

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.013

· 临床研究 ·

## 食管癌患者血清蛋白指纹图谱的检测及食管癌诊断模型的建立

刘丽华<sup>1</sup>, 单保恩<sup>1</sup>, 王士杰<sup>1,2\*</sup>, 孟君<sup>1</sup>, 王玲<sup>1</sup> (1. 河北医科大学第四医院 科研中心/河北省肿瘤研究所, 河北石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院 内窥镜室, 河北石家庄 050011)

**[摘要]** 目的: 利用蛋白质组学基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术检测食管癌患者血清蛋白指纹图谱, 建立食管癌蛋白指纹图谱诊断模型, 探讨其临床应用价值。方法: 收集河北医科大学第四医院 2008 年 5 月至 9 月间胸外科食管癌患者血清 32 例和健康志愿者血清 28 例, 采用弱阳离子交换蛋白质芯片(WCX 磁珠)提纯血清蛋白, MALDI-TOF MS 技术进行血清蛋白质质谱检测, 所得结果用 ZUCI-蛋白芯片数据分析系统进行分析。运用遗传算法结合支持向量机运算建立食管癌蛋白指纹图谱诊断模型; 将 60 例标本随机分成训练组和盲法测试组, 训练组为 21 名食管癌患者和 19 名健康人, 盲法测试组为 11 名食管癌患者和 9 名健康人, 验证诊断模型的特异性和敏感性。结果: 采集食管癌患者和健康对照者的血清蛋白指纹图谱, 经数据对比分析找到 44 个有显著性差异的质荷比峰( $P < 0.05$ ); 从中筛选出差异最显著的 6 个蛋白质荷比峰( $m/z$  分别为 2 210、2 864、6 634、4 068、2 083 和 8 131), 并以此建立食管癌蛋白指纹图谱诊断预测模型; 验证该模型诊断食管癌的特异性为 88.9%、敏感度为 100%。结论: 应用 MALDI-TOF MS 技术检测食管癌患者血清蛋白指纹图谱建立的食管癌蛋白指纹图谱诊断模型在食管癌的诊断中具有较高的敏感度和特异性。

**[关键词]** 食管癌; 基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱; 蛋白指纹图谱; 诊断模型

**[中图分类号]** R735.1; R730.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2009)03-0272-05

## Serum proteomic spectra of esophageal carcinoma patients and a corresponding esophageal carcinoma diagnostic model

LIU Li-hua<sup>1</sup>, SHAN Bao-en<sup>1</sup>, WANG Shi-jie<sup>1,2\*</sup>, MENG Jun<sup>1</sup>, WANG Ling<sup>1</sup> (1. Research Center, Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University; Cancer Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Endoscopy, Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To examine the serum proteomic spectra of human esophageal carcinoma by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), so as to set up a diagnostic model of esophageal carcinoma and to investigate its clinical value. **Methods:** Thirty-two esophageal carcinoma patients and 28 healthy controls were obtained from Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University during May to September of 2008. Serum protein was extracted by weak cation exchange (WCX) protein chip system, and proteomic spectra was examined by MALDI-TOF MS. The obtained data were analyzed by ZUCI-protein chip data analyze system (ZUCI-PCDAS) and an esophageal carcinoma diagnostic model was established by genetic arithmetic (GA) combined support vector machine (SVM). The above 60 samples were randomly divided into training set and blinding test set, with training set including 21 esophageal carcinoma patients and 19 healthy controls and blinding test set including 11 esophageal carcinoma patients and 9 healthy controls, so as to examine the specificity and sensitivity of this diagnostic model. **Results:** Serum proteomic spectra of esophageal carcinoma patients and healthy controls were obtained by MALDI-TOF MS, and  $m/z$  (mass to charge) peaks of 44 differential proteins were obtained after analyzed by ZUCI-PCDAS software package ( $P < 0.05$ ). From which, 6 differential proteins (whose  $m/z$  peaks being 2 210, 2 864, 6 634, 4 068, 2 083 and 8 131, respectively) were selected to establish a diagnostic model of esophageal carcinoma. Specificity and sensitivity of this model in diagnosing esophageal carcinoma

