

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.011

· 基础研究 ·

PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 的制备及其对肝癌 HepG2 细胞侵袭力的抑制

蔡海东¹, 谯 媛², 袁雪宇¹, 杨越华¹, 袁世栋¹, 孙 明¹, 吕中伟^{1*} (1. 同济大学附属第十人民医院核医学科, 上海 200072; 2. 第二军医大学附属长海医院输血科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨以 PEI-RGD (polyethyleneimine-Arg-Gly-Asp) 为转染载体的¹²⁵I-(α_v)ASODN 投递在体外对 HepG2 肝癌细胞侵袭力的影响。方法: ¹²⁵I 标记整合素 α_v 亚基的 ASODN, 以聚乙烯亚胺衍生物 PEI-RGD 为载体制备 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 复合物, 通过受体介导方式转染进入 HepG2 细胞, 利用 Boyden 小室侵袭模型检测复合物对 HepG2 细胞侵袭力的影响。结果: (1) ¹²⁵I-(α_v)ASODN 的标记率为 (73.78 ± 4.09)%, 放化纯度为 (96.68 ± 1.38)%, 37 °C 放置 48 h 后的放化纯度仍 >90%, 表明其稳定性良好; (2) HepG2 细胞对 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 的摄取于 4 μ l/2 μ g 时达到峰值 [(12.77 ± 0.85)%], 之后明显降低, 故选择 2 μ l/1 μ g 作为 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 对 HepG2 细胞的作用剂量; (3) 相对于其他实验组和对照组, PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 组显著降低了 HepG2 细胞的侵袭能力 ($P < 0.01$)。结论: 以 PEI-RGD 为载体投递 ¹²⁵I-(α_v)ASODN 能有效抑制 HepG2 细胞的侵袭力。

[关键词] 聚乙烯亚胺-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (PEI-RGD); 整合素 α_v 亚基; ASODN; 肝肿瘤; 侵袭

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0609-05

Preparation of PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN and its inhibitory effect on invasive ability of HepG2 cells

CAI Hai-dong¹, QIAO Yu², YUAN Xue-yu¹, YANG Yue-hua¹, YUAN Shi-dong¹, SUN Ming¹, LV Zhong-wei^{1*} (1. Department of Nuclear Medicine, Tenth People's Hospital of Shanghai, Affiliated to Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Department of Blood Transfusion, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of ¹²⁵I-(α_v)ASODN on the *in vitro* invasive ability of hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) through PEI-RGD-mediated receptor process. **Methods:** Integrin α_v -specific antisense oligonucleotide was labeled with ¹²⁵I, and PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN complex was prepared by combining ¹²⁵I-(α_v)ASODN with polyethyleneimine derivative PEI-RGD. PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN complex was transferred into HepG2 cells through the receptor-mediated process. The effect of PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN complex on the invasive ability of HepG2 cells was examined by Boyden chamber invasive assay. **Results:** (1) The labeling yield and radiochemical purity of ¹²⁵I-(α_v)ASODN were (73.78 ± 4.09)% and (96.68 ± 1.38)%, respectively, and the labeled compound had a good stability *in vitro* after 48 h at 37 °C; (2) The ability of HepG2 cells to uptake PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN reached its peak ([12.77 ± 0.85]%) when PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN was at 4 μ l/2 μ g ([12.77 ± 0.85]%), and then gradually decreased thereafter. So the dosage of PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN for the following experiment was chosen as 2 μ l/1 μ g; (3) The invasive capacity of HepG2 cells was significantly reduced in PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN group compared with those in other experiment and control groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** ¹²⁵I-(α_v)ASODN mediated by PEI-RGD can effectively inhibit the invasive capacity of HepG2 cells.

[Key words] polyethyleneimine-Arg-Gly-Asp (PEI-RGD); integrin α_v ; antisense oligodeoxynucleotide (ASODN); hepatocellular carcinoma; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 609-613]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30300092)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30300092)

[作者简介] 蔡海东 (1975-), 男, 江苏省南通市人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事肿瘤核医学方面的研究。E-mail: caihdong@163.com

