人间充质干细胞转染条件的优化

李云霞，边延林，朱建伟，张宝红*
（上海交通大学药学院，细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心，上海 200240）

摘要：间充质干细胞（MSCs）在人体内分布广泛，具有强大的自我更新能力、多能性以及免疫调节能力，并且具有迁移到受损组织和肿瘤部位的特性，表达抗体的 MSCs 在肿瘤治疗方面显示出良好的应用前景。然而，MSCs 难以转染，限制了实际应用。该文采用 4 种方法转染脐带血来源的人间充质干细胞，并优化了转染条件。结果表明，三质粒系统制备慢病毒转染 MSCs 的效率较高，当包装条件为 *m*（DNA）∶ *m*（Lipo）=1 ∶ 2、*m*（vector）∶ *m*（psPAX2）∶ *m*（VSVG）= 3 ∶ 2 ∶ 1 时，50%的 MSCs 可成功表达目的蛋白。利用优化后的条件，本研究成功构建了分别表达 Anti-CD24 和 BiTE-Fc 2 种不同结构抗体的 MSCs，为 MSCs 在肿瘤治疗领域的应用研究提供了试验基础。

关键词：间充质干细胞；抗体表达；慢病毒；转染
中图分类号：Q816　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)05-0742-11
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.05.014

Condition Optimization of Human Mesenchymal Stem Cells Transfection

LI Yunxia, BIAN Yanlin, ZHU Jianwei, ZHANG Baohong*
(*Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody (MOE), School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

ABSTRACT: Mesenchymal stem cells (MSCs) are distributed widely in the human body. MSCs have powerful self-renewal ability, pluripotency, and immunomodulation property. Due to the damaged tissue and tumor site tropism, MSCs that express antibodies have potential applications in tumor therapy. However, the low efficiency of MSC transfection restricts their application. This study optimized four transfection methods for human umbilical cord blood-derived MSCs. The results showed that with the optimal packaging conditions [*m*(DNA)∶*m*(Lipo)=1∶2, *m*(vector)∶*m*(psPAX2)∶*m*(VSVG)=3∶2∶1], lentivirus produced by three-plasmid system could infect MSCs more efficiently, 50% of MSCs could express target protein successfully. In addition, MSCs expressing two antibodies with different structures, Anti-CD24 and BiTE-Fc, were successfully constructed with the above methods, respectively, providing the research basis for applying MSCs in tumor therapy.

Key Words: mesenchymal stem cell; antibody expression; lentivirus; transfection

间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）于 1976 年首次被发现[1]，是人体内分布较广泛的细胞之一，可从骨髓、胎盘、脐带血、脂肪组织以及牙髓等不同组织[2—3]中分离得到。MSCs 具有强大的自我更新能力，并能保持多能性，可分化为脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞[1,4]。此外，MSCs 具有免疫调节作用[5]，能产生免疫调节分子，通过多种方式介导免疫反应，包括调节 B 细胞的增殖和功能[6]、诱导调节 T 细胞的扩增[7]等。骨髓 MSCs 可随着细胞外基质和外周血中的化学吸引剂梯度以及局部因素的变化向创伤、损伤和肿瘤部位趋化和募集[8]。因此，MSCs 是一种很有潜力的肿瘤治疗药物载体[9]。

目前已有多项针对干细胞表达细胞因子或抗

收稿日期：2022-09-29
作者简介：李云霞(1996—)，女，硕士，从事生物技术药物研究。
通信作者：张宝红(1975—)，女，副教授，博士生导师，从事生物技术药物研究与开发。
E-mail：bhzhang@sjtu.edu.cn

体的抗肿瘤和免疫调节作用的研究[10]。例如，利用 MSCs 的“肿瘤识别”特征，使其在肿瘤部位表达、分泌细胞因子或治疗性抗体，如 β 干扰素（interferon-β，IFN-β）、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体（tumor necrosis factor apoptosis inducing ligand，TRAIL）、白细胞介素 -12（IL-12）等，靶向杀伤肿瘤细胞[11]。

然而，与其他细胞相比，干细胞转染难度更高，且需保持其多能性和活率，因此，大部分干细胞转染方法的效率都较低[12]，限制了 MSCs 在肿瘤治疗中的应用。因此，对 MSCs 的转染条件进行优化具有重要意义。MSCs 的转染方法主要分为非病毒转染法和病毒转染法。非病毒转染法包括电转染、化学试剂转染等，普遍效率较低[12]；病毒转染法效率较高，但需要考虑安全性问题[13]。病毒介导的外源基因转导可使干细胞表达外源蛋白质，也可提高干细胞中天然表达的蛋白质（如具有修复作用的生长因子）的表达水平。常用的基于 RNA 的逆转录病毒，如 γ- 逆转录病毒和慢病毒，可将目的基因整合到基因组中，使细胞能够稳定、长期地表达特定基因[14]。然而，如果病毒整合到原癌基因中或破坏肿瘤抑制物的功能，就有诱发插入突变的风险，这在干细胞的应用中尤需注意。γ- 逆转录病毒可感染分裂期的细胞，并倾向于在转录起始点附近整合；慢病毒可以感染分裂和非分裂期的细胞，并优先整合到转录单位[14—15]。AIUTI 等[16] 比较了从 Wiskott-Aldrich 综合征患者体内分离的自体造血干细胞和祖细胞中 γ- 逆转录病毒和慢病毒的常见整合位点，发现 γ- 逆转录病毒在原癌基因附近有插入热点，而慢病毒没有，说明慢病毒在长期使用中是更安全的选择。本研究比较了多种转染方法，选用安全性较高的电转染、化学试剂转染、腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV）和慢病毒感染等方法进行探究和条件优化。考察了包装慢病毒的 pHIV、psPAX2、VSVG 三质粒系统转染人间充质干细胞（human mesenchymal stem cells，hMSCs）的效率。其中，psPAX2 为慢病毒衣壳蛋白和核衣壳蛋白表达质粒，VSVG 为表达包膜蛋白的质粒。最后，采用慢病毒转染法构建了 2 种表达不同结构类型抗体的 hMSCs，以期在干细胞培养期间持续、稳定地分泌目标抗体。

