

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.005

· 基础研究 ·

阿糖胞苷增强白血病细胞 B7 分子表达及促进双功能抗体对靶细胞的杀伤

杨 铭, 范冬梅*, 高瀛岱, 赵英新, 周 圆, 许元富, 纪 庆, 王金宏, 熊冬生, 杨纯正(中国医学科学院北京协和医学院 血液学研究所 血液病医院 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

[摘要] 目的: 研究阿糖胞苷(cytarabine, Ara-C)对白血病细胞共刺激分子 B7 表达的影响, 以及联合双功能抗体 anti-CD3/anti-Pgp 介导 T 细胞对耐药白血病细胞的杀伤作用。方法: 应用流式细胞术检测白血病细胞株 K562 和多药耐药白血病细胞株 K562/A02 细胞经 Ara-C 刺激不同时间后 B7-1、B7-2 分子的表达, RT-PCR 方法检测 B7-1 mRNA、B7-2 mRNA 的表达, MTT 法检测经 Ara-C 刺激的 K562 和 K562/A02 细胞对 T 淋巴细胞增殖的影响。CytoTox 96 非放射性细胞毒性分析检测 Ara-C 联合 anti-CD3/anti-Pgp 微型双功能抗体对人外周血淋巴细胞杀伤 K562 和 K562/A02 靶细胞的影响。结果: 经 Ara-C 刺激的 K562 和 K562/A02 细胞 B7-1、B7-2 分子的表达较对照组明显升高; MTT 结果显示, 经 Ara-C 刺激的 K562 和 K562/A02 细胞能促进 T 淋巴细胞增殖; Ara-C 联合 anti-CD3/anti-Pgp 双功能抗体在 0.39:1~25:1 效靶比范围内, 随着效靶比的升高, 介导 T 淋巴细胞对 K562 和 K562/A02 细胞的杀伤率随之提高, 对高表达 Pgp 的耐药 K562/A02 细胞尤为明显。结论: Ara-C 可上调白血病细胞 B7 分子的表达, 从而增强 anti-CD3/anti-Pgp 双功能抗体介导的 T 细胞对靶细胞的体外杀伤作用。

[关键词] 阿糖胞苷; 白血病细胞; anti-CD3/anti-Pgp; B7-1; B7-2; T 淋巴细胞;

[中图分类号] R730.3; R733.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0447-05

Cytarabine enhances B7 expression on leukemic cells and promotes cytotoxic effect of bispecific antibody against target cells

YANG Ming, FAN Dong-mei*, GAO Ying-dai, ZHAO Ying-xin, ZHOU Yuan, XU Yuan-fu, JI Qing, WANG Jin-hong, XIONG Dong-sheng, YANG Chun-zheng (State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of cytarabine (Ara-C) on B7 expression on leukemia cells, and to study the effects of anti-CD3/anti-Pgp bispecific antibody on the cytotoxicity of T cells against drug-resistant leukemia cells. **Methods:** The expressions of B7-1 and B7-2 on K562 (leukemia cells) and K562/A02 cells (drug-resistant leukemia cells) were examined by flow cytometry after treatment with Ara-C for different periods. B7-1 and B7-2 mRNA expressions in K562 and K562/A02 cells were detected by RT-PCR. The proliferation of T lymphocytes stimulated by Ara-C-treated K562 and K562/A02 cells was detected by MTT assay. *In vitro* cytotoxicity of T lymphocytes against K562 and K562/A02 cells was analyzed using CytoTox 96 nonradioactive method after treatment with anti-CD3/anti-Pgp bispecific antibody and Ara-C. **Results:** Compared with untreated cells, B7-1 and B7-2 expression on Ara-C-treated K562 and K562/A02 cells was significantly enhanced. MTT results showed that Ara-C-treated K562 and K562/A02 cells increased the proliferation of T lymphocytes. Ara-C combined with anti-CD3/anti-Pgp bispecific antibody enhanced the cytotoxicity of T cells against K562 and K562/A02 target cells (T: target, 0.39:1-25:1), especially when against Pgp positive drug-resistant K562/A02 leukemia cells. **Conclusion:** Ara-C can upregulate B7 expression on leukemia cells, and when combined with anti-CD3/anti-Pgp bispecific antibody it can enhance the cytotoxicity of T cells against target leukemia cells *in vitro*.

