文章编号:1000-5404(2006)05-0411-03

论著

反义 B7-H1 对人树突状细胞生物学特性的影响研究

吴 淼,余佩武,曾冬竹,王自强,赵永亮,雷 晓,朱自满 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 研究反义 B7-H1 基因转染对人树突状细胞(dendritic cells,DCs)生物学特性的影响。**方法** 以稳定表达反义 B7-H1 的重组腺病毒 Ad. ASB7-H1 转染 DCs,转染后 1、3、5、7 及 9 d 以流式细胞术检测转染 DCs 表面 B7-H1、CD1、CD14、D80、CD83 及 HLA-DR 的表达,ELISA 技术检测 Ad. ASB7-H1 转染 DCs 培养上清中 IL-12 的水平,^{3}H-TdR 掺入法检测 Ad. ASB7-H1 转染 DCs 诱导的 T 淋巴细胞增殖能力。**结果** 反义 B7-H1 转染 DCs 后可明显抑制细胞表面 B7-H1 表达,其抑制效应在转染后 24 h 即开始出现。对 DCs 其他粘附分子表型表达无明显影响。Ad. ASB7-H1 转染 DCs 刺激同种异体混合淋巴细胞反应能力增强;Ad. ASB7-H1 转染 DCs 分泌 IL-12 能力提高。**结论** Ad. ASB7-H1 转染可抑制 DCsB7-H1 的表达并使 DCs 生物学行为发生改变,反义 B7-H1 可能成为提高 DCs 疫苗生物学效能的一个潜在靶点。

关键词: 反义 B7-H1; 树突状细胞;生物特性
中图法分类号: R329.24; R341.6; R394.3 **文献标识码:** A

Influence on biological characteristics of dendritic cells by transfecting B7-H1 antisense gene

WU Miao, YU Pei-wu, ZENG Dong-zhu, WANG Zi-qiang, ZHAO Yong-liang, LEI Xiao, ZHU Zi-man (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of B7-H1 antisense gene transfection on the biological characteristics of dendritic cells (DCs) in human. **Methods** Human DCs were transfected with Ad. ASB7-H1 or Ad. LzcZ as positive control, and the untreated DCs served as normal control. Then the phenotypes of DCs, transfected with Ad. ASB7-H1 or Ad. LzcZ or normal, were detected of B7-H1, CD1, CD14, D80, CD83 and HLA-DR, with flow cytometry on post-transfection day 1, 3, 5, 7, 9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect IL-12 level of supernatant, ^{3}H-TdR to detect the capacity of the DCs transfected of Ad. ASB7-H1 to activate T lymphocyte proliferation. **Results** The expression level of B7-H1 on transfected DCs was inhibited from 24 h after transfection, but the expression levels of CD1, CD14, D80, CD83 and HLA-DR were not significantly changed. Ad. ASB7-H1 transfection significantly increased the potency of secretion of IL-12 by transfected DCs and enhanced the ability of DCs to stimulate T cell proliferation. **Conclusion** DCs transfected by Ad. ASB7-H1 can inhibit B7-H1 expression and the biological characteristics of transfected DCs changed correspondingly. B7-H1 may be a promising target for improving the biological effects of DCs vaccine.

Key words: antisense B7-H1; dendritic cells; biological characteristics

B7-H1 是表达于多种肿瘤细胞表面的一种糖蛋白,当与其受体 PD-1 结合后可传递一种 T 细胞抑制性调节信号,并被认为与肿瘤的免疫逃逸相关[1]。树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为机体内专职的抗原提呈细胞,在机体抗肿瘤免疫反应中起作枢纽作用,而新近研究表明在 DCs 尤其是在成熟 DCs 上也有高水平 B7-H1 表达[2],故明确 DCs 表面 B7-H1 DCs 的高表达对 DCs 功能的发挥将产生何种影响,对为基础肿瘤防治研究无疑具有重要意义。为此,本研究利用我们构建的稳定表达反义 B7-H1 的重组腺病毒 Ad. ASB7-H1 转染 DCs,研究 DCs 表面 B7-H1 的表达对 DCs 生物学特性的影响,旨在探索以 B7-H1 为靶点,提高 DCs 为基础的肿瘤生物治疗的效率的可行性。

作者简介:吴 淼(1969-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事微创技术在腹部肿瘤外科治疗中的应用研究和肿瘤生物治疗方面的研究。发表论文 6 篇,现在解放军第 180 医院普通外科。电话:(023)68765267, E-mail: wumiao-@163.com
通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@sina.com
收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-09-10

