论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0384-03

转染 rhscIL-12 对人树突状细胞功能的影响

余佩武,赵永亮,王月禾,吴 森,饶 芸 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要: 目的 观察 rhscIL-12 基因转染的人树突状细胞(dendritic cells, DCs)功能的改变。**方法** 构建 rhscIL-12 和逆转录病毒载体的重组体,脂质体介导转染人外周血来源 DCs,以流式细胞仪分析细胞表型改变,ELISA 检测 IL-4、IL-12 和 IFN-γ 的水平。**结果** rhscIL-12 转染 DCs 后可进一步上调 DCs 表面分子的表达,IL-12 的分泌量明显提高;在混合淋巴细胞反应中,Th1 型细胞因子 IFN-γ 的水平明显上升,Th2 型细胞因子 IL-4 显著下降;随着 IL-12 的分泌量的增加, IFN -γ 含量明显增加,二者存在着显著正相关关系($r=0.955\ 678$, $P<0.01$)。**结论** rhscIL-12 体外转染 DCs 能上调 DCs 表面分子表达,诱导 Th0 向 Th1 分化,增强机体抗肿瘤免疫效应。

关键词: 树突状细胞; 白细胞介素 12; 基因转染; 功能

中图法分类号: R329.24; R392.11; R394 **文献标识码**: A

Effect of rhscIL-12 gene transfection on function of human dendritic cells

YU Pei-wu, ZHAO Yong-liang, WANG Yue-he, WU Miao, RAO Yun (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the function changes of human dendritic cells after rhscIL-12 gene transfection. **Methods** The recombinant of rhscIL-12 gene and retroviral vector were constructed and transfected into dendritic cells from human peripheral blood by lipofection. The phenotype changes of DCs were analyzed by fluorescence-activated cell sorter (FACS) and IL-4, IL-12 and IFN-γ levels were detected using ELASA. **Results** The expression of DCs surface molecules and IL-12 level were significantly increased after rhscIL-12 gene transfection into human dendritic cells. In the mixed lymphocyte reaction, the IFN-γ level increased and IL-4 decreased significantly. With the IL-12 level rising, the IFN-γ level increased significantly, suggesting a positve correlation between IL-12 and IFN-γ ($r=0.955\ 678$, $P<0.001$). **Conclusion** rhscIL-12 gene transfection into human DCs can upregulate the surface molecules, induce Th0 cells differentiate to Th1, and enhance the immune response to tumor.

Key words: dendritic cells; IL-12; gene transfection; function

树突状细胞(dendritic cells, DCs)因其在抗肿瘤免疫中的重要作用而成为恶性肿瘤生物治疗研究的热点。DCs 在抗肿瘤免疫反应中分泌大量白细胞介素-12(interleukin 12, IL-12)是 DCs 激发抗肿瘤免疫的主要机制之一[1]。如果将其基因导入 DCs 使其自行分泌,这样在免疫突触局部形成一个持续高浓度的分泌 IL-12 微环境,将有利于免疫反应的激发和维持,又可减少局部或全身直接应用 IL-12 的不良反应。由此,我们构建重组人单链白细胞介素-12(recombinant human single chain interleukin 12, rhscIL-12)的重组体,并将其导入 DCs,以期纠正异常或正向加强 DCs 的免疫功能。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

质粒提取试剂盒、脂质体转染试剂盒(Roche 公司),鼠抗人 HLA-DR-PE、CD80-PE、CD83-FITC 单克隆抗体(Immunotech, French),IL-4、GM-CSF(Promega, English),人 IFN-γ、IL-4、IL-12 ELISA 试剂盒(晶美生物公司)。

1.2 载体和细胞系

质粒 pUMVC3-hIL-12 由美国密歇根大学医学院 Mitsuhiro Takenoyama 教授惠赠,含位于 *Not* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切位点间的 2 247 bp 的 IL-12 的 cDNA 片段;pIRES-EGFP 质粒购于 clontech 公司;pLPSN 质粒由第三军医大学大坪医院野战外科研究所提供;PA317 细胞株由西南医院全军烧伤研究所提供。

1.3 质粒的提取、纯化、酶切、连接和转化

参照 Sambrook 等[2]的方法。

作者简介:余佩武(1961-),男,湖北省麻城市人,博士,主任医师,教授,主要从事胃肠道肿瘤的外科治疗及生物治疗方面的研究,发表论文 50 余篇。电话:(023)68754161