[Key words] cytarabine; leukemia cell; anti-CD3/anti-Pgp; B7-1; B7-2; T lymphocyte

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 447-451]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30701012); 天津市科技计划资助项目(No. 08ZCKFSH04100); 天津市应用基础研究计划资助项目(No. 07JCZDJC04900)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30701012); the Science and Technology Program of Tianjin (No. 08ZCKFSH04100); the Basic Application Research Program of Tianjin (No. 07JCZDJC04900)

[作者简介] 杨 铭(1970~), 男, 天津市人, 副主任技师, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: tjfdm@yahoo.com

T 细胞激活途径中除抗原肽-MHC 分子复合物与 TCR 的相互作用, 抗原提呈细胞与 T 细胞之间的共刺激分子通路对于 T 淋巴细胞免疫活性的调节也发挥着重要作用^[1]。虽然肿瘤细胞表达肿瘤特异性抗原, 但并不是具备了肿瘤抗原就能激发机体抗肿瘤免疫。研究^[2]证实多数肿瘤细胞不表达 B7 共刺激分子, 导致 T 细胞无应答。诱导肿瘤细胞表面高表达作为第二信号的 B7 共刺激分子, 可提高对肿瘤的特异性免疫反应。

抗 CD3 和抗肿瘤抗原的微型双功能抗体如 anti-CD3/anti-Pgp、anti-CD3/anti-CD20 和 anti-CD3/anti-CD19^[3-4]等能够将活化的淋巴细胞靶向至肿瘤细胞, 从而在体外和体内介导特异性杀伤作用, 是一种很有潜力的治疗恶性肿瘤的方法。但是, 采用微型双功能抗体存在对肿瘤生长的控制难于持久以及停药后复发的问題, 这是多种因素影响的结果, 然而可以确信, 淋巴细胞作为抗肿瘤免疫过程中的主要效应细胞, 其激活程度以及活化后的状态是关键的因素之一。目前, 共刺激分子 B7 对淋巴细胞的活化作用日益受到关注, 许多研究证明调节一种或多种共刺激分子信号能够改善效应细胞的功能并最终影响抗肿瘤免疫效果。本研究观察阿糖胞苷 (cytarabine, Ara-C) 刺激耐药白血病细胞 B7 的表达, 并且联合 anti-CD3/anti-Pgp 微型双功能抗体, 观察体外介导细胞毒性 T 细胞对靶细胞的特异性杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与细胞株

Ara-C 购自 Pharamacin 公司, Mouse Anti-Human CD86 PE 标记抗体、Anti-human CD80 FITC 标记抗体、Mouse IgG1 PE 标记抗体、Mouse IgG1 FITC 标记抗体均购自 BD 生物技术有限公司。重组人白介素-2 (IL-2) 购自北京远策药业有限责任公司, Cyto-Tox 96 非放射性细胞毒性分析 (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay) 试剂盒购自 Promega 生物技术有限公司。MTT 购自 Sigma 公司。

K562/A02 细胞由本实验室用多柔比星长期诱导白血病 K562 细胞建立的一株多药耐药细胞株^[5], 在培养过程中不断加入多柔比星以维持其耐药性, 实验前停加多柔比星, 悬浮培养于含 10% 的灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

1.2 抗体的表达与纯化

Anti-CD3/anti-Pgp 微型双功能抗体由本实验室构建、表达和纯化^[6], 以 13 个氨基酸的 E-tag 作为

鉴定和纯化标记, 通过 Pharmacia 公司的 anti-E-tag 亲和层析柱纯化后纯度 > 95%, 纯化的蛋白采用 Pierce 公司的 BCA 蛋白测定试剂盒测定浓度。

