

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)10-0877-04

重组腺病毒载体介导人 DeltaNp73 α 转染对树突状细胞凋亡的抑制作用

胡义杰, 范士志, 蒋耀光, 李志平, 陈建明, 何勇

(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所胸心外科 重庆 400042)

Inhibitory effect of recombinant adenovirus vector-mediated transfection of DeltaNp73 α on dendritic cell apoptosis

HU Yi-Jie, FAN Shi-Zhi, JIANG Yao-Guang, LI Zhi-Ping, CHEN Jian-Ming, HE Yong

Department of Cardiothoracic Surgery, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】 AIM: To investigate the effect of transfection with DeltaNp73 α recombinant adenovirus on the maturation and vitality of dendritic cells from human umbilical blood. **METHODS:** DeltaNp73 α recombinant adenovirus were constructed with Adeasy system. Immature dendritic cells were isolated from human umbilical cord blood, and cultured in the presence of interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, and then transfected with the adenovirus vector with centrifugal force method. Viability and maturation state of dendritic cells after transfection were assessed by flow cytometric analysis. **RESULTS:** DeltaNp73 α recombinant adenovirus vector was constructed successfully; and DeltaNp73 α expression in the transfected dendritic cells was confirmed by RT-PCR and Western Blot. The expressions of CD83, HLA-DR and the vitality of transfected dendritic cells were increased. **CONCLUSION:** Transfection with DeltaNp73 α recombinant adenovirus promotes the maturation and inhibits the apoptosis of dendritic cells, which enhances effectively the antigen presentation of dendritic cell vaccine.

【Keywords】 DeltaNp73 α ; recombinant, genetic; adenoviridae; dendritic cells; dendritic cells vaccine

【摘要】目的: 研究人 DeltaNp73 α 基因重组腺病毒转染人脐血来源树突状细胞(DC)对其成熟状态及其凋亡水平的影响。方法: 用 Adeasy 系统构建人 DeltaNp73 α 基因重组腺病

收稿日期 2006-09-11; 接受日期 2006-10-08

基金项目 国家自然科学基金(30600611); 第三军医大学中青年基金项目(XG200540)

通讯作者: 何勇, Tel: (023)60983998 Email: heyong8998@yahoo.com.cn

作者简介: 胡义杰, 硕士, 住院医师, Tel: (023)68757241 Email: gysjf_hu@yahoo.com.cn

毒, 并通过增强离心法将其转染至人脐血来源 DC, 流式细胞仪分析转染后 DC 的成熟状态以及 DC 的凋亡水平。结果: 成功构建了人 DeltaNp73 α 基因重组腺病毒并高效转染 DC; 人 DeltaNp73 α 基因重组腺病毒转染提高了 DCCD83, HLA-DR 的表达, 并能显著抑制其凋亡水平。结论: 人 DeltaNp73 α 基因重组腺病毒转染 DC, 促进 DC 的成熟并抑制其凋亡, 将有效地提高 DC 疫苗的抗原呈递能力。

【关键词】 DeltaNp73 α ; 重组, 遗传; 腺病毒科; 树突细胞; 树突细胞疫苗

【中图分类号】R392.12

【文献标识码】A

0 引言

免疫治疗是肿瘤目前极有前景的治疗手段之一。激活特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)是实现肿瘤主动免疫治疗的关键。树突状细胞(dendritic cell, DC)能摄取特异性相关抗原、高水平的表达与抗原递呈有关的 MHC-I, MHC-II 分子、多种共刺激分子及黏附分子, 从而激活初始 T 淋巴细胞。肿瘤细胞通过分泌一些免疫抑制因子来抑制 DC 的成熟及其功能, 甚至通过相关信号通路诱导 DC 细胞的凋亡^[1]。具有抑制细胞作用的 DeltaNp73 α 属于 p53 基因家族, 其在肺癌组织中表达量和阳性表达率明显升高, 是肺癌免疫治疗中较好的靶点。我们拟通过构建 DeltaNp73 α 的重组腺病毒(adenovirus, Ad)并转染人 DC, 使 DeltaNp73 α 在 DC 内稳定高表达、呈递, 并探讨 DeltaNp73 α 高表达对 DC 活化状态及凋亡水平的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 真核表达质粒 pcDNA3-DeltaNp73 α -HA 由意大利罗马大学 Gerry Melino 教授和 Vincenzo De laurenzi 博士惠赠, 含 DeltaNp73 α 基因 cDNA 全长约 1700 bp。PAdTrack-CMV 293T 细胞 *E. coli* BJ5183, DH5 α 大肠杆菌由第三军医大学西南医院烧伤研究所提供。KpnI, XbaI, PmeI, PacI 限制性内切酶以及 T4DNA 连接酶(NEB 公司); 脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂盒(Invitrogen 公司); 大小量质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、RNA PCR Kit

