

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0306-06

不同重组病毒载体在大鼠骨髓间充质干细胞中的转染效率及基因表达

潘虹^{1,2}, 刘新建¹, 吴继红¹, 田毓华¹, 谢匡成¹, 陈霞芳¹, 张圣海¹, 黄倩^{1*}, 林志新^{2*} (1. 上海交通大学附属第一人民医院中心实验室, 上海, 200080; 2. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海, 200240)

[摘要] 目的: 探讨不同的重组病毒载体对体外培养的 SD 大鼠骨髓间充质干细胞 (rMSCs) 的转染效率和外源基因表达水平, 为利用骨髓间充质干细胞进行细胞和基因治疗提供实验依据。方法: 采用淋巴细胞分离液、密度梯度离心及体外培养方法分离 rMSCs, 流式细胞仪检测细胞表面 CD11b、CD45 和 CD90 的表达鉴定细胞类型。进一步用携带绿色荧光蛋白 (EGFP) 报告基因的重组 Ad5-EGFP、Ad5F35-EGFP、rAAV1/2-EGFP、rAAV2-EGFP 及 Lentivirus-EGFP 转染体外培养的 rMSCs, 荧光显微镜观察、流式细胞仪检测 EGFP 阳性率和荧光强度。结果: rMSCs 细胞表面 CD11b、CD45 和 CD90 阳性率分别为 (14.1 ± 3.3)%、(1.1 ± 0.4)% 和 (82.3 ± 5.7)%。Ad5-EGFP 按 10、100 和 1 000 MOI 转染 rMSCs, 2 d 后流式细胞仪检测, EGFP 阳性率分别为 (33.6 ± 2.7)%、(88.6 ± 1.0)% 及 (99.9 ± 0.1)% , 荧光强度为 4.4 ± 0.3、39.8 ± 1.5 及 811.4 ± 3.9; Ad5F35-EGFP 按 10、100 和 1 000 MOI 转染 rMSCs, 2 d 后阳性率分别为 (96.9 ± 0.4)%、(99.9 ± 0.1)% 及 (99.7 ± 0.1)% , 荧光平均强度为 369.3 ± 14.8、895.4 ± 7.5 及 703.2 ± 38.4; rAAV1/2-EGFP 及 rAAV2-EGFP 按 1 × 10⁴ 和 1 × 10⁵ vg/细胞转染 rMSCs, 6 d 后阳性率分别为 (0.94 ± 0.31)% 及 (1.30 ± 0.36)% , 和 (2.16 ± 0.38)% 及 (3.90 ± 0.33)% ; LV-EGFP 按 30 (TU/细胞) 转染 rMSCs, 6 d 后阳性率为 (60.5 ± 3.2)% , 荧光强度为 27.0 ± 3.6。结论: Ad5、Ad5F35 及 LV 能够有效转染体外培养的 rMSCs 并表达外源基因, 转染效率与病毒的用量间存在量效关系。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 基因治疗; 重组病毒载体; 转染效率; 基因表达

[中图分类号] R730.5 **[文献标志码]** A

Transfection efficacy and gene expression of different recombinant viral vectors in rat mesenchymal stem cells *in vitro*