1 仪器与试药

1.1 仪器与试剂

Tanon 1600 系列 DNA 凝胶电泳仪和凝胶成像分析系统（上海天能科技有限公司）；Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；Series 8000 Direct-Heat 型二氧化碳培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；CKX53 型生物显微镜（日本 Olympus 株式会社）；CytoFLEX 型流式细胞仪（美国 Beckman Coulter 公司）；PowerPac™ 型蛋白凝胶电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）。

Neon™ Transfection System 试剂盒、Lipofectamine 2000（以下简称 Lipo）转染试剂（美国 Invitrogen 生命技术公司）；线性聚醚酰亚胺（PEI，相对分子质量 25 000，美国 Polysciences 公司）；聚凝胺（polybrene，美国 Santa Cruz Biotechnology 公司）；DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清（FBS）均购于美国 Gibco 公司；MSCs 培养基、干细胞温和消化酶均购于友康恒业生物科技（北京）有限公司；聚合酶链式反应（PCR）所用 DNA 聚合酶和限制性内切酶 QuickCut *Not* Ⅰ、QuickCut *Xba* Ⅰ均购于宝日医生物技术（北京）有限公司；DNA 凝胶回收试剂盒（美国 Axygen 公司）；同源重组试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；山羊源抗人 IgG（Fc 特异性）抗体（美国 Sigma 公司）；化学发光底物（ECL）显色液（苏州新赛美生物科技有限公司）。

1.2 质粒及细胞

电穿孔转染 hMSCs 使用的绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）质粒、pHIV-GFP 质粒、pHIV-puro1.0 慢病毒表达载体、psPAX2 质粒、VSVG 质粒、AAV 无辅助病毒系统（包括 AAV-RFP 表达质粒、pHelper 包装质粒和 RC8 辅助质粒）由本实验室保存；TransStbl3 Chemically Competent Cell 购于北京全式金生物技术股份有限公司；pHIV-BiTE-Fc 质粒由通用生物系统（安徽）有限公司合成。

脐带血来源的 hMSCs（代数不超过 10 代）由云南舜喜再生医学工程有限公司（云南省干细胞库）赠送，仅用于科研；人胚胎肾细胞（HEK293T 细胞、293F 细胞）由本实验

室保存。

2　方法与结果

2.1　电穿孔转染 hMSCs 效率的探究

使用苯酚提取和乙醇沉淀法纯化 GFP 质粒。使用 Neon™ Transfection System 电穿孔转染 hMSCs，将融合度为 70%的 hMSCs 用杜氏磷酸盐缓冲溶液（DPBS）洗涤后用 Buffer R 重悬，加入 GFP 质粒 20 μg，设置 1 个空白对照组和 2 个试验组。空白对照组的细胞不做额外处理，试验组的条件设置如表 1 所示，将电穿孔转染的细胞悬液加至有新鲜培养基的 6 孔板中，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

表 1　Neon™ Transfection System 电转染 hMSCs 的条件

Tab.1　Conditions of hMSCs Transfection by Electroporation with Neon™ Transfection System

电压/V	脉冲时间/ms	脉冲数
1 400	10	3
1 200	20	2

显微镜下可观察到电穿孔转染对细胞活率的影响较大，细胞死亡率高。培养 48 h 后，收集各组细胞，每组 2×10^5 个，用含 2% FBS 的磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤细胞 2 次后，用流式细胞仪检测干细胞表面 GFP 的表达情况。结果（图 1）显示，细胞转染效率为 5%左右，效率较低。

2.2　化学转染 hMSCs 的条件探究

化学转染试剂选用 Lipo 和 PEI。转染前 1 天以每 1 mL 含 1×10^5 个细胞的密度将 hMSCs 接种于 96 孔板中。转染当天细胞融合度约为 60%。每组设置 3 个复孔，每孔转染 GFP 质粒总质量为 187.5 ng，以表 2 所示的转染条件，按试剂盒标示的转染方法转染 hMSCs，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 72 h，以 450 ～ 490 nm 的激发光在显微镜下观察 GFP 表达情况（图 2A）；每组收集 2×10^5 个细胞，用流式细胞仪检测干细胞表面 GFP 的表达情况（图 2B、2C）。根据流式细胞术检测结果，化学试剂转染 hMSCs 的效率在 5%以下。

表 2　Lipo、PEI 转染 hMSCs 的条件

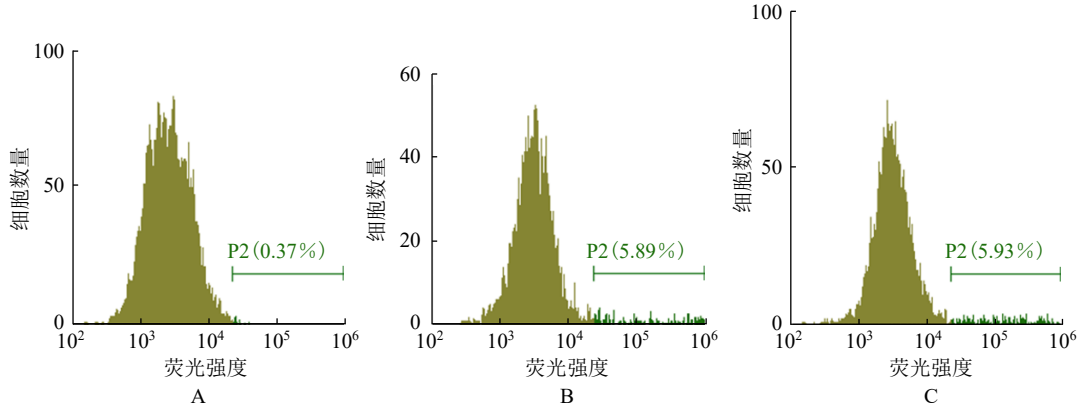
Tab.2　Conditions of the Transfection of hMSCs by Lipo and PEI