(TaKaRa 公司);人淋巴细胞分离液(B&D 公司);人白细胞介素 IL-4,人粒-单核集落刺激因子 GM-CSF,肿瘤坏死因子 TNF- α (Perprotech 公司);Anti-HA Tag Mouse monoclonal Antibody(Applygen 公司);Tripure Reagent(百泰克生物公司);MC-CellLytics Mammalian Cell Protein Extraction Reagent,BCA 蛋白质定量测定试剂盒(上海申能博彩生物公司);goat anti-mouse IgG/HRP 二抗(Biosynthesis 公司);PE-anti-CD1a,PE-anti-CD83,PE-anti-HLA-DR 及其同型对照(美国 Bio-Legend 公司);PE-Annexin V 凋亡试剂盒(晶美生物公司)。根据 GenBank 中 DeltaNp73 α cDNA 的序列,应用 Primer 5 软件设计针对其的特异引物并由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 复制缺陷性腺病毒 Ad-DeltaNp73 α 的构建

复制缺陷性腺病毒 Ad-DeltaNp73 α 含全长人 DeltaNp73 α cDNA,由我科通过 AdEasy 系统构建。50% 组织培养转染剂量法(TCID50)测得病毒的滴度(M. O. I)为 2.5×10^{11} pfu/L。

1.2.2 人脐带血来源 DC 的分离培养 经产妇同意后,取剖腹产时新生儿脐带血(125×10^3 U/L 肝素抗凝)经人淋巴细胞分离液密度梯度离心法^[21]分离出单个核细胞,37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO₂ 孵箱孵育。2 h 后转移未贴壁细胞至另一离心管供分离 T 细胞,贴壁细胞更换含有细胞因子 IL-4(1000×10^3 U/L),GM-CSF(1000×10^3 U/L)的培养基继续培养。间隔 1 d 半量更换培养基,补充细胞因子 IL-4,GM-CSF。第 6 日收获未成熟 DC(imature dendritic cells, iDC)或者第 5 日换液时加入 TNF- α (50×10^3 ng/L),刺激 48 h 后即第 7 日收获成熟 DC(mature dendritic cells, mDC)。

1.2.3 重组腺病毒增强离心法转染 DC 参照文献[3],采用离心法增强腺病毒转染 DC。

1.2.4 转染后 DC 中 DeltaNp73 α 的表达 收集 DC,腺病毒转染 48 h 的 DC/Ad-DeltaNp73 α 以及对照组的 DC/Ad-ctrl。RT-PCR 分析 DeltaNp73 α mRNA 水平;Western Blot 分析 DeltaNp73 α 蛋白表达水平。

1.2.5 转染前后 DC 表面标志物的变化 收集 DC, PBS 洗涤细胞后,分别加入待检测的 CD1a,CD83 及 HLA-DR 抗体及其同型对照;4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后,PBS 液洗涤 2 次后上机检测。

1.2.6 DC 凋亡水平的变化 转染 7 d 收集 DeltaNp73 α 腺病毒感染的 DC(对照组采用正常培养 DC,Ad-EGFP 转染的 DC)将细胞悬浮在 $1 \times$ 结合缓冲液中,调整密度为 $(2 \sim 5) \times 10^8$ /L,将细胞悬液和 PE 标记 Annexin V 混合,室温孵育 10 min,离心,PBS