PAN Hong^{1,2}, LIU Xin-jian¹, WU Ji-hong¹, TIAN Yu-hua¹, XIE Kuang-cheng¹, CHEN Xia-fang¹, ZHANG Sheng-hai¹, HUANG Qian^{1*}, LIN Zhi-xin^{2*} (1. Central Laboratory, First People's Hospital of Shanghai Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China; 2. College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective :** To investigate the transfection efficacy and exogenous gene expression of different recombinant viral vectors in the rat mesenchymal stem cells (rMSCs) *in vitro*, so as to provide evidence for using MSCs in gene therapy. **Methods:** rMSCs were isolated by Filcoll-hypaque gradient centrifuging method (lymphocytes separation) and the cell types were identified by detecting CD11b, CD45 and CD90 by flow cytometry. Ad5-, Ad5F35-, rAAV1/2-, rAAV2- and Lentivirus-encoding EGFP were used to transfect cultured mesenchymal stem cells separately, then the GFP positive rate and the mean intensity of GFP fluorescence were examined by flow cytometry and fluorescence microscopy, respectively. **Results:** Flow cytometry assay showed that the positive rates of CD11b, CD45 and CD90 were (14.1 ± 3.3)%, (1.1 ± 0.4)% and (82.3 ± 5.7)%, respectively. Two days after rMSCs were transfected with Ad5-EGFP at 10, 100, 1 000 MOI, the EGFP positive rates were respectively (33.6 ± 2.7)%, (88.6 ± 1.0)% and (99.9 ± 0.1)% and the mean intensity of EGFP fluorescence were respectively 4.4 ± 0.3, 39.8 ± 1.5 and 811.4 ± 3.9; the numbers for transfection with Ad5F35-EGFP at 10, 100, 1 000 MOI were respectively (96.9 ± 0.4)%, (99.9 ± 0.1)%, and (99.7 ± 0.1)% and 369.3 ± 14.8, 895.4 ± 7.5 and 703.2 ± 38.4. The EGFP positive rates in rMSCs transfected with 1 × 10⁴ and 1 × 10⁵

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973) 资助项目 (No. 2004CB518804); 国家自然科学基金杰出青年资助项目 (No. 30325043). Supported by the Major State Basic Research Development Program (973) of China (No. 2004CB518804); National Natural Science Foundation of China (No. 30325043)

[作者简介] 潘虹 (1983-), 女, 浙江省金华市人, 硕士研究生, 主要从事干细胞基因治疗方面的研究, Email: sjtupanhong@sjtu.edu.cn

* Corresponding author. HUANG Qian, Email: qhuang@sjtu.edu.cn; LIN Zhi-xin, Email: zxlin@sjtu.edu.cn

vg/cell of rAAV1/2-EGFP and rAAV2-EGFP were $(0.94 \pm 0.31)\%$, $(1.30 \pm 0.36)\%$, and $(2.16 \pm 0.38)\%$, $(3.90 \pm 0.33)\%$, respectively. Six days after rMSCs were transfected with 30 TU/cell of Lentivirus-GFP, the EGFP positive rates and mean intensity of GFP fluorescence were $(60.5 \pm 3.2)\%$ and 27.0 ± 3.6 , respectively. **Conclusion:** Ad5, Ad5F35 and Lentivirus can effectively transfect rMSCs *in vitro* and express exogenous genes; the transfection efficacy is associated with the amount of the virus.

[**Key words**] mesenchymal stem cell; gene therapy; recombinant viral vector; transfection efficacy; gene expression

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4): 306-311]

随着细胞和基因治疗的发展,种子细胞或靶细胞逐渐成为影响细胞和基因治疗成功与否的关键环节之一。干细胞因其具有高度的自我更新能力和多向分化潜能,已成为组织工程中首选的种子细胞^[1]。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)来源充足、取材容易、移植后排斥反应弱,因此已成为细胞和基因治疗研究的热点^[2]。为了使骨髓间充质干细胞更好地发挥治疗效果,有时需要对其进行修饰和诱导。病毒载体是最常用的基因传递载体,不同类型的病毒载体具有各自的优缺点。为了筛选能够高效转染 MSCs 的载体,本研究对重组腺病毒 Ad5 和 Ad5F35、腺相关病毒 AAV1/2 和 AAV2,以及慢病毒载体对体外培养的大鼠 MSCs (rMSCs)的转染效率和外源基因表达水平进行了比较,为今后利用骨髓间充质干细胞进行细胞和基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离、纯化和培养

无菌条件下取 8 周龄、体重约 200 g 的 SD 大鼠 [雄性,购自中国科学院上海实验动物中心,动物合格证号:SCXK(沪)2003-0002] 的股骨、胫骨,剪去两端骨髓,用 PBS 冲出骨髓腔内骨髓,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。再用 PBS 制成骨髓单细胞悬液,按 1:1 的体积比,小心加在 Filcoll-hypaque 层上面,2 000 r/min 离心 20 min。吸取中间不透明的单个核细胞层,再以 1:2 的体积比加入 PBS,混匀,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。用含 10% 胎牛血清、1 ng/ml bFGF 的低糖 DMEM 培养液调节细胞密度,最后以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2 流式细胞仪对 rMSCs 的鉴定