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清(Hyclone, USA),DMEM(高糖型)(Gibco,USA)。rhIL-2、rhIL-4 及 rhGM-CSF(Promega, USA),rhTNF-α(Sigma, USA),3H-TdR(1 mCi/ml)(中国同位素公司北京原子能研究所),鼠抗人 HLA-DR、CD1a、CD83、CD14 及 B7-H1 单克隆抗体(Gibco,USA),流式细胞仪(Beckman coulter,USA)。Ad. LacZ、Ad. ASB7-H1 分别为携带 β 半乳糖苷酶基因和反义 B7-H1 基因的复制缺陷型腺病毒,滴度约 6.5×10^{10} pfu/ml[3]。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 A 组:100 MOI Ad. ASB7-H1 转染组。B 组:100 MOI Ad. LacZ 转染组。C 组:未转染正常 DCs 组。

1.2.2 Ad. ASB7-H1 转染 DCs 分离 PBMCs 加入培养板中,加 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清),加入 rhGM-CSF、rhIL-4 使其终浓度分别为 100 ng/ml、50 ng/ml,37 ℃、5% CO2 培养,24 h 后,吸去培养液,用 Ad. ASB7-H1 和 Ad. LacZ 按 MOI 100 转染诱导培养中的 DCs,以刚好淹没细胞为度,37 ℃、5% CO_2 孵育 1 h 后,去除去病毒液,加入终浓度为 rhGM-CSF 100 ng/ml、rhIL-4 50 ng/ml 的培养液继续培养。

1.2.3 DCs 培养及 Ad. ASB7-H1 转染 DCs 前后 DCs 表型的变化 转染后第 1、3、5、7 及 9 天共 5 个时相点以流式细胞仪检测 B7-H1 表达的变化,在 DCs 诱导培养和转染后第 3、5、7 及 9 天分别检测 CD1、CD14、D80、CD83 及 HLA-DR 表达情况。实验参照文献[4]进行。

1.2.4 ELISA 技术检测 Ad. ASB7-H1 转染 DCs 分泌 IL-12 能力 实验准备及操作步骤按照试剂盒说明进行。以标准品浓度作横坐标,D 值作纵坐标绘制标准曲线,通过标本的 D 值在标准曲线上查出其浓度。

1.2.5 ^{3}H-TdR 掺入法检测 Ad. ASB7-H1 转染 DCs 诱导的混合淋巴细胞反应 培养第 7 天收集各组 DCs 用 DMEM 培养基调整浓度为 1×10^6 细胞/ml,加入丝裂霉素 25 μg/ml,37 ℃,温育 45 min,用 PBS 洗 2 次。然后根据文献[5]所述方法进行混合淋巴细胞反应。同时以培养基作为 DCs 的阴性对照。

1.3 统计学分析

所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;采用 SPSS 10.0 进行 t 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 Ad. ASB7-H1 转染对 DCs B7-H1 的表达的影响

反义 B7-H1 转染后 1、3、5、7、9 d 共 5 个时相点以流式细胞仪检测 B7-H1 表达的变化,与 Ad. LacZ 转染对照组(B 组)和未转染组(C 组)相比较,DCs 表面 B7-H1 分子表达被抑制,转染后 1 d 即开始出现 B7-H1 表达抑制现象,转染后第 3 天表现出显著性差异($P<0.05$),第 5、7、9 天差异非常显著($P<0.01$),见表 1。

2.2 Ad. ASB7-H1 转染对 DCs 表型的影响

在诱导 DCs 的过程中,细胞表面 CD1a、CD80、CD83 及 HLA-DR 的表达量进行性升高,CD14 表达量则进行性下降;在诱导培养 6~8 d,上述变化分别呈现出类似"S"型变化。在转染后第 3、5、7、9 d 检测 DCs 表面 CD1、CD14、D80、CD83 及 HLA-DR 的表达情况,发现与未转染正常 DCs 比较,Ad. ASB7-H1 转染对 DCs 表面表达上述粘附分子无显著影响($P>0.05$),见表 2、3。

表 1 Ad. ASB7-H1 转染 DCs 后 DCs 表面 B7-H1 表达检测[($\bar{x}\pm s$)%]

组别	时间(d)					
	0	1	3	5	7	9
A 组	28.24±2.06	39.47±2.13	44.64±2.86	46.34±3.08	47.29±3.44	46.73±3.36
B 组	28.24±2.06	43.96±4.68	59.69±6.03[a]	81.47±6.95[b]	86.84±7.83[b]	89.72±7.68[b]
C 组	28.24±2.06	46.35±4.16	60.55±5.64[a]	80.62±5.84[b]	88.34±6.35[b]	91.25±6.87[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 A 组比较

