的关系，我们构建了 pcDNA3.1-HYAL1 质粒，利用脂质体将重组质粒转染到 Hyase 低表达的 MCF-7、ZR-75-30 细胞株，并筛选到稳定表达的细胞克隆。实验表明过表达 HYAL1 基因（转染重组载体）的 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞的侵袭力生成潜力明显增强。为进一步的细胞侵袭力试验、诱导人脐静脉内皮细胞（ECV-304）生成管腔潜能的变化试验和体内试验，以及为阐明 Hyase 的表达和 Hyase 基因的表型特点在乳腺癌进程中的作用，探索其对乳腺癌恶性行为的影响等提供了实验基础。

参考文献：

[1] 任国胜，王小毅，姚榛祥. 人乳腺癌细胞株透明质酸酶的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志，2002，19(4)：336－337.
[2] 王小毅，任国胜，石　远，等. 肝素对透明质酸酶不同表达水平的人乳腺癌细胞侵袭力的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(10)：1219－1221.
[3] 石　远，任国胜，王　良，等. 人乳腺癌细胞株透明质酸酶基因的表达及其意义[J]. 重庆医学，2005，34(2)：257－258.
[4] West D C, Hampson I N, Arnold F, *et al*. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid[J]. Science, 1985, 228(4705): 1324－1326.
[5] Lees V C, Fan T P, West D C. Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan[J]. Lab Invest, 1995, 73(2): 259－266.
[6] Csoka A B, Frost G I, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes[J]. Matrix Biol, 2001, 20(8): 499－508.
[7] Lokeshwar V B, Schroeder G L, Carey R I, *et al*. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37): 33654－33663.
[8] Hautmann S H, Lokeshwar V B, Schroeder G L, *et al*. Elevated tissue expression of hyaluronic acid and hyaluronidase validates the HA-HAase urine test for bladder cancer[J]. J Urol, 2001, 165(6 Pt 1): 2068－2074.
[9] Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C, *et al*. Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours[J]. Anticancer Res, 2002, 22(4): 2423－2427.

（编辑　龙　亮）

文章编号：1000-5404(2008)02-0149-01

个案与短篇

新生儿脐血单个核细胞 ICOS 与转录因子表达的观察

闫　莉，刘恩梅，黄　英　（重庆医科大学附属儿童医院呼吸内科，重庆 400014）

新生鼠及人脐血的研究均表明，新生儿 T 细胞有向 Th2 细胞发育的潜能。可诱导共刺激因子（inducible co-stimulate factor，ICOS）是近年来发现表达在活化 T 淋巴细胞表面的一种新型膜分子，转录因子 T-bet、GATA-3 和 Foxp3 分别是 Th1、Th2 和 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞的特异性转录因子，它们均可影响 T 细胞分化的上游调节。我们比较了新生儿脐血与成人外周血新鲜分离的单个核细胞及 PHA 刺激活化后的单个核细胞 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率，转录因子 T-bet、GATA-3、Foxp3 mRNA 的表达水平及相应的细胞因子的表达水平，以了解新生儿 Th1/Th2 的功能状态。

1　材料与方法

1.1　标本

收集足月、顺产、体质量 2.5～4 kg、37 周≤孕周＜42 周、1 min Apgar 评分≥8 分、产前产时无异常的新生儿脐血，对照组为健康成人，无特应性疾病家族史及个人史，无其他疾病史，采血前 4 周无明显感染史及免疫调节剂用药史。

基金项目：重庆市科委科技计划（2003-43-97）
Supported by the Sci&Tech Project of Chongqing Scientific Committee (2003-43-97)
作者简介：闫　莉，女，重庆市人，硕士，医师，主要从事小儿呼吸系统疾病方面的研究，现在成都儿童专科医院。电话：（028）85138837，E-mail：pipi8812@126.com
通信作者：刘恩梅，电话：（023）63624074，E-mail：emliu186@126.com
收稿日期：2007-06-06；修回日期：2007-09-10