第 4 代的 rMSCs,经 2.5 g/L 的胰酶消化后,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤后制成 $2 \times 10^6/\text{ml}$ rMSCs 单细胞悬液,分别加入到 4 个离心管中,其中 1 管为空白对照,3 管为实验管。分别加入 CD11b-PE、CD90-FITC 和 CD45-TC(Invitrogen 公

司),室温孵育 20 min 后 PBS 洗涤,1 200 r/min 离心 5 min,PBS 重悬。流式细胞仪(Beckman Coulter EPICS XL)检测并计数阳性细胞。

1.3 重组腺病毒、腺相关病毒以及慢病毒

所有重组病毒均携带 CMV 启动子调控的绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因。5 型重组腺病毒(Ad5-EGFP)由本实验室制备,滴度为 8×10^9 PFU/ml;基因组为 5 型、但外壳纤维为 35 型的嵌合型重组腺病毒(Ad5F35-EGFP)由第二军医大学钱其军教授惠赠,其滴度为 1.49×10^9 PFU/ml;2 型重组腺相关病毒(rAAV2-EGFP),滴度为 1×10^{12} 病毒基因组(vg)/ml;I 型重组腺相关病毒实际是外壳为 I 型、但反向末端重复序列(ITR)为 II 型的假型病毒(rAAV1/2-EGFP),滴度为 1×10^{12} vg/ml;rAAV2-EGFP 及 rAAV1/2-EGFP 均购自本元正阳基因技术有限公司。慢病毒 Lentivirus-EGFP(LV-EGFP)由中科院上海生化与细胞生物学研究所郭礼和教授惠赠,滴度为 2×10^8 转录单位(TU)/ml。

1.4 显微镜观察以及流式细胞仪检测 Ad、AAV 及 LV 对体外培养 rMSCs 的转染效率

按每孔 1×10^5 将 rMSCs 接种在 24 孔细胞培养板中,1 d 后细胞贴壁,分别将 Ad5-EGFP(10、100、1 000 MOI)、Ad5F35-EGFP(10, 100, 1 000 MOI)、rAAV1/2-EGFP(1×10^4 、 1×10^5 vg/细胞)、rAAV2-EGFP(1×10^4 、 1×10^5 vg/细胞)及 LV-EGFP(30 TU/细胞)加入到 rMSCs 细胞培养液中。不同重组病毒对 rMSCs 的感染和转导效率用报告基因 EGFP 的表达来反映。分别在 Ad 感染 rMSCs 后 2 d、rAAV 及 LV 感染后 6 d 用倒置荧光显微镜(德国 Zeiss Axio 100)观察并照像记录 EGFP 阳性细胞以及被感染细胞的形态,以流式细胞术对 EGFP 阳性细胞数和强度进行定量分析。

1.5 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 统计软件对数据进行 *t* 检验分析和处理。用 Microsoft Excel 软件作图。

2 结果

2.1 SD 大鼠 rMSCs 的形态特征

经淋巴细胞分离液密度梯度离心所得的细胞为比较一致的球形单个核细胞。原代培养 24 h 后大部分细胞贴壁, 72 h 后贴壁细胞分裂增殖, 形成细胞团, 细胞不断分裂增殖。新生的细胞圆形, 位于中心, 周围的细胞逐渐变为梭形, 核居中, 偶有双核, 含 1~3 个核仁。接种 3 d 后首次换液, 1 周后细胞集落迅速增多, 不断扩大, 互相融合。9~14 d 时细胞贴满瓶底(图 1A)。刚传代的细胞呈球形, 很快沉降贴壁, 伸展为三角形、多角形, 并逐渐变成梭形。少部分圆形细胞悬浮, 折光性差, 随换液除去, 虽然传代后细胞形态未变, 但增殖速度明显增快, 约 6 d 长满培养瓶底。多次传代的 MSCs 达融合生长时, 有更均匀有序的成纤维细胞样分布特征(图 1B)。连续传 4 代, 细胞形态无明显变化。