* 通信作者 (Corresponding author)。E-mail: heyixue163@163.com

整合素 α_v 亚基在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的浸润、转移和新生血管形成过程中具有重要作用^[1]。聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)—精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)作为一种新的非病毒基因转染载体,是目前研究的热点,其PEI可与DNA络合, RGD可与 α_v 亚基结合,经胞饮作用进入细胞内。本研究以放射性核素¹²⁵I标记整合素 α_v 亚基的反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN),与PEI-RGD络合后,以受体介导的方式转染至肝癌HepG2细胞,分析PEI-RGD/¹²⁵I(α_v)ASODN对HepG2细胞侵袭力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

整合素 α_v 亚基的ASDON序列由上海生物工程技术有限公司合成,序列为5'-GCCCTC-CTTCCACAATCCCA-3',经Blast Research软件对比与人类其他基因编码序列无同源性, PAGE纯化, 5'端和3'端硫代修饰。PEI-RGD购自法国PolyPlus-transfection公司, InnoCyte™细胞侵袭分析试剂盒(QIA129)购自Merck公司, Na¹²⁵I购自成都中核高通同位素股份有限公司等。

1.2 (α_v)ASODN的¹²⁵I标记、纯化和鉴定

取20 μ g的(α_v)ASODN溶于0.1 mol/L乙酸铵溶液(pH 5.0), 60 °C加热30 min,依次加入0.25 mmol/L的KI 10 μ l、1.85 $\times 10^6$ Bq的Na¹²⁵I 10 μ l、0.03 mol/L的TiCl₃ 100 μ l,混匀后60 °C加热45 min。室温冷却后加入0.1 mol/L的Na₂SO₃ 5 μ l,再加入1 mol/L乙酸铵溶液20 μ l,调节反应混合物pH至7.0, 60 °C加热60 min。以丙酮:乙酸乙酯(1:1, V/V)为展开剂,纸层析法计算标记率。以0.01 mol/L的HEPES(pH 7.4)为洗脱液,将反应混合液经Sephadex G25柱分离纯化,计算放化纯度。随后将纯化后的反应物分别于24、48、72、96 h测量放化纯,观察其体外稳定性。

1.3 人肝癌HepG2细胞的培养

人肝癌细胞株HepG2由同济大学生命科学与技术学院模式生物开放实验室惠赠,加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,于37 °C、95%湿度及5% CO₂的培养箱中培养,0.25%胰酶常规消化传代。实验选用对数生长期的细胞,待细胞贴壁达50%~60%时投药。以PEI-RGD(μ l):¹²⁵I(α_v)ASODN(μ g)比例为2:1混合,进行转染。

1.4 PEI-RGD/¹²⁵I(α_v)ASODN转染HepG2细胞

及其细胞摄取率测定

取对数生长期的HepG2细胞,以DMEM培养液调细胞密度至 1×10^5 /ml,接种24孔板,每孔500 μ l。设PEI-RGD/¹²⁵I(α_v)ASODN组(包括2 μ l/1 μ g、4 μ l/2 μ g、8 μ l/4 μ g、16 μ l/8 μ g、32 μ l/16 μ g共5亚组)、¹²⁵I(α_v)ASODN组和¹²⁵I对照组进行转染,每组设3复孔,CO₂培养箱培养48 h,待细胞贴壁率达50%~60%时加入药物,继续培养24 h。用0.25%胰酶消化细胞,收集细胞悬液于离心管中,分别测量总CPM(A₀),然后1 500 $\times g$ 离心、洗涤,重复3次,分离出细胞,并测定细胞CPM(A),按下式计算细胞摄取率:细胞摄取率(%) = A/A₀ \times 100%。

1.5 Boyden小室法检测PEI-RGD/¹²⁵I(α_v)ASODN对HepG2细胞侵袭力的影响

实验分PEI-RGD/¹²⁵I(α_v)ASODN组(2 μ l:1 μ g,该剂量时细胞对PEI-RGD/¹²⁵I(α_v)ASODN的摄取率较高且细胞毒性较小)、¹²⁵I(α_v)ASODN组、(α_v)ASODN组、PEI-RGD/(α_v)ASODN组、PEI-RGD组、¹²⁵I组和空白对照组共7组,使用InnoCyte™细胞侵袭分析试剂盒(QIA129)检测。取300~400 μ l无血清培养液加入上室,孵育30~60 min后吸出,取含10%胎牛血清的培养基500 μ l加入下室,然后吸取转染的细胞悬液300~350 μ l加入上室,置于CO₂培养箱培育48 h后,于下室染色孔加入500 μ l细胞染色液,并将黏附在上室底部背侧的细胞敲入染色孔,再培育30 min。取混合液200 μ l行荧光检测和拍照,并计算抑制率。