**[基金项目]** 科技部重大科技攻关课题 (No. 2006BAI02A07)。Supported by the Key Science and Technology Research Project of Chinese Technology Administration (No. 2006BAI02A07)

**[作者简介]** 刘丽华 (1972-), 女, 河北省承德市人, 医学博士, 主要从事肿瘤蛋白质组学和肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail: lihuailiu567@hotmail.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: hb.w.sj@163.com

noma was 88.9% and 100%, respectively. **Conclusion:** An esophageal carcinoma diagnostic model has been established from serum proteomic spectra of esophageal carcinoma by MALDI-TOF MS and has high sensitivity and specificity to diagnose esophageal carcinoma.

[ **Key words** ] esophageal neoplasms; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; serum proteomic spectra; diagnostic model

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16(3): 272-276 ]

近年来,蛋白质组学研究取得长足的进展,尤其对实体瘤的分子标志物检测中显示出特有的高灵敏度、特异度;越来越多的研究采用这一技术对肿瘤相关的全部和差异蛋白质进行研究,旨在从细胞水平和整体水平研究肿瘤蛋白质的组成及动态变化规律,从而深入认识个体的各种生理、病理过程,为疾病的诊治寻求高效的分子标志物<sup>[1-3]</sup>。基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是近年出现的一种新的蛋白质组学研究方法,可用于检测临床各种标本,如血清、尿液、脑脊液或各种分泌物,实现了质谱技术用于临床检测的飞跃<sup>[4]</sup>。

食管癌是人类常见恶性肿瘤之一。据 Parkin<sup>[5]</sup> 测算,2002 年全球食管癌新发 462 000 例,其中中国发生 243 854 例,占 52.8%。而中国的食管癌 90% 集中在太行山南部的河北、河南、山西三省交界处的高发区<sup>[6]</sup>。目前,食管癌的主要诊断手段仍然依赖于胃镜检查,其成本高、患者依从性差,因此寻找高效的分子标志物对食管癌的诊治有重要意义。本研究利用 MALDI-TOF MS 技术平台,对食管癌患者及正常对照者血清进行检测,并建立区分两者的蛋白质谱模型,探讨其在食管癌诊断中的可行性及其应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本实验中用于蛋白质组学研究的 32 例食管癌患者血清标本全部来自 2008 年 5 月至 9 月间河北医科大学第四医院胸外科,其中男 18 例、女 14 例,年龄 44~72 岁,平均年龄(57.5±8.9)岁,术前均未进行放、化疗;所有标本均经病理证实为食管鳞状细胞癌,无淋巴结转移,根据 AJCC/UICC 食管癌 TNM 分期标准<sup>[7]</sup>均为 I~II 期。正常对照者 28 例,为健康体检患者,男 16 例、女 12 例,年龄 40~68 岁,平均年龄(55.3±7.6)岁。所有研究对象都签署知情同意书,并报医院伦理委员会审批同意。患者全部在清晨空腹状态下,聚丙烯干燥管采血 3

ml,室温静置 1 h,然后 2 000 r/min 离心 5 min,取血清再次 3 000 r/min 离心 5 min,分装后 -80 °C 保存,避免反复冻融对小分子蛋白或多肽的影响。

### 1.2 试剂和仪器

为去除血清中高丰度蛋白的影响,本研究利用液体蛋白芯片(又称磁珠,其表面经预处理,捕获蛋白的面积远大于固体蛋白芯片)进行血清蛋白提纯。分离用成套试剂购自德国 Bruker Daltonics 公司,磁珠直径小于 1 μm,选用弱阳离子(weak cationic exchanger, WCX)螯合磁珠进行分析。分析中所用的三氟乙酸、乙腈、乙醇、丙酮等均为色谱纯,购自 Sigma 公司。标准血清购自 Sigma 公司,标准品为 preptide 和 protein 混合物,由德国 Bruker Daltonics 公司提供。质谱仪为 Autoflex III 型,为德国 Bruker Daltonics 公司产品。