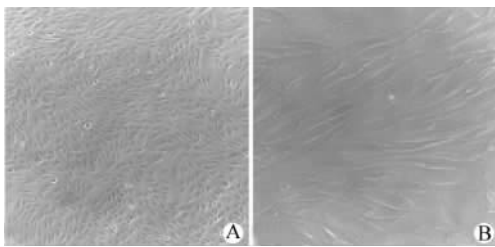


图 1 连续培养 rMSCs 的形态

Fig.1 Morphology of rMSCs

A: The 1st passage rMSCs(×100);

B: The 4th passage rMSCs (×400)

2.2 rMSCs 的表面抗原

传 4 代后的 rMSCs 经流式细胞术检测, CD90 呈阳性反应, CD11b 及 CD45 基本呈阴性反应。其中 CD90 阳性率为(82.3 ± 5.7)%, CD11b 阳性率为(14.1 ± 3.3)%, CD45 阳性率为(1.1 ± 0.4)%(图 2), 表型鉴定可初步确定为骨髓间充质干细胞。

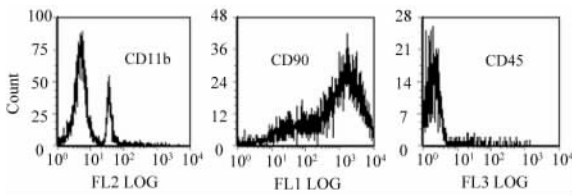


图 2 第 4 代 rMSCs CD11b、CD45、CD90 的表达

Fig.2 Expression of CD11b, CD45, CD90 on the 4th passage of rMSCs by FACS analysis

2.3 Ad、rAAV 及 LV 对体外培养的 rMSCs 的转染效率

分别用 10、100 和 1 000 MOI 的 Ad5-EGFP 病毒感染 rMSCs, 24 h 后倒置显微镜即可观察到 GFP 阳性细胞, 随着病毒用量的增加, GFP 阳性细胞数目增多, 荧光亮度增强(图 3); 此状态可持续 10~12 d, 第 12 天后, 阳性细胞开始逐渐减少, 荧光亮度减弱。分别用 10、100 和 1 000 MOI 的 Ad5F35-EGFP 病毒感染 rMSCs, GFP 阳性细胞数和亮度均高于 Ad5-EGFP, 但 Ad5F35-EGFP 在 1 000 MOI 时, 被感染的 rMSCs 发生明显病变。与 Ad5-EGFP 一样, Ad5F35-EGFP 感染后荧光可以持续表达 10~12 d, 12 d 后阳性细胞逐渐减少, 荧光亮度减弱。rAAV1/2-EGFP 或 rAAV2-EGFP 按 1×10^4 及 1×10^5 vg/细胞感染 rMSCs, 6 d 后 GFP 阳性细胞数和荧光亮度均较弱, 长期观察可见这两种血清型 rAAV 的转导效率无明显变化。LV-EGFP 按 30 TU/细胞感染 rMSCs 后, 第 2 天即可观察到少量细胞表达 GFP, 随着时间延长, GFP 阳性细胞逐渐增多, 第 6 天时表达 GFP 荧光的细胞数量及亮度不再有明显变化(图 4)。流式细胞术检测转染 rMSCs 的阳性率及平均荧光强度, 结果见表 1。

