

www.LifeOmic.com

www.LifeOmic.cn

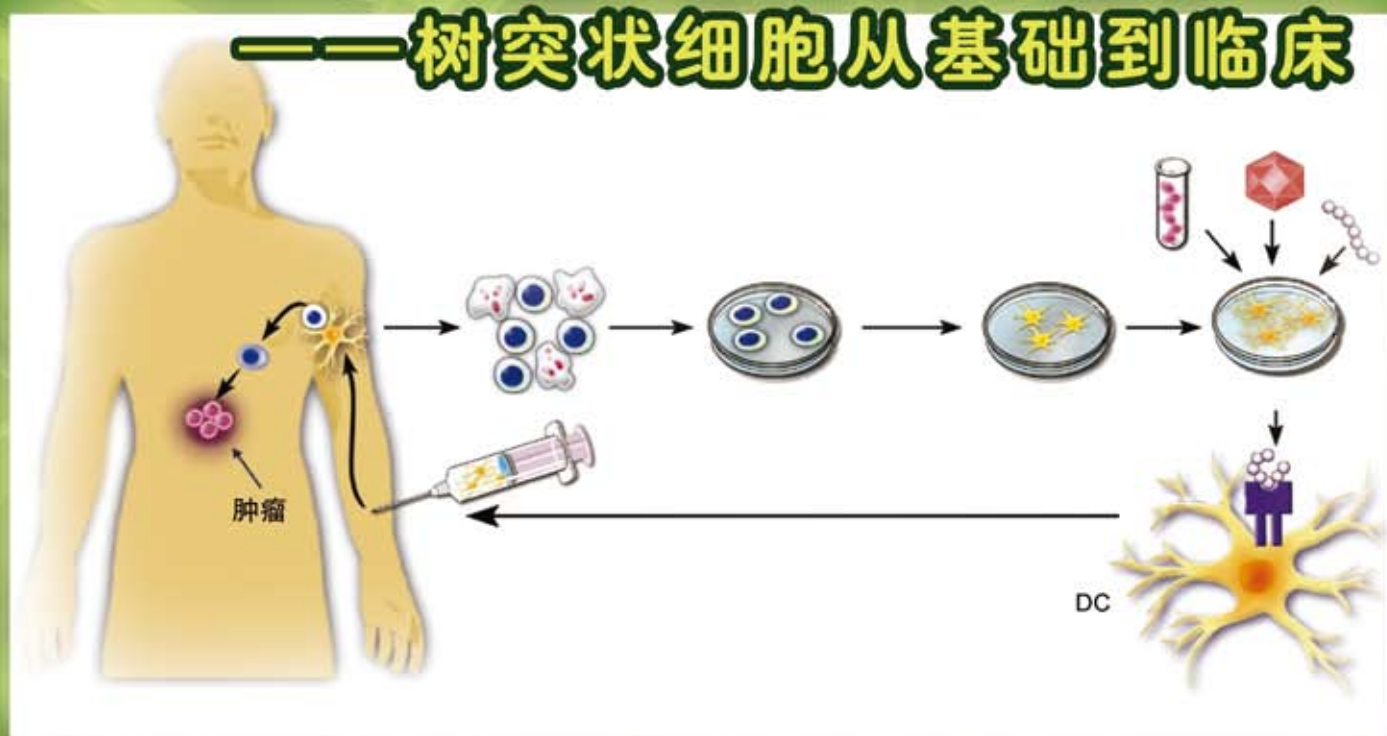
生命奥秘

2012年 5月刊
总第45期

LifeOmics

向 Ralph M. Steinman 致敬

——树突状细胞从基础到临床



微生物实验室里的喧闹与骚动

跳蛛可从模糊图像中获得清晰视野



无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学



目录 | CONTENTS

专题译述

向Ralph M. Steinman致敬——树突状细胞从基础到临床

前言

一、树突状细胞的发现	02
二、树突状细胞的生物学特征	04
三、树突状细胞的分类	11
四、树突状细胞的功能	17
五、树突状细胞与疾病的关系	26
六、树突状细胞的临床应用	31
七、展望	38

下一期（2012年6月刊）预告：生物学前沿研究选介

下一期生命奥秘将探讨的内容主要包括：稳态组织（tissue homeostasis）中先天免疫信号通路（innate immune signalling）的作用及其对病原体感染的反应；DNA损伤反应机制（DNA damage response）对开发抑制剂类药物的作用及其对肿瘤疾病的治疗功效；患者自身细胞来源的多潜能干细胞（pluripotent stem cell）的治疗前景及其对肿瘤的促进作用；以及小鼠遗传特性对研究骨生理学的意义。

热点话题

微生物实验室里的喧闹与骚动	41
---------------------	----

生命百态

跳蛛可从模糊图像中获得清晰视野	50
蝙蝠吃甜品一举两得	52

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

专题译述

Worthy Issues

向Ralph M. Steinman致敬 ——树突状细胞从基础到临床

特约编辑：Jane，女，博士，研究方向：免疫学

前言

2011年10月3日，诺贝尔生理学或医学奖公布，来自美国洛克菲勒大学的科学家Ralph M. Steinman、生于卢森堡的法国籍科学家Jules A. Hoffmann以及美国科学家Bruce A. Beutler因在免疫识别方面的卓越贡献共享了该奖项。这三位科学家的获奖被众多专家和媒体认为是众望所归，实至名归。但在诺贝尔奖公布的几个小时后，却突然传来了Ralph Steinman已在9月30日过世的噩耗。Ralph Steinman，这位发现树突状细胞先驱，这位奠定了适应性免疫识别启动相关机制的免疫学家，其工作发现虽然仅仅历经30余年，却已得到世人的公认，并成为免疫学的经典教义，启发着我们进一步认识免疫系统。如今他已不能享受诺贝尔奖给自己带来的殊荣和荣耀，并且成为了迄今为止已过世而获得诺贝尔奖的第一人。

1973年，Steinman与其导师Zanvil Cohn在小鼠的脾脏发现具有树枝状突起的独特形态的细胞，并将之命名为树突状细胞（dendritic cell, DC）。树突状细胞尽管仅是免疫细胞中很小的一群细胞，却是目前所知抗原提呈能力最强的抗原提呈细胞（antigen presenting cell, APC）。它最大的特点是能够刺激初始型T细胞的活化和增殖，而巨噬细胞和B细胞等仅能刺激已活化的T细胞或记忆性T细胞，因此DC是适应性免疫应答的始动者，它与免疫激活和免疫耐受密切相关。除外，树突状细胞在机体抗感染、肿瘤、

移植排斥及自身免疫病等过程中发挥着重要的作用。从最初鉴定出的朗格汉斯细胞，到后来发现的不同组织器官的树突状细胞，树突状细胞充分展示出其多组织分布、异质性等特点。目前人们根据树突状细胞的来源、组织定位及功能等不同特性，开发出了多种分类方法。另外，由于树突状细胞在免疫细胞的启动活化和免疫应答中发挥重要作用，因此应用前景良好，人们已借助树突状细胞开发出相关的DC疫苗，以用于治疗肿瘤、感染性疾病等。本文将从多个方面回顾树突状细胞的发现历史、树突状细胞的分类、功能及树突状细胞的临床应用等，以阐述我们迄今为止对树突状细胞的认识，同时我们将从基础研究和临床应用方面来展望树突状细胞的研究方向以及未来的发展趋势。

一、树突状细胞的发现

在Steinman去世两周后的2011年10月在线发表的《免疫学年度综述》（*Annual Review of Immunology*）上，Steinman回顾了自己的学习和工作经历，系统描述了他走上免疫学研究之路的历程及其发现树突状细胞这一独特的细胞类型的研究过程。这篇文章可能是他留给世人的最后一篇综述文献，同时也是对树突状细胞的研究历史的一个最好的回顾。

目前公认的、最早发现的一类树突状细胞是朗格汉斯细胞（Langehans cell），它因发现者的姓氏而得名。朗格汉斯细胞是科学家朗格汉斯（Paul Langehans）于1868年发现的表皮皮肤外层（即表皮）的常驻细胞。由于其独特的树突状样形态、特殊的组织定位以及网状分布，朗格汉斯细胞长期以来被误认为外周的神经细胞，直到Steinman发现了一个独特的细胞类型以及所带动的相关的研究工作，才最终确定朗格汉斯细胞其实是树突状细胞的一种，它可作为皮肤常驻的抗原呈递细胞（APC）而存在。

Steinman于1970年左右来到洛克菲勒大学开始了师从Zanvil Cohn与James Hirsch的博士后研究生涯。Cohn和Hirsch都是当时细胞生物学界的领军人物，他们在吞噬细胞的研究方面建树颇多。当时学术界普遍认为，以巨噬细胞为代表的吞噬细胞在免疫的启动方面发挥着重要的辅助作用。Steinman在展开自己的博士后工作时，并没有想到去发现一个新的细胞类型，而只是对抗原进入机体后，机体如何决定启动免疫应答，特别是启动细胞免疫应答感兴趣。Steinman当时的研究工作还是以巨噬细胞为主的。脾细胞一直被认为是很好的研究手段，因为它们可在体外实验中研究抗体反应的启动。在对脾细胞的研究中，Steinman很快与Cohn观察到一个新的细胞类型，而且鉴于它们具

有树突样突起，而被命名为树突状细胞（dendritic cell, DC）。这一成果被发表于1973年的《实验医学期刊》（*JEM*）杂志上（图1），这是关于树突状细胞发现的第一篇文献。随后的树突状细胞研究工作的开展并非一帆风顺，在很长时间里，关于它们是一种独立的细胞类型，在启动免疫应答中为关键性细胞类型的观点并不被主流的免疫学家认可。直到树突状细胞的MHC抗原摄取、处理及呈递相关机制被逐渐阐明，以及对这类细胞的发育和分类的进一步认知等，树突状细胞才逐渐被接受。最终，科学家们终于承认它们是免疫系统的一个非常重要的细胞类型，并赞同其在免疫反应，尤其是适应性免疫应答中发挥了重要的作用，是适应性免疫应答的最重要的启动子的观点。

提到树突状细胞的发现，不得不提的是浆细胞样树突状细胞（plasmacytoid DC, pDC）。这群树突状细胞被归于树突状细胞家族的时间是最晚的。1958年，Karl Lennert 和Wolfgang Remele发现了pDC。由于其定位于活动性淋巴结周围，呈浆细胞形态，并且后续研究发现这些细胞表达T细胞和单核细胞的表面标记，因此被命名为浆细胞样T细胞或浆细胞样单核细胞。随后，在上世纪80年代时病理学家们发现这群细胞集中在炎症、肿瘤和皮肤周围的淋巴组织内，但当时人们对它们的具体功能还不是很了解。然而，O' Doherty和Géraldine Grouard等分别从人外周血和扁桃体中分离出这类细胞，发现IL-3和CD40L是能够促使其分化为具有成熟树突状细胞形态的一类细胞，因而将它们命名为浆细胞样树突状细胞。1999年，研究发现病毒感染能够刺激这群细胞快速分泌大量I型干扰素，因此又将它们命名为I型干扰素生成细胞（type I interferon producing cell, IPC）。到目前为止，研究发现，pDC（IPC）主要有两大功能：一是专职性产生I型干扰素；二是能进一步分化为经典的DC，以抗原特异性的方式活化初始T细胞。

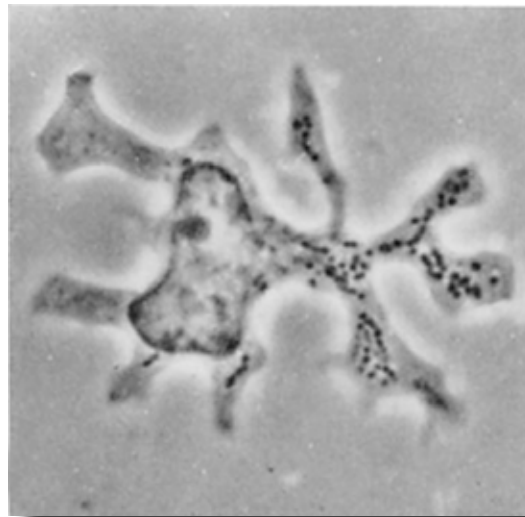


图1 1973年Steinman首次在*JEM*杂志上报道树突状细胞的形态。

图片来源：Steinman RM and Cohn ZA. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J.Exp Med*, 137: 1142-1162.

二、树突状细胞的生物学特征

1. 树突状细胞一般及形态学特征

树突状细胞广泛分散于全身上皮组织和实质性器官，数量不超过局部细胞总数的1.0%；它可迁移到血液与淋巴中，数量不超过血液有核细胞总数的0.1%。成熟DC因其表面具有许多树突状（dendron）突起而得名，它的细胞膜有较强的伸缩能力，甚至可扩展到数百微米。DC的扩展形式包括树突、伪足及面纱等。该细胞胞质内无溶酶体和内体，胞核形状不规则，也少见其它细胞器。DC的共同表面标志是Flt3受体，还表达与抗原呈递相关的主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex, MHC）I类和II类分子、共刺激分子（CD80/B7-1、CD86/B7-2、CD40及CD40L等）、黏附分子（细胞间黏附分子ICAM-1、ICAM-2、ICAM3及淋巴细胞功能相关抗原LFA-1、LFA-3等）、细胞因子受体（GM-CSFR、IL-1R、IL-10R及IL-4R等）、与吞噬有关的受体（如Fc受体（FcεR、FcγR）、补体受体、Toll样受体（TLR）、甘露糖受体（MRC1/CD206）以及其它一些凝集素受体，如DC-SIGN/CD209、Langerin/CD207、ASGPR、OLR1/LOX-1以及CLEC4A/DCIR等。需要指出的是，DC的表型随其在发育、成熟和活化的不同阶段而变化。DC的最大特点是，它是体内惟一能激活静息型T细胞产生初次免疫应答的细胞，而且它能点状放大刺激，并激活T细胞增殖。一个DC能够激活100~3000个T细胞，这是巨噬细胞和B细胞激发T细胞增殖及抗原提呈能力的100~1000倍。

2. 树突状细胞的发育

体内的树突状细胞均起源于多能造血干细胞。目前主要有两条公认的树突状细胞发育途径：髓系和淋巴系分化途径，即与吞噬细胞相同的髓系起源及与淋巴细胞相同的淋巴细胞系起源。以往的观点认为髓系来源的树突状细胞为“经典”的、常规意义上的DC（classical DC or conventional DC, cDC），而淋巴系来源的DC即为淋巴系树突状细胞。现在发现这种观点并不科学，在体外实验中发现将小鼠骨髓共同髓系前体（common myeloid progenitor, CMP）移植到放射线照射的受者小鼠，可重建其脾脏和胸腺cDC和pDC，而骨髓来源的淋巴系共同前体细胞（CLP）在体内和体外实验中都可分化为DC。因此，目前更多的科学家倾向于根据其形态和功能特点，将DC分为cDC和pDC，并将DC的起源和发育修正为图2的形式。

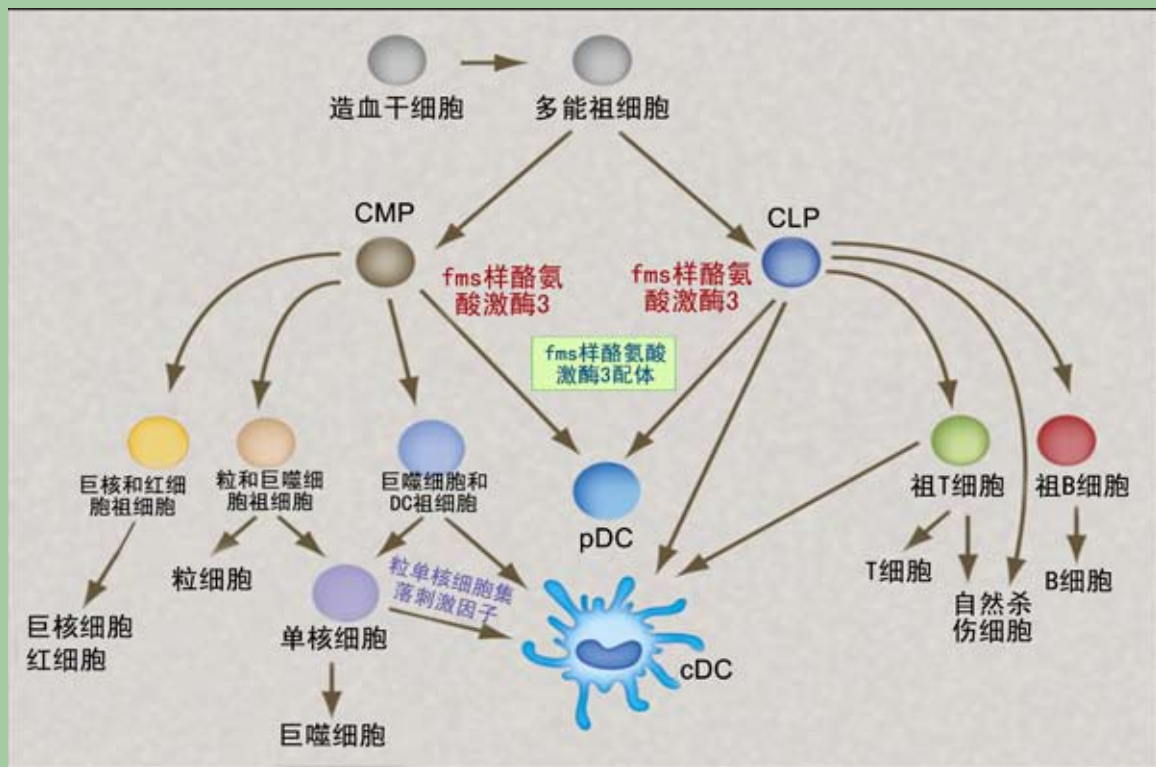


图2 小鼠树突状细胞的分化发育。

图片来源：曹雪涛，2009，免疫学前沿进展，人民卫生出版社，北京市，65-78.