1.3 流式细胞仪检测经 Ara-C 刺激后 K562 和 K562/A02 细胞 B7-1、B7-2 的表达

取对数生长期的 K562 和 K562/A02 细胞, 调整细胞密度至 1×10^6 /ml, 接种于 24 孔细胞培养板中, 同时加入终浓度为 0.25 μ mol/L 的 Ara-C 分别作用 0、24、48 和 72 h, 对照组加入等体积的 PBS。收集细胞, 用预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 分别加入 PE 标记的 CD86 抗体和 FITC 标记的 CD80 抗体, 同型对照为 Mouse IgG1 PE 标记抗体和 Mouse IgG1 FITC 标记抗体, 按照说明书操作步骤进行, 用预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 于流式细胞仪上检测, 激发光为氩离子激光 488 nm, 每个样品计数 10 000 个活细胞数, 其结果用 Cell Quest 软件分析。

1.4 RT-PCR 检测经 Ara-C 刺激后 K562 和 K562/A02 细胞 B7-1、B7-2 mRNA 的表达

取对数生长期的 K562 和 K562/A02 细胞, 分别加入终浓度为 0.25 μ mol/L 的 Ara-C 作用 72 h, 以未加 Ara-C 刺激的细胞作为对照组。收集细胞按照 TRIzol 说明书操作步骤提取细胞的总 RNA, 取适量的 DEPC 水溶解沉淀, 紫外分光光度计定量。分别各取 10 μ g 总 RNA 进行逆转录, 引物由 Invitrogen 生物技术有限公司合成, 扩增条件为: 94℃、40 s, 52℃、30 s, 72℃、1 min, 30 个循环, 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 扩增产物分别为 558 bp 和 588 bp, 紫外分析透射仪观察并拍照。以 β -actin 为内对照。引物序列设计如下: CD80, 上游引物 5'-TGCTGTCTGTCATTGCTGGGAACT-3', 下游引物 5'-CCCAGGTGAAGTCCTCTGACACGTG-3', CD86, 上游引物 5'-GGGGATCCATGGGCTTGGCAATCCTTAT-3', 下游引物 5'-TCGGGTGACCTTGCTTAGACGTGCAGG-3'。

1.5 靶细胞与效应细胞的制备

将浓度为 0.25 μ mol/L 的 Ara-C 与 1×10^5 /ml 的 K562 和 K562/A02 细胞, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中孵育培养 72 h。收集细胞, 离心, 以 $2\ 000 \times g$ 离心 10 min, 用锥虫蓝拒染法计数活细胞数, 用完全培养基调整细胞密度至 2×10^5 /ml 作为靶细胞备用。

采用玫瑰花环形成法分离白膜中的 T 淋巴细胞, 用 BD 公司的 anti-CD3 FITC 抗体标记, 其阳性率 > 95% 方可用于实验。用完全培养基调整 T 细胞密度至 3×10^6 /ml, 接种于培养瓶中, 而后加入 IL-2 (50 U/ml), 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培

养 48 h,收集细胞,离心,以 $2\ 000 \times g$ 离心 10 min,用锥虫蓝拒染法计数活细胞数,用完全培养基调整细胞密度至 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 作为效应细胞备用。

1.6 MTT 法检测淋巴细胞的增殖

将上述制备好的靶细胞和效应细胞,按照不同的效靶比 0.62:1 ~ 40:1 接种于 96 孔细胞培养板中,于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中孵育培养 72 h。每组 3 个复孔,重复 3 次。实验结束前,每孔加入 20 μl MTT,继续培养 4 h 后,离心,弃上清,每孔加入 150 μl DMSO,振荡混匀,于酶标仪上检测其光密度值。

