

# 骨桥蛋白基因质粒的构建及慢病毒包装的实验研究

李 薇<sup>1</sup>, 王文平<sup>2</sup>, 陈 亮<sup>2</sup>, 王珍祥<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的:**构建骨桥蛋白(OPN)基因的重组质粒,并包装慢病毒。**方法:**从 C57BL/6 野生型小鼠肾脏组织提取总 RNA,逆转录为 cDNA 经特定引物扩增出 OPN 基因片段,并大量扩增,利用基因重组技术该基因片段与慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP-T2A-Puro 连接形成重组质粒,该重组质粒转染 293T 细胞进行慢病毒包装后测定滴度。**结果:**DNA 测序证实提取的基因为 OPN 片段,慢病毒滴度达  $2.5 \times 10^8$  TU/ml。**结论:**成功包装了含有 OPN 基因片段的慢病毒,为进一步研究 OPN 对各种细胞的生物学功能的影响奠定了基础。

**[关键词]** 骨桥蛋白;重组质粒;慢病毒;小鼠

**[中图分类号]** R 329.24 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.05.002

## The construction of osteopontin gene recombinant plasmid and its package of lentivirus

LI Wei<sup>1</sup>, WANG Wen-ping<sup>2</sup>, CHEN Liang<sup>2</sup>, WANG Zhen-xiang<sup>2</sup>

(1. Department of Plastic and Burn Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004; 2. Department of Plastic and Aesthetic Surgery, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct the recombinant plasmid containing the osteopontin(OPN) gene and package lentivirus with it. **Methods:** The total RNA of kidney tissue was abstracted from C57BL/6 wild type mouse, and then was transcribed to cDNA. The OPN gene was largely amplified with special primers, and then cloned to lentivirus carrier to construct the pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP-T2A-Puro. The lentivirus was packaged by transfecting the plasmids into 293T cells, and the virus titer was tested. **Results:** The OPN gene fragment was successfully cloned by sequencing. The virus titer was  $2.5 \times 10^8$  TU/ml. **Conclusions:** The lentivirus containing OPN gene is successfully packaged, which lays the foundation in further researching the biological function of OPN gene.

**[Key words]** osteopontin; recombinant plasmid; lentivirus; mouse

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是由多种细胞分泌产生的一种分泌型磷酸糖蛋白。因其分布广泛,可影响多种细胞的生物学功能,从而参与多种病理生理过程而越来越受到重视。但是,目前关于 OPN 发挥作用的分子机制的研究尚不足。因此,如果能深入研究 OPN 的调控作用及作用机制,将为临床上多种疾病的治疗提供新的策略。基因重组技术就是将目的基因与慢病毒载体进行连接后包装,使得包装成功的慢病毒感染至细胞内,从而达到细胞内目的基因水平表达的永久改变。本课题拟利用基因重组技术构建表达 OPN 基因的质粒,并包装成慢病毒颗粒,为我们研究 OPN 对细胞生物学功能的影响以及临床上与 OPN 相关疾病的治疗奠定实验基础。

## 1 材料与方法

1.1 材料及试剂 野生型 C57BL/6 小鼠(4 周龄, 1 只,由第三军医大学附属大坪医院实验动物中心提供), pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP-T2A-Puro 质粒(下称 pCDH 质粒), pMD2. G 质粒和 pSPAX2 质粒(均由第三军医大学热带医学实验室提供); PMD18T 载体和 DH5 $\alpha$  感受态(由第三军医大学附属西南医院烧伤研究所提供); DL2000 DNA Marker(北京,天根); DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR*. 1、*BamH*. 1(日本, TaKaRa 公司); 质粒提取试剂盒(北京, OMEGA), RNA 提取试剂盒(美国, Promega); 反转录试剂盒、PCR 试剂盒(北京, 百泰克); DMEM 培养基、顶级胎牛血清(美国, Gibco 公司)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 利用 Oligo6.0 软件设计野生型 C57BL/6 小鼠 OPN 基因及 GAPDH 的引物序列, 根据慢病毒载体的结构特点, 选择限制性内切酶为 *BamH*. 1 及 *EcoR*. 1 两种, OPN 基因上游引物序列: 5'-GGG AAT TCA TGA GAT TGG CAG TG-3'; 下游引物 5'-AAG GAT CCG TTG ACC TCA GAA GA-3';

