基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0813-03

HBsAg 冲击的树突状细胞疫苗的制备及免疫活性研究

李生伟,李 钺,刘作金,龚建平
(重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨利用 HBsAg 冲击树突状细胞(Dendritic cells,DC)制备 HBsAg- 树突状细胞疫苗(HBsAg-DC 疫苗)的基本方法并检测其免疫活性。方法:收集 Lewis 大鼠骨髓细胞,加入含 rGM-CSF(4 ng/ml)及 rIL-4(8 ng/ml)的 RPMI1640 培养 7 d 后,加入 HBSAg(100 μg/ml)再培育 48 h,即获得 HBsAg-DC 疫苗。倒置显微镜观察细胞形态学变化,流式细胞仪检测其表型;单向混合淋巴细胞反应评价 HBsAg-DC 疫苗的细胞免疫活性。结果:采用该方法可诱导扩增出较多数量和较高纯度 DCs。HBsAg 冲击 DCs 后,明显增强 DCs 的 T 细胞刺激活性。同种异体和自体之间 T 淋巴细胞增殖功能没有显著差异($P>0.05$)。经 HBsAg 冲击后第 3 d(培养第 10 d)的 DCs 在异体 T 淋巴细胞增殖反应中能够诱导出很强的增殖应答反应;MTT 比色法分析显示不同密度的 DCs 和 HBsAg-DCs 经丝裂霉素 C 处理后,均能明显刺激同种异体 T 细胞增殖,且该效应随着 DCs 和 HBsAg-DCs 数量的增加而逐渐增强($P<0.01$);同密度的 HBsAg-DCs 比 DCs 的刺激作用更强,差异有显著性($P<0.01$)。结论:本方法可以诱导扩增出较多数量和较高纯度 DC,HBsAg-DC 具有较强的抗原递呈能力。

【关键词】疫苗;乙型肝炎病毒;树突状细胞
【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-19

Detection of the immunological competence of HBsAg pulsed Dendritic Vaccination

LI Sheng-wei, et al
(*Department of Hepatobliliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the immunological competence of HBsAg-DCs vaccination prepared via HBsAg inducing DCs. *Methods*: The bone marrow cells of Lewis rat were cultured by RPMI1640 added with 4 ng/ml of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and 8 ng/ml of interlcukin-4 (IL-4). 7 days late, the RPMI1640 were added with HBsAg (100 μg/ml) for another 48h to obtain HBsAg-DCs. The morphologic changes of HBsAg-DCs were observed by light microscope and the phaenotype change were detected by flow cytometry (FCM); The immuno-competence of the HBsAg-DCs were judge by one-way mixed lymphocyte reaction (MLR). *Results*: There were many DCs growing adherence in cluster and the suspended cells were obviously increasing and much bigger after administrating HBsAg. Compared with DCs, there were significant difference in T cell proliferation stimulated by HBsAg-DCs ($P<0.05$), however, there was no significant difference in the T cell function. DCs inducing by HBsAg for 3 d could induce much more fortis. After treated by mitomycin C, T cell proliferation could be enhanced by DCs and HBsAg-DCs ($P<0.01$), and HBsAg-DCs were much more effective than the same density of DCs ($P<0.01$). *Conclusion*: The DCs loading with HBsAg have strong ability in presenting antigen.

【Key words】Immune depression; HBV; Dendritic cell

随着乙肝免疫球蛋白(Hepatitis B immunoglobulin,HBIG)和以拉咪夫定(Lamivudine,LMV)为代表的核苷类似物抗病毒药物的常规应用,乙肝肝移植(Liver transplantation,LT)术后的(HBV)再感染率显著下降。但因为 20%的患者对 HBIG 无反应性、不能维持 HBIG 血清滴度、高病毒血症、病毒编码特异区的 HBsAg 基因变异等原因,约 36%患者仍会再度感染 HBV。树突状细胞(Dendritic cells,DC)是体内广泛分布的抗原提呈细胞,在诱导 T 淋巴细胞介导的针对病毒的特异性免疫反应中发挥着重要作用。但 HBV 感染者常存在 DCs 功能缺陷,LT 术后必需的免疫抑制治疗将进一步抑制受体 DCs 的功能,造成 T、B 淋巴细胞对 HBV 免疫耐受,而成为导致传统疫苗无效的最关键原因[1,2]。因此,恢复 DCs 的强大免疫功能进行主动免疫治疗可能成为预防 HBV 再感染的主

