

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0205-05

· 论 著 ·

CAR 的表达调节对肝癌基因治疗中腺病毒载体感染效率的影响

吴 贇^{1,2} 郑 辉¹, 陈宏新², 黄孝天², 沈佐君¹, 刘晶星^{2*} (1. 安徽医科大学 附属省立医院 临检中心, 合肥 230001; 2. 上海交通大学医学院 病原生物学教研室, 上海 200025)

[摘要] 目的: 通过抑制 Raf-MEK-ERK 信号转导途径调节肝癌细胞表面柯萨奇病毒和腺病毒受体(coxsackie-adenovirus receptor, CAR)的表达, 探索肝癌基因治疗中 CAR 表达与腺病毒(adenovirus, Ad)感染效率之间的关系。方法: 选择两株人肝癌细胞株 SMMC-7721 及 HepG₂, 以 Raf-MEK-ERK 信号转导抑制剂 U0126 作用后, 应用 Western blotting 检测细胞表面 CAR 蛋白的表达水平。选用能表达 GFP 的非复制型 E₁A 缺陷的 Ad 感染人肝癌细胞 SMMC-7721 及 HepG₂, 应用 FACS 分析 U0126 处理前后 Ad 感染效率的变化。结果: 细胞经 MEK 抑制剂 U0126 处理后, 细胞膜表面 CAR 的表达呈明显上调趋势。FACS 检测显示, 经 U0126 处理后, 在相同感染复数(10 MOI) Ad-GFP 的感染下, GFP⁺ 细胞率明显升高, SMMC-7721 细胞由(71.65 ± 6.21)% 上升至(86.54 ± 5.70)%; HepG₂ 细胞由(77.53 ± 4.62)% 上升至(87.06 ± 2.83)% (均 P < 0.05)。结论: 抑制剂 U0126 抑制 Raf-MEK-ERK 信号转导途径后, 可上调肝癌细胞膜表面 CAR 的表达, 从而导致 Ad 在肝癌细胞感染效率的提高。

[关键词] 柯萨奇病毒和腺病毒受体; U0126; 腺病毒; 感染效率; 肝细胞癌; 基因治疗

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

Influence of coxsackie-adenovirus receptor expression on infection efficiency of adenovirus vector in gene therapy of hepatocellular carcinoma

WU Yun^{1,2}, ZHENG Hui¹, CHEN Hong-xin², HUANG Xiao-tian², SHEN Zuo-jun¹, LIU Jing-xing^{2*} (1. Center of Clinical Laboratory, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China; 2. Department of Etiology, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the relationship between coxsackie-adenovirus receptor (CAR) expression and the infection efficiency of adenovirus vector in gene therapy for hepatocellular carcinoma through regulating CAR expression on cells surface *via* inhibition of the Raf/MEK/ERK pathway. **Methods:** Western blotting analysis was used to examine CAR expression in hepatocellular carcinoma cells (SMMC-7721 and HepG₂) before and after treatment with U0126, inhibitor of Raf/MEK/ERK signal transduction. SMMC-7721 and HepG₂ were infected by a non-replicating, E1A-deleted adenovirus expressing EGFP (Ad-GFP). FACS was used to analyze the infection efficiency of Ad before and after U0126 treatment. **Results:** The expression of CAR on cell surface had an increasing tendency after treatment with U0126. FACS analysis showed significantly increased infectivity of cells treated with the MEK inhibitor U0126 compared with untreated cells: SMMC-7721, (71.65 ± 6.21)% → (86.54 ± 5.70)%, HepG₂, (77.53 ± 4.62)% → (87.06 ± 2.83)%, when infected with Ad-GFP at the same MOI (10 MOI). **Conclusion:** The inhibition of Raf/MEK/ERK pathway by U0126 may up-regulate the expression of CAR in some hepatocellular carcinoma cells, which subsequently enhances the susceptibility of adenovirus infection to target cells.

