

记忆性 T 细胞亚类的研究进展

史利军¹ 综述, 袁维峰¹, 王净², 李刚¹ 审校

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 北京 100193; 2. 河北北方学院 河北 张家口 075000

摘要: T 细胞免疫对于调节抗体的生成及清除受感染的细胞均发挥相当重要的作用。记忆性 T 细胞的特点是在初次免疫反应完成后仍能长期存活, 并形成不同的亚类, 每一亚类细胞又分为中枢记忆性 T 细胞和效应记忆性 T 细胞。这些记忆性 T 细胞在宿主体内长期存在, 当宿主受到再次感染时可提供有效的保护作用。本文结合最新研究进展, 对主要的记忆性 T 细胞(如 CD8⁺和 CD4⁺记忆性细胞)类型及其功能作一综述。

关键词: 记忆性 T 细胞; 中枢记忆性 T 细胞; 效应记忆性 T 细胞

中图分类号: R392.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2014)11-1488-05

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.000657

Progress in research on subsets of memory T cells

SHI Li-jun*, YUAN Wei-feng, WANG Jing, LI Gang

*Beijing Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Corresponding author: LI Gang E-mail: gli358@yahoo.com

Abstract: T-cell responses are known to play an important role in modulating antibody production and killing infected cells. The characteristic of memory T cells is their ability to survive for a long time and form various subsets after completion of immune response. Each subset includes central and effector memory T cells. These cells can persist in a host for a long time and provide long-term protection against reinfection. This paper reviews the subsets and function of main memory T cells such as CD8⁺ and CD4⁺ memory T cells.

Key words: Memory T cells (T_m); Central memory T cell (T_{cm}); Effector memory T cell (T_{em})

免疫记忆反应的发生是由抗原特异性 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞介导的。在免疫反应的后期, 大多数效应细胞凋亡, 少数细胞存活下来形成长寿的记忆性 T 细胞(memory T cells, T_m), 当再次受到抗原刺激时, 这些记忆性 T 细胞很快发生记忆反应, 为机体提供免疫保护。免疫记忆是疫苗免疫的基础与前提, 因此, 免疫记忆的维持以及基于记忆原理设计的疫苗等研究均为我们提供了一个广阔的理论与实践空间。疫苗免疫的主要目的是促进免疫记忆, 然而对于 T 淋巴细胞, 获得长期的免疫记忆已被证明是相对困难的^[1]。中和抗体不足以产生持续的免疫反应, 因此对抗病原疫苗免疫的基本目标是使机体产生 T_m^[2-3]。如: 基于 T 细胞的免疫对于季节性或大流感的流行可产生长期的免疫保护作用, 因为基于 T 细胞的免疫识别的是病毒内部的蛋白, 抗原漂移和变异对于 T 细胞免疫影响较小, 而对于识别病毒表面蛋

白的抗体而言, 抗原漂移和变异对其产生的保护力影响则相对较大^[4]。

很多研究集中在阐明 T_m 形成的机制和途径^[56]。T_m 除在病毒、细菌等病原清除中起作用外, 其还与许多自身免疫性疾病的发生有关, 如类风湿性关节炎、糖尿病等^[7], 同时, T_m 也可介导快速移植排斥反应^[8]。阐明 T_m 产生及记忆的机制对于如何提高保护性免疫时免疫记忆反应的发生及减少免疫疾病中免疫记忆反应均是非常重要的^[9]。本文主要介绍了 CD8⁺和 CD4⁺记忆性细胞, 并结合最新研究, 对主要的记忆细胞类型及其功能作一综述。

1 T_m 亚类、表型特征与组织分布

根据表型、组织分布及功能的差别, T_m 分为 CD4⁺T_m 和 CD8⁺T_m, 根据细胞表面趋化因子受体(chemokine receptor, CCR)7 和 L-选择素(cluster of differentiation 62 L-selectin, CD62L, 白细胞分化抗原 62L 选择素)表达的不同, T_m 又可分为功能明显不同