洗涤细胞,使用 $1 \times$ 结合缓冲液重悬细胞,PI 染色细胞(终浓度为 1×10^3 μ g/L)流式细胞仪分析。

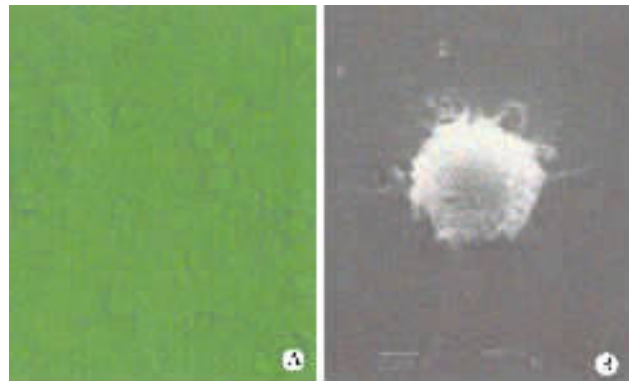
统计学处理:用 SPSS11.0 软件分析数据; $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 DC 的分离 在诱导培养 DC 过程中,第 5 日在光镜下即可见细胞呈半悬浮生长,胞膜向外延伸出树枝状突起,CD1a⁺ 细胞约占 29%。加入 TNF- α 刺激 48 h 后其突起明显增多。培养 7 d 时表型检测 CD83 细胞约占 91%,HLA-DR 表达约占 92%,均较各自未成熟组明显增多。扫描电镜观察,胞质突起形成典型的树枝状,并可见 DC 的粗糙表面(图 1)。

2.1 重组腺病毒转染 DC 以及 DeltaNp73 α 的表达

采用 200 M. O. I 重组 DeltaNp73 α 腺病毒有效转染 iDC(图 2)。绝大部分细胞均出现绿色荧光的表达;最佳 M. O. I 根据转染过后的效率以及对 DC 的细胞毒性综合优化为 200(具体数据未列出)。RT-PCR 及 Western Blot 结果证实通过 200 M. O. I 重组腺病毒转染 DC 后,可以观察到 DeltaNp73 α mRNA 及其蛋白在 DC 中的表达(图 3)。



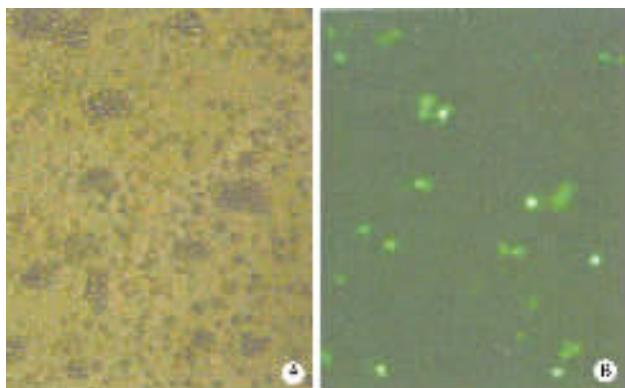
A:光镜 $\times 400$;B:扫描电镜 $\times 3000$ 。

图 1 人脐带血来源 DC 的分离

2.3 标志物的变化 转染后的 DC 表面分子 CD83,HLA-DR 均较 iDC 表达水平增加,接近 mDC 水平(图 4)。CD83,HLA-DR 表达的上调在 Ad-DeltaNp73 α 和 Ad-ctrl 组间没有差异,提示 DeltaNp73 α 对 DC 表面分子的表达没有明显作用。

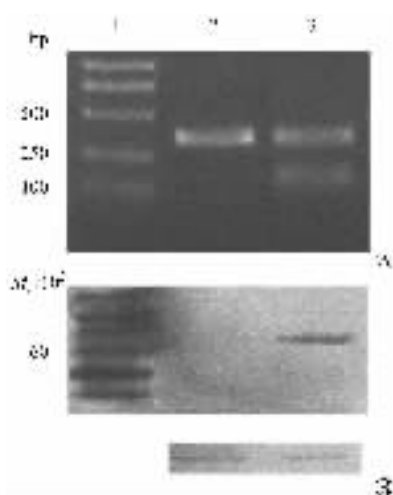
2.4 凋亡水平的改变 重组腺病毒转染 DC 7 d 后,DeltaNp73 α 组 DC 存活率显著高于另外两组,而正常培养 DC 以及空腺病毒载体转染组之间没有显著差异。同时,DeltaNp73 α 组 DCs 的存活率达 $(71.0 \pm 2.8)\%$,显著高于另两组,而正常培养 DC 以及空腺

病毒载体转染组之间没有显著差异(分别为 $(53.5 \pm 0.7)\%$ ($45.5 \pm 3.5\%$)).