1.7 LDH 法检测 Ara-C 联合 anti-CD3/anti-Pgp 微型双功能抗体介导 T 细胞对靶细胞的杀伤

采用 CytoTox96 非放射性细胞毒试剂盒检测淋巴细胞对靶细胞的杀伤作用。于 96 孔细胞培养板中分别加入上述制备好的靶细胞和效应细胞。靶细胞 K562 和 K562/A02,每孔 $2 \times 10^4/100\ \mu\text{l}$,同时加入 anti-CD3/anti-Pgp 微型双功能抗体 400 ng/ml,按照不同的效靶比(E:T)0.39:1 ~ 25:1 分别加入效应细胞,同时按照操作说明设立对照组,每组 3 复孔,重复 3 次。于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续孵育培养 4 h 后,取上清,按照操作步骤先后加入反应底物和终止液。酶标仪测定 D_{492} 值后,按下式计算杀伤百分率:细胞杀伤率(%) = (实验组 - 效应细胞自发释放 - 靶细胞自发释放) / (靶细胞最大释放 - 靶细胞自发释放) $\times 100\%$ 。

1.8 统计学处理

应用 SPSS11.0 软件进行分析,两组均数比较应用 Student-*t* 检验,多组均数比较应用 One-Way ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ara-C 刺激后 K562 和 K562/A02 细胞 B7-1、B7-2 的表达

Ara-C 作用于 K562 和 K562/A02 细胞 72 h 后与对照组相比,B7-1、B7-2 分子均有不同程度的上调,B7-2 上调幅度较大。以时间为观察点,0.25 $\mu\text{mol/L}$ Ara-C 刺激 K562 和 K562/A02 细胞,在 0 h 时均未出现 B7-1、B7-2 分子的表达,24 h 时出现 B7-1、B7-2 分子的上调,72 h 时阳性细胞和平均荧光强度均达最大值(表 1)。可见 Ara-C 上调 B7-1、B7-2 分子表达具有时间-效应依赖性。

2.2 Ara-C 刺激后 K562 和 K562/A02 细胞 B7-1、B7-2 分子 mRNA 的表达

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示,Ara-C 刺激

的 K562 和 K562/A02 细胞分别在 558 bp 和 588 bp 处可见清晰条带,而未经 Ara-C 刺激的 K562 和 K562/A02 细胞无条带(图 1)。说明 Ara-C 刺激的 K562 和 K562/A02 细胞可诱导 B7-1 和 B7-2 mRNA 的表达。

表 1 Ara-C 促进 K562 和 K562/A02 细胞 B7-1、B7-2 的表达
Tab. 1 Ara-C increased B7-1 and B7-2 expression in K562 and K562/A02 cells

Time(t/h)	K562		K562/A02	
	B7-1	B7-2	B7-1	B7-2
Con	5.41	3.76	0.90	1.34
0	7.31	10.37	1.44	1.25
24	39.38	25.50	9.47	5.88
48	54.49	42.71	11.13	16.47
72	69.26	50.66	31.94	82.73

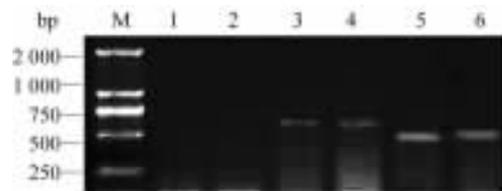


图 1 Ara-C 促进 K562 和 K562/A02 细胞中 B7-1、B7-2 mRNA 的表达

Fig. 1 Ara-C increased B7-1 and B7-2 mRNA expression in K562 and K562/A02 cells

M: DNA marker; 1: K562 cells; 2: K562/A02 cells; 3: B7-2 mRNA in K562 treated with Ara-C; 4: B7-2 mRNA in K562/A02 cells treated with Ara-C; 5: B7-1 mRNA in K562 cells treated with Ara-C; 6: B7-1 mRNA in K562/A02 cells treated with Ara-C

2.3 Ara-C 刺激的 K562 和 K562/A02 细胞对 T 淋巴细胞的促增殖作用

经 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Ara-C 刺激的 K562 和 K562/A02 细胞对 T 淋巴细胞的增殖具有明显的刺激作用,在低效靶比(0.62:1、1.25:1 及 2.5:1)时,T 细胞的增殖较慢,但随着效靶比由 5:1 升高到 40:1 时,其促增殖作用逐渐增强,在 40:1 时其促增殖作用最强(图 2)。

