文章编号:1000-5404(2010)12-1257-04

论著

RNA 干扰 DC-SIGN 表达对树突状细胞成熟及功能的影响

王建军,郭述良,李 兰,邬亭亭 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 研究慢病毒介导 RNA 干扰树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3 结合非整合素因子(DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin,DC-SIGN)分子表达及干扰后对树突状细胞(dendritic cells,DCs)成熟度及功能的影响。**方法** 分离健康人外周血单核细胞,用 GM-CSF 和 IL-4 刺激诱导 DCs。培养第 4 天分 3 组:RNA 干扰组、阴性对照组和空白对照组,按实验设计加入病毒共孵育 12 h 后换液,继续培养 60 h 后用荧光显微镜观察转染效率及荧光强度,培养第 6 天加 LPS 刺激成熟。第 7 天收集细胞用 RT-PCR 检测 DC-SIGN mRNA 水平,Western blot 检测 DCs 总 DC-SIGN 蛋白表达水平,流式细胞仪检测 DCs 表面 DC-SIGN 水平,ELISA 检测 DCs 培养上清液中 IL-12、IL-10 水平,混合淋巴细胞反应检测 DCs 对 $CD4^+$T 淋巴细胞刺激增殖能力的影响。**结果** ①荧光显微镜显示感染复数(MOI)为 20 时,DCs 感染病毒的效率达 85%。②RT-PCR 证实 RNA 干扰后 DC-SIGN mRNA 表达水平(0.252 5 ±0.139 6)显著低于另 2 组(0.572 2 ±0.190 9、0.548 7 ±0.119 3),差异有统计学意义($F=8.142$,$P<0.05$)。③Western blot 检测干扰组 DCs 内总 DC-SIGN 水平(0.323 7 ±0.057 0)显著低于另 2 组(0.590 ±0.014、0.578 ±0.023),差异有统计学意义($F=51.376$,$P<0.05$)。④流式细胞仪检测干扰组 DCs 表面表达 DC-SIGN 水平[(43.10 ±10.12)%]显著低于另 2 组[(73.05 ±8.11)%、(74.49 ±5.56)%],差异有统计学意义($F=14.19$,$P<0.05$)。⑤各组间成熟标志物 HLA-DR 及 CD86 差异无统计学意义($P>0.05$)。⑥ELISA 结果显示各组 DCs 培养上清液中 IL-10、IL-12 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。⑦混合淋巴细胞反应结果显示各组 DCs 诱导 $CD4^+$T 淋巴细胞增殖能力差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 慢病毒介导的 RNA 干扰能有效抑制 DCs 表面 DC-SIGN 分子表达,抑制 DC-SIGN 表达对 DCs 成熟度及 DCs 功能无影响。

[关键词] 树突细胞;慢病毒属;RNA 干扰;细胞黏附分子;T 淋巴细胞;抗原, CD4
[中图法分类号] R392.2; R338.12; R349.2 **[文献标志码]** A

Effect of RNAi-mediated silencing of DC-SIGN on maturity and functions of human dentritic cells *in vitro*

Wang Jianjun, Guo Shuliang, Li Lan, Wu Tingting (Department of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Lentivirus-mediated RNA interference (RNAi) of dendritic cells-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN) gene on the maturity and function of human DC cells. **Methods** The peripheral blood mononuclear cells were obtained from healthy individuals, and then cultured in medium with GM-CSF and IL-4. Four days later, the cells were divided into RNAi group, negative control group and blank group. The culture medium was discharged 12 h after corresponding treatment. The infection efficiency and fluorescence intensity was calculated and observed with fluorescence microscopy in 60 h later. On the 6th day after culture, LPS was added to stimulate DCs to mature, and then on the next day, the cells were collected for the detection of DC-SIGN mRNA by RT-PCR and protein by Western blot analysis. The level of DC-SIGN on the surface of DCs was detected by flow cytometry. The levels of IL-12 and IL-10 in the supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Proliferation induction of DCs to $CD4^+$T lymphocytes was measured by mixed lymphocyte reaction (MLR). **Results** The efficiency of infection of DCs was 85% when multiplicity of infection (MOI) was 20. The expression of DC-SIGN mRNA was much lower in RNAi group (0.252 5 ±0.139 6) than in the other 2 groups (0.572 2 ±0.190 9 and 0.548 7 ±0.119 3) ($F=8.142$, $P<0.04$). Western blot analysis showed that the protein level of DC-SIGN were 0.323 7 ±0.057 0

