论著

文章编号:1000-5404(2005)17-1732-03

*Serrate*1 基因转染对小鼠树突状细胞生物学特性的影响

孙 鲲,林科雄,吴 奎,夏俊波,王长征 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 探讨 *Serrate*1 基因转染对小鼠树突状细胞生物学特性的影响。**方法** 将 *Serrate*1 基因体外转染小鼠 DCs,经 G418 筛选后,Western blot 检测 DCs *Serrate*1 的表达,流式细胞仪检测转染后 DCs 表面共刺激分子的表达,混合淋巴细胞反应观察 DCs 对 T 淋巴细胞增殖的影响。**结果** *Serrate*1 基因转染的树突状细胞 *Serrate*1 的表达较未转染组明显增高,转染 *Serrate*1 基因的 DCs 表面 CD80、CD86 等共刺激分子的表达与对照组比较无明显改变($P>0.05$);在混合淋巴细胞反应中,转染 DCs 对 T 细胞的增殖有抑制作用,而空载体 pcDNA 3.1(+)对照组与未转染组的树突状细胞具有强烈的激发 T 细胞增殖的能力。**结论** *Serrate*1 基因转染能在不影响 DCs 表面共刺激分子表达的情况下显著抑制 T 细胞活化。

关键词: *Serrate*1;树突状细胞;免疫耐受

中图法分类号: R392.11; R394.2; R562.250.2 **文献标识码**: A

Effect of *Serrate*1 gene transfection on biological characteristic of dendritic cells in mice

SUN Kun, LIN Ke-xiong, WU Kui, XIA Jun-bo, WANG Chang-zheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of *Serrate*1 gene transfer on the biological characteristic of dendritic cells (DCs) in mice. **Methods** Mice DCs were transfected with pcDNA3.1(+)-*Serrate*1 plasmid through Lipofectmine 2000 and the transfected cells were selected by G418. The biological characteristic of transfected DCs were detected by Western blotting, the expression of the costimulatory molecules on the transfected DCs were detected by FACS, and the proliferation of T cells were tested by mixed lymphocyte reaction (MLR). **Results** The expression of *Serrate*1 on the transfected DCs increased significantly than that of non-transfected DCs. There was no difference in the expression of costimulatory molecules between the transfected DCs and non-transfected DCs. In MLR, the proliferation of T lymphocyte cells was inhibited by transfected DCs, but the control DCs stimulated the proliferation strongly. **Conclusion** DCs overexpressing *Serrate*1 could inhibit the proliferation and activation of T cells, which was not related to the expression of costimulatory molecules on DCs but *via* the Notch1-*Serrate*1 signaling pathway.

Key words: *Serrate*1; dendritic cells; immune tolerance

以抗原特异性 T 细胞的过度活化为主要表现的免疫耐受缺陷在支气管哮喘(哮喘)的发病过程中起着重要的枢纽作用。近年来,Notch 信号通路在免疫细胞尤其是 T 细胞分化方面的作用颇受关注。有研究认为[1],Notch 信号是 T 细胞发育过程中的必需信号途径,Notch1/*Serrate*1 信号能使外周 T 细胞的分化向调节性 T 细胞(Tregs)方向偏移,从而诱导外周免疫耐受[2]。为了研究 Notch 信号通路在哮喘发病中的作用,我们将小鼠 *Serrate*1 基因转染至正常小鼠成熟 DCs,观察转染后 DCs 共刺激信号分子表达的改变和对 T 细胞增殖的影响,旨在探讨该两种信号通路在 T 细胞活化的作用方面是否存在关联。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与动物

pcDNA 3.1(+)-*Serrate*1 表达质粒由本室构建,rmGM-CSF、rmIL-4、T 细胞纯化柱购于 R&D 公司,RPMI1640 培养基购于 Hyclone 公司,G418、Lipofectamin 2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司,大鼠抗小鼠 *Srrate*1 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司,生物素化兔抗大鼠 IgG 购于武汉博士德公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)、丝裂霉素、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)均为 Sigma 公

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300148)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300148)

作者简介:孙 鲲(1975-),女,辽宁省大连市人,博士,主治医师,主要从事哮喘免疫学机制方面的研究。电话:(023)68755320

通讯作者:王长征,电话:(023)68774603

收稿日期:2005-04-15;**修回日期**:2005-06-26

司产品。

健康 BALB/c 小鼠，雌性，6～8 周龄，体质量 20.1～23.0 g，购于本校实验动物中心。

1.2　树突状细胞的转染与筛选

脱颈椎处死小鼠，无菌取双侧股骨和胫骨，按照文献[3]方法分离树突状细胞并于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养中，37 ℃，5% CO_2 条件下培养。将正常 DC 按 1×10^5/ml 浓度接种于 6 孔培养板中，每孔加 3 ml，待培养基变黄时更换培养基，每孔中加入 Opti 培养基 1 ml。