2.1 cDC的髓系和淋巴系起源

小鼠骨髓前体细胞具有分化为巨噬细胞、粒细胞以及在GM-CSF作用下分化为DC的潜能。人类CD34⁺骨髓来源的前体细胞可分化为CD1a⁺粒细胞前体和具有双潜能的前体细胞群，后者的转归为：在粒单核细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF）、肿瘤坏死因子 α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）和白细胞介素4（interleukin-4, IL-4）作用下转变成未成熟DC，然后经CD40L或内毒素刺激下成为成熟DC；或在M-CSF诱导下转化为巨噬细胞。体外实验时可以利用GM-CSF和IL-4诱导外周血单核细胞向树突状细胞分化。另外，将小鼠CMP移植到放射线照射的受者小鼠，可重建其脾脏和胸腺cDC和pDC，这也直接证明了DC的髓系起源。朗格汉斯细胞、皮肤DC和间质DC均为髓系来源的DC。

胸腺cDC及小鼠脾脏、淋巴结cDC的某些亚群可表达淋巴样细胞相关的标志分子，包括CD8 α 、CD4、CD2、BP1及CD25等，提示某些DC为淋巴系起源。将胸腺内低表达CD4的淋巴样前体细胞转移到放射线照射的受者小鼠，可产生T细胞和CD8胸腺cDC。淋巴样树突细胞前体细胞在IL-3的作用下转变成未成熟DC，经CD40L作用成熟为淋巴样树突细胞。

2.2 pDC的发育

pDC因其在病毒感染后能够大量快速分泌 I 型干扰素，所以又被称为（type I interferon producing cell, IPC）。pDC是一支单独的造血细胞系，相对于髓系来源，其与B细胞系在发育上有着更近的谱系关系。最新的研究表明，CLP（common lymphoid progenitor）和CMP（common myeloid progenitor）中的Flt3⁺细胞都有可能发育为pDC（图2），转录因子E2-2是pDC发育的一个必需的和特异性的调节者。分化成熟的pDC可进入外周血液循环。不同于髓系细胞从输入淋巴管进入二级淋巴器官的是，pDC是经由高内皮静脉进入淋巴结的，这一点与T细胞和B细胞相同。进入淋巴结后，pDC在淋巴结中的T细胞聚集区定居下来。

2.3 DC发育的调节

就目前的研究而言，DC的发育主要有两个方面的调节作用：一是细胞因子的调节作用；二是转录因子的调节作用。

DC的髓样或淋巴样起源并不是绝对的，有证据表明cDC也可由淋巴系前体细胞分化而来，而pDC也可以由髓系的前体细胞分化而来。在DC发育过程中，Flt3（FMS-like tyrosine kinase-3, Flt3）在前体表面的表达是其分化成为DC的重要条件。骨髓细胞在Flt3L（fms-like tyrosine kinase 3 ligand）存在的情况下，主要促进CD8⁺ cDC和pDC的生成（图2）。Flt3基因敲除的小鼠有DC的缺陷，小鼠和人服用Flt3L后都可以大量扩增DC的数量（大约可增加10倍）。GM-CSF主要促进CD8⁺ cDC的生成，同时抑制Flt3L引起的促pDC的分化作用。而细胞因子TGF-β1对朗格汉斯细胞（LC）的分化发育具有至关重要的作用。

关于对转录因子的调节的研究发现，由于转录因子PU.1可以调控Flt3的表达，因而对cDC的发育非常重要。此外，锌指结构转录因子Ikaros对DC的发育也非常关键，其无义突变会导致CD8⁺ 和CD8⁺ cDC以及CD8⁺ pDC发育障碍。NF-κB信号通路的RelB或TRAF6缺陷导致CD8⁺ cDC发育障碍。亮氨酸链结构转录因子Batf3的缺失可导致CD8⁺ cDC发育缺陷。转录因子Id2是CD8⁺ cDC发育所必需的，它在造血祖细胞中过表达会抑制pDC的发育，这种抑制作用可能是通过拮抗转录因子HEB和E2A的活化而实现的。对pDC的发育而言，如前所述，螺旋-环-螺旋结构转录因子E2-2则发挥至关重要的作用，其它DC分化发育所涉及到的转录因子还有IRF2、IRF4、IRF8及stat3等（表1）。目前关于转录因子的研究尚停留在动物实验阶段（主要在小鼠完成），这些转录因子是否是人类DC发育分化中的关键因素还有待验证。

表1 树突状细胞分化发育中关键性的转录因子

转录因子	CD8 ⁺ DC	CD8 ⁻ DC	B220 ⁺ pDC	表皮朗格汉斯细胞
RelB ^{-/-}	有	无	ND	有
Ikaros ^{-/-}	15%	无	ND	ND
Ikaros DN ^{-/-}	无	无	ND	有
Ikaros Ik ^{L/L}	有	有	无	ND
PU.1 ^{-/-}	有	无	ND	ND
IRF2 ^{-/-}	有	20%	有	60%
IRF4 ^{-/-}	有	10%	50%	ND
IRF8/ICSBP ^{-/-}	5%	有	10%	40%
STAT3 ^{-/-}	10%	10%	ND	ND
Gfil ^{-/-}	50%	50%	50%	增加
Id2 ^{-/-}	5%	增加	增加	无
E2-2 ^{-/-}	有	有	无	ND
Batf3 ^{-/-}	无	有	有	ND
Runx3 ^{-/-}	增加	80%	ND	无
Xbp-1 ^{-/-}	40%	40%	25%	ND
TRAF6 ^{-/-}	有	4%	有	ND
Rbp-j ^{-/-}	有	30%	有	有

ND: not detected 未检测。

表格来源: Steinman RM, Idozaga J. (2010) Features of the dendritic cell lineage. *Immunological Reviews*, 234: 5-17.

2.4 DC的分离、体外诱导及扩增

虽然DC在组织中分布很广，但含量极少，生理情况下半衰期为数天到几周。因此，建立成熟的DC体外培养技术，以获得足够数量的有功能的DC就显得尤为重要。

最早的DC分离方法是利用DC与其它细胞的黏附性差异来分离获得的。DC具有轻度黏附特性，一般在经过分离液分离并经短暂培养后即自动从塑料平皿上脱落下来；而单核细胞、巨噬细胞可长时间黏附，借此可直接分离出体内的DC。但用这种方法获得的DC数量少、纯度低，为了解决DC的纯度问题，后续的科学家的在前述方法上实施亲和黏附法等改良手段，提高了DC的纯度问题，但是仍然未解决DC数量少的问题。

1992年，Steinman率先建立了采用GM-CSF从小鼠骨髓中大规模培养制备DC的方法。此后不久人们成功利用GM-CSF加TNF-α从CD34⁺造血干细胞中扩增到大量的

DC，使得对DC的研究获得突飞猛进的进展。1994年，Nikolaus Romani等人建立了应用GM-CSF与IL-4从人外周血大规模培养制备DC的方法，使人源DC的研究得以迅速发展。及后人们又建立并完善了多种培养扩增DC的方法，这使得对DC的研究更加深入。

体外诱生DC有许多不同的方案，应视组织来源而定，应用不同的细胞因子进行诱导培养。不同的细胞因子发挥着不同的作用：GM-CSF可诱导DC前体扩增，促使其分化，并可在体外维持DC存活；IL-4往往与GM-CSF同时使用，特别是将外周血单核细胞作为前体时，IL-4可抑制巨噬细胞克隆形成，诱导DC生长和成熟；当用骨髓或脐血CD34⁺细胞作前体时，则用TNF- α 代替IL-4，因其可降低粒细胞的产生，上调细胞GM-CSF β 链的表达，增强它对细胞因子信号的反应能力。在GM-CSF、TNF- α 和IL-4刺激的骨髓CD34⁺细胞培养体系中加入FMS样酪氨酸激酶3配体（Flt3L）可使DC的收获率提高，再加入干细胞因子可进一步提高收获率。不同的前体细胞、细胞因子和培养条件可以改变DC的表型和功能。GM-CSF和IL-4有利于髓系DC的分化、IL-3促进向淋巴系DC分化、CD40L则对两种DC的成熟都有促进作用，而IL-10、间充质干细胞则抑制其成熟。

3. 树突状细胞的分化和成熟

3.1 DC前体细胞（precursor DC, pre-DC）

DC前体细胞是在稳态下、尚无DC表型或功能的细胞，如血循环单核细胞是髓样DC的前体。DC前体细胞经血循环或淋巴循环进入多种实体器官及非淋巴组织的上皮部位，在微生物感染、炎症刺激及某些细胞因子作用下分化、发育为未成熟DC，其确切机制尚不清楚，例如(1)急性炎症时，髓系DC前体细胞能迅速动员至非淋巴组织。(2) GM-CSF、IL-4及TNF α 等细胞因子可在体外诱导外周血单核细胞分化为DC。

3.2 未成熟DC（immature DC）

稳态条件下，体内绝大多数DC处于未成熟状态，其生物学特征为(1)高表达与吞噬有关的受体，如Fc受体、补体受体、甘露糖受体及凝集素样受体等，它可通过受体介导的内吞作用或巨吞饮作用而有效地摄取抗原。(2)能表达MHC II类分子，具有很强的加工、处理抗原的能力。(3)低表达CD80、CD86及CD40等共刺激分子和ICAM等黏附分子，因而提呈抗原并刺激初始T细胞活化的能力很弱；体外激发混合淋巴细胞反应（MLR）的能力较弱；可参与诱导免疫耐受。未成熟DC一旦接触并摄取抗原或受炎症因子等影响，即开始从组织局部向外周淋巴器官迁移。迁移过程中，未成熟DC逐渐成熟，其抗原摄取能力逐渐下降，而提呈抗原并刺激初始T细胞活化的能力则逐渐增强。

3.3 成熟DC (mature DC)

DC成熟指DC对环境刺激发生反应所经历的复杂分化过程，从而获得启动适应性免疫应答的能力。刺激因子的类型决定DC分化的程序及其随后所启动免疫应答的性质。能诱导DC成熟的因素主要是微生物产物，如内毒素（LPS）、CpG等可作为TLR的配体而诱导DC成熟；炎性细胞因子，如TNF α 、IFN- γ 、TSLP及IL-10等都是诱导DC成熟的重要因子；DC自身所处的局部微环境以及刺激DC的抗原种类等，均可影响DC成熟。表2显示的是常见的可刺激DC成熟的刺激剂。

相对于未成熟DC，成熟DC会经历一系列的表型和功能成熟过程，(1)丢失介导吞噬的受体。(2)高表达MHC II类分子和共刺激分子，包括CD40、CD80和CD86。(3)形态发生改变。(4)启动抗原处理机制，包括溶酶体相关的膜蛋白（DC-LAMP）的水平增加。(5)趋化因子受体表达谱发生改变，CCR1、CCR5和CCR6等的表达降低，而CCR7的表达会增加，从而促使DC从外周组织传入淋巴管再迁移至邻近的次级淋巴组织。迁移至外周淋巴器官T细胞区的成熟DC高表达MHC I类/II类分子、共刺激分子和黏附分子（B7、CD40及ICAM-1），它能有效地将加工、处理后的抗原以抗原肽-MHC II类分子复合物的形式提呈给初始T细胞，并使之激活。成熟的树突状细胞是目前发现的唯一能激活未致敏的初始型T细胞的抗原呈递细胞。当机体遭遇病原微生物侵袭或体内有细胞发生恶变时，DC能很快获知这些信息，并将这些信息及时传递给免疫系统，同时将病原微生物或恶变细胞从体内清除出去。近年研究表明，CD83分子是人成熟DC特征性的表面标志。

表2 DC成熟的常见刺激剂

刺激剂	刺激方式
病原微生物的产物	通过Toll样、NOD、RIG-I及Mda-5等受体
淋巴细胞（NK、NKT、 $\alpha\beta$ T级 $\gamma\delta$ T）、中性粒细胞	通过CD40、淋巴毒素 α 、 β 受体
细胞因子	TNF、干扰素、TSLP及IL-10
内源性配体	尿酸、组胺、热休克蛋白、HMGBP1、防御素1及ATP
免疫复合物	通过活化和抑制FcR

表格来源：Steinman RM, Banchereau J. (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449: 419-426.

4. 树突状细胞迁移的过程及机制

树突状细胞的一个重要特征是其具有特殊的迁移能力，此乃DC分化、成熟和发挥抗原呈递功能必需的环节。介导DC迁移的关键因子是趋化因子，如巨噬细胞炎症因子（MIF）、活化T细胞分泌的趋化因子（RANTES）及单核细胞趋化因子（MCP-1）等。

DC迁移的过程是(1)趋化因子介导骨髓来源的DC迁移至非淋巴组织。(2)DC在浸润的组织局部捕获抗原而被激活，自分泌或旁分泌各种细胞因子，发生结构、功能改变而逐渐成熟，同时其表面趋化因子受体表达谱和表达水平会发生改变，在微环境中不同趋化因子的介导下，经由输入淋巴管和（或）血循环而迁移至局部淋巴结。(3)趋化因子介导进入淋巴结的DC定居于T细胞区。

4.1 DC由造血组织迁移至外周非淋巴组织

在外伤或炎症因子刺激下，单核巨噬细胞系统释放CC类趋化因子，如MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES及MCP-3等，诱导骨髓或脐血CD34⁺ DC前体细胞经毛细血管进入血流。外周组织的CD34⁺前体细胞为未成熟DC，其功能特征为具有很强的摄取、加工、处理抗原的能力，但提呈抗原的能力较弱。

血流中的未成熟DC高表达趋化因子受体CCR1、CCR2、CCR5、CXCR1和CXCR2，它对多数CC亚家族趋化因子，如MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES及MCP-3产生趋化活性，从而穿越血管壁并浸润外周组织，并在组织局部捕获抗原。

来源于造血组织的未成熟DC广泛分布于全身非淋巴组织，包括上皮组织、胃肠道、生殖和泌尿管道、气道以及肝、心、肾等实质脏器的间质等，构成初级保护屏障。外周组织中DC数量极低，它们主要分布于存在炎性细胞因子（如TNF- α 及IL-1）和抗原物质的微环境中。

4.2 DC由外周非淋巴组织迁移至淋巴结

进入外周非淋巴组织的DC捕获抗原，并在后续的迁移过程中逐渐成熟，其机制为(1)捕获抗原而被激活的DC的CCR5（配体为MIP、RANTES及MCP）表达相对减少，而CXCR4（配体为CXCL12）和CCR7表达增高，这利于DC从外周组织（如炎症部位）迁移至淋巴器官。(2)CCL19（MIP3 β 、ELC）和CCL21（SLC）为CCR7的高亲和力受体，在淋巴结输入管和派氏集合高内皮小静脉（HEV）高表达，进入淋巴结的DC通过其表面CCR7与相应配体结合，从而介导DC穿越HEV而归巢。

4.3 进入淋巴结的DC定居于T细胞区

进入淋巴结的DC表面高表达CCR7及CXCR4等趋化因子受体，同时对淋巴结T细胞区高浓度CXC亚类趋化因子（SDF- α 和MIP-3 β 等）反应性明显增强，这使DC向淋巴结T细胞区迁移。同时，脾脏、淋巴结T细胞区的成纤维网状细胞表面组成性高表达CCL21，从而促进DC和T细胞间的相互作用。DC完成迁移并定居于淋巴结T细胞区后，即停止合成MHC II类分子，但稳定高表达pMHC II类分子复合物、黏附分子和多种共刺激分子，故具有强的抗原提呈能力。成熟DC在CD40L作用下，能分泌各类细胞因子，从而有效激活初始T细胞并产生免疫应答。

三、树突状细胞的分类

DC广泛分布于机体的所有组织和器官，目前已知的DC亚群包括存在于淋巴组织、血液和非淋巴组织的cDC以及分泌I型干扰素的pDC。此外，根据来源、分布、分化状态和功能等，DC可分为不同类别。

1. cDC和pDC

树突状细胞最常用的分类方法，是将其分为cDC和pDC（表3）。cDC根据组织定位和表面marker的不同，又可进一步分为朗格汉斯细胞、真皮树突状细胞及血中的树突状细胞等。而组织定居的cDC根据CD8的表达，又可以分为CD8⁺ cDC和CD8⁻ cDC。CD8⁺ cDC表达IL-10p70、TLR3、4，它主要参与诱导Th0细胞向Th1细胞的极化，而CD8⁻ cDC则表达TLR4、7等，分泌趋化因子MIP1 α 及MIP1 β 等。

表3 人cDC与pDC的比较

	cDC (HLA-DR ⁺ CD11c ⁺)					pDC (HLA-DR ⁺ CD123 ⁺)
	朗格汉斯细胞	真皮DC		血中的DC		
		CD103 ⁻	CD103 ⁺	BDCA3 ⁻	BDCA3 ⁺	
分布	表皮、内脏粘膜	真皮	真皮	血、次级淋巴器官	血	血、次级淋巴器官、外周组织（例如皮肤和肺）
表达的C型凝集素	Langerin	DC-SIGN DEC205	Langerin DEC205	DEC205 DCIR	CLEC9A	BDCA2
TLR表达	TLR2,3,5	TLR2,3,4,5	TLR2,3,4,5	TLR2,3,4,7,8	TLR2,3,8	TLR7,9
细胞因子	IL-12、IL-15、IL-23、IL-6、TNF及IL-1 β					IFN α 、IFN β 、IL-6及TNF
功能	活化抗原特异性的CD4 ⁺ T细胞、CD8 ⁺ T细胞、B细胞及活化NK细胞					诱导T _{reg} 产生，诱导浆细胞产生，通过I型干扰素活化NK细胞

表格来源：Altfeld M, et al. (2011) DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nature Reviews Immunol*, 11: 176-186.

pDC的表面标志：小鼠为CD45RA^{hi}B220⁺CD11c^{low}CD11b⁻MHC-II^{low}、CD8 α 、TLR7及TLR9；人的则为CD4⁺CD45RA⁺IL-3R α (CD123)⁺CD11c⁻、TLR7及TLR9。

pDC和cDC有着非常大的区别。pDC特征性地表达TLR7和TLR9，但不表达TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6和TLR8。这种独特的TLR受体表达使pDC能够专门从事微生物单链RNA和双链DNA的识别。若pDC上的TLR被激活，则能够强烈和快速地诱导I型干扰素产生，以及细胞因子（高水平的TNF α 和IL-6）和趋化因子（MIP1 α 及MIP1 β 等）的分泌，另外还能诱导pDC的成熟和分化。BDCA2是一种C型凝集素蛋白，特异性地表达于人类pDC的表面，它能强有力地抑制TLR配体诱导pDC产生IFN反应的能力，于成熟时消失。而另外一种C型凝集素蛋白BDCA-4则可用于pDC的分离。pDC虽然也具有抗原呈递能力，但相对于cDC来说，其抗原呈递能力较弱。

2. 根据DC分布部位分类

DC按其组织分布可分为3类：(1)淋巴样组织DC，包括滤泡DC、并指状DC和胸腺DC。(2)非淋巴样组织DC，包括朗格汉斯细胞和间质DC。(3)循环DC，包括外周血DC和隐蔽细胞。不同部位DC其生物学特征及命名各异。

2.1 滤泡状树突状细胞（FDC）

关于FDC的起源目前还不是很清楚，有一些研究支持它的造血起源，更有一些资料提示它是基质细胞起源。一般认为，FDC可能由间质DC迁移至淋巴组织而生成，其表面具有树枝状突起。FDC主要分布于淋巴结、脾脏和肠相关组织（MALT）B细胞区的初级和次级淋巴滤泡中，它是一种非迁移性细胞群体。

可用于鉴别小鼠FDC的常用抗体为FDC-M1与FDC-M2，而可用于鉴别人FDC的常用抗体则为DRC-1、HJ2及KI-M4。

FDC还能表达其它表面标志，包括Fc γ RIIB/CD32、Fc ϵ RII/CD23、CR1/2/CD21/35、ICAM-1/CD54、VCAM-1/CD106、MadCam-1、8D6/CD320、CD40、TLR（2,3,4）及淋巴毒素受体等。

FDC所分泌的细胞因子和趋化因子有CXCL13、IL-6、IL-7、IL-15、BAFF及TNF α 等。

FDC与常规的DC不同，它不表达MHC II类分子，而是借助细胞表面高表达的FcR和补体受体与抗原-抗体-补体复合物结合，但结合后并不发生内吞，从而令抗原长期滞留于细胞表面（数周、数月、甚至数年），并参与生发中心的形成、免疫球蛋白的类别转换、记忆性B细胞的产生和维持等。

FDC周围聚集的B细胞能识别并结合被FDC滞留、浓缩的复合物形式的抗原，并加工处理后提呈给Th细胞，从而有效激发再次免疫应答。

FDC参与HIV、朊病毒等的感染，以及滤泡淋巴瘤和慢性炎症性自身免疫病的进程。

2.2 并指状DC (interdigitating DC, IDC)

IDC是参与初次免疫应答的重要抗原呈递细胞，它由皮肤朗格汉斯细胞移行至淋巴结衍生而来，分布于淋巴组织胸腺依赖区和次级淋巴组织中。IDC表面缺乏FcR和C3bR，但富含MHC I类和II类抗原。IDC通过其突起与周围T细胞密切接触，从而有效地将抗原提呈给特异性T细胞。多数IDC易凋亡，寿命短；少量IDC为长寿抗原呈递细胞，这可能与维持T细胞免疫记忆有关。

2.3 胸腺树突状细胞

胸腺DC约占骨髓来源胸腺细胞的0.1%，主要位于胸腺皮质/髓质交界处和髓质部分。虽然胸腺DC与外周淋巴器官IDC主要都来源于骨髓，但两者表面标志不完全一致。人胸腺DC高表达自身抗原、MHC II类分子和CD11，它们的主要功能是参与T细胞在胸腺的阴性选择，通过清除自身高反应性T细胞而诱导中枢耐受。胸腺DC生命周期很短，只有2~3周。

2.4 朗格汉斯细胞 (Langerhans cell, LC)

朗格汉斯细胞起源于胎肝或卵黄囊的前体细胞，其发育过程依赖细胞因子M-CSF。LC主要位于表皮和胃肠道上皮，为未成熟DC，表面高表达MHC I、II类抗原和Fcγ R、C3bR，胞质内含特征性Birbeck颗粒。LC比较特征性的标志是它与上述位于真皮的CD103⁺ DC一样都表达C型凝集素Langerin/CD207。LC的其它标志包括上皮细胞黏附分子EpCAM、F4/80、E-cadherin、DEC205/CD205和CD11b。

