实MSC/mIL-12抑制肾细胞癌的生长, 显著延长小鼠的生存。Duan等^[26]证实, 皮下注射MSC/Ad mIL-12除在局部产生IL-12外, hBMSCs还可迁移至肺脏、肝脏、脾脏产生生物学作用。因此, hBMSCs可作为良好的基因转移载体应用于肿瘤的基因治疗。

本实验成功构建了编码人IL-12的腺病毒载体, 感染hBMSCs后能高浓度长时间地分泌人IL-12。该研究具有以下几个特点: ①利用内部核酸进入位点(IRES)序列将hIL-12的p35和p40两个基因片段连接起来, 使两个基因片段在同一个启动子的调控下得到有效的表达。IRES是最为常用的双基因表达载体的构成元件^[27-28], 使直接置于启动子下游的基因以5'-Cap依赖的方式进行蛋白的翻译起始, 而置于IRES下游的基因则以5'-Cap非依赖的方式, 即IRES驱动的方式进行蛋白的翻译起始^[29-30]。本实验构建的Ad hIL-12其p35直接置于CMV下游, 而p40则置于IRES下游, 这样在CMV启动子的调控下, 转录成为同一条mRNA, 其中p35以5'-Cap依赖的方式翻译成蛋白, 而p40则以IRES驱动的方式进行蛋白的翻译, 保证了IRES序列相连接的p40和p35基因的各自独立表达。②常规滴度的Ad hIL-12(100 MOIs)感染hBMSCs并用射线照射使hBMSCs失去增殖能力后, hBMSCs可产生和分泌大量的IL-12, 其浓度可达24 h 100 ng/ 1×10^6 细胞, 而且表达的持续时间长, 连续检测至第5天, IL-12的分泌仍然没有下降趋势。先将编码IL-12的腺病毒载体感染hBMSCs使其持续分泌IL-12, 并利用hBMSCs低免疫原性的特点, 可有效解决直接使用IL-12蛋白半衰期短、降解快, 需反复多次注射的缺点以及直接利用腺病毒载体体内注射容易引起强烈的免疫反应、病毒易被迅速清除的弊端。③本实验以人的白细胞介素12和人骨髓间充质干细胞作为研究对象, 更利于研究结果向临床应用的转化, 同时避免了腺病毒直接体内注射所带来的安全隐患以及异源性基因直接导入