[Key words] coxsackie-adenovirus receptor; U0126; adenovirus; infection efficiency; hepatocellular carcinoma; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(3): 205-209]

随着分子生物学技术的迅猛发展,被认为是肿瘤治疗第 5 种模式的基因治疗越来越受到人们的重视^[1]。当前在肝癌的基因治疗实践中应用最多的是腺病毒(adenovirus, Ad)载体系统。自从 Ad 载体被发现并应用于基因治疗以来,介导柯萨奇病毒和

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 39970691)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39970691)。

[作者简介] 吴 贇(1973-), 女,安徽省淮南市人,硕士,主要从事柯萨奇病毒的研究。现工作于安徽医科大学附属省立医院临检中心,主管检验师。E-mail: wuyunzh@sina.com.cn

* Corresponding author. E-mail: AD50238836@online.sh.cn

腺病毒受体(coxsackie-adenovirus receptor, CAR)就备受关注。

CAR 是柯萨奇 B 组病毒(coxsackie B virus, CBV)和 Ad 受体,于 1997 年通过免疫亲和层析的方法被分离识别^[2-3]。CAR 分布广泛,在许多组织和细胞中都有表达,但不同种属、组织的分布不同^[4]。据文献^[5-6]报道在高度恶性的肿瘤细胞中,包括卵巢癌、结肠直肠癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈部肿瘤、黑素瘤和神经胶质瘤等, CAR 是低水平表达的。以 Ad 载体为基础的基因治疗中 CAR 介导的 Ad 进入靶细胞是基因转移中的限速步骤,并且转染效率与细胞表面 CAR 的表达有关^[7-9]。低水平表达的 CAR 无疑是制约 Ad 转导效率的主要障碍,甚至在某些肿瘤细胞还表现出对 Ad 转染呈现一定的抗性^[10-11],为了解决 Ad 转导效率低下的难题,本实验试图通过抑制 Raf-MEK-ERK 信号转导途径上调细胞表面 CAR 的表达水平,促进腺病毒载体的转导效率,最终达到有利于肝癌基因治疗的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 SMMC-7721 及 HepG₂ 由本室保存。兔抗 CAR 胞外段多克隆抗体 H-300 为 Santa Cruz 公司产品, FITC 标记的羊抗兔 IgG (H + L) 为北京鼎国生物公司产品, P42/P44 MAPK 抗体试剂盒及 U0126 (Raf-MEK-ERK 信号途径抑制剂) 为 Cell Signaling 公司产品。Ad-GFP 是非复制型 E₁A 剔除的 Ad, 病毒的包装培养和效价滴定都在人胚肾细胞系 HEK293 细胞中完成, 由生化教研室应磊博士惠赠。PVDF 膜及 ECL 化学发光试剂盒为 Amersham Pharmacia 公司产品。改良的 RIPA 细胞裂解液由 Tris-HCl (50 mmol/L pH 7.5), NaCl (150 mmol/L), NP40 (1%), 脱氧胆酸钠 (0.5%), SDS (0.1%), EDTA (1 mmol/L), Leupeptin (2 μg/ml), PMSF (1 mmol/L) 组成。

使用的主要仪器有 Hoefer miniVE 垂直电泳仪及电转移设备(Amersham Pharmacia 公司), 荧光倒置显微镜(Leica, 型号: DMIRB), 冷却式数字显微图像系统(Digital Imaging System, 型号: SPOT RT), 流式细胞仪(BD-calibur)等。

1.2 细胞培养

应用含 10% BSA、0.2 mol/L 谷氨酰胺、0.1 mol/L 丙酮酸钠的 RPMI-1640 培养液, 在 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养, 隔天换 1 次培养液, 当细胞生长