1.6 统计学处理

所有数据经SPSS13.0统计软件包处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和多样本两两比较。

2 结果

2.1 ¹²⁵I(α_v)ASODN的标记效率

实验结果显示,¹²⁵I对(α_v)ASODN的标记率为(73.78 \pm 4.09)%,¹²⁵I(α_v)ASODN的放射化学纯度为(96.68 \pm 1.38)%,提示标记成功,且标记物¹²⁵I(α_v)ASODN有较高的质量。

2.2 ¹²⁵I(α_v)ASODN的稳定性

2.2.1 ¹²⁵I(α_v)ASODN的脱标 标记完成后于37 °C放置2、4、8 h测定标记率,分别为(72.47 \pm 4.14)%、(70.46 \pm 4.32)%、(67.88 \pm 3.72)%。

2.2.2 ¹²⁵I(α_v)ASODN的放射化学纯度变化 经纯化后于37 °C放置24、48、72、96 h测定放射化学

纯度,分别为(95.61 ± 1.56)%、(90.57 ± 1.95)%、(87.38 ± 1.67)%、(77.79 ± 1.86)%。可见¹²⁵I-(α_v)ASODN 的放射化学纯度于标记后 48 h 仍在 90% 以上,而 96 h 后明显减低,提示该标记物的相关实验应在标记完成后 48 h 之内完成为佳。

2.3 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 转染后 HepG2 细胞的摄取率

不同剂量比例(2 μ l/1 μ g、4 μ l/2 μ g、8 μ l/4 μ g、16 μ l/8 μ g、32 μ l/16 μ g)的 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 转染 HepG2 细胞后的摄取率(%)分别为(10.92 ± 1.20)%、(12.77 ± 0.85)%、(7.78 ± 1.37)%、(7.11 ± 1.76)%、(1.42 ± 1.03)% (图 1);¹²⁵I-(α_v)ASODN 对照组和¹²⁵I 对照组分别为(2.19 ± 1.35)%和(0.31 ± 0.28)%。由此可见, HepG2 细胞对 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 的摄取在 4 μ l/2 μ g 时达到最大,然后随着剂量的增加细胞摄取率明显减低,提示复合物在剂量高于 4 μ l/2 μ g 时对 HepG2 细胞具有细胞毒性,因此在细胞实验中剂量应控制在 4 μ l/2 μ g 以内以减少细胞毒性对实验的影响。

2.4 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 对细胞侵袭力的抑制作用

各实验组和对照组的侵袭检测荧光场见图 2,抑制率见表 1。实验结果显示,PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 组对肝癌 HepG2 细胞侵袭的抑制率最大,与其他各实验组和对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

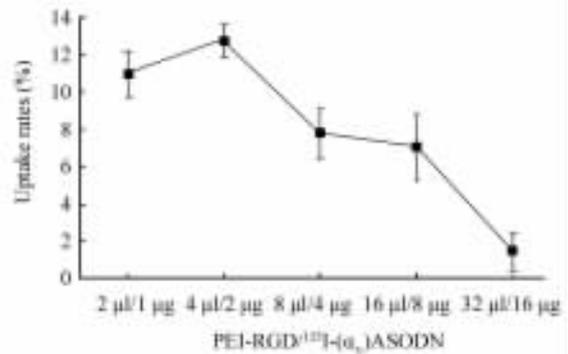


图 1 HepG2 细胞对不同剂量比例的 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 的摄取率
Fig.1 Uptake rates of different dose ratio of PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN by HepG2 cells