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2014ywf-yb-5 2011js-3)。

通讯作者: 李刚, E-mail: gli358@yahoo.com

的两类细胞,即中枢记忆性 T 细胞(central memory T cell, T_{cm})——CCR7+CD4+ T_{cm} 和效应记忆性 T 细胞(Effector memory T cell, T_{em})——CCR7-细胞^[10]。CCR7+记忆细胞和 CCR7-记忆细胞可同时高表达 CD62L,但 CCR7-细胞表达 CD62L 的水平则相对较低或变化较明显。与 CD4+ T_{cm} 相比,CD8+ T_{cm} 又被分为 T_{cm} (CCR7+)和 T_{em} (CCR7-),其 CCR7+细胞可高表达 CD62L,大多数 CCR7-细胞则缺少 CD62L。CD8+ T_{em} 中的 T_{em} RA 细胞因表达 CD45RA 分子而被命名^[11-12]。

可基于细胞表面的 CD28 和 CD95 分子鉴别 CD8+ T_{cm} /CD28+ / CD95+ 细胞为 CD8+ T_{cm} /CD28- / CD95+ 细胞为 CD8+ T_{em} 。CD8+ T_{cm} 在分化过程中获得了效应功能及表面的黏附分子、趋化因子受体的改变,这些分子的改变使得 CD8+T 细胞可以从淋巴组织中游出。经过数天的扩增,约 90% 病原特异性 CD8+T 细胞发生凋亡,剩余的小部分细胞在宿主体内获得长期的存活特性和能力^[13],在病原清除后变成了免疫记忆细胞。 T_{cm} 具有如下典型特征:①可长期存活;②受到抗原再刺激后可快速扩增,并重新获得效应功能;③在 IL-15 的作用下,可自我更新,维持稳定的细胞数量;④在静息阶段保持多种分化潜能,在再次感染中可迅速分化为效应性细胞毒性细胞。不同的效应和记忆性 CD8+细胞亚群在生命周期、组织归巢特性、免疫反应中的扩增和自我更新能力等方面均有很大的差异^[14]。在慢性感染中产生长寿的抗原特异性 CD8+细胞和急性感染中形成的 CD8+ T_{cm} 有着本质的不同的^[15]。

T_{cm} 表面不同的分子标志物影响其组织定位。 T_{cm} 主要在二级淋巴组织和器官中循环,如主要分布于脾脏、血液和淋巴结中, T_{em} 则主要分布于血液、淋巴结和外周非淋巴组织中。此外,通过不同的活性状态可鉴别 T_{cm} 和 T_{em} 。 T_{em} 在再次感染中的扩增反应较强,但效应反应相对较弱。CD4+ T_{cm} 细胞具备大量分泌 IL-2 的能力^[16]。 T_{em} 对于再感染反应迅速,并产生直接的细胞裂解活性,具备快速产生细胞因子并清除感染细胞的能力。CD8+ T_{em} 细胞可有效地分泌 IFN(interferon,干扰素) γ 、TNF(tumor necrosis factor,肿瘤坏死因子)- α 、IL(interleukin,白细胞介素)-4、IL-5 和穿孔素^[17]。CD4+ T_{cm} 和 CD8+ T_{cm} 的不同表型将直接影响它们在免疫反应中的功能。因为它们可以溢出到外周组织中, T_{em} 主要提供第一道免疫防线,而 T_{cm} 则不同,它们具备强大的增殖能力,可产生第二波的效应细胞,对于再次感染维持长期的保护力。大多数 T 细胞均是在不断循环着的,从

血液到组织再循环至血液,每天可循环 1~2 次。淋巴细胞的再循环可以保证及时地识别抗原并作出相应反应,但 T_{cm} 的再循环受表面归巢受体分子的影响。

T_{cm} 在淋巴和非淋巴组织中均有分布。 T_{cm} 表达 CD62L、CCR7、CCR4、CCR6、CXCR3、CCR1、CCR2 分子,与初始淋巴细胞相似,它们大部分存在于二级淋巴组织和器官中,仅一部分在血液和淋巴器官内循环。 T_{em} 不表达 CD62L 和 CCR7 分子,这类细胞可迁移到非淋巴组织中,到达炎症部位。 T_{em} 高表达 β 1 和 β 2 整合素、皮肤淋巴细胞抗原(cutaneous lymphocyte antigen,CLA)和趋化因子受体 CCR1、CCR3、CCR5。归巢到皮肤的 T_{em} 表达 CCR4 和 CCR10 分子,归巢到肠道的 T_{em} 表达 α 4 β 7 整合素分子和 CCR9。