皮肤中活化的LC很少，它通过体外培养后经GM-CSF、IL-1刺激而活化，并发生以下变化：MHC II类分子和CD40表达上调；刺激同种异体T细胞增殖的能力增强；隐蔽的突起展开并且数量和长度增加；胞内酸性细胞器和Birbeck颗粒减少甚至消失；特征性CD1a标记可能消失。LC具有较强吞噬能力和抗原提呈能力。皮肤LC功能受神经-内分泌调控，提示神经末梢可能与皮肤LC的分布有关。LC还有一个特点就是，它一旦定位至表皮部位，则具有射线抗性。

2.5 间质树突状细胞 (interstitial DC)

间质DC主要是分布在心、肝、肾及肺等实质器官间质毛细血管附近的未成熟DC，它们高表达MHC II类分子，具有不规则膜突起。间质DC也可分布于骨骼肌和大血管内皮下，它们可能与动脉粥样硬化有关。分布于消化道、呼吸道和泌尿生殖道粘膜的间质DC（即黏膜DC）是一群特殊的DC，也称为哨兵细胞（sentinel cell），其形态和表面标志随环境不同而各异。例如，口腔黏膜DC高表达CD1a，含Birbeck颗粒；直肠DC表达CD1a；气管、支气管、肺泡、大肠、小肠、阴道和宫颈黏膜DC高表达MHC II类抗原。另外，大鼠间质DC可分布于某些免疫豁免区。表达树突细胞特异性细胞间黏附分子-3结合非整合蛋白（dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN/CD209）、CD11b和CD14常用DC-SIGN标志。

2.6 循环树突状细胞 (circulating DC)

循环DC包括两类：(1) 外周血DC，主要包括来自骨髓的DC前体细胞和经血循环迁移、携带抗原的LC及间质DC。(2) 隐蔽细胞 (veiled cell, VC)，它是输入淋巴管和淋巴液中迁移形式的DC，分布在全身淋巴管中。VC来源广泛，机体受感染、损伤等刺激后，全身各器官DC均迁移至淋巴管中成为VC，故此群细胞的标志和形态各异，但一般均表达MHC II类分子。至于生物学功能方面，VC具有较强的摄取抗原的能力、能在体外自发与T细胞形成DC-T细胞簇、可激活未致敏T细胞以及启动初次免疫应答。

3. 根据DC功能状态分类

根据DC功能状态不同，可分为耐受性DC和调节性DC。

3.1 耐受型DC

具有诱导免疫耐受功能的DC，主要有3种（表4）。

表4 具有诱导免疫耐受功能的DC的分类及简介

具有诱导免疫耐受功能的DC	简介
表达IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) 的DC	它是色氨酸代谢限速酶，具有免疫抑制作用，其机制为：(1)IDO促进色氨酸的分解，导致色氨酸耗竭，而缺失色氨酸（必需氨基酸）的T细胞的增殖会受到抑制。(2)色氨酸代谢产物（如犬尿氨酸、吡啶-2,3-二羧酸等）具有细胞毒性，可介导T细胞凋亡。
高表达ILT4 (immunoglobulin-like transcript 4) 的DC	它的配体是MHC I类分子。它受到信号通路激活后，通过募集含SH2结构的磷酸酶SHP-1而抑制胞外信号传递，以及保内Ca ²⁺ 离子动员和酪氨酸磷酸化，最终下调依赖NF- κ B的共刺激分子表达，抑制抗原特异性T细胞活化，从而诱导免疫耐受。
未成熟DC	它在功能上也可被视为耐受性DC。

3.2 调节性DC

在含IL-10、GM-CSF及TNF α 或脾脏基质细胞的培养体系中，小鼠骨髓细胞可分化为CD11c^{low} CD45RB^{high}调节性DC。有研究已发现，体内也存在该调节性DC亚群，它们主要分布于小鼠脾脏和淋巴结，具有浆细胞样和未成熟DC样表型，不表达B220、CD8、Gr-1，低表达CD11c、CD11b、DEC-205、MHC II、CD80和CD86；活化后高表达IL-10，不表达IL-2、IL-4及IFN- γ 。

调节性DC可诱导CD4⁺ CD25⁻ T细胞转化为高分泌IL-10的Tr1细胞，从而引起抗原特异性细胞免疫耐受。现在调节性DC的领域研究较热，已发现多个具有免疫调节作用的DC亚群，它们主要参与的是免疫耐受的诱导。国内有免疫学家在这方面做了非常重

要的工作。例如，曹雪涛等人发现新鲜分离的脾脏内皮细胞可以通过直接细胞接触和TGF- β 的作用来诱导CD11c^{hi}CD11b^{lo}MHC-II^{hi}的脾脏成熟DC重新获得增殖的潜能，并分化成为一种全新的调节性DC，这种调节性DC具有CD11c^{lo}CD11b^{hi}MHC-II^{lo}的表型，它们部分通过分泌NO而发挥对T细胞的抑制作用。而且，在脾脏内分离到了对应的一群CD11c^{lo}CD11b^{hi}MHC-II^{lo}细胞，它们在受到LPS刺激后分泌NO和IL-10并抑制T细胞的增殖。该研究小组还报告了体外长期培养的脾脏内皮细胞系以及肝脏基质细胞可以使CD117⁺Lin⁺HSCs分化发育为CD11c^{lo}CD11b^{hi}MHC-II^{lo}的调节性DC。这些工作提示了肝脾基质可以使以往认为处于终末分化状态的成熟DC再分化为能抑制T细胞的调节性DC，这有利于控制免疫反应强度、维持局部的稳态，同时可能代表了一种免疫微环境负向调控免疫反应的普遍机制。

此外，最近又发现了一群新的DC亚群——NKDC。NKDC的命名是因为其表面既表达NK细胞的表面标志（NK1.1），又表达树突状细胞的表面标志（CD11c）。从功能上说，它既具有NK细胞的细胞毒活性，又具有捕获和呈递肿瘤抗原给肿瘤特异性T细胞的特点。NKDC有可能在肿瘤免疫中发挥重要作用，杀伤肿瘤细胞，并把肿瘤抗原呈递给抗原特异性的T细胞。目前研究人员在人体内也发现了相应的细胞亚群，即一群具有杀伤功能的树突状细胞。

生命世界 无奇不有

www.LifeOmic.com

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

联系人：蔡小姐

四、树突状细胞的功能

1. 抗原提呈

1.1 DC捕获抗原的途径

机体内的DC大部分都处于非成熟状态，并且具有极强的抗原捕获能力。DC主要通过三种方式捕获抗原：胞吞（phagocytosis）、吞饮（pinocytosis）和受体介导的内吞作用（receptor-mediated endocytosis）。其中胞吞主要针对的是固相大颗粒性物质或微生物。然而，由于DC表面缺乏特异性抗原受体，所以以此方式进入细胞的抗原种类和数量受到限制，所幸液相吞饮作用能够弥补这一缺陷。液相吞饮主要针对的是液相中的可溶性抗原，这种方式的功能最为强大。一般认为，DC在成熟过程中，胞吞能力会逐步减弱，仅部分DC保留受体介导的内吞作用。

1.2 受体介导的内吞作用

DC在膜表面不同受体的帮助下可有效捕获低浓度抗原。目前人们已发现的与抗原捕获相关的受体包括DC-SIGN/CD209、Langerin/CD207、ASGPR、OLR1/LOX1及CLEC4A/DCIR等凝集素样受体、甘露糖受体MRC1/CD206、LY75(DEC205/CD205)及Fc受体等。在Fc受体的协作下，DC能够捕获免疫复合物性抗原；在甘露糖受体的帮助下，DC可以捕获甘露糖化岩藻糖化的抗原。此途径具高效性、选择性及饱和性等特性。DC成熟过程中，Fc受体及甘露糖受体等抗原捕获受体表达下调，同时它们摄取抗原的能力随之下降。

1.3 巨吞饮作用

DC具有强大的液相吞饮功能。通过膜皱缩和形成大囊泡，它们能在极低抗原浓度（ 10^{-10} mol/L）下有效摄取抗原。未成熟DC的吞饮速度快，吞饮量大。吞噬作用：DC仅在某些特定发育阶段具一定吞噬功能。某些部位或幼稚阶段DC可通过吞噬作用摄取大颗粒或微生物（ $> 0.5 \mu\text{m}$ ）。FDC还可长期储存捕获的抗原，从而维持记忆性B细胞克隆和血清抗体水平。

机体内的DC大部分处于非成熟状态，它们具有极强的内吞能力，可形成液相内吞作用，使得极低浓度（ 10^{-10} mol/L）的抗原得到提呈；DC也可通过受体介导对糖基化抗原进行内吞。抗原被DC摄取后，经过MHC II类途径处理、加工，形成抗原多肽，与细胞内MHC II类分子结合后提呈在DC表面，并可提呈24 h~48 h，以维持较长时间的免疫激发功能。因此，DC是体内抗原的主要摄取者和T细胞激活的主要承担者。

1.4 DC对抗原的加工和处理

根据抗原的性质和来源不同，DC可以通过以下四种途径进行抗原的加工、处理和

提呈：**MHC I类分子途径**（内源性抗原提呈途径）（图3）、**MHC II类分子途径**（外源性抗原提呈途径）（图3）、非经典的抗原提呈途径（MHC分子对抗原的交叉提呈）（图3）及脂类抗原的**CD1分子提呈途径**。

1.4.1 MHC I类分子途径

内源性抗原通过**MHC I类分子途径**加工处理与提呈。完整的抗原首先在胞质内降解成抗原肽，然后进行转运。已知胞质内蛋白酶体（**proteasome**）在内源性抗原的降解中可发挥重要的作用。蛋白酶体（**20S**）是胞内一种大分子蛋白水解酶复合体，它呈中空圆柱形结构，其中具有酶活性的组分主要是两种蛋白酶体 β 亚单位（**proteasome subunit beta type, PSMB**）**PSMB8**和**PSMB9**。这两种亚单位主要负责将溶酶体外的蛋白抗原降解为多肽。

蛋白酶体具有广泛的蛋白水解活性，可将内源性蛋白降解为**6~30**个氨基酸大小的多肽片段。在胞质中经蛋白酶体降解的抗原肽首先转移至内质网（**ER**）腔内与新组装的**MHC I类分子**结合。此过程依赖于ER表面的抗原加工相关转位物（**transporter associated with antigen processing, TAP**）。**TAP**是一种由两个亚单位（**TAP1**和**TAP2**）组成的异二聚体。**TAP1**和**TAP2**各跨ER膜6次、共同在ER膜上形成孔道。胞质中的抗原肽先与**TAP**结合，然后**TAP**以ATP依赖的方式对肽进行转运。与抗原肽结合后，**TAP**异二聚体结构改变，孔道开放，抗原肽得以通过孔道从而进入ER腔内。

TAP可选择性地转运适合与**MHC I类分子**结合的**8~12**个氨基酸的抗原肽。**MHC I类分子**的 α 链和 β_2m 在ER中合成，随后 α 链立即与伴侣蛋白（**chaperone**）结合。伴侣蛋白可以参与 α 链折叠、保护 α 链不被降解、参与 α 链与 β_2m 组装成完整的**MHC I类分子**，并参与**MHC I类分子**与**TAP**的结合。在伴侣蛋白的参与下，**MHC I类分子**组装为二聚体，其 α 链的 α_1 和 α_2 功能区构成抗原肽结合槽，在ER内与已被降解的**8~12**个氨基酸的抗原肽结合，形成复合物，随后经高尔基体转运至细胞膜上，提呈给**CD8⁺ T细胞**。

1.4.2 MHC II类分子途径

外源性抗原主要通过**DC的MHC II类分子途径**加工与提呈。外源性蛋白抗原进入体内后被抗原提呈细胞识别，并被其摄入，从而在胞内形成一种膜性细胞器——内体（**endosome**）。进入内体的蛋白质在酸性环境中被附着于内体膜上的蛋白酶水解为多肽片段，然后随内体转运至溶酶体或融合为内体/溶酶体。溶酶体及内体是抗原提呈细胞加工处理外源性抗原的主要场所。溶酶体含组织蛋白酶、过氧化氢酶等多种酶，且为酸性环境，可将蛋白抗原降解为适合与**MHC II类分子**结合的含有**10~30**个氨基酸残基的短肽。

在粗面内质网（**rough endoplasmic reticulum, RER**）中新合成的**MHC II类分子**的 α 链与 β 链折叠形成二聚体，随后在粗面内质网膜上与一种称为**Ia**相关恒定链的辅助分子结合形成（ $\alpha\beta Ii$ ）**3**九聚体。**MHC II类分子**在与抗原肽结合前被高尔基体由ER转运到内体，形成富含**MHC II类分子**的腔室（**MHC class II compartment, MIIC**），在腔内**Ii**被降解，仅在**MHC II类分子**的抗原肽结合槽内留有一小片段，即**MHC II类分子**相关的恒定链多肽（**class II-associated invariant chain peptide, CLIP**）。

MHC II类分子的 α_1 与 β_1 功能区形成抗原多肽结合槽，其两端为开放结构，与之结合的最适抗原肽约含**13~18**个氨基酸。在**MIIC**中，在**HLA-DM**分子的帮助下，**CLIP**与

抗原肽结合槽解离。占据MHC II类分子抗原肽结合槽的CLIP被待提呈的抗原肽置换，形成稳定的抗原肽-MHC II类分子复合物，随后被转运至细胞膜表面，供CD4⁺ T细胞识别，从而将外源性抗原提呈给CD4⁺ T细胞。此外，部分外源性抗原也可不通过II依赖性途径与MHC II类分子结合。它直接与胞膜表面的空载MHC II类分子结合后，被吞噬进入细胞内，在内体中抗原被降解为多肽，随后与再循环至胞内的空载的成熟MHC II类分子结合，形成稳定的抗原肽-MHC II类分子复合物，转运至细胞膜进行抗原多肽的提呈。

1.4.3 非经典的抗原提呈途径（MHC分子对抗原的交叉提呈）

抗原的交叉提呈（cross-presentation）也称交叉致敏（cross-priming），主要是指抗原提呈细胞能够将外源性抗原摄取、加工和处理，并通过MHC I类分子途径提呈给CD8⁺ T细胞（CTL）。现已证实，MHC分子对抗原的提呈确实存在交叉提呈的现象，少数外源性蛋白质抗原通过胞质的TAP依赖途径或非依赖途径，循MHC I类分子途径提呈给CD8⁺ T细胞；除了MHC I类分子提呈外源性抗原外，内源性抗原在某些情况下也能通过MHC II类途径加以提呈。目前认为抗原的交叉提呈参与了机体对病毒（如疱疹病毒）、细菌（如李斯特菌）感染和大多数肿瘤的免疫应答过程，但是这种途径并非抗原提呈的主要方式。目前人们对于交叉提呈的相关机制还不是很清楚，有研究发现主要是自噬的相关的机制参与其中。

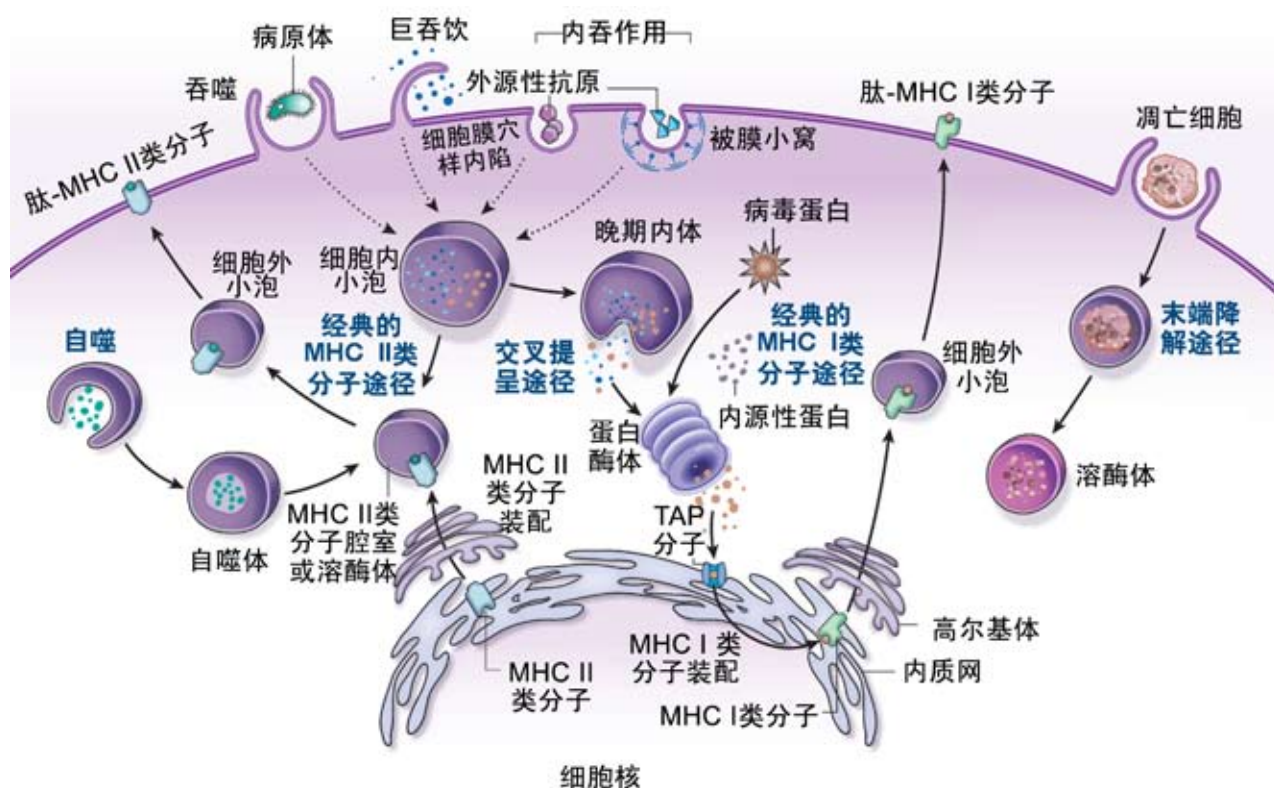


图3 MHC I类分子和II类分子的抗原加工提呈过程以及交叉提呈。

图片来源：Hubbell JA, et al. (2009) Materials engineering for immunomodulation. *Nature*, 462: 449-460.