2.4 Ara-C 联合 anti-CD3/anti-Pgp 增强 T 淋巴细胞对 K562 和 K562/A02 细胞的杀伤

采用 Promega Cytotox-96 非放射性细胞毒试剂盒检测 Ara-C 联合 anti-CD3/anti-Pgp 促进 T 淋巴细

胞对靶细胞的特异性杀伤作用。实验结果表明(图 3);共刺激分子 B7 的表达,增强了 anti-CD3/anti-Pgp 微型双功能抗体所介导的 T 淋巴细胞的杀伤作用,其对 K562 和 K562/A02 细胞的杀伤作用在效靶比为 0.37:1 时分别为(0.62 ± 0.5)% 和(16.44 ± 1.2)%;随着效靶比的不断增高杀伤作用逐渐增强,在效靶比为 25:1 时分别增加至(29.46 ± 1.7)% 和(60.49 ± 2.9)%。

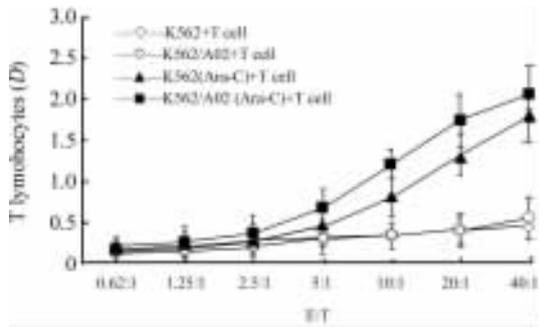


图 2 Ara-C 增强 K562 和 K562/A02 细胞对 T 细胞增殖的诱导
Fig. 2 Ara-C enhanced proliferation of T lymphocytes induced by K562 and K562/A02 cells

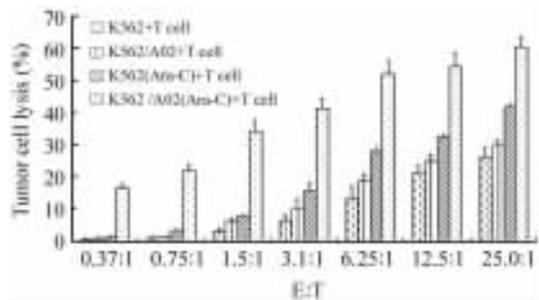


图 3 Anti-CD3/anti-Pgp 联合 Ara-C 促进 T 细胞对 K562 和 K562/A02 细胞的杀伤

Fig. 3 Anti-CD3/anti-Pgp combined with Ara-C enhanced cytotoxicity effect of T lymphocytes on K562 and K562/A02 cells

3 讨论

在免疫反应中, T 淋巴细胞的激活有赖于双信号系统的共同作用。第一信号系统来自于抗原肽-MHC 分子组成的复合物与 TCR 的相互作用;第二信号是抗原非特异性的共刺激信号,由抗原提呈细胞表面表达的协同刺激分子与 APC 表面的配体结合所诱导。第二信号系统启动维持并调节活化级联反应,刺激 T 细胞增殖、分化和产生细胞因子并最终分化为效应细胞,产生免疫应答^[7]。

介导这种共刺激作用的分子有多种,其中最重要、研究最多的是 B7(B7-1、B7-2)分子。缺少 B7 分

子的表达将导致免疫信号传递的中断,最终导致免疫失活^[8]。B7 分子缺陷使肿瘤细胞逃避宿主免疫监视,进而发生肿瘤,可能是人类血液肿瘤的发病机制之一^[9]。实验发现白血病 K562 细胞不表达 B7 分子,与 Lindner 等^[10-12]的研究相一致,说明 K562 细胞也存在 B7 分子表达的缺陷。

本研究结果表明,以一定剂量的 Ara-C 分别与 K562、K562/A02 细胞作用 0、24、48、72 h, B7-1、B7-2 的表达均有不同程度的上调,说明 Ara-C 可上调白血病细胞中的共刺激分子 B7-1 和 B7-2 的表达,并与作用时间成正相关。进一步用 RT-PCR 检测表明,Ara-C 同样可诱导 K562 和 K562/A02 细胞 B7-1、B7-2 mRNA 表达的上调。无论是从蛋白水平还是分子水平都能上调 K562 及 K562/A02 细胞 B7 分子的表达,这是由核转录因子 NF-κB 与 B7 基因启动子结合后激活引起的^[13]。