2 T_{cm} 的形成及与初始细胞的差异

在免疫反应中,初始 CD8+T 细胞(Naive T cell, T_n)对于抗原的反应是进行显著的克隆扩增,同时产生大量的抗原特异性 T 细胞。初始 T 细胞在抗原刺激下分化为效应性 T 细胞,也叫细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)。这些效应细胞寿命均比较短,但有少量效应细胞分化为记忆细胞,一旦重新遇到同源抗原,记忆细胞对于抗原将会发生强烈的反应,包括细胞的迅速扩增及转变为效应细胞^[13]。 T_{cm} 的产生是免疫早期伴随而生的,这时初始 T 细胞通过其抗原受体(T cell receptor,TCR)、CD28 共刺激受体分别与抗原/MHC、共刺激配体(B7-1/B7-2)结合而被活化。根据分泌的细胞因子区分效应性 T 细胞,如 Th1 细胞分泌 IFN γ 、TNF- α 、IL-2, Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-13, Th17 细胞分泌 IL-17。大多数活化的效应性 T 细胞在体内均经历很短的生命周期,仅一小部分活化细胞可发展成为 T_{cm} (其具体机制尚不清),这些 T_{cm} 在个体的生命期内长期存在,调控机制尚需进一步研究。 T_{cm} 通过表型、功能及归巢性质的不同可与初始 T 细胞加以区别的^[9]。

2.1 IL-7R 在免疫反应早期,可观察到 IL-7R 不同水平的表达。 T_n 和 T_{cm} 均高水平表达 IL-7R,IL-7 对于这些细胞的稳定存在是不可缺少的。在抗原刺激的 48 h 内,大多数 T 细胞 IL-7R 的表达均会下调,只有小部分 T 细胞重新表达 IL-7R,这些重新表达 IL-7R 的细胞亚类与记忆性 T 细胞类似。IL-7R 低水平表达的细胞亚类与效应性 T 细胞相似,可表达效应性分子,如分泌颗粒酶 B 和 IFN γ 。IL-7R^{high} 细胞转化为记忆 T_{cm} 的可能性更大,IL-7R^{low} 细胞转化为 T_{cm} 的可能性小,这类细胞在最后阶段不再重新表达 IL-7R^[18]。

2.2 IL-2R α IL-2 是一种 T 细胞生长的关键细胞因子, 细胞接收这一细胞因子信号依赖于相应的细胞因子受体复合物, 这一受体复合物由高亲和力的 IL-2R α (CD25)、IL-2R β (CD122)和共有链 γ (CD132)组成。在静止阶段, CD8+T 细胞表达 IL-2 和 IL-2R α 的水平均较低, 在受到淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、流感病毒及其他外来刺激后, CD8+T 细胞表达 IL-2R α 的水平迅速的上调。IL-2R α^{high} 细胞最终分化为短寿命的终末效应细胞, 其扩增能力较低, 但 IL-2R α^{low} 细胞则具备极强的记忆能力, 类似长寿的记忆性 T 细胞^[19]。

2.3 KLR 杀伤细胞凝集素样受体亚家族 G 成员 1 (killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1, KLRG1) 是一种 C 型亲和素样受体, 包含免疫受体酪氨酸抑制基序 (immuno receptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)。在受到感染后, 鼠的效应和记忆性 CD8+T 细胞 KLRG1 表达均上调。目前, KLRG1 对于 T 细胞的调控作用机制尚不是很清楚, 但其被认为可以减轻免疫炎症反应, 从而可阻止自身免疫性疾病的发生。

