

来源于人外周血单核细胞的树突状细胞感染rAAV-HBsAg后的功能改变

树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为专职的抗原呈递细胞在机体的免疫应答过程中居中心地位,其在恶性肿瘤、慢性感染性疾病和自身免疫性疾病等的免疫治疗中的作用已得到广泛关注。

目前,用病毒载体将抗原基因导入DCs并使之持续表达被认为是最有效的基因转移的方法之一,但有研究[1][2][3]显示部分病毒或病毒载体因可缩短DCs寿命、阻止DCs成熟和抑制DCs表面分子的表达等而影响DCs抗原呈递功能。

重组腺相关病毒(rAAV)是目前基因治疗的常用载体系统之一,被其感染的DCs是否会出现上述功能变化有待验证。基于此,本研究观察了rAAV载体介导HBsAg基因感染人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)来源DCs后的功能改变情况,旨在为rAAV载体广泛用于基于DCs的免疫治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 载体与细胞

携带乙肝表面抗原蛋白基因的rAAV(rAAV-HBsAg)由中国预防医学科学院病毒学研究所基因工程国家重点实验室构建、包装和纯化,滴度为 5×10^{11} CFU/ml,具体方法参见文献[4];人白细胞购自北京市北太平庄血站。

1.2 主要试剂

AIM-V培养液购自Gibco公司;白介素-12(p70)(IL-12)检测试剂盒、白介素-2(IL-2)、白介素-4(IL-4)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)和粒细胞巨嗜细胞集落刺激因子(GM-CSF)购自深圳晶美公司;淋巴细胞分离液购自北京宝芝林公司; γ -干扰素(IFN- γ)ELISA检测试剂盒购自北京天象人公司(Gibco原装)。

1.3 人外周血DCs的分离和培养、病毒的感染

参照文献[5][6]并略作改进:贴壁2 h,弃悬浮细胞后立即在六孔板中分别加入感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 5×10^6 CFU/ml的rAAV-HBsAg和AIM-V培养液(感染rAAV-HBsAg和未感染DCs组,简称rAAV-HBsAg-DCs和N-DCs),总体积为500 μ l,3 h后弃去各孔液体,加入含GM-CSF(1 000 U/ml)和IL-4(400 U/ml)的AIM-V 3 ml培养液继续培养。

1.4 培养DCs上清中IL-12(p70亚单位)含量检测

按试剂盒说明书提供的方法于培养后1、3、5、7 d检测rAAV-HBsAg-DCs和N-DCs上清中IL-12(p70)含量,各时相点均设3复孔。

1.5 淋巴细胞与DCs共孵育后上清中IFN- γ 含量的检测

在12孔板中将感染后培养7 d的rAAV-HBsAg-DCs、培养同样长时间的N-DCs分别与自身淋巴细胞按1:20的比例混合,加入含IL-2(100 U/ml)AIM-V培养液1.5 ml,以不加DCs只含相同总细胞数的淋巴细胞为对照组,各组均设3个复孔,于共孵育后的第3、5和7 d按试剂盒说明书提供的方法检测上清中IFN- γ 含量。

1.6 MTT法检测混合白细胞反应(MLR)

MLR检测所选用的T淋巴细胞与DCs分别来自不同的健康献血者,取培养7 d的rAAV-HBsAg-DCs和培养同样长时间N-DCs用25 μ g/ml的丝裂霉素C在37 $^{\circ}$ C水浴中作用30 min,1 000 r/min离心10 min,弃上清,沉淀细胞用PBS洗3次,悬浮于AIM-V培养液中。分别以 1×10^5 /孔、 2×10^3 /孔、 1×10^4 /孔、 2×10^4 /孔、 1×10^3 /孔将DC加入96孔板中,以T淋巴细胞供者自身的PBMC为对照组,每组3个复孔。每孔均加入 1×10^5 的T淋巴细胞,终体积200 μ l,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养96 h。终止培养前6 h加入MTT 200 μ l(5 mg/ml),培养终止后加酸化异丙醇100 μ l,充分混匀,静置数分钟后在波长570 nm处测D₅₇₀值。刺激指数(SI)=实验孔D(λ)均值/对照孔D(λ)均值,以SI反映DC刺激后同种异体淋巴细胞增殖的能力。