序号	DNS与化学转染试剂的质量比	化学转染试剂用量/ng
1	*m*(DNA)∶*m*(Lipo)=1∶2	375.0
2	*m*(DNA)∶*m*(Lipo)=1∶1	187.5
3	*m*(DNA)∶*m*(PEI)=1∶2	375.0
4	*m*(DNA)∶*m*(PEI)=1∶1	187.5

2.3　三质粒系统制备 AAV 转染 hMSCs 的条件探究

2.3.1　三质粒系统制备 AAV

选用 AAV-RFP、pHelper 和 RC8 三质粒系统制备 AAV，检测红色荧光蛋白（RFP）的表达情况。转染前 1 天，以每 1 mL 含 3.5×10^5 个细胞的



A—对照组；B、C—试验组。

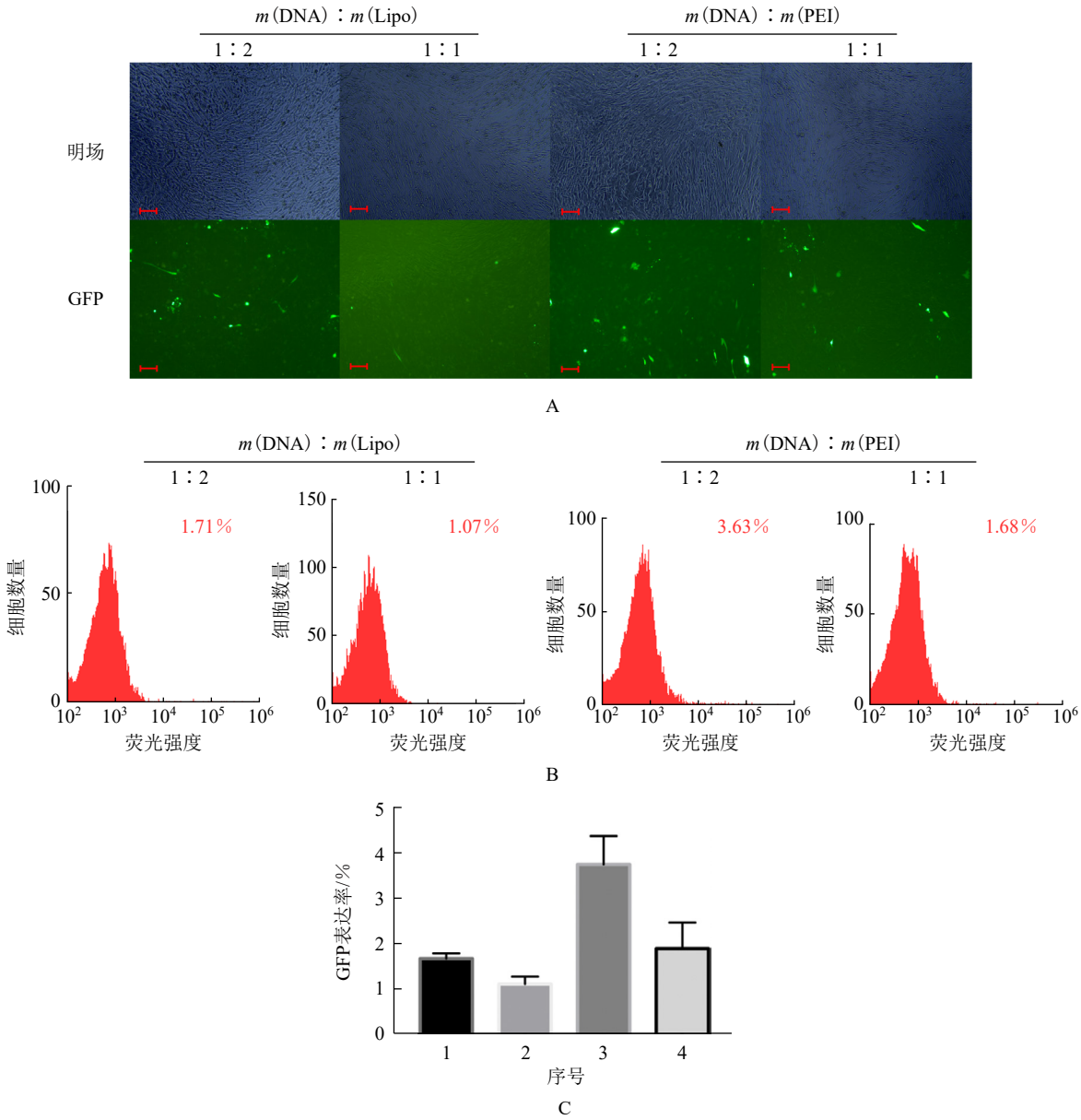
图 1　Neon™ Transfection System 电转染 hMSCs 的效率

Fig.1　Efficiency of hMSCs Transfection by Electroporation with Neon™ Transfection System

密度接种 HEK293T 细胞于 6 孔板中。转染当天，细胞融合度约为 60%，将细胞培养基更换成无血清 DMEM 培养基；转染 DNA 总量（即 AAV-RFP、pHelper 和 RC8 质粒的总质量）为 3 000 ng。按表 3 的条件用 Opti-MEM 培养基稀释各 DNA 溶液至终体积为 100 μL；另按表 3 的条件分别取 Lipo，用 Opti-MEM 培养基稀释至终体积为 100 μL。室温孵育 5 min 后，将 DNA 和 Lipo 混匀，室温下继续孵育 20 min，然后加至 HEK293T 细胞的培养液中，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。4 h 后更换为新鲜的 DMEM（含 10% FBS），继续培养 48 h，待用。

