

· 基础研究 ·

二十二碳六烯酸对人外周血树突状细胞成熟的影响*

綦晓龙¹, 陈川宁², 徐亮¹, 吴晓霞¹

(泸州医学院: 1. 附属医院普外科; 2. 生物化学及医学分子生物学教研室, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨二十二碳六烯酸(DHA)在体外对人外周血来源树突状细胞(DCs)成熟状态及免疫学功能的影响。方法 经淋巴细胞分离液(Ficoll)密度梯度离心法分离出单个核细胞, 用含 rhGM-CSF 和 rhIL-4 培养液诱导 5 d, 获得未成熟 DCs, 并分为 4 组: 未成熟组、成熟组、DHA 组和饱和脂肪酸(SA)组。经 DHA 孵育 24 h, 内毒素脂多糖(LPS)作用 48 h, 于第 8 天, Wright-Giemsa 染色观察各组 DCs 形态; 流式细胞仪检测表型, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 DCs 共刺激分子 CD80、CD86 及 HLA-DR mRNA 的表达; ELISA 检测各组细胞上清液中 IL-12 及 TNF- α 的含量。结果 DHA 组细胞上清液 IL-12 和 TNF- α 的含量比成熟组低($P < 0.01$), 而 SA 组与成熟组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。DHA 干预下平均荧光强度呈明显下调。成熟组 CD80、CD86 及 HLA-DR mRNA 相对表达量比未成熟组高($P < 0.01$); DHA 组比成熟组低($P < 0.01$); 而 SA 组与成熟组相比无差异($P > 0.05$)。结论 DHA 可下调 DCs 共刺激分子 CD80、CD86 及 HLA-DR 的表达, 降低 IL-12 及 TNF- α 的释放, 减弱 DCs 的抗原提呈能力, 且可抑制 DCs 体外成熟。

关键词: 树突状细胞; 细胞因子类; 二十二碳六烯酸类

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2012. 01. 021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)01-0054-04

Effect of Docosahexaenoic acid on maturation and immunologic function of human peripheral blood Dendritic cells*

Qi Xiaolong¹, Chen Chuanning², Xu Liang¹, Wu Xiaoxia¹

(1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital; 2. Laboratory of Medical Molecular Biology & Department of Biochemistry, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan, 646000 China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Docosahexaenoic acid(DHA) on maturation and immunologic function of human peripheral blood Dendritic cells(DCs) in vitro. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were separated by Ficoll, and were induced by rhGM-CSF and rhIL-4, and then obtain immature DCs for five days, divided into 4 groups: immature DCs group, mature DCs group, DHA treatment group and the SA treatment group. After incubated 24 h by DHA and then induced 48 h by lipopolysaccharide(LPS), observed DCs patterns in each group by stained with Wright-Giemsa, properties of DCs detected by FCM detection expression of DCs costimulatory molecules CD80, CD86 mRNA and surface antigen-presenting molecules human leukocyte antigen-DR(HLA-DR) mRNA by RT-PCR, and detected IL-12 and TNF- α levels of cell supernatant by ELISA. **Results** The relative expression of mRNA in CD80, CD86 and HLA-DR, it is higher in mature DCs group than immature DCs group, the difference was significant($P < 0.01$), it is lower in DHA treatment group than mature DCs group, the difference was significant($P < 0.01$). The differences in SA treatment group compared with the mature was not significant($P > 0.05$). Average fluorescent intensity was significantly lower in DHA intervention. Content on the supernatant of IL-12 and TNF- α , it was lower in DHA treatment group than mature DCs group, the difference was significant($P < 0.01$). The differences in SA treatment group compared with the mature was not significant($P > 0.05$). **Conclusion** DHA can reduce dendritic cell costimulatory molecules CD80, CD86 and surface antigen-presenting molecule HLA-DR expression in vitro, reduce cytokine Interleukin-12 and tumor necrosis factor- α release, decrease dendritic cells capability in antigen presentation, inhibit the maturation of dendritic cells in vitro.

