

# tumstatin 基因修饰的 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞 生成抗血管生成活性的血小板

李娟<sup>1</sup>, 罗以勤<sup>1</sup>, 丁邦胜<sup>1</sup>, 贺学姣<sup>1</sup>, 周明<sup>2</sup>, 赵亮<sup>1</sup>, 姚丽娟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 以慢病毒为基因载体,将 tumstatin cDNA 导入 CD34<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 造血干细胞。用慢病毒感染 CD34<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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基金项目(编号:KJ2011A163)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院<sup>1</sup> 检验科、<sup>2</sup> 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

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<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>显示,尽管血管生成抑制因子和促进因子均存在于血小板 $\alpha$ 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<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>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 $\alpha 3$ 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<sup>+</sup> 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-

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-17 and IL-6, as well as promote the the damaged lung tissue to repair.

**Key words** chronic obstructive pulmonary disease; bone marrow derived mesenchymal stem cell; IL-17; IL-6

ZsGreen 载体质粒及包装试剂盒购自深圳百恩生物科技有限公司;脐血由安徽医科大学附属省立医院产科提供;人重组 TPO、IL-3、IL-6、SCF 购自英国 Pepro Tech 公司;无血清培养液 Stem SpanTMSFEM 购自加拿大 Stem Cell Technologies 公司;CD34<sup>+</sup>、CD61<sup>+</sup> 细胞分选试剂盒购自德国 Miltenyi Biotec GmbH 公司;抗人 CD34 和 CD41a 单抗均购自美国 eBioscience 公司;兔抗人 tumstatin 抗体购自英国 Abcam 公司;人静脉内皮细胞购自上海吉凯公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 pLVX-tumstatin-mCMV-ZsGreen 载体的构建及慢病毒包** 以 pMAL-tumstatin 质粒为模板,用 PCR 法扩增 tumstatin,在引物中分别引入 Spe I 和 BamH I 酶切位点,上游引物序列:5'-CTAGAC-TAGTGCCACCATGCCAGTTTGAAAGGAAACGTGG-AG-3',下游引物序列:5'-CGCGGATCCTCAGTGTCTTTTCTTCATGCACACCTG-3',划线部分为酶切位点。慢病毒载体 pLVX-mCMV-ZsGreen 及 PCR 扩增产物 tumstatin 经 BamH I 和 Spe I 双酶切,纯化后的产物在 T4DNA 连接酶作用下进行连接。然后将重组质粒转化感受态细菌进行扩增并抽提质粒,同时做酶切鉴定并测序。重组表达质粒 pLVX-tumstatin-mCMV-ZsGreen 和空慢病毒载体与包装质粒共转染 293T 细胞进行重组慢病毒颗粒包装,按试剂盒说明书进行,收集上清液过滤后 -80 °C 保存。HEK 293 细胞进行滴度测定,用荧光显微镜计数荧光细胞数量,在最高稀梯度 10<sup>m</sup> 的孔数出现 N (N < 10) 个带荧光的细胞,则病毒滴度为 N × 10<sup>m</sup> TU/μl。

**1.2.2 CD34<sup>+</sup> 细胞的筛选及慢病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 初筛** 经产道分娩胎儿后,收集脐血于 CPDA 无菌采血袋内,4 °C 保存。采用密度梯度离心法将脐血按 4 : 1 比例加入羟乙基淀粉沉淀红细胞,收集上层血浆,缓慢加至 Ficoll-Hypaque 分离液上,离心收集白膜层, PBS 洗涤 2 次得到人脐带血的单个核细胞,按照 CD34<sup>+</sup> 细胞免疫磁珠分选试剂盒说明书进行分选后,将 CD34<sup>+</sup> 细胞接种于含 50 μg/L 细胞因子 TPO、IL-3、IL-6、SCF 的完全培养基中预培养,并留取 30 μl 细胞液流式测定 CD34<sup>+</sup> 细胞纯度。将预培养 72 h 后的 5 × 10<sup>4</sup> 个细胞转入 12 孔板,将制备保存的慢病毒按感染复数 (MOI) 0 : 1 : 1、10 : 1、30 : 1、50 : 1 感染细胞,在 8 μg/ml 的 Polybrene 存在下,于 30 °C、800 r/min 离心 1 h 后,种回至 12 孔板中,每孔加细胞因子组合培养

