

趋化因子受体7基因绿色荧光慢病毒载体构建及在未成熟树突状细胞中的表达***

宋立孝¹, 张璞¹, 李德鹏¹, 曾令宇², 陈翀², 潘秀英¹, 徐开林¹, 黄一虹¹

Construction and expression of mouse chemokine receptor-7 green fluorescent lentiviral expression vector in immature dendritic cells

Song Li-xiao¹, Zhang Pu¹, Li De-peng¹, Zeng Ling-yu², Chen Chong², Pan Xiu-ying¹, Xu Kai-lin¹, Huang Yi-hong¹

Abstract

BACKGROUND: Chemokine receptor 7 (CCR7) plays a key role in launching and regulating the migration of dendritic cells (DCs) from peripheral tissue to the lymphatic system. But immature dendritic cells (imDCs) do not express CCR7. Therefore, imDCs carrying CCR7 possess great prospect for stronger immune tolerance.

OBJECTIVE: To construct green fluorescent protein (GFP) lentiviral expression vector with mouse CCR7 gene and to observe the expression of CCR7 gene in imDCs.

METHODS: The CCR7 was amplified from the mouse thymus by RT-PCR and transfected into pCR-Blunt carrier. The CCR7 DNA fragment and IRES-GFP were cloned into lentiviral expression vector LV-Lac, to form recombinant lentiviral plasmid LV-CCR7. Three plasmids of the lentiviral system (recombinant lentiviral plasmid LV-CCR7, package plasmid ΔNRF, envelope plasmid pVSVG) were co-transfected with package lentivirus by lipofectamine. The imDCs were infected by the recombinant lentiviral, The morphology of transfected imDCs was examined under a fluorescent microscope and flow cytometry was used to determine the expression of CCR7.

RESULTS AND CONCLUSION: The CCR7 fragment was amplified from cDNA of the mouse thymus and subcloned to pCR-Blunt carrier, and lentiviral expression vector LV-CCR7 was constructed successfully. After infected with 293 FT cells for 24 hours through three plasmid package system, positive expression of GFP was observed under fluorescence microscope. The titer of the lentivirus was above 10⁸ U/L, and to obtain the recombinant lentiviral with mouse CCR7 gene. The lentiviral plasmid could infect imDCs effectively, a large amount of GFP and CCR7 expression was observed under fluorescence microscope and flow cytometry, respectively, and the positive rate was 50%. It indicates that GFP lentiviral vector LV-CCR7 with mouse CCR7 gene were successfully constructed and expressed in imDCs.

Song LX, Zhang P, Li DP, Zeng LY, Chen C, Pan XY, Xu KL, Huang YH. Construction and expression of mouse chemokine receptor-7 green fluorescent lentiviral expression vector in immature dendritic cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(1): 134-138. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 趋化因子受体 7(chemokine receptor-7, CCR7)是树突状细胞从外周迁移至淋巴系统发挥作用的最重要的启动和调节者,但未成熟树突状细胞表面不表达 CCR7,因此利用携带 CCR7 基因的未成熟树突状细胞可以更好地诱导免疫耐受。

目的: 构建携带小鼠 CCR7 基因的绿色荧光蛋白重组慢病毒载体,观察其在未成熟树突状细胞中的表达。

方法: 采用 RT-PCR 扩增小鼠 CCR7 基因并克隆至 pCR-Blunt 载体。将 CCR7 DNA 片段及 IRES-GFP 连入慢病毒转移质粒 LV-Lac,生成重组慢病毒质粒 LV-CCR7。采用脂质体转染法将慢病毒系统 3 质粒(重组慢病毒质粒 LV-CCR7、包装质粒 ΔNRF 及包膜质粒 pVSVG)共转染包装慢病毒,重组慢病毒感染未成熟树突状细胞,光学显微镜观察细胞状态,流式细胞术鉴定 CCR7 蛋白的表达。