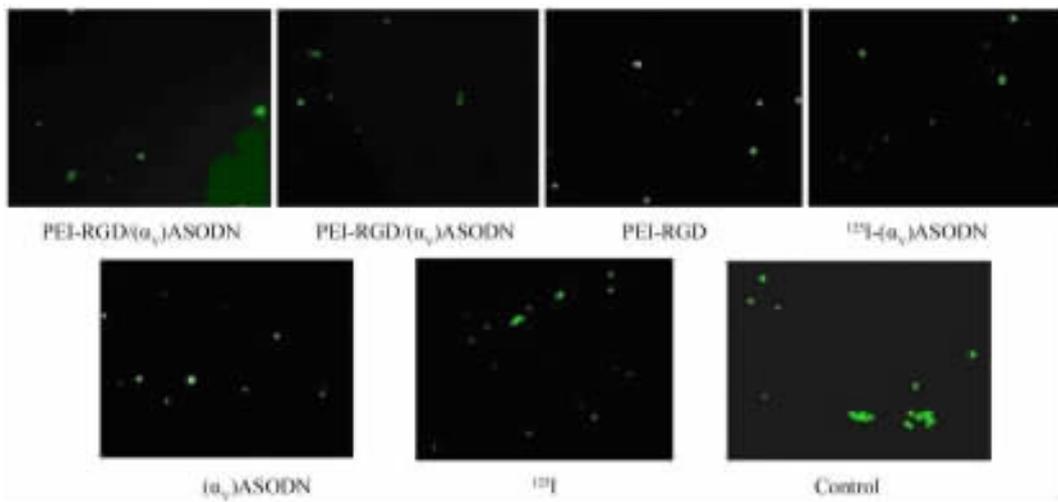


图 2 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 对肝癌细胞侵袭力的抑制作用(×100)
Fig.2 Inhibitory effect of PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN on invasiveness of HepG2 cells(×100)

3 讨论

整合素 α_v 亚基在多种恶性肿瘤细胞(如 HCC、黑素瘤等)中异常高表达^[2-3],参与配体的识别,主要通过其内的同源重复序列识别配体中的 RGD 序列实现与配体的结合^[4-5],与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的多种成分如玻链蛋白(vitronec-

tin, VN), 纤链蛋白(fibronectin, FN), 纤维胶原(fibrinogen, FB)等相互作用,接受细胞外生长激素和(或)细胞外基质信号的刺激,通过激活 Ras/MAP 等信号通路使肿瘤细胞的增生、分化和迁移能力发生改变^[6],促进肿瘤细胞生长、抑制肿瘤细胞凋亡,并向周围侵袭和转移。

表 1 Boyden 小室侵袭模型检测各实验组细胞侵袭的抑制率(n = 3)

Tab.1 Inhibitory rates on cell invasion of different experimental groups as detected by Boyden chamber assay (n = 3)

Group	Fluorescence value	Inhibitory rate (%)
PEI-RGD/ ¹²⁵ I-(α _v)ASODN	32.53 ± 3.54	52.60 ± 4.11
PEI-RGD/(α _v)ASODN	41.33 ± 2.99	39.73 ± 3.40*
PEI-RGD	47.91 ± 2.76	30.05 ± 5.19 [△]
¹²⁵ I-(α _v)ASODN	58.88 ± 3.18	14.14 ± 2.94 ^{△△}
(α _v)ASODN	59.80 ± 3.13	12.79 ± 2.68 ^{△△}
¹²⁵ I	67.94 ± 3.21	0.91 ± 2.91 ^{△△}
Blank control	68.55 ± 1.52	0 ^{△△}

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs PEI-RGD/ ¹²⁵I-(α_v)ASODN group; [△] P < 0.05, ^{△△} P < 0.01 vs PEI-RGD/(α_v)ASODN group

目前针对整合素 α_v 亚基治疗 HCC 的研究多集中在免疫治疗和基因治疗方面,部分已进入药物临床试验阶段^[7]。有研究表明,整合素 α_vβ₃ 的单克隆抗体 LM609^[8-9]、vitaxin^[10-11]在体内实验中均体现出良好的抗肿瘤侵袭作用;而基因治疗则多利用肿瘤特异的 ASODN 或核酶来减少整合素 α_v 亚基的表达或改变表达构型,干扰其介导的黏附、移动与转移功能。然而目前研究所选择的转染载体多为病毒类或脂质体等,不仅存在安全问题,而且对体内靶细胞的特异性差,以及需要载体克隆、测序验证等颇为费时复杂的步骤,因此在体内实验和临床应用过程中并未取得满意的效果。为此,在本研究中选择了受体介导的基因转移技术,即通过载体 PEI-RGD 与 HCC 膜表面的整合素 α_v 亚基选择性结合,将携带的 ASODN 导入细胞内。PEI-RGD 是一种线性聚乙烯亚胺衍生物,具有两个特征:(1) PEI 是一种阳离子化合物,能与 ASODN 以离子键结合,起着携带 ASODN 的作用,并且能吸收溶酶体中的 H⁺,使溶酶体中的核酸酶失活,保护 ASODN 不被降解;(2)其表面呈现许多短的 RGD 多肽,类似整合素 α_v 亚基的天然配体,与 α_v 特异结合后通过细胞内吞进入靶细胞,因此可以起到靶向性转染的效果^[12]。唐永松等^[13]在利用 PEI-RGD 介导 bcl-2 反义核酸转 caco-2 细胞研究中发现,相对于单独使用 bcl-2 反义核酸,能明显提高 caco-2 细胞的摄入量。