表 2 正常 DCs 表型表达变化[($\bar{x}\pm s$)%]

时间	表型				
	CD1a	CD14	D80	CD83	HLA-DR
4 d	16.13±1.36	75.17±7.12	15.89±1.20	14.65±1.46	16.13±1.07
6 d	31.28±2.57	42.62±3.57	26.34±3.89	22.73±3.40	22.17±2.46
8 d	72.94±5.78	18.87±2.13	69.57±5.13	71.08±6.16	68.59±5.71

表 3 Ad. ASB7-H1 转染 DCs 后 DCs 表型的变化[($\bar{x}\pm s$)%]

时间	表型				
	CD1a	CD14	D80	CD83	HLA-DR
3 d	17.22±1.54	76.26±6.53	13.92±1.06	15.74±1.55	17.22±1.36
5 d	33.65±3.84	41.89±4.84	27.61±3.56	27.03±2.95	26.44±2.19
7 d	70.67±6.41	18.15±2.02	71.29±6.64	72.47±6.66	71.37±6.44
9 d	76.53±732	8.49±1.08	76.45±6.78	71.81±6.56	77.75±6.76

2.3 Ad. ASB7-H1 修饰的 DCs 培养上清中 IL-12 检测

Ad. ASB7-H1 转染组(A 组)培养上清中 IL-12 的含量显著增加,且明显高于 Ad. LacZ 转染对照组(B 组)和未转染组(C 组),差异显著($P<0.05$),在第 8 天时的分泌量明显高于第 5 天($P<0.05$),Ad. LacZ 转染对照组(B 组)和未转染组(C 组)DCs 之间组差异不显著($P>0.05$),见表 4。

表 4 各组 DCs 培养上清中不同时相 IL-12 含量(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

时间	A 组	B 组	C 组
5 d	440.0±25.0	298.3±13.1[a]	312.5±18.6[a]
8 d	788.3±43.7	531.3±35.9[a]	571.9±27.3[a]

a: $P<0.05$, 与 A 组比较

2.4 Ad. ASB7-H1 修饰的 DCs 诱导的同种混合淋巴细胞反应

ASB7-H1 转染 DCs 在体外刺激 T 淋巴细胞增殖结果显示,Ad. ASB7-H1 转染组转染组(A 组)刺激 T 淋巴细胞增殖的能力较 Ad. LacZ 转染对照组(B 组)和未转染组(C 组)DCs 强,差异有显著性($P<0.05$)。

3 讨论

B7-H1 是近年来发现的一种细胞表面糖蛋白,属于 B7 共刺激家族成员。研究表明 B7-H1 与其受体 PD-1 结合后可传递一种 T 细胞抑制性调节信号,肿瘤细胞过渡表达 B7-H1 将导致机体抗瘤免疫障碍,被认

为与肿瘤的免疫逃逸相关[6]。新近研究表明在 DCs 尤其是在成熟 DCs 上也有高水平 B7-H1 表达。本研究利用我们构建的稳定表达反义 B7-H1 的重组腺病毒 Ad. ASB7-H1 转染 DCs，探讨 DCs 表面 B7-H1 的表达对 DCs 生物学特性的影响，旨在为进一步探讨 B7-H1 靶点在以树突状细胞为基础的肿瘤免疫中的作用奠定一定基础。

Ad. ASB7-H1 转染 DCs 后经流式细胞仪检测 B7-H1 表达的变化，显示 DCs 表面 B7-H1 分子表达被抑制，这种抑制现象在转染后 1 d 即开始出现，第 3 天有显著性差异（$P<0.05$），第 5、7、9 天差异非常显著（$P<0.01$）。而 Ad. ASB7-H1 转染对 DCs 后 CD1、CD14、D80、CD83 及 HLA-DR 等粘附分子的表达无明显影响。提示反义 B7-H1 能够有效的抑制人 DCs 细胞内 B7-H1 基因的表达，同时不干扰与 DCs 功能发挥有重要作用的粘附分子等重要基因的功能。说明 Ad. ASB7-H1 在 DCs 中发挥作用具有相当的特异性，与文献[7]报道相符合。