Key words: dendritic cells; cytokines; docosahexaenoic acids

树突状细胞(dendritic cells, DCs)被认为是目前发现的机体内功能最强大的抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)。DCs 能有效地激活、诱导初始 T 细胞, 引发机体的免疫应答或免疫耐受, 在免疫耐受和免疫调节中的作用日益受到广泛关注。近年来, 随着移植免疫反应机制研究的逐步深入, 人们发现 DCs 的成熟状态是机体诱导移植排斥反应或诱导移植耐受的关键环节^[1], 通过 DCs 诱导耐受是延长移植存活的有效方法。研究发现, ω -3 PUFAs 可使大鼠 DCs 的 CD40、CD80、CD86 及 MHC II 等表型明显下调, 其抗原提呈功能也受到明显影响^[2]。在临床实践中发现, ω -3 PUFAs 对类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎等多种自身免疫性疾病具有一定的治疗作用, 可以缓解上述疾病的病程进展^[3-4], 提示其可能与自体免

疫反应的抑制有关。本研究在体外以二十二碳六烯酸(DHA)处理 DCs, 观察其对 DCs 细胞形态、免疫表型及细胞因子释放的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 RPMI-1640 购自 Gibco 公司; 人淋巴细胞分离液(Ficoll)购自天津灏洋生物制品科技有限公司; rhGM-CSF 及 rhIL-4 购自美国 Peprotech 公司; DHA、饱和脂肪酸(SA)及内毒素脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自 BioBRK 公司; ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司; Wright-Giemsa 染液购自南京建成生物科技有限公司; FITC 标记 CD80、

* 基金项目: 四川省卫生厅支撑计划基金资助项目(2007011); 泸州市科技局支撑基金资助项目(2008027)。

表 1 引物序列及扩增产物

mRNA	引物	引物序列(5'-3')	产物(bp)
CD80	上游	TTT TCC AGA GCC TCA CCT	353
	下游	CAC TTT CCC TTC TCA ATC	
CD86	上游	ATT CGG ACA GTT GGA C	373
	下游	TTG CTC GTA ACA TCA GG	
HLA-DRB1	上游	TTT CTA TCC AGG CAG CAT T	127
	下游	TGT TTC CAG CAT CAC CAG	
人 GAPDH	上游	ATG CTG GCG CTG AGT ACG TC	263
	下游	GGT CAT GAG TCC TTC CAC GAT A	

CD86 及 HLA-DR 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 DCs 的诱导及培养 取健康成人外周血 40 mL,用肝素抗凝,淋巴细胞分离液(Ficoll)密度梯度离心法分离出单个核细胞(PBMC),D-Hank's 液洗涤,用含 10%胎牛血清 RPMI-1640 培养液悬浮细胞,接种。放置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 2 h,吸弃细胞悬液,洗去非贴壁细胞,获得贴壁的单个核细胞。加入含 10%胎牛血清 RPMI-1640 完全培养基、rhGM-CSF、rhIL-4 使其终浓度为: rhGM-CSF 500 U/mL, rhIL-4 250 U/mL。隔日半量换液,诱导 5 d。

1.2.2 DCs 的处理和分组 将细胞分为 4 组,分别为未成熟组、成熟组、DHA 组及 SA 组(饱和脂肪酸对照组),并行细胞爬片。分别将 DHA 和 SA(均以 50%乙醇溶解)加入相应组的培养基中,使其终浓度为 50 μmol/L,未成熟组和成熟组则分别加入相应剂量的乙醇作为平衡。第 6 天(脂肪酸作用 24 h 后),除未成熟组外,各组分别加入 LPS 100 μg/L 诱导 DCs 成熟,第 8 天(LPS 作用 48 h 后)收集各组细胞进行相关指标的检测。

1.2.3 形态学检测 培养第 8 天时,在细胞爬片中加入 95%乙醇固定 15 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍,Wright-Giemsa 染色,显微镜下观察,摄片。

1.2.4 ELISA 测定 IL-12 p70 及 TNF-α 水平 收集各组细胞培养上清液,每组至少 3 复孔。取出酶标板,依照次序对应分别加入 50 μL 的标准品于空白微孔中;分别标记样品编号,加入 50 μL 样品于空白微孔中;在样品孔中加入 10 μL 生物素标记液;在标准品孔和样品孔中加入 50~100 μL 酶标记液;37 °C 孵育反应 60 min;在孔板摇床上用洗涤液清洗 5 次,每次静置 10~20 s;每孔加入底物(显色剂)A、B 液各 50 μL;37 °C 下避光孵育反应 15 min;每孔加入 50 μL 终止液终止反应。于酶标仪上以波长 450 nm 测定各孔的 OD 值。实验重复 3 次,取 3 次实验的平均值。