2.3.2 AAV 的浓缩

收集细胞和培养基，离心 (250×*g*) 5 min，收集上清液，细胞用 PBS 0.5 mL 重悬后在液氮和 37 ℃



A—GFP 表达情况的荧光显微图（标尺 =100 μm）；B、C—流式细胞术检测各组细胞中 GFP 的表达水平（*n*=3）。

图 2 化学转染试剂转染 hMSCs 的效率

Fig.2 hMSCs Transfection Efficiency by Chemical Reagents

表 3　三质粒系统制备 AAV 的条件

Tab.3　Conditions of AAV Produced by Three-plasmid System

序号	*m*(DNA)∶*m*(Lipo)	*m*(AAV-RFP)∶*m*(pHelper)∶*m*(RC8)
1	1∶2	3∶2∶1
2	1∶1	3∶2∶1
3	1∶2	4∶1∶1
4	1∶1	4∶1∶1
5	1∶2	3∶1∶2
6	1∶1	3∶1∶2
7	1∶2	1∶1∶1
8	1∶1	1∶1∶1

水浴中反复冻融 4 次后，离心 (10 000×*g*)10 min，去除细胞碎片，取上清液。合并 2 次收集的上清液，用 0.45 μm 滤膜过滤；加入滤液体积一半的 10% 聚乙二醇 8000 溶液（含 1 mol/L 氯化钠溶液），混合均匀，4 ℃放置过夜；离心 (10 000×*g*)2 h，取沉淀（即所需病毒）用 PBS 150 μL 溶解，过 0.22 μm 滤膜除菌，得浓缩的 AAV。

2.3.3　AAV 转染 hMSCs

转染前 1 天将 hMSCs 以每 1 mL 1×10^5 个的细胞密度接种于 96 孔板中。转染时加入 MSCs 培养基 50 μL 和“**2.3.1**”项下不同条件制备的 AAV 病毒 50 μL，加入聚凝胺（终质量浓度为 8 μg/mL），每组设置 3 个复孔。转染 12 h 后换新鲜的 MSCs 培养基，培养 72 h 后，以 532 nm 波长的激发光在荧光显微镜下观察 RFP 表达情况（图 3A），并收集各组细胞约 2×10^5 个，用流式细胞仪检测干细胞表面 RFP 的表达情况。结果（图 3B、3C）显示，尽管已经进行了病毒浓缩，三质粒系统制备的 AAV 转染 hMSCs 效率仍较低，几乎没有成功感染的干细胞。

2.4　三质粒系统制备慢病毒转染 hMSCs 的条件探究

2.4.1　三质粒系统制备慢病毒

使用 pHIV-GFP、psPAX2 和 VSVG 三质粒系统制备慢病毒，转染 hMSCs。转染前 1 天，以每 1 mL 3.5×10^5 个的细胞密度将 HEK293T 细胞接种于 6 孔板中，按表 4 中的条件，采用 2 种化学转染试剂照“**2.3.1**”项下方法转染细胞。

转染 48 h 后收取细胞上清液保存于 4 ℃，另添加新鲜培养基继续培养细胞 72 h，收取细胞上清液。合并 2 次收取的上清液，离心 (2 500×*g*)20 min，

表 4　三质粒系统制备慢病毒的条件

Tab.4　Conditions of Lentivirus Produced by Three-plasmid System

序号	转染试剂	*m*(DNA)∶*m*(转染试剂)	*m*(pHIV-GFP)∶*m*(psPAX2)∶*m*(VSVG)
1	Lipo	1∶2	3∶2∶1
2	Lipo	1∶1	3∶2∶1
3	PEI	1∶2	3∶2∶1
4	PEI	1∶1	3∶2∶1
5	Lipo	1∶2	4∶1∶1
6	Lipo	1∶1	4∶1∶1
7	PEI	1∶2	4∶1∶1
8	PEI	1∶1	4∶1∶1
9	Lipo	1∶2	3∶1∶2
10	Lipo	1∶1	3∶1∶2
11	PEI	1∶2	3∶1∶2
12	PEI	1∶1	3∶1∶2
13	Lipo	1∶2	1∶1∶1
14	Lipo	1∶1	1∶1∶1
15	PEI	1∶2	1∶1∶1
16	PEI	1∶1	1∶1∶1