在得到 Ara-C 激活 K562 和 K562/A02 细胞表达 B7 后,对 T 淋巴细胞的增殖具有明显的刺激作用,在低效靶比时, T 淋巴细胞增殖较慢,但随着效靶比的不断升高,其促增殖作用逐渐增强。

双功能抗体具有两条抗原结合臂,可同时与肿瘤相关抗原和免疫效应细胞表面分子标志相结合,并能有效地使效应细胞靶向杀灭肿瘤细胞^[14]。双特异抗体联合应用激活共刺激信号通路的治疗方案能够提高疗效,这一点已被许多实验证实^[15]。实验中检测 Ara-C 联合双功能抗体的体外杀伤效果表明,在不同效靶比时能够增强对白血病细胞的杀伤作用,对高表达 Pgp 的耐药白血病细胞杀伤作用尤为明显,这说明共刺激分子确实改变了淋巴细胞的状态,提高了其对肿瘤细胞的杀伤效率,这些活化的淋巴细胞可能蓄积丰富的穿孔素、颗粒酶等对靶细胞进行高效、特异地杀伤。

总之,研究结果表明共刺激分子 B7 的表达能够增强双功能抗体 anti-CD3/anti-Pgp 介导 T 细胞的体外杀伤作用,可能成为一种有前景的生物治疗佐剂,有助于效应细胞更高效地靶向杀伤白血病细胞,尤其是高表达 Pgp 的耐药白血病细胞,其调节效应细胞活性的作用及机制尚需进一步的实验来证实。

[参考文献]

[1] Yamazaki T, Akiba H, Zwai H, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC [J]. J Immunol, 2002, 169(10):5538-5545.
[2] 张学光. 共刺激分子及其调节网络在特异性免疫应答中的作用及机制 [J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(1): 26-32.
[3] Gao Y, Xiong D, Yang M, et al. Efficient inhibition of multidrug-

- resistant human tumors with a recombinant bispecific anti-P-glycoprotein/anti-CD3 diabody [J]. *Leukemia*, 2004, 18(3): 513-520.
- [4] Reusch U, Le Gall F, Hensel M, *et al.* Effect of tetravalent bispecific CD19/CD3 recombinant antibody construct and CD28 costimulation on lysis of malignant B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by autologous T cells [J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(3): 509-518.
- [5] 栾凤君, 杨纯正, 马建国, 等. 一株人红白血病多药耐药细胞系(K562/A02)的建立及其耐药特性的研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1993, 15(2): 101-103.
- [6] 高瀛岱, 熊冬生, 许元富, 等. 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体的构建和表达 [J]. *生物工程学报*, 2003, 19(5): 444-449.
- [7] 王振发, 王 烈, 卫立辛. 趋化因子和 B7 分子联合应用抗肿瘤的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(1): 94-06.
- [8] Hellstrom KE, Hellstrom I, Chen L, *et al.* Can co-stimulated tumor immunity be therapeutically efficacious [J]. *Immunol Rev*, 1995, 145(6): 123-145.
- [9] 马肖容, 张玉刚, 曹星梅, 等. 血液系统恶性肿瘤细胞共刺激分子的检测及临床意义 [J]. *西安交通大学: 医学版*, 2003, 24(4): 323-325.
- [10] 部 峰, 陈君敏, 叶德富, 等. 钙离子载体上调 K562 细胞 B7 分子表达 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(7): 612-614, 618.
- [11] Jang BC, Park YK, Choi IH, *et al.* 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate induces the expression of B7-DC, -H1, -H2, and -H3 in K562 cells [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(6): 1439-1447.
- [12] Lindner I, Kharfan-Dabaja MA, Ayala E, *et al.* Induced dendritic cell differentiation of chronic myeloid leukemia blasts is associated with down-regulation of BCR/ABL [J]. *J Immunol*, 2003, 171(4): 1780-1791.
- [13] 范冬梅, 高瀛岱, 杨 铭, 等. 阿糖胞苷上调耐药白血病细胞共刺激分子表达及其分子机制研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(9): 815-818.
- [14] 高瀛岱, 熊冬生, 杨纯正, 等. 微型双功能抗体介导人 T 细胞杀伤耐药实体瘤细胞 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(11): 653-656.
- [15] Yoshida H, Katayose Y, Unno M, *et al.* A novel adenovirus expressing human digand enhances antitumor immunity [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52(2): 97-106.
- [收稿日期] 2009 - 07 - 18 [修回日期] 2009 - 09 - 27
[本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