达 80% 汇合时即可传代。

1.3 U0126 处理后细胞膜和胞质成分蛋白的提取

从同一培养瓶中取等量细胞接种于 35 mmΦ 培养皿中, 细胞达 80% 汇合时进行如下处理: 先用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 加入 1.5 ml 1640/BSA 培养液, 再加入不同工作浓度的 U0126 (分别为 0.5、10、20 μmol/L)。置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中 24 h。PBS 洗 3 次, 加 0.25 ml 改良 RIPA 细胞裂解液, 置冰上 10 min。用细胞刮将细胞刮下, 收集至 0.5 ml EP 管中, 用 1 ml 无菌塑料注射器反复抽吸充分裂解细胞。100 000 ×g 离心 10 min, 收集上清即为细胞质成分蛋白, 用于检测该信号传导途径是否被抑制。沉淀再用 0.25 ml 改良 RIPA 细胞裂解液重悬后收集即为细胞膜成分蛋白, 用于检测不同浓度 U0126 作用下细胞膜表面 CAR 蛋白的表达水平。

1.4 Western blotting 检测细胞表面 CAR 蛋白表达

将收集的细胞膜成分蛋白进行 SDS-PAGE, 电泳结束后, 按电转移装置中的操作说明做滤纸-胶膜“三明治”电转移。转膜结束后, 将 PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液(TBS, 0.1% Tween-20) 封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 然后将膜与一抗(稀释度 1:1 000)和二抗作用。一抗有磷酸化的 P42/P44 MAPK 兔多克隆抗体(Thr202/Tyr204)、P42/P44 MAPK 兔多克隆抗体、兔抗 CAR 多克隆抗体(自制^[12]等; 二抗为 HRP-抗兔 IgG (稀释度 1:2 000)。PVDF 膜取出沥干后, 在膜中央加入配制好的 ECL 发光底物液, 均匀覆盖, 室温反应 2 min 后沥干, 保鲜膜包裹, 曝光, 显影, 洗片。

1.5 荧光显微镜检测经 Ad-GFP 感染的肝癌细胞绿色荧光蛋白的表达

收集经 U0126 处理的细胞爬片。次日, 用 Ad-GFP (10 MOI) 感染, 使 Ad 吸附细胞 1 h 后撤去 Ad, 置 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养 24 h。0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 换新鲜培养液后置倒置荧光显微镜下观察, 并用数字显微图像系统(SPOT 软件) 拍照记录。

1.6 FACS 分析 Ad 在肝癌细胞中的感染效率

细胞接种 24 孔培养板 (1 × 10⁵ 个/孔), 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养过夜。用 10 μmol/L U0126 处理(同步骤 1.3), 置孵箱中继续培养 24 h。晚上重复以上步骤再种两孔细胞作为对照, 过夜培养。用 Ad-GFP (10 MOI) 感染, 使 Ad 吸附细胞 1 h 后撤去 Ad, 置 CO₂ 孵箱中继续培养 24 h, 弃去培养液, PBS 洗 3 次, 胰蛋白酶消化, 600 ×g 离心 5 min 收集细胞。加 0.3 ml PBS 重悬细胞后, 以流式细胞仪检测 GFP⁺ 细胞数。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用统计学软件 SPSS 11.5 进行 t 检验, $P < 0.05$, 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 Raf-MEK-ERK 信号转导途径可上调肿瘤细胞膜表面 CAR 的表达

U0126 是 MEK1/2 的抑制剂, MEK1/2 的磷酸化位点分别为 Thr202 和 Tyr204。当 Raf-MEK-ERK 信号转导途径被 U0126 抑制后, 信号级联反应被阻断, MEK1/2 下游的 ERK 就不能通过磷酸化被激活, 因此只能检测到总 ERK, 而非 ERK 的活性形式——磷酸化的 ERK (P-P44/P42 MAPK)。在 MEK1/2 抑制剂 U0126 作用下, SMMC-7721 和 HepG₂ 肝癌细胞株在 Raf-MEK-ERK 信号转导途径被抑制, 细胞膜表面 CAR 的蛋白表达水平呈明显上调趋势(图 1)。