1.4.4 脂类抗原的CD1分子提呈途径

哺乳动物细胞不能将脂类抗原加工处理成为能与MHC分子结合的多肽，因而脂类抗原不能被MHC限制的T淋巴细胞识别。目前人们发现，脂类抗原（例如分支杆菌胞壁成分）可与表达于DC等的抗原提呈细胞表面的CD1分子结合而被提呈。CD1是一类MHC I类样的分子，包括CD1a~e五个成员。目前认为，CD1a~e（CD1d除外）主要将脂类抗原提呈给特定的T细胞以介导对于病原微生物的适应性免疫应答，其中CD1d主要将脂类抗原提呈给NKT细胞以参与固有免疫应答。

CD1分子既可以提呈外源性脂类抗原，也可以提呈自身脂类抗原。新合成的CD1分子与胞内脂质结合后转至细胞膜表面，然后内化。CD1在内体或溶酶体中与外源性脂类抗原结合，随后它们被运行至细胞膜表面参与抗原提呈。鉴于此，CD1分子提呈脂类抗原不依赖于TAP或HLA-DM分子，主要是通过CD1分子的再循环过程来完成，而没有明显的抗原的加工处理。

2. 激活初始T细胞

DC是体内激活初始T细胞的最重要的APC，它既能提供初始T细胞活化所需的抗原刺激信号，也能提供共刺激信号。

2.1 为T细胞活化提供第一信号

DC将肽-MHC复合物提呈给T细胞，TCR特异性识别在MHC分子槽中的抗原肽，并与之结合，启动抗原识别信号（即第一信号），导致CD3和辅助受体（CD4或CD8）分子的胞浆段尾部聚集，激活与胞浆段尾部相连的酪氨酸激酶，促使CD3分子胞浆区ITAM中的酪氨酸（Y）磷酸化（pY）。pY使下游含酪氨酸的蛋白磷酸化，启动激酶活化的级联反应，最终通过激活转录因子，进入核内，结合于靶基因，调控细胞增殖及分化相关基因，表达相应功能。

2.2 为T细胞活化提供第二信号

T细胞与DC细胞表面由多对免疫分子组成。这些分子包括免疫球蛋白超家族的B7/CD28、B7/CTLA4、LFA-1/ICAM-1或ICAM-2、CD2/LFA-3，以及TNF/TNF受体超家族的CD40/CD40L等。

CD28/B7是重要的共刺激分子，其主要作用是促进IL-2基因转录和稳定IL-2 mRNA，从而明显促进IL-2合成。T细胞在缺乏共刺激信号的情况下，抗原识别介导的第一信号非但不能有效激活特异性T细胞，反而导致T细胞无能（anergy）。激活的专职APC高表达共刺激分子，而正常组织及静止的APC则不表达或仅低表达共刺激分子。缺乏共刺激信号可使自身反应性T细胞处于无能状态，从而有利于维持自身耐受。

活化的第一信号和第二信号共同启动了获得性免疫应答，包括T细胞的克隆扩增和分化为效应性T细胞。而DC所分泌的细胞因子可为T细胞活化提供第三信号，从而决定T细胞的命运。

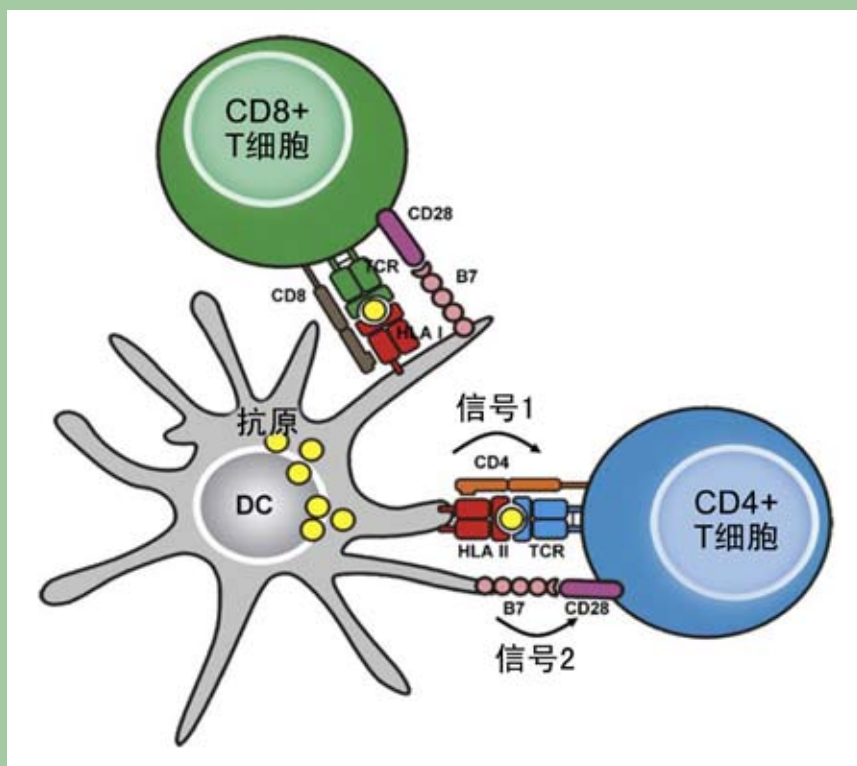


图4 DC为T细胞活化提供双信号。DC表面的MHC抗原肽复合体与T细胞表面的TCR结合提供活化的第一信号，DC表面的B7分子（CD80/CD86）与T细胞表面的CD28分子结合提供活化的第二信号。

图片来源：Berntsen A, Geertsens PF, Svane IM. (2006)Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 50: 34-43.

3. 参与T细胞分化发育

参与T细胞在胸腺内的发育：DC作为重要的胸腺基质细胞，对T细胞在胸腺中的选择过程起重要作用。胸腺DC表面高表达MHC II类分子，双阳性胸腺细胞在TCR重排后识别胸腺皮质DC表面的自身MHC分子，通过阳性选择而存活；进入胸腺髓质的单阳性T细胞通过识别胸腺DC表面自身肽-MHC分子复合物而经历阴性选择。同时，胸腺DC还表达LFA-1、CD40、CD30L和FasL等膜分子，它们通过与T细胞表面ICAM-1、CD40L、CD30和Fas相互作用，参与介导T细胞对自身抗原的中枢耐受。

参与外周T细胞的活化：一般认为，DC分泌IL-12，作用于Th0细胞使之向Th1细胞分化；DC若分泌IL-4，则作用于Th0细胞使之向Th2细胞分化。

参与记忆性T细胞形成：外周淋巴器官T细胞依赖区中有极少量长寿IDC，它们可能与T记忆细胞的形成和维持有关。

4. 诱导免疫耐受

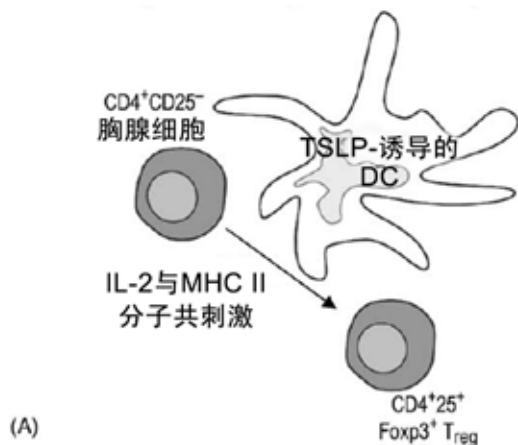
树突状细胞既参与中枢免疫耐受的诱导，又参与外周免疫耐受。中枢免疫耐受主要是在胸腺内参与胸腺细胞的阴性选择。胸腺髓质DC参与T细胞的阴性选择，通过排除自身反应性克隆，在建立中枢免疫耐受中发挥重要作用。另外，未成熟DC在外周免疫耐受中也发挥关键性作用。静息状态下，骨髓来源的未成熟DC经血液、非淋巴组织向淋巴组织T细胞区迁移，此过程中DC不断捕获自身抗原（包括死亡的自身细胞核内环境中的其它蛋白），并因此诱导相应T细胞产生耐受。

未成熟DC诱导外周耐受的机制可能是(1)未成熟DC不表达或低表达共刺激分子CD80及CD86，抗原提呈时因缺乏共刺激分子信号而诱导T细胞失能。未成熟DC虽然具有强大的内吞作用，但其抗原呈递能力低下。在体外实验中，如给予低剂量的GM-CSF或大剂量的LPS则可培养出未成熟DC。这种DC只表达与抗原呈递相关的MHC I类及II类分子，几乎不表达CD40、CD80、CD86及黏附分子等提供协同活化信号的分子。(2)接受自身抗原刺激的未成熟DC可诱导调节性T细胞的产生，后者可分泌具有负调节作用的IL-10，从而参与免疫耐受的建立。(3)诱导T细胞凋亡，用抗原负载的未成熟DC证实，生理状态下的DC可在外周组织摄取自身凋亡细胞，诱导自身抗原特异性T细胞的清除。

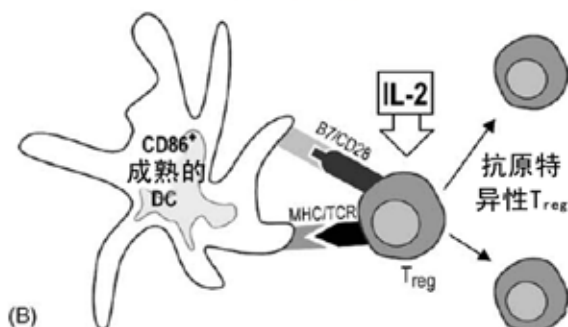
未成熟DC诱导外周免疫耐受的特点为(1)未成熟DC须摄入一定量自身抗原，此乃诱导外周耐受的前提。(2)未成熟DC表面的DC-SIGN受体与静止T细胞表面的ICAM-3结合，可提供自身反应性T细胞激活信号。(3)摄取自身抗原的未成熟DC本身可分泌IL-10，有助于耐受的诱导。(4)具有可逆性。

另外一个很重要的DC参与免疫耐受的机制是静态时它对 T_{reg} 数量的控制作用。DC的存在对于 T_{reg} 的自稳性增殖非常重要，缺失DC会导致 T_{reg} 的减少，并且剩余的 T_{reg} 的Foxp3表达明显降低。而且，成熟DC可以通过IDO（indoleamine 2,3-dioxygenase）依赖的方式促进 T_{reg} 的扩增。DC对天然 T_{reg} 和外周 T_{reg} 的发育均有促进作用，当来自于Rag2^{-/-} HA转基因小鼠（这种小鼠Foxp3⁺ T细胞缺失）的CD4⁺CD25⁻ T细胞被过继转移到正常小鼠中，并注射融合蛋白抗DEC205-HA后，这群细胞能转化为Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T细胞。TGF- β 1和IL-10在DC诱导 T_{reg} 和Tr-1的生成中也发挥重要作用。有人还发现，小肠固有层的DC能够以一种TGF- β 和微生物A代谢产物维甲酸依赖的方式在体外诱导 T_{reg} 。最近有研究表明，来源于肠系膜淋巴结的DC在共培养体系中通过分泌TGF- β 能诱导大概4%的CD4⁺ T细胞表达Foxp3。执行控制 T_{reg} 数量的肠系膜DC亚群是CD103⁺ DC（其特征性标志有DEC205/CD205及Langerin/CD207，有时也表达CD8）。其它一些能够诱导耐受性DC的方式也能够诱导调节性T细胞的产生，如维生素D3及DP1拮抗剂（BW245C）。DC不仅是 T_{reg} 的诱导者，也是 T_{reg} 发挥抑制功能的靶点。近年研究表明， T_{reg} 能够改变DC的表型和细胞因子分泌从而控制免疫应答（尤其值得注意的是，B7-H3和B7-H4在其中发挥了重要的作用）。另外，有研究还发现当有 T_{reg} 存在时，DC和效应性T细胞间的接触时间减少了3倍，表明 T_{reg} 抑制两种细胞群体之间的稳定接触。

胸腺内发育和扩增



外周扩增



抑制模式

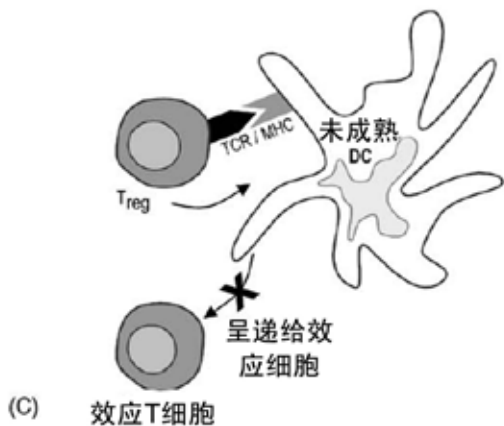


图5 DC调节 T_{reg} 的发育和扩增。A. TSLP诱导的DC在胸腺内可诱导 T_{reg} 的产生；B. 在外周DC可诱导抗原特异性 T_{reg} 产生；C. 未成熟DC的免疫抑制作用。

图片来源：Tarbell KV, Yamazaki S, Steinman RM. (2006) The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Seminars in Immunology*, 18:93-102.

5. 参与免疫调节

DC通过分泌不同细胞因子及改变其膜表面共刺激分子表达来调节Th亚群分化、发育、并影响适应性免疫应答类型和强度。已有报道指出，DC对不同 $CD4^+$ Th细胞亚

群功能分化和功能识别具有调节作用。例如，DC通过表面TLR9识别CpG，TLR4识别LPS后分泌IL-12促使Th0细胞向Th1细胞分化，并介导细胞免疫应答。DC通过表面TLR2识别配体后分泌的IL-4促使Th0向Th2细胞分化，并介导体液免疫应答。此外，DC可促进Th17细胞分化；用完整的*E.coli*与结合于嘌呤能P2受体上的ATP刺激人单核细胞来源的DC能够产生IL-23，进而诱导Th17的产生。鼠髓系来源位于中枢神经系统中的CD11b⁺ DC能够产生IL-23、TGF- β 和IL-6，进而诱导EAE模型中Th17的产生。肠道中的CD11b⁺ DC可以促进Th17的分化，而巨噬细胞则可以抑制DC的效应。另外，人源DC可以体外诱导多功能的Th17细胞，并同时分泌IL-17和IFN- γ 。对于最近的一个新的热点——T细胞亚群Tfh（T follicular helper cell）来说，DC也发挥一定的作用。有报道称，成熟的人源DC可以通过IL-12诱导初始型CD4⁺ T细胞发育为分泌IL-21的Tfh。此外，DC还可对固有免疫的细胞起免疫调节作用，如通过分泌细胞因子等介导NK细胞的活化等。

除了在免疫应答中发挥正性的辅助性作用外，DC还可发挥免疫抑制作用。DC可产生抑制性的细胞因子TGF- β 和IL-10，T_{reg}和1型调节性T细胞——Tr1细胞的产生，从而抑制效应性T细胞的功能（前文已作叙述，此处不再赘述）。

另一方面，不同Th细胞亚群所产生的细胞因子也能影响DC发育、分化及成熟。

6. 参与B细胞发育、分化与激活

位于外周淋巴器官B细胞依赖区的FDC可参与B细胞发育、分化、激活剂记忆性B细胞的形成和维持，其主要作用为(1)促进生发中心淋巴细胞对抗原产生特异性反应。(2)参与B细胞膜表面高亲和力Ig表达和V区基因重排。(3)高表达FcR、CR等受体，有利于持续附着一定量抗原，通过长时间刺激记忆性B细胞，使其保持免疫记忆。(4)促进静止B细胞表达B7分子，并发挥抗原提呈功能。(5)通过释放可溶性因子直接调节B细胞生长与分化。(6)增强细胞因子诱导的CD40⁺ B细胞的生长和分化。

7. pDC的功能

作为一个体内I型干扰素的主要产生细胞，pDC主要参与抗感染免疫。此外，它也具有一定的抗原呈递能力，只不过这种能力较弱。值得注意的是，pDC具有与cDC一样的免疫调节作用，包括(1)pDC对T细胞免疫功能的诱导与调控作用。未成熟pDC诱导特异性CD4⁺ T细胞的失能；CD40L刺激成熟的pDC诱导CD8⁺调节性T细胞的产生；由IL-3或/和CD40L联合刺激的pDC能诱导T细胞向TH2型分化；肿瘤组织及其引流淋巴结中分离的pDC可抑制T细胞的免疫功能。(2)对B细胞的作用。pDC诱导成熟B细胞分化为浆细胞。(3)对NK细胞作用。病毒活化的pDC可调节NK细胞对病毒的杀伤活性。(4)pDC可诱导单核细胞向树突状细胞分化。

五、树突状细胞与疾病的关系

树突状细胞参与多种疾病的发生、发展如感染、肿瘤、过敏性疾病以及移植排斥反应等，下面就树突状细胞与疾病的关系分别做一介绍。

1. 树突状细胞与感染

DC在感染性疾病中发挥了重要作用。一般情况下，病原体入侵时，微生物产物激活自然免疫机制，包括病原微生物被DC摄取、加工及递呈，产生对宿主有益的反应。这方面已经有相当多的证据，如当病原微生物与DC一起注入小鼠，可诱导针对博氏疏螺旋体、衣原体、硕大利什曼原虫、真菌、鼠弓形体、疟疾及HIV等的特异性的适应性免疫应答。相反，如果去除DC则可以降低针对巨细胞病毒（CMV）、合包体病毒（HSV-2）和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）的防御作用。在人体被细菌性败血症和登革热病毒感染时，如缺乏循环DC，则预后较差。

但是，病原体可通过多种方式逃避免疫反应，包括(1)阻止DC的成熟。DC表面有多种模式识别受体，如Toll样受体和凝集素样受体、细胞质NOD/NALP、RIG-I/DDX58和MDA5/IFIH1分子等。正常情况下，这些模式识别受体与病原微生物的主要产物等病原相关模式结合后可诱导DC的成熟，但是有一些病原微生物具有阻止DC成熟的能力，例如伯纳特立克次体、伤寒杆菌，炭疽致死因子蛋白、疟原虫、溃疡分枝杆菌，以及多种病毒（牛痘病毒、单纯疱疹病毒、艾滋病病毒（HIV）、CMV、水痘带状疱疹病毒、人丙型肝炎病毒（HCV）、埃博拉病毒、拉沙病毒和麻疹病毒等）。但是毒黄热病病毒疫苗在发挥作用时可能通过感染DC并促进其成熟，从而呈递抗原给T细胞则是例外。(2)改变机体内DC的数量。例如鼠疫耶尔森杆菌、伤寒杆菌选择性地将毒素注入吞噬细胞（包括DC），从而摧毁这一类在固有和适应性免疫应答中发挥重要作用的细胞。流感、麻疹和HSV-2诱导树突状细胞的程序性死亡。(3)阻止DC的迁移。CMV、疱疹病毒及分支杆菌等抑制DC的迁移步骤主要是通过阻止趋化性细胞因子受体CCR7的表达而实现的。CCR7是引导DC从血流迁移至外周淋巴器官的关键性趋化性细胞因子受体。(4)改变DC的生理功能。在烟曲菌、疟原虫及丙型肝炎病毒感染时，DC功能发生改变，从而诱使保护性的Th1反应变成非保护性的Th2反应，或者在百日咳感染时，促进IL-10的产生。(5)有些病原微生物利用DC以达到在感染个体复制和扩散的目的。凝集素受体DC-SIGN/CD209可被登革热和埃博拉病毒利用来感染DC。在人T细胞白血病病毒（HIV1）、CMV、埃博拉病毒感染时，凝集素可在DC内隔绝病毒，使其不至于去感染如T细胞等靶细胞。此外，DC还参与水痘带状疱疹病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、烟曲菌、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、鼠弓形体、朊病毒及戴文氏杆菌感染等。

近年来国际上较为关注HIV与DC的关系。下面我们将用更多的笔墨来梳理清楚它们之间相关关系的最新研究进展。

长期以来，科学家们对艾滋病病毒（HIV）相对于其它病原体更难感染人类的原因困惑不已，直到发现了DC的一种朗格汉斯细胞特异性表达的蛋白质——**langerin**，人们才豁然开朗。DC因其独特的组织分布、主要在黏膜表面表达以及强大的抗原捕获能力而成为人体抵御HIV感染的第一道防线。但有研究发现，HIV要感染DC并非易事。介导HIV感染DC的受体包括感染T细胞所需的CD4分子及趋化性细胞因子受体（CCR5和CXCR4）等。此外，DC表面表达多种多样的C型凝集素受体，有些是选择性表达于某些DC的亚群。cDC表达C型凝集素样受体DC-specific C-type lectins（DC-SIGN），朗格汉斯细胞不表达DC-SIGN，却表达另外一种凝集素**langerin**（又称为CLEC4k或CD207）和C免疫受体（DCIR，也称为CLEC4A）。

Langerin可与HIV病毒结合，将其内在化而进入Birbeck颗粒。在此颗粒内，HIV病毒被快速降解。因此朗格汉斯细胞构成了抵御病毒感染的第一道天然屏障。如果HIV的浓度非常高，那么它就会以langerin非依赖的方式内在化入细胞内，携带完整的HIV病毒至T细胞区感染CD4⁺ T细胞。因此，尽管DC本身并不易被HIV病毒感染，但当与T细胞接触时，它却能促进HIV对CD4⁺ T细胞的感染。这过程主要是由DC-SIGN凝集素样受体介导的。DC-SIGN能够结合HIV病毒，在将病毒转移给T细胞之前，DC-SIGN可以将完整病毒停留在细胞胞质内很长的一段时间。体外实验发现，DC-SIGN稳定表达的细胞可将HIV完整病毒滞留3-6天。随后，与T细胞混合后，DC可将病毒转给T细胞。HIV感染的DC与T细胞相互接触后，两种细胞之间形成病毒突触，CD4分子以及CCR5和CXCR4在病毒突触旁边富集，促进了病毒感染CD4⁺ T细胞。这表明DC在HIV感染时可以发挥双重角色，即在感染局部DC接触病毒时有抑制病毒复制的作用，但当病毒感染T细胞时，又有促进病毒感染T细胞的能力。

DC除了细胞表面的langerin具有抑制病毒感染的作用外，细胞内也有限制病毒感染复制的分子。这些分子主要分为两大类：APOBEC家族和TRIM家族分子。APOBEC3G(A3G)是一种DNA脱氨酶，它可在病毒产生时被整合到病毒体内，然后诱导大量的G-A高频突变至新生的病毒DNA内。A3G也可以以编辑非依赖的方式发挥作用。HIV在CD4⁺ T细胞中复制时则发挥限制因子的作用。