[收稿日期] 2014-08-01

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81071563)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 整形烧伤科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 第三军医大学附属西南医院 整形外科, 重庆 400038

[作者简介] 李 薇(1989 -), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 王珍祥, 硕士研究生导师, 副主任医师, 副教授。E-mail: 413040369@qq.com

GAPDH 基因上游引物序列:5'-ACC CAT CAC CAT CTT CCA GGA G-3';下游引物 5'-GAA GGG GCG GAG ATG ATG AC-3'。

1.2.2 RNA 的提取、反转录和目的基因的扩增  
根据 OPN 的表达特点,选择小鼠的肾脏组织进行 RNA 提取,提取过程按照 RNA 提取试剂盒说明书进行,根据反转录试剂盒说明逆转录 RNA 为 cDNA。聚合酶链反应扩增条件:(1)94 °C 5 min,(2)94 °C 30 s,(3)57 °C 30 s,(4)72 °C 40 s,(5)4 °C hold,(2)~(4)35 个循环。扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,120 V 20 min 紫外线下观察目的条带大小并回收 DNA。取少量 DNA 再次进行凝胶电泳鉴定,DL2000 为分子标准。

1.2.3 目的片段与 PMD18T 载体的连接及鉴定  
胶回收产物与 PMD18T 载体进行连接,连接体系: PMD-18T 载体 1  $\mu$ l;回收产物 4  $\mu$ l;T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ l;连接 Buffer 1  $\mu$ l;H<sub>2</sub>O 3  $\mu$ l。4 °C 冰箱过夜。取以上 10  $\mu$ l 产物加入 0.1 ml DH5  $\alpha$  感受态中,混匀后低温静置 30 min,42 °C 处置 90 s,再迅速转移至冰上 2 min。上述混合液中加入 0.9 ml LB 培养基,37 °C 160R 摇床 60 min;取少许上述液体平铺于固体琼脂板,晾干后倒置于 37 °C 培养箱过夜。无菌牙签挑取琼脂板上的单菌落放入装有氨苄西林抗性的 LB 培养基的无菌锥形瓶内,37 °C 200R 摇床过夜。摇床所得菌液收集提取质粒 DNA:菌液收集至无菌管内,10 000 g 常温离心 1 min;弃上清液,加 250  $\mu$ l Solution I 重悬沉淀物;加 250  $\mu$ l solution II 混匀,液体变澄清;加 350  $\mu$ l Solution III 混匀,可见白色沉淀;13 000 g 常温离心 10 min;上清液转移至吸附管内,10 000 g 常温离心 1 min;弃废液,500  $\mu$ l Buffer HB 加入吸附管,10 000 g 离心 1 min;弃废液,加入 700  $\mu$ l DNA Wash Buffer 至吸附管,10 000 g 常温离心 1 min;重复上一步;弃废液,13 000 g 离心 2 min;吸附柱转移至新的 EP 管内,悬空滴加 Elution Buffer 洗脱,13 000 g 离心 1 min,EP 管内即为扩增后提取 PMD18T-OPN 质粒。取 PMD18T-OPN 质粒 4  $\mu$ l 进行酶切鉴定,酶切体系:DNA 4  $\mu$ l;BamH.1 酶 1  $\mu$ l;EcoR.1 酶 1  $\mu$ l;10  $\times$  K Buffer 2  $\mu$ l;H<sub>2</sub>O 12  $\mu$ l。37 °C 恒温水浴箱 1.5 h 后经 1% 琼脂糖凝胶电泳,120 V 20 min 后观察产物的条带数目及大小情况。菌液取 1 ml 送至上海生工生物工程有限公司进行基因测序分析。