收稿日期:2005-07-11;修回日期:2005-09-20

1.4　pLPSN-rhscIL-12-IRES2-EGFP 逆转录病毒表达载体的构建[3,4]

将 pUMVC3-rhscIL-12 质粒与 pIRES-EGFP 质粒进行重组，再将重组的 rhscIL-12-IRES-EGFP 表达质粒和 pLPSN 表达质粒重组，通过 DNA/脂质体 DOSPER 转染病毒包装细胞系 PA317 细胞，经 G418 筛选获抗性克隆。

1.5　树突状细胞的体外诱导和培养

从人外周血中收集单个核细胞，调节细胞浓度为 10^6/ml，然后在 6 孔板上贴壁，2 h 后吸去悬浮的淋巴细胞，留下贴壁细胞并加入含 GM-CSF(100 ng/ ml)、IL-4(20 ng/ ml) 和 10 % 胎牛血清的 RPMI1640 培养液，在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。

1.6　rhscIL-12 基因转染

DCs 在培养第 7 天进行 DOSPER 脂质体介导的基因转染。DOSPER 与 DNA 之比为 4∶1，转染过程中继续加入上述细胞因子。转染共进行 8 ~ 8.5 h。此后，于培养的第 8 天、第 9 天再转染 2 次，每次 2 ~ 3 h。转染终止后加入含细胞因子的培养液继续培养。第 10 天加入终浓度为 8×10^5 U/L TNF-α，第 7、10、14、17 天分别收集细胞及其培养上清。

1.7　转染分组

用 RPMI1640 完全培养基处理的 DC 为 1640DC 组；用空载体转染的 DC 为 revDC 组；用 rhscIL-21 基因转染的 DC 为 rhscDC 组。

1.8　表型检测

流式细胞仪检测 CD83、CD80、HLA-DR 等表达。

1.9　rhscDCs 上清中 IL-12 检测

于转染第 7、10、14、17 天取上清，ELISA 测定其 IL-12 分泌。

1.10　混合淋巴细胞反应(mixed leukocyte reaction, MLR)

取健康人外周血 20 ml，淋巴细胞分离液密度梯度离心后获取单个核细胞层，37 ℃贴壁培养 1 h，收集悬浮的细胞为同种异体 T 细胞，于 96 孔板中加入 T 细胞 (2×10^5/孔)；收集不同组 DCs 用 1640 培养液调整浓度为 1×10^5 细胞/ml，加入丝裂霉素 C 25 μg/ml，37 ℃，温育 45 min，用 PBS 洗 2 次，分别取 200 μl 加入培养板，在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中共培养 5 d，收集其上清液，ELISA 法检测上清中 IL-4、IL-12、IFN-γ 的分泌水平。

1.11　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。IFN-γ 和 IL-12 的关系进行单因素线性相关分析。

2　结果

2.1　rhscIL-12 基因转染对 DCs 表型的影响

rhscIL-12 转染对 DCs 表型的影响主要表现在 HLA-DR 和共刺激分子 CD80 明显上调(表 1)，与对照组比较，有显著性差异($P < 0.01$)。

2.2　rhscDCs 分泌 IL-12 定量检测

以 ELISA 定量检测在培养第 7、10、14、17 天 1640DC、revDC 和 rhscDC 每 10^5 细胞、24 h IL-12 的分泌量，为减少外源性因素的干扰，在进行本次细胞培养时采用无血清培养基，结果表明，rhscDC 显著高于其他组别 DCs，统计学分析有显著差异(表 2)。

表 1　rhscIL-12 转染对 DCs 表型的影响 [($\bar{x} \pm s$) %]

组别	HLA-DR	CD80	CD83
1640DC	81.3 ± 1.5[a]	82.5 ± 1.0[a]	85.1 ± 5.5
rveDC	85.3 ± 4.8[a]	80.6 ± 4.8[a]	77.2 ± 2.9
rhscDC	92.9 ± 5.5	94.2 ± 4.8	86.3 ± 2.7

a：$P < 0.01$，与 rhscDC 组比较

表 2　各组 DCs 不同时相 IL-12 表达定量比较(ng/L，$\bar{x} \pm s$)