APOBEC3E与APOBEC3F（它的作用较弱）可在单核细胞衍生的DC中限制HIV的复制。在体外培养中发现一群易被HIV感染的DC细胞是APOBEC3G基因缺陷。在DC成熟过程中，随着低分子量活性形式的APOBEC3G增加，HIV感染减少，细胞质内存在大量活性形式的APOBEC3G的单核细胞，则对HIV感染有抗性。

临床上发现，HIV感染导致进行性的血中DC频数（cDC和pDC）减少，这与血浆中病毒负载量的增加以及疾病的进展密切相关。DC数目的减少在急性病毒感染时就发生了，并在病毒感染时一直持续。在慢性感染的病人血中也发现DC数目比未感染者低，究竟是什么原因造成这一现象的呢？如前所述，DC受HIV感染的几率较小，因此因直接被HIV病毒感染而导致DC数目减少的可能性不大。目前已知的主要是间接机制，包括(1)病毒感染后产生的大量I型干扰素IFN α 能阻碍单核细胞或其它前体细胞分化成cDC。(2)HIV感染的DC比未受感染的DC更容易发生细胞凋亡。(3)感染后，DC在体内有一个重新分布至次级淋巴器官的过程。有研究表明HIV病毒感染后，淋巴结合脾脏中的pDC数量增加。

受HIV感染的DC还会呈现功能障碍。已知通过DC-SIGN与HIV相互作用后会负向调控TLR诱导的cDC活化，因此HIV病毒感染会使血中的cDC的成熟受损。在HIV感染急性期，pDC产生IFN α 的能力下降。但是感染后期产生IFN α 的能力又有所增加。此外，pDC在感染后产生IDO，并通过IDO的表达促进T细胞向T_{reg}分化，从而发挥免疫抑制作用。HIV病毒感染CD4⁺ T细胞非常有效，但在活化T细胞内的HIV病毒的大量复制会导致T细胞死亡。另外，受感染的DC和T细胞产生抑制性细胞因子IL-10从而诱导免疫抑制，这些都是HIV躲避免疫系统攻击的重要机制。

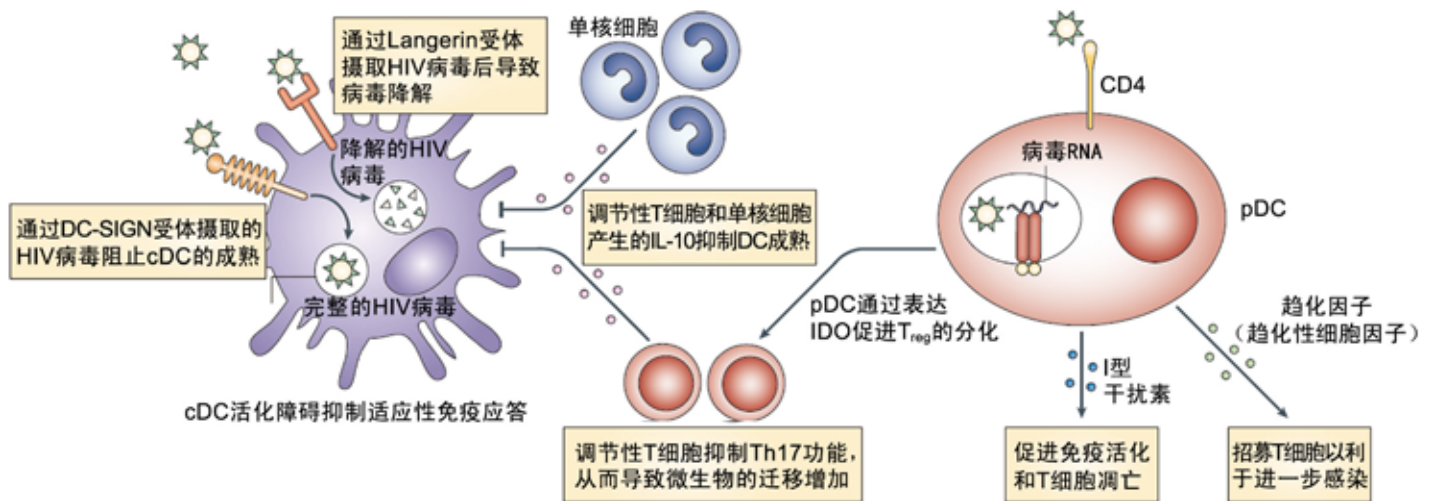


图6 cDC和pDC在HIV病毒感染时的作用。cDC在启动适应性免疫应答中发挥关键作用。在HIV病毒感染时cDC功能受损，这主要由于直接（病毒通过DC-SIGN与cDC直接相互作用）或间接机制（在感染过程中，单核细胞产生的IL-10）的作用。cDC功能抑制导致抗病毒适应性免疫应答缺陷。pDC主要是固有免疫的参与者，HIV感染pDC后产生大量的I型干扰素以抑制病毒的复制，诱导邻近T细胞的死亡。而且，pDC产生针对T细胞的趋化因子，从而招募T细胞以利于HIV的感染和病毒扩散。pDC可促进T_{reg}的产生，T_{reg}再对cDC的功能发挥抑制作用。

图片来源：Altfeld M, et al. (2011) DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nature Reviews Immunol*, 11: 176-186.

2. 树突状细胞与自身免疫病

免疫自稳是机体免疫系统维持内环境稳定的一种生理功能。该功能正常时，机体可及时清除体内损伤、衰老、变性的细胞和免疫复合物等异物，从而对自身成分保持免疫耐受；该功能失调时，可发生生理功能紊乱或自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的特点就是机体对自身结构免疫耐受性的丧失，从而导致针对某些特殊器官破坏性的过程。作为免疫应答的启动、调控和维持因素，DC具有介导免疫性和耐受性的双重功能。对自身抗原的不合时宜的反应，会导致慢性炎症的发生，最终导致自身免疫病的发生。呈递自身抗原的DC在这个过程中发挥了重要的作用，它可导致自身反应性T、B细胞扩增从而诱导自身免疫病的发生。

导致自身免疫病发生的一个关键步骤就是特定细胞因子的过度产生，而树突状细胞是这类细胞因子的主要产生细胞。自身反应性T细胞破坏组织细胞而释放的坏死物质可刺激DC分泌I型干扰素 $IFN\alpha/\beta$ 以及 $TNF\alpha$ ，进而加重炎症性免疫反应。DC是 $TNF\alpha$ 的主要来源，在牛皮癣发生时，受损皮肤局部的DC亚类是 $TNF\alpha$ 的主要来源，阻断 $TNF\alpha$ 可显著改善类风湿性关节炎和牛皮癣的病程。近年有针对pDC与系统性红斑狼疮（SLE）发病密切相关的报道。SLE病是由自身核抗原抗体复合物沉积而导致的自身免疫病，发病时I型干扰素大量产生。

pDC是I型干扰素的主要产生者，它可诱导自身反应性T细胞的活化，促进未成熟DC活化，产生反应性抗体。除SLE外，I型干扰素和pDC也参与如牛皮癣、皮肤肌炎、干燥综合症等自身免疫病的发生。另外，树突状细胞分泌的IL-23也是驱动自身免疫病病程的一个关键性细胞因子，如参与牛皮癣、炎症性肠炎的进程等。

已知DC在自身免疫病中发挥重要作用，针对DC的治疗手段也可用于自身免疫病的治疗。这些治疗手段包括(1)借助多种治疗手段，如糖皮质激素可减少DC的数目，并降低其功能。(2)减少DC所产生的 $TNF\alpha$ 、 $IFN\alpha/\beta$ 等致病性细胞因子。(3)利用DC扩增抗原特异性 T_{reg} ，从而抑制免疫反应。在自发性糖尿病动物模型鼠NOD中发现，可利用DC扩增特异性地针对胰岛素产生 β 细胞的调节性T细胞有效缓解糖尿病的发病，这是DC参与免疫耐受维持的一个重要体现。DC所激发的针对自身抗原的保护作用具有长期性、抗原依赖性、可转移性等特点，是一种主要诱导的免疫耐受。

3. 树突状细胞与过敏性疾病

正常的情况下，DC保证免疫系统对环境中所接触的无害的抗原处于免疫耐受状态。这些抗原包括花粉、尘螨、食物等可引起呼吸道或肠道致敏的抗原。粘膜表面的DC捕获这些抗原蛋白后促使相应的T细胞处于不应答的状态，可能的机制是通过细胞表面的ICOSL-ICOS的相互作用诱使T细胞分化为抗原特异性的产生IL-10的调节性T细胞。在发生过敏的情况下，免疫耐受被打破，CD4⁺辅助性T细胞分化成特应性的Th2细胞，产生大量的IL-4、IL-5和IL-13，从而参与疾病发生的多个方面，如这些细胞因子可诱导体液免疫发生类别转换，产生大量的IgE型抗体。

有一个非常重要的科学问题就是，过敏时为何发挥免疫耐受作用的DC会发挥截然相反的作用。目前有研究发现细胞因子在这一过程中发挥重要的作用，如最近的研究表明胸腺基质细胞淋巴生成素（thymic stromal lymphopoietin, TSLP）在特应性皮炎和哮喘发病中至关重要。TSLP可诱导外周血和皮肤的DC成熟，并诱导Th2型的细胞极化，分泌IL-4、IL-5、IL-13和高水平的TNF。TSLP处理的树突状细胞表达TNF家族成员OX40L/CD252/TNFSF4，OX40L引导T细胞分化成Th2细胞，并产生前列腺素D2等过敏介质。

关于DC在过敏中的作用未来有一些新的研究方向，如(1)TSLP所诱导的DC成熟的相关机制以及如何阻断这一过程。(2)过敏性物质可能会直接修饰DC的功能，阻止DC的IL-12产生，从而促进T细胞向过敏性Th2型细胞极化。(3)一些新合成的寡核苷酸可抑制DC呈递过敏原给Th2细胞，这些化合物在ragweed所诱导的鼻炎的治疗中已经显示了潜在的临床应用价值。(4)利用DC诱导过敏原特异性的调节性T细胞的产生以用于过敏性疾病的治疗。(5)开发新的用于治疗过敏性疾病的药物，如S1P（sphingosine-1-phosphate receptor）激动剂FTY720阻止DC从肺迁移至淋巴结，从而感染DC呈递抗原给能引起疾病的Th2细胞。针对前列腺素D1受体的激动剂能使DC诱导过敏原特异性的T_{reg}的产生。

4. 树突状细胞与移植

树突状细胞在机体外周与中枢免疫耐受维持中发挥重要作用，它以多种机制参与自身免疫耐受的形成，在器官移植和造血干细胞移植中发挥重要作用。器官移植后，一方面供体DC从移植器官中游走至受者的次级淋巴器官内，激活受者T细胞，启动免疫应答，触发排斥反应；另一方面，受者DC主要参与移植后初始炎症反应，浸润到移植器官内，加工处理凋亡或坏死细胞的崩解碎片并结合自身MHC分子，最终把限制性供体MHC分子及自身MHC分子复合肽呈递给受者T细胞，触发排斥反应。一般认为前者参与急性排斥反应，而后者与慢性排斥有关。临床上的排异反应药物对参与移植排斥反应的树突状细胞和T细胞也有抑制作用。在造血干细胞移植时，受体DC是GVHD（graft versus host disease）的重要启动者，在移植时阻断DC的功能可促进移植物的存活。最

近的研究表明, 移植物DC可在受体局部再生, 长期呈递供体抗原从而引起免疫排斥。

要抑制供体或受体DC的功能, 主要可以采用以下几个策略: (1)激活受者的NK细胞, 可抑制DC的功能。(2)诱导耐受性DC的产生, 如诱导表达ILT3、LITRB4分子的DC产生, 从而诱导移植物特异性Foxp3⁺ T_{reg}增加, 抑制排斥移植物的效应T细胞的功能。与成熟DC相比, 未成熟DC具有截然不同的生物学特性, 后者低水平表达MHC、CD40、CD80、CD86及B7等共刺激分子和黏附分子, 具有极强的抗原摄取、加工处理能力, 而激发免疫应答能力却较弱。未成熟DC可诱导抗原特异性T细胞耐受及调节性T细胞的产生; 淋巴样树突细胞通过诱导CD8⁺的调节性T细胞、Th2型免疫应答进而抑制供体Th1、细胞毒性T淋巴细胞, 使其免疫活性降低, 从而抑制Th1型细胞介导的免疫应答, 抑制移植物排斥反应。目前在造血细胞移植时, 为提高移植成功率, 降低排异反应, 临床上广泛使用的技术手段是清除受者的树突状细胞。

需要指出的是, Steinman生前的最后一篇论著是关于DC能诱导抗原特异性T_{reg}产生, 从而阻止GVHD的发生, 而且这种T_{reg}可在宿主体内长期存活, 在小鼠的研究中发现它可存活6个月以上。

5. 树突状细胞与肿瘤

DC与肿瘤的发生、发展密切相关。DC是T细胞介导的原发和继发性免疫反应的最强激发者。成熟DC高表达的MHC分子与肿瘤抗原结合后, 提呈给CD4⁺ T细胞, 使之活化并发挥抗癌效应; 或提呈给CD8⁺ T细胞以产生特异性的细胞毒性T淋巴细胞, 发挥抗肿瘤效应。DC也可通过合成和分泌一些细胞因子(如IL-12)来发挥抗肿瘤作用。IL-12可诱导T细胞、NK细胞产生大量的TNF、穿孔素和颗粒酶, 从而诱使肿瘤细胞溶解。以上是DC的抗肿瘤效应, 但是机体内肿瘤为了躲避免疫系统的攻击, 发展了一套相当完善的免疫逃逸机制。肿瘤的免疫逃逸机制相当复杂, 目前尚不完全清楚。这可能包括两个因素, 首先是肿瘤方面的因素。肿瘤细胞免疫原性低, 肿瘤细胞低表达或不表达MHC分子, 使T细胞对肿瘤抗原不能识别; 此外, 肿瘤细胞缺乏共刺激分子的表达, 从而无法给T细胞提供活化所必需的第二信号。如肿瘤蛋白会上调DC的stat3的表达, 下调MHC II类分子和共刺激分子的表达, 并诱导DC分泌IL-10和TGF-β, 导致T细胞的无能和功能抑制。有研究发现, 在DC中抑制stat3的功能, 可有效促进或逆转抗肿瘤活性。其次是宿主免疫系统的因素。荷瘤宿主体内DC的异常变化是肿瘤免疫逃逸机制的一个重要方面, 主要体现在DC的数量减少和功能低下或缺陷, 因而不能有效提呈抗原和提供协同刺激信号, 以致T细胞介导的抗肿瘤免疫未能有效发挥作用。某些肿瘤细胞能通过分泌细胞因子来抑制肿瘤患者体内DC的成熟及机体的免疫功能, 使肿瘤细胞逃脱机体的免疫监视而无限生长。

DC的数量和功能异常主要体现在以下几个方面: (1)肿瘤浸润树突状细胞(tumor infiltrating dendritic cell, TIDC)和外周血中循环DC数目减少。(2)DC的功能受损。包

括未成熟DC捕获抗原的能力受损、DC的成熟和迁移受损及激发机体免疫抗肿瘤反应受损，即虽然肿瘤局部有少量DC的存在，但却无成熟DC有效呈递抗原、诱导免疫反应从而促使肿瘤溶解，即使存在局限性的免疫反应，也不足以使肿瘤消退。有报道指出，在胰腺癌等实体瘤患者体内循环血中DC的数量较正常对照组减少，而且存在明显的功能缺陷，而实体瘤内浸润的DC数量多的患者预后较好。T1DC常用的鉴定标志物包括S-100、CD1a、CD207、CD209、p55、人白细胞DR抗原（HLA-DR）、CD83和树突状细胞溶酶体相关膜蛋白（DC-lysosomal-associated membrane protein, DC-LAMP/LAMP3/CD208）等。

六、树突状细胞的临床应用

目前，以DC作为治疗手段已被人们广泛关注。它主要被用于感染性疾病和肿瘤的防治。但用DC防治感染性疾病具有双重性。一方面，作为最强的APC，DC在病原抗原的摄取、提呈及特异性免疫激活中都具有重要作用，是抗感染免疫的中心环节。我们可以应用病原抗原体外致敏DC再过继回输的方式治疗多种感染性疾病。另外，DC亦可导致病毒复制、播散及免疫抑制。如前所述，DC是HIV感染的重要靶细胞和病毒储存源，HIV可在DC与CD4⁺细胞的结合的突触区进行病毒复制并感染T细胞。而麻疹病毒（MV）则可感染DC并在DC内大量复制、降低DC数量及功能，这是麻疹病毒感染导致免疫抑制的一个重要原因。目前最有应用和开发前景的是DC肿瘤疫苗的相关工作，我们主要以DC作为肿瘤疫苗为例来阐述一下树突状细胞的临床应用。

1. DC疫苗的制备方法

DC疫苗作为一种治疗性疫苗，更准确地说应该是一种自身（或称自体）免疫疗法，有其特殊性。它一般是以患者的DC在体外负载肿瘤抗原后，再接种到患者身上，或在体内直接以肿瘤抗原刺激DC，以激发机体抗肿瘤特异性免疫应答。目前用于DC介导的肿瘤疫苗的抗原主要有肿瘤细胞或肿瘤细胞提取物、蛋白质、肽、DNA或RNA等。在体外特定培养条件下，通过负载肿瘤抗原可有效地致敏和活化DC，促进其分化和成熟，增强其抗肿瘤功能。

1.1 DC的获取及培养

近年来,随着人们对DC的起源、分类标志、摄取和加工处理抗原的机制以及引起DC迁移和成熟的信号传导等领域的认识进一步加深,体外培养获取大量DC用于临床的研究方法已日趋成熟。首先,DC可以由增殖的CD34⁺前体细胞产生。存在于人骨髓、脐血和成年人外周血中的CD34⁺细胞,体外培养时添加GM-CSF和TNF α 则可以发育成DC。另外,DC也可以由非增殖的CD14⁺单核细胞产生。CD14⁺单核细胞在添加GM-CSF和IL-4的条件下也可以分化为树突状细胞。研究证实了这些途径来源的DC是生物学功能完好的DC,它与纯化的体内成熟DC一样,具有同样的APC功能,因而可较好地应用于临床抗肿瘤免疫治疗研究。但如何进一步诱导在体外诱导分化的DC,使其具有较好的成熟表型和迁移能力也是DC疫苗制备的一个重要的考量。体外常用的刺激DC成熟的刺激剂包括模式识别受体配体(如微生物产物脂多糖LPS、poly(I:C)等)、TLR激动剂R848、CD40L、炎症细胞因子(如TNF α)和炎症介质PGE2等。由于IFN- γ /LPS刺激并不适用于临床应用,新近开发的一种鸡尾酒刺激剂组合ITIP(包括IL-1 β 、TNF α 、IL-6和PGE2)在临床上较为常用,目前已成为一种标准的刺激手段。与单纯TNF α 诱导成熟的DC相比,ITIP诱导成熟的DC会上调共刺激分子CD80、CD40和CD83,分泌IL-12,启动CD4⁺ Th1辅助反应和CD8⁺的杀伤性反应。而TNF α 诱导成熟的DC不能引起这些反应。非常重要的一点是,ITIP所诱导成熟的DC分泌较少的IL-10,其诱导T_{reg}产生的能力较弱。另外,值得注意的是,ITIP刺激的DC迁移能力较强,ITIP组合中的PGE2可上调CC趋化因子受体成员CCR7的表达,使成熟的DC在趋化因子CCL19和CCL21的引导下进入淋巴结并发挥作用。

临床研究大多采用外周血CD14⁺单核细胞来源的DC,这主要是因为这种方法取材方便、培养容易。由于临床实验设计标准不同,现在尚难比较上述两种来源的DC的疗效。实验发现,在激活混合淋巴细胞反应(MLR)和摄取抗原能力上,鼠骨髓来源的DC比脾脏来源的DC强、成年人外周血DC较脐血DC强。在启动抗原特异性CD8⁺ T细胞反应方面,CD34⁺前体细胞来源的DC比CD14⁺单核细胞来源的DC强。目前临床上应用的DC大都来源于患者外周血,DC经体外培养致敏后回输患者体内进行抗肿瘤免疫治疗。Kugler等人用正常的同种异体捐献者外周血CD14⁺单核细胞来源的DC作为疫苗,将经照射的自体肿瘤细胞和同种异体DC(1×10^8 细胞/例,其中10%~15%为融合体)皮下注射治疗原发性肾癌,获得了较为理想的疗效。这说明同种异体来源的DC在DC疫苗的抗肿瘤治疗中也有着广阔的发展前景。