1.2.4 目的片段与慢病毒载体的连接 经基因测序正确的 OPN 质粒片段与慢病毒载体 pCDH 质粒

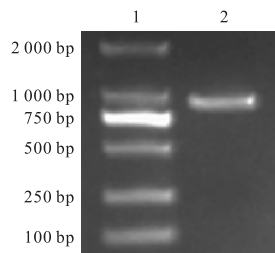
进行连接反应,OPN 质粒 4  $\mu$ l;pCDH 质粒 1  $\mu$ l;T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ l;连接 Buffer 1  $\mu$ l;H<sub>2</sub>O 3  $\mu$ l,产物标记为 OPN-pCDH 质粒。经 BamH.1 及 EcoR.1 双酶切鉴定,酶切体系:DNA 4  $\mu$ l;BamH.1 酶 1  $\mu$ l;EcoR.1 酶 1  $\mu$ l;10  $\times$  K Buffer 2  $\mu$ l;H<sub>2</sub>O 12  $\mu$ l。37 °C 恒温水浴箱 1.5 h 后经 1% 琼脂糖凝胶电泳,120 V 20 min 后观察产物的条带数目及大小情况。

1.2.5 慢病毒包装 293T 细胞自液氮中取出后复苏培养,培养液为 DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清。收集 293T 细胞  $3 \times 10^6$  个均匀铺入 10 cm 细胞培养板中,培养液终体积为 10 ml。培养 24 h 观察细胞状态良好,运用氯喹-氯化钙法包装空载体慢病毒及 OPN 慢病毒,包装体系如下:pMD 2. G 5  $\mu$ g;pSPAX2 15  $\mu$ g;质粒 DNA 20  $\mu$ g,12 h 后换液,48 h 后收集上清液,70 000 g 离心 2 h;弃去上清液,用病毒原液 1% 体积的 HBSS 重悬沉淀,4 °C 放置过夜后置于 -80 °C 保存。

1.2.6 慢病毒滴度测定 消化收集培养的 293T 细胞,计数后铺入 24 孔板,每孔  $2.5 \times 10^4$ ;24 h 后取病毒 2  $\mu$ l 稀释到 200  $\mu$ l,在孔内分别加入稀释后的病毒 5  $\mu$ l、20  $\mu$ l、100  $\mu$ l,同时加入终浓度 8  $\mu$ g/ml polybrene,混匀;48 h 后换液;96 h 后在荧光显微镜下观察细胞荧光产生情况,根据转染情况计算并确定病毒滴度。

## 2 结果

2.1 胶回收产物鉴定 胶回收产物凝胶电泳提示为 900 bp 左右的单一条带,无杂带(见图 1)。



1: DNA 分子标准;2: 胶回收产物

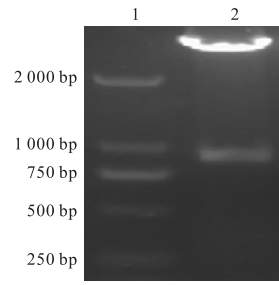
图1 胶回收产物鉴定

2.2 目的片段与 PMD18T 载体的连接鉴定及测序  
凝胶鉴定结果提示酶切产物为两条目的条带,大小分别与 PMD18T 载体及胶回收产物的片段长度一致,提示连接正确(见图 2)。基因测序结果所提取的目的片段序列,序列比对提示含有两个碱基突变点,且为同义突变,即不影响蛋白的表达,所提取的目的片段为 OPN 基因(见图 3)。

2.3 目的片段与慢病毒载体的连接鉴定 经基因测序及酶切鉴定正确的 OPN 片段与 pCDH 质粒经连接后,取部分进行酶切鉴定,结果提示产物为清晰的纯化的两条片段,大小与 pCDH 质粒及 OPN 基因片段大小相符,即 pCDH 质粒与 OPN 基因的连接成功,可进行慢病毒包装(见图 4)。