从图 1 中可见 HepG2 细胞对复合物的摄取在 PEI-RGD/¹²⁵I-(α_v)ASODN 为 4 μl/2 μg 时细胞摄

取率达到最大,之后随着浓度的增加,细胞摄取率明显减低,可能的原因是 HepG2 细胞的表面受体 α_v 已经饱和,加上复合物本身对 HepG2 细胞具有细胞毒性而导致摄取减低。为减少复合物的细胞毒性对 HepG2 侵袭力的影响,实验取 PEI-RGD/ ¹²⁵I-(α_v)ASODN 为 2 μl/1 μg 进行细胞侵袭研究。研究表明,PEI-RGD/ ¹²⁵I-(α_v)ASODN 组对肝癌细胞侵袭的抑制率相对于其他各对照组差别具有统计意义,提示其对 HepG2 细胞侵袭力的抑制作用高于其他各实验组和对照组。可能的原因包括:(1) PEI-RGD 与 HepG2 表面的 α_v 结合后,减少其他细胞、细胞外基质和基膜等天然配体与 α_v 结合的概率,起着竞争抑制的作用^[14-15];(2) PEI-RGD 与 α_v 结合后引起细胞内吞进入细胞质,并降解 α_v 亚基,减低 HepG2 表面的 α_v 密度;(3) 进入细胞的(α_v)ASODN 在 PEI-RGD 的保护下,可免受核酸酶的降解,与 α_v 的 mRNA 结合后干扰 α_v 亚基的表达;(4) ¹²⁵I-(α_v)ASODN 还可以进入胞核内,可与 DNA 结合,其标记的 ¹²⁵I 衰变时产生 Auger 电子和 CK 电子,围绕其衰变位点约 10 nm(DNA 链上约 10 bp 以内)的范围内形成局部高能量沉积(335 keV),引起 DNA 的双链断裂(double-strand break, DSB)等难以修复的损伤所致^[16]。同时也发现 PEI-RGD/(α_v)ASODN 和 PEI-RGD 对细胞侵袭力抑制效应的差别尽管有统计学差异,但差别并不大,提示反义技术在本研究中对 HepG2 细胞侵袭力的抑制作用效果并不满意。因此选择抑制效率更高、作用时间更长、更稳定的 RNA 干扰技术将是本课题的下一个研究目标^[17]。

[参 考 文 献]

[1] Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varnier JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8 (8): 604-617.

[2] Koistinen P, Ahonen M, Kähäri VM, et al. AlphaV integrin promotes *in vitro* and *in vivo* survival of cells in metastatic melanoma [J]. Int J Cancer, 2004, 112(1): 61-70.

[3] Lessey BA, Young SL. Integrins and other cell adhesion molecules in endometrium and endometriosis [J]. Semin Reprod Endocrinol, 1997, 15(3): 291-299.

[4] Chen X, Liu S, Hou Y, et al. MicroPET imaging of breast cancer alphaV-integrin expression with ⁶⁴Cu-labeled dimeric RGD peptides [J]. Mol Imaging Biol, 2004, 6(5): 350-359.

[5] Janssen M, Frielink C, Dijkgraaf I, et al. Improved tumor targeting of radiolabeled RGD peptides using rapid dose fractionation [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2004, 19(4): 399-404.