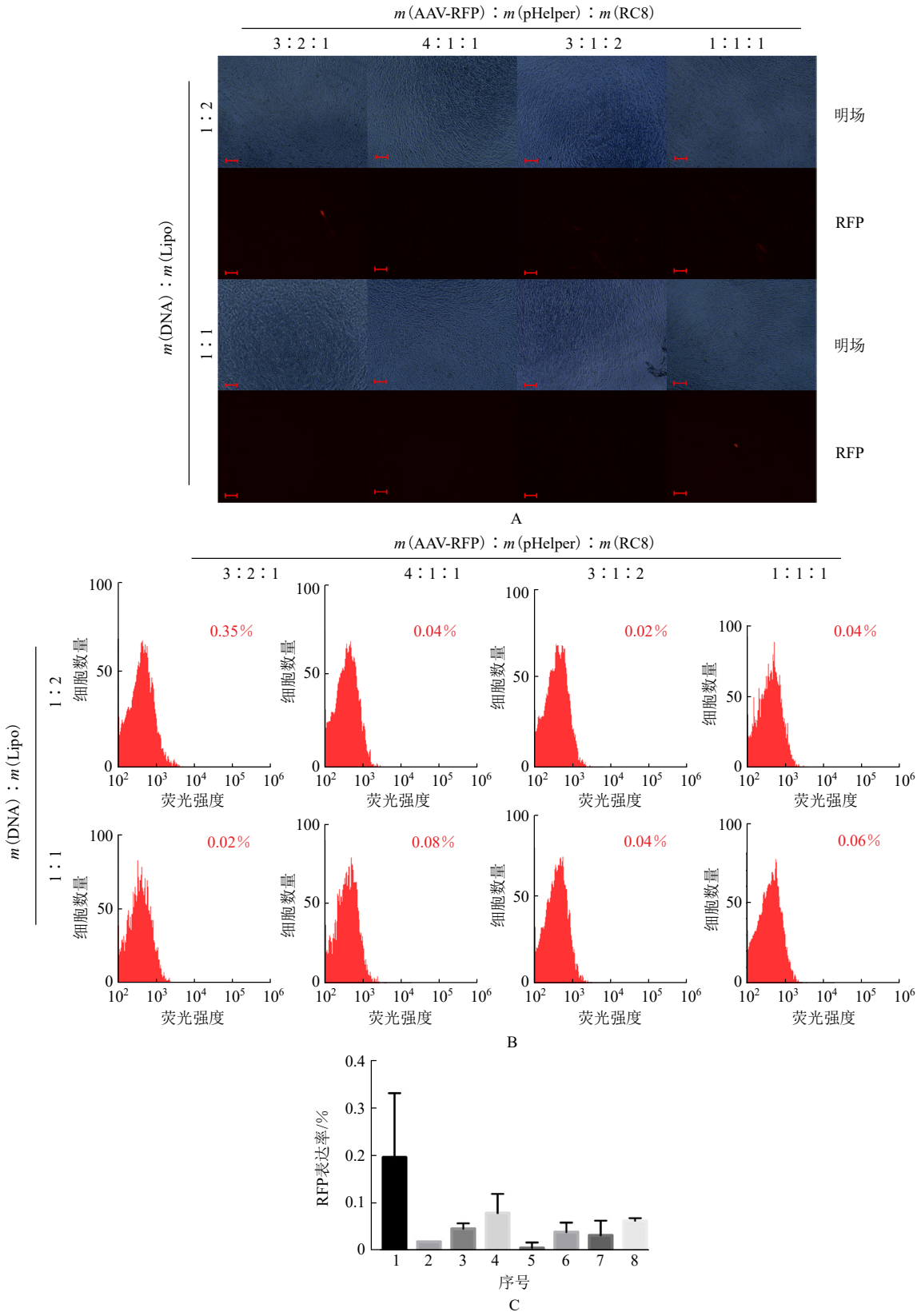
取上清液，经 0.22 μm 滤膜过滤，即得慢病毒。

2.4.2　慢病毒转染 hMSCs

转染前 1 天将 hMSCs 以每 1 mL 1×10^5 个的细胞密度接种于 96 孔板中。转染时加入 MSCs 培养基 50 μL 和“**2.4.1**”项下不同条件制备的慢病毒 50 μL，加入聚凝胺（终质量浓度为 8 μg/mL），每组设置 3 个复孔。转染 12 h 后换新鲜的 MSCs 培养基，培养 72 h 后，以 450 ～ 490 nm 的激发光在荧光显微镜观察 GFP 表达情况（图 4A、4B），并收集各组细胞约 2×10^5 个，用流式细胞仪检测干细胞表面 GFP 的表达情况。结果（图 5A、5B）显示，三质粒系统制备的慢病毒感染 hMSCs 效率较高。在三质粒质量比不变的条件下，Lipo 的效率高于 PEI，且转染试剂的质量为 DNA 总质量的 2 倍时效率较高。在受试范围内，当 pHIV-GFP、psPAX2 和 VSVG 质量比为 3 ∶ 2 ∶ 1 时，效率最高，50% 的 hMSCs 可成功表达目的蛋白。上述结果表明，三质粒系统制备慢病毒感染 hMSCs 整体效率较高，且慢病毒感染的优化条件为 DNA 和 Lipo 质量比为 1 ∶ 2，载体、psPAX2 和 VSVG 质量比为 3 ∶ 2 ∶ 1。