3 免疫记忆的产生

CD8+T 细胞在分化过程中不需要抗原的持续存在。很多研究均表明^[20-21], 感染后 1 ~ 3 d 内 CD8+Tn 收到的抗原信号就足以保证其后续的分化过程。这些早期的抗原信号印迹, 对于 Tn 分化为 Tm 起到重要作用, 包括子代细胞核外遗传信息的改变并稳定表达、调控子代细胞克隆扩增, 使子代细胞获得效应功能等。但事实上, Tm 不是单一类型的细胞, 它是不同亚类和功能细胞的集合体, 从而决定了 Tm 形成过程影响因素的多样性^[22]。Tm 的形成有些是在初始阶段决定的, 有些是会受到其他因素的影响, 如组织定位的不同及炎症反应的性质。事实证明, 记忆前体细胞在免疫反应的早期就可以检测到, 免疫细胞的产生开始于免疫反应启动阶段。但后续的其他信号在记忆细胞成熟过程中也起到非常重要的作用, 所以, 效应细胞到记忆细胞的转变并不是一个随机的过程, 会受到很多影响因素的调控^[23]。

Tm 的形成包括各种核外遗传性状的改变, 最终导致基因表达调控的改变。近几年的研究也揭示了几种控制 CD8+Tm 形成的转录因子, 如 T-bet 是一种 T 盒转录因子, 主要调控 Th1 细胞的分化, 其和同源的转录因子 Eomesodermin (Eomes) 与效应和记忆 T 细胞的分化密切相关^[24]。对于小鼠基因突变的研究

发现, 随着编码以上两种转录因子基因的突变, T 细胞将不能上调 IL-2R β / CD122 的表达, 或不能诱导效应基因如颗粒酶 B 基因、IFN γ 基因和穿孔素基因的表达^[24]。由于缺少 CD122 / IL-15 的刺激, 这些突变鼠体内缺少 CD8+Tm。在 CD8+T 细胞的分化过程中, IL-12 反而能调控 T-bet 和 Eomes 的表达, 因此, IL-12 可促进 T-bet 而抑制 Eomes 的诱导和分化。在 Tm 中, T-bet 的表达会降低, 而 Eomes 的表达却会升高。进一步的研究也发现, 检测炎症反应高峰期 T-bet 的表达水平, 可以衡量记忆前体效应细胞 [memory precursor effector cells (MPECS)-KLRG1 $^{\text{low}}$ IL-7R $^{\text{high}}$] 和存活期较短的效应细胞 [short-lived effector cells (SLECs)-KLRG1 $^{\text{high}}$ IL-7R $^{\text{low}}$] 的比率^[25]。在免疫反应的早期, CD8+Tm 一旦受到感染, T-bet 的表达就会增加。T-bet 高表达的细胞将分化为效应细胞, T-bet 低表达的细胞将分化为记忆细胞^[25]。

最近的研究发现^[26], B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1 (B lymphocyte induced maturation protein-1, Blimp-1) 和 B 细胞淋巴瘤 / 白血病蛋白-6 (B-cell lymphoma / leukemia-6, Bcl-6) 对于效应 / 记忆细胞的分化方向均起到一定的作用。Blimp-1 在效应和记忆细胞中均有表达, 其对于效应性 T 细胞的终末分化是不可缺少的, 缺少 Blimp-1 将妨碍效应 T 细胞的分化及免疫记忆前体细胞的产生。此外, Bcl-6 对于免疫记忆细胞的分化也是不可缺少的, Bcl-6 的过表达可使 Tm 生成增加, 反之, 缺少 Bcl-6 可影响 Tm 的生成及存活。与 Bcl-6 同源的 Bcl-6b 对于二次免疫反应的发生也是不可缺少的, Bcl-6 和 Blimp-1 可相互阻止对方的表达。Blimp-1 缺陷的 T 细胞 T-bet 的表达会降低, 而 Bcl-6 和 Eomes 的表达会升高^[26]。

DNA 结合蛋白抑制剂-2 (DNA binding protein inhibitor-2, Id2)、B 细胞特异鼠白血病病毒整合位点基因-1 (B cell-specific LV integration site-1, Bmi-1)、丝氨酸蛋白酶抑制剂-2A (serine protease inhibitor-2A, Spi-2A) 和肺 Kruppel 样因子 (Lu Mng Kruppel-like factor, LKLF) 也与效应及记忆细胞的分化有关^[27]。Id2 是 E 蛋白转录因子家族成员中的一种抑制剂, 在 Id2 缺乏的情况下, 由于凋亡的增加使得扩增的效应细胞减少, 但 Id2 不能决定 CD8+记忆性 T 细胞亚类的分化, 因为在 Tcm 和 Tem 细胞中均有 Id2 的表达。TCR 在记忆前体细胞中持续诱导表达 Bmi-1, 但在终末效应性 T 细胞中其表达将受到抑制, 此外, 因为有细胞周期停滞蛋白 (Ink4a) 及凋亡因子 (Arf and Noxa) 的产生, Bmi-1 的缺乏也将使 CD4+T 细胞转化为 Th1 记忆细胞受到影响。Spi-2A 是一种维持