### 1.3 采用液体蛋白芯片提取血清蛋白

血清冰浴下解冻,取 5 μl 加入已装好结合缓冲液(BS)和 WCX 磁珠的样品管中,置磁架上分离 5 min;仔细吸去悬浮的液体,用磁珠清洗缓冲液(WS)清洗 3 次,每次清洗在磁珠分离器前后相邻两孔间反复移动样品管 10 次(注意磁珠在管中的运动),液体应清澈,完全吸去悬浮的液体并避免吸走磁珠;加入 5 μl 磁珠洗脱缓冲液(ES),溶解贴壁的磁珠;放入磁珠分离器使磁珠贴壁 2 min;将上清液移入干净的 0.5 ml 样品管,加入 5 μl 稳定缓冲液(SS),小心吸打混匀即可用于质谱分析。

### 1.4 MALDI-TOF MS 检测的质量控制及其标准

每个标准品可对其周围的 4 个样品蛋白分子量进行校正,采用同一标准品结晶靶点,不同结晶点多点采集,累加后获得标准品图谱,校正平均分子量偏差应小于 0.01%。采用标准血清对整个实验流程进行质量控制,每 7 个样本与 1 个标准血清匹配同时进行实验,采集的标准血清图谱与数据库中已有的对应 WCX 磁珠相同采集方法的标准血清数据比较,计算变异系数。

### 1.5 MALDI-TOF MS 技术检测食管癌患者血清蛋白指纹图谱

所有样品随机点样于 384 普通靶,先点 1 μl 样

品,室温放干后,再点 1  $\mu$ l 基质(3 mg/ml CHCA, 50% ACN, 2% TFA),室温放干后上机检测。质谱数据采集方法采用 ClinProt 线性阳离子模式,参数设置如下:第一离子源 20.00 kV,第二离子源 18.90 kV,检测范围为相对分子质量 1 000 ~ 12 000。每个样品重复点 3 个靶点,同一靶点的不同结晶点进行多点采集,每个点采集 50 shots,选 8 个不同位置累计 400 shots。为获得更好的质谱图,先选择高能量(8% ~ 10%)激光轰击,然后换成低激光能量采集图谱。

1.6 质谱检测数据的分析与蛋白指纹图谱诊断模型的建立和验证

利用 ZUCI-蛋白芯片数据分析系统(ZUCI-Protein chip data analyze system, ZUCI-PCDAS),对采集图谱进行均一化处理,去噪平滑,过滤信噪比小于 2 的蛋白峰,对每个蛋白质荷比峰做 Wilcoxon 秩和检验,筛选出有差异的质荷比峰。通过遗传算法结合支持向量机运算建立食管癌蛋白指纹图谱诊断模型,以留一法进行交叉验证。所有的样本随机划分,2/3 样本作为训练组,1/3 样本作为盲法测试组,并将训练组样本再随机分出 1/3 进行交叉验证,经软件包运算后计算每个样本的平均预测值,并计算出灵敏度和特异度。

1.7 统计学处理

对初步筛选出的蛋白质荷比峰进行 *t* 检验,偏态分布数据用 Mann-Whitney 检验,  $P < 0.05$  有显著性差异。

2 结果

2.1 MALDI-TOF MS 质量控制标准品和标准血清检测结果

作为实验质量控制的标准品含有 11 个多肽,标准品 MALDI-TOF MS 检测图谱如图 1,校正平均分子量偏差小于 0.01%。作为实验流程质量控制的标准血清质谱图采集后,与数据库中已有的对应 WCX 磁珠相同采集方法的标准血清数据比较,变异系数(CV) < 30%。