2.2 CAR 表达上调促进 Ad 在肝癌细胞中感染效率提高

经 U0126 处理的细胞, Raf-MEK-ERK 信号转导途径被抑制, 再用 Ad 感染靶细胞。以能表达 EGFP

的非复制型 Ad (Ad-GFP) 来评价 Ad 的感染效率。如图 2 所示, 从左至右依次为转染 Ad-GFP 后 SMMC-7721 肝癌细胞的透射光照片、荧光照片及两者的叠加照片, 图中 GFP⁺ 细胞即可视为 Ad 感染细胞, GFP⁺ 细胞数与感染细胞总数的比例即为 Ad 感染效率。

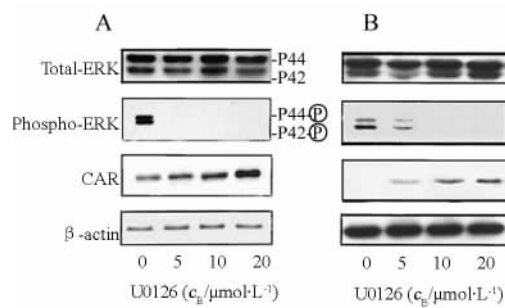


图 1 Western blotting 检测经 U0126 处理后肿瘤细胞表面 CAR 的表达

Fig. 1 Western blotting analysis for CAR expression on cancer cells after treatment with U0126

A: SMMC-7721 cells; B: HepG₂ cells

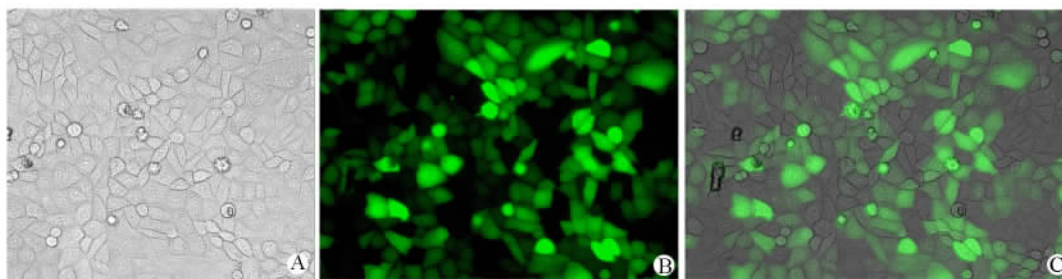


图 2 感染 Ad-GFP 的 SMMC-7721 细胞表面荧光蛋白的表达(×200)

Fig. 2 Expression of fluorescence protein on SMMC-7721 cells infected with Ad-GFP(×200)

A: Transmitted light; B: Fluorescence; C: Overlay

进一步用流式细胞术检测 Ad 感染效率, 发现用相同感染复数(10 MOI)的 Ad-GFP 感染细胞, 经 U0126 处理后的细胞较未处理细胞 GFP⁺ 细胞率明显升高。SMMC-7721 中 Ad 的感染效率从 $(71.65 \pm 6.21)\%$ \rightarrow $(86.54 \pm 5.70)\%$ (图 3); HepG₂ 中 Ad 的感染效率从 $(77.53 \pm 4.62)\%$ \rightarrow $(87.06 \pm 2.83)\%$ (图 4)。平行实验重复 3 次, 差异经 t 检验分析($t = 6.84, P < 0.05$)结果显示, U0126 作用后肝癌细胞表面 CAR 表达明显上调, 致使 Ad 感染效率明显增加。

3 讨论

以重组 Ad 为基础的基因治疗开辟了现代肿瘤

治疗的新篇章。根据 Ad 在治疗中的作用不同分为两大策略:(1) Ad 作为转移治疗性基因的载体。基因治疗的最初目的就是传送特殊基因(例如 *IFN*, *TNF*, *HSV-TK* 基因等)至靶细胞, 以通过该基因的表达达到治疗效果。(2) 选择性复制 Ad 直接裂解具有某种特殊生物学特征的肿瘤细胞, 其代表为 Ad11520 腺病毒, 它能够在抑癌基因 *P53* 缺陷的肿瘤细胞中复制, 但不能在 *P53* 正常的细胞中复制, 从而达到裂解肿瘤细胞同时又不损伤正常细胞的目的。但无论何种策略, Ad 能高效进入靶细胞才是关键, 而这又依赖靶细胞表面 CAR 的表达。因此如果能找到有效调节 CAR 的方法, 就可解决基因治疗过程中 Ad 转导效率低下的难题。