CD8+T 细胞稳定存在的蛋白,其具有促进记忆细胞分化的作用,同时 Spi-2A 也是一种 NF- κ B 依赖性的溶解体蛋白酶抑制剂,可保护 CD8+T 细胞在免疫反应的最后阶段发生凋亡。LKLf 对于初始淋巴细胞的稳定存在非常重要,在受到 TCR 刺激时,LKLf 的表达会下调,LKLf 由 IL-2 和 IL-7 诱导产生,LKLf 的重新表达与 T_m 的长期稳定存在和发育过程是一致的,这表明 LKLf 对于 T_m 的持续存在起一定的作用。

4 免疫记忆的维持

在急性感染阶段随着病原的清除,CD4+和 CD8+T_m 的维持依赖 IL-7 和 IL-15,而 IL-7 和 IL-15 共同维持细胞的生存、扩增及更新^[26]。而记忆性 T 细胞稳态增殖的维持与其亚类及其所识别抗原的性质有关:①针对感染性病原体的 CD8+T_m 表型为 CD22^{high}CD127^{high},更新率低,其存活依赖于 IL-7,稳态增殖依赖于 IL-15;②针对联合使用佐剂的蛋白抗原和部分自身抗原特异性的 CD8+T_m 细胞,表型为 CD22^{high}CD127^{high},更新率低,其存活和稳态增殖依赖于 IL-15 或高浓度 IL-7;③针对共生抗原(来自共生菌)和部分自身抗原的特异性 CD8+T_m 表型为 CD22^{low}CD127^{low},更新率较快,其存活和稳态增殖均依赖于主要组织相容性复合体分子(major histocompatibility complex MHC I);④针对感染性病原体、部分共生抗原或部分自身抗原的 CD4+T_m 表型为 CD22^{low}CD127^{high};⑤记忆性 T 细胞更新率慢,其存活和稳态增殖均依赖于 IL-7 和 IL-15,但针对部分共生抗原或部分自身抗原的 CD4+T_m 细胞,表型为 CD22^{low}CD127^{high},更新率快,其存活依赖于 IL-7 和 IL-15,稳态增殖则依赖于 IL-7、IL-15 和 MHC II 类分子^[28-29]。

5 结 语

为了了解 T_m 的生物学特性,有必要明确其基本的性质、分类,明确其与 T_n 细胞的不同。T_m 的产生是伴随免疫早期而生的,大多数活化的效应性 T 细胞在体内均经历很短的生命周期,仅一小部分活化细胞可发展成为 T_m,其分化机制还需要进一步的研究,且 T_m 在个体生命期内长期存在及自我更新的机制尚不是很清楚^[6]。