液 1 ml 继续培养过夜。12 h 后换液,此后每 2 ~ 3 d 换液 1 次并用倒置荧光显微镜下观察细胞感染情况,观察荧光表达情况,培养 1 ~ 2 周后计算转染效率。以表达 ZsGreen 绿色荧光的细胞为转染阳性细胞,统计同一视野下转染阳性细胞数和总细胞数。根据以下公式计算转染效率:转染效率 = ZsGreen 阳性细胞数 / 总细胞数 × 100%。转染效率 90% 以上的最低 MOI 值为最适 MOI。

**1.2.3 诱导 MKs 和血小板的生成及流式细胞术分析和细胞形态学分析** 将细胞分为 3 组:无病毒感染组、不含目的基因空病毒感染组和含目的基因病毒感染组,将病毒液按照 MOI 初筛实验的最佳 MOI 值感染 CD34<sup>+</sup> 细胞。观察细胞感染情况后,在上述细胞因子组合培养液中继续培养、诱导分化,适当传代换液。在第 3、7、14 天时,取相应细胞, PBS 离心洗涤后分别加入抗 CD34、抗 CD41a 的单抗及同型对照抗体,避光孵育 45 min, PBS 离心并重悬到 1% 多聚甲醛溶液中,进行流式分析鉴定 MKs。同时,收集培养细胞上清,先低速离心去除细胞和碎片,再高速离心得血小板沉淀后,分别加入同型对照抗体和抗 CD41a 的抗体,避光孵育 45 min, PBS 离心后重悬到 1% 多聚甲醛溶液中,进行流式分析血小板。另取细胞进行瑞氏染色进行形态学分析。

**1.2.4 MKs 和血小板 tumstatin 的检测** 用 CD61<sup>+</sup> 磁珠分离收集上述 3 组细胞来源的 MKs,用 TRIzol 裂解细胞提取总 RNA,经逆转录后用特异性 tumstatin 引物(同上)进行 PCR 检测,25 μl 总反应体系,按 95 °C 2 min 95 °C 30 s 变性 58 °C 30 s 退火 72 °C 1 min 延伸,共 30 个循环,最后 72 °C 反应 1 min 后 4 °C 停止。将各组 PCR 产物行凝胶电泳分析产物。同时收集 3 组细胞来源的血小板提取总蛋白,用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳,然后按正极滤纸-PVDF 膜-PAGE 凝胶-滤纸负极的顺序进行转膜,结束后加入 5% 的脱脂奶粉封闭。最后将膜置于 tumstatin 一抗中 4 °C 过夜,再置于辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗液中,摇床上孵育 1 h。参考 Thermo ECL 产品说明书,在化学发光成像系统显色拍照分析。

**1.2.5 转基因血小板内皮细胞管状结构形成抑制实验** 分别收集 2 组细胞来源的血小板 1 × 10<sup>8</sup> /ml,以新分离的正常人血小板为对照,利用液氮反复冻融 3 次裂解血小板,释放蛋白。50 μl 稀释的 ECMa-

trix™ (CHEMICON) 加入 96 孔培养板 37 °C 孵育 1 h 待 ECMatrix™ 凝固, 将 150 μl 不含抗生素的 HU-VECs (脐静脉内皮细胞) 接种到上述包被 ECMatrix™ 的培养板中, 每孔含细胞数量为  $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  个, 然后加入血小板裂解液。试验重复 3 次。细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养, 在 1、2、4、8、12 h 时间点观察不同处理组之间内皮细胞管状排列情况、单位面积内管状结构数量和完整程度的差异。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。

