

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¹袁小兵²袁俞守义¹袁康禹²袁云德²袁渊第一军医大学流行病教研室袁广东 广州 510515 袁中国预防医学科学院病毒学研究所袁北京 100052 袁

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(rAAV)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- α)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FACSort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- α 的水平显著提高(<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型细胞分化且不明显改变DCs的表型和刺激淋巴细胞增值的功能。rAAV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 1000-2588(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

HU Gui-fang¹, WU Xiao-bing², YU Shou-ji¹, KANG Yu², HOU Yun-de²

¹Department of Epidemiology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute 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 levels of both interleukin (IL)-12 in the supernatant of in vitro cultured DCs infected with rAAV-HBsAg and interferon (IFN- α) in the supernatant of the lymphocyte populations co-cultured with DCs were determined by ELISA. The functions of the rAAV-HBsAg-infected DCs were assessed 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- α 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 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 antigen; 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。

目前袁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。有研究表明显示部分病毒或病毒载体因可缩短DCs寿命而阻止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。基于此袁本研究观察了rAAV载体介导HBsAg基因感染人外周血单核细胞(DCs)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

携带乙肝表面抗原主蛋白基因的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。包装和纯化袁滴度为5伊0¹¹。

收稿日期 2003-02-19

基金项目 国家863高科技发展计划 2003-BH03-05-02

Supported by National 863 Key Research Project (2003-BH03-05-02)

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

CFU/ml²具体方法参见文献咱暂且白细胞购自北京市北太平庄血站遥

1.2 主要试剂

AIM-V 培养液购自 Gibco 公司白介素 -12 淋 70 免
淋 L-12 免检测试剂盒免白介素 -2 淋 L-2 免白介素 -4 淋 L-4 免
肿瘤坏死因子 球蛋白和粒细胞巨嗜细胞集落刺激
因子淋 M-CSF 免购自深圳晶美公司白淋巴细胞分离液
购自北京宝芝林公司白的干扰素淋 FN 酶免 LISA 检测
试剂盒购自北京天象人公司淋 gibco 原装免

1.3 人外周血 DCs 的分离和培养 病毒的感染

参照文献咱袁暂并略作改进附贴壁 2 h 袁弃悬浮细胞后立即在六孔板中分别加入感染复数渊multiplicity of infection, MOI 宽为 5 例 10^6 CFU/ml 的 rAAV-HBsAg 和 AIM-V 培养液感染 rAAV-HBsAg 和未感染 DCs 组袁简称 rAAV-HBsAg-DCs 和 N-DCs 宽总体积为 500 滋袁 h 后弃去各孔液体袁加入含 GM-CSF 渊 000U/ml 宽和 IL-4 渊 00U/ml 宽的 AIM-V3ml 培养液继续培养遥 1.4 培养 DCs 上清由 IL-12 渊 70 亚单位袁量检测

1.4 培养 DCs 上清中 IL-12p70 亚单位定量检测

按试剂盒说明书提供的方法于培养后 1 天检测 rAAV-HBsAg-DCs 和 N-DCs 上清中 IL-12p70 含量。每组设 3 个复孔。

1.5 淋巴细胞与 DCs 共孵育后上清中 IFN- γ 的含量的检测

在 12 孔板中将感染后培养 7 d 的 rAAV-HB-sAg-DCs 培养同样长时间的 N-DCs 分别与自身淋巴细胞按 1:100 的比例混合并加入含 IL-2 100 U/ml 和 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。共孵育后的第 3 天和 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测 MLR 空

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。培养 7 d 的 rAAV-HBsAg-DCs 和培养同样长时间 N-DCs 用 25 浓度/ml 的丝裂霉素 C 在 37 益水浴中作用 30min。离心 10min。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 伊 0⁵/ 孔。将 DC 加入 96 孔板中。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 伊 0⁵ 的 T 淋巴细胞。终体积 200 滤。益。% CO₂ 培养 96 h。终止培养前 6 h 加入 MTT 200 滤。mg/ml。培养终止后加酸化异丙醇 100 滤。充分混匀。静置数分钟后在波长 570nm 处测 D₅₇₀ 值。刺激指数 = (实验孔 D₅₇₀ 均值 / 对照孔 D₅₇₀ 均值) / 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-DCs¹ 分别取 500 滴 细胞悬液加入各测定管中² PE 或 FITC 标记的抗体孵育 30min³ BS 洗 2 遍⁴ 在 FACSsort⁵ 流式细胞仪⁶ ectonDickinson⁷ 室上 检测 DCs 表面标记⁸

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-12p70 瘤量检测

在培养的第5天，AAV-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，AAV-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 ± 1.0	24.63 ± 1.4
3	29.10 ± 3.6	33.1 ± 9.8
5	33.16 ± 5.3*	45.48 ± 0.04*
7	37.43 ± 0.9	46.71 ± 4.2

N-DCs:unmodifieddendriticcells;rAAV-HBsAg-DCs:dendritic
cellsinfectedwithrAAV-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- α 在第 5 和第 7 天袁AAV-HBsAg-DCs 组 IFN- α 含量明显高于N-DCs 组 $P<0.02$ 。两组分泌 IFN- α 的水平均随着共孵育时间的延长而提高 $P<0.01$ 袁表 2冤