结果与结论: 实验成功扩增出小鼠 CCR7 DNA 片段并克隆至 pCR-Blunt 载体,亚克隆构建慢病毒表达载体 LV-CCR7,经 3 质粒包装系统感染 293 FT 细胞后,24 h 于荧光显微镜下均观察到绿色荧光蛋白阳性表达,病毒滴度为 10⁸ U/L 以上,获得携带 CCR7 基因的重组慢病毒。慢病毒颗粒可有效感染未成熟树突状细胞,荧光显微镜可见大量 GFP 蛋白表达,阳性细胞达 50%,流式细胞术检测到 CCR7 蛋白表达, LV-CCR7 基因修饰的未成熟树突状细胞仍保持在未成熟状态。结果证实,实验成功构建携带小鼠 CCR7 基因绿色荧光慢病毒载体 LV-CCR7,并可在未成熟树突状细胞中表达。

关键词: 趋化因子受体 7; 未成熟树突状细胞; 慢病毒载体; 真核表达; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.01.029

宋立孝, 张璞, 李德鹏, 曾令宇, 陈翀, 潘秀英, 徐开林, 黄一虹. 趋化因子受体 7 基因绿色荧光慢病毒载体构建及在未成熟树突状细胞中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(1):134-138. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

树突状细胞是目前已知最有效的抗原递呈细胞,是一类具有不同亚群和不同功能的异质

性细胞群体。树突状细胞可以引起初始T细胞活化、分化或者耐受,这种不同的作用与树突状细胞的成熟状态有关^[1-3]。通常认为成熟树突状细胞诱导免疫应答,而未成熟树突状细胞介导特异性的免疫耐受^[4-5]。

¹Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China;
²Laboratory of Transplant Immunology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Song Li-xiao★, Master, Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China songlixiao510@126.com

Correspondence to: Huang Yi-hong, Professor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China hxr1583@sina.com

Supported by: Jiangsu Provincial Natural Science Foundation of Higher Education Institution, No.07KJD320224*; Xuzhou Science and Technology Plan Program, No. XF10C065*

Received: 2011-09-16
Accepted: 2011-12-13

目前已知趋化因子是介导树突状细胞在体内迁移、分化成熟和完成抗原递呈功能的重要因子。在树突状细胞分化成熟的过程中, 趋化因子受体(chemokine receptor, CCR)表达谱也不断发生变化, 使不同发育阶段的树突状细胞对不同趋化因子表现出不同的反应^[6]。

未成熟阶段树突状细胞可高表达巨噬细胞炎性蛋白MIP-1 α 和MIP-1 β 等趋化因子及CCR2和CCR5等趋化因子受体, 在炎症因子等刺激下, 某些趋化因子表达下调, 树突状细胞成熟并迅速表达CCR7以及强烈上调对其配体SLC(CCL21)和MIP3 β (CCL19)的趋化活性^[7], 最终促使树突状细胞离开外周组织进入引流淋巴结T细胞区。

在CCR7或其配体SLC和MIP3 β 缺陷的基因敲除小鼠, 树突状细胞不能迁移至次级淋巴结器官, 因为未成熟树突状细胞上不表达CCR7^[8-9]。未成熟树突状细胞的发育是个动态过程, 并不具有迁移特性。

实验拟构建表达趋化因子受体CCR7的慢病毒载体, 用携带CCR7基因的慢病毒颗粒感染小鼠骨髓来源的未成熟树突状细胞, 检测未成熟树突状细胞细胞表型和成熟状态的变化, 以及未成熟树突状细胞细胞表面CCR7的表达, 为进一步研究CCR7基因修饰的未成熟树突状细胞归巢、趋化性以及在外周骨髓移植免疫耐受中的作用提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 基因学体外实验。

时间及地点: 于2010-07/2011-02在徐州医学院移植免疫实验室完成。

材料:

实验动物: 健康SPF级8~10周龄雄性C57BL/6小鼠, 体质量(25.07 \pm 1.08)g, 动物质量合格证号: SCXK(苏)2007-0001, 购于扬州大学实验动物中心。