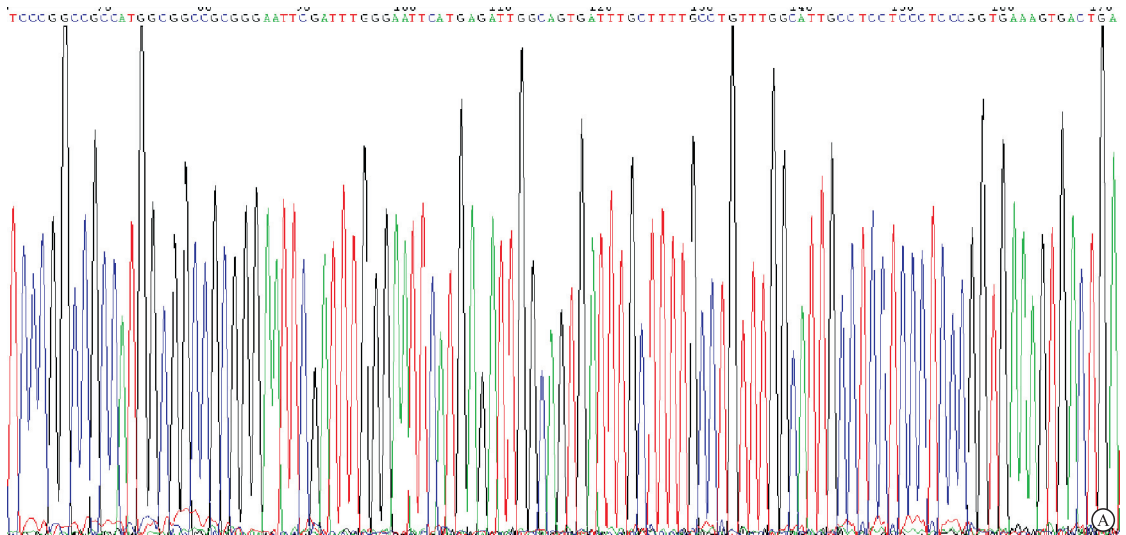
2.4 慢病毒滴度测定 pCDH 质粒及 pCDH-OPN 质粒经包装再感染 293T 细胞后荧光显微镜下均能见到绿色荧光产生,且前者所产生的荧光强度明显强于后者(见图 5)。故慢病毒包装成功,且滴度为