**2 结果**

**2.1 重组质粒酶切鉴定及慢病毒包装** 本研究用慢病毒质粒含双启动子, 分别促进目的蛋白 tumstatin 和标记蛋白 ZsGreen 表达 (图 1A)。将构建抽提好的重组质粒用 Spe I + BamH I 进行双酶切, 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳发现 738 bp 的目的条带和载体质粒条带, 说明慢病毒载体上连入了 tumstatin 基因 (图 1B)。将重组质粒 pLVX-tumstatin-mCMV-ZsGreen 与包装质粒共转染 293 T 细胞, 进行慢病毒的包装。转染 293 T 细胞 48 h 后, 荧光显微镜观察细胞被感染情况 (图 1C)。包装后得到的慢病毒 tumstatin 液进行 10 倍梯度稀释后感染 HEK 293 细胞, 在 10<sup>7</sup> 稀释梯度孔发现超过 10 个含荧光细胞, 而 10<sup>8</sup> 稀释梯度孔发现 1 个含荧光细胞, 因此慢病毒 tumstatin 滴度为  $1.0 \times 10^8$  TU/ml。

**2.2 CD34<sup>+</sup> 细胞纯度鉴定及感染 MOI 值初筛** 每袋脐血体积为 100 ~ 120 ml, 含单个核细胞  $(0.5 \sim 1) \times 10^8$  个。台盼蓝染色显示细胞活力良好, 死细胞较少。CD34<sup>+</sup> 免疫磁珠分选得  $(0.5 \sim 1.5) \times 10^6$  个 CD34<sup>+</sup> 干细胞, 流式细胞术测得 CD34<sup>+</sup> 干细胞的纯度达到约 98.5%。通过 MOI 初筛实验发现 MOI 30 : 1 转染 CD34<sup>+</sup> 干细胞感染率较高且荧光持续较长, 而 50 : 1 的 MOI 值转染的细胞虽然荧光出现较早但细胞死亡较多, MOI 10 : 1 比 1 : 1 的 CD34<sup>+</sup> 干细胞感染率高但是较 MOI 30 : 1 仍然较低。因此, 慢病毒感染 CD34<sup>+</sup> 干细胞时, 选择 MOI 30 : 1 为最佳值进行感染实验, 见图 2。以表达绿色荧光的细胞为转染阳性细胞, 荧光显微镜分析、计算细胞转染率为 90.3%。

**2.3 诱导分化的 MKs 及血小板检测** 流式细胞

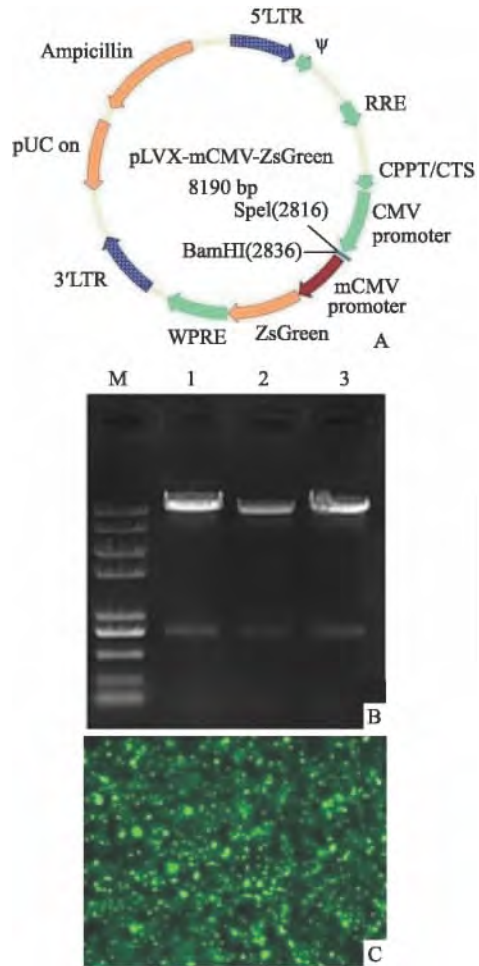


图 1 重组慢病毒鉴定图

A: 慢病毒载体; B: pLVX-tumstatin-mCMV-ZsGreen 酶切鉴定; M: Trans1k plus Marker; 1、2、3: 酶切得到的载体质粒条带和目的基因条带; C: 转染后 48 h 绿色荧光蛋白 ZsGreen 表达 × 10