将 4 μl Lipofectamine 2000 用 100 μl 无血清的 Opti-MEM 培养基稀释，轻弹离心管壁混匀，室温下孵育 5 min。取 3 个离心管，各加入 100 μl 无血清 Opti-MEM 培养基，分别加入质粒 pcDNA 3.1(+)-*Serrate*1、pcDNA 3.1(+) 各 1.6 μg，轻弹管壁混匀。将 DNA 加入 Liopfectamine 2000 稀释液中，混匀，室温下孵育 20 min，使脂质体充分包裹 DNA。

将上述 DNA-脂质体混合物分别加入 12 孔细胞培养板中，轻摇培养板，使之充分混匀。37 ℃，5% CO_2 培养箱中孵育 6～12 h。弃培养液，换 RPMI 1640 继续培养 24 h。

24 h 后加入 G418（经不同浓度的 G418 作用于正常 DC，200 μg/ml 细胞 7～8 d 全部死亡，确定最终浓度为 200 μg/ml）进行筛选，定期更换培养液。在正常细胞 7～8 d 死亡后，继续对转染细胞进行筛选至 12～14 d，镜下可见存活细胞克隆，照相保存。

1.3　Western blot 检测

分别取 2×10^6 个转染 *Serrate*1 基因 DC 和未转染 DC，用细胞裂解液（50 mmol/L Tris，pH 8.0；0.15 mol/L NaCl；20 mmol/L EDTA；1% Triton X-100）裂解后行 7.5% 的 SDS-PAGE 电泳，转移电泳产物至 PVDF 膜（电压 20 V，转膜时间 90 min）。0.02% 的氨基黑中快速染色后用 TBST（10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0；150 mmol/L NaCl；0.05% Tween-20）洗涤 3 次，再用 5% 脱脂奶粉（TBST 中）封闭，洗涤后加入一抗（1∶500），内参照选用 Vinculin（MW 为 121×10^3，一抗为大鼠抗小鼠 Vinculin），各 5 ml，封口后 4 ℃ 过夜。0.05% Tween -20 TBS 洗膜后，加入二抗（1∶500），室温下摇动 1 h，洗涤后将膜置 DAB 显色液中显色，凝胶成像系统扫描存盘，测定条带的光密度（*D*）值，并进行条带的蛋白含量分析。

1.4　转染后的 DC 表面 CD80、CD86 等共刺激分子的表达

取 1×10^6 个转染 *Serrate*1 基因 DC 和未转染 DC，各加入 FITC-anti-mouse MHC-Ⅱ 0.5 μl、FITC-anti-mouse CD80 0.5 μl、PE-anti-mouse CD86 0.5 μl、FITC-anti-mouse CD11c 0.625 μl、FITC- anti-mouse CD40 0.5 μl、FITC- anti-mouse CD8a 1 μl，及相应的同型对照，4 ℃，避光 30 min。PBS 洗涤后流式细胞仪检测上述共刺激分子的表达。

1.5　转染后的 DC 对混合淋巴细胞反应的作用

T 细胞纯化柱分离正常小鼠脾脏 $CD4^+$ T 细胞，台盼蓝染色测得细胞活力 98% 以上，用 RPMI1640 培养基垂悬细胞，调细胞浓度为 2×10^6/ml。取 C_{57}BL/6J 小鼠脾细胞，以 ^{60}Co 20 Gy 灭活，作为刺激细胞。96 孔细胞培养板内每孔加 BALB/c 小鼠 T 细胞 1×10^5 个、灭活的 C_{57}BL/6J 小鼠脾细胞各 1×10^5 个，再分别加入 1×10^4 个转染 *Serrate*1 基因 DC 或未转染的 DC，终体积为 200 μl，每组设 3 复孔。置 37 ℃，5% CO_2 培养 96 h 后，MTT 法检测 T 细胞增殖活性。