1.7 流式细胞仪检测DCs表面标记

收集感染后7 d的rAAV-HBsAg-DCs以及培养7 d的N-DCs,分别取500 μ l细胞悬液加入各测定管中,用PE或FITC标记的抗体孵育30 min,PBS洗2遍,在FACSort流式细胞仪(Becton Dickinson)上检测DCs表面标记。

1.8 统计处理

本实验所得计量资料用SPSS10.0软件进行方差分析或t检验。

2 结果

2.1 培养DCs上清中IL-12(p70)含量检测

在培养的第5天,rAAV-HBsAg-DCs的IL-12分泌水平显著高于N-DCs(P<0.05);随着培养时间的延长,rAAV-HBsAg-DCs和N-DCs逐渐成

熟，其IL-12的分泌水平有逐步提高的趋势(表1)。

表 1 经与未经 rAAV-HBsAg 感染的 DCs 中 IL-12 含量
Tab.1 Contents of IL-12 in the dendritic cells infected with or without rAAV-HBsAg

Time post-incubation (d)	Contents of IL-12 (pg/10 ⁶ cells)	
	N-DCs	rAAV-HBsAg-DCs
1	23.85±3.10	24.63±3.14
3	29.10±4.36	33.1±2.98
5	33.16±4.53*	45.48±6.04*
7	37.43±6.09	46.71±9.42

N-DCs: unmodified dendritic cells; rAAV-HBsAg-DCs: dendritic cells infected with rAAV-HBsAg; *P<0.05

2.2 淋巴细胞与DCs共孵育后上清中IFN-γ含量检测

对照组上清中未能检测到IFN-γ。在第5和第7天，rAAV-HBsAg-DCs组IFN-γ含量明显高于N-DCs组(P<0.02)；两组分泌IFN-γ的水平均随着共孵育时间的延长而提高(P<0.01，表2)

表 2 淋巴细胞与 DCs 共孵育后上清中 IFN-γ 含量
Tab.2 Production of IFN-γ(pg/10⁶ cells) by the lymphocyte populations co-cultured with the dendritic cells

Time post-co-incubation (d)	Contents of IFN-γ (pg/10 ⁶ cells)	
	N-DCs	rAAV-HBsAg-DCs
3	9.97±2.04	10.87±3.45
5	18.41±4.02 [#]	30.76±1.38 ^{#*}
7	26.09±4.45 [#]	47.49±5.52 ^{#*}

*P<0.02 vs N-DCs; [#]P<0.01 vs 3 d; [§]P<0.01 vs 5 d

2.3 rAAV-HBsAg感染后DCs刺激同种异体淋巴细胞增殖能力的变化

rAAV-HBsAg感染和未感染的DCs在不同的刺激细胞/应答细胞(stimulator/responder, S/R)比值时均可刺激同种异体淋巴细胞增殖，感染和未感染的DCs刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力无显著差异(表3)。

表 3 经与未经 rAAV-HBsAg 感染的 DCs 刺激同种异体淋巴细胞增殖反应的能力
Tab.3 Stimulation abilities of rAAV-HbsA-infected and naive dendritic cells in allogeneic lymphocyte reaction

Stimulator/responder (S/R)	Stimulation index (SI)	
	N-DCs	rAAV-HBsAg-DCs
1:1	9.78±0.97	10.33±1.34
1:5	6.39±0.87	6.02±0.65
1:10	4.34±0.68	4.68±0.59
1:50	3.36±0.35	3.22±0.36
1:100	1.85±0.32	2.02±0.32

2.4 rAAV-HBsAg感染后DCs的表面标记变化

rAAV-HBsAg感染7 d和未感染培养7 d的DCs表达CD80、CD86和HLA-DR的细胞占受检细胞总数的74%以上，较少的细胞表达CD83和CD14，感染和未感染的DCs的表面标记分子无明显改变(图1)。