2.2 食管癌患者血清蛋白质荷比峰的筛选

食管癌患者和健康对照的血清样本分别结合到 WCX 磁珠上,用 Autoflex III 型质谱仪检测,在相对分子质量 1 000 ~ 20 000 范围内,共检测到 138 个蛋白质荷比峰。对每一个质荷比峰做食管癌与健康对照的成组数据平均数比较,其中 44 个差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。 *P* 值越小,说明在两组中差异越显著,单个质荷比峰的分组能力越强。表 1 为 6 个典型的

蛋白质质荷比峰。与健康志愿者比较, *m/z* 为 2 210、2 864、6 634 和 2 083 的 4 个峰在食管癌患者中高表达,而 *m/z* 为 4 068 和 8 131 2 个峰在食管癌患者中低表达, *m/z* 峰 2 210 和 8 131 如图 2 和 3 所示。

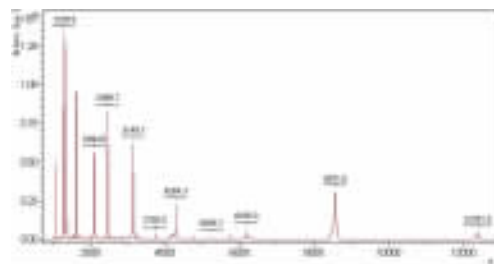


图 1 MALDI-TOF MS 检测蛋白多肽标准品质谱图谱  
Fig. 1 Mass spectra of peptide and protein standard detected by MALDI-TOF MS

表 1 食管癌患者与健康对照者中 6 个差异蛋白质质荷比峰的比较

Tab. 1 Comparison of 6 differential protein *m/z* peaks between esophageal carcinoma patients and healthy controls

<i>m/z</i> peak	Healthy control	Esophageal carcinoma patient	<i>P</i> value
2 210	8.38 ± 1.82	1 495.07 ± 139.17	0.000 09
2 864	313.61 ± 317.82	885.60 ± 449.03	0.000 10
6 634	64.32 ± 47.51	421.21 ± 287.99	0.000 23
2 083	63.13 ± 14.61	1 223.94 ± 390.45	0.001 32
4 068	951.67 ± 689.94	225.78 ± 98.50	0.000 87
8 131	653.67 ± 183.82	16.58 ± 4.24	0.008 51

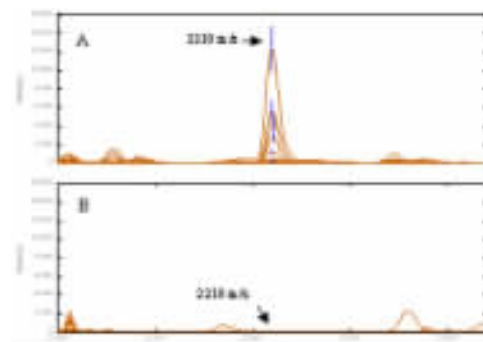


图 2 质荷比(*m/z*)峰为 2 210 的蛋白在食管癌患者和健康对照者中的表达  
Fig. 2 Comparison of differential protein, which *m/z* peak is at 2 210, between esophageal carcinoma patients and healthy controls  
A: Esophageal carcinoma patient; B: Healthy control

### 2.3 食管癌蛋白指纹图谱诊断模型的特异性和敏感性

利用 ZUCI-PCDAS 高通量蛋白质数据分析软件包,通过遗传算法结合支持向量机运算,选择  $m/z$  为 2 210、2 864、6 634、4 068、2 083 和 8 131 的 6 个蛋白质荷比峰建立食管癌蛋白指纹图谱诊断预测模型,进行训练和测试。训练组为 21 名食管癌患者和 19 名健康者,盲法测试组为 11 名食管癌患者和 9 名健康者。经盲法交叉测试,11 例食管癌患者全部正判,9 名健康者中有 8 名正判、1 名误判。盲法测试结果显示,蛋白指纹图谱诊断模型检测食管癌的特异性为 88.9%,敏感性为 100%。