3 讨论

目前对于 MSCs 的分离、纯化和培养还没有统一的方法^[3,4]。密度梯度离心法^[5]比较常用。根据相对密度差别, 用相对密度为 1.077 的淋巴细胞分离液分离骨髓间充质干细胞。经梯度离心后, 能有效地将绝大部分红细胞、粒细胞、脂肪细胞和血小板除去, 获得纯度较高的单个核细胞。然后利用 MSCs 与血液系统细胞贴壁性能的差异, 随换液弃除悬浮生长的血细胞。经几次传代, 细胞形态更均一, 排列更有序, 提示骨髓单个核细胞作传代有益于富集和纯化其中的 MSCs 组分。目前, 对骨髓 MSCs 的研究仍处于探索阶段, 还没有理想的用于鉴定的标志性分子或方法^[6,7]。本实验通过流式细胞仪检测细胞表面抗原 CD11b、CD45(两者均属造血系统细胞标记物)、CD90(表示细胞处于原始的未分化状态)来鉴定 rMSCs。流式鉴定结果显示, 本实验所获得的细胞绝大部分为 CD90 阳性, CD11b、CD45 基本阴性。故可初步确定其即为本研究需要的骨髓间充质干细胞。

近年来, 利用基因工程细胞进行替代治疗和基因治疗已成为医学领域乃至整个生命科学领域的研究热点, 其中寻找合适的供体细胞或靶细胞及相应

的载体是细胞和基因治疗中最为困难的部分。尽管干细胞在成体内广泛存在,但骨髓间充质干细胞(MSCs)因其来源容易,易于体外培养扩增,且移植后排斥反应较弱等,是很有前途的靶细胞或载体^[8-13]。在神经系统疾病的治疗方面, Schwarz等^[14]利用经过修饰的、可以表达 L-DOPA 的 MSCs 供体细胞做移植治疗帕金森病,在动物模型中取得

了较明显的效果。在肿瘤治疗方面,有人利用 MSCs 将 β -干扰素导入体肿瘤细胞,可明显抑制恶性肿瘤细胞生长^[15]。还有研究表明^[16-17], MSCs 可以靶向肿瘤细胞,提示其在肿瘤基因治疗方面意义非常大。然而,天然的 MSCs 在治疗方面存在局限性,通过基因修饰以定向诱导分化,或表达特殊的因子和基因产物十分重要。