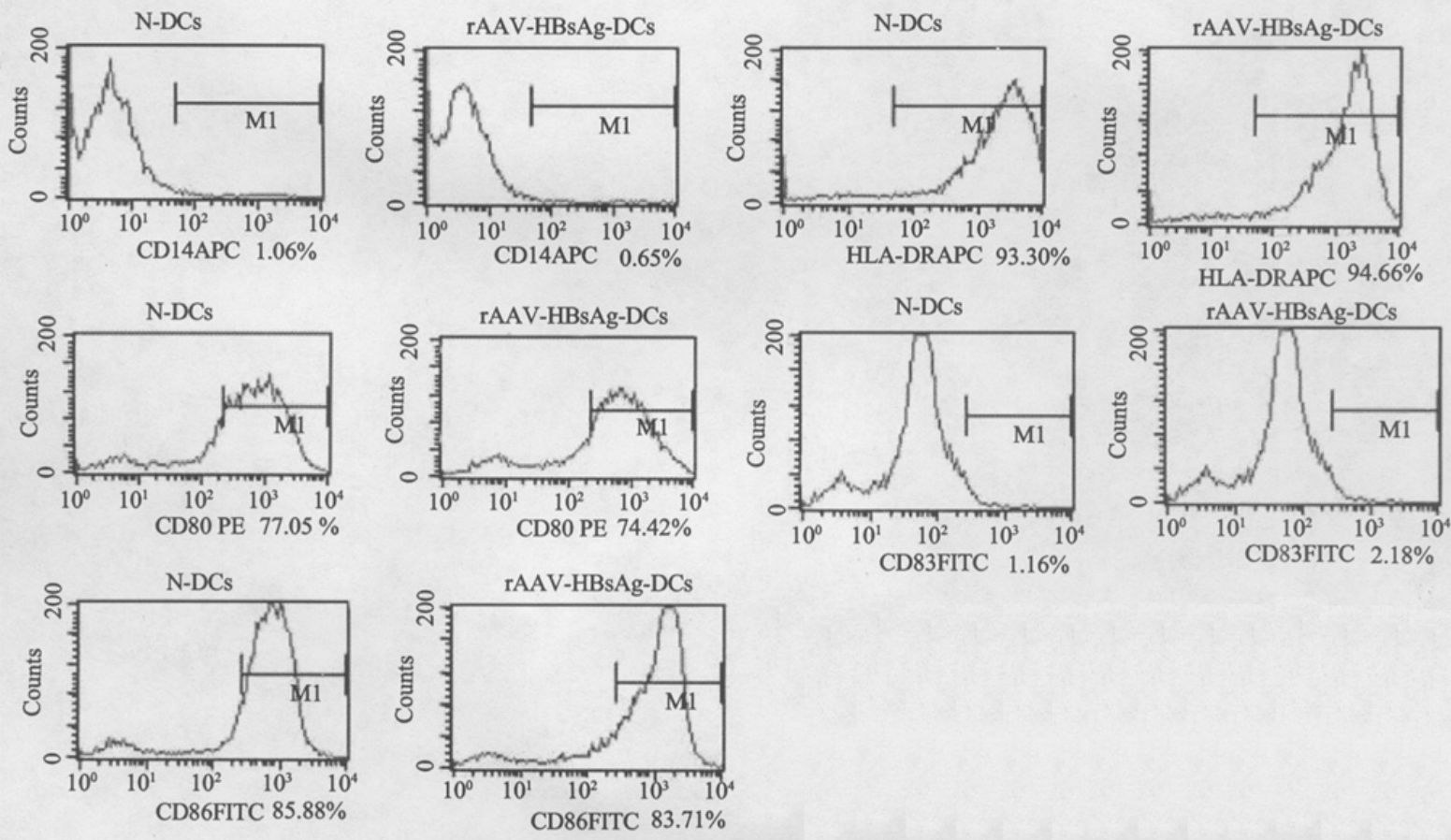


图1 经与未经rAAV-HBsAg感染的DCs的表面标记表达结果
Fig.1 Surface marker expressions in rAAV-HBsAg-infected and naive dendritic cells

3 讨论

为达到最佳免疫治疗效果，基于DCs的免疫治疗方案使用病毒载体常需综合考虑感染效率、转基因表达持续时间、稳定性和对DCs自身功能的负面影响等多种因素。rAAV作为一种活病毒载体具有稳定表达、定点整合、安全性较高，且不表达任何病毒自身蛋白基因等优点，是基因治疗研究应用较广泛的载体系统之一。目前虽已有研究[5][6]表明用表达HPV-16E6和HPV-16E7抗原的rAAV体外感染DCs能激发E6和E7特异性细胞毒性淋巴细胞(CTL)的产生，但rAAV介导抗原基因感染的DCs功能变化状况如何有待研究。