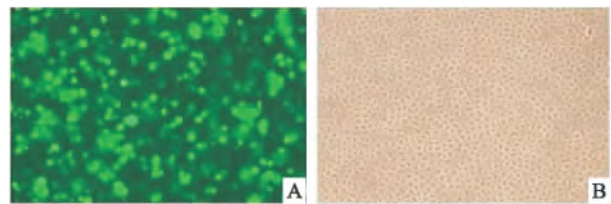
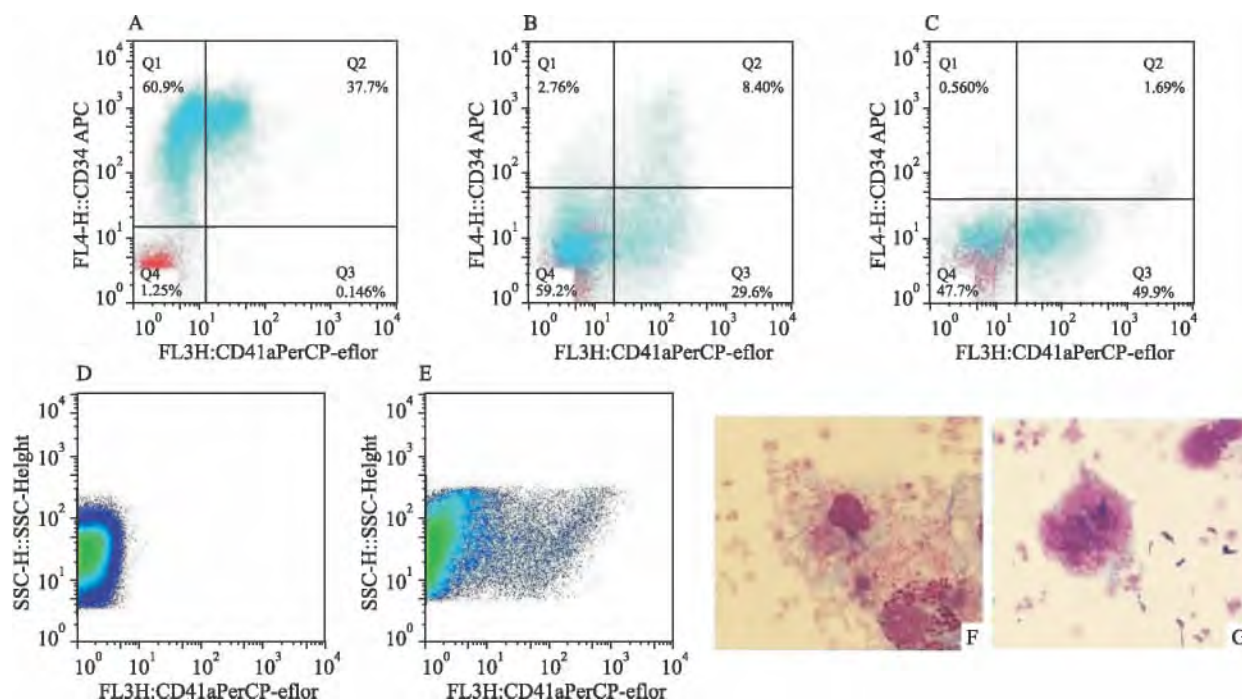


图 2 绿色荧光蛋白 ZsGreen 在转染细胞的表达

A: 换液后 72 h 荧光显微镜下观察转染结果 × 10; B: 换液后 72 h 白光 × 10

术鉴定结果: 由于 CD34 主要是干细胞的标志, CD41a 是 MKs 和血小板的特异性抗体, 因此可检测 CD34 和 CD41a 分子在第 3 (转染前)、7、14 天的表达来观察 MKs 的分化情况以及 MKs 产血小板情况。结果显示: 无病毒感染组、不含目的基因空病毒感染组及含目的基因病毒感染组细胞在相同的时间, 其细胞表面 CD34 和 CD41a 分子表达变化趋势基本相同, 说明空病毒感染及含目的基因的病毒感染基本

图3 CD34<sup>+</sup>诱导分化 MKs 及血小板

A: 转染前细胞 CD34 和 CD41a 表达率; B、C: 分别为转染后细胞第 7、14 天 CD34 和 CD41a 表达率; D: 培养血小板同型对照; E: CD41a 标记后的培养上清血小板; F、G: 典型的 MKs 和血小板 油镜  $\times 1\ 000$