1.2.5 DCs 表面相关表型的检测 将不同时期的 DCs 用 PBS 调至 4 × 10⁵ 个/mL,加入离心管,每管 200 μL,加 FITC 标记的 CD80、CD86 和 HLA-DR 单抗,4 °C 标记 30 min 后,PBS 洗涤,用 600 μL LPBS 重悬细胞待测。

1.2.6 RT-PCR 检测 DCs 中 CD80、CD86、HLA-DR mRNA 的表达 RT-PCR 步骤:(1)提取总 RNA,冰上收集细胞加入 1 mL 冰 TRNzol 匀浆,依次经氯仿、异丙醇等抽提总 RNA。(2)RT 反应体系 20 μL,总 RNA X μL (<1 μg),RNase free H₂O (11-X)μL,5 × RT Buffer 4 μL,dNTP Mixture(10 mM)2 μL,Super-RI 0.5 μL,RT-Enhancer 0.5 μL,Oligo(dT) 18 (50 pmol/μL) 1 μL,ReverTra Ace 1 μL。反应条件:30 °C 10 min,42 °C 30 min,99 °C 5 min,4 °C 5 min。(3)PCR 反应体系 20 μL,RT 产物 2 μL,RNase free H₂O 6 μL,2 × Taq PCR Master-

mix 10 μL,上、下游引物(10 pmol/μL)各 1 μL。反应条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,30 个循环,72 °C 后延伸 5 min。反应结束后,取 10 μL PCR 产物与上样 Buffer 混匀,与 PCR-Marker 一起,在含 1 mg/mL 溴化乙锭的 3%琼脂糖凝胶中电泳,在紫外透射仪下观察结果。电泳结果采用凝胶图像分析系统观察并照相,黑马凝胶图像分析系统分析电泳图像,以目的基因扩增量/内对照(人 GAPDH)基因扩增量表示所要检测基因的表达量,见表 1。

1.3 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS15.0 软件对所得数据进行处理。组间差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 P < 0.01 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DCs 形态学观察 镜检显示,PBMC 呈圆形,胞体小,黏附贴壁生长。由 GM-CSF、IL-4 及 LPS 联合诱导的 DCs 细胞体积渐渐增大,细胞形态也不断发生变化,由圆形变成梭形、星形或不规则形,胞浆变得丰富,细胞膜伸出很多不规则突出,并聚集成簇。培养 8 d 的成熟组及 SA 组细胞呈现典型的 DCs 形态,胞体大,不规则,胞膜向外伸出毛刺状或树突状突起,呈半贴壁生长;DHA 组则与未成熟组细胞形态类似,见图 1。

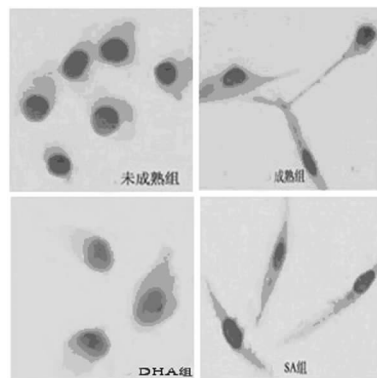


图 1 各组培养后 DCs 经 Wright-Giemsa 染色 光镜观察结果(×400)

2.2 流式细胞仪(FCM)检测 诱导第 8 天后,DCs 经流式细胞仪检测成熟组 CD80、CD86 及 HLA-DR 平均荧光强度明显上调;其余 3 组无显著差异。但是在其成熟过程中给予 DHA 干预后呈明显下调,结果见表 2。

