

## 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

胡贵方<sup>1</sup> 袁小兵<sup>2</sup> 俞守义<sup>1</sup> 康禹<sup>2</sup> 袁云德<sup>2</sup> 渊第一军医大学流行病学教研室袁广东 广州 510515 中国预防医学科学院病毒学研究所袁北京 100052 冤

**摘要**目的 观察人外周血单核细胞来源树突状细胞(DCs)经重组腺相关病毒(AAV)载体介导乙肝表面抗原(HBsAg)基因感染后的功能改变。方法 采用 ELISA 试剂盒检测感染 rAAV-HBsAg 后的 DCs 分泌 IL-12 水平以及 rAAV-HBsAg-DCs 与淋巴细胞共孵育后上清中干扰素(IFN)的含量。采用混合白细胞反应(MLR)检测 rAAV-HBsAg 感染前后 DCs 刺激同种异体淋巴细胞的增殖能力。用 FACS 流式细胞仪检测 rAAV-HBsAg-DCs 表面分子 CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 的变化。结果 rAAV-HBsAg 感染可促进 DCs 分泌 IL-12 ( $P < 0.05$ )。感染后的 DCs 刺激淋巴细胞分泌 IFN 的水平显著提高 ( $P < 0.01$ )。感染前后的 DCs 刺激同种异体淋巴细胞增殖能力及其特征性表面分子无明显改变。结论 rAAV 介导 HBsAg 基因感染的 DCs 能诱发淋巴细胞朝 Th1 型细胞分化,但不明显改变 DCs 的表型和刺激淋巴细胞增殖的功能。AAV 载体介导 HBsAg 基因体外遗传修饰的 DCs 可以进一步用于乙型肝炎的免疫治疗研究。  
**关键词** 树突状细胞; 重组腺相关病毒; 免疫学; 肝炎表面抗原; 乙型肝炎病毒; 乙型  
中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 000-2588(2003)07-0696-03

## Functional change of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells after recombinant adeno-associated virus type 2-mediated HBsAg gene infection

HUGui-fang<sup>1</sup>, WUXiao-bing<sup>2</sup>, YUShou-yi<sup>1</sup>, KANGYu<sup>2</sup>, HOUYun-de<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Epidemiology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China

**Abstract:** Objective To observe the changes in the functions of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells (DCs) after hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) gene infection mediated by recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV). Methods The level of both interleukin (IL)-12 in the supernatant of *in vitro* cultured DCs infected with rAAV-HBsAg and interferon (IFN) in the supernatant of the lymphocyte populations co-cultured with DCs were determined by ELISA. The functions of the rAAV-HBsAg-infected DCs were reassessed by mixed leukocyte reaction (MLR), and the changes of the surface markers (including CD80, CD83, CD86 and HLA-DR) in response to the infection were detected by flow cytometry. Results After rAAV-HBsAg infection, the IL-12 secretion of DCs was significantly enhanced ( $P < 0.05$ ), while IFN production by the lymphocyte populations co-cultured with rAAV-HBsAg-infected DCs was reduced ( $P < 0.01$ ). rAAV-HBsAg infection of DCs did not affect the surface marker expressions and stimulation ability of the DCs in allogeneic lymphocytes reaction. Conclusion DCs infected by rAAV-HBsAg are more efficient than naive DCs in eliciting the differentiation of the lymphocytes toward Th1 type T cells, but the functions and the surface markers of DCs remain unaffected after the infection, suggesting the applicability of rAAV as a potentially useful vector for HBsAg gene transfer into the DCs for HBV immunotherapy. Key words: dendritic cells; recombinant adeno-associated virus/immunology; hepatitis B surface antigens; hepatitis B virus

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。

目前常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。已有研究<sup>[1-3]</sup>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。袁被其感染的 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。袁旨在为 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

携带乙肝表面抗原主蛋白基因的 rAAV(AAV-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。袁滴度为  $5 \times 10^{11}$

收稿日期: 2003-02-19

基金项目: 国家 863 高科技发展计划(863-BH03-05-02)

Supported by National Key Research Project (863-BH03-05-02)