实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[10]。

质粒: 包装质粒 Δ NRF, 包膜蛋白质粒pMD, 质粒MigR1内含内部核糖体进入位点IRES和GFP, 质粒LV-Lac(内含CMV启动子)均由本实验室保存。

细胞: 慢病毒包装细胞系293 FT细胞, 购自美国Invitrogen公司。

感受态TOP10细胞购自北京天根公司, 置于-80℃冰箱保存。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
总RNA提取试剂Trizol、M-MLV反转录酶、Pfx高保真DNA聚合酶	美国Invitrogen公司
限制性内切酶BamHI, EcoRI, SalI, KpnI, T ₄ DNA连接酶	美国NEB公司
1 kb DNA相对分子质量标记物	立陶宛Fermentas公司
小鼠重组粒-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)	Protech公司
转染试剂Lipofectmine 2000	美国Invitrogen公司
FITC标记的抗小鼠CD11c抗体、PE标记的抗小鼠、CCR7、CD80、APC标记的抗小鼠CD86抗体及同型对照流式抗体	美国ebioscience公司
各种培养基和胎牛血清	美国Gibco公司
克隆载体pCR-Blunt T载体	美国Invitrogen公司

徐州医学院附属医院,¹血液科,²移植免疫实验室, 江苏省徐州市221002

宋立孝★, 男, 1983年生, 山东省桓台县人, 汉族, 2011年徐州医学院毕业, 硕士。
songlixiao510@126.com

通讯作者: 黄一虹, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 徐州医学院附属医院血液科, 江苏省徐州市221002
hxr1583@sina.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2012)01-00134-05

收稿日期: 2011-09-16
修回日期: 2011-12-13
(20110411025/WJ-C)

实验方法:

引物设计: 根据GeneBank公布的小鼠CCR7 cDNA序列用Primer Primer 5软件设计PCR引物。CCR7引物: 上游(P1)引入BamHI酶切位点e5'-AAG GAT CCA TGG ACC CAG GGA AAC C-3', 下游(P2)5'引入EcoRI酶切位点5'-AAG AAT TCC TAC GGG GAG AAG GTT GTG -3'。引物委托上海Invitrogen公司合成。

目的基因的克隆: 取C57BL/6小鼠的胸腺组织, Trizol法提取总RNA, 使用OligodT18作为引物使用M-MLV反转录酶按说明书操作合成cDNA。使用Pfx DNA聚合酶扩增CCR7基因, PCR条件为94℃预变性2 min; 继之94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 68℃ 90 s, 共35个循环, 68℃终末延伸2 min。0.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物, 回收目的片段并克隆入pCR-Blunt载体, 转化TOP10感受态细胞, EcoRI单酶切初步鉴定重组子, 将鉴定正确者送Invitrogen公司行DNA测序鉴定, 将正确的重组子命名为pCR-Blunt-CCR7。

重组慢病毒转移质粒LV-CCR7的构建和鉴定: 经酶切和测序鉴定正确后, BamHI/EcoRI双酶切重组质粒pCR-Blunt-CCR7, EcoRI/SalI双酶切质粒MigRI, 回收IRES-GFP DNA片段, BamHI/SalI双酶切质粒LV-Lac, 回收LV骨架片段, T₄DNA连接酶连接回收的3个片段, 转化感受态细胞TOP10, 小量提取重组质粒使用限制性内切酶BamHI/

Kpn I 酶切鉴定, 鉴定正确者中量提取质粒已备转染用。

293 FT细胞培养: 将293 FT慢病毒包装细胞于含体积分数10% FBS和6 mmol/L L-谷氨酰胺的高糖DMEM培养基于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中常规培养, 每隔两三天传代1次。