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 2 淋巴细胞与 DCs 共孵育后上清中 IFN- γ 的含量

Tab.2 Production of IFN- γ (pg/10⁶ cells) by the lymphocyte populations co-cultured with the dendritic cells

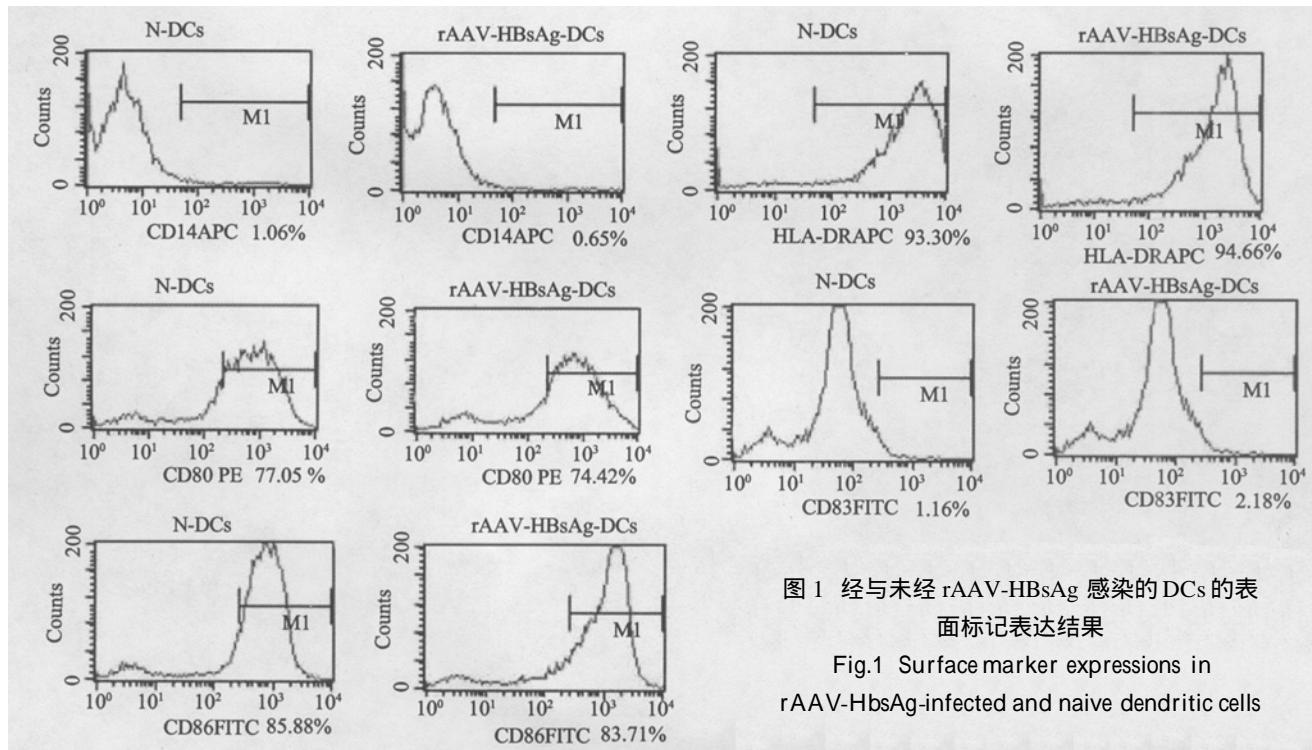
Time post-co-incubation(d)	Contents of IFN- γ (pg/10 ⁶ cells)	
	N-DCs	rAAV-HBsAg-DCs
3	9.97 ± .04	10.87 ± .45
5	18.41 ± .02 [#]	30.76 ± .38 ^{*#}
7	26.09 ± .45 [#]	47.49 ± .52 ^{*#\\$}

* $P < 0.02$ vs N-DCs; # $P < 0.01$ vs 3 d; $^{\text{s}}P < 0.01$ vs 5 d

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 颗	9.78 ± 0.97	10.33 ± 0.34
1 颗	6.39 ± 0.87	6.02 ± 0.65
1 颗	4.34 ± 0.68	4.68 ± 0.59
1 颗	3.36 ± 0.35	3.22 ± 0.36
1 颗	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。

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。AAV 作为一种活病毒载体具有稳定表达、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，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，在实验中未感染的 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 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。高水平表达的有 CD40、CD80、CD83 和 CD86。II 型主要组织相容性复合体 MHC II 分子。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。单核细胞标记物 CD83 和 CD86。成熟 DCs 标记物表明本研究所采用的方法能获得较高纯度的 DCs。但处于非成熟状态的 rAAV-HBsAg 感染与否并不明显影响 DCs 表面标记的表达。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2 对照组和实验组呼吸频率和心率的比较
Tab.2 Comparison of the respiratory frequencies and heart rates between the 2 groups (Mean \pm SD, times/min)