不影响细胞培养过程中的分化。同时,对不同天数细胞 CD34 和 CD41a 分子表达比较,最初分选得 CD34<sup>+</sup> 细胞阳性率约为 98.5%,经 3 d 培养之后 CD34<sup>+</sup> 细胞阳性率变化不大,其中 37.7% 的细胞同时表达 CD41a 分子;随着时间的增加,表达 CD34 分子细胞越来越少,第 14 天时,CD34<sup>+</sup> 细胞不到 2%;而 CD41a 细胞却不断增加,但第 14 天之后,增加速度缓慢。在进行血小板流式分析时,对培养细胞上清中的沉淀加 CD41a 分子标记(图 3A、B、C),同时用全血中分离的血小板设门,结果显示:细胞培养第 7 天已有少量血小板分泌,在 14 d 和 21 d 时,血小板有明显增多(图 3D、E)。瑞氏染色进行形态学分析表明经过 14 d 的培养后转基因细胞呈现出典型的 MKs 形态,核多叶,并产生大量的血小板(图 3F、G)。研究结果表明转基因表达并不影响 CD34<sup>+</sup> 细胞诱导分化为巨 MKs 和血小板。

**2.4 MKs tumstatin 基因表达、血小板 tumstatin 蛋白表达检测** CD61<sup>+</sup> 磁珠分离培养 14 d MKs, RT-PCR 法检测结果表明含目的基因慢病毒感染组有 738 bp 的特异性扩增条带,而无病毒感染组和不合目的基因空病毒感染组无特异性扩增条带(图 4A)。说明 tumstatin 基因成功导入 CD34<sup>+</sup> 干细胞基因组中并随着细胞分化为 MKs, tumstatin 基因也存在于 MKs

中。Western blot 法检测结果表明 3 组细胞中来源于无病毒感染组和不合目的基因空病毒感染组血小板裂解物无 tumstatin 蛋白条带,含目的基因病毒感染组血小板有 tumstatin 蛋白条带(图 4B)。表明通过慢病毒介导, tumstatin 基因转入 CD34<sup>+</sup> 细胞,经诱导分化在 MKs 和血小板中得到表达。

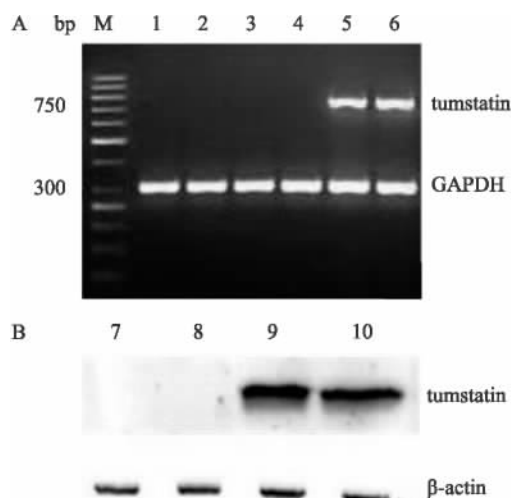


图4 MKs tumstatin 基因表达、血小板 tumstatin 蛋白表达

A: RT-PCR 法检测结果; M: Trans1k plus Marker; 1、2: 无病毒感染组; 3、4: 空病毒感染组; 5、6: 含目的基因病毒感染组; B: Western blot 法鉴定结果; 7: 无病毒感染组; 8: 不含目的基因空病毒感染组; 9、10: 含目的基因病毒感染组

**2.5 基因修饰血小板血管内皮细胞管状结构形成抑制实验** 基因修饰的血小板具有抗新生血管生成的作用,进行了内皮细胞管状结构形成抑制试验。当 HUVECs 在基质上培养时,它们迅速排列形成中空管状结构,与正常分离血小板和未转染血小板比较,tumstatin 基因修饰的显著抑制内皮细胞管状结构形成。研究结果显示未修饰的血小板血管分支数(NBP) = 82.12 ± 13.1; tumstatin 基因修饰血小板 NBP = 38.2 ± 7.8; 而正常人分离血小板 NBP = 146.7 ± 17.8, 3 组间比较差异有统计学意义( $F = 114.51, P < 0.05$ )。表明 tumstatin 基因修饰血小板与正常血小板和未转染血小板不同,能显著抑制内皮细胞管状结构的形成,进而推测在体内有可能抑制肿瘤新生血管形成。见图 5。