1.6　统计学方法

采用 *t* 检验。

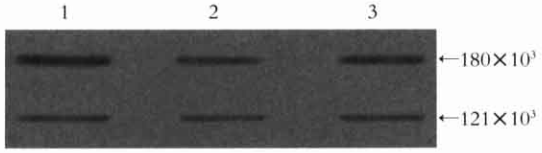
2　结果

2.1　G418 筛选基因转染细胞

pcDNA 3.1(+)-*Serrate*1 携带有 neo^r 基因，其表达产物磷酸转移酶可使 G418 失活。转染的细胞在用 G418 筛选时，由于导入了 pcDNA 3.1(+)-*Serrate*1 上的 neo^r 基因，获得了 G418 抗性而能够继续存活，未转染的细胞则被 G418 杀死。G418 筛选 2 周后，*Serrate*1 基因转染的细胞有抗性克隆的形成，周围其它细胞完全死亡。

2.2　Western blot 检测

*Serrate*1 基因转染组在分子质量为 180×10^3 处出现 1 条明显的着色带，其位置与 *Serrate*1 的分子质量一致，而空载体 pcDNA 3.1(+) 对照组与未转染对照组可见较基因转染组浅淡的着色带，印迹扫描灰度值约为正常 DC 的 3.2 倍，提示 *Serrate*1 基因转染的 DC 表达出更多 *Serrate*1 蛋白质（图 1）（121×10^3 为内参照条带）。



1：Serrate1 transfected DC；2：Non-transfected DC；3：Control

图 1　Western blot 法检测转染 DC *Serrate*1 蛋白的表达

Fig 1　Expression of *Serrate*1 protein in transfected DCs by Western blotting

2.3　转染后的 DC 表面 CD80、CD86 及 CD11c 的表达

与未转染组比较，转染 *Serrate*1 基因的 DC 表面 CD80、CD86、CD40、MHC-Ⅱ、CD11c、CD8a 等表型分子的表达无明显改变（$P>0.05$），空载体转染及转染前后上述表面分子的表达水平无明显改变（$P>0.05$）。见表 1。

表 1　转染 *Serrate*1 基因对小鼠 DC 表型分子表达的影响（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Effects of *Serrate*1 transfection on the expression of phenotype molecules of DCs in mice（$n=10$，$x\pm s$）

Group	Expression of phenotype molecule of DCs					
	CD80	CD86	MHC-II	CD40	CD11c	CD8α
Transfected DCs	82.43±6.52	88.19±7.06	79.84±7.35	73.11±6.24	86.41±7.11	14.24±1.01
Non-transfected DCs	80.92±9.05	85.58±8.74	80.23±8.83	69.85±4.92	81.06±6.78	16.52±1.77

2.4　转染的 DC 抑制混合淋巴细胞反应的作用

空载体 pcDNA 3.1(+) 转染对照组与未转染组的 *D*(570) 值无明显差异（$P>0.05$），该两组 *D*(570) 具有强烈的激发 T 细胞增殖的能力。而 pcDNA 3.1(+)-*Serrate*1 转染组与未转染组 DC 的培养体系比较，前者的 *D*(570) 值（24.13±5.62）明显低于后者（61.05±9.48）（$P<0.01$），说明 pcDNA 3.1(+)-

*Serrate*1 转染的 DC 对混合淋巴细胞反应中 T 淋巴细胞的增殖有抑制作用。

3 讨论

Notch 信号在幼稚 T 细胞向效应/记忆 T 细胞的分化过程中是成熟 T 细胞获得并保持效应功能的一个新的途径[4,5]。活化 $CD4^+$ T 细胞的效应功能和细胞因子的分泌在决定免疫应答和耐受中发挥了重要的作用。有研究表明,T 细胞表面的 Notch 受体与其配体结合可抑制免疫应答,影响 $CD4^+$ T 细胞增殖和分泌细胞因子,并诱导产生 Treg 细胞,Treg 细胞通过细胞-细胞接触、分泌 IL-10、TGF-β 等抑制性细胞因子来发挥其诱导并维持外周耐受的作用[6]。Vigouroux 等[7]应用超表达 Notch 配体 Jagged1 的 EBV-LCL 与自体 T 细胞共同培养,结果显示该细胞能抑制 T 细胞增殖,减低细胞毒性 T 细胞活性,并使 IL-10 的分泌明显增加。所以,超表达 Jagged1 的 APC 能诱导针对病毒抗原特异性的 Treg 细胞极化。