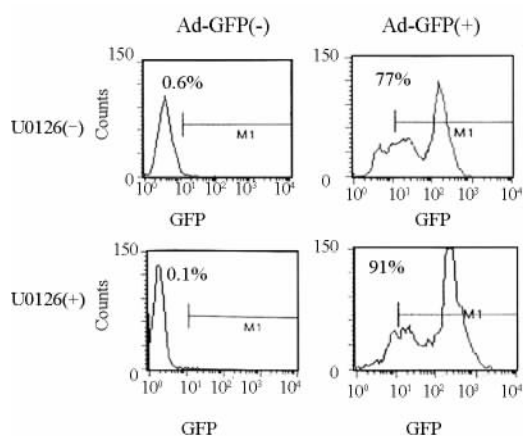


图3 FACS 检测 U0126 处理后 SMMC-7721 中 GFP⁺ 细胞率 (10 MOI)

Fig.3 GFP⁺ cell rate in SMMC-7721 cells infected with Ad-GFP at 10 MOI after treatment with U0126

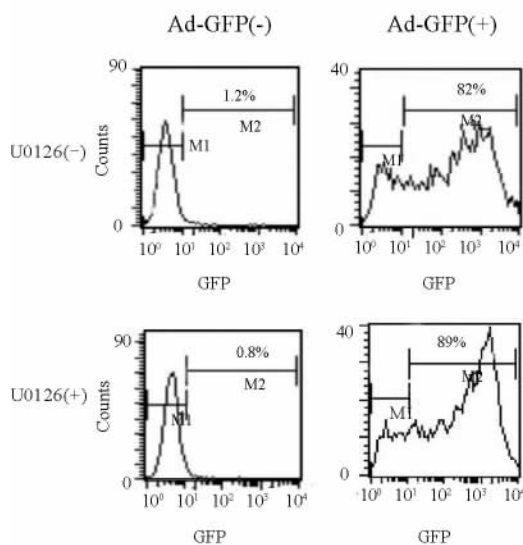


图4 FACS 检测 U0126 处理后 HepG₂ 中 GFP⁺ 细胞率(10 MOI)

Fig.4 GFP⁺ cell rate in HepG₂ cells infected with Ad-GFP at 10 MOI after treatment with U0126

调节 CAR 表达量的方法有很多^[13],本实验从抑制 Raf-MEK-ERK 信号转导途径着手。Raf-MEK-ERK 信号转导途径即 MAPK 途径(mitogen activated protein kinase pathway),丝裂原活化的蛋白激酶途径),主要是由 3 个激酶磷酸化而产生的一系列激酶级联反应。当胞外信号传递给受体 Tyr 蛋白激酶后,就会通过 G 蛋白耦联的 Ras 激活 Raf,Raf 又继续激活其下游的 MEK,后者再激活 ERK。ERK 能使许多调节骨架蛋白及代谢、染色体重排的蛋白与转录因子磷酸化,因此该信号转导途径与细胞的增