IL-12 主要来源于 DCs、巨噬细胞等 APCs，DCs 分泌 IL-12 的能力是评价 DCs 功能状态的重要指标。我们的实验结果显示反义 B7-H1 修饰 DCs 后，不仅能诱导 DCs 产生 IL-12，而且其 DCs 分泌 IL-12 的水平较非转染及转染对照组明显增高。究其原因，我们认为 B7-H1 可能传递了抑制 IL-12 相关基因表达的负性调节信息，而 B7-H1 反义 RNA 可有效的阻滞该信号通路，提高 DCs 分泌 IL-12 的能力。IL-12R（CD25）主要表达于活化的 T 细胞、静息或活化的 NK 细胞，IL-12 具有促进 T 细胞增殖和 IFN-γ、TNF-β 等细胞因子分泌的作用，同时其在 T 细胞发育中的 Th1/Th2 漂移中具有重要作用，其诱导 T 细胞 Th1 分化[8,9]。肿瘤因局部微环境 IL-12 异常，Th1/ Th2 分化就向 Th2 发生偏移，IFN-γ 分泌减少，使机体免疫监视能力降低，可能是机体异质化细胞得以逃遁、成瘤、转移和复发的主要原因之一[10]。因此，我们认为反义 B7-H1 修饰 DCs 后可增强 DCs 免疫调节功能，对 Th1 细胞介导的抗肿瘤免疫具有促进作用。

DCs 是体内功能最强的 APCs，不仅能原位致敏 T 淋巴细胞，而且在体外可有效地诱导同种异体 T 淋巴细胞活化增殖[10]，促进 T 细胞分泌 IL-2、IFN-γ 等细胞因子，通过自分泌作用进一步促进 T 细胞的增殖。DCs 因此被认为是刺激 T 淋巴细胞增殖重要的细胞，DCs 刺激同种 T 淋巴细胞增殖的效应，也是衡量其自身免疫刺激效应的客观尺度之一[11]。本组实验结果显示，无论是 Ad. ASB7-H1 转染组还是非转染 DCs 组都显示了较强的刺激 T 细胞增殖的效应。但是反义 B7-H1 修饰 DCs 组（转染组）较未转染组具有更强的刺激 T 细胞增殖效应。究其原因，一方面可能与 B7-H1 反义 RNA 修饰 DCs 后 IL-12 分泌增加有关，在 IL-12 作用下 T 细胞增殖、活化，产生 IFN-γ、IL-2 及 TNF-β 等细胞因子，形成刺激 T 细胞增殖的正反馈环路[12]。另外，反义 B7-H1 还可能阻滞了通过 B7-H1 途径向 DCs 内传递的抵消协刺激分子 B7-1、B7-1 刺激性信号的负性调节因素，因而表现出具备更高免疫刺激活性的特征。

综上所述，反义 B7-H1 修饰 DCs，DCs 的生物学特性发生了明显的变化。可明显抑制 DCs 表面 B7-H1 的表达，对 DCs 其他表型无明显影响，同时可提高 DCs 分泌 IL-12 和刺激同种异体 T 细胞增殖的能力，增强 DCs 的免疫调节功能。B7-H1 靶点可能是以 DCs 为基础的抗瘤生物治疗的一个潜在的靶点。

参考文献：

[1] TAMURA H, OGATA K, DONG H, *et al*. Immunology of B7-H1 and its roles in human diseases[J]. Int J Hematol, 2003, 78(4): 321 - 328.

[2] MAZANET M M, HUGHES C C. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis [J]. J Immunol, 2002, 169(7): 3581 - 3588.

[3] 吴　森，余佩武，王自强，等. 反义 B7-H1 位置特异性腺病毒载体的构建与鉴定[J]. 第三军医大学学报，2006，28(5)：387 - 390.

[4] 张　坤，余佩武，高朋芬，等. 胃癌患者外周血 DCs 细胞表型变化研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(13)：1207 - 1209.

[5] 易善红，宋　波，汪泽厚，等. HLA 衍生肽对大鼠脾细胞增殖功能及 HO-1 活性的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(4)：314 - 316.

[6] THOMPSON R H, GILLETT M D, CHEVILLE J C, *et al*. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(49): 17174 - 17179.

[7] STAHEL R A, ZANGEMEISTER-WITTKE U. Antisense oligonucleotides for cancer therapy—an overview [J]. Lung Cancer, 2003, 41 (Suppl 1): S81 - S88.

[8] 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.

[9] OSAKI T, HASHIMOTO W, GAMBOTTO A, *et al*. Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18) [J]. Gene Ther, 1999, 6(5): 808 - 815.

[10] TRINCHIERI G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes[J]. Blood, 1994, 84(12): 4008 - 4027.

[11] PETTIT S J, NEAL D E, KIRBY J A. Evaluation of dendritic cell immunogenicity after activation and chemical fixation: a mixed lymphocyte reaction model [J]. J Immunother, 2002, 25(2): 152 - 161.

[12] HEUFLER C, KOCH F, STANZL U, *et al*. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells[J]. Eur J Immunol, 2001, 26(3): 659 - 668.

（编辑　陈聪连）