2.5　hMSCs 表达抗体的验证试验

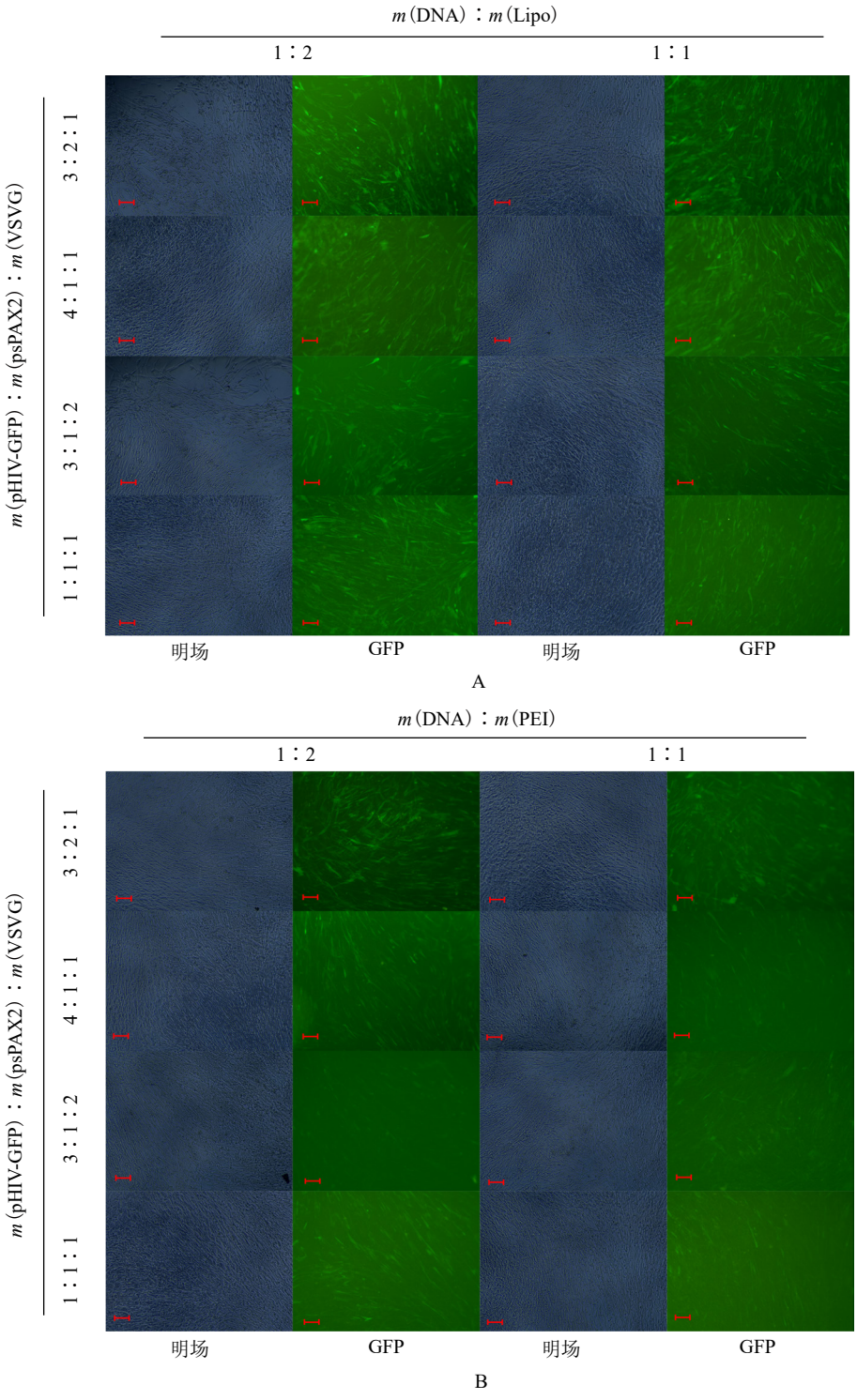
使用优化条件 *m*(DNA) ∶ *m*(Lipo)=1 ∶ 2，



A—RFP 表达情况的荧光显微照片（标尺 =100 μm）；B、C—流式细胞术检测各组细胞中 RFP 的表达水平（n=3）。

图 3　三质粒系统制备 AAV 转染 hMSCs

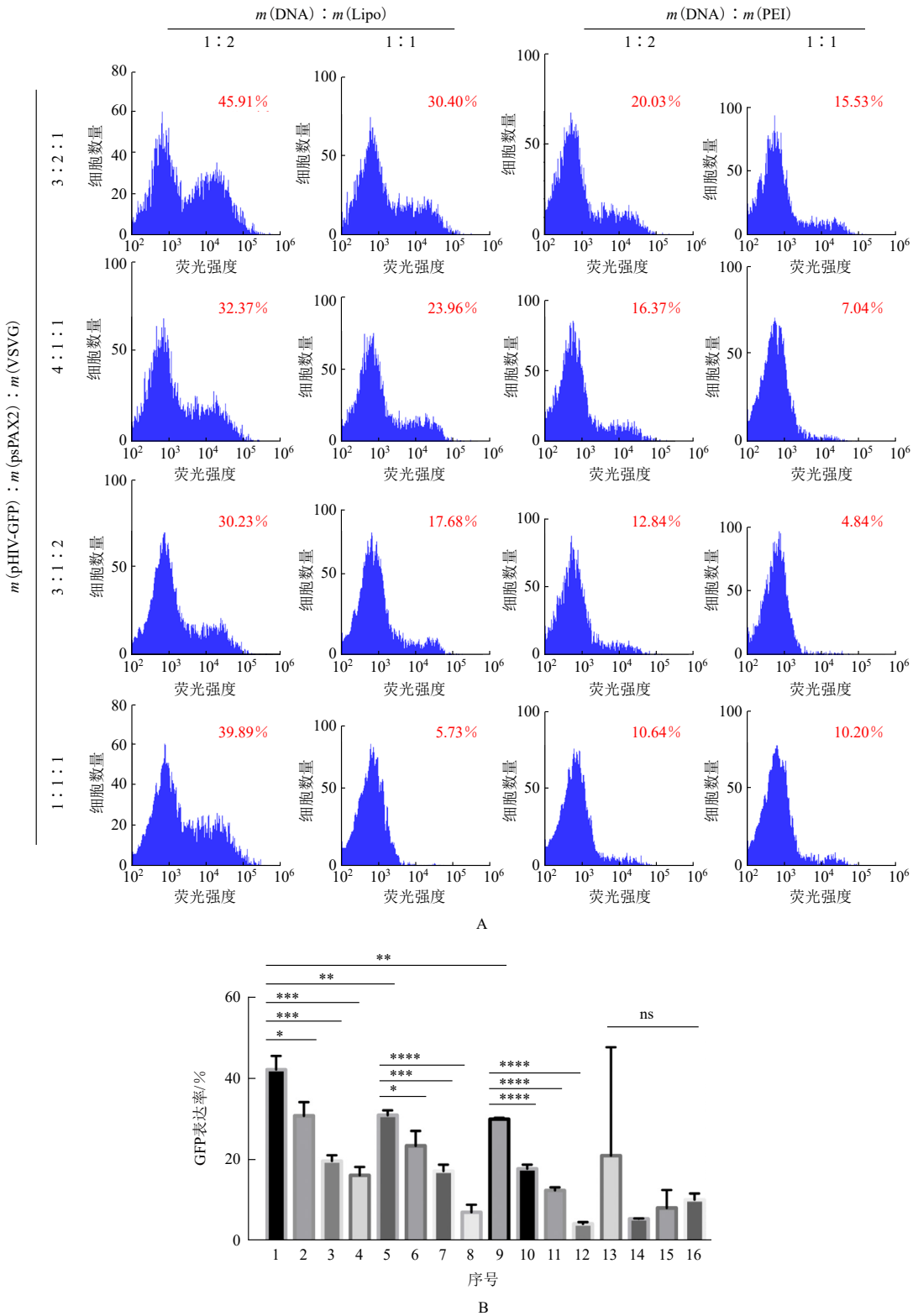
Fig.3　AAV Produced by Three-plasmid System Infecting hMSCs



A—转染试剂为 Lipo 的各组细胞中 GFP 的表达情况；B—转染试剂为 PEI 的各组细胞中 GFP 的表达情况。

图 4　荧光显微照片（标尺：100 μm）

Fig.4　Fluorescence Microscopic Images (Scale Bar: 100 μm)



A—流式细胞术检测各组细胞中 GFP 的表达水平；B—各转染条件下细胞中 GFP 的表达率

（两两比较，ns 表示 $P>0.05$，* 表示 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$，*** 表示 $P<0.001$，**** 表示 $P<0.000\,1$；$n=3$）。