A:光镜 $\times 100$; B:倒置荧光显微镜 $\times 100$.

图2 重组腺病毒转染后 DC 镜下特征



A:RT-PCR 分析 DeltaNp73 α mRNA 的表达. β -actin:内参;1:DL 2000 2:Ad-ctrl 转染的 DC β :Ad-DeltaNp73 α 转染的 DC. B:Western Blot 分析带 HA 标签的 DeltaNp73 α 蛋白的表达情况. 1:蛋白分子质量 2:Ad-ctrl 转染的 DC β :Ad-DeltaNp73 α 转染的 DC.

图3 M. O. I 200 的 DeltaNp73 α 重组腺病毒转染 DC 后 DeltaNp73 α 的表达

3 讨论

DC 是启动免疫反应最关键的抗原呈递细胞,但由于 DC 具有高度不均质性,其分化以及功能很容易受外界因素的影响,且恶性肿瘤可以通过分泌一系列的免疫抑制因子,致使 DC 功能失调,从而系统的影响免疫抗癌效应. 我们采用在体外诱导培养 DC,经含全长 DeltaNp73 α 基因重组腺病毒修饰,探讨 DC 功能变化及进一步用于抗癌的可行性.

首先,肿瘤可以干预 DC 的成熟状态;而重组腺病毒转染可促进 DC 的活化. 从多种肿瘤患者肿瘤中分离的 DC,其共刺激分子 CD80,CD86 等均低表达,即表型主要为未成熟表型,其 T 细胞刺激能力明显

减弱,体外诱导同源 CD4 $^+$ T 细胞无力;是否诱导 T 细胞的死亡^[4]. 未成熟 DC 对成熟刺激因子 GM-CSF, TNF- α 或 CD40L 均呈低反应性,提示并非缺乏成熟刺激因子,可能是肿瘤相关产物抑制了其成熟. 我们的实验结果显示 DeltaNp73 α 对 DC 的成熟并没有直接的影响,但重组腺病毒的转染,可以显著提高相关共刺激分子的表达,促进 DC 的成熟;而 DeltaNp73 α 的表达,却显著地诱导了 HLA-DR 的表达,提示 DC 高效表达 MHC I 类和 MHC II 类分子,为下一步的有效抗原呈递提供了基础.