慢病毒载体包装细胞系的建立: 将培养的293FT细胞接种于多聚赖氨酸铺板的100 mm培养皿中, 当细胞融合度达到80%时利用脂质体进行转染。按照质量LV-CCR7 15 μg, ΔNRF 10 μg, PMD.G 5 μg溶于1.5 mL Opti-MEM 培养基稀释; 按混合质粒(μg)与脂质体(μL)=1:2取脂质体, 即48 μL Lipofectamine 2000 以1.5 mL Opti-MEM培养基稀释; 室温孵育5 min 后将稀释后的质粒与Lipofectamine 2000混匀, 室温孵育25 min后加入培养皿中, 轻轻混匀, 于37 °C、体积分数5% CO₂培养箱中培养。孵育24 h后荧光显微镜下观察GFP表达情况。24 h后将培养基更换为体积分数2% FBS的高糖DMEM培养基, 继续培养48 h后收集培养含有病毒颗粒的上清, 0.45 μm 滤器过滤后使用超速离心机70 000 g 4 °C离心2 h后弃去上清, 使用Opti-MEM培养基4 °C溶解过夜重悬病毒颗粒。

未成熟树突状细胞的培养及慢病毒的感染: 将小鼠无菌条件下取股骨和胫骨, 剪开干骺端, 冲洗收集骨髓离心, 含体积分数10%胎牛血清1640培养基重悬细胞, 分至6孔板, 每孔加入细胞数1×10⁶, 加入20 μg/L rmGM-CSF, 37 °C温箱孵育, 定期换液, 培养至第5天按MOI=20加入浓缩的慢病毒颗粒, 并加入聚凝胺至终浓度为8 mg/L, 感染后6 h换液。同时设立LV空载体对照组, 第5天换液时加入脂多糖(LPS), 刺激48 h后, 即第7 d收获成熟树突状细胞。

流式细胞仪检测: 离心收集树突状细胞, PBS洗涤3次, 常温条件下使用FITC标记的CD11c及PE标记的CD80、CCR7, APC标记的CD86的流式抗体, 避光孵育细胞20 min, PBS洗涤细胞并重悬, 行流式细胞术检测树突状细胞表面CCR7的表达。

主要观察指标: 荧光显微镜下观察未成熟树突状细胞的绿色荧光表达, 流式细胞仪检测转染后的未成熟树突状细胞表面CCR7的表达。

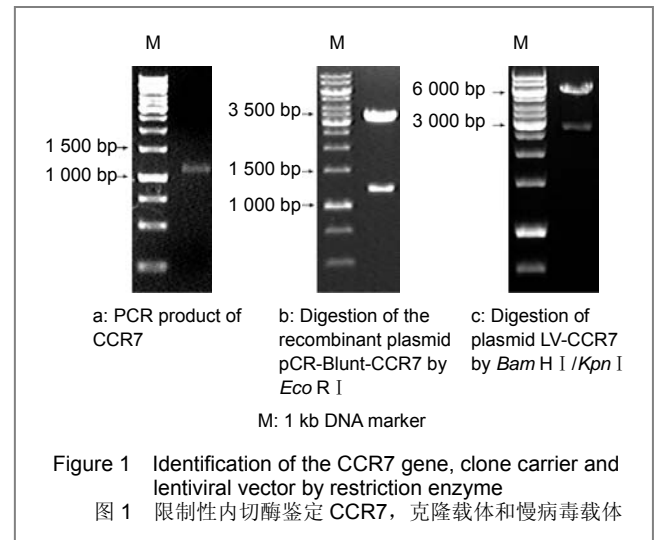
统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS.13.0统计处理软件分析, 单变量两组资料之间的比较采用两样本t 检验, P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 小鼠 CCR7 基因的克隆和克隆载体的构建 CR产物经0.7%琼脂糖凝胶电泳, 在1.1 kb处见到清晰的条带, 与目的片段大小相符, 结果见图1a。使用限制性内切酶 *Eco* R I 酶切构建的重组质粒 pCR-Blunt-