图 5　用三质粒系统制备的慢病毒转染 hMSCs

Fig.5　Infection of hMSCs by Lentivirus Produced by Three-plasmid System

m(pHIV-GFP)∶*m*(psPAX2)∶*m*(VSVG)=3∶2∶1进行三质粒系统制备慢病毒转染hMSCs表达抗体的验证试验。选择2个结构不同的模式抗体，IgG1型单克隆抗体Anti-CD24和双特异性T细胞重定向抗体BiTE-Fc（由2个scFv和2个Fc区组成），检测干细胞的表达情况。

构建Anti-CD24的轻重链表达质粒：通过PCR构建Anti-CD24-轻链（light chain，LC）和Anti-CD24-重链（heavy chain，HC）的表达序列，采取双酶切法（酶切位点：*Xba* Ⅰ、*Not* Ⅰ），通过同源重组将Anti-CD24的轻重链表达序列分别构建到pHIV-puro1.0慢病毒表达载体上，分别获得质粒pHIV-Anti-CD24-LC和pHIV-Anti-CD24-HC，经大肠埃希菌（TransStbl3 Chemically Competent Cell）转化后挑选单克隆，经测序无误后进行后续表达试验。

pHIV-BiTE-Fc表达载体质粒由通用生物系统（安徽）有限公司合成。

按“**2.4.1**”项下方法包装慢病毒，采用的优化包装条件为*m*(DNA)∶*m*(Lipo)=1∶2、*m*(vector)∶*m*(psPAX2)∶*m*(VSVG)=3∶2∶1，同时包装pHIV-puro1.0空载体作为对照。按“**2.4.2**”项下方法转染hMSCs，并收集上清液。以293F细胞表达纯化的Anti-CD24 p.c.和BiTE-Fc p.c.作为阳性对照，采用蛋白质印迹法，上样量为1 μg，检测hMSCs的抗体表达情况。结果（图6A）显示，Anti-CD24和BiTE-Fc均成功表达。

继续培养构建成功的MSC-Anti-CD24和MSC-BiTE-Fc，转染当天记为d1，分别在d5、d10取细胞上清液，使用辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的抗人Fc二抗进行酶联免疫吸附测定（ELISA）检测，MSC-Anti-CD24上清液中Anti-CD24的质量浓度在d5、d10时分别为198.91、101.24 μg/mL；MSC-BiTE-Fc上清液中BiTE-Fc的质量浓度在d5、d10时分别为8.57、11.78 μg/mL（图6B）。上述结果证明慢病毒构建的hMSCs在10 d内可以稳定地表达抗体。

3　讨论

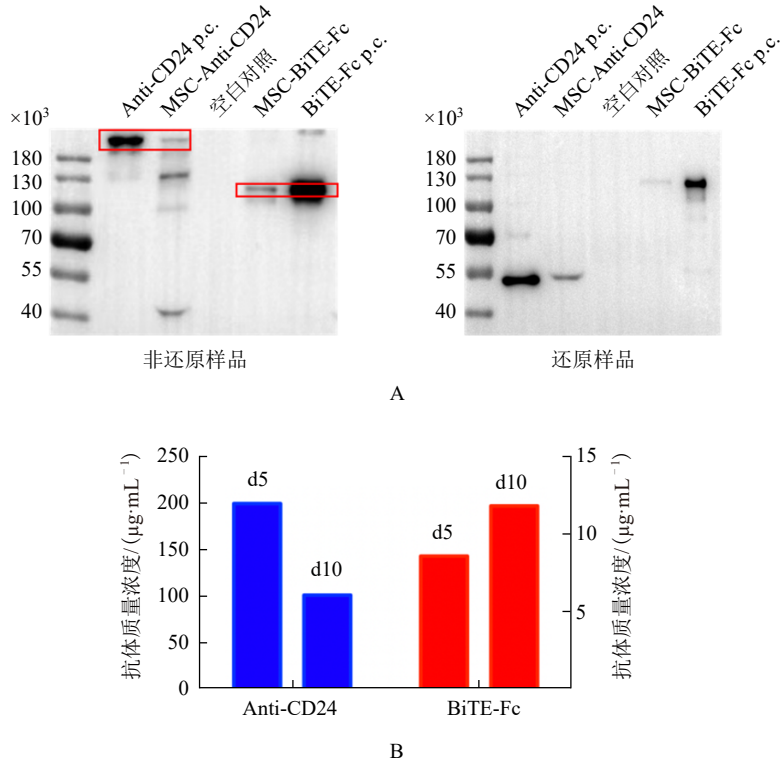
本研究采用4种方法转染脐带血来源的hMSCs，以荧光蛋白作为报告基因初步探究不同方法的转染效率，并对转染条件进行优化。

结果显示，电转染hMSCs效率较低，约为5%，且电穿孔对细胞损害较大，转染后可见细胞大量死亡，不适用于转染hMSCs。但FERREIRA等[17]研究显示，通过调节脉冲电场强度、电脉冲类型、电脉冲缓冲电导率和电穿孔温度，可将电转染大鼠MSC的效率优化至29%，使用优化的方法表达β-半乳糖苷酶，表达持续时间至少可以达到10 d。

采用化学转染试剂，包括Lipo及PEI，直接转染MSC虽然安全性高，但效率仍较低（<5%）。DE CARVALHO等[18]研究了转染试剂Lipofectamine 3000转染10代内hMSCs的效率。结果显示，使用较低代次的hMSCs，转染时细胞融合度为70%，Lipo与DNA的比值为3，可将eGFP的转染效率提高至26%，且hMSCs代数越高，转染效率越低。为保证研究结果可靠，本研究中使用的hMSCs代数均不超过10代。推测本研究中化学转染试剂直接转染的效率与文献数据存在差异的主要原因是PEI、Lipo和Lipofectamine 3000本身转染能力有差距。HO等[19]的研究显示，在组蛋白脱乙酰酶6抑制剂和融合脂质存在的情况下，使用PEI转染人脂肪组织衍生的骨髓MSCs（4～6代）具有较高的转染效率（>80%）。然而，该研究仅聚焦于MSCs的酶前药修饰的条件优化，没有进行MSC表达细胞因子或抗体的验证研究。其他的非病毒转染方法，如纳米载体技术和质粒设计等[20]也在不断发展，可提高MSCs的转染效率，为改造MSC提供新的技术支持。