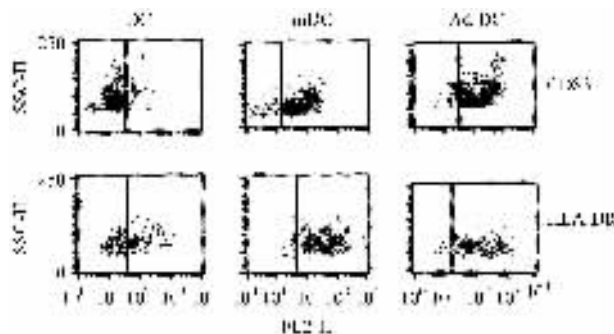


图4 Ad-DeltaNp73 α 转染 iDC 48 h 后表型分析

其次,肿瘤患者体内易发生 DC 的自发性凋亡以及 T 细胞、肿瘤细胞介导的 DC 凋亡^[5];而 DeltaNp73 α 重组腺病毒转染可抑制 DC 的凋亡,提高其生存率. 相比于 iDC, mDC 更容易发生自发性凋亡^[6]. DC 与 CD4 $^+$ T 细胞发生抗原特异性作用后,DC 立即进入凋亡过程;该过程部分受 CD95-CD95L (即 Fas-FasL)信号通路的调节. 已经证实 DC 的生存期显著影响着在体 DC 诱导 T 细胞聚集增殖能力以及维持有效抑瘤免疫学效应的能力^[7]. 通过 TNF 受体修饰 DC,可以显著抑制 DC 的自发性凋亡,使其生存期长于正常对照 DC 以及空病毒载体转染的 DC^[8]. 瘤内注射表达抗凋亡分子 BCL-XL 的 DC 疫苗可以诱导更强的抗癌效应;并证实与 DC 生存期延长相关^[9]. 本研究 DC 的生存率明显高于正常对照 DC 以及含 EGFP 病毒转染的 DC,亦即 DeltaNp73 α 可以抑制 DC 细胞的自发性或诱导性凋亡,这将提高 DeltaNp73 α 修饰 DC 的 T 细胞聚集增殖能力以及有效抑瘤免疫反应能力.

【参考文献】

- [1] Uramoto H, Sugio K, Oyama T, et al. Expression of the p53 family in lung cancer [J]. Anticancer Res 2006 26(3A):1785-1790.
- [2] Morse HC, Kearney JF, Isaacson PG, et al. Cells of the marginal zone—origins, function and neoplasia [J]. Leuk Res, 2001 25(2):169-178.
- [3] Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, et al. Enhanced efficiency

by centrifugal manipulation of adenovirus-mediated interleukin 12 gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells [J]. Hum Gene Ther , 2001 , 12(4) 333 - 346.

[4] Munn D , Sharma M , Lee J . Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2 , 3-dioxygenase [J]. Science , 2002 297 1867 - 1870.

[5] Pinzon-Charry A , Maxwell T , McGuckin MA , et al . Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer [J]. Breast Cancer Res , 2006 8(1) R5.

[6] Lokshin AE , Kalinski P , Sassi RR , et al . Differential regulation of maturation and apoptosis of human monocyte-derived dendritic cells mediated by MHC class II [J]. Int Immunol , 2002 , 14(9) : 1027 - 1037.

[7] Kanto T , Kalinski P , Hunter OC , et al . Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis [J]. J Immunol , 2001 , 167(7) : 3773 - 3784.

[8] Yurkovetsky ZR , Shurin GV , Barry DA , et al . Comparative analysis of antitumor activity of CD40L , RANKL , and 4-1BBL in vivo following intratumoral administration of viral vectors or transduced dendritic cells [J]. J Gene Med 2006 8(2) 129 - 137.

[9] Pirtskhalaishvili G , Shurin GV , Gambotto A , et al . Transduction of dendritic cells with Bcl-xL increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice [J]. J Immunol , 2000 165(4) 1956 - 1964.

编辑 王睿

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)10-0880-01

应急卫生防疫保障信息的时效性探讨

崔鑫鑫¹, 王赤才², 周世伟¹, 骈涛¹, 陶发胜¹ (¹ 第三军医大学卫生勤务学教研室, ² 第三军医大学, 重庆 400038)

【关键词】 应急卫生防疫保障信息 时效性
【中图分类号】 R197.2 【文献标识码】 B

0 引言 应急卫生防疫保障信息是指在应急状态下, 一切与卫生防疫保障有关的或者能为卫生防疫保障提供有效服务的消息、数据、文字、程序和情报等。应急卫生防疫保障信息作为应急卫生防疫保障的基础和关键因素, 其对应急卫生防疫保障的影响集中体现在信息的处理过程, 对采取保障措施时间的影响, 从而影响卫生防疫保障的效果。我们以突发公共卫生事件的案例分析为基础, 提出应急卫生防疫保障信息时效性的观点, 并对其影响要素作以简要分析。