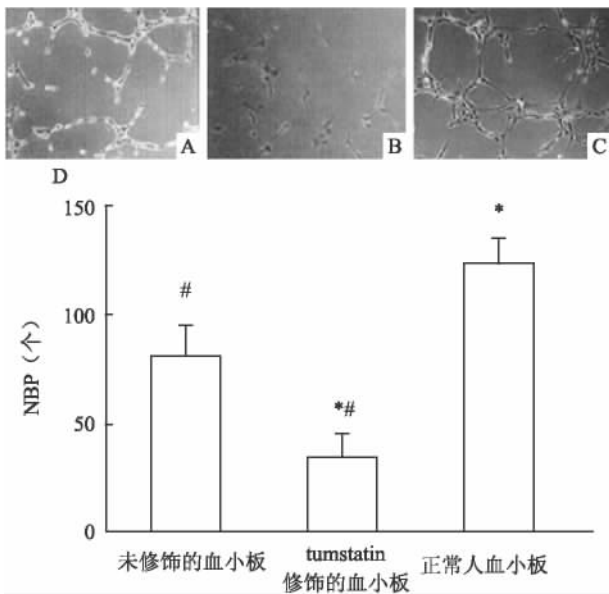


图 5 内皮细胞管状结构形成试验图

A: 未修饰的血小板内皮细胞管状结构形成 × 10; B: tumstatin 基因修饰血小板管状结构形成 × 10; C: 正常血小板内皮细胞管状结构形成 × 10; D: 各分枝数比较; 与未修饰的血小板比较: \*  $P < 0.05$ ; 与正常人血小板比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

血小板被认为在止、凝血过程中发挥主要作用,但近些年研究<sup>[5]</sup>显示血小板能够促进肿瘤生长和转移,血小板数量增多与肿瘤生长和转移具有正相关性,而降低血小板数量或者抑制其功能可以明显抑制肿瘤生长和转移<sup>[6]</sup>。生理状态下肿瘤微环境中血小板释放血管生成调节因子参与调节血管生成,但其血管生成促进因子的作用持续地占有主导

地位<sup>[1,7]</sup>。本研究通过慢病毒介导基因修饰血小板前体细胞,经过诱导、分化后在 MKs 和血小板中成功过表达血管生成抑制因子 tumstatin,与正常人血小板比较,这种血小板内容物在体外显著抑制人脐静脉血管内皮细胞的管状结构形成。

tumstatin 通过特异性抑制内皮细胞蛋白的合成来实现对肿瘤新生血管的抑制作用。tumstatin 与  $\alpha v \beta 3$  整合素相互作用,抑制局部粘着斑激酶(FAK)、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(PKB/Akt)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的活性,从而降低了真核起始因子 4E 的磷酸化,在翻译的过程中,真核起始因子 4E 无法与 4E 结合蛋白 1 分离,导致帽子依赖型蛋白的合成受到抑制。tumstatin 抗血管活性至少是血管抑素 endostatin 的 10 倍<sup>[8]</sup>。因此,考虑用 tumstatin 作为基因修饰血小板的抗血管生成因子。

该研究慢病毒启动子为 CMV 启动子,可启动基因在多种细胞表达,无选择性,转染的 CD34<sup>+</sup> 细胞可向不同细胞系分化。因此,tumstatin 除了在 MKs 和血小板中表达外,还会在红细胞系和粒细胞系表达。为了让基因只在 MKs 和血小板中表达,可选择 MKs/血小板特异性启动子如 Gp1ba<sup>[9]</sup>。另外,可通过优化培养液的细胞因子组合,引导基因转染细胞主要分化为 MKs 和血小板。MKs 定义为 CD41a<sup>+</sup>、CD61<sup>+</sup> 细胞,因此可用 CD61 磁珠分离获得向 MKs/血小板分化的较为单一的细胞。这种方法可除去其他细胞及碎片,有利于 MKs 和血小板的产生。