组别	7 d	10 d	14 d	17 d
1640DC	81.7 ± 3.6	98.8 ± 5.0[a]	137.4 ± 4.5[b]	85.1 ± 2.6[a]
revDC	59.4 ± 2.7	31.5 ± 2.8[a]	137.2 ± 3.2[b]	97.1 ± 2.1[a]
rhscDC	66.4 ± 2.3	541.3 ± 50.8	867.3 ± 21.0	614.5 ± 15.6

a：$P < 0.01$，b：$P < 0.05$，与 rhscDC 组比较

2.3　混合淋巴细胞反应中 IL-4、IL-12 和 IFN-γ 含量检测

ELISA 检测 MLR 上清中 IL-4、IL-12 和 IFN -γ 的分泌量(表 3)，结果显示 rhscDC 组 IL-4 的分泌量显著低于 1640DC 和 revDC 组，而 IL-12 和 IFN -γ 的分泌量显著高于 1640DC 和 revDC 组，随着 IL-12 的分泌量的增加，上清液中 IFN -γ 含量明显增加，二者存在着显著正相关关系($r = 0.955\ 678$，$P < 0.01$)。

表 3　混合淋巴细胞反应中细胞因子的检测(ng/L，$\bar{x} \pm s$)

组别	IFN-γ	IL-12	IL-4
1640DC	248 ± 32.5[a]	280 ± 41.8[a]	620 ± 20.6[a]
revDC	269 ± 15.3[a]	300 ± 36.7[a]	590 ± 10.3[a]
rhscDC	1 293 ± 73.6	960 ± 56.3	170 ± 12.3

a：$P < 0.01$，与 rhscDC 组比较

3　讨论

DCs 是目前已知功能最强的抗原提呈细胞，具有强大的免疫刺激功能。DCs 通过细胞表面高表达 MHC Ⅰ、Ⅱ类分子及共刺激分子，促进 T 细胞的有效激活，主导了 Th1 型的应答，诱导特异性的 CTL 从而利于肿瘤的清除。

在抗肿瘤细胞免疫反应中，CTL 是主要效应细胞，是细胞免疫反应的执行者，但辅助性 T 细胞(Th)也发挥重要作用，影响机体免疫反应发展方向，而 IL-12 是功能最强 Th 分化的免疫佐剂，这一点在天然 IL-12 已被证实。IL-12 主要来源于 DCs 的分泌，其分泌量受 DCs 的成熟状态及某些刺激信号的影响。在机体生理条件下，DCs 通过局部分泌产生 IL-12 促进 Th1 淋巴细胞增殖、分化，诱导产生 IFN-γ，在体液抗肿瘤免疫方面发挥重要的作用。同时这些因子又能以一种正反馈旁分泌的方式活化 DCs，上调其 CD80、CD86 等多种共刺激因子的表达，从而增强 DCs 呈递抗原、活化 T 淋巴细胞产生抗原特异性免疫应答的能力[5,6]。然而在肿瘤发生过程中，DCs 的功能受到抑制，表面分子的

表达降低，其自然分泌的 IL-12 不能有效拮抗其微环境中 IL-4 和 IL-10 的作用，致使 Th1 的发育受到一定的阻碍。

将 rhscIL-12 基因转染 DCs 后，实验结果显示，DCs 表面分子的表达明显提高，从而在免疫突触局部放大初始免疫信号；IL-12 的分泌量明显提高，表明 rhscIL-12 基因转染 DCs 后能更加有效地激活 T 细胞。在混合淋巴细胞反应中，rhscDC 组 T 细胞分泌的 Th1 型细胞因子 IFN-γ 的水平明显上升，Th2 型细胞因子 IL-4 显著下降，提示 IL-12 转染的 DCs 可向着有利于 Th1 细胞分化的方向发育，抑制向 Th2 分化，从而启动细胞性免疫应答。由于大多数肿瘤患者的 Th1 反应明显降低，因此 rhscIL-12 转染 DCs 可纠正上述偏移[7]。实验结果表明 IL-12 基因转染 DCs 的生物佐剂效应较单纯 DCs 更强，在其装载肿瘤相关的抗原后，可能成为一种值得探索的抗肿瘤治疗性疫苗。

参考文献：

[1] SNIJDERS A, KALINSKI P, HILKENS C M, *et al*. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals[J]. Int Immunol, 1998, 10(11): 1593-1598.

[2] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MINSTI T. Molecular cloning - a laboratory manul [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

[3] WILLETT B J, CANNON C A, HOSIE M J, *et al*. Upregulation of surface feline CXCR4 expression following ectopic expression of CCR5: implications for studies of the cell tropism of feline immunodeficiency virus[J]. J Virol, 1995, 76(18): 9242-9252.