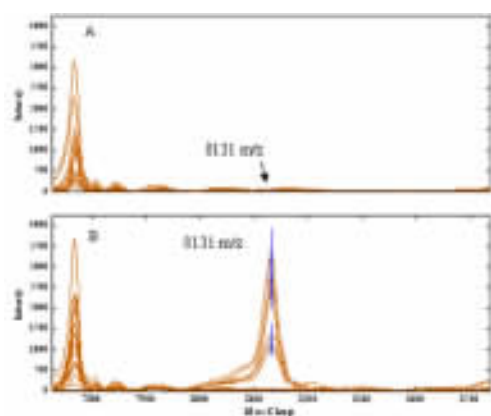


图3 质荷比 ( $m/z$ ) 峰为 8 131 的蛋白在食管癌患者和健康对照者中的表达

Fig.3 Comparison of differential protein, which  $m/z$  peak is at 8 131, between esophageal carcinoma patients and healthy controls

A:Esophageal carcinoma patient; B:Healthy control

## 3 讨论

食管癌作为消化系统常见的恶性肿瘤,长期以来严重威胁着人们的身体健康。临床上,多数食管癌患者到医院就诊时已属中、晚期,虽经联合治疗平均 5 年生存率一直徘徊在 10% 左右;而早期食管癌患者及癌前病变患者经内镜下行黏膜下切除术,5 年生存率达 95% 以上。目前,食管癌的诊断依赖于内镜和病理学检查,存在操作复杂、成本高、对人体侵害大、检出率低、假阳性率高等缺陷。现有的食管癌血清标志物如鳞状上皮细胞癌抗原 (SCCA)、癌胚抗原 (CEA) 和糖类抗原 (CA19-9) 等多存在灵敏度和特异度不能兼顾的问题,即使多种指标联合检测也只能对临床分期提供参考,不能对食管癌早期发现与早期诊断提供帮助。因此,寻找敏感度高、特

异度高的食管癌肿瘤标志物应用于早期诊断,对提高患者生存率有重要意义。

MALDI-TOF-MS 是当今最先进的蛋白质组学技术之一<sup>[3,8]</sup>。以这一技术开发的系列液体蛋白质芯片可以非特异性结合被测样本中的各种蛋白质,去除高丰度蛋白,而且其结合面积远大于以往的固体蛋白芯片,克服了传统二维凝胶电泳难以解决的诸多问题:如膜蛋白的分离,强酸性、强碱性蛋白的分离,低分子量、低丰度蛋白的检测等,为临床筛查肿瘤标志物提供了理想的平台,在发现疾病相关蛋白和后续蛋白鉴定方面具有光明的前景。目前,国外学者应用此项技术检测卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌及转移性甲状腺癌等恶性肿瘤患者的血清标本,建立相应的肿瘤蛋白质指纹图谱诊断模型,其敏感度和特异度均比以往的肿瘤标志物高<sup>[9-12]</sup>。有利于早期发现、早期诊断、早期治疗恶性肿瘤,降低其发病率及病死率。对食管癌的蛋白质指纹图谱诊断模型研究国内外报道较少。国内学者<sup>[13-14]</sup>采用 CM10 蛋白芯片及 IMAC3 芯片和表面增强激光解吸电离质谱技术 (SELDI-MS) 检测食管癌患者和健康人血清,建立食管癌早期筛查模型并筛选出 2 种与食管癌转移密切相关蛋白。国外学者 Breton 等<sup>[15]</sup>运用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS 的方法检测食管癌发生发展过程中不同阶段的 10 个细胞株,表明在 Barrett's 食管炎和食管癌中 cathepsin D、aldo-keto reductases 1C2 调节异常,这些蛋白质通过影响细胞凋亡、胆汁酸转移和维生素 A 代谢途径参与疾病的发生。Millar 等<sup>[16]</sup>在内镜检查或内镜超声的同时采集食管癌患者血清,用 C8 磁珠分选后进行质谱分析 (MALDI-TOF),找到 9 个有意义的差异峰。