$2.5 \times 10^8$  TU/ml。



1: DNA 分子标准; 2: 胶回收产物

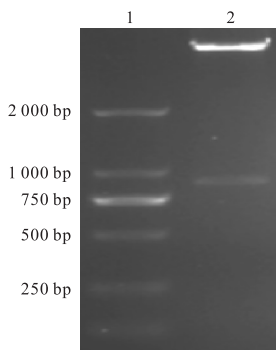
图2 PMD18T-OPN质粒的双酶切鉴定



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1447 bits(1604)	0.0	878/883(99%)	3/883(0%)	Plus/Minus
Query 134	GTTGACCTCAGAAGATGAACCTCTAATTCATGAGAAAATTCGGAATTCAGATACCTATC	193		
Sbjct 962	GTTGACCTCAGAAGATGAACCTCTAATTCATGAGAAAATTCGGAATTCAGATACCTATC	923		
Query 194	ATCTTCCTTACTCTTAGGGCTAGGACTAGCTTGTCCCTGTGGCTGTGAAACTTGTGGCT	253		
Sbjct 922	ATCTTCCTTACTCTTAGGGCTAGGACTAGCTTGTCCCTGTGGCTGTGAAACTTGTGGCT	863		
Query 254	CTGATGTTCCAGGCTGGCTTTGGAACCTTGCTTGACTATCGATCACATCCGACTGATCGGC	313		
Sbjct 862	CTGATGTTCCAGGCTGGCTTTGGAACCTTGCTTGACTATCGATCACATCCGACTGATCGGC	803		
Query 314	ACTCTCCTGGCTCTCTTTGGAATGCTCARGTCTGTGTGTTTCCAGACTTGGTTCATCCAG	373		
Sbjct 802	ACTCTCCTGGCTCTCTTTGGAATGCTCARGTCTGTGTGTTTCCAGACTTGGTTCATCCAG	743		
Query 374	CTGACTTGACTCATGGCTGCCCTTCCGTTGTTGTCCIGATCAGAGGGCATGCTCAGAAG	433		
Sbjct 742	CTGACTTGACTCATGGCTGCCCTTCCGTTGTTGTCCIGATCAGAGGGCATGCTCAGAAG	683		
Query 434	CTGGGCAACAGGGATGACATCGAGGGACTCCTTAGACTCACCGCTCTTCATGTGAGAGGT	493		
Sbjct 682	CTGGGCAACAGGGATGACATCGAGGGACTCCTTAGACTCACCGCTCTTCATGTGAGAGGT	623		
Query 494	GAGGTCCCTCATCTGTGGCATCAGGATACTGTTTCATCAGTAACCTGGAAACTCCTAGACTT	553		
Sbjct 622	GAGGTCCCTCATCTGTGGCATCAGGATACTGTTTCATCAGTAACCTGGAAACTCCTAGACTT	563		
Query 554	TGACCTCAGTCCATAAGCCAAAGCTATCACCTCGGCCGTTGGGGACATCGACTGTAGGGAC	613		
Sbjct 562	TGACCTCAGTCCATAAGCCAAAGCTATCACCTCGGCCGTTGGGGACATCGACTGTAGGGAC	503		
Query 614	GATTGGAGTGAAGTGTCTGTCTGTGTACTAGCAGTGCAGGTCTCATCAGACTCATCCGA	673		
Sbjct 502	GATTGGAGTGAAGTGTCTGTCTGTGTACTAGCAGTGCAGGTCTCATCAGACTCATCCGA	443		
Query 674	ATGGTGAGATTCTGTCGATTTCATCCGAGTCCACAGAATCCTCGCTCTCTGCATGGTCTCC	733		
Sbjct 442	ATGGTGAGATTCTGTCGATTTCATCCGAGTCCACAGAATCCTCGCTCTCTGCATGGTCTCC	383		
Query 734	atcgtcatcatcatcgtcgtcgtcgtcgtcgtcCATGTGGTCATGGCTTTCATTGGAATTGCT	793		
Sbjct 382	ATCGTCATCATCATCGTCATCATCGTCGTCCATGTGGTCATGGCTTTCATTGGAATTGCT	323		

A: 测序图谱; B: 序列分析(方框内即为突变点)

图3 PMD18T-OPN质粒的基因测序

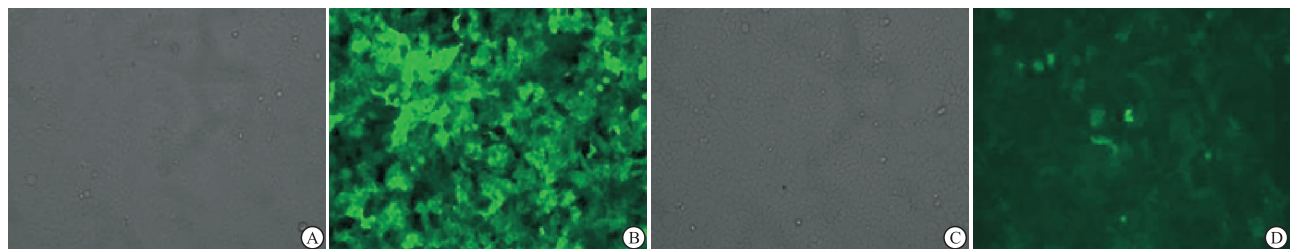


1: DNA分子标准; 2: 酶切产物

图4 OPN-pCDH质粒的双酶切鉴定

### 3 讨论

OPN 又称为分泌磷酸蛋白 I、早期 T 淋巴活性 I、骨唾液酸蛋白 I 和尿石蛋白,最早于 1979 年从恶性转化的上皮细胞中分离得到,属于细胞外基质蛋白,在血液、心肌、肾脏、肺部、骨骼、脑、脂肪、肝脏组织以及激活的 T 细胞、巨噬细胞等不同的组织细胞中均有所发现<sup>[1]</sup>,具有广泛的生物学功能,现已引起越来越多的关注。OPN 与成纤维细胞<sup>[2]</sup>、间充质干细胞<sup>[3]</sup>、皮肤表皮干细胞<sup>[4]</sup>等多种细胞的生物