维甲酸增加诱导型 FOXP3⁺ 细胞数量: 直接作用还是间接作用?

诱导型调节性 T 细胞是利用体外培养的方法、通过人为加入 TGF- β 等细胞因子诱导生成的一群具有调节性 T 细胞 (Treg) 表型(FOXP3⁺)与功能的细胞。虽然该群细胞的稳定性不及天然的 Treg, 但仍不失为一个良好的研究 Treg 的体外模型。哈佛医学院 Mathis 等于 2008 年 11 月在 *Immunity* 杂志上发表一篇名为《维甲酸可通过抑制 CD4⁺ CD44^{hi} 细胞间接增加 FOXP3 表达》的文章, 该文认为, 哺乳动物肠道内一群 CD103⁺ DC 生成的维生素 A 代谢产物维甲酸(retinoic acid, RA)在诱导型调节性 T 细胞生成的模型中可以促进 FOXP3⁺ 生成。

该研究首先通过对 RA 受体缺陷小鼠的研究确定了 RA 是通过其受体 RAR- α 来起作用的。对加入 RA 刺激的诱导型 Treg 的基因分析发现, RA 并未直接参与到 TGF- β 的信号通路中, 而阻碍 Treg 形成的 IL-6 在 RA 的作用机制中也不占主导地位。研究又发现, 在 CD4⁺ CD44^{hi} 记忆性 T 细胞缺失的情况下, naive T 细胞向诱导型 Treg 的转化就不再受 RA 的影响, 该记忆性 T 细胞可以通过分泌 IFN- γ 、IL-21 和 IL-4 抑制 naive T 细胞向诱导型 Treg 的转化, 而 RA 恰恰是通过对这些 CD4⁺ CD44^{hi} 记忆性 T 细胞的抑制, 间接促进了 Treg 的生成。最后, 该研究利用体内回输实验进一步验证了这个观点。

针对 Mathis 等的研究结论, Cheroutre 等在给 2009 年 4 月 *Immunity* 杂志的信中提出了不同的看法, 指出即使将 naive T 细胞的纯度增加至 99.9%, 即在没有其他细胞参与的情况下, naive T 向诱导型 Treg 的转化仍然可受到 RA 的促进; RA 还可以削弱诱导体系中 CD28 抗体对 Treg 形成的负面影响, 即 RA 可以直接促进 FOXP3⁺ 细胞的生成。

在同期杂志上, Mathis 实验室的研究人员针对这质疑信件作了回复, 回复指出, naive T 细胞在被激活的过程中, 可能会分化为其他效应细胞, 从而释放相关细胞因子, RA 可能是通过这些效应细胞对 naive T 起了间接作用, 而非 Cheroutre 等认为的直接作用。维甲酸增加诱导型 FOXP3⁺ 细胞数量, 其机制究竟是直接作用还是间接作用? 还需要进一步深入探讨。

- [丁圆圆 摘译, 郭振红 审阅. Hill JA, Hall JA, Mathis D, *et al.* *Immunity* 2008, 29(5): 758-770.
Mucida D, Pino-Lagos K, Cheroutre H, *et al.* *Immunity*, 2009, 30(4): 471-472.
Hill JA, Hall JA, Mathis D, Benoist C, *et al.* *Immunity*, 2009, 30(4): 472-473.]