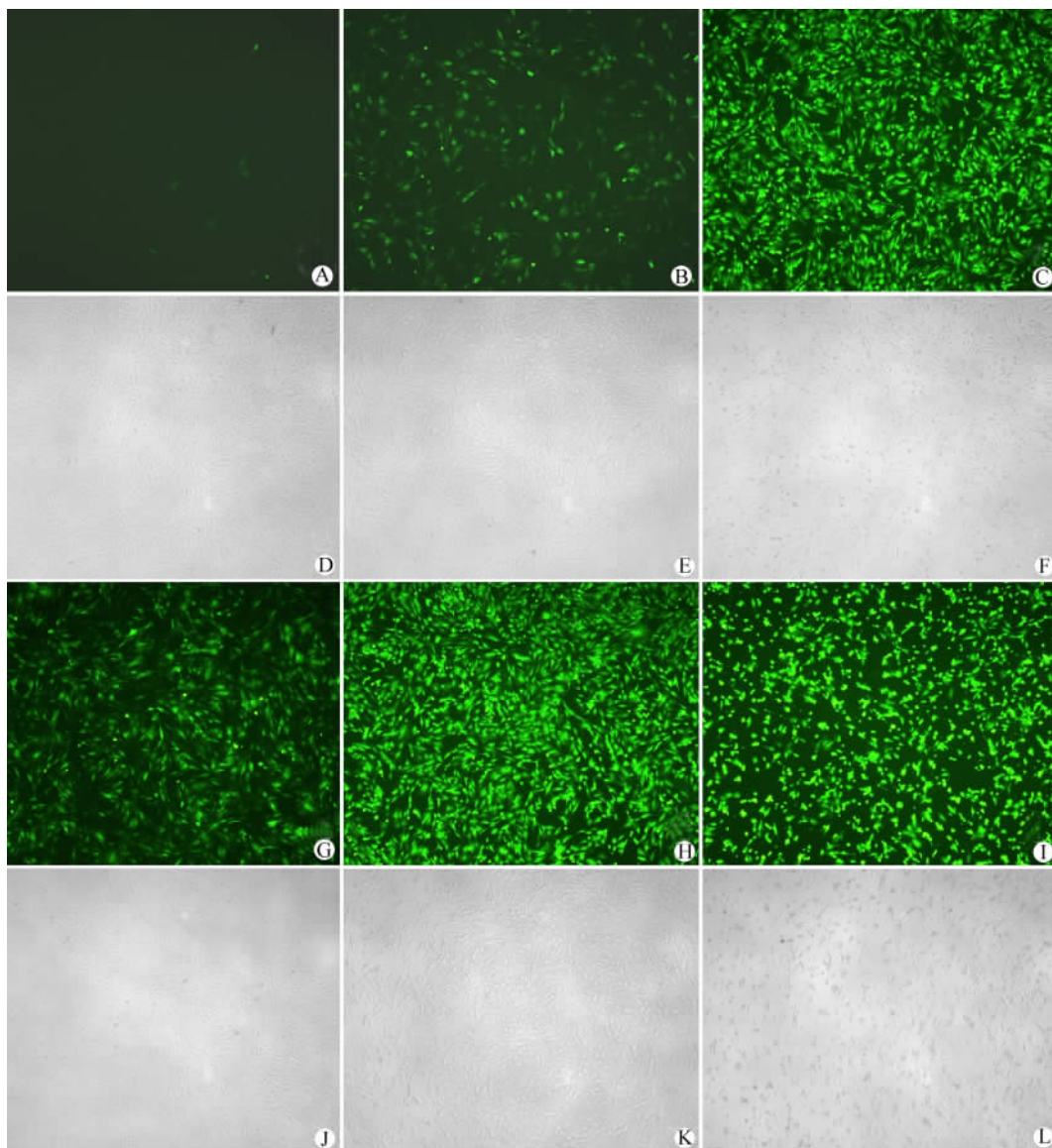


图3 Ad5-EGFP、Ad5F35-EGFP 对体外培养 rMSCs 的转染及外源基因 GFP 的表达

Fig. 3 GFP expression in rMSCs after transfection with Ad5-EGFP and Ad5F35-EGFP *in vitro* ($\times 50$)

A-C,G-I: Fluorescence microscope; D-F, J-L: Light microscope; A, D: 10 MOI Ad5-EGFP, 48 h, in the same visual field; B, E: 100 MOI Ad5-EGFP, 48 h, in the same visual field; C,F: 1 000 MOI Ad5-EGFP, 48 h, in the same visual field; G,J: 10 MOI Ad5F35-EGFP, 48 h, in the same visual field; H, K: 100 MOI Ad5F35-EGFP, 48 h, in the same visual field; I, L: 1 000 MOI Ad5-EGFP, 48 h, in the same visual field

为成功修饰 MSCs 的需要,本研究比较了常用的、不同类型的重组病毒载体对 MSCs 的感染和外

源基因表达效率。Ad5 是最常用的载体,对人类没有大的致病性,宿主范围广,转染效率高;但其靶向

性较差,免疫原性较强,所介导的外源基因不能长期表达。有报道^[18-19] Ad5F35 对 Ad5 转染较差的细胞,特别是造血系统细胞、干细胞和一些肿瘤细胞的转染效率较高。AAV 载体无致病性,免疫原性低,

不存在插入突变或致癌的危险,其最大的特点是能介导外源基因长期稳定表达。慢病毒的特点是其基因组能稳定整合入宿主细胞染色体,因此,能持久稳定表达外源基因。

表 1 不同重组腺病毒载体以不同剂量转染 rMSCs 后的 GFP 阳性率和荧光强度

Tab. 1 GFP positive rate and fluorescence intensity in rMSCs after transfection by different recombinant viral vectors at different dosage analyzed by FACS

