

腺病毒载体转染人未成熟树突状细胞对其成熟特性的影响

王永权 彭毅志 王强 王逸涛 游波



【摘要】 目的 观察重组腺病毒载体 AdEASY-增强型绿色荧光蛋白(EGFP)转染人未成熟树突状细胞(imDC)后,其表型特征及免疫学功能的变化,并探讨白细胞介素(IL)10对腺病毒转染诱导imDC成熟的抑制作用。方法 贴壁法分离人脐带血来源的单核细胞,利用重组粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和IL-4诱导分化imDC。对照组为常规培养的imDC,转染组用AdEASY-EGFP转染imDC,IL-10组用IL-10处理转染后细胞。流式细胞仪检测细胞表面成熟标志[CD86、CD83和人类白细胞DR抗原(HLA-DR)],混合淋巴细胞反应(MLR)检测其刺激同种异体未致敏T淋巴细胞的增殖能力。结果 腺病毒转染imDC后,转染组细胞成熟表型表达率分别为CD86:46±10、CD83:38±7、HLA-DR:82±10,均较对照组(10±7.8±3、68±8)显著上调,且刺激T淋巴细胞增殖的能力显著加强(SI>2.0)。IL-10组处理的imDC上述表型表达率分别为CD86:8±5、CD83:9±3、HLA-DR:63±12,与对照组比较差异无统计学意义(P>0.05),其刺激T淋巴细胞增殖的能力也明显下降。结论 腺病毒能有效转染imDC,但在转染后有促进其成熟的趋势;用IL-10能有效抑制该成熟状态。

【关键词】 胎血; 树突细胞; 腺病毒科; 白细胞介素10

Influence of adenovirus transfection on the maturation characteristics of human immature dendritic cells
 WANG Yong-quan, PENG Yi-zhi, WANG Qiang, WANG Yi-tao, YOU Bo. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combine Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

Corresponding author: PENG Yi-zhi, Email: yizhipen@mail.tmmu.com.cn, Tel: 023-68754175

【Abstract】 Objective To observe the changes in the phenotype characteristics and immune function after transfection of cord blood derived immature dendritic cells (imDC) with Adeasy-EGFP adenovirus vector, and to explore the function of IL-10 in inhibition of imDC maturation. Methods Immature dendritic cells were generated from human cord blood (CB) monocyte cultured with rhGM-CSF and rhIL-4. The recombinant adenovirus vector AdEASY-EGFP was transduced into immature dendritic cells on the third day with or without adding IL-10. The expression of cell maturation marker CD83, CD86 and HLA-DR were determined with flow cytometry. Allogenic mixed leukocyte reaction (MLR) was used to examine the imDC's ability to promote T cell proliferation. Results The expression of surface maturation markers of imDC after transfection with adenovirus were significantly up-regulated (CD86:46±10; CD83:38±7; HLA-DR:82±12), and its ability to promote T cell proliferation was also obviously increased (SI>2.0). However, the expression of surface maturation markers of imDC after IL-10 treatment had lower mature phenotypes expression after transduction (CD86:8±5; CD83:9±3; HLA-DR:63±12), and T cell stimulating ability was decreased comparing with adenovirus transfection groups. Conclusion Adenovirus can be transduced into imDC with high efficiency, but transfection itself can promote imDC's maturation. IL-10 treatment can inhibit the tendency to maturation stimulated by adenovirus transduction efficiently.

【Key words】 Human cord blood; Dendritic cells; Adenovirus; Interleukin-10

研究证明,未成熟树突状细胞(imature dendritic cell, imDC)可通过诱导T淋巴细胞特异性低应答,特异性抑制免疫应答^[1],为减缓同种异体皮

肤移植的免疫排斥反应提供策略。用携带目的基因的各种基因工程载体转染树突状细胞(DC),已广泛应用于诱导移植耐受的实验性研究^[2,3]。但对于imDC来说,有效的基因转移不仅意味着目的基因的稳定表达,同时也取决于转染方式对imDC成熟特性的影响。倘若某种转染方式或者某个载体本身对imDC有成熟诱导的作用,即使能够成功转染成熟抑制产物或者定向趋化受体,也难以发挥应有作用。

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信(讯)作者:彭毅志,Email: yizhipen@mail.tmmu.com.cn,电话:023-68754175

而且由于 imDC 在转染过程中已经成熟, 基因工程 imDC 产物反而会发挥成熟树突状细胞 (mature dendritic cell, mDC) 的作用, 促进免疫应答, 加快排斥反应^[4]。本研究拟应用基因工程载体 AdEASY-增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 重组腺病毒系统转染 imDC, 观察其转染后表型特征和免疫学功能的变化, 评价其成熟特性, 并探讨白细胞介素 (IL) 10 的抗成熟特性在腺病毒转染中的作用。