1.2 疫苗制备的常用方法

1.2.1 肿瘤细胞与DC融合

细胞融合技术最大的优点是融合细胞能递呈肿瘤细胞所有的抗原,包括已知和未知的抗原。鉴于目前大多数人类肿瘤细胞抗原类型仍未明确鉴定,因此利用肿瘤细胞作为疫苗的有效成分,是一种简单和有效的方法,且这种疫苗能较为稳定地表达肿瘤抗原,诱导持久的抗肿瘤作用。最佳候选细胞为自身肿瘤细胞,DC可来自肿瘤患者自身或者异体的外周血单个核细胞,融合技术以电脉冲诱导融合(即电穿孔技术)的效率最高,比化学融合剂(如聚乙二醇)诱导方法高1~2数量级。实验证明电融合技术融

合的DC疫苗免疫接种小鼠后，可产生有效的抗肿瘤效应。未成熟的DC可通过与肿瘤细胞混合的方式获得较好的抗原捕获效果，成熟的DC则需通过与肿瘤细胞融合的手段负载抗原。然而这种方法费时费力，因融合后须经7~14d的培养并进行细胞筛选，以防混入肿瘤细胞。也可应用经体外诱导凋亡的肿瘤细胞与DC融合作为疫苗，激发抗肿瘤特异性免疫反应。来源于新鲜标本或培养细胞系的肿瘤细胞在体外经超声波、 γ 射线、放线菌素D或丝裂霉素等处理后诱导肿瘤细胞凋亡，经免疫组化、流式细胞术等检测后，负载于DC。在一项试验中，人们利用经诱导凋亡的肿瘤细胞负载单核细胞来源的DC，从而成功地诱导产生CD8⁺ CTL和CD4⁺ Th1细胞。也可用坏死的肿瘤细胞作为抗原负载DC，且多采用反复冻融的方法获得坏死的肿瘤细胞。这一方法的局限性是技术手段很难标准化，所产生的融合细胞寿命较短。以凋亡或坏死的肿瘤细胞负载DC，不仅可产生MHC II类分子表位，也可通过交叉提呈的方法产生MHC I类分子表位。

1.2.2 肿瘤细胞的蛋白提取物刺激DC

对于那些抗原表位尚不清楚的肿瘤而言，以可溶性蛋白作为抗原负载DC是一种可行的手段。它可使那些因MHC限制而排除在肽疫苗治疗之外的患者受益。在肿瘤动物模型和肿瘤患者中，以肿瘤抗原蛋白转染的DC在体外和体内均诱导出针对肿瘤的抗原特异性CTL反应。而利用超声波破碎、反复冻融、诱导细胞凋亡的方法制备的肿瘤抗原具有多种抗原表位，更有利于诱导DC对肿瘤细胞的免疫攻击。

1.2.3 肿瘤特异性多肽致敏DC

较早前，以肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原多肽负载DC的肿瘤疫苗就被应用于临床了，并在临床I、II期试验中取得了满意的效果。抗原多肽致敏DC的优点在于，其诱发的免疫反应是高度表位特异性的，从而避免了引起自身免疫反应的可能。使用这种方法不需要肿瘤组织或细胞，可以调控诱发的免疫应答的强度。此外，近来发现此方法可引发抗原表位扩展，即机体在几次接种后可对与目的抗原表位相关的抗原表位产生免疫应答，从而增强其疗效。缺点则是抗原表位必须是已知的，其应用受到MHC限制。由于此疫苗为单一表位，所以增加了肿瘤细胞逃避免疫识别的可能性。

1.2.4 肿瘤抗原DNA/RNA致敏DC

以肿瘤抗原DNA/RNA修饰DC的优点在于目的抗原可在细胞内表达，从而以内源性蛋白的形式经MHC I类途径被DC加工和提呈，分泌出细胞外的蛋白又可经MHC II类途径加工和提呈。实验证实，肿瘤抗原RNA转染后的DC可在体外和体内引起肿瘤抗原特异性的免疫反应。然而这种免疫应答的强度很大程度上取决于DC的转染效率。就转染方法而言，DNA和RNA一样，均可以病毒（腺病毒、逆转录病毒等）和非病毒（脂质体介导、电穿孔技术及磷酸钙沉淀法等）介导的方法导入DC内。虽然前者的转染效率要高于后者，但出于安全因素的考虑，它在临床的应用受到限制。这种疫苗策略的另一优势在于DNA可经体外合成而大量获得，并可包含多个抗原表位，还可经修饰使其功效增强。与DNA相比，RNA更具有以下优点：RNA疫苗只在宿主细胞的胞质中表达，而DNA疫苗要进入细胞核后再进行转录，所以RNA疫苗没有导致癌变的潜在危险；稳定的mRNA在哺乳动物细胞中的半衰期不足24 h，而未整合的DNA可在未分裂的细胞中持

续发挥功能达数月之久，故前者较后者更为安全；可在DC中表达多个肿瘤基因，但缺点是稳定性不如DNA，易被降解而使其功效降低。

1.2.5 细胞外小体致敏DC

DC可分泌一种具有抗原提呈能力的细胞外小体（exosome）来表达MHC和CD86分子。在体外可刺激抗原特异性CD8⁺ T细胞的增殖，因而细胞外小体被认为是一种有意义的肿瘤疫苗。目前，人们已建立细胞外小体生产、纯化和质量控制的标准程序，有以细胞外小体作为肿瘤疫苗的临床试验报道。

1.2.6 肿瘤抗原在体内致敏DC

目前，多数方法都是在体外利用粒细胞-单核细胞集落刺激因子（GM-CSF）和白介素（IL-4）等细胞因子将外周血单核细胞诱导为未成熟DC，再以各种形式的肿瘤抗原冲击DC，然后作为疫苗接种给患者。不过这些方法周期较长，不适宜大批量生产，且在整个培养周期中易受污染。有实验显示，肿瘤抗原肽或蛋白经脂质体介导能够在体内转染DC，激发肿瘤抗原特异性的CTL反应。目前，国内有实验应用热休克蛋白和肿瘤多肽共同负载DC，由此制备的疫苗既是特异性疫苗，又是多价疫苗，可有效地避免肿瘤的免疫逃逸，使小分子多肽易于被DC捕获，同时热休克蛋白具有刺激DC成熟的作用，因而可增强DC疫苗的抗肿瘤效应。图7所示为从外周血单个核细胞制备抗肿瘤DC疫苗的示意图。

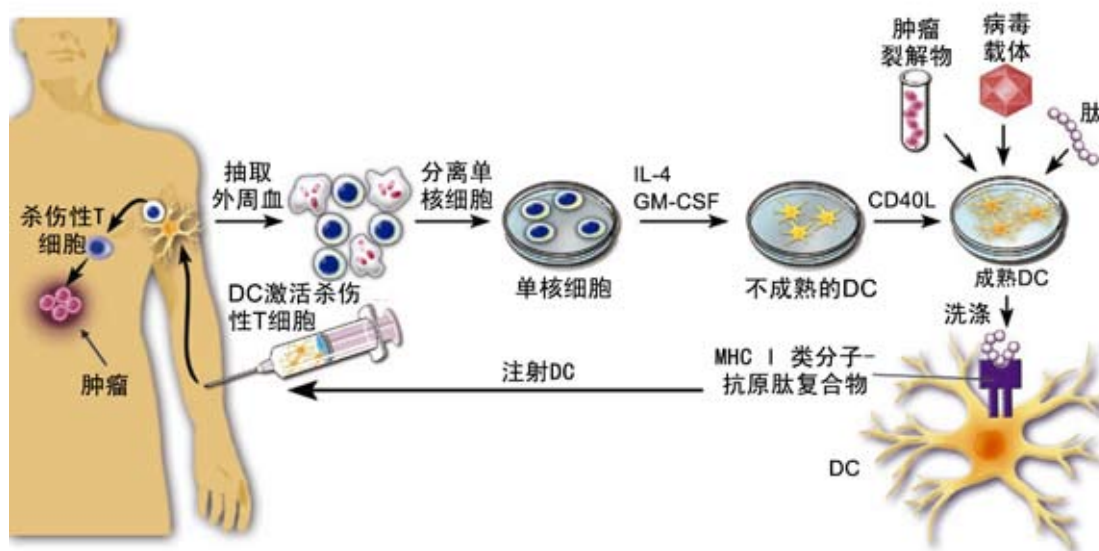


图7 从人外周血单个核细胞制备抗肿瘤DC疫苗的示意图。

图片来源：Berzofsky JA, et al. (2004) Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J. Clin Invest*, 113:1515-1525.

1.3 DC的输注途径和剂量

1.3.1 输注途径

早期DC的输注途径多采用静脉注射。近年来，采用皮下、皮内、淋巴管内及瘤体内注射的方法得到了广泛的应用。目前，多数学者认为皮内、瘤体内注射可能更有利于DC发挥其生物学功能。DC发挥其抗肿瘤免疫效应的基础是DC负载肿瘤抗原后能够迁移至T淋巴细胞富集的二级淋巴器官，从而激活抗肿瘤免疫反应。因此，DC的输注途径与其能否更好地发挥生物学功能密切相关。

1.3.1.1 静脉及淋巴管内注射

对静脉及淋巴管内注射的DC进行跟踪比较，将转移性恶性黑色素瘤患者外周血CD34⁺造血干细胞来源的DC经放射性标记后，进行静脉或淋巴管内注射，然后γ照相机全身拍照观察。结果发现DC经静脉注射后在肺内作短暂停留，最后定位于脾和肝脏7天以上。DC注入足背淋巴管内后，可迅速迁移至引流淋巴结并停留24 h以上，实验说明与静脉注射相比，淋巴管内注射更有利于DC发挥其抗肿瘤作用。

1.3.1.2 真皮内注射

对多种DC的输注形式进行跟踪研究后，发现真皮内注射DC后10 min内就可见标记的DC迁移入引流淋巴结，4h后引流淋巴结显象最明显，证实真皮内注射可以使DC快速迁移至引流淋巴结，且可以滞留较长时间，这表明真皮内注射可能是DC疫苗抗肿瘤治疗的另一较佳输注途径。

1.3.1.3 瘤体内注射

目前，在DC疫苗抗肿瘤治疗临床试验中，人们大都采用肿瘤细胞抗原肽、肿瘤细胞溶解物或凋亡的肿瘤细胞体外致敏DC，然后回输体内。然而，体外致敏存在明显不足，如DC体外培养时间较长、致敏过程繁琐及增加DC被污染的机会。另外，肿瘤抗原的局限性和非特异性也是潜在的导致DC疫苗不能较好地发挥其抗肿瘤免疫效应的因素。因此，将DC直接注射入瘤体内，使其体内致敏无疑是一条较好的思路。肿瘤组织内浸润DC的数量与肿瘤患者的预后呈正相关。有报道对已有远处转移的7例恶性黑色素瘤，以及3例乳腺癌患者自体外周血单核细胞来源的DC进行培养后，直接将 3×10^8 DC多位点注射于瘤体内。4d后，4例恶性黑色素瘤和2例乳腺癌患者肿瘤即开始退缩。退缩肿瘤组织活检发现瘤体内大量淋巴细胞和DC浸润。

1.3.2 剂量

大部分临床报道DC每次注射的细胞数量为 $10^6 \sim 10^8$ 。研究认为DC注射的细胞数量与肿瘤缓解的时间成正比。如Small等人报道，对前列腺癌激素治疗无效的患者来说，采用前列腺酸磷酸酯酶（PAP）和GM-CSF融合蛋白作为抗原致敏外周血来源的DC，随后以不同的细胞数量静脉回输，结果6例患者均诱导出抗肿瘤免疫反应，其中3例患者前列腺特异性抗原（PSA）水平下降了50%。疾病的缓解时间和获得的对PAP的免疫反应的持续时间与接受的DC注射细胞数量呈正相关。但是是否细胞数量越高，治疗效果越好，有无平台效应，以及细胞数量多少为最佳尚需进一步研究。

1.3.3 DC与细胞因子或佐剂联用

在DC疫苗的实际应用中，人们为了克服肿瘤微环境的免疫抑制状态，提高DC疫苗的效应，会将DC与共刺激分子、细胞因子、促有丝分裂原及细菌性抗原一起联用。前面我们提过Flt3L在控制DC数量中的重要作用。Morse等人应用FLt3L治疗转移性结肠癌患者，结果发现FLt3L能够将DC动员至外周血并提高DC在瘤周的浸润，且FLt3L促进的DC动员与迟发性超敏反应的增高呈正相关，说明FLt3L能提高血循环中DC的数量并可能成为DC抗肿瘤免疫治疗中有用的佐剂之一。此外，细胞因子与DC疫苗联用也获得了较好的效果。Okada等人用照射后的自体来源的恶性神经胶质瘤作为抗原致敏DC后，与转染IL-4的成纤维细胞共同使用，结果产生了明显的协同效应，大大提高了DC诱导的抗肿瘤免疫反应。Panelli等人将MART21或GP100冲击的自体单核细胞来源的DC与IL-2共用，结果7例恶性黑色素瘤患者中的一例皮肤和肺部转移灶出现部分退缩。用细菌或病毒抗原与DC疫苗联用也能够促进DC的抗肿瘤作用。将恶性黑色素瘤抗原与流感MatrixA2多肽共同致敏单核细胞来源的DC，以此来治疗恶性黑色素瘤患者，结果8例患者全都产生了恶性黑色素瘤抗原特异的、能分泌IFN γ 的效应CD8⁺ T细胞。

2. DC疫苗治疗肿瘤的实验和临床研究

DC是人体内功能最强，而且是惟一能递呈蛋白质抗原并致敏初始T细胞的抗原递呈细胞（antigen presenting cell, APC），它是连接先天性免疫和获得性免疫的桥梁。由于以DC为基础的肿瘤疫苗可以有效地增强诱导机体特异性的抗肿瘤免疫反应，因而被公认为最具潜能的肿瘤免疫治疗手段。此外，鉴于DC具有诱导初始免疫应答的能力，所以将其作为肿瘤免疫治疗的载体具有很强的吸引力。大量基础研究试验证实，DC肿瘤疫苗对小鼠肿瘤有明确的治疗效果。1996年，第一个用于人的临床试验的报道出现。10个滤泡性B细胞淋巴瘤病人用肿瘤特异性的抗原蛋白刺激外周血来源的DC制备成DC肿瘤疫苗进行治疗。结果显示8个病人对特异性肿瘤抗原产生较强的细胞免疫应答，其中1个病人产生了针对肿瘤抗原的特异性的CTL应答，但是未观察到肿瘤消减。随后，以DC为基础的肿瘤疫苗的研究报道大量涌现。这些临床试验，都得到了相似的结果。首先，被免疫的病人通常都出现了很强的针对靶向抗原的获得性特异性免疫反应，这些反应可以通过诸如四聚体或五聚体染色、IFN- γ ELISpot和Cr₅₁释放试验等方法检测出来。其次，其中少量病人还出现一定的肿瘤微小残留病灶的消退。目前世界上第一个获得美国FDA批准的肿瘤生物治疗DC细胞疫苗是Dendreon公司开发的Provenge（Sipuleucel-T）前列腺癌疫苗。它是应用PAP（prostatic fraction of serum acid phosphatase）和GM-CSF（granulocyte macrophage-colony stimulating factor）融合蛋白刺激自体抗原呈递细胞所形成的个体化疫苗。在III期临床试验中，使用Provenge治疗的受试者生存期比安慰剂组延长了4.1个月，3年生存率提高38%，死亡率降低22.5%。现在全球还有大量应用DC疫苗治疗肿瘤（包括恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结直肠癌及恶性脑胶

质瘤等)的临床试验研究,并且临床应用中观察到一定的疗效和特异性免疫反应。**Steinman**本人深受胰腺癌的折磨,他也是DC疫苗的先行者和受益者之一。虽然DC疫苗治疗最终并没有挽救他的生命,却也已经给世人以信心,毕竟曾延长了他的生命。我们在已经报道的DC疫苗临床试验中,还是看到了希望。关于DC疫苗正在开展的临床试验方面,大家可以登录以下几个网址对感兴趣的疾病病种进行查找,主要有 (1) The US NCI. (2) ClinicalTrials.gov. (3) CenterWatch (USA). (4) Emergingmed.

Kugler等人将DC-肿瘤细胞融合细胞接种给转移性肾细胞癌的患者,在接受治疗的17例患者中7例有效,4例肿瘤完全缓解,2例肿瘤消退50%以上。应用肿瘤血管衍生的内皮细胞负载DC在体外可有效地诱导CTL的产生,并特异性杀伤肿瘤血管衍生的内皮细胞。**Holtl**等人以肿瘤细胞提取物作为抗原冲击DC治疗转移性肾细胞癌,在27例患者中,2例完全缓解,1例部分缓解,7例肿瘤无进展。**Reichardt**等人用来自于多发性平滑肌瘤的独特型抗原蛋白致敏DC后应用于患者,可诱导出CTL反应且临床症状缓解。**Murphy**等人用前列腺特异性抗原(PSA)来源的、与HLA-A2相连的多肽来致敏激素疗法失败的前列腺癌患者自体未成熟的DC,获得了30%的完全缓解率。

研究发现,给进展期乳腺癌和卵巢癌患者皮下接种HER-2/neu或MUC-1来源的肽致敏的DC,全部受试者均呈现较好的耐受性,且未见任何不良反应,50%的患者外周血中可检测到抗原特异性的CTL。不仅如此,在接种了几次DC/MUC-1多肽的患者体内可检测到抗CEA和抗MAGE-3的T细胞免疫反应,而接种了DC/HER-2肽的患者则检测到抗MUC-1 T细胞免疫反应,证明这种疗法可在体内引起抗原表位扩展。抗原肽是免疫识别机制的重要物质基础,应用食管癌抗原肽或黑色素瘤G280-9V多肽负载DC,均能诱导出高效的特异的CTL。在体外实验中,转染肝癌细胞mRNA的DC能诱导肿瘤特异性的CTL。**Ludewig**等人在小鼠模型体内以脂质体介导肿瘤抗原肽转染DC,诱导出保护性抗肿瘤免疫反应。DC疫苗抗肿瘤机制不仅取决于特异性CTL效应,还可增强活化的NK细胞的杀伤肿瘤细胞的功能。体内实验提示DC疫苗可提高NK细胞(NKp46、NKG2D)的活性和活化受体的表达,维持NK细胞的生存期。

国内关于DC的相关研究也有一些跟踪报道,如应用肿瘤细胞株与DC融合的疫苗在小鼠上进行实验,发现疫苗能显著促进肿瘤组织中TNF α mRNA、IFN- γ mRNA、Bcl-2、Bax及Caspase-3蛋白的表达,产生杀伤活性强的特异性CTL效应,使小鼠产生一定的免疫保护作用,抵抗肝癌细胞的再次攻击,让治疗小鼠的肿瘤生长明显减慢。第二军医大学免疫学研究所于2002年通过SFDA的正式批准,率先在国内开展了多中心随机对照的自体DC联合化疗来治疗晚期转移性肿瘤患者的临床试验,目前已经进入了III期临床试验,这一实验已延长了很多患者的生存期。

尽管DC疫苗已经呈现出很多令人鼓舞的应用前景,但是也有很多问题有待解决,包括诸如DC抗原不能有效负载、呈递抗原能力差、DC成熟度低、DC亚群的不均一性、肿瘤抗原的突变、肿瘤介导的免疫抑制、肿瘤抗原相关性的T细胞诱导的自体耐受,以及T_{reg}的抑制作用等多个方面。目前大量研究证实,针对自体TAA的DC疫苗可以在小鼠和人体内诱导出可检测到的自体反应性T细胞的活化和增殖,提示可以在宿主的细胞水平突破肿瘤的免疫耐受。然而,这种T细胞的活化难以引起肿瘤的消退。例如**Rosenberg**证实TAA抗原肽免疫可以活化产生高水平的肿瘤特异性的效应性T细胞,但是仍不足以引起肿瘤的缩小。这说明传统的肿瘤DC疫苗尽管可以在细胞水平对抗免疫