[基金项目] 国家自然科学基金(30571653);重庆市卫生局资助项目(05-2-113)
[通信作者] 郭述良, E-mail:GUOSL999@sina.com

in RNAi group, which was significantly lower than the other 2 groups (0.590 ± 0.014, 0.578 ± 0.023, F = 51.376, P < 0.05). The expression of DC-SIGN on the surface of DCs was lower in RNAi group [(43.10 ± 10.12)%] than in the other 2 groups [(73.05 ± 8.11)%, (74.49 ± 5.56)%, F = 14.19, P < 0.05]. Expressions of HLA-DR and CD86 on DCs were not statistically significant among the 3 groups (P > 0.05). IL-10 and IL-12 levels in the supernatant were not statistically significant among the 3 groups (P > 0.05). MLR showed the potency of proliferation induction of DCs to T lymphocytes was not statistically significant among the 3 groups (P > 0.05). **Conclusion** Lentivirus-mediated RNAi of DC-SIGN gene suppresses the gene expression on the surface of DCs effectively, but had no effect on the maturity and functions of DCs.

[Key words] dendritic cells; Lentivirus; RNA interference; cell adhesion molecules; T lymphocytes; antigens, CD4

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571653) and the Science Research Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (05-2-113). Corresponding author: Guo Shuliang, E-mail: GUOSL999@sina.com

树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3结合非整合素因子(DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin, DC-SIGN)是C型凝集素受体,在递呈内化抗原,激活初始T淋巴细胞启动下游免疫等方面起着重要作用,是结核病防御的新靶标[1,2]。结核分枝杆菌通过自身毒力成分与DC-SIGN结合,诱导DCs处于失能的半成熟状态,影响下游抗结核免疫应答。体内研究[1,2]显示用外周血单核细胞诱导的DCs表达DC-SIGN水平增高者更易感结核分枝杆菌。而用单抗封闭DC-SIGN能恢复宿主抗结核免疫应答[1]。但由于单抗费用昂贵,限制了其在临床免疫治疗中的应用。

慢病毒载体介导的RNA干扰能将自身携带片断整合入宿主细胞基因组,在哺乳动物各类细胞稳定表达的小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA),长期稳定抑制基因表达[3]。已有研究使用慢病毒载体转染DCs前体细胞下调DC-SIGN表达,从而抑制HIV从DCs向T细胞播散[4]。单纯下调DC-SIGN并不影响DCs的生长及成熟特性[4,5]。为此,我们使用慢病毒载体介导的RNA干扰DC-SIGN表达,使其获得长期沉默效应,并检测DC-SIGN下调后是否会对DCs的成熟度及功能有影响,为研究DC-SIGN在结核病发病机制中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人外周血标本 取自第三军医大学西南医院血库分离的白膜,HBsAg阴性,HIV抗体阴性,志愿者均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、重组人白细胞介素4(IL-4)均购于Peprotech公司。脂多糖(LPS)购于Sigma公司。荧光标记单克隆抗人抗体PE DC-SIGN、PE-Cy5 CD86、PE-Cy5 HLA-DR以及同型对照PE Rat IgG2a、k和PE-Cy5 Mouse IgG2b、k均购于eBioscience公司。富集人$CD4^+$ T细胞分选试剂盒购于Stemcell公司。IL-12、IL-10 ELISA试剂盒购于美国ADI公司。DC-SIGN引物及内参引物由上海生工合成,RNAiso plus及RT-PCR试剂盒购于TaKaRa公司。RIPA蛋白裂解液购于上海申能博彩生物科技公司,鼠抗CD209单克隆抗体购于R&D公司。^{3}H-TdR由第三军医大学西南医院核医学科提供。表达DC-SIGN siRNA和绿色荧光蛋白的慢病毒载体及作阴性对照用的只表达绿色荧光蛋白的慢病毒载体均已由本实验组成员构建完成。表达DC-SIGN siRNA的慢病毒载体中siRNA的序列为:ACGACGACAAATGTAATCT。

1.2 方法

1.2.1 DCs的培养与诱导分化 将20 ml白膜加到含4 ml淋巴细胞分离液的离心管中,经密度梯度离心(2 500 r/min, 20 min)分选出单个核细胞。PBS洗3次,用无血清1640培养基将单个核细胞浓度调至5×10^6/ml,接种于6孔板中,每孔2 ml。37 ℃、5% CO_2贴壁2 h,弃未贴壁细胞,并用PBS轻洗4次去掉悬浮细胞。重新加入完全培养基(含10%胎牛血清的1640)2 ml/孔,每孔加入rhGM-CSF、rhIL-4各50 ng/ml刺激分化,中途不换液,培养至第4天收集细胞,调整细胞浓度1×10^6/ml备用。