1.2　实验方法

分离培养脐血单个核细胞（umbilical cord blood mononuclearcells，CBMC）和人外周静脉血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC），进行细胞培养后通过流式细胞仪检测 ICOS 表达，通过 RT-PCR 定量检测 T-bet，GATA-3，FoxP3 及内参照 β-actin 表达水平，并用 ELISA 法测定培养上清 IL-4、IL-10 IFN-γ 水平。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SAS 6.0 统计软件进行分析，两组间比较用 t 检验，多组间比较用双因素方差分析法。

2　结果

培养前 CBMC 的 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率显著高于 PBMC（$P<0.01$），无 PHA 刺激组与培养前无显著性差异（$P>0.05$）。PHA 刺激 48 h 后，CBMC 的 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率与 PBMC 的 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率均较培养前明显升高（$P<0.01$）。PHA 刺激后 CBMC 的 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率仍然显著高于 PBMC（$P<0.01$）。培养前、PHA 刺激 48 h 后 CBMC T-bet、GATA-3、Foxp3 mRNA 的表达强度均低于 PBMC，其中新生儿脐血 T-bet 表达显著低于 PBMC（$P<0.05$），3 种转录因子无 PHA 刺激组与培养前均无显著性差异（$P>0.05$），PHA 刺激后 CBMC Foxp3 mRNA 表达较培养前明显增高（$P<0.05$），同时显著高于 PBMC Foxp3 mRNA 表达（$P<0.01$）。PHA 刺激培养 48 h 后，

（下转 156 页）

别位于穿梭质粒和骨架质粒)之间的重组从而获得重组病毒,这个过程发生在 HEK-293 细胞中,从而避免在细菌中重组[14,15]。这个系统有多种优势,包括操作简便、出毒快、重组效率高、稳定性好、获得的病毒产率高、目的基因的表达水平高(因为 mCMV 启动子比 hCMV 启动子强若干倍)等。

本实验利用腺病毒 AdMax 包装系统成功构建了携带人 BMP-7 基因的重组腺病毒 Ad5-BMP-7,简化了实验步骤,缩短了构建周期,并获得了较高的病毒滴度,对 HKC 细胞具有较高的感染能力,这对利用所构建的重组腺病毒转染 HKC 细胞及肾脏其他细胞,进一步研究 BMP-7 在肾脏发育和肾脏疾病中的分子作用机制及治疗作用奠定了基础。

参考文献:

[1] Liu K D. Molecular mechanisms of recovery from acute renal failure [J]. Crit Care Med, 2003, 31(8 Suppl): S572 - S581.

[2] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis: The role of bone morphogenic protein-7 and hepatocyte growth factor[J]. Kidney Int Suppl, 2003, (87): S105 - S112.

[3] Klahr S, Morrissey J, Hruska K, *et al*. New approaches to delay the progression of chronic renal failure[J]. Kidney Int Suppl, 2002, (80): 23 - 26.

[4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 16 - 56.

[5] 江千里, 王建民, 温丽敏, 等. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(9): 1034 - 1035.

[6] Knippenberg M, Helder M N, Zandieh-Doulabi B, *et al*. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(3): 902 - 908.

[7] Davies J A, Fisher C E. Genes and proteins in renal development[J]. Exp Nephrol, 2002, 10(2): 102 - 113.

[8] Bosukonda D, Shih M S, Sampath K T, *et al*. Characterization of receptors for osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7 (OP-1/BMP-7) in rat kidneys[J]. Kidney Int, 2000, 58(5): 1902 - 1911.

[9] Davies J A. Morphogenesis of the metanephric kidney[J]. Scientific World J, 2002, 2: 1937 - 1950.

[10] Dudley A T, Lyons K M, Robertson E J. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye[J]. Genes Dev, 1995, 9(22): 2795 - 2807.