作者介绍:李生伟(1964-),男,教授,博士,研究方向:肝胆外科疾病。
通讯作者:龚建平,男,教授,E-mail: gongjianping11@126.com.
基金项目:国家自然科学基金资助课题(编号:30972888);重庆市自然科学基金(编号:2007BB0266);中国博士后基金(编号:20070411152)。

要手段。目前,体外获得大量 DCs 和制备 DCs 疫苗技术日趋成熟。但是,尚无在 LT 术后动物体内进行 HBsAg-DCs 疫苗实验的报导,该疫苗是否可预防 LT 术后 HBV 再感染仍缺乏直接的证据。因此,我们探讨将 HBsAg 冲击 DC 制备 HBsAg 冲击的树突状细胞疫苗(HBsAg-DC 疫苗)的基本方法,以期为在动物体内进行肝移植术后 HBsAg-DCs 疫苗实验奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂

雄性 Lewis 大鼠(RT11),鼠龄 10~12 周,体重 240~280 g,购自中国医学科学院实验动物研究所。大鼠重组白细胞介素-4(rIL-4)和粒巨细胞集落刺激因子(rGM-CSF)购于 R&D 公司。FITC 标记的 CD80、CD86 及 CD11c 的兔抗鼠单克隆抗体购自 BD Pharmingen 公司;HBsAg 疫苗为康泰生物制品公司产品。

1.2 DCs 制备

Lewis 大鼠,拉颈处死,无菌手术取出股骨和胫骨,PBS 洗涤 3 次;剪去长骨两末端,用不含血清的 RPMI1640 液体培养基(含青链霉素,各 100 μ/ml)冲洗骨髓腔。冲洗液经 200 目铜网过滤,1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,加 3 ml Tris-NH_4Cl 溶液溶解红细胞,反复离心收集沉淀的骨髓细胞。调整细胞浓度至 2.0×10^6 个/ml,加入含 rGM-CSF(4 ng/ml)及 rIL-4(8 ng/ml)的 RPMI 1640 培养液,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中;隔天半量换液并加入细胞因子。

1.3 DC 负载 HBsAg 制备[3]

上述细胞培养 7 d 后,调整浓度为 3×10^6 个/ml,加入含 HBsAg(100 μg/ml)的完全培养基,继续培育 48 h,收集悬浮的细胞即为 HBSAg 致敏的 DCs 疫苗。

1.4 DC 的观察与检测

DCs 培养过程中,倒置显微镜观察细胞形态学变化;采用流式细胞仪检测 DCs 表面标志 CD80、CD40 及 MHC-Ⅱ表型变化。

1.5 HBsAg-DCs 细胞免疫活性检测[3,4]

1.5.1 四甲基偶氮唑盐法(MTT)检测 DC 刺激同种异体大鼠(或自体)淋巴细胞的增殖能力。处死 BN 大鼠(或 Lewis 大鼠),无菌条件下取出脾脏,加 RPMI1640 培养液研磨并通过不锈钢筛网,加入 0.83% Tris-NH_4Cl 溶解红细胞,PBS 洗涤两次,再以 RPMI 1640 培养液重悬后,注入尼龙毛柱,置 37℃孵育 2 h,用预热的 PBS 冲洗出非黏附细胞,既为同种异体 T 淋巴细胞即反应细胞。调整细胞浓度至 2×10^6 个/ml 作为反应细胞。

1.5.2 单向混合淋巴细胞反应(Mixed lymphocyte response, MLR)。将用细胞因子培养的各时段 DCs 作为刺激细胞,以 RPMI1640 完全培养液悬浮后,加入终浓度为 25 mg/L 的丝裂霉素 C(包括 DCs、HBsAg-DCs 组)。将 2 组 DCs 与 T 淋巴细胞按不同比例(DCs/T)加入 96 孔圆底培养板各孔。以细胞培养液为空白对照。置 37℃,5% CO_2 培养箱中混合培养 72 h,于培养结束前 4 h,每孔加入 10 μl MTT (<5 mg/ml)染液及 100 μl 二甲基亚砜(DMS)。置酶联检测仪上测定光密度(OD)值,结果以三复孔均值表示。检测波长 570 nm。按公式计算刺激指数。刺激指数(Stimulating index, SI)= 实验组 OD 值/对照组 OD 值。评价淋巴细胞增殖功能。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 倒置显微镜观察不同时期 DC 的形态学变化