1.2.2 DCs转染 收集第4天细胞,分3组:RNA干扰组(慢病毒载体介导的RNA干扰组)、阴性组(只表达绿色荧光的慢病毒载体组)和空白组(无病毒感染组),按实验设计用感染复数(MOI)为20的慢病毒颗粒感染DCs,孵育12 h后换液,加50 ng/ml的GM-CSF和IL-4。继续培养48、60、72 h后用荧光显微镜观察荧光细胞阳性率及细胞坏死情况,筛选出最佳转染时间。培养第6天加LPS 100 ng/ml,第7天收集细胞。

1.2.3 RT-PCR检测DC-SIGN mRNA 依据GenBank编号为NM_021155的碱基序列设计RT-CPR上下游引物。DC-SIGN上游引物5′-AACAATCCAGGCAAGACG-3′,下游引物5′-TCCGCTGGGAGTTAGACA-3′,扩增产物全长618 bp。β-actin上游引物5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′,下游引物5′-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3′,扩增产物长272 bp。收集第

7 天细胞按照 RNAiso plus 说明书提取细胞总 RNA 进行逆转录合成 cDNA,逆转录条件:42 ℃ 30 min,95 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min。PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 30 个循环,72 ℃终末延伸 5 min 后 4 ℃保存。最后 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳显示,用 Quantity One 软件测定各个条带灰度值。

1.2.4　Western blot 检测 DC-SIGN 总蛋白　　收集第 7 天细胞,离心后弃上清液,各孔加入 RIPA 蛋白裂解液并用超声破碎后收集总蛋白。用考马斯亮蓝法对蛋白进行定量,再经 SDS-PAGE 电泳后,将目的蛋白条带电转移至 NC 膜上。用封闭液(含 6% 脱脂奶粉的 PBS)封闭 2 h 后过夜,清洗后加鼠抗 CD209 单抗及鼠抗 β-actin 单抗室温反应 1 h。洗涤后再加入抗鼠 IgG-HRP 二抗及抗生物素-HRP 抗体室温反应 1 h。洗涤后用化学发光试剂孵育 1 min,用 X 光片曝光显影,观察结果。

1.2.5　流式细胞仪分析 DCs 表型　　将细胞悬液浓度调至 1×10^7/ml,以 100 μl/管分为若干管,加入荧光标记的单克隆抗体及同型对照物,用流式细胞仪检测 DC-SIGN、CD86 和 HLA-DR 表达率。

1.2.6　培养上清液中 IL-12 及 IL-10 的含量测定　　收集上清液,用 ELISA 试剂盒检测上清液中 IL-10、IL-12 含量。反应终止后半小时内用酶标仪检测 450 nm 吸光度,按标准品浓度与吸光值关系绘制标准曲线,再根据标准曲线计算所测细胞因子的含量。

1.2.7　$CD4^+$ T 细胞分选及培养　　抽取健康人外周血 8 ml,用富集人 $CD4^+$ T 细胞分选试剂 400 μl 与之充分混合。室温静置 20 min 后,加入到含 4 ml 淋巴细胞分离液的离心管中。室温下密度梯度离心(1 200 r/min,20 min),吸取云雾层,用 PBS(含 2% 胎牛血清)洗涤 2 次,用完全培养基调整细胞浓度 2×10^6/ml,接种在 6 孔板中备用。

1.2.8　同种异体混合淋巴细胞反应　　分组同前,各组 DCs 经洗涤后用 1640 完全培养液调整为 1×10^5/ml,加入丝裂霉素 C 终止 DCs 增殖,37 ℃ 5% CO_2 孵箱培养 60 min。调整细胞数量,将 DCs 接种到 96 孔板中,每孔细胞数为 1×10^4 个,并设立完全空白对照。每孔再加入 2×10^6/ml 的健康人同种异体 $CD4^+$ T 细胞 100 μl,补充至液体终体积为 200 μl,置 37 ℃ 5% 的 CO_2 孵箱中继续培养 72 h。培养结束前 16 h 加入 ^{3}H-TdR,最后用 β 液闪计数仪检测增殖水平。

1.3　统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计,测定结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,3 组均数比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　DCs 形态学观察