[6] Kim M, Carman CV, Springer TA, et al. Bidirectional transmem-

- brane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins [J]. Science, 2003, 301(5640): 1720-1725.
- [7] Fuxe J, Liu L, Malin S, *et al.* Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human astrocytic tumors and xenografts [J]. Int J Cancer, 2003, 103(6): 723-729.
- [8] Zhu J, Carman CV, Kim M, *et al.* Requirement of alpha and beta subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling [J]. Blood, 2007, 110(7): 2475-2483.
- [9] Landen CN, Kim TJ, Lin YG, *et al.* Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphaVbeta3 integrin in ovarian cancer [J]. Neoplasia, 2008, 10(11): 1259-1267.
- [10] Winter PM, Schmieder AH, Caruthers SD, *et al.* Minute dosages of αVβ3-targeted fumagillin nanoparticles impair Vx-2 tumor angiogenesis and development in rabbits [J]. FASEB J, 2008, 22(8): 2758-2767.
- [11] Sroka TC, Marik J, Pennington ME, *et al.* The minimum element of a synthetic peptide required to block prostate tumor cell migration [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(11): 1556-1562.
- [12] Garrigues HJ, Rubinchikova YE, Dipersio CM, *et al.* Integrin alphaVbeta3 binds to the RGD motif of glycoprotein B of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and functions as an RGD-dependent entry receptor [J]. J Virol, 2008, 82(3): 1570-1580.
- [13] 唐永松,曹明溶,蒋建伟,等. 整合素受体介导 bcl-2 反义核酸对人结肠癌细胞的靶向作用 [J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(4): 192-195.
- [14] Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, *et al.* Inhibition of the alpha-nu integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours *in vivo* [J]. Br J Cancer, 2002, 86(5): 788-795.
- [15] Rengifo-Cam W, Konishi A, Morishita N, *et al.* Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis [J]. Oncogene, 2004, 23(1): 289-297.
- [16] Jacobs A, Tjuvajev JG, Dubrovin M, *et al.* Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant vectors *in vivo* [J]. Cancer Res, 2001, 61(7): 2983-2995.
- [17] Howard KA, Rahbek UL, Liu X, *et al.* RNA interference *in vitro* and *in vivo* using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system [J]. Mol Ther, 2006, 14(4): 476-484.
- [收稿日期] 2009-09-29 [修回日期] 2009-11-16
[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

活体内共刺激分子 PD-1 抑制 T 细胞的功能

B7: CD28 家族成员 Programmed death 1 (PD-1) 在调控 T 细胞功能中发挥着重要作用,其通过与配体 PD-L1、PD-L2 结合向 T 细胞内传递抑制信号,防止 T 细胞过度活化。近期研究表明,PD-1 与肿瘤以及慢性病毒感染进程密切相关,衰竭性 CTL 细胞(cytotoxic T lymphocytes)是其研究的热点之一,PD-1 的表达也作为 CTL 细胞衰竭的重要判定标准。此外,通过抑制 T 细胞对自身抗原的反应,PD-1 也控制着自身免疫性疾病的发生、发展;进一步机制研究表明,PD-1 通过其胞内 ITIM 和 ITSM 基序与 SHP-1 及 SHP-2 结合,从而发挥抑制功能。

最新一期 *Nature Immunology* 上发表了 Jeffrey A. Bluestone 教授关于 PD-1 在调控自身免疫性疾病(1 型糖尿病) 进程中作用机制的文章。该研究以糖尿病小鼠(NOD 小鼠) 为模型,首先在 NOD 小鼠体内注射胰岛抗原特异性的 T 细胞诱导糖尿病的发生,但如果隔天注射胰岛抗原 P31 交联的脾细胞,则可以引起 T 细胞耐受,而不发生糖尿病。作者研究发现,当在耐受维持阶段阻断 PD-1,能引起 T 细胞的重新活化,糖尿病发生明显增加,而 B7: CD28 家族另一重要成员 CTLA-4 并没有这种效应。作者运用双光子显微镜进一步研究该过程中 T 细胞运动的变化。当给予 PD-L1 的抗体(即阻断 PD-1 的作用) 以后,胰腺周围淋巴结中 T 细胞运动明显减弱,胰岛中也有类似现象。已有研究表明,TCR 接受刺激信号后,其运动速度会逐渐减慢,与 DC 形成稳固的接触,从而引起 T 细胞活化。该研究中,作者发现 T 细胞运动速度减慢后,与 DC 接触时间变长,T 细胞内活化信号 Erk 的表达以及 IFN-γ 的分泌明显增加,也解释了为什么 PD-1 阻断后 T 细胞运动减弱会引起 T 细胞的活化。

双光子显微镜在 2002 年引入免疫学研究,越来越受到免疫学家的青睐,其在活体内研究免疫反应有着明显的优势。本文作者正是利用这一先进技术,从细胞运动的角度提出了 PD-1 发挥抑制效应的新机制,为研究免疫分子功能提供了新思路。

[顾炎摘译,韩岩梅审阅. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, *et al.* Nat Immunol, 2009, 10(11): 1185-1192.]