Item	Ad5-EGFP (MOI)			Ad5F35-EGFP (MOI)			rAAV1/2-EGFP (vg · cell ⁻¹)		rAAV2-EGFP (vg · cell ⁻¹)		LV-EGFP (TU · cell ⁻¹)
	10	100	1 000	10	100	1 000	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁵	30
Positive rate(%)	33.6 ± 2.7	88.6 ± 1.0	99.9 ± 0.1	96.9 ± 0.4	99.9 ± 0.1	99.7 ± 0.1	0.94 ± 0.31	1.30 ± 0.36	2.16 ± 0.38	3.90 ± 0.33	60.5 ± 3.2
Fluorescent intensity	4.4 ± 0.3	39.8 ± 1.5	811.4 ± 3.9	369.3 ± 14.8	895.4 ± 7.5	703.2 ± 38.4	1.41 ± 0.09	1.37 ± 0.03	1.41 ± 0.08	1.58 ± 0.04	27.0 ± 3.6

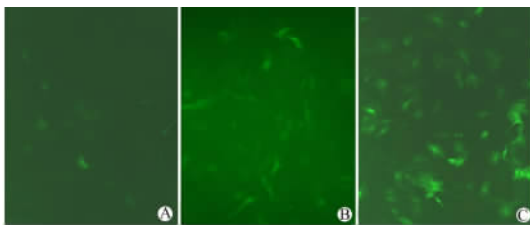


图 4 LV-GFP 对体外培养 rMSCs 的转染及外源基因 GFP 的表达 (×100)

Fig. 4 Transfection and exogenous gene expression of LV-GFP in rMSCs *in vitro* (×100)

A: 30 TU/cell of LV-GFP, 2 d; B: 30 TU/cell of LV-GFP, 3 d; C: 30 TU/cell of LV-GFP, 6 d.

本实验结果表明,Ad5、Ad5F35 及 LV 均可以有效转染体外培养的 rMSCs 并表达外源基因,Ad5F35 对 rMSCs 的转染效率要高于 Ad5,转染效率与病毒的用量间存在量效关系。重组腺病毒载体(Ad5、Ad5F35)转染 rMSCs 后,病毒基因不能整合到宿主细胞基因组,外源基因的表达随着时间的延长而减弱;而慢病毒载体转染 rMSCs 后,病毒基因能稳定整合到宿主细胞基因组内并持久表达外源基因,因此,在 MSCs 的修饰方面占据重要地位,为利用 rMSCs 携带治疗基因转移进行基因治疗研究奠定了基础。需指出的是,两种血清型 rAAV 转染效率较低,鉴于有研究表明 rAAV 特别是 AAV1/2,对体内和体外的视网膜色素上皮(RPE)细胞的转染效率明显不同,对体内 RPE 细胞转染效率远远高于体外^[20],因此,还有必要深入进行体内实验研究。

[参考文献]

- Naumann A, Dennis J, Staudenmaier R, *et al.* Mesenchymal stem cells – a new pathway for tissue engineering in reconstructive surgery [J]. *Laryngorhinotologie*, 2002, 81(7): 521-527.
- Van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, *et al.* Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2002, 2(2): 195-209.
- Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma [J]. *Lab Invest*, 1999, 79(4): 449-457.
- Oreffo RO, Virdi AS, Triffitt JT. Retroviral marking of human bone marrow fibroblasts: *in vitro* expansion and localization in calvarial sites after subcutaneous transplantation *in vivo* [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 186(2): 201-209.
- Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L, *et al.* An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure [J]. *Connect Tissue Res*, 2001, 42(1): 49-58.
- Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1): 67-73.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, *et al.* Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction [J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(6): 900-908.
- Scuteri A, Casseti A, Tredici G. Adult mesenchymal stem cells rescue dorsal root ganglia neurons from dying [J]. *Brain Res*, 2006, 1116(1): 75-81.