1 案例分析 1961年霍乱流行案例^[1]。此次霍乱的流行过程是1961-06-05/1961-05-12, 事件持续的时间较长。7月份发病人数达到453例, 7~12月期间, 发病人数逐渐增多, 至12月份发病人数达4318例。虽然在7月上旬, 防疫部门得到疫情信息, 采取了紧急措施, 但发病人数仍然呈上升趋势, 未能遏制疫情的蔓延。7月份的死亡率为11.26%, 此后至12月份死亡率有所下降, 为9.94%。7月5日事发地阳江县才将疫情信息上报, 卫生防疫部门接到信息后, 立即奔赴现场, 于7月6日赶抵事发现场, 立即采取措施, 展开全面封锁患者或带菌者所在的村庄、街道, 禁止出售可能传播霍乱的任何食品, 对阳性水体进行消毒并严禁使用, 预防接种等一系列应对措施。但是, 采取紧急措施的时间距离第一例病例发病时间已相隔约1月, 由于时间间隔较长, 虽然防疫人员竭尽全力, 仍未查清该次霍乱是由什么渠道, 由何处出入事发地, 对于6月5日以前是否还有同类患者发生, 也无从调查和确认。在此次霍乱的大流行中, 由于疫情信息迟报1+月, 即使防疫部门在接到信息后立即反应, 采取各种应急措施, 也无法遏制疫情的蔓延和发展。

因井水污染引发的食物型O₁₃₉霍乱暴发^[1]。首发病例时间2004-05-04早上5:30, 于5日早上2点入院, 9:45疑似霍乱疫情信息报至防疫部门, 至5月10日疫情即告平息。该案

例疫情发现及时, 传递迅速, 应急处理得当, 使得疫情被迅速扑灭。

2 讨论

2.1 应急卫生防疫保障信息时效性的基本观点 信息的时效性是指在一定的时间范围内, 信息是有价值的, 但随着时间的推移, 信息可利用的价值就可能失去, 从而变成过时的信息。应急卫生防疫保障的整个过程依赖于信息的传递和处理, 及时、准确、完整的信息在应急卫生防疫保障中起着沟通、协调、组织的作用。突发事件的突发性、公共性、危害性、复杂性、多变性的特点就决定了其信息在短时间内大量涌现、瞬息万变, 有效信息可能在很短的时间内失去价值, 变成过时信息, 即应急卫生防疫保障信息具有明显的时效性。

2.2 应急卫生防疫保障信息时效性的影响因素 对信息时效性的影响因素主要从信息传递者、信息接收者、信息传递渠道^[2]方面分析。信息传递者专业素质低或不具备专业素质、对信息收集和传递的重要性没有认识、对应急卫生防疫保障不了解, 就无法获取信息的潜在价值, 对预示性的信息视而不见, 不能及时完整的收集和传递信息或使用错误的收集和传递方法都会严重的影响信息的时效性, 导致信息的失真、失效。

信息传递渠道是信息由传递者到接收者的惟一通道, 其对信息时效性的影响通常由于组织内部机构庞杂、层次繁多, 信息传递渠道迂回曲折或信息传递系统不健全、分工不明确, 这不仅影响传递速度, 而且容易造成信息传递中断。

信息接收者是信息传递的最终接受者, 信息作用的发挥、价值的体现, 很大程度上依赖于信息接收者对信息的接收和利用程度, 无论信息传递多么及时、完整, 如果信息接收者对其不重视, 反应不及时, 信息应有的作用没有发挥, 也谈不上信息的时效性。

另外, 其时效性还受到应急卫生防疫保障外部环境的影响, 例如技术条件、政策支持、组织机构和经费支持等。

应急卫生防疫保障信息的时效性的论证和提出, 对应急卫生防疫保障中信息及时、有效的传输和处理提供依据和支持, 信息的时效性特点就要求我们在应急处理中重视信息的传输, 减少干扰因素的影响, 保证其时效性, 使卫生防疫保障得以顺利完成。

【参考文献】

[1] 郭新彪, 刘君卓. 突发公共卫生事件应急指引[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004 9 #0 - 50.

[2] 马费成. 信息管理学基础[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000 : 40 - 69.

[3] 魏彩娥, 杨建设. 浅谈信息在卫生防疫事业管理中的作用[J]. 中国预防医学杂志. 2001 4 298.

[4] 司徒潮满. 卫生防疫信息管理的问题和对策. 中国公共卫生管理[J]. 1996 12(4) 279 - 281.

编辑 黄良田

收稿日期 2006-09-12 ; 接受日期 2006-10-09
作者简介 崔鑫鑫, 硕士生. Tel : (023) 68752341 Email : 07cuixinxin@ mail. tmmu. com. cn