DC 细胞培养 2~3 d 出现较多的贴壁簇状生长,细胞形态小而圆,有少量短突起,形似"豆芽状"的细胞;第 5 d 开始细胞继续变大,簇状细胞团减少,悬浮的细胞不断增多,突起增多;以 HBsAg 冲击后的第 7~10 d,悬浮细胞明显增多,体积较大,"树突"比较明显,此时细胞活力好,培养瓶壁可见较多的呈"长条状"贴壁生长的成纤维状细胞和伸出多个"长伪足"的巨噬样细胞。若继续生长至 14 d 以上,则细胞明显变大,胞内开始出现囊泡,细胞出现活力减退迹象(图 1)。

2.2 流式细胞仪分析 HBsAg 冲击后对 DCs 表达的影响

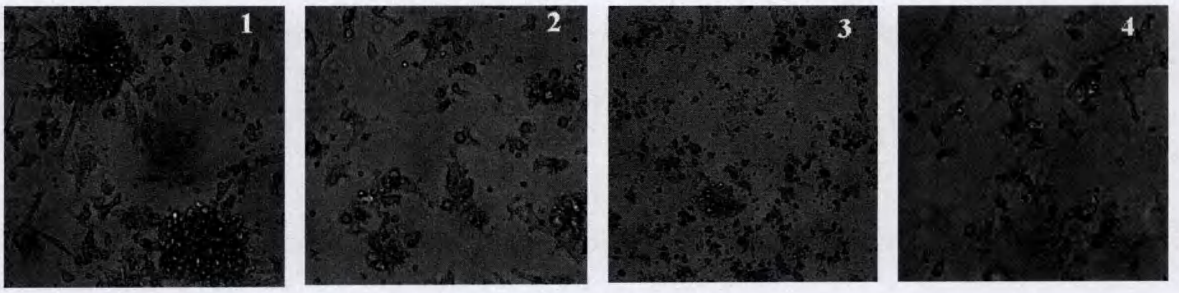
流式细胞仪检测 HBsAg 冲击前后(DCs 培养第 5 d 及 10 d)其表面标志 CD40、CD80 及 OX62(MHC-Ⅱ)变化情况。结果发现(表 1),HBsAg 冲击对 DCs 特异性表面标记 OX62 的表达影响无显著差异,分别为 82.5%及 81.7%($P>0.05$);但明显促进反映 DC 成熟程度的表面共刺激分子 CD40、CD80 的表达,分别为 24.6%,70.7%及 30.7%,87.1%($P<0.01$)。

2.3 HBsAg 冲击对 DCs 细胞免疫活性的影响

采用浓度为 1×10^6 个/ml 的 HBsAg-DCs 细胞及 DCs 细胞,作为刺激细胞,分别与 Lewis 大鼠和 BN 大鼠的的 T 细胞按不同比例进行同种异体和自体混合淋巴细胞反应(图 2)。结果显示,HBsAg-DCs 及 DCs 与 T 淋巴细胞按 1:5 比例混合培养为最适反应条件。与 DCs 比较,各组 HBsAg-DCs 刺激 T 细胞增殖的功能有显著差异($P<0.05$),表明 HBsAg 冲击DCs 后,明显增强 DCs 的 T 细胞刺激活性。而同种异体和自体之间 T 淋巴细胞增殖功能没有显著差异($P>0.05$)。同时,测定 HBsAg 冲击后不同时间的 DCs 对同种异体 T 细胞增殖的影响发现(图 2~4),经 HBsAg 冲击后第 3 d(培养第 10 d)的 DCs,在异体 T 淋巴细胞增殖反应中能够诱导出很强的增殖应答反应,显著强于培养 7、8 d 及 9 d 的 DCs ($P<0.01$);而 MTT 比色法分析显示(图 1~4),不同密度的 DCs 和 HBsAg-DCs 经丝裂霉素 C 处理后,与同种异体 T 细胞进行混合培养 48 h 后,均有明显刺激同种异体 T 细胞增殖的作用,且该效应随着 DCs 和 HBsAg-DCs 数量的增加而逐渐增强($P<0.01$),且同密度的 HBsAg-DCs 比 DCs 刺激 T 细胞增殖作用更强,差异有显著性($P<0.01$)。