2.3 DHA 对 DCs 分泌细胞因子水平的影响 以 PBS 为空白,以各标准 OD 值及对应浓度制作 IL-12 p70 及 TNF-α 标准曲线,IL-12 p70 回归计算公式为 Y = 0.001 2X + 0.22,直线相关系数(r²)为 0.979 2;TNF-α 回归计算公式为 Y = 0.000 9X + 0.095 2,直线相关系数(r²)为 0.992 4。ELISA 结果显示,成熟组与未成熟组相比,IL-12 p70 和 TNF-α 水平明显提高。

但是在其成熟过程中给予 DHA 干预,其产生的 IL-12 p70 和 TNF- α 的水平则明显下调,见表 3、图 2。

表 2 各组 CD80、CD86 及 HLA-DR 的平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s, \%$)

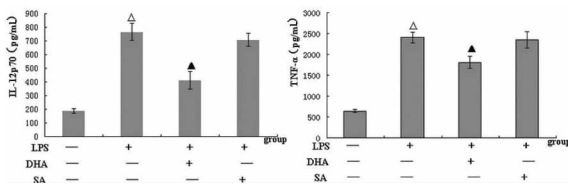
项目	未成熟组	成熟组	DHA 组	SA 组
CD80	52.7 \pm 4.3	97.8 \pm 3.7 Δ	56.8 \pm 4.2 \blacktriangle	58.6 \pm 5.3
CD86	55.0 \pm 3.4	96.1 \pm 1.3 Δ	60.5 \pm 3.8 \blacktriangle	62.4 \pm 4.7
HLA-DR	80.4 \pm 7.6	98.6 \pm 3.6 Δ	81.6 \pm 4.6 \blacktriangle	79.8 \pm 7.5

Δ : $P < 0.01$, 与未成熟组比较; \blacktriangle : $P < 0.01$, 与成熟组比较。

表 3 各组 IL-12 p70 和 TNF- α 的含量 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

项目	未成熟组	成熟组	DHA 组	SA 组
IL-12 p70	189.7 \pm 16.3	768.1 \pm 62.7 Δ	412.6 \pm 62.6 \blacktriangle	709.5 \pm 47.8
TNF- α	637.6 \pm 38.4	2 405.7 \pm 125.5 Δ	1 807.4 \pm 140.3 \blacktriangle	2 353.4 \pm 194.7

Δ : $P < 0.01$, 与未成熟组比较; \blacktriangle : $P < 0.01$, 与成熟组比较。



Δ : $P < 0.01$, 与未成熟组比较; \blacktriangle : $P < 0.01$, 与成熟组比较。

图 2 各组 IL-12 p70 及 TNF- α 的含量 (pg/mL)

2.4 DHA 对 DCs 中 CD80、CD86、HLA-DR mRNA 表达的影响 CD80、CD86、HLA-DR 的 PCR 扩增产物分别与各自 GAPDH 的 PCR 扩增产物相比,结果显示:CD80 ($F = 182.324, P = 0.000$)、CD86 ($F = 104.611, P = 0.000$)、HLA-DR ($F = 205.319, P = 0.000$) 的 4 个组之间均有显著差异 ($P < 0.01$);成熟组与未成熟组相比,有显著差异 ($P < 0.01$);DHA 组 CD80、CD86 及 HLA-DR mRNA 表达与成熟组相比均有所减低 ($P < 0.01$),说明 DHA 可有效抑制 DCs 中 CD80、CD86 和 HLA-DR mRNA 的表达,而 SA 组 CD80、CD86 和 HLA-DR mRNA 表达与成熟组比较无明显变化 ($P > 0.05$),见图 3。

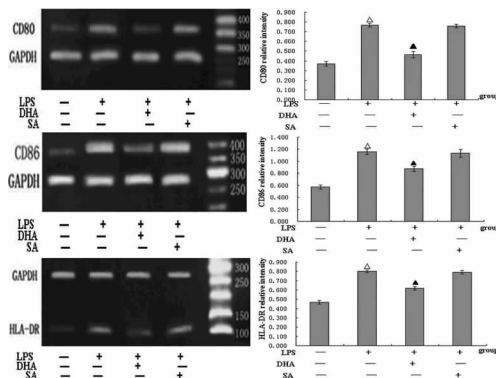


图 3 DHA 对 DCs 表达 CD80、CD86 和 HLA-DR mRNA 的影响

3 讨 论

DCs 是目前发现的功能最强大的 APC,最大的特点是能显著刺激初始型 T 细胞增殖^[5]。而其他 APC 仅能刺激已活化的或记忆性 T 细胞,因此,DCs 是机体免疫反应的始动者,在免疫应答中具有独特的地位。成熟 DCs 表达高水平的共刺