倒置显微镜观察,加入细胞因子后第 3 天悬浮细胞增多,细胞形态多样,以类圆形为主,并可见细胞表面出现少量树突,体积逐渐增大。第 4 天悬浮细胞明显增多,体积变大,出现集落,树突明显增多,大部分悬浮细胞已具有 DCs 表现。培养第 7 天,细胞体积明显增大,细胞悬浮,并出现大量集落,树突明显,为典型的 DCs 表现。

2.2　慢病毒转染 DCs

对培养第 4 天以前的细胞进行转染,12 h 后贴壁细胞出现大量裂解坏死,存活细胞显著减少,无法进行后续试验。培养第 4 天与第 5 天细胞进行转染,细胞坏死量显著下降,转染效率提高。MOI 为 20 时,转染效率可达 85%。继续培养 60 h 后荧光显微镜下能看到细胞表达荧光。见图 1。

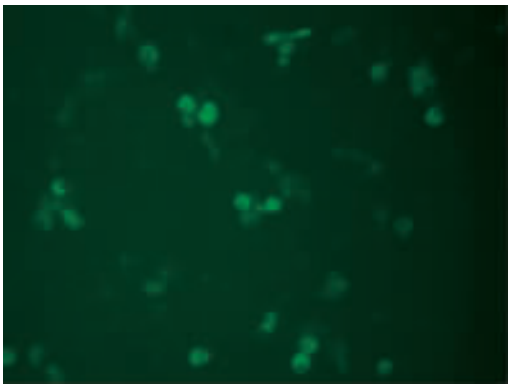
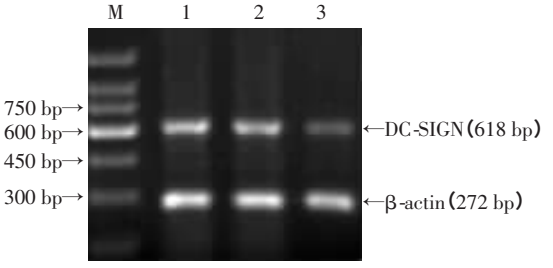


图 1　荧光显微镜下观察慢病毒载体转染 DCs　(×200)

2.3　DC-SIGN mRNA 表达

RNA 干扰组目的条带灰度值/内参灰度值(0.252 5 ± 0.139 6)与空白对照组(0.572 2 ± 0.190 9)及阴性组(0.548 7 ± 0.119 3)相比显著下降,差异有统计学意义($F=8.142$, $P<0.05$)。RNA 干扰后 DC-SIGN mRNA 下调 55.87%。见图 2。

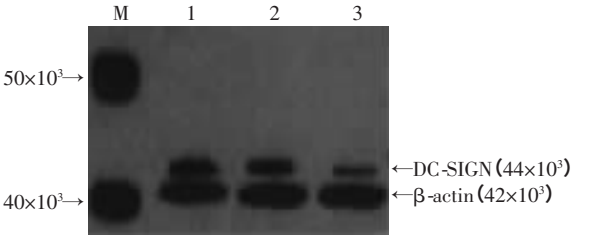


M:标准;1:空白组;2:阴性组;3:RNA 干扰组

图 2　RT-PCR 检测 DC-SIGN mRNA 表达

2.4　Western blot 检测 DC-SIGN 蛋白水平

干扰组目的条带灰度值/内参灰度值(0.323 7 ± 0.057 0)与空白对照组(0.590 0 ± 0.014 0)及阴性对照组(0.578 0 ± 0.023 0)相比显著下调,差异有统计学意义($F=51.376$, $P<0.05$)。RNA 干扰后 DC-SIGN 蛋白下调 45.14%。见图 3。



M:标准;1:空白组;2:阴性组;3:RNA 干扰组

图 3　Western blot 检测 DC-SIGN 蛋白水平

2.5 DCs表面DC-SIGN表达水平

干扰组DC-SIGN阳性率[(43.10±10.12)%]与空白对照组[(73.05±8.11)%]及阴性组[(74.49±5.56)%]相比显著下调,差异有统计学意义($F=14.19$,$P<0.05$)。RNA干扰组HLA-DR阳性率[(87.25±4.75)%]与空白对照组[(88.37±3.12)%]及阴性组[(86.59±6.55)%]相比差异无统计学意义($F=0.096$,$P>0.05$)。RNA干扰组CD86阳性率[(78.92±4.99)%]与空白组[(82.60±6.10)%]及阴性组[(81.86±4.34)%]相比差异无统计学意义($F=0.421$,$P>0.05$)。