APC 为初始 $CD4^+$ T 细胞的分化所必需,$CD4^+$ T 细胞与 APC 通过粘附因子、TCR 与 MHC-II-肽复合物及共刺激信号分子结合而诱导活化和克隆增殖[8]。作为体内功能最强大的 APC,DC 能通过影响抗原特异性 T 细胞的分化来调控免疫应答的类型——免疫激活亦或是免疫耐受,该免疫调节作用主要取决于表面共刺激分子及其它一些信号分子的表达和细胞因子的分泌。一般认为,成熟 DC 诱导 T 细胞活化,这主要是因为成熟 DC 表面有高水平的能够活化 T 细胞的共刺激分子 CD80、CD86 和 MHC-Ⅱ类分子等表达,而未成熟 DC 却相反,上述分子在这些细胞的表达明显偏低,则诱导 T 细胞产生免疫耐受。未成熟 DC 诱导 T 细胞耐受的主要机制之一就是使抗原特异性 T 细胞向 Treg 细胞方向分化[9]。但是能使初始 T 细胞优先分化为 Treg 细胞而不是辅助性或记忆性 T 细胞的确切机制尚不清楚。

本实验探讨了 *Serrate*1 基因转染对 DC 的生物学特性的影响,结果显示,转染后 DC 表面 CD80、CD86、CD40、MHC-Ⅱ、CD11c、CD8a 等表面分子的表达与未转染及空载体转染组比较无明显改变,说明该基因的转染并未影响到 DC 表型的表达。CD86、CD80 和 MHC-Ⅱ类分子等都是活化 T 细胞的关键表面分子。CD86、CD80 是 DC 活化 T 细胞的重要共刺激信号。哮喘 DC 的共刺激信号表达过强是 Th1/Th2 偏移的重要因素。既然 *Serrate*1 基因的转染没有影响这些信号分子的表达,但却影响了 T 细胞的活化,说明 Notch 信号是抑制 T 细胞活化的独立调节机制。

我们还检测了转染 *Serrate*1 基因的 DC 在混合淋巴细胞反应中对 T 细胞增殖的作用。结果显示,与未转染 DC 相比,转染后 DC 能够抑制 T 细胞的增殖活性,说明转染 *Serrate*1 基因的 DC 发挥上述作用可能与 *Serrate*1 超表达有关,而并非通过改变 DC 表面共刺激分子的表达来实现。这也表明 Notch 信号通路和 DC 的共刺激信号通路具有各自的独立功能,二者之间可能没有相互的影响。*Serrate*1 超表达使得 Notch1 信号转导增强,一方面通过接触作用抑制 T 细胞的活化,使 T 细胞分泌细胞因子减少;另一方面可能通过促进抑制性细胞因子的分泌再次对 T 细胞的活化产生抑制,更重要的是促进 Treg 细胞的分化。Treg 细胞能作用于效应性 T 细胞,使其 Th1、Th2 类细胞因子的分泌减少,并恢复正常的平衡状态。但 IL-10 等细胞因子是否会反过来影响 T 细胞表面 Notch1 或 APC 表面 *Serrate*1 的表达尚不清楚,有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Benson R A, Adamson K, Corsin Jimenez M, *et al*. Notch1 co-localizes with CD4 on activated T cells and Notch signaling is required for IL-10 production[J]. Eur J Immunol, 2005, 35 (3): 859 - 869.

[2] Hoyne G F, Le Roux I, Corsin Jimenez M, *et al*. *Serrate*1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral $CD4^+$ T cells[J]. Int Immunol, 2000, 12(2): 177 - 185.

[3] Inaba K, Inaba M, Romani N, *et al*. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. J Exp Med, 1992, 176(6): 1693 - 1702.

[4] Costa R M, Drew C, Silva A J. Notch to remember[J]. Trends Neurosci, 2005, 28(8): 429 - 435.

[5] Tsukumo S, Yasutomo K. Notch governing mature T cell differentiation [J]. J Immunol, 2004, 173(12): 7109 - 7113.

[6] Piccirillo C A, Shevach E M. Naturally-occurring $CD4^+CD25^+$ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance [J]. Semin Immunol. 2004,16(2): 81 - 88.

[7] Vigouroux S, Yvon E, Wagner H J, *et al*. Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes[J]. J Virol, 2003, 77 (20): 10872 - 10880.

[8] Jin Y, Fuller L, Ciancio G, *et al*. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow[J]. Hum Immunol, 2004, 65(2): 93 - 103.

[9] Gad M, Kristensen N N, Kury E, *et al*. Characterization of T-regulatory cells, induced by immature dendritic cells, which inhibit enteroantigen-reactive colitis-inducing T-cell responses *in vitro* and *in vivo*[J]. Immunology, 2004, 113(4): 499 - 508.

(编辑 周 芳)