AAV在基因递送方面安全性高，属于非整合型病毒，重组AAV基因组序列上去除了大部分的野生型AAV基因组元件，进一步保证了安全性。同时，AAV免疫原性低、表达稳定，但不同血清型的AAV转染效率不同。这可能是本研究所用AVV转染hMSC效率较低的原因。

慢病毒转染是一种安全、高效的hMSCs转染方法。第3代自灭活慢病毒将病毒序列分为多个质粒，避免了病毒重组以及产生具有复制能力的病毒颗粒的可能性，提升了慢病毒在临床应用中的安全



A—构建 Anti-CD24-LC 质粒、Anti-CD24-HC 质粒；B—ELISA 法检测抗体表达量。

图 6 慢病毒转染 hMSCs 表达抗体的验证结果

Fig.6 Verification Results of the Antibody Expression by Lentivirus Infected hMSCs

性[21]。自灭活慢病毒在其 3' 长末端重复区域中有缺失，进一步降低了产生复制型病毒的诱变风险[22]。本研究选取的 pHIV、psPAX2、VSVG 三质粒系统具有较高的包装效率，进一步提高了转染效率。结果显示三质粒系统制备的慢病毒转染 hMSC 的效率较高，当包装条件为 *m*(DNA) ∶ *m*(Lipo)=1 ∶ 2、*m*(vector) ∶ *m*(psPAX2) ∶ *m*(VSVG)=3 ∶ 2 ∶ 1 时转染效率可达 50%，且可稳定表达 10 d。然而，此方法对 hMSCs 的后续传代扩增是否产生影响还需长期观察，以确认安全性。同时，还可优化其他步骤，如慢病毒包装转染试剂、慢病毒浓缩方法等，以达到更高的转染效率。

参考文献：

[1] WAN C, HE Q L, MCCAIGUE M, *et al*. Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells(MSCs)[J]. *J Orthop Res*, 2006, **24**(1): 21-28.

[2] HANSON S, THIBEAULT S L, HEMATTI P. Clinical applications of mesenchymal stem cells in laryngotracheal reconstruction[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2010, **5**(3): 268-272.

[3] LIU J J, FANG Y, YAO S, *et al*. Concise reviews: characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells: an overview of human dental tissue-derived MSCs[J]. *Stem Cells*, 2015, **33**(3): 627-638.

[4] ANKRUM J A, ONG J F, KARP J M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(3): 252-260.

[5] KRAMPERA M, COSMI L, ANGELI R, *et al*. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2006, **24**(2): 386-398.

[6] CORCIONE A, BENVENUTO F, FERRETTI E, *et al*. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions[J]. *Blood*, 2006, **107**(1): 367-372.

[7] SELMANI Z, NAJI A, ZIDI I, *et al*. Human leukocyte

antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce $CD4^{+}CD25^{high}FOXP3^{+}$ regulatory T cells［J］. *Stem Cells*, 2008, **26**(1): 212-222.

［8］ SON B R, MARQUEZ-CURTIS L A, KUCIA M, *et al*. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells *in vitro* is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases［J］. *Stem Cells*, 2006, **24**(5): 1254-1264.

［9］ NAJI A, EITOKU M, FAVIER B, *et al*. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications［J］. *Cell Mol Life Sci*, 2019, **76**(17): 3323-3348.

［10］ DE BECKER A, RIET I V. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: how to improve the efficacy of cell therapy?［J］. *World J Stem Cells*, 2016, **8**(3): 73-87.

［11］ YANG Y Y, ZHANG X L, LIN F Z, *et al*. Bispecific CD3-HAC carried by E1A-engineered mesenchymal stromal cells against metastatic breast cancer by blocking PD-L1 and activating T cells［J］. *J Hematol Oncol*, 2019, **12**(1): 46.

［12］ BAEK K, TU C Y, ZOLDAN J, *et al*. Gene transfection for stem cell therapy［J］. *Curr Stem Cell Reports*, 2016, **2**(1): 52-61.

［13］ ZHANG X J, GODBEY W T. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering［J］. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, **58**(4): 515-534.

［14］ MILONE M C, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors［J］. *Leukemia*, 2018, **32**(7): 1529-1541.

［15］ LEWINSKI M K, YAMASHITA M, EMERMAN M, *et al*. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection［J］. *PLoS Pathog*, 2006, **2**(6): 611-622.

［16］ AIUTI A, BIASCO L, SCARAMUZZA S, *et al*. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome［J］. *Science*, 2013, **341**(6148): 1233151.

［17］ FERREIRA E, POTIER E, LOGEART-AVRAMOGLOU D, *et al*. Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection［J］. *Gene Ther*, 2008, **15**(7): 537-544.

［18］ DE CARVALHO T G, PELLENZ F M, LAUREANO A, *et al*. A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells［J］. *Biotechnol Lett*, 2018, **40**(3): 617-622.

［19］ HO Y K, WOO J Y, TU G X E, *et al*. A highly efficient non-viral process for programming mesenchymal stem cells for gene directed enzyme prodrug cancer therapy［J］. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 14257-14271.

［20］ HAMANN A, NGUYEN A, PANNIER A K. Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: a review of nonviral methods and applications［J］. *J Biol Eng*, 2019, **13**(1): 7-22.

［21］ DULL T, ZUFFEREY R, KELLY M, *et al*. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system［J］. *J Virol*, 1998, **72**(11): 8463-8471.

［22］ ZUFFEREY R, DULL T, MANDEL R J, *et al*. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery［J］. *J Virol*, 1998, **72**(12): 9873-9880.