3 讨 论

疫苗研究和免疫治疗的主要目标是增强抗原提呈以诱导有效的免疫应答[5]。DCs 是目前已知的体内最重要的专职抗原提呈的细胞,具有很强的诱导初次免疫应答的能力,是



1~4 分别为 2、5 、10 、14 d 的 DCs

图 1 不同时期的 DCs 形态(×400)

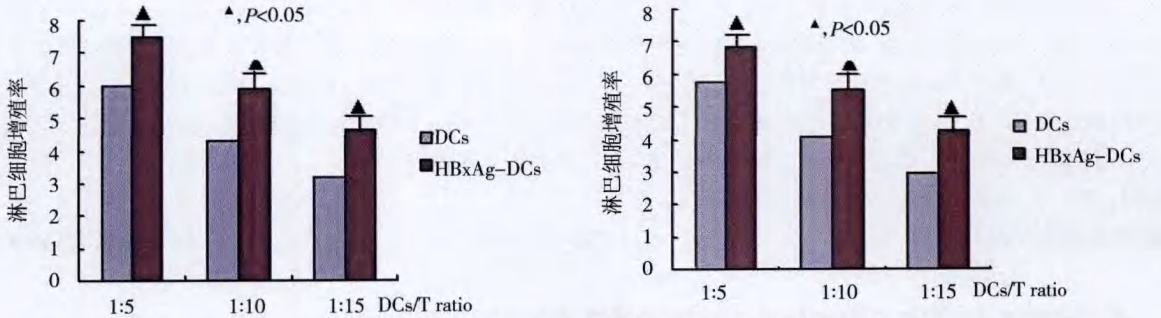


图 2 DCs、HBsAg-DCs 与同种异体和自体淋巴细胞反应

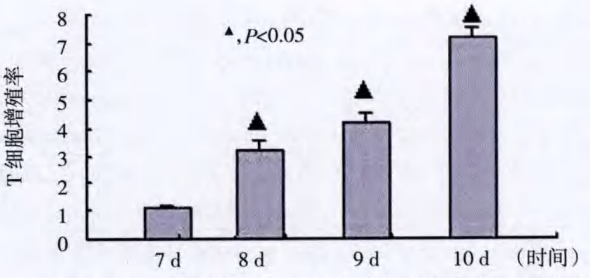


图 3 培养不同时间 HBsAg-DCs 的同种异体淋巴细胞反应

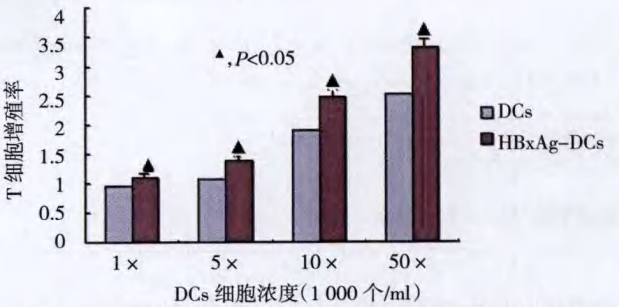


图 4 不同密度 DCs、HBsAg-DCs 对 T 细胞增殖能力的影响

诱导特异性免疫应答的关键环节[6,7]。目前分离 DC 主要有 2 种:一种是"培养粘附法",根据 DC 和单核细胞粘附特性的不同,收集粘附的细胞即为 DC,纯度可达 80%左右。另一种为免疫分选法",选用抗细胞表面特异性标志的 Ab,用免疫磁珠或流式细胞仪进行阴性选择的方法,通过去除其他细胞而获得 DC,纯度可达 90%以上[8]。细胞因子在体外 DC 扩增中是必不可少的,GM-CSF 是 DC 诱导中的最基本的细胞因