殖分化有关。本实验选择通过抑制 Raf-MEK-ERK 信号转导途径而上调 CAR 的表达有如下 4 个理由:(1)已知许多受体 Tyr 蛋白激酶及与 G 蛋白耦联的细胞因子受体都可激活胞内 Ser-Thr 蛋白激酶,即 MAPKs,而 CAR 胞内域也存在 Tyr 磷酸化位点,因此推测 CAR 可能也是这一类的受体,从而与 MAPK 信号转导途径有关。(2)有证据表明 CAR 表达的缺失至少部分是通过癌基因信号传导途径,例如 Ras-激活的 ERK 信号途径。(3)Raf-MEK-ERK 信号途径据报道与许多病毒感染有关(乙型流感病毒,HBV,HSV,HIV-I,SV40,EBV,CMV 及 Ad7 等)。病毒感染靶细胞后可激活该信号途径,后者被活化后又可进一步促进病毒的复制增殖。因此,如果能抑制该信号途径,可上调 CAR 的表达,增加 Ad 载体的易感性从而提高 Ad 转导效率。(4)Raf-MEK-ERK 信号转导途径与肿瘤的发生密切相关。该途径中的激酶在抗癌治疗中本身就是特异性靶点。本实验采用的 MEK 抑制剂 U0126 就是已进入二期临床试验的抗癌药物^[14]。因此选择抑制 Raf-MEK-ERK 信号转导途径而上调 CAR 表达的方法可达到多途径综合治疗肝癌的目的。

本课题使用 MEK 抑制剂 U0126 后,Raf-MEK-ERK 信号转导途径被阻断,其下游的 ERK 不能被激活,因此 Western blotting 只能检测到总 ERK,而非 ERK 的活性形式——磷酸化的 ERK。Western blotting 结果证实了 CAR 的表达至少部分可以通过有效抑制 Raf-MEK-ERK 信号转导途径来调节,且抑制该信号转导途径后 CAR 的蛋白表达水平上调(图 1)。其实不仅如此,本实验通过免疫荧光镜检还观察到 CAR 的亚细胞定位也呈现出从胞质向胞膜表面汇聚的现象(另文发表)。

我国是肝癌的高发病率国家,年发病人数约 35 万,年死亡人数约 32 万,发病率和死亡率均占癌症中的第二位^[15]。而传统的手术、药物治疗或放、化疗对肝癌的疗效均不甚理想,因此国内外专家都在积极寻找并开展多种类型的肝癌基因治疗研究^[16-17]。基于此,本实验选择了两株肝癌细胞株——HepG₂ 细胞株及由我国建系培养的 SMMC-7721 人肝癌细胞株,经荧光镜检及 FACS 证实,经 U0126 作用后肿瘤细胞中 GFP⁺ 细胞率明显升高(图 3,4),说明 Ad 转染效率有明显提高。

本实验通过抑制 Raf-MEK-ERK 信号转导途径的方法上调细胞表面 CAR 的表达,既提高了 Ad 载体的基因感染效率,又提高了 Ad 载体的安全性,为基因治疗过程中促进 Ad 感染效率的方法提供了一

种实践途径。

[参 考 文 献]