- [11] Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue [J]. *Spine*, 2004, 29(18): 1971-1979.
- [12] Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, *et al.* A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow [J]. *Blood*, 2004, 104(9): 2643-2645.
- [13] Silva FH, Nardi NB. From leading role to the backstage: mesenchymal stem cells as packaging cell lines for in situ production of viral vectors [J]. *Med Hypotheses*, 2006, 67(4): 922- 925.
- [14] Schwarz EJ, Reger RL, Alexander GM, *et al.* Rat marrow stromal cells rapidly transduced with a self-inactivating retrovirus synthesize L-DOPA *in vitro* [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(16): 1214-1223.
- [15] Studeny M, Marini FC, Champlin RE, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- β delivery into tumor [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(13): 3603-3608.
- [16] Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, *et al.* Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(21): 1593-1603.
- [17] Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, *et al.* Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors [J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(5): 421-429.
- [18] Yotnda P, Onishi H, Heslop HE, *et al.* Efficient infection of primitive hematopoietic stem cells by modified adenovirus [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(12): 930-937.
- [19] Shayakhmetov DM, Li ZY, Ni S, *et al.* Targeting of adenovirus vectors to tumor cells does not enable efficient transduction of breast cancer metastases [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(4): 1063-1068.
- [20] 吴继红, 张圣海, 刘焰, 等. 1型及2型腺相关病毒对视网膜细胞转导效率的比较研究 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(40): 2841-2846.
- [收稿日期] 2007-04-20 [修回日期] 2007-06-04
[本文编辑] 韩丹

· 科技动态 ·

b-arrestin 1 对 CD4⁺ T 细胞存活和自身免疫的调控

在获得性免疫中, CD4⁺ T 细胞发挥着重要作用, 其调控的失常会导致自身免疫性疾病的发生。机体对外周活化的 CD4⁺ T 细胞的调控是十分严格的, 其产生和消亡间保持着微妙的平衡。在哺乳动物中, CD4⁺ T 细胞的死亡主要由两条不同的通路介导: 一条是细胞表面受体, 如 TNF、TRAIL 受体和 Fas; 另一条是 Bcl-2 蛋白家族介导的通过调控线粒体的途径。Bcl-2 家族中既有能正相调控又有能负相调控 T 细胞凋亡的分子, Bcl-2 分子就是其中抑制凋亡的重要成员。b-arrestins 蛋白是多功能的信号分子, 被认为能调控多种信号分子的活性和分布; 此外, b-arrestins 也在核内发挥重要表达调控作用。b-arrestins 在机体内表达广泛, 在神经和免疫系统有更高的表达。其中, b-arrestin 2 在固有免疫 Toll 受体信号通路中具有负相调控作用。论文作者研究了 b-arrestin 1 (Arrb 1) 在免疫系统中的作用。

作者发现在 Bcl-2 缺失的小鼠中, T 细胞更容易死亡, 而且随着小鼠寿命的延长多发生白细胞减少症。相反, 在 Bcl-2 转基因小鼠中 T 细胞抵抗各种凋亡刺激的能力增强, 存活时间延长。同时, 作者在构建的实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 小鼠模型中发现, Arrb 1 基因敲除会明显缓解症状, 而转染 Arrb 1 基因就会明显加重症状。不仅如此, 作者还在多发性硬化症患者的自身反应性 CD4⁺ T 细胞中发现其 Arrb 1 和 Bcl-2 基因的表达都呈现高表达; 而当用 RNA 干扰 Arrb 1 之后, 这些细胞在细胞因子撤离后表现出了高的凋亡率。

通过检测 CD4⁺ T 细胞中 Bcl-2 基因启动子区域 H4 组蛋白的乙酰化情况, 作者提出这样一个假设: Arrb 1 通过乙酰化 Bcl-2 启动子区域的组蛋白 H4 提高原癌基因 Bcl-2 的表达量, 从而正相调节 CD4⁺ T 细胞的活性。这一结论也在 Arrb 1 基因敲除的小鼠中得到证实: Arrb 1 基因敲除, 小鼠对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 的抵抗性增强; 而 Arrb 1 基因的表达就会增加小鼠对 EAE 的易感性。

研究证实了 Arrb 1 (b-arrestin 1) 在 T 细胞生理功能调节中的重要作用及其机制, 并将 b-arrestin 1 与自身免疫疾病的病理机制联系在一起。

[王品摘译, 安华章审阅. Shi Y, Feng Y, Pei G, *et al.* *Nat Immunol*, 2007, 8(8): 817-824]