人体所产生的伦理学问题。

4 参考文献

- [1] Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(5):361-368.
- [2] McMonagle EL, Taylor S, van Zullekom H, et al. Production of biologically active equine interleukin 12 through expression of p35, p40 and single chain IL-12 in mammalian and baculovirus expression systems. *Equine Vet J.* 2001;33(7):693-698.
- [3] Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 1993;177(4):1199-1204.
- [4] Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, et al. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood.* 1997;90(7):2541-2548.
- [5] Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy.* 2005;7(1):36-45.
- [6] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24(2):462-471.
- [7] Studeny M, Marini FC, Champlin RE, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 2002;62(13):3603-3608.
- [8] Stagg J, Lejeune L, Paquin A, et al. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther.* 2004;15(6):597-608.
- [9] Thurner B, Röder C, Dieckmann D, et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods.* 1999;223(1):1-15.
- [10] Chen P, Tan XH, Ma JY, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(19):3713-3718.
陈鹏, 谭晓华, 马晶莹, 等. 5和5F35型腺病毒载体对人骨髓间充质干细胞转染效率的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(19):3713-3718.
- [11] Lamont AG, Adorini L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol Today.* 1996;17(5):214-217.
- [12] Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F, et al. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol.* 2005;174(7):3992-3998.
- [13] Yuan MZ, Ni XX, Haixia Yaoxue. 2009;21(4):23-27.
袁明洲, 倪秀雄. 白介素-12抑制机制及其在黑色素瘤治疗中的应用[J]. 海峡药学, 2009, 21(4):23-27.
- [14] Ohe Y, Kasai T, Heike Y, et al. Clinical trial of IL-12 for cancer patients. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1998;25(2):177-184.
- [15] Fan FR, Wei J, Xie T, et al. Shanghai Jiaotong Daxue Xuebao : Yixueban. 2008;28(2):141-144.
樊芙蓉, 韦俊, 谢挺, 等. AdMaxTM重组腺病毒载体转染人脂肪间充质干细胞[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2008, 28(2):141-144.
- [16] Bramson J, Hitt M, Gallichan WS, et al. Construction of a double recombinant adenovirus vector expressing a heterodimeric cytokine: in vitro and in vivo production of biologically active interleukin-12. *Hum Gene Ther.* 1996;7(3):333-342.
- [17] Flotte TR, Carter BJ. Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 1995;2(6):357-362.
- [18] Alves A, Vibert E, Trajcevski S, et al. Adjuvant interleukin-12 gene therapy for the management of colorectal liver metastases. *Cancer Gene Ther.* 2004;11(12):782-789.
- [19] Jia SF, Duan X, Worth LL, et al. Intratumor murine interleukin-12 gene therapy suppressed the growth of local and distant Ewing's sarcoma. *Cancer Gene Ther.* 2006;13(10):948-957.
- [20] Hackett NR, Kaminsky SM, Sondhi D, et al. Antivector and antitransgene host responses in gene therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2000;2(4):376-382.
- [21] Chen HH, Decot V, Ouyang JP, et al. In vitro initial expansion of mesenchymal stem cells is influenced by the culture parameters used in the isolation process. *Biomed Mater Eng.* 2009;19(4-5):301-309.
- [22] Forte G, Minieri M, Cossa P, et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells.* 2006;24(1):23-33.
- [23] Bosch P, Fouletier-Dilling C, Olmsted-Davis EA, et al. Efficient adenoviral-mediated gene delivery into porcine mesenchymal stem cells. *Mol Reprod Dev.* 2006;73(11):1393-1403.
- [24] Shan ZX, Lin QX, Li XH, et al. Nanfang Yike Daxue Xuebao. 2008; 28(7): 1673-4254.
单志新, 林秋雄, 李晓红, 等. 腺病毒表达载体对骨髓间充质干细胞分化能力的影响[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(7): 1673-4254.
- [25] Gao P, Ding Q, Wu Z, et al. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2010;290(2):157-166.
- [26] Duan X, Guan H, Cao Y, et al. Murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interleukin-12 gene delivery into Ewing sarcoma tumors. *Cancer.* 2009;115(1):13-22.
- [27] Kazadi K, Loeuillet C, Deutsch S, et al. Genomic determinants of the efficiency of internal ribosomal entry sites of viral and cellular origin. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(21):6918-6925.
- [28] Lu J, Zhang JM, Lin MJ, et al. Zhongguo Shengwu Huaxue yu Fenzi Shengwuxue. 2007;23(7):513-518.
卢杰, 张珈敏, 林美娟, 等. RNA病毒翻译调控元件——内部核糖体进入位点(IRES)[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(7): 513-518.
- [29] Kieft JS. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem Sci.* 2008;33(6):274-283.
- [30] Mokrejs M, Masek T, Vopálenky V, et al. IRESite—a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Database issue):D131-136.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金(30972804)。

致谢: 感谢陈鹏、陈霞、郭智等老师提供异基因造血干细胞移植实验中所用的健康供者骨髓以及邱实、冯慧晶、胡永超等同学在实验过程中的帮助和支持。

利益冲突: 无任何利益冲突。

课题的意义: 实验构建了 hIL-12 腺病毒载体, 并利用 hBMSCs 携带其基因在体外成功表达 IL-12 蛋白, 并且 Ad hIL-12 腺病毒载体感染 hBMSCs 后可持续高水平分泌 hIL-12, 在以 hBMSCs 为载体细胞的基因治疗中有潜在的应用前景。

课题评估的“金标准”: 本实验观察结果为 Ad hIL-12 腺病毒载体感染 hBMSCs 后分泌 hIL-12 的含量, 暂无公认的“金标准”。

设计或课题的偏倚与不足: 实验未进行更长时间的关于 hBMSCs 表达 IL-12 蛋白的研究, 没能完成 hBMSCs-Ad IL-12 持续表达曲线, 未监测到 IL-12 降低的时间点。

提供临床借鉴的价值: 本实验利用 hBMSCs 携带 hIL-12 基因, 并在体外成功表达 IL-12 蛋白, 解决了 IL-12 在临床中存在的半衰期短、大剂量使用对机体毒副作用大的问题, 为肿瘤的免疫基因治疗提供了理论基础。