激分子 CD80、CD86,它们与 T 细胞受体 CD28 结合,传导正性共刺激信号,以激活初始型 T 细胞并促进细胞因子 IL-12 的分泌^[6]。而未成熟 DCs 只有低水平的 MHC II 类分子表达,同时缺乏刺激 T 细胞活化必需的辅助分子 CD80、CD86 等,体外激发混合淋巴细胞反应极弱,也不能诱导初始 T 细胞活化。随着免疫抑制治疗的进展,器官移植取得了很大进步,但目前应用的免疫抑制是以牺牲机体整体免疫功能为代价,且有不良反应^[7],寻找新型的免疫抑制剂和诱导受者对供者抗原的特异性耐受是当前移植学急需解决的问题。

DCs 是专职的 APC,是众所周知的高效 APC,许多研究已经证实 DCs 在决定耐受和免疫的平衡上起着关键的作用^[8]。 ω -3 多不饱和脂肪酸中的 DHA 在体外可以显著抑制 DCs 共刺激分子 CD80、CD86 以及表面抗原提呈分子 HLA-DR 的表达,从而干扰了 DCs 与 T 细胞之间的共刺激作用,使 T 细胞无法激活。所谓的成熟状态不仅是对 DCs 功能的描述,还包括了它的表型特征。比如,当 DCs 表面高表达 MHC 分子、CD40、CD80、CD83、CD86 等时,它就被认为是成熟^[9]。这是因为 DCs 表面的分子与其对 T 细胞活化的能力是密切相关的,从免疫学的角度来讲,一旦 DCs 表面分子的表达达到了成熟的“标准”,DCs 也就进入了成熟的功能状态^[10-11]。

DHA 还可以抑制 DCs 细胞释放细胞因子 IL-12 和 TNF- α 。IL-12 p70 是 DCs 成熟过程中分泌的一种标志性的细胞因子,它能够促进 Th0 细胞分化为 Th1 细胞,从而诱导 Th1 细胞介导的免疫反应^[12-13]。本研究结果显示 DHA 使 DCs 分泌 IL-12 p70 的水平降低至接近未成熟 DCs 水平。TNF- α 是一种全身性炎症反应和免疫反应介质,DHA 明显抑制 DCs 分泌 TNF- α ,抑制抗原特异性 T 细胞增殖,是 DCs 诱导外周耐受的一种可能机制^[14-15]。而 DCs 对 Th1/Th2 应答平衡的调节是决定移植排斥或耐受的另另一重要机制之一^[16-17]。因此,可以认为 DHA 从细胞免疫表型的表达和细胞因子的释放 2 个方面抑制了 DCs 对 T 细胞的激活能力。而 SA 在本实验中并未发现对 DCs 有明显影响^[18]。

参考文献:

- [1] Jensen SS, Gad M. Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity[J]. J Inflamm, 2010, 7(1): 37-39.
- [2] Jans LA, Giltay EJ, Does AJ. The efficacy of ω -3 fatty acids DHA and EPA (fish oil) for perinatal depression [J]. Br J Nutr, 2010, 16(1): 4-9.
- [3] Caughey GE, James MJ, Proudman SM, et al. Fish oil supplementation increases the cyclooxygenase inhibitory activity of paracetamol in rheumatoid arthritis patients[J]. Complement Ther Med, 2010, 18(3): 171-173.
- [4] Sales C, Oliviero F, Spinella P. Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in diet of patients with rheumatic diseases[J]. Reumatismo, 2008, 60(2): 95-101.
- [5] Poulin GB, Ahringer J. The Caenorhabditis elegans CUL-4/DDB-1/CDT-2 ubiquitin ligase complex is required for attenuation of EGFR signalling in vulva precursor cells[J]. BMC Dev Biol, 2010, 10(1): 109-112.
- [6] Azzi J, Tang L, Moore R, et al. Polylactide-cyclosporin: A nanoparticles for targeted immunosuppression[J]. FASEB J, 2010, 24(10): 927-929.