- [1] Pietrangelo A, Oude Elferink R, Prieto J, *et al.* Genetics in liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2007, 46(6): 1143-1148.
- [2] Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5 [J]. *Science*, 1997, 275(5304): 1320-1323.
- [3] Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, *et al.* The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses[J]. *J Virol*, 1998, 72(1): 415-419.
- [4] Fechner H, Haack A, Wang H, *et al.* Expression of Coxsackie-adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting *in vivo*, indicating anatomical vector barriers [J]. *Gene Ther*, 1999, 6(9): 1520-1535.
- [5] van't Hof W, Crystal RG. Manipulation of the cytoplasmic and transmembrane domains alters cell surface levels of the Coxsackie-adenovirus receptor and changes the efficiency of adenovirus infection[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(1): 25-34.
- [6] Wang Y, Thorne S, Hannoek J, *et al.* A novel assay to assess primary human cancer infectibility by replication-selective oncolytic adenoviruses[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 351-360.
- [7] Anders M, Hansen R, Ding RX, *et al.* Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the Coxsackievirus and adenovirus receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4): 1943-1948.
- [8] Bauerschmitz GJ, Barker SD, Hemminki A. Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents[J]. *Int J Oncol*, 2002, 21(6): 1161-1174.
- [9] 任鹏康, 韦 芳, 李惠明, 等. 肿瘤细胞表面柯萨奇病毒-腺病毒受体与 5 型腺病毒感染效率的关系[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(3): 209-213.
- [10] Suzuki K, Fueyo J, Krasnykh V, *et al.* A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(1): 120-126.
- [11] Wesseling JG, Bosma PJ, Krasnykh V, *et al.* Improved gene transfer efficiency to primary and established human pancreatic carcinoma target cells via epidermal growth factor receptor and integrin-targeted adenoviral vectors[J]. *Gene Ther*, 2001, 8(13): 969-976.
- [12] 吴 贇, 陈 洪, 黄孝天, 等. 柯萨奇-腺病毒受体基因的原核表达及多克隆抗体制备[J]. *上海第二医科大学学报*, 2004, 24(9): 726-730.
- [13] Hemminki A, Kanerva A, Liu B, *et al.* Modulation of Coxsackie-adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(4): 847-853.
- [14] Murphy DA, Makonnen S, Lassoued W, *et al.* Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006) [J]. *Am J Pathol* 2006, 169(5): 1875-1885.
- [15] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.
- [16] Tommasi S, Pinto R, Pilato B, *et al.* Molecular pathways and related target therapies in liver carcinoma[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(32): 3279-3287.
- [17] Numnum TM, Makhija S, Lu B, *et al.* Improved anti-tumor therapy based upon infectivity-enhanced adenoviral delivery of RNA interference in ovarian carcinoma cell lines[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(1): 34-41.
- [收稿日期] 2008 - 02 - 28 [修回日期] 2008 - 04 - 15
[本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

骨髓龕位内血管周围树突状细胞为 B 细胞存活提供关键信号

骨髓通常被认为是初级淋巴器官,为干细胞提供向淋巴系或髓系分化所必需的独特微环境,即龕位。早期 B 细胞的发育是在骨髓中进行,并经历了一系列的分化阶段,如前祖 B 细胞、祖 B 细胞、前 B 细胞。随后,未成熟 B 细胞离开骨髓迁移到脾脏内继续发育成熟。其中有约四分之一的表达有 IgD 和 IgM 的成熟 B 细胞被发现能够通过再循环回到骨髓内。此外,这些骨髓定居的成熟 B 细胞还能够参与原位的 T 细胞非依赖性体液免疫。从而提示,骨髓也能储存终末分化的 B 细胞,即长期存活浆细胞。T 细胞的发育主要是在胸腺内进行的,但是成熟的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞也能归巢到骨髓,并可在此分化为记忆性 T 细胞,从而构成了骨髓移植的主要障碍。骨髓定居的初始和记忆 T 细胞能够在原位被激活,提示骨髓内可能有专职抗原提呈细胞存在,骨髓除了造血中起到初级淋巴器官的功能,还能够在启动和再刺激适应性免疫反应中提供合适的微环境。

作者通过流式方法首次确定了骨髓定居树突状细胞(bone marrow dendritic cells, bmDCs)的独特表型,原位双光子成像发现这些数量较为稀少的细胞定位于骨髓内血管周围,并包绕成簇状,该部位还共存有成熟 B 细胞和 T 细胞。当条件性敲除 bmDCs 后,再循环到骨髓龕位内的成熟 B 细胞数量明显减少,但是当 B 细胞转基因过表达 Bcl-2 后,其数量就不发生改变。作者进一步发现,骨髓龕位内再循环 B 细胞的存活有赖于 bmDCs 上巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage inhibitory factor, MIF)的表达。

总之,这些结果提示我们骨髓也可成为次级淋巴器官,通过 bmDCs 维持再循环 B 细胞的存活和定位,从而为今后进一步研究骨髓在对抗血源性病原体免疫防御中的独特功能提供了实验支持和理论基础。

[钱 程 摘译, 安华章 审阅. Sapoznikov A, Pewzner-Jung Y, Kalchenko V, *et al.* *Nat Immunol*, 2008, 9(4): 388-395]