[11] Zeisberg M, Shah A A, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9): 8094 - 8100.

[12] Piscione T D, Phan T, Rosenblum N D. BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis *via* Smad1 dependent and independent pathways[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 280(1): F19 - F33.

[13] 房亚东, 徐 雪, 党永明, 等. 大鼠微管相关蛋白4重组腺病毒载体的构建及在细胞中的表达鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 880 - 882.

[14] 李钊伦, 田普训, 薛武军, 等. sCD40L Ig 重组腺病毒载体的构建鉴定和体外表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(21): 2107 - 2110.

[15] 丁涵露, 吴雄飞, 高闻达, 等. 重组 AdPD-L1 腺病毒的构建表达及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1190 - 1193.

(编辑 王小寒)

(上接149页)

CBMC 分泌的 IL-4、IL-10、IFN-γ 均低于 PBMC,其中 IL-10 和 IFN-γ 显著低于 PBMC($P<0.05$, $P<0.01$)。

3 讨论

有研究表明,母亲-胎盘-胎儿环境中的细胞因子在调节母体对胎儿同种异体抗原的反应中扮演了重要角色,其中 Th2 类细胞因子 IL-4 和 IL-10 有利于妊娠的继续,故妊娠期间母体的免疫系统和母胎界面的细胞因子微环境是偏向于 Th2 型体液免疫反应的[1],推测新生儿 T 细胞可能有向 Th2 细胞发育的潜能。近年来,研究表明在 Th1/Th2 分化过程中, ICOS、T-bet、GATA-3 和 Foxp3 均位于 Th1/Th2 分化的上游。对 T 细胞的激活、分化起着非常重要的作用。

本组对新生儿脐血的研究资料显示:培养前新生儿 CBMC $CD3^+ICOS^+$ 细胞阳性率明显高于成人 PBMC,且 T-bet mRNA 的表达显著低于 PBMC,进一步提示在出生时新生儿 $CD3^+$ T 细胞本身可能存在 Th2 分化发育的优势趋向。我们的研究表明,培养前 CBMC Foxp3 mRNA 与 PBMC 无显著性差异,而经 PHA 刺激后 CBMC Foxp3 mRNA 表达明显高于 PBMC,表明新生儿 T 细胞经活化后具备向 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞方向分化的能力。我们的研究结果还显示经 PHA 刺激后 CBMC 的细胞因子 IFN-γ、IL-4 与 IL-10 水平均较 PBMC 低下,其中 IL-10、IFN-γ 两者具有显著性差异。有研究表明,新生儿期 Th 细胞功能明显低下,产生各种细胞因子的能力普遍不足,可能与新生儿脐血 T 淋巴细胞较原始且又缺乏 T 淋巴细胞活化/生长因子有关,抗原表达既弱又不充分。但 Th1 类细胞因子 IFN-γ 水平低下更显著,呈现低水平的 Th2 优势状态[2],此为胚胎期免疫发育特性的延续[3]。

总之,通过对新生儿 Th1/Th2 分化上游阶段 ICOS、T-bet、GATA-3 和 Foxp3 研究,我们进一步证实 CBMC T 细胞有向 Th2 发育的倾向,经活化后向 Th2 分化的能力更强,并且具备向 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞分化的能力,同时,与健康成人相比,新生儿时期 T 细胞功能明显低下。

关键词: ICOS;转录因子;新生儿;T 细胞亚群
中图法分类号: R392.12 ;R392.11 文献标识码: B

参考文献:

[1] Gonzalo J A, Delaney T, Corcoran J, *et al*. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation[J]. J Immunol, 2001, 166(1): 1 - 5.

[2] Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(2): 330 - 336.

[3] 蒋力学, 史桂英, 石学耕, 等. 新生儿、儿童及成人外周血 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞分泌 IFN-γ 及 IL-4 变化的研究[J]. 上海免疫学杂志, 2002, 22(1): 23 - 25.

(编辑 王小寒)