作者简介: 胡贵方, 男, 1966 年, 湖南耒阳人, 第一军医大学 2000 级博士研究生, 袁电话: 20-61648311, 袁 e-mail: guifanghu@hotmail.com



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 ± 0.34
1:1	6.39 ± 0.87	6.02 ± 0.65
1:10	4.34 ± 0.68	4.68 ± 0.59
1:10	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 和 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。

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

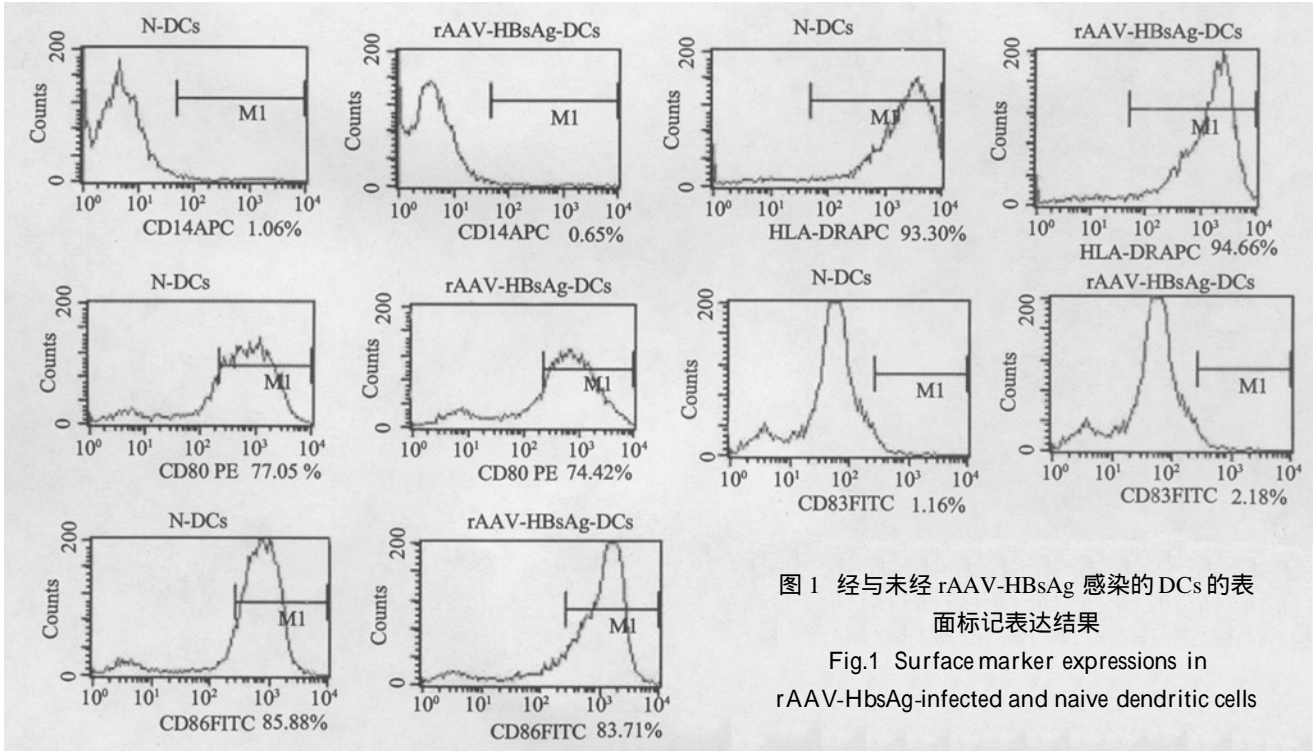


图 1 经与未经 rAAV-HBsAg 感染的 DCs 的表面标记表达结果

Fig.1 Surface marker expressions in rAAV-HbsAg-infected and naive dendritic cells

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。AAV 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。它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- $\gamma$ 。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- $\gamma$  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- $\gamma$ 。这可能与培养液中高浓度的 GM-CSF 和 IL-2 等有关。有待进一步探讨。

DCs 表面具有特征性表面标记。要白细胞分化群。MHCII 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。我们分离的 DCs 高水平表达 HLA-DR 和共刺激分子 CD80 和 CD86。低水平表达 CD14。骨髓细胞标记 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。