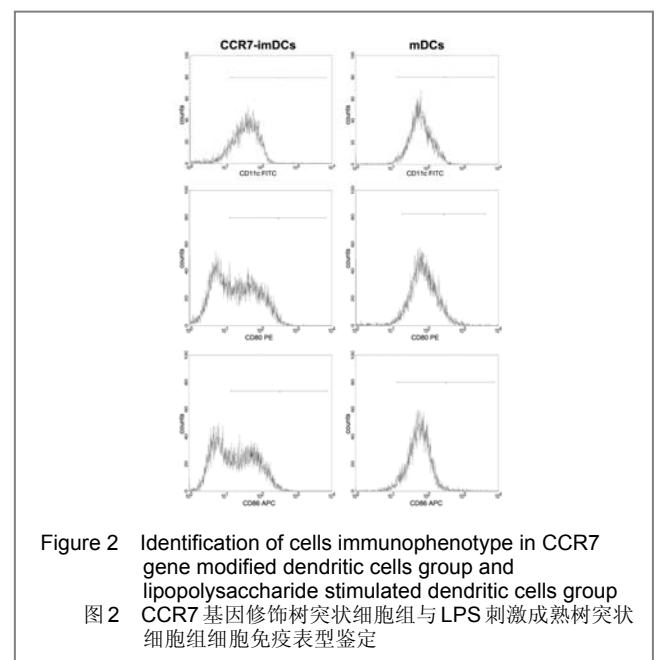
CCR7, 0.7%琼脂糖凝胶电泳见大小约1.1 kb及3.5 kb两条清晰条带, 与理论值相符, 结果见图1b。测序结果回报PCR产物与GeneBank公布的小鼠CCR7基因序列相符。

2.2 重组慢病毒载体LV-CCR7的构建和鉴定结果 使用限制性内切酶 *Bam* H I /*Kpn* I 双酶切重组质粒LV-CCR7, 0.7%琼脂糖凝胶电泳, 分别在3.1 kb及6.1 kb处有明亮条带, 与理论值相符, 见图1c。表明慢病毒转移质粒LV-CCR7构建正确。



2.3 慢病毒的包装结果 使用阳离子脂质体Lipofectamine 2000的3质粒包装系统感染293 FT细胞后, 24 h于荧光显微镜下均观察到GFP阳性表达, 收集感染后72 h培养细胞上清, 4 °C 70 000 g超速离心1次病毒滴度达1.51×10⁸ L⁻¹。

2.4 病毒感染未成熟和成熟树突状细胞免疫表型鉴定 见图2。



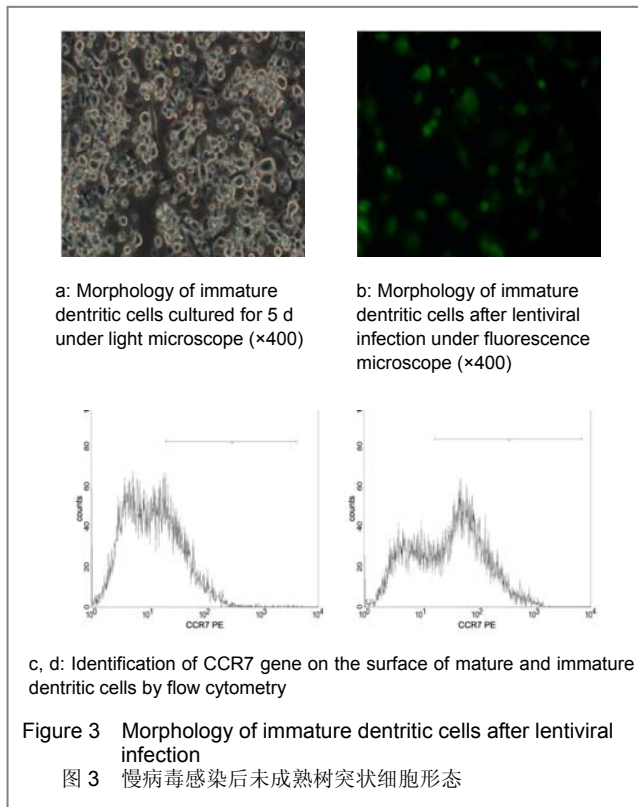
病毒感染未成熟树突状细胞与未感染的未成熟树突状细胞表面标志CD11c, CD80和CD86表达差异无显著性意义($P > 0.05$), 而成熟树突状细胞这些表面标志表达较高($P < 0.05$), 见表1