随着 CD34<sup>+</sup> 在体外增殖分化为 MKs 和血小板技术日趋成熟,为基因修饰血小板研究血小板相关蛋白功能和治疗遗传性血液病如血友病、巨血小板综合征提供了可能<sup>[8]</sup>。血小板可与肿瘤细胞形成聚集,黏附于血管内皮,肿瘤细胞可激活血小板释放血小板内容物<sup>[10]</sup>,因此,通过慢病毒介导在血小板中过表达血管生成抑制因子 tumstatin,产生“治疗性”血小板,在肿瘤治疗中可能具有一定潜力。如肿瘤化疗时可输注“治疗性”血小板,有可能解决化疗药物引起的血小板减少症、输注常规血小板引起的促进肿瘤新生血管生长的问题;并有可能使抗血管生成基因治疗联合化疗发挥更大的抗肿瘤效果,这些推测有待于进一步研究证实。

### 参考文献

[1] Italiano J E Jr, Richardson J L, Patel-Hett S, et al. Angiogenesis is

- regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet granules and differentially released [J]. *Blood*, 2008, 111(3):1227–33.
- [2] Etulain J, Fondevila C, Negrotto S, et al. Platelet-mediated angiogenesis is independent of VEGF and fully inhibited by aspirin [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 170(2):255–65.
- [3] Nierodzik M L, Karparkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(5):355–62.
- [4] Maeshima Y, Colorado P C, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(28):21340–8.
- [5] Cho M S, Bottsford-Miller J, Vasquez H G, et al. Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells [J]. *Blood*, 2012, 120(24):4869–72.
- [6] Troxler M, Dickinson K, Homer-Vanniasinkam S. Platelet function and antiplatelet therapy [J]. *Br J Surg*, 2007, 94(6):674–82.
- [7] Caine G J, Harris A L, Christodoulos K, et al. Analysis of combination anti-angiogenesis therapy on markers of coagulation, platelet activation and angiogenesis in patients with advanced cancer [J]. *Cancer Lett*, 2005, 219(2):163–7.
- [8] Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, et al. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin [J]. *Biol. Chem*, 2001, 276(18):15240–8.
- [9] Kuether E L, Schroeder J A, Fahs S A, et al. Lentivirus-mediated platelet gene therapy of murine hemophilia A with pre-existing anti-factor VIII immunity [J]. *Thromb Haemost*, 2012, 10(8):1570–80.
- [10] Sarkar S, Alam M A, Shaw J, et al. Drug delivery using platelet cancer cell interaction [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(11):2785–94.

## Tumstatin gene-modified CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells produce anti-angiogenic platelets

Li Juan, Luo Yiqin, Ding Bangsheng, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells transfected with recombinant lentivirus vector carrying tumstatin cDNA were *in vitro* induced to produce megakaryocytes (MKs) and platelets. The inhibitory effect of the platelets on the growth of capillary tube structures of HUVEC were detected. **Methods** Constructed pLVX-tumstatin-mCMV-ZsGreen recombinant vector was transfected into 293T cells for virus packaging. Cord blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells enriched by immunomagnetic separation were transfected with recombinant lentivirus and induced to produce megakaryocytes in the culture medium combinations of cytokines. Flow cytometry and morphological observation were used to detect the generation of megakaryocytes and platelets. RT-PCR and Western blot analysis were applied to examine the expression of tumstatin. Capillary tube structures assay of HUVEC was used to evaluate the inhibitory effect of the platelets *in vitro*. **Results** CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells transfected with recombinant lentivirus at the best multiplicity of infection (MOI) being 30 : 1, ZsGreen positive rate of which was highest. The transfected and untransfected cells generated megakaryocyte and platelets, the growth rate and differentiation trend of which were substantially identical by flow cytometry analysis. RT-PCR detected a 738 bp tumstatin cDNA in transfected MKs. Western blot confirmed the expression of tumstatin protein in gene-modified megakaryocyte and platelets. Tumstatin gene-modified platelets inhibited the capillary tube structures of HUVEC. **Conclusion** Gene-modified CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells not only successfully differentiate into megakaryocyte and platelets but also express tumstatin protein, and this transgenic platelets significantly inhibit the capillary tube structures of HUVEC *in vitro*.

**Key words** tumstatin; lentivirus vector; CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cell; HUVEC; megakaryocyte; platelet