A: 感染pCDH载体的293T细胞(普通镜下观察); B: 感染pCDH载体的293T细胞(荧光镜下观察);

C: 感染pCDH-OPN载体的293T细胞(普通镜下观察); D: 感染pCDH-OPN载体的293T细胞(荧光镜下观察)

图5 慢病毒载体感染293T细胞后观察荧光产生情况

学功能有着密切关系,从而在创面愈合<sup>[5]</sup>、肿瘤的发生及转移<sup>[6]</sup>、免疫炎症反应<sup>[7]</sup>、骨转换<sup>[8]</sup>等过程中均有参与。

OPN 在细胞膜上的受体有整合素及 CD44。整合素家族的多种分子包括  $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 5$ 、 $\alpha v \beta 3$  等均可作为 OPN 的受体参与介导不同细胞的迁移运动,而 CD44 亚型中只有 CD44v 亚型才能与 OPN 相互作用<sup>[9]</sup>,从而影响细胞的迁移。OPN 经过凝血酶的剪切作用暴露出隐藏的表位从而与整合素  $\alpha 9 \beta 1$ 、 $\alpha 4 \beta 1$  结合,另外 OPN 通过特异性的含有同型表位 V6 ~ V7 位点的同型表位及整合素  $\alpha x \beta 2$  结合 CD44<sup>[10]</sup>。研究<sup>[11]</sup>表明,OPN 与受体结合后,可以激活多种相关下游信号分子,如丝裂原活化蛋白激酶、磷脂酰肌醇 3 激酶、苏氨酸蛋白激酶、细胞外调节蛋白激酶、蛋白激酶 C、黏着斑激酶等,从而影响细胞的相关生物学功能及活性。综上所述,OPN 对细胞生物学功能的影响途径错综复杂,目前对于这方面的报道仍然有限。

基因克隆技术最终目的在于获得大量同一 DNA 分子的拷贝。基因克隆的核心技术即为 DNA 重组技术。DNA 重组技术可简要概括为分、切、接、转、筛这几个基本步骤。由于此技术具有可在体外人工合成,可根据具体实验目的需要进行基因的重

组、表达、测序、诱变、修复的特点,现已大量应用于基础实验研究。

实验室常用于包装的病毒载体主要有以下几种:(1)腺病毒载体宿主范围广泛,制备过程中可达到高滴度,基因不整合至宿主细胞内,操作方便,但因是瞬时感染,即感染作用时间短,不宜用于实验周期较长的实验研究;(2)慢病毒载体的目的基因片段可以镶嵌于宿主细胞的遗传物质内共同表达,因此可以永久也更稳定地表达,但是操作较复杂;(3)腺相关病毒因具有致病性低、与宿主发生免疫反应机会小、可长久稳定表达等优点,目前发展最热。在目前实验研究中,应用最广泛的仍是腺病毒及慢病毒。