表1 小鼠树突状细胞表面流式细胞仪鉴定结果
Table 1 Surface markers of dendritic cells detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

Group	CD80	CD86	CCR7
CCR7- imDCs	52.70 \pm 3.62 ^a	58.97 \pm 2.59 ^a	63.33 \pm 5.87 ^a
mDCs	85.94 \pm 5.85	90.02 \pm 2.73	32.77 \pm 3.29

^a $P < 0.05$, vs. imDCs group. imDCs: immature dendritic cells; mDCs: mature dendritic cells

2.5 浓缩病毒感染未成熟树突状细胞后CCR7蛋白的表达 病毒上清感染未成熟树突状细胞后荧光显微镜可见大量GFP蛋白表达, 阳性细胞达50%, 流式细胞仪检测未成熟树突状细胞阳性细胞, LV空载体组未检测到CCR7的表达, LV-CCR7基因修饰树突状细胞组较LPS刺激成熟树突状细胞组CCR7表达高($P < 0.05$), 见图3, 表1, 表明携带CCR7基因的慢病毒成功转染入未成熟树突状细胞 并表达CCR7蛋白。



3 讨论

近年研究认为未成熟树突状细胞亦可迁移至次级淋巴器官, 且迁移至次级淋巴器官的未成熟树突状细胞

在诱导免疫耐受中发挥重要作用^[11-13]。然而, 从静脉输注的外源性树突状细胞很难到达次级淋巴器官^[14-15], 因此, 若能用基因工程技术构建能表达特异性趋化因子的受体修饰未成熟树突状细胞, 使未成熟树突状细胞能有效地归巢至引流淋巴结和中枢淋巴结, 则可能增强其诱导免疫耐受的效果。已知树突状细胞在体内的迁移有一系列细胞因子和信号传导通路参与调控, 其中趋化因子CCR7及其配体CCL21和CCL19是最受关注的一组趋化因子^[16], CCR7属于趋化因子受体超家族中的一员, 具有7个富含疏水氨基酸的 α 螺旋跨膜区结构^[17], 主要在成熟树突状细胞、幼稚T细胞、B细胞、调节性T细胞表面表达。CCR7最重要的作用是使活化的成熟树突状细胞通过输入淋巴管进入淋巴结^[18], 研究发现, 缺少CCR7引起树突状细胞运动异常, 导致淋巴结结构异常, 表明CCR7对树突状细胞迁移至淋巴组织有着重要的作用^[19]。CCR7基因敲除的小鼠(CCR7^{-/-}), FITC皮肤涂抹致敏实验结果表明, CCR7^{-/-}小鼠树突状细胞不能离开皮肤组织迁移至引流淋巴结, 即使在皮下注射刺激也不能迁移至引流淋巴结^[20]。Zhao等^[21]发现CCR7缺陷的树突状细胞感染鼠伤寒沙门菌后不能迁移至淋巴结, 雷公藤内酯处理过的树突状细胞表面CCR7表达下降, 迁移功能受损^[22]。上述研究表明成熟树突状细胞由外周向淋巴器官的定向迁移, 由其表面表达的CCR7及其配体所介导^[23]。研究发现树突状细胞迁移至次级淋巴器官的T细胞区与T细胞相互作用对于诱导免疫反应或免疫耐受极其重要^[24]。因未成熟树突状细胞表面不表达CCR7, 向淋巴结的趋化迁移特性较弱, 长时间处于非T细胞区而发育为成熟树突状细胞, 不能将处理的抗原提呈给T细胞, 诱导Treg的产生, 失去了诱导免疫耐受的特性^[25]。Garrod等^[26]将CCR7转染未成熟树突状细胞后明显延长移植小鼠心脏的存活时间。且CCR7除了调控树突状细胞的趋化迁移外, 还与树突状细胞结构, 迁移速度等有关^[27]。因此实验设想构建携带有CCR7基因的慢病毒载体, 转染未成熟树突状细胞使其表面高表达CCR7, 有效迁移至次级淋巴器官, 更好地发挥免疫耐受的效果, 为异基因造血干细胞移植免疫耐受提供新方法和新思路。