2.6 IL-10及IL-12水平

RNA干扰组DCs培养上清液中IL-12水平(45.84±2.32)与空白组(46.88±3.32)及阴性组(47.63±1.42)比较,差异无统计学意义($F=1.042$,$P>0.05$),干扰组IL-10水平(192.70±16.00)与空白组(218.50±13.70)及阴性组(195.70±29.80)相比,差异无统计学意义($F=1.347$,$P>0.05$)。

2.7 混合淋巴细胞反应

RNA干扰组的DCs刺激$CD4^+$T淋巴细胞增殖能力(748.00±30.22)与空白组(819.00±55.28)及阴性对照组(742.00±124.97)相比差异无统计学意义($F=1.144$,$P>0.05$)。

3 讨论

DCs是体内功能最强大的抗原提呈细胞,能高效摄取、加工、递呈抗原。成熟DCs还是唯一能激活初始T细胞,启动初始免疫应答的抗原提呈细胞。DC-SIGN是DCs表面分子,是一个广泛的病原体受体,属于C型凝集素家族成员。DC-SIGN分子是近年来国外研究热点,结核分枝杆菌、HIV病毒、利什曼原虫、HBV病毒、巨细胞病毒、幽门螺旋杆菌、SARS病毒等胞内寄生病原体都能通过DC-SIGN感染DCs,影响DCs成熟,下调宿主免疫应答[2,4]。

慢病毒载体介导的RNA干扰,能特异性抑制目的基因表达,且快速、有效、序列特异性强并能长期稳定地起到抑制效果。其他方法(如物理方法、腺病毒等)或因不能用于原代细胞,或因具有免疫原性会导致DCs成熟,而不能用于未成熟DCs的转染[6]。使用慢病毒介导RNA干扰调控DC-SIGN表达有望为结核病靶向治疗提供一个新的策略。

本实验用表达DC-SIGN siRNA的慢病毒载体转染人外周血单核细胞来源DCs,确定最佳感染MOI值为20。由于转染DCs前体细胞即单核细胞会受到很有影响,且不易存活[4,7]。故本实验选择在DCs培养的第4天进行转染。MOI为20时,最佳共孵育时间为12 h。转染60 h后能看到稳定的荧光。

本实验研究慢病毒载体介导的RNA干扰目的基因后对DC-SIGN表达的影响。在mRNA水平和蛋白水平慢病毒介导的RNA干扰均起到一定的抑制作用。外周血单核细胞诱导分化成DCs需要用IL-4不断刺激,而IL-4本身能上调DC-SIGN表达[5],且原代DCs生存时间短等原因均会影响干扰效果。从RNA水平经转录翻译需要一个过程,且已经表达的DC-SIGN分子需要经一段时间以后才能被降解。因此我们选择在转染60 h观察到稳定绿色荧光蛋白表达后,进行各项指标检测。

本实验进一步发现,RNA干扰DC-SIGN表达下调后,再用LPS刺激其成熟,与正常组相比CD86、HLA-DR水平并无显著影响,表明LPS刺激DCs成熟并不依赖于DC-SIGN水平的高低。LPS刺激DCs成熟主要依赖于Toll样受体的信号内传放大[1,2]。同时研究进一步显示DC-SIGN下调并不影响成熟DCs分泌细胞因子IL-12,IL-10的水平及DCs所诱导的$CD4^+$T细胞增殖能力。表明单纯下调DC-SIGN水平不会影响DCs成熟度及免疫学功能。

综上所述,本研究建立了一种稳定、有效干扰DC-SIGN表达的方法。慢病毒转染后的DCs能保持其原有的成熟表型、形态、生长特性及免疫功能,为DC-SIGN在结核病发病机制中的作用的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Geijtenbeek T B, Van-Vliet S J, Koppel E A, *et al*. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function[J]. J Exp Med, 2003, 197(1): 7-17.

[2] 刘平, 郭述良, 罗永艾. DC-SIGN分子与结核病的发生[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(6): 458-461.

[3] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, *et al*. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 401-406.

[4] Arrighi J F, Pion M, Wiznerowicz M, *et al*. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells[J]. J Virol, 2004, 78(20): 10848-10855.

[5] 刘平, 郭述良, 罗永艾. IL-4调控DC-SIGN表达对树突状细胞免疫学功能的影响及与结核病发生的关系[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(13): 1295-1298.

[6] Arthur J F, Butterfield L H, Roth M D, *et al*. A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells[J]. Cancer Gene Ther, 1997, 4(1): 17-25.

[7] Neil S, Martin F, Ikeda Y, *et al*. Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes[J]. J Virol, 2001, 75(12): 5448-5456.

(收稿:2009-11-26;修回:2010-03-16)

(编辑 邓强庭)