本实验成功提取了 C57BL/6 野生型小鼠肾脏组织的 OPN 基因片段,与慢病毒载体连接后,利用氯喹-氯化钙法成功包装制备了滴度达  $2.5 \times 10^8$  TU/ml 的慢病毒,包括空载体慢病毒及含 OPN 基因片段的慢病毒两种。慢病毒的成功包装为后续 OPN 在细胞基因及蛋白水平高表达奠定基础,从而方便了我們进一步研究 OPN 在细胞内发挥作用的分子机制,甚至为临床上治疗与 OPN 相关的疾病包括肿瘤、难愈性创面、免疫炎症疾病等的治疗提供策略。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin; role in immune regulation and stress Responses[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2008, 19(1):333-345.
- [2] 孙爱军, 高平进, 刘建军, 等. 骨桥蛋白增高自发性高血压大鼠血管外膜成纤维细胞的迁移活性[J]. 生理学报, 2004, 56(1):21-24.
- [3] Zou C, Luo Q, Qin J, *et al.* Osteopontin promotes mesenchymal stem cell migration and lessens cell stiffness via integrin b1, FAK, and ERK pathways [J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 65(3):455-456.
- [4] 李琴, 王左林. 骨桥蛋白对鼠皮肤表皮干细胞的生物学影响[J]. 口腔颌面外科杂志, 2012, 22(1):8-14.
- [5] Yamanaka O, Sumioka T, Saika S, *et al.* The role of extracellular matrix in corneal wound healing[J]. Cornea, 2013(32 Suppl 1):S43-S45.
- [6] 陶潜, 张晓娟, 郑艳莉, 等. 骨桥蛋白在卵巢癌及交界性肿瘤中的表达及临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2013, 28(6):606-607.
- [7] 王云萍, 张琳, 赵华明, 等. 骨桥蛋白在类风湿关节炎患者血清中的表达及意义[J]. 山西医药杂志, 2011, 40(6):583-584.
- [8] Uysal T, Gorgulu S, Yagci A, *et al.* Effect of resveratrol on bone formation in the expanded inter-premaxillary suture: early bone changes[J]. Orthod Craniofac Res, 2011, 14(2):80-87.
- [9] Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, *et al.* CD44 variants but not CD44s cooperate with  $\beta 1$ -containing in integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis[J]. Cancer Res, 1999, 59(1):219-226.
- [10] Yamamoto N, Sakai F, Kon S, *et al.* Essential role of the cryptic epitope SLAGLR within osteopontin in a murine model of theumatoid arthritis[J]. J Clin Invest, 2003, 112(2):181-188.
- [11] Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2004, 15(3):126-136.
- ( 本 文 编 辑 马 启 )
- 
- ( 上 接 第 563 页 )
- [8] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1):1-21.
- [9] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, *et al.* MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study [J]. J Neurotrauma, 1996, 13(7):343-359.
- [10] Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology [J]. J Neurovirol, 1999, 5(6):556-569.
- [11] Thawer SG, Mawhinney L, Chadwick K, *et al.* Temporal changes in monocyte and macrophage subsets and microglial macrophages following spinal cord injury in the lys-egfp-ki mouse model [J]. J Neuroimmunol, 2013, 261(1/2):7-20.
- [12] Smoleńska Z, Pawowska J, Zdrojewski Z, *et al.* Increased percentage of CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells correlates with clinical activity in primary Sjögren's syndrome [J]. Cell Immunol, 2012, 278(1/2):143-151.
- [13] Mikulkova Z, Praksova P, Stourac P, *et al.* Numerical defects in CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis [J]. Cell Immunol, 2010, 262(2):75-79.
- [14] Donnelly DJ, Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2008, 209(2):378-388.
- [15] Lee KD, Chow WN, Sato-Bigbee C, *et al.* FTY720 reduces inflammation and promotes functional recovery after spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 2009, 26(12):2335-2344.
- [16] Schwartz M. Beneficial autoimmune T cells and posttraumatic neuroprotection [J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 917:341-347.
- [17] Deb C, Lafrance-Corey RG, Schmalstieg WF, *et al.* CD8<sup>+</sup> T cells cause disability and axon loss in a mouse model of multiple sclerosis [J]. PLoS One, 2010, 5(8):e12478.
- [18] Mueller CA, Schluesener HJ, Conrad S, *et al.* Spinal cord injury-induced expression of the immune-regulatory chemokine interleukin-16 caused by activated microglia/macrophages and CD8<sup>+</sup> cells [J]. J Neurosurg Spine, 2006, 4(3):233-240.
- [19] Bieber AJ, Kerr S, Rodriguez M. Efficient central nervous system remyelination requires T cells [J]. Ann Neurol, 2003, 53(5):680-684.
- ( 本 文 编 辑 姚 仁 斌 )