耐受，但还是难以在整体水平打破机体对肿瘤的免疫耐受状态，限制了肿瘤免疫治疗的效果。如何打破肿瘤免疫耐受状态，进一步提高肿瘤DC疫苗的临床疗效，是新一代的DC疫苗发展研究急需解决的问题。

七、展望

自1973年Steinman与Cohn首先报道树突状细胞起，迄今已走过了将近40个春秋了。起初整个免疫学界对它一无所知，不认可它，后来逐渐发现DC在免疫系统中起着关键性的桥梁作用，现今人们已经开始逐渐学会利用它为人类服务了。

需要指出的是，关于树突状细胞我们大部分的基本认识，包括发育、表型、亚群分类、功能等的研究由于取材限制，相关信息均来自于小鼠，那么究竟有哪些和人类是一致的，还有哪些是人类DC独有的，还需要科学家们进一步探索。近年来，科学家已经开始重视这一问题，如已经阐明人pDC的相关表型。随着对DC的进一步认识，人们已经发现DC本身的异质性非常复杂。细分DC、阐明其功能，并进一步有效利用DC是非常关键的。此外，我国在DC基础研究方面还很落后，如何提高整个国家在这些方面的研究水平也是值得关注的问题。曹雪涛教授领衔的研究小组发现了一群独特的调节性树突状细胞亚群，提高了中国免疫学研究在国际的声誉，希望以后有更多的中国免疫学家在这一领域有创新性的发现。

DC疫苗的临床应用也是非常重要的领域。目前将DC疫苗应用于恶性肿瘤的疗法已被广泛研究，并部分应用于临床治疗。值得注意的是，DC疫苗在取得了一定的成绩的同时，也发现了一些问题。目前通用的体外诱导和培养DC的方法耗时、费力且价格昂贵，不能规模化生产，且易被污染，尚不能广泛应用于临床；来自于肿瘤患者的DC数量有限，且存在功能上的缺陷，要达到临床治疗所需的数量和质量存在一定困难；针对某一种肿瘤或某一个肿瘤抗原表位，不同的转染物和转染方法会产生不同的效果，故需仔细筛选以获得最佳方案；DC与肿瘤细胞融合形成的杂交细胞，既表达DC的抗原和共刺激分子，又能内源性表达肿瘤特异抗原和肿瘤相关性抗原，但融合过程本身并不能上调DC的共刺激分子的表达和诱导DC的成熟，不过TNF- α 、IL-1 β 等DC的诱导成熟剂则可上调这些抗原的表达，因而在设计疫苗时应注意DC的诱导成熟；从目前的动物和人体实验以及体外实验的结果来看，各种DC疫苗的抗肿瘤效率仍然较低，提高治疗效率的措施仍需进一步探索；DC疫苗回输的途径、应用剂量、治疗间隔等仍需反复探讨；DC疫苗在人体上的实验，应加强医学伦理学的要求。此外，肿瘤疫苗的抗肿瘤效应不但与疫苗本身的类型与质量有关，还取决于肿瘤患者机体的免疫应答能力，而普遍

存在的肿瘤免疫逃逸机制是影响肿瘤免疫治疗效果的重要原因。因此，如何同时提高肿瘤患者机体免疫应答，也是提高肿瘤疫苗抗肿瘤效应的一个重要方面。

目前，我国部分地区已进行了脐血库建设。鉴于脐血中的干细胞较多，脐血中CD34⁺细胞较骨髓和外周血的CD34⁺细胞具有更强的增殖潜能，因此可考虑在体外进行脐血干细胞诱导分化为DC，再负载肿瘤抗原制备疫苗，进行抗肿瘤治疗，可望解决DC的来源问题。目前国内外均未见相关实验研究。关于DC疫苗制备的更有效的方法，可能是上述几种方法的不同组合或结合细胞因子、基因修饰等方法进行，可望能提高DC疫苗的抗肿瘤功能。

参考文献

1. Steinman RM, Cohn ZA. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137(5):1142-62.
2. Steinman RM, Banchereau J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449(7161):419-26.
3. Piguet V, Steinman RM. (2007) The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol*, 28(11):503-10.
4. Yamazaki S, Steinman RM. (2009). Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Dermatol Sci*, 54(2):69-75.
5. Steinman RM. (2008) Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity*, 29(3):319-24.
6. Steinman RM. (2009) Some scientific and organizational challenges in cancer immunology. *Ann N Y Acad Sci*, 1174:1-5.
7. Steinman RM. Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annu Rev Immunol*, 2011 Oct 13. [Epub ahead of print]
8. Trumpfheller C, Longhi MP, Caskey M, Idoyaga J, Bozzacco L, Keler T, Schlesinger SJ, Steinman RM. (2012) Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T cell immunity. *J Intern Med*, 271:183-92.
9. Steinman RM. (2010) Some active areas of DC research and their medical potential. *Eur J Immuno*, 40(8):2085-8.
10. Steinman RM, Idoyaga J. (2010) Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*, 234(1):5-17.
11. 曹雪涛, 2009, 免疫学前沿进展, 人民卫生出版社, 北京市, 65-78.
12. 龚非力, 2009, 医学免疫学, 科学出版社, 北京市, 106-111.
13. 金伯泉, 2008, 医学免疫学, 人民卫生出版社, 北京市, 108-1

OmicsLink™ 即用型 ORF 表达克隆

4套已构建表达克隆即订即得

助您迈出基因功能研究第一步



ORF表达克隆的优势

- ◆ 将约20,000条人源基因插入到慢病毒载体（Lv105）、哺乳动物载体（M02）、穿梭克隆等4套载体中构成的现货ORF表达克隆，即订即得；
- ◆ 45,000条人源、小鼠、斑马鱼基因；
- ◆ 100多种适用于不同表达系统的表达载体；
- ◆ 50多种不同功能的蛋白标签；
- ◆ 保证表达框序列正确性。

ORF表达克隆的应用

- ◆ 蛋白的表达纯化、细胞定位，用于对目的基因或蛋白的功能研究与分析。
- ◆ 原位杂交探针的制作，用于检测组织或器官的基因表达谱。
- ◆ 在蛋白功能研究过程中，用于shRNA和miRNA抑制基因的功能拯救实验。
- ◆ 高通量筛选，可用于功能基因组学、蛋白组学和系统生物学的前沿领域。

热点话题

Hot Topics

“微生物实验室里的喧闹与骚动”



Didier Raoult极富想象力、性格叛逆，表情通常十分高傲。这位法国最高产的微生物学家非常“好斗”。

Didier Raoult曾是一名叛逆少年，曾多次被几所不同的高中开除。可是谁也没想到，现年59岁的Raoult已是法国最有影响力、成果最大的微生物学家。Raoult在法国艾克斯-马赛大学（University of Aix-Marseille）领导的科研团队多达200人。他个人或与他人合作发现了好几十种新细菌，而且2003年Raoult还因为将有史以来（2011年10月科学家们又发现了一个更大的病毒*Megavirus chilensis*，译者注）最大的病毒*Mimivirus*鉴定为病毒（之前这种微生物一直被认作革兰氏阳性细菌，译者注）而轰动了学术界。*Mimivirus*是该病毒家族里第一个成员，它有助于我们认识病毒的进化与植物的关系。



Raoult课题组最开始认为图中所示的这种从冷却塔中发现的新型微生物是一种细菌，后来才发现它是一种新型病毒，Raoult等人将其命名为*Mimivirus*。

不过，Raoult并没有因为是一名科学家而磨平了年少时的棱角。身材修长的Raoult还留着一头长发，他那一双像老鹰一样充满洞察力的眼睛还时不时地闪过一丝明显的担忧。而且，他也像年轻人一样很容易被激怒。Raoult在去年出版了一本充满争议，但是通俗易懂的科普读物，他在书中直截了当地指出达尔文的进化论是错的。还有一段小插曲也影射了他少年时候的生活。他曾经在2006年被十几家知名的微生物学杂志集体“封杀”。尽管这个“封杀”只是暂时的，但到今天回想起来他还是非常生气。Raoult非常喜欢引用Will-iam Faulkner小说里的一句话——生活中充满了各种不和谐因素和愤怒，因为这段话的确非常适合他。Raoult曾表示，如果不是因为他太太是一名心理医生，那么他可能早就疯了。

然而，Raoult的“疯狂”可能也正是他获得成功的关键因素。Raoult的老朋友兼长期合作伙伴、法国里昂大学医学院的院长Jérôme Etienne曾这样评价：他极富想象力，工作也非常努力，而且对科研事业充满了热情。尽管Raoult的科研团队规模庞大，但是他手下的工作人员却全都表示只愿意在他这儿干，不愿意到别的实验室去。跟随Raoult从事科研工作长达20多年的Philippe Brouqui指出，他跟随Raoult的原因是因为Raoult是全世界最棒的微生物学家之一。

不过，Raoult也以人数相当于他的支持者的“敌人”规模以及Raoult对这些人的轻蔑而闻名于世。《科学》（Science）杂志曾采访过几位法国科学家，他们表示只愿意匿名对Raoult发表评价，其中一人指出，大家都不愿意谈及这个人，因为他的影响力太大了。Raoult很容易就可以让他们过不下去。艾克斯-马赛大学的遗传学家Jean-Michel Claverie 在与Raoult合作了5年之后于2006年和他断绝了关系。Claverie 在给《科学》杂志的一封电子邮件里这样写到：他的同事们很难发表不同意见。

Raoult的“微生物”人生

Raoult的职业生涯一直都与一个城市——马赛紧密联系在一起。其实他们一家是在他8岁时才搬来马赛的，马赛那种码头城市的性格却非常对Raoult的脾气。Raoult在马赛获得了人类生物学博士学位，同时成为了一名医生。2004年，Raoult发现了一种立克次体（*rickettsia*），他用他们当地一个名声很差的人的名字Quartiers Nord给这个新物种命名为*Afipia quatiernordensis*。

立克次体是一种胞内革兰氏阳性菌，它主要通过蜱（ticks）、跳蚤（fleas）、虱子（lice）和螨（acarids）等媒介传播。现今立克次体已成为Raoult的主要研究方向。不过他最开始主要研究的是一种叫做地中海斑疹热（Mediterranean spotted fever）的疾病，又名马赛热（Marseille fever）。Raoult曾经在美国马里兰州贝塞斯达的美国国立海军医学中心（National Naval Medical Center in Bethesda, Maryland）里花了6个月来研究斑疹伤寒（typhus）。1984年，Raoult回到法国马赛之后，艾克斯-马赛大学的校长给他提供了一份助理教授的职务。于是Raoult在他的家乡开始了行医生涯和科研事业，同时他也致力于开发新型诊断技术。1987年，Raoult的实验室升级成为了法国国立立克次体参考中心（France's national reference center for rickettsia）。1988年，他的实验室又成为了世界卫生组织节肢动物传播病原体合作研究中心（collaborating center for the World Health Organization for arthropodtransmitted bacteria）。

Raoult将他的很多科学发现都归功于选择了得力的合作伙伴。比如他从法国里昂的合作伙伴那里得到的心脏瓣膜标本上分离获得了伯纳特氏立克次体（*Coxiella burnetii*）。这是一种经由牛、羊等动物传播的病原体，它可以引起一种叫做Q热（Q fever）的疾病。但是Raoult发现，伯纳特氏立克次体也与心内膜炎（endocarditis）有关。接下来，Raoult又发现了好几个能够导致心内膜炎的其它病原体。Michel Drancourt曾于1984年与Raoult一起工作，他指出，Raoult有一个制胜的法宝，那就是他能够成功地培养出别人培养不出来的细菌。

进入90年代，基因组测序技术大发展，Raoult迅速将其应用于微生物研究。他在1992年购进了一台DNA测序仪，并开始对各种生物样品进行DNA测序，以查看能不能从中发现一些典型的细菌DNA序列，或者能够发现一些新的细菌物种。而且Raoult还具有宏基因组学（metagenomics）研究的观念，他对各种环境样品，比如海水或土壤等样品都进行了微生物DNA测序分析，因为他认为这样可以帮助他发现另外一个广阔的微生物世界。Raoult曾表示，我们正处在一个魔幻般的科学时代，这必将是一个充满新发现的时代。

Raoult在实验室中扮演封建家长的角色

每周五的下午Raoult实验室都会召开小组会议。在8月的一次组会上，基因组课题组的一位年轻博士生做了一个10分钟的简短报告，介绍了他们最近刚刚发现的新细菌。

Raoult听得很仔细，等这位学生说完之后，Raoult才用非常和蔼的态度告诉她下一步应该怎么做。这名来自亚洲的女学生听完之后也害羞地点头表示同意。其他学生（其中有很多也与这位博士生一样，来自法国以外的国家和地区）也都非常认真地听完了整个介绍和讲评。

法国格勒诺布尔傅立叶大学（Joseph Fourier University）的微生物学家Patricia Renesto曾在Raoult的实验室工作了好几年，她非常钦佩Raoult，并指出Raoult的实验室是很多外籍学生职业生涯中的一块跳板。但是不好的一方面就是Raoult大权独揽，什么都管。他的这种行为也挺让人讨厌的。他有着独裁家长的一面，很多人都不知道这一点。

那次会议结束之后，Raoult回到办公室里兴奋地对大家宣布，这个新发现的细菌将是他们从塞内加尔首都达喀尔拿到的这份大便标本中发现的第225种细菌。Raoult指出，世界纪录是从一个大便样品里发现80种细菌，他们比这个纪录还要高出2.5倍。而且他们发现的细菌中，有一半都是从未被人从消化道中分离到的，并且还有21种是他们完全不认识的。

Raoult似乎可以被称为一位多产的科学家。我们最近刚刚在PubMed上搜索过Raoult的论文，居然有1400多篇。他在论文中介绍了60多种新的细菌种类（species）和一个新的细菌种属（genus），这个种属的名称是*Raoultella*。但是有一些科学家却抱怨Raoult实验室的操作规程里有很多错误，比如采用未经验证的测序结果等。

实际上，Raoult实验室就曾经在2006年被论文问题搞到焦头烂额，因为大家对他们实验采用的小鼠斑疹伤寒（typhus）动物模型不太认可。美国微生物学协会（American Society for Microbiology, ASM）出版的《感染与免疫》（Infection and Immunity）杂志的一名评审发现，Raoult等人在论文的修回稿中采用的四幅图片与第一次提交的原始图片一模一样，但是这几幅图片应该是介绍不同的实验结果的。

在Raoult等人给美国微生物学协会写的回信中，该论文的第二作者Christian Capo和通讯作者Jean-Louis Mège表示他们愿意对这个问题负全责，但是他们只承认其中的两幅图有问题。Capo在回信中写到，他犯了一个小错误，可是Mège却写到是Capo没有将评审的修回意见告诉其他的作者，而他本人当时又正在休假，所以才出了问题。即便如此，美国微生物学协会在咨询了他们的伦理道德委员会之后还是决定“封杀”本论文的5名作者，同时对Raoult本人也进行封杀，期限为1年。美国微生物学协会在给Mège的回信中这样写到：我们对你们的解释表示不能接受。你们对论文数据的所作所为违背了科研行为的伦理道德准则。

Capo和Mège表示愿意接受这个结果，可是Raoult却给美国微生物学协会回信，表示他在此次事件中完全没有任何责任和问题，所以对他进行“连坐式”的惩罚是非常不公平的。他要求取消对他本人以及本论文另外两位作者的处罚，但是美国微生物学协会没有同意。暴怒之下，Raoult辞去了另外两份由美国微生物学协会出版的杂志的评审职

务，同时也退出了美国微生物学协会以及该学会的领导集体，并且还禁止他们实验室再向美国微生物学协会出版的任何杂志投稿。可是这些杂志已经发表了230多篇Raoult的论文。从那次事件之后，Raoult的名字只在美国微生物学协会出版的杂志上出现过两次，而且都是在四年之后的2010年。Raoult还于2007年将他与美国微生物学协会之间的通信以及他自己写的一封澄清邮件抄送给了他在法国的所有同事，要求他们不要再在论文中署上他的名字，在信中Raoult这样写到：如果这事发生在美国，我就要提起诉讼了。

这次事件并没有给Raoult的学术生涯带来太大的影响。从2013年开始，Raoult将负责一个新的科研项目，这是由政府资助的一个项目，他们将召集来自各个不同研究领域的专家和医学专家一起在马赛对各种人类感染性疾病和热带疾病的病原体开展研究。

Raoult认为从事建模工作的研究人员都是“江湖郎中”

尽管Raoult有着多年的细菌研究经验，但他最著名的成就还是我们前面介绍过的发现了巨病毒这一成果。这还得追溯到上世纪80年代末，当时英国利兹公共卫生实验室（Public Health Laboratory in Leeds, U.K）的细菌学家Timothy Rowbotham发现了一种体内寄生有军团杆菌（*Legionella*）的阿米巴原虫（amoebae）。可是Rowbotham在这种阿米巴体内还发现了一种他不认识的新型微生物，当时他认为这是一种细菌。

后来Rowbotham将这种阿米巴原虫寄给了英国的一位博士研究生Richard Birtles。一向对新型微生物非常敏感的Raoult得知这一消息后立刻就邀请Birtles到马赛来和他一起工作。可是他们最开始也不知道这种新型微生物是什么东西，直到后来用电镜进行观察才找到了一点头绪。他们发现这种微生物其实根本就不是细菌，而是一种体积比任何一种已知病毒都要大许多的新型病毒。这种名叫Mimivirus的新型病毒如果算上毛冠（hairy crown），直径可以达到700 nm，其DNA基因组长达120万碱基对，这个规模比任何一种已知的DNA病毒的基因组都要超出6倍以上，甚至比某些细菌的基因组还要大。经过基因组比对研究发现，这种新型病毒属于核质大型DNA病毒（nucleocytoplasmic large DNA viruses, NCLDV），与痘病毒（poxviruses）同属一类病毒。于是Raoult根据这种病毒类似于细菌的特点将其命名为Mimivirus（“mimicking microbe”的缩写），并且根据它新建了一个Mimiviridae病毒家族。

研究发现，Mimivirus病毒的基因组非常有意思。Claverie课题组开展的一项分析表明，这种病毒基因组里含有与DNA处理和蛋白质合成相关的基因，但是这些基因在当时都被认为是活体生物（病毒本身不属于活体生物）独有的基因。这一发现让一个沉寂已久的话题又重新热闹起来，即病毒在整个生物进化树中的位置问题。现在Raoult对这个问题已经掌握了足够的话语权，俨然已经成为了这个领域的老大。但是法国巴黎第十一大学（University of Paris-Sud in Orsay）的David Moreira却认为Raoult在这个问题上太狂妄了，他指出Raoult总是喜欢对自己并不熟悉的问题指手画脚。

有一些科学家认为Raoult在流行病学模型（epidemic modeling）方面也存在同样的问题。这是一个近年来发展非常迅速的方向，可是Raoult却一直对此进行攻击，认为这种模型毫无用处。Raoult认为从事这些建模工作的科研人员都是“江湖郎中”，甚至认为，到目前为止，这种模型还没有成功地预测出哪怕是一次感染性疾病暴发的情况。

Raoult的另外一个攻击对象就是达尔文了。在他的新书《认识真正的达尔文》（Beyond Darwin）中这样写到：其实达尔文就是一名牧师。因为Raoult认为达尔文的进化树是受到《圣经》（Bible）启发的产物，而且他认为这种进化树太简陋了。Raoult还对另外几条当代进化学定律提出了质疑，比如自然选择的重要性等。Raoult举例说，在遗传学研究中我们都会发现，不同的微生物物种之间，乃至微生物和复杂生物，比如人体（消化道）之间都存在着非常频繁的基因交换事件，这就很有可能会“创造”出新型的生物物种。所以Raoult认为，达尔文的进化树应该是一张由各个相互关联的物种交织起来的生物进化网。

Moreira担心Raoult正在授人以柄，被上帝论者利用，他指出，公开表达这些观点是非常危险的。美国马里兰州贝塞斯达美国国立生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information）的进化生物学家Eugene Koonin 也认为Raoult做的太过了。虽然达尔文的进化论不太完整，但并不能因此彻底否定这套理论，它还是有一定道理的。而且达尔文的进化论并不适用于微生物进化领域。