综上所述,了解 T_m 的组成和各自的功能,将有助于人们认识免疫记忆的本质,揭示免疫记忆的规律,同时也为新型疫苗的研发及免疫疾病的治疗奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Bröker BM, Holtfreter S, Bekeredjian-Ding I. Immune control of Staphylococcus aureus-regulation and counter-regulation of the adaptive immune response [J]. *Int J Med Microbiol*, 2014, 304 (2): 204-214.
- [2] McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. The potential of CD4 T-cell memory [J]. *Immunology*, 2010, 130 (1): 1-9.
- [3] Castellino F, Galli G, Del Giudice G, et al. Generating memory with vaccination [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39 (8): 2100-2105.
- [4] McKinstry KK, Dutton RW, Swain SL, et al. Memory CD4 T cell-mediated immunity against influenza A virus: more than a little helpful [J]. *Arch Immunol Ther Exp(Warsz)*, 2013, 61 (5): 341-353.
- [5] Boussiotis VA, Chatterjee P, Li L. Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications [J]. *Cancer J*, 2014, 20 (4): 265-271.
- [6] Matarese G, Colamatteo A, De Rosa V. Metabolic fuelling of proper T cell functions [J]. *Immunol Lett*, 2014, 161 (2): 174-178.
- [7] Oling V, Reijonen H, Simell O, et al. Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to Type 1 diabetes [J]. *Cell Immunol*, 2012, 273 (2): 133-139.
- [8] Barrett DM, Singh N, Liu X, et al. Relation of clinical culture method to T-cell memory status and efficacy in xenograft models of adoptive immunotherapy [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16 (5): 619-630.
- [9] Bushar ND, Farber DL. Recalling the year in memory T cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1143 (11): 212-225.
- [10] Ojdana D, Safiejko K, Lipska A, et al. Effector and memory CD4+ and CD8+ T cells in the chronic infection process [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2008, 46 (4): 413-417.
- [11] Bosque A, Planelles V. Studies of HIV-1 latency in an ex vivo model that uses primary central memory T cells [J]. *Methods*, 2011, 53 (1): 54-61.
- [12] Obar JJ, Lefrancois L. Memory CD8+ T cell differentiation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1183(1): 251-266.
- [13] Cierci N, Camisa B, Cocchiarella F, et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors [J]. *Blood*, 2013, 121 (4): 573-584.
- [14] Belz GT, Kallies A. Effector and memory CD8+ T cell differentiation: toward a molecular understanding of fate determination [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22 (3): 279-285.
- [15] Rutishauser RL, Kaech SM. Generating diversity: transcriptional regulation of effector and memory CD8 T-cell differentiation [J]. *Immunol Rev*, 2010, 235 (1): 219-233.
- [16] MacLeod MK, Clambey ET, Kappler JW, et al. CD4 memory T cells: what are they and what can they do [J]. *Semin Immunol*, 2009, 21 (2): 53-61.
- [17] Cuddapah S, Barski A, Zhao K. Epigenomics of T cell activation, differentiation, and memory [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22 (3): 341-347.
- [18] Belz GT, Kallies A. Effector and memory CD8+ T cell differentiation: toward a molecular understanding of fate determination [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22 (3): 279-285.

[19] Knudson CJ , Weiss KA , Hartwig SM , *et al.* The pulmonary localization of virus-specific T lymphocytes is governed by the tissue tropism of infection [J]. *J Virol* , 2014 , 88 (16) : 9010-9016.

[20] Koning D , Costa AI , Hasrat R , *et al.* In vitro expansion of antigen-specific CD8(+) T cells distorts the T-cell repertoire [J]. *J Immunol Methods* , 2014 , 405 (3) : 199-203.

[21] Melhem NM , Smith KN , Huang XL , *et al.* The impact of viral evolution and frequency of variant epitopes on primary and memory human immunodeficiency virus type 1-specific CD8 T cell responses [J]. *Virology* , 2014 , 450-451 (2) : 34-48.

[22] D'Cruz LM , Rubinstein MP , Goldrath AW. Surviving the crash : transitioning from effector to memory CD8+ T cell [J]. *Semin Immunol* , 2009 , 21 (2) : 92-98.

[23] Daniels MA , Teixeira E. The persistence of T cell memory [J]. *Cell Mol Life Sci* , 2010 , 67 (17) : 2863-2878.

[24] Suzuki H , Shi Z , Okuno Y , *et al.* Are CD8+CD122+ cells regulatory T cells or memory T cells [J]. *Hum Immunol* , 2008 , 69 (11) : 751-754.

[25] Cui W , Kaech SM. Generation of effector CD8 + T cells and their conversion to memory T cells [J]. *Immunol Rev* , 2010 , 236(1) : 151-166.

[26] Farber DL. Biochemical signaling pathways for memory T cell recall [J]. *Semin Immunol* , 2009 , 21 (2) : 84-91.

[27] Pearce EL. Metabolism in T cell activation and differentiation [J]. *Curr Opin Immunol* , 2010 , 22 (3) : 314-320.

[28] Surh CD , Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells [J]. *Immunity* , 2008 , 29(6) : 848-862.