[4] SOIFER H, HIGO C, LOGG C R, *et al*. A novel, helper-dependent, adenovirus-retrovirus hybrid vector: stable transduction by a two-stage mechanism[J]. Mol Ther, 2002, 5(5 Pt 1): 599-608.

[5] MAZZOLINI G, ALFARO C, SANGRO B, *et al*. Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(5): 999-1010.

[6] Kalady M F, Onaitis M W, Emani S, *et al*. Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity[J]. J Surg Res, 2004, 116(1): 24-31.

[7] SUZUKI T, FUKUHARA T, TANAKA M, *et al*. Vaccination of dendritic cells loaded with interleukin-12-secreting cancer cells augments *in vivo* antitumor immunity: characteristics of syngeneic and allogeneic antigen-presenting cell cancer hybrid cells[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(1): 58-66.

（编辑 陈聪连）

（上接 383 页）

胀，管腔缩小，并伴有部分肾小管上皮细胞坏死及凋亡；20 周时肿胀的小管上皮细胞逐渐缩小，部分远曲小管出现扩张，个别肾小管萎缩，但未见间质出现纤维化；24 周时可见较多肾小管出现萎缩，肾间质出现多灶性纤维化

2.2 马兜铃酸诱导的大鼠肾组织中蛋白质差异表达

根据马兜铃酸处理大鼠不同时间肾组织病理改变的结果提示，12 周开始肾脏出现早期的病变，因此本研究取 12 周时的肾组织进行双向电泳，得到了 2-DE 图谱，并对图谱上的蛋白质点进行定性和定量分析。分析结果显示正常组和马兜铃酸肾病模型组的匹配率为 83.4%，有大量蛋白质点相对含量增加或降低，或新出现，其中 87 个蛋白质点在模型组比正常组上调 2 倍，18 个蛋白质点上调 5 倍以上，73 个蛋白质点下调 2 倍。部分表达差异的蛋白点中蛋白质点 1 271、1 823 和 2 621 在正常组弱表达，而在模型组高表达；蛋白质点 1 567 和 1 789 在正常组中无表达，而在模型组出现表达；蛋白质点 1 398 在模型组中表达低于正常组

3 讨论

马兜铃酸肾病是我国慢性肾小管-间质疾病的常见病因[1]，由于目前尚无有效的治疗方法，病人很快或逐渐进入终末期肾衰[2]，因此，如何寻找出马兜铃酸导致肾脏损害的始动分子，进而早期诊断和早期治疗（在蛋白质或基因水平进行干预和阻断）将是解决马兜铃酸肾损害的关键，也正是我们的研究目标。

在本研究中利用双向电泳系统，对马兜铃酸诱导肾间质纤维化早期（12 周）大鼠模型的肾组织和正常大鼠肾组织进行蛋白差异展示，并用分析软件进行分析，结果显示双向电泳图谱的匹配率可达 83.4%，同时可见一些明显差异的蛋白质点，提示这些差异表达的蛋白质可能参与马兜铃酸致肾损害早期过程的毒性作用，可能成为马兜铃酸导致肾纤维化的始动分子。我们还需对这些差异蛋白质分子进行质谱鉴定及进一步的功能研究，才能寻找出真正介导马兜铃酸毒性作用的蛋白质分子

关键词：马兜铃酸；肾脏；双向聚丙烯酰胺凝胶电泳；差异蛋白质

中图法分类号：R692.02 文献标识码：B

参考文献：

[1] 高艳丽，梁晓萍，崔鸿瑞，等. 慢性马兜铃酸肾病肾间质纤维化发病机制的初步探讨[J]. 中华肾脏病杂志，2005，21(1)：31-35.

[2] 刘志红，黎磊石. 马兜铃酸肾病：一个亟被认识但未解决的问题[J]. 2003，12(6)：501-503.

[3] 邓法山，张晓明，黄庆元，等. 慢性马兜铃酸肾病动物模型的建立及其意义[J]. 中华医学杂志，2001，81(18)：1095-1100.

[4] 吴 杰，陈香美，柳锡柱. 急慢性马兜铃酸肾病的临床病理特点及其病理机制[J]. 中华检验医学杂志，2005，28(6)：587-590.

[5] 陈 文，梁晓萍，李 安，等. 马兜铃酸肾病的临床与病理表现[J]. 中华医学杂志，2001，81(18)：1101-1105.

（编辑 汪勤俭）