Raoult本人则完全不关心其他人对他的看法和评价，对于有关他的是是非非，他非常坦然。他曾表示，当他第一次来到马赛时，最让他感到吃惊的事情就是发现那里的每一个人都是斗士。可能这就是Raoult喜欢马赛的原因，Raoult的生命信条就是“生命不息，战斗不止”。

相关阅读：

巨病毒（Giant Virus）引发的“新”问题 ——病毒起源问题

病毒来自哪里？病毒能算是活的生物吗？Didier Raoult在2004年发现的Mimivirus病毒，以及在那之后陆续发现的其它几种巨病毒让科学家们对上述一个世纪之前就被讨论过的老话题产生了兴趣，而这些沉寂许久的问题又重新成为了热门话题。

科学家们在20世纪初第一次发现了病毒这种微生物，当时就有人认为这些小东西是联系无机世界和有机生物世界的纽带，并且认为病毒可能就是生命诞生之前的一种

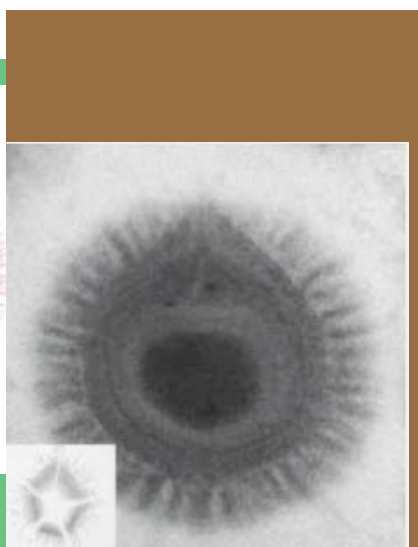
过渡态物种，细胞也是由病毒发展进化而来的。但是之后的遗传学研究数据却不能够支持这些假设，反而却支持了相反的观点，即病毒来源于细胞。因为研究发现，病毒含有的遗传物质以及其它一些分子似乎都是细胞的“碎片”，而且病毒可能还会通过“窃取”其它细胞组份的方式帮助自身进化。如果这种观点成立，那么病毒在生物进化树上就找不到自己的位置了，它们可能就是在古细菌（Archaea）、细菌（Bacteria）和真核生物（Eukarya）之间穿梭的“小飞虫”。国际病毒命名委员会（International Committee on Taxonomy of Viruse）于2000年正式宣布病毒不属于活的生物。

可是，*Mimivirus*病毒的横空出世却打破了这个观点。*Mimivirus*病毒这么大是因为在它的基因组当中包含了许多与DNA修复、DNA复制纠错、mRNA转录和翻译等过程相关酶的编码基因。这些基因拥有一个名字，叫做“信息基因（informational gene）”。在过去，它们都是活生物的特异性标志。以往所有已知的病毒都不含这些基因，因为病毒寄生的细胞可以表达这些蛋白质，已知的病毒全都会利用细胞表达的酶帮助自己完成复制，直到*Mimivirus*病毒这个特例的出现，引起了人们的重视。Raoult等人根据*Mimivirus*病毒的基因组信息推测该病毒可能源自某种古老的病毒祖先，这种病毒祖先是携带了全套蛋白表达系统的，它们并不需要“窃取”别人的基因。

可是这种观点并没有得到所有人的支持。2008年，法国巴黎第十一大学（University of Paris-Sud in Orsay）的David Moreira等人发表了一篇文章，他们对*Mimivirus*病毒的基因进行了分析，结果发现其中有126个基因和细胞中的同类基因非常相似，所以他们认为*Mimivirus*病毒还是以窃取细胞基因的方式完成进化的，只是*Mimivirus*病毒的体积如此巨大这一点还不太好解释。



更大的病毒。左图展示的是新发现的 *Megavirus chilensis* 病毒，它的出现更进一步证实了所有的巨病毒全都源自同一个病毒祖先的观点。Didier Raoult相信这些病毒就是生物进化树上的第四界生物，如上面彩图中的紫红色部分所示。



可是Raoult坚持认为他们的观点是正确的。他们在2010年发表的一篇论文中继续指出, 不仅*Mimivirus*病毒可以在进化树上找到自己的位置, 其它与*Mimivirus*病毒同属一类的核质巨DNA病毒(NCLDV)也都可以在进化树上占据一席之地。如果我们找到了这些病毒的原始祖先, 那可能就会发现上面介绍过的三界生物之外的第四界生物。Raoult等人的观点来源于对NCLDV病毒和其它三界生物DNA处理基因的系统进化分析(phylogenetic analysis)结果, 他们发现NCLDV病毒似乎可以独立成为一个新的大类。

但是这其中存在一个问题, 因为两个物种在基因上的相似性并不能确切地证明它们源自同一个祖先, 不同来源的物种也可以拥有在序列上完全相同的基因片段, 这就是我们已知的趋同进化(convergent evolution)现象。英国纽卡斯尔大学(Newcastle University in the United Kingdom)的Eva Heinz团队重复了Raoult等人的实验, 可是他们采用了不同的进化模型, 得到了更加精确的结果, 他们的实验结果于2011年6月正式发表。在Heinz的进化树中, 并没有所谓的第四界生物, NCLDV病毒的基因全都散布于整个进化树之中。

如今, 赞成Raoult观点的人已经很少了。可是Raoult曾经的一位同事, 同样就职于法国埃克斯马赛大学(University of Aix-Marseille)的Jean-Michel Claverie在去年10月在《美国科学院院刊》(PNAS)上发表了一篇文章, 极力鼓吹各种巨病毒源自同一个病毒祖先的观点。Claverie最近从智利的海岸地区分离出了另外一种与*Mimivirus*病毒非常类似, 但是比这个病毒体积更大的病毒, 这种病毒名叫*Megavirus chilensis*病毒。据他在论文中的介绍, 这种病毒有53%的基因是和*Mimivirus*病毒一样的, 在7个编码产物是蛋白质翻译途径中的关键酶的基因中, 有四个*Mimivirus*病毒基因同源, 并且以前从未在其它病毒基因组中发现过。Claverie指出, 这就排除了这两种基因各自独立获得这些基因的可能性。Moreira也表示, Claverie的这篇论文更加让他确信*Mimivirus*病毒和*Megavirus chilensis*病毒源自同一个病毒祖先。

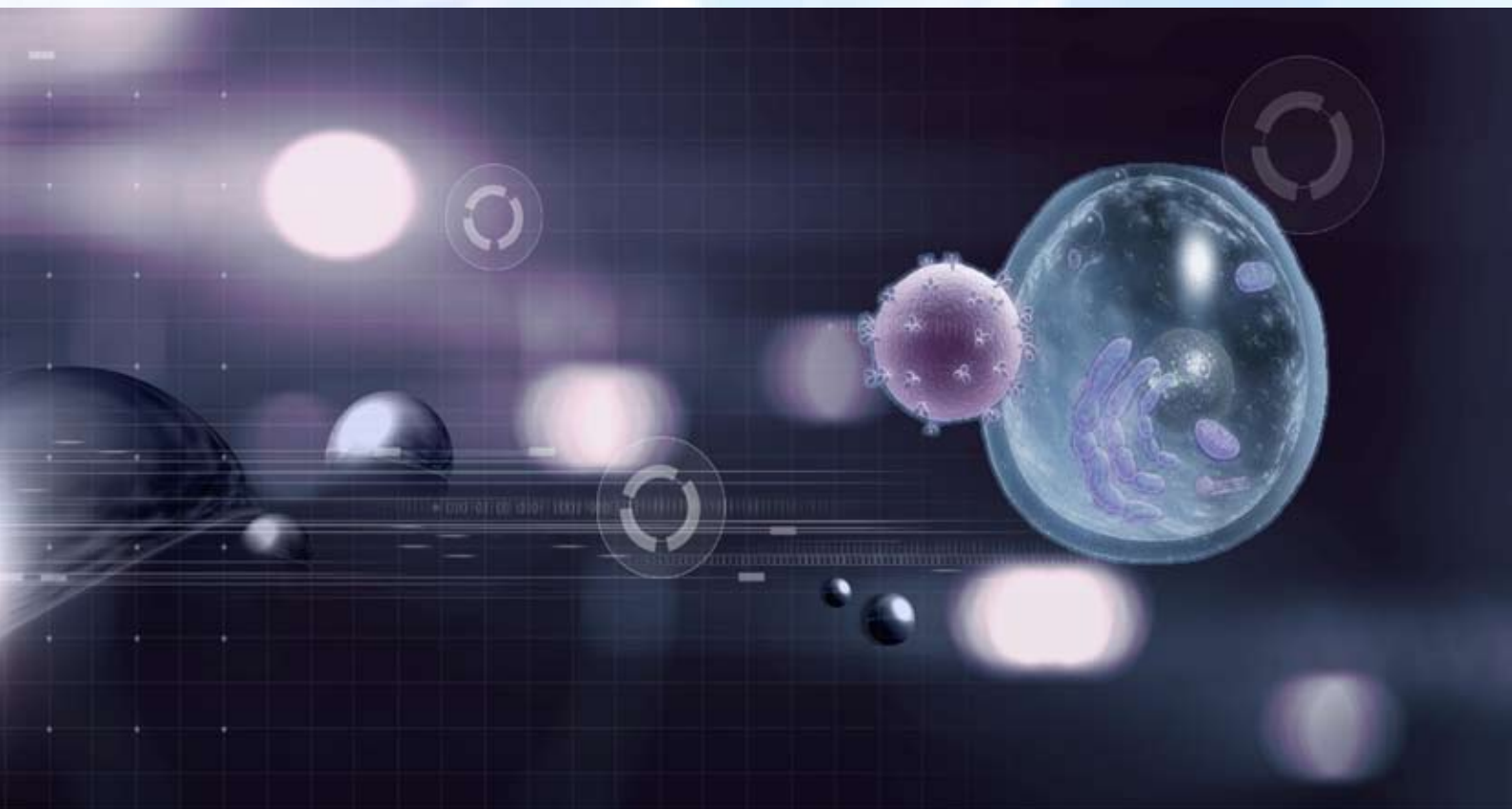
Edward Holmes是美国宾夕法尼亚州立大学(Pennsylvania State University)的病毒进化专家, 他指出, 如果继续发现更多新的病毒(不仅仅是发现新的巨病毒), 那么就可以解决病毒的起源问题。Holmes表示, 如果根据我们现有的知识和数据就下结论说我们已经彻底了解了病毒的进化史, 那是非常愚蠢的。在我们生活的地球上肯定还存在很多我们不知道的病毒, 其中的一部分病毒很有可能就是一个崭新的物种。

原文检索: CATHERINE MARY. (2012) Sound and Fury in the Microbiology Lab. *Science*, 335:1033-1035.

 筱玥/编译

慢病毒颗粒包装服务

慢病毒质粒构建 + 病毒包装 + 质检 = **最快20个工作日**



产品优势

- ◆ 25000个人源/15000个小鼠基因，1126个人源/672个小鼠/408个大鼠miRNA，多种载体和标签可供选择
- ◆ 15000个已构建慢病毒载体人源基因表达克隆、1200个慢病毒载体miRNA前体表达克隆、1200个慢病毒载体miRNA inhibitor表达克隆
- ◆ 选择已构建好的表达克隆包装病毒，最快20个工作日即可提供病毒颗粒，病毒滴度 $>10^7$ copies/ml

应用范围

- ◆ 目的基因、miRNA的过表达与抑制表达
- ◆ 可转导大部分细胞，包括原代细胞、干细胞等难转染细胞
- ◆ 稳定细胞株筛选
- ◆ 癌症、基因组疾病等的基因治疗

生命百态

Amazing Lives



可从模糊图像中获得清晰视野

跳蛛（jumping spider）用散焦法作为深度知觉的标准度量，从而锁定猎物。

我们都知道，模糊的视线是由于影像没有准确地聚焦在视网膜上而产生的。对人类来说，模糊的视线会妨碍我们精确地感知世界，于是，我们会竭力去纠正这种模糊的视线，以看清我们想要看清的东西。不过，有些蜘蛛却很特别，在它们眼里，图像仿佛故意在其视网膜中散焦，从而为它们提供重要的深度知觉，使它们能够做出高精确度的跳跃。近日，Nagata等人结合分子实验、电生理学实验以及行为实验，精彩地阐述了跳蛛奇特的深度知觉方式。

我们人类是以双眼构成的立体视觉来接收深度信息的。这种视觉特性被人类开发成3D影像技术，即分别向左右眼提供有细微区别的图像，从而产生逼真的效果。然而，许多动物（比如昆虫）就没有同等程度的双目性视觉，为了弥补这一缺陷，它们只好不断地转头，用这种运动视差来获知某一物体距离的远近。值得一提的是跳蛛（图1），它拥有令人钦羡的锐利主眼，这种主眼的特征是相对扩大。而其它两对或三对副眼也同样拥有良好的敏锐度，同时还是有效的运动检测器，这为它们的行动带来了极大的便利。



图1抓到你了！跳蛛利用其多层视网膜产生的差异性聚焦获得绿光图像，从而确定它与猎物之间的距离。

让我们先介绍一下跳蛛。正如其名，跳蛛是优秀的跳高选手，它能够精确地跨越沟渠或者扑向猎物。但是，这种动物是能像人类一样使用双目性立体视法呢，还是像其它昆虫一样拥有运动视差？我们并不知道。那么，它们如何获取环境中的深度信息呢？

20世纪80年代有人描述了跳蛛的前眼里不同寻常的“阶梯”视网膜，这为我们了解它们的视觉提供了一条线索。据称，跳蛛的前眼里并非只有单层的感光细胞，而是有一个多层的视网膜，上面有四层清晰可见的光感受器层。**Nagata**等人凭借分子生物学和电生理学的组合实验，研究了这些视网膜层的光学灵敏度。结果，他利用基因测序、表达分析和原位杂交的方法，识别出了这四层视网膜上所存在的视蛋白（由一组基因负责编码的具有特定色彩灵敏度的蛋白质）。此外，电生理学实验揭示了视网膜第1层和第2层对绿光最为敏感，第3层和第4层则对紫外光最敏感。同时，这些不同的光灵敏度都分别与视网膜层上已被识别出的视蛋白基因相匹配。然而奇怪的是，尽管视网膜第1层和第2层都主要含有对绿光敏感的光感受器，但色差效应却显示进入的绿光只清晰地聚焦于视网膜第1层。这意味着主要对绿光敏感的第二视网膜层（视网膜第2层）接收到的是散焦的图像，换句话说，就是“模糊的”图像。因此，**Nagata**等人认为，跳蛛其实是从这一层视网膜中接收的大量散焦图像来获取深度信息的，这些信息量和物体与其晶状体的距离成比例。

为了检验这一假说，**Nagata**等人做了一个实验，使跳蛛在不同的光条件下准确地跳向它们的猎物。其依据是，如果绿光通道的散焦起着重要的作用，那么在没有绿光的情况下，跳蛛就应该无法准确地判断其跳跃的距离。结果正如预想的那样，跳蛛在绿光下能准确地跳到猎物身上，而在红光照射下（此时将所有波长较短的光，如绿光或蓝光都移去）则总是低估其跳跃距离。综上所述，他们的实验数据提供了强大的证据，表明跳蛛运用奇特的图像散焦方式来获得深度感知。但是，其中涉及聚焦和散焦图像如何合

并的确切神经机制仍然没能被破解。

对视觉研究而言，弄清动物如何感知世界是一项巨大的挑战。而Nagata等人所作的研究以实例证明了动物视觉的复杂本质，并在加深我们对此现象的理解时凸显了行为研究的关键作用。目前，虽然视觉研究在利用先进的分子和生理学方法描述动物眼睛结构和识别光感受器方面取得了优异的成就，但基于此类数据的与动物感知相关的推断在缺乏行为实验的确切证据时，仍然无法在根本上证实由此得出的假说。而Nagata等人的研究却用实例表明他们确实能够利用分子技术和生理学技术来严谨地证实这类假说，并最终能获得重要的创见。不过，他们最终仍然需要借助完整的活体动物进行行为学实验。尽管如此，Nagata等人还是与目前视觉研究中愈加流行的技术方法相悖，开创了一条属于自己的新路，他的研究也因此表明：他所用的方法是如何补充而不是完全替代了动物视觉行为研究。

原文检索：

Marie E. Herberstein, Darrel J. Kemp. (2012). A Clearer View from Fuzzy Images. *Science* 335, 409-410.

 文佳/编译



蝙蝠吃甜品一举两得

吸食花蜜的鼯形长舌蝠（*Glossophaga soricina*）喜欢摄入高糖饮食，所以往往会有较高的血糖水平。尽管拥有这种嗜甜食的习惯，但它们却不会像其它哺乳动物（包括人类）那样遭受与糖相关的损害健康的疾病，甚至还更长寿——其寿命比体型类似的啮齿动物约长5倍。这一现象受到了来自莱布尼兹野生动物园研究所（Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research）的Detlev Kelm的关注，他和由德国学者组成的团队希望了解相关问题的答案，比如，这种蝙蝠如何在其休息和飞行期间调控自身血糖，又如何

避免高血糖饮食引起的不良效应。而今，他们所做出的有趣研究成果发表在了《美国科学院院刊》(PNAS)上。

首先，研究团队测量了蝙蝠在休息用餐时的血中葡萄糖水平，他们给予的伙食标准参照蝙蝠在野外通常食用的水准。有趣的是，蝙蝠的餐后血糖水平远远超过体型类似的哺乳动物的正常值，并且范围达到哺乳动物已有记录的最高水平。对此，研究者推断，这种蝙蝠已经进化出一种对葡萄糖的生理耐受性，从而能够避免高糖饮食的损伤性作用，由于短寿通常与此作用相关，因此它们的长寿也就不奇怪了。

接下来，研究者开始检测运动对调控血糖的作用。他们在蝙蝠享用了一顿大餐或者数顿规模较小的便餐之后，用三种不同的运动饮食疗法来开展研究。结果他们发现，一般而言，飞行中的蝙蝠血糖峰浓度下降程度明显较休息中的蝙蝠多。此外，餐后飞行时间较长的蝙蝠血糖峰浓度也较低，同时其血糖回落至餐前值的速度也更快。这表明，蝙蝠将飞行作为一种策略来防止血糖上升至过高的、以及能潜在性导致机体损伤的水平。

实际上，吸食花蜜的蝙蝠在野外环境中需要耗费高达12小时的时间来享用夜宵，其中60%的时间用于飞行。因此，Kelm等人表示，飞行不仅仅能帮助蝙蝠调控血糖水平，还能使之在寻找栖息地和新的食物来源上投入更多的精力，而这些可能为在美餐之间耗费大量时间于飞行中的蝙蝠提供极大的利益。

最后，研究者们希望知道，在给予蝙蝠相当于自然情况下的食物量较长一段时间内(如数周)，其血糖浓度到底会有多高。须说明的是，血糖能反作用于血中的血红蛋白，形成糖化血红蛋白，此作用依赖于血中的葡萄糖量以及红血球细胞的生命，因此糖化血红蛋白是一个合适的衡量标准。当Kelm从蝙蝠体内抽出血样，并测量糖化血红蛋白的量之后，结果发现：若以其它哺乳动物作为对照，那么吸食花蜜的蝙蝠血中的糖化血红蛋白处于正常的水平。这说明蝙蝠长期都拥有较低的血糖水平，因此不会忽然处于高血糖水平的威胁之下，也就不会产生相应的损伤作用。

尽管吸食花蜜的蝙蝠长寿的秘密仍然未被完全揭晓，但Kelm等人运用精心设计的实验阐述了这种蝙蝠如何利用飞行来获取高糖饮食所带来的收益，而避免其有害影响，还是很有意义的。所以说，或许我们也都能够尽情享受甜美的蛋糕，只要在吃完之后及时去跑一场马拉松，那么恐怕也能像蝙蝠一样，不仅不受任何不良影响，说不定还能长寿。

原文检索：

Kelm, D. V., Simon, R., Kuhlow, D., Voigt, C. C. and Ristow, M. (2011). High activity enables life on a high sugar diet: blood glucose regulation in nectar-feeding bats. *Proc. R. Soc. B* 278, 3490-3496.

 文佳/编译

A group of people are forming a human pyramid against a cloudy sky with a bright sun. The pyramid consists of four people standing on the ground, three people standing on their shoulders, and one person at the very top. The text is overlaid on the center of the image.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255