本研究运用 MALDI-TOF-MS 的方法对临床上 I ~ II 期散发食管癌进行研究,在严格的质量控制下进行 WCX 液体蛋白芯片结合洗脱并采集质谱数据。但是应用蛋白质组学研究后的另外一个问题是大量数据的处理。本研究选用 ZUCI-蛋白芯片数据分析系统进行高通量数据处理,在食管癌和健康对照人群的血清样本中筛选出差异蛋白质荷比峰。并应用遗传算法结合支持向量机运算建立蛋白质指纹图谱诊断模型,经过大量计算机运算和统计学分析,筛选出最优肿瘤标志物组合,确保了诊断模型的准确性和严谨性,优于以往建模方案。本诊断模型选择 6 个蛋白质峰,检测食管癌的特异度为 88.9%、敏感程度 100%。此种联合检测模式,在提高敏感度的同时,保证了较高的特异度。本课题组将进一步增加病例数验证实验的重复性和可靠性,并利用

液相色谱-串联质谱技术对诊断模型中的差异质荷比峰进行分离纯化和鉴定,以尽早筛查出灵敏度好、特异性高的食管癌标志物,应用于临床。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Srinivas PR, Verma M, Zhao Y, *et al.* Proteomics for cancer biomarker discovery[ J ]. *Clin Chem*, 2002, 48( 8 ): 1160-1169.
- [ 2 ] Etzioni R, Urban N, Ramsey S, *et al.* The case for early detection [ J ]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3( 4 ): 243-252.
- [ 3 ] Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research[ J ]. *Clin Biochem*, 2004( 11 ), 37: 943-952.
- [ 4 ] Villanueva J, Philip J, Entenberg D, *et al.* Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry[ J ]. *Anal Chem*, 2004, 76( 6 ): 1560-1570.
- [ 5 ] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002[ J ]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55( 2 ): 74-108.
- [ 6 ] 温登瑰, 王士杰. 涉县、林州、阳城、磁县上消化道癌集中高发分析[ J ]. *中国肿瘤*, 2008, 17( 12 ): 1004-1006.
- [ 7 ] 王士杰, 王其彰. 食管癌与贲门癌[ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 2008, 189-197.
- [ 8 ] Pusch W, Flocco MT, Leung SM, *et al.* Mass spectrometry based clinical proteomics[ J ]. *Pharmacogenomics*, 2003, 4( 4 ): 463-476.
- [ 9 ] Oh JH, Nandi A, Gurnani P, *et al.* Proteomic biomarker identification for diagnosis of early relapse in ovarian cancer[ J ]. *J Biinform Comput Biol*, 2006, 4( 6 ): 1159-1179.
- [ 10 ] Kojima K, Asmellash S, Klug CA, *et al.* Applying proteomic-based biomarker tools for the accurate diagnosis of pancreatic cancer[ J ]. *J Gastrointest Surg*, 2008, 12( 10 ): 1683-1690.
- [ 11 ] Nagalla SR, Canick JA, Jacob T, *et al.* Proteomic analysis of maternal serum in down syndrome: identification of novel protein biomarkers[ J ]. *J Proteome Res*, 2007, 6( 4 ): 1245-1257.
- [ 12 ] Villanueva J, Martorella AJ, Lawlor K, *et al.* Serum peptidome patterns that distinguish metastatic thyroid carcinoma from cancer-free controls are unbiased by gender and age[ J ]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5( 10 ): 1840-1852.
- [ 13 ] 徐淑永, 张琼, 张朝霞, 等. 新疆维吾尔族食管癌患者血清蛋白指纹图谱诊断模型的建立[ J ]. *新疆医科大学学报*, 2008, 31( 2 ): 154-156.
- [ 14 ] 冯笑山, 王立东, 单探幽, 等. 食管癌淋巴结转移的蛋白质组学[ J ]. *郑州大学学报: 医学版*, 2007, 42( 3 ): 397-399.
- [ 15 ] Breton J, Gage MC, Hay AW, *et al.* Proteomic screening of a cell line model of esophageal carcinogenesis identifies cathepsin D and aldo-keto reductase 1C2 and 1B10 dysregulation in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[ J ]. *J Proteome Res*, 2008, 7( 5 ): 1953-1962.
- [ 16 ] Millar, Timothy P, Karpievitch, *et al.* Identification of human esophageal cancer sub-types by serum protein analysis using MALDI-TOF mass spectroscopy[ J ]. *Gastroenterology*, 2006, 130( 4 ): 272.
- [ 收稿日期 ] 2009-03-08 [ 修回日期 ] 2009-04-15  
[ 本文编辑 ] 韩丹