Group	Pre-wound			HHEExposure		
	n	RF	HR	n	RF	HR
EG	18	28.56 \pm 8.30	72.61 \pm 0.51	40	54.28 \pm 6.39*	94.00 \pm 5.49*
CG	19	22.26 \pm 3.50	75.47 \pm 0.51	39	58.88 \pm 0.73*	112.51 \pm 8.21*
t		-1.443	-2.358		2.470	2.562
P		0.169	0.240		0.023	0.012

RF:Respiratory frequency; HR:Heart rate; *P<0.05 vs pre-wound

应袁血浆苗EP浓度的升高其中血浆苗EP浓度与疼痛的感受度有关袁急性疼痛可使血浆苗EP含量增高袁但经过疼痛干预如使用麻醉剂+灸疗止痛药物后袁血浆苗EP含量较治疗前可明显下降袁遥

本研究结果显示袁采用密闭性功能敷料护理创面后袁动物各时间段的血浆苗EP浓度变化显著低于对照组袁在损伤后24 h与损伤前无统计学意义袁说明密闭性功能敷料具有明显降低血浆苗EP的高峰值袁能促进某些负反馈袁保持机体的衡态袁镇痛起协同作用袁王学敏袁报道的术后镇痛结果一致袁

心率袁呼吸频率不是对疼痛应激反应的一个敏感指标袁仍是对机体的应激反应的体现袁组织创伤后袁细胞破坏时释放或产生激肽袁缓激肽袁物质和5-羟色胺袁酸性代谢的产物和乙酰胆碱等物质袁当这些物质达到一定浓度后就会刺激感觉神经引起伤口剧烈急性疼痛袁导致血压升高袁呼吸袁心率加快袁本研究观察到湿热环境下实验组和对照组的创伤前与热暴露时呼吸频率袁心率明显增快袁实验组增加幅度小

于于对照组遥可见含有清热袁凉血袁活血袁淤袁止痛功效的密闭性功能敷料能直接作用于感觉神经和提高水解致痛物质酶活性袁使致痛物质迅速分解袁浓度降低而达到止痛效果袁减轻损伤后应激反应遥

参考文献院

咱暂 HawrankoAA, Serafini M, Smith DJ. Anti-analgesia and reduced antinociception from supraspinally administered beta-endorphin in stressed rats: dependence on spinal cholecystokinin 咱暂 Neurosci Lett, 1999, 267 (2):101-4.

咱暂张金山, 冯金花, 安建雄 等. 急腹症与慢性脊神经痛患者血浆苗内啡肽含量研究 咨暂中国疼痛医学杂志 1998, 4(1):19-22.

Zhang JS, Feng JH, An JX, et al. Plasma content of 苗endorphin in patients with acute abdominal disease or chronic spinal neuralgia 咨暂 Chin J Pain Med, 1998, 4(1):19-22.

咱暂 Pokela ML. Effect of opioid-induced analgesia on beta-endorphin cortisol and glucose responses in neonates with cardiorespiratory problems 咨暂 Biol Neonate, 1993, 64(6):360-7.

咱暂孙同柱, 付小兵, 陈伟, 等. 一种小型猪全层皮肤缺损创面模型的制备与应用 咨暂中华实验外科杂志, 2002, 19(5):466-8.

Sun TZ, Fu XB, Chen W, et al. Establishment and application of wound model of full-thickness skin defect in minipigs 咨暂 Chin J Exp Surg, 2002, 19(5):466-8.

咱暂雷亚峰. 驱风止痛膏对大鼠外伤淤血模型血浆苗EP的变化分析 咨暂安徽中医临床杂志(Anhui J Trad Chin Clin), 2000, 12(1):29.

咱暂 Huang YS, Jiang JW, Wu GC, et al. Effect of melatonin and electroacupuncture(EA) on NK cell activity interleukin-2 production and POMC-derived peptides in traumatic rats 咨暂 Acupunct Elect Res, 2002, 27(2):95-105.

咱暂王学敏, 刘滨婴, 徐惠芳. 不同镇痛方法对老年人术后应激反应的影响 咨暂上海医学(Shanghai Med J), 2002, 25(增刊):18-20.

muneevasion 咨暂 Immunol, 1999, 163(12):6762-8.

咱暂 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 咨暂 Gene Ther, 2000, 7(18):1575-83.

咱暂吴小兵, 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 咨暂科学通报(Sic Bull), 2000, 45(19): 2071-5.

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

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

咱暂 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity 咨暂 Nature, 1998, 392(6673):245-52.

渊上接 698 页冤

明在基于DCs的免疫治疗方案渊研究冤中袁AAV载体是介导外源基因体外遗传修饰DCs较为理想的载体袁能通过其它措施促进DCs的成熟袁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遥

致谢院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遥

参考文献院

咱暂 Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, et al. Matured dendritic cells infected with herpes simplex virus type I exhibited T-cell stimulatory capacity 咨暂 Virol, 2000, 74(15):7127-36.

咱暂 Engelmayr J, Larsson M, Subklewe M, et al. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of im-