目前多应用病毒载体系统把外源性基因转入树突状细胞, 如腺病毒载体、腺相关病毒载体、反转录病毒载体、慢病毒载体等。本实验室在国内率先成功构建了新一代的高滴度自身失活型慢病毒载体系统, 并对内部启动子进行了优化, 筛选出表达效率最高的CMV启动子^[28-29]。优化后的慢病毒载体具有可感染非分裂细胞、目的基因表达时间较长、免疫反应性小、安全性较高等优点。IRES具有内核糖体进入位点的功能, 是最为常用的双基因表达载体的构成元件^[30]。作为报告基因, GFP荧光稳定, 且无明显的细胞毒性, 应用于检测细胞转染效率及体内

外示踪便捷可靠。本实验成功扩增出小鼠CCR7 DNA片段并克隆至pCR-Blunt载体, 亚克隆构建慢病毒表达载体LV-CCR7, 经3质粒包装系统包装后获得较高滴度慢病毒颗粒, 并利用IRES元件的特性, 成功构建了携带CCR7和GFP慢病毒表达载体。这对于重组慢病毒感染未成熟树突状细胞后, 进一步研究CCR7在骨髓移植免疫耐受中的作用奠定了基础。

目前关于树突状细胞的体外培养扩增已取得了一定的进展, 研究比较肯定的是GM-CSF的量与培养树突状细胞的成熟程度明显相关。一般认为, 较大剂量的GM-CSF诱导生成的细胞以成熟型树突状细胞为主, 而小剂量GM-CSF诱导生成的细胞以非成熟树突状细胞为主, 实验选用小鼠骨髓细胞作为树突状细胞的前体细胞, 采用低剂量的GM-CSF获得了较高纯度的未成熟树突状细胞^[29, 31], 转染后荧光显微镜下观察到绿色荧光, 流式细胞仪检测结果显示, 未成熟树突状细胞不表达CCR7, 而转染后的未成熟树突状细胞表达CCR7, 且较成熟树突状细胞表达量高, 细胞表型鉴定转染的未成熟树突状细胞仍保持在未成熟状态, 以上结果表明, 重组小鼠CCR7慢病毒表达载体成功转染未成熟树突状细胞且高效表达CCR7, 这为进一步研究携带CCR7基因的未成熟树突状细胞的趋化迁移能力以及骨髓移植免疫耐受动物实验提供了一定的方法和思路, 使未成熟树突状细胞具有更广泛的应用前景。

4 参考文献

[1] Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, et al. Isolation of dendritic cells. *Curr Protoc Immunol*. 2009.

[2] Himoudi N, Yan M, Bouma G, et al. Migratory and antigen presentation function of IFN- γ -producing killer dendritic cells. *Cancer Res*. 2009;69(16):6598-6606.

[3] Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, et al. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol*. 2007;82(6):1365-1374.

[4] Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood*. 2009;11(3):3418-3427.

[5] Ariane V, Schouten HC, Gerard MJ. Murine dendritic cells that are resistant to maturation are unable to induce tolerance to allogeneic stem cells. *Transplant Immunology*. 2006;16(1):8-13.

[6] Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2(1):123-128.

[7] Riedl K, Baratelli F, Batra RK, et al. Overexpression of CCL-21/secondary lymphoid tissue chemokine in human dendritic cells augments chemotactic activities for lymphocytes and antigen presenting cells. *Mol Cancer*. 2003;2(1):35-48.

[8] Forster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. CCR7 coordinates and primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999;1(1):23-33.

[9] Ohi LM, Mohaupt N, Czeloth G, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*. 2004;21(2):279-288.

[10] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.