材料与方法

1. 标本来源及形态学观察: 人脐带血来源于本院妇产科健康足月分娩的新生儿脐静脉 (产妇知情同意), 按照文献^[5]分离脐带血单核细胞 (CBMC) 进行 imDC 的体外诱导, 在相差显微镜、扫描电镜下观察 imDC 形态并摄片。

2. 重组腺病毒载体 AdEASY-EGFP 的包装与扩增: 当腺病毒 E1 基因转化的人胚肾细胞 (HEK293 细胞) 汇合率达 90% 左右时更换培养液, 加入 10 μ l AdEASY-EGFP 病毒空载体, 放入 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中继续培养 7~10 d。镜下观察培养的 HEK293 细胞, 待其体积缩小呈悬浮生长具有致病效应 (cytopathic effects, CPE) 时取出, 收集至 15 ml 离心管中, 蜡条密封管口置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中 15 min, 随即投入 37 $^{\circ}$ C 水浴解冻 10 min。反复冻融 3 次使细胞完全破裂, 4 $^{\circ}$ C、10 000 \times g 离心 30 min, 取上清液备用。

3. 实验分组: 调整 imDC 浓度为 5 \times 10⁵ 个/ml 并分为 3 组。对照组: 常规培养 5 h, 补充含血清 RPMI 1640 培养基及重组粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、IL-4。转染组: 将 imDC 悬浮于 0.5 ml 无血清无抗生素 RPMI 1640 中, 按 1 000:1 加入上述重组腺病毒载体。IL-10 组: 在转染组处理的基础上, 按 100 μ g/L 加入 IL-10 (法国 Cytolab 公司), 继续培养 3~5 d。流式细胞仪 (FACSCalibur 型, 美国 BD 公司) 检测其转染效率。

4. 细胞表型的检测: 将 3 组 imDC 分别取 2 \times 10⁵ 个悬浮于 1 ml 磷酸盐缓冲液 (PBS) 并置于 1.5 ml EP 管中, 按文献^[6]步骤进行, 流式细胞仪检测 imDC 的表型标记。每组样本重复检测 5 次。

5. 混合淋巴细胞反应 (MLR): 3 组 imDC 分别用 RPMI 1640 培养基调整其浓度为 1.0 \times 10⁶ 个/ml。参照文献^[7]分离异体 CBMC 中的 T 淋巴细胞 (1 \times 10⁶/ml)。取 96 孔培养板, 每个浓度各设 5 个复孔。对照组: 每孔加入 T 淋巴细胞 2 \times 10⁵ 个。转染组:

每孔先加入 T 淋巴细胞 1 \times 10⁵ 个, 然后以不同细胞比例 (1:1, 1:10, 1:100) 加入腺病毒转染后的 imDC, 终体积均为 200 μ l。IL-10 组: 在转染组处理基础上加入 IL-10 (100 μ g/L)。细胞继续常规培养 72 h, 结束前 16 h 每孔加入 18.5 kBq 标记胸腺嘧啶脱氧核苷 (³H-TdR)。在液体闪烁计数器 (LS6000TA 型, 美国 Beckman 公司) 上检测每分钟放射性荧光闪烁计数值 (cpm 值), 按下列公式计算刺激指数 (SI): SI = 实验组 cpm 值 \div 阴性对照组 cpm 值。

6. 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行方差分析, 采用 SPSS 11.0 统计学软件分析。

结果

1. imDC 的形态学观察: CBMC 在 GM-CSF 和 IL-4 的诱导下培养至第 2 天, 相差显微镜下可见对照组细胞从贴壁状态变为悬浮生长; 第 5 天以后细胞体积逐渐增大, 表面有不规则突起, 增殖旺盛的细胞聚集成团 (图 1)。扫描电镜见 imDC 表面不规则, 有膜性树枝状突起以及不规则皱褶; 转染组细胞树枝状突起更为显著和典型 (图 2)。

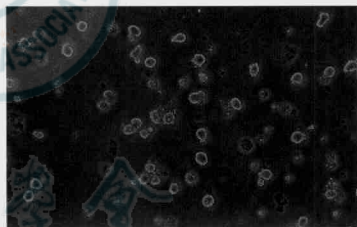


图 1 imDC 呈悬浮状态生长 倒置相差显微镜 \times 200

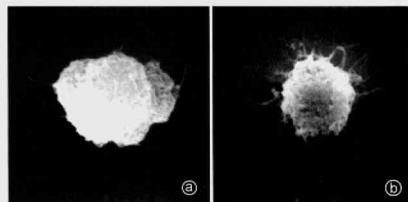


图 2 imDC 表面呈皱褶状, 有不规则突起 扫描电镜 \times 4 000。

a. 对照组 imDC; b. 转染组 imDC

2. imDC 的表型检测: 对照组 imDC 中 CD86 和 CD83 低表达, HLA-DR 阳性; 转染组 CD86 和 CD83 阳性率显著高于对照组 ($P < 0.01$), HLA-DR 阳性率也有所增加 ($P < 0.01$); IL-10 组 CD86、CD83 以