## · 科技动态 ·

### 专职性的 CD4<sup>+</sup> 记忆细胞以静息状态定位在骨髓中

免疫记忆细胞在生成之后发生自稳性增殖以维持机体免疫记忆,这个过程发生在何处一直是免疫学研究的一个关注点。记忆性 CD8 和 B 细胞在生成后定位在骨髓中,依赖于周围环境中的生长因子存活和增殖。传统观念认为,记忆性 CD4<sup>+</sup> 细胞生成后一直在外周循环,以便能在第一时间发现外周可能出现的抗原并将其清除。而新近研究表明,抗原特异性的记忆性 CD4<sup>+</sup> 细胞在生成之后主要定居在骨髓中,在一种表达 IL-7 的骨髓基质细胞的龛位中静息。

该研究首先设计了 4 个针对不同抗原的免疫反应模型,刺激小鼠后在不同的时间点检测不同组织中针对这些抗原特异性 CD4<sup>+</sup> 细胞的数目,结果发现,在免疫反应的初期,这群细胞主要存在于脾脏和外周的淋巴结中,而在免疫反应后期,大部分的细胞都转移至骨髓中。在针对于 LCMV 来源的 GP 肽的反应模型中,检测至免疫反应后的 134 d,发现有 80% 的记忆性 CD4<sup>+</sup> 细胞定居在骨髓中。与来自于脾脏的记忆性( CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>-</sup> )CD4<sup>+</sup> 细胞不同,骨髓中的( CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>-</sup> )CD4<sup>+</sup> 高表达 Ly6C。这个迁移的过程依赖于 CD4<sup>+</sup> 细胞上 integrin $\alpha$  2 的表达。

进一步研究发现,相对于脾脏的( CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>-</sup> )CD4<sup>+</sup> 细胞,位于骨髓的这群细胞在基因表达和细胞增殖上都是不活跃的,说明这群细胞处于一种静息的状态。有 95% 的抗原特异性记忆性细胞与可表达 VCAM<sup>+</sup> 的骨髓基质细胞共定位,这种基质细胞表达记忆性 CD4<sup>+</sup> 细胞存活所必需的生长因子 IL-7。该研究估计骨髓可为  $5 \times 10^6$  个记忆性 CD4<sup>+</sup> 细胞提供生存的龛位。

位于骨髓的记忆性 CD4<sup>+</sup> 细胞相对于脾脏的记忆性 CD4<sup>+</sup> 细胞在活化后能更快更强地表达细胞因子和 CD40L。该研究最后证明只有来自于骨髓的高表达 Ly6C 的记忆性的( CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>-</sup> )CD4<sup>+</sup> 细胞才能辅助 B 细胞产生高亲和力的抗体,而来自于脾脏当中的( CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>-</sup> )CD4<sup>+</sup> 细胞不具有这种功能。

作者认为,记忆性 CD4 细胞主要以静息状态定位在骨髓中表达 IL-7 的基质细胞龛位中,在再次免疫应答的过程中能被迅速地活化,以辅助 B 细胞产生高亲和力的抗体。

[ 蒋雪玉 摘译,郭振红 审阅. Tokoyodo K, Zehentmeier S, Hegazy AN, *et al.* *Immunity*, 2009, 30( 5 ): 721-730 ]