[11] Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, et al. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood*. 2003;102(6):2187-2194.

[12] Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity*. 2003;19(1):47-57.

[13] Bosisio D, Vulcano M, Sironi M, et al. Blocking TH17-polarizing cytokines by histone deacetylase inhibitors in vitro and in vivo. *J Leukocyte Biology*. 2008; 84(1):1540-1548.

[14] Yurkovetsky ZR. Trafficking of dendritic cells in the tumor environment. *Biomedical and life sciences*. 2009;4(1):1-19.

[15] Christian NA, Benencia F, Milone MC, et al. In vivo dendritic cell tracking using fluorescence lifetime imaging and near-infrared-emissive polymersomes. *Mol Imaging Biol*. 2009;11(1):167-177.

[16] Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(5):362-371.

[17] Rosenkilde MM, Smit MJ, Waldhoer M. Structure, function and physiological consequences of virally encoded chemokine seven transmembrane receptor. *Br J Pharmacol*. 2008;153(S1):S154-166.

[18] Worbs T, Forest R. A key role for CCR7 in establishing central and peripheral tolerance. *Trends Immunol*. 2007;28(6):274-280.

[19] Hartigan AJ, Westwick J, Jarai G, et al. CCR7 deficiency on dendritic cells enhances fungal clearance in a murine model of pulmonary invasive aspergillosis. *J Immunol*. 2009;183(8):5171-5179.

[20] Hintzen G, Ohi L, Del ML, et al. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol*. 2006;177(10):7346-7354.

[21] Zhao C, Wood MW, Galyov EE, et al. Salmonella typhimurium infection triggers dendritic cells and macrophages to adopt distinct migration patterns in vivo. *Eur J Immunol*. 2006;36(1):2939-2950.

[22] Peng GJ, Hu SY, Wang Z, et al. Effects of Baisong tablet on behavioral changes of chronic mild stress-induced depression model rats. *Shandong Zhongyiyao Daxue Xuebao*. 2004;28(3):231-233.

[23] Seth S, Oberdorfer L, Hyde R, et al. CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *J Immunol*. 2011;186(1):3281-3282.

[24] Bai Y, Liu JH, Wang Y, et al. L-selectin-dependent lymphoid occupancy is required to induce alloantigen-specific tolerance. *J Immunol*. 2002;168(1):1579-1589.

[25] Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2009;11(1):21-27.

[26] Garrod KR, Chang CK, Liu FC, et al. Targeted lymphoid homing of dendritic cells is required for prolongation of allograft survival. *J Immunol*. 2006;177(2):863-868.

[27] Sanchez-Sanchez N, Riou-Blance L, Rodriguez-Fernandez JL. The multi personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol*. 2006;176(1):5153-5159.

[28] Chen XM, Xu KL, Pan XY, et al. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2005;13(4):641-644.
陈香梅, 徐开林, 潘秀英, 等. 携带绿色荧光蛋白基因的逆转录病毒载体的构建及其介导的T细胞基因转移研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(4):641-644.

[29] Huang YH, Chao YL, Tang RX, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(5):941-946.
黄一虹, 晁亚丽, 汤仁仙, 等. 慢病毒介导可溶性肿瘤坏死因子受体1在小鼠骨髓未成熟树突状细胞中的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(5):941-946.

[30] Kazadi K, Loeuillet C, Deutsch S, et al. Genomic determinants of the efficiency of internal ribosomal entry sites of viral and cellular origin. *Nucleic Acid Res*. 2008;36(21):6918-6925.

[31] Lutz MB, Suri RM, Niimi M, et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol*. 2000;30(7):1813-22.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 江苏省高校自然科学基金(07KJD320224); 徐州市科技计划项目(XF10C065)资助。

作者贡献: 实验设计为通讯作者, 实施为第一、二、三、五作者, 干预实施与评估为第四、六、七作者, 均经过正规培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

本文创新性: 实验成功构建 CCR7 慢病毒载体, 并转染了小鼠骨髓来源的树突状细胞。