业已证明，IL-12是Th1产生必需的细胞因子，在启动细胞介导的免疫反应过程中起重要作用，它可刺激静止或激活的淋巴细胞产生Th1型细胞因子IFN- γ 。本实验结果显示，rAAV-HBsAg感染能提高DCs的IL-12的分泌水平，感染后的DCs刺激淋巴细胞产生IFN- γ 能力增强，提示rAAV介导HBsAg基因感染的DCs能诱发淋巴细胞朝Th1型细胞分化，从而激发抗原特异性的CTL产生。出人意料的是，本实验中未感染的DCs在培养末期IL-12分泌也增多，同时也可促进淋巴细胞产生IFN- γ ，这可能与培养液中高浓度的GM-CSF、IL-2等有关，有待进一步探讨。

DCs表面具有特征性表面标记—白细胞分化群(CD)，高水平表达的有CD40、CD80、CD83、CD86和II型主要组织相容性复合体(MHCII)等[7]。我们分离的DCs高水平表达HLA-DR、共刺激分子CD80和CD86，低水平表达CD14(单核细胞标记)和CD83(成熟DCs标记)，表明本研究所采用的方法能获得较高纯度的DCs，但处于非成熟状态；rAAV-HBsAg感染与否并不明显影响DCs表面标记的表达；此外，无论是被rAAV-HBsAg感染还是未被感染的DCs均表现出较强的刺激淋巴细胞增值的能力，两者之间并无明显的区别。从这些方面来看，rAAV介导外源基因感染并不会干扰DCs的正常功能。

总之，本实验的结果显示rAAV介导外源基因感染DCs能诱发淋巴细胞朝Th1型细胞分化，同时并不影响DCs的表型和刺激淋巴细胞增值的能力，表明在基于DCs的免疫治疗方案(研究)中，rAAV载体是介导外源基因体外遗传修饰DCs较为理想的载体，如能通过其它措施促进DCs的成熟，在恶性肿瘤和乙型肝炎等慢性感染性疾病的免疫治疗方面将大有作为。

致谢：感谢北京大学人民医院血液科王卉医师在流式细胞仪检测细胞表面标记实验中给予的帮助。

参考文献：

- [1] Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, et al. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type I exhibited T-cell stimulatory capacity[J]. J Virol, 2000, 74(15): 7127-36.
- [2] Engelmayer J, Larsson M, Subklewe M, et al. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion[J]. J Immunol, 1999, 163(12): 6762-8.
- [3] Jenne L, Hauser C, Arrighi JF, et al. Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function[J]. Gene Ther, 2000, 7(18): 1575-83.
- [4] 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 等. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法[J]. 科学通报(Sic Bull), 2000, 45

(19): 2071-5.

[5] Liu Y, Chiriva-Internati M, Grizzi F, et al. Rapid induction of cytotoxic T-cell response lymphocytes against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector[J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(12): 948-57.

[6] Chiriva-Internati M, Liu Y, Salati E, et al. Efficient generation of cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by adeno-associated virus/human papillomavirus type 16 E7 antigen gene transduction into dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(1): 30-8.

[7] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity[J]. *Nature*, 1998, 392(6673): 245-52.

参考文献:

[1] Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, et al. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibited T-cell stimulatory capacity[J]. *J Virol*, 2000, 74(15): 7127-36.

[2] Engelmayer J, Larsson M, Subklewe M, et al. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion[J]. *J Immunol*, 1999, 163(12): 6762-8.

[3] Jenne L, Hauser C, Arrighi JF, et al. Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(18): 1575-83.

[4] 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 等. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法[J]. *科学通报(Sic Bull)*, 2000, 45(19): 2071-5.

[5] Liu Y, Chiriva-Internati M, Grizzi F, et al. Rapid induction of cytotoxic T-cell response lymphocytes against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector[J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(12): 948-57.

[6] Chiriva-Internati M, Liu Y, Salati E, et al. Efficient generation of cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by adeno-associated virus/human papillomavirus type 16 E7 antigen gene transduction into dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(1): 30-8.

[7] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity[J]. *Nature*, 1998, 392(6673): 245-52.