[29] Tan Z , Gong FL. The functional subsets of T cells [J]. *Chin Bull Life Sci* , 2010 , 22(6) : 499-505. (in Chinese)
谭政,龚非力. T 细胞功能亚群[J]. *生命科学* , 2010 , 22(6) : 499-505.

收稿日期 2014-04-24 编辑 王佳凤

(上接第 1487 页)

3 讨论

显微镜下观察显示 ,36 代细胞 1 : 2 传至 37 代 ,细胞能长成单层 ,长势明显好于 35 代细胞 1 : 4 传至 37 代 ,1 : 4 传代的细胞基本能长成薄单层 ,但有空隙。克氏瓶 1 : 2 与 1 : 4 比例传代的细胞无明显差异 ,但在细胞工厂中则截然不同 ,细胞传代比例为 1 : 2 培养液加量为 300 ml / 层时 ,细胞各生长阶段均正常 ,培养液加量为 200 ml / 层 ,细胞长势缓慢 ,生长不旺盛 ,形态不佳 ,原因是营养成分不足所致 ,培养液加量为 400 ml / 层 ,细胞数较少 ,长势不旺盛 ,分裂相亦不足 ,原因是氧气不足所致。细胞传代比例为 1 : 4 时 ,由于传代比例过低 ,营养成分、氧气不足 ,导致两种传代比例的细胞数相差约 1 000 万。在相同加液量下 ,两种传代比例的细胞数差异有统计学意义($P < 0. 001$)。

细胞病变的圆润、典型、广泛程度直接决定疫苗的质量和产量。在相同条件下 ,细胞质量越好 ,数量越多 ,在其体内繁殖的病毒质量就越好 ,生产的疫苗质量也越好 ,产量越高。本实验结果表明 ,1 : 4 传代的细胞病毒滴度明显低于 1 : 2 传代的细胞。

细胞工厂的使用 ,可全面实现细胞培养的自动化 ,大大降低劳动强度和密集度 ,提高生产率 ,降低污染率 ,而且细胞工厂的操作性、可控性更强 ,只要掌握好传代比例 ,控制好营养成分 ,保证供氧充足 ,细胞工厂可替代传统的培养瓶培养技术 ,实现大规模的细胞培养 ,制备出质量均一的细胞。

参考文献

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China(Vol) [S]. Beijing : China Med Sci Press , 2010. (in Chinese)
国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (三部)[S]. 北京 : 中国医药科技出版社 , 2010.

[2] Li JP , Zhou CJ , Wang Y , *et al.* Culture of CHO-C28 cells by domestic and imported DMEM [J]. *Chin J Biologicals* , 2007 , 20(3) : 219-222. (in Chinese)
李建平,周长军,王宇,等. 国产与进口 DMEM 培养基培养 CHO-C28 细胞效果比较 [J]. *中国生物制品学杂志* , 2007 , 20 (3) : 219-222.

[3] Yao W , Zhong JQ , Su B , *et al.* Preparation of inactivated hemorrhagic fever with renal syndrome vaccine by primary kidney cells of Gerbil mice cultured on cell-stack apparatus [J]. *Chin J Biologicals* , 2010 , 23(6) : 613-614 , 618. (in Chinese)
姚伟,钟建琴,苏波,等. 细胞工厂培养沙鼠肾原代细胞制备肾综合征出血热灭活疫苗 [J]. *中国生物制品学杂志* , 2010 , 23(6) : 613-614 , 618.

[4] Liu XP , Wei ZD , Xie P , *et al.* Study on the production of rotavirus vaccine by CellSTACK [J]. *Prog in Microbiol Immunol* , 2011 , 39(4) : 13-16. (in Chinese)
刘学平,魏至栋,谢澎,等. 细胞工厂生产口服轮状病毒活疫苗的应用研究 [J]. *微生物学免疫学进展* , 2011 , 39(4) : 13-16.

[5] 郝鹏博,谢秋红,杜岩,等. 比较胰酶 / EDTA 两种消化液对携带水痘-带状疱疹病毒的 2BS 消化效果分析 [J]. *中国实用医药* , 2011 , 6(21) : 60-61.

收稿日期 2013-12-04 编辑 何巍