- [7] Nakamae H, Storer BE, Storb R, et al. Low-dose total body irradiation and fludarabine conditioning for HLA class I-mismatched donor stem cell transplantation and immunologic recovery in patients with hematologic malignancies: a multicenter trial[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16(3):384-386.
- [8] Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(11):753-766.
- [9] Maroof A, Beattie L, Kirby A, et al. Dendritic cells matured by inflammation induce CD86-dependent priming of naive CD8+ T cells in the absence of their cognate peptide antigen[J]. *J Immunol*, 2009, 183(11):1295-1297.
- [10] Ramgolam VS, Degregorio SD, Rao GK, et al. T cell LFA-1 engagement induces HuR-dependent cytokine mRNA stabilization through a Vav-1, Rac1/2, p38 MAPK and MKK3 signaling cascade[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):1445-1447.
- [11] Eisenring M, vom Berg J, Kristiansen G, et al. IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11):1030-1038.
- [12] Antelo DP, Filgueira AL, Cunha JM. Reduction of skin-homing cytotoxic T cells (CD8+ CLA+) in patients with vitiligo [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2011, 27(1):40-42.
- [13] Duong CP, Westwood JA, Berry LJ, et al. Enhancing the

specificity of T-cell cultures for adoptive immunotherapy of cancer[J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(1):33-48.

- [14] Miller MR, Seifert J, Szabo NJ, et al. Erythrocyte membrane fatty acid content in infants consuming formulas supplemented with docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid(ARA): an observational study[J]. *Matern Child Nutr*, 2010, 6(4):338-340.
- [15] Woodworth HL, McCaskey SJ, Duriancik DM, et al. Dietary fish oil alters T lymphocyte cell populations and exacerbates disease in a mouse model of inflammatory colitis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20):7960-7963.
- [16] Rockett BD, Salameh M, Carraway K, et al. ω -3 PUFA improves fatty acid composition, prevents palmitate-induced apoptosis, and differentially modifies B cell cytokine secretion in vitro and ex vivo[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(6):1284-1286.
- [17] Yessoufou A, Plé A, Moutairou K, et al. Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4+ CD25+ regulatory T-cells[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(12):2377-2379.
- [18] Hodge G, Hodge S, Li-Liew C, et al. Lymphocytic bronchiolitis is associated with inadequate suppression of blood T-cell granzyme B, IFN-gamma, and TNF-alpha [J]. *Transplantation*, 2010, 89(10):1283-1285.

(收稿日期:2011-06-08 修回日期:2011-08-15)

(上接第 53 页)

- A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-biomembranes*, 2006, 1758(9):1499-1502.
- [2] Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds[J]. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2010, 125(2):510-513.
- [3] 王彦, 吴奎, 毕玉田, 等. FasL 和 Der p2 双基因共表达真核表达载体的构建及其在树突状细胞中的表达[J]. *重庆医学*, 2010, 39(20):2697-2699.
- [4] 张从纪, 杨彦春, 单佑安. VEGF 基因真核表达载体的构建及其在骨髓间充质干细胞中的表达[J]. *重庆医学*, 2010, 39(1):4-6.
- [5] Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, et al. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(2):219-221.
- [6] Li WZ, Ma N, Ong LL, et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11):2118-2120.
- [7] Hao L, Wang J, Zou Z, et al. Transplantation of BMSCs expressing hPDGF-A/hBD2 promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury[J]. *Gene Therapy*, 2009, 16(1):34-36.

- [8] Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy[J]. *Curr Opin Oncol*, 2007, 19(5):650-653.
- [9] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history concepts and assays[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 4(2):313-315.
- [10] Falanga V. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 32(1):88-91.
- [11] Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, et al. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(3):522-524.
- [12] Luenser K, Ludwig A. Variability and evolution of bovine beta-defensin genes[J]. *Genes Immun*, 2005, 6(1):115-117.
- [13] Wu Z, Hoover DM, Yang D, et al. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(44):8880-8883.
- [14] Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(33):5707-5709.

(收稿日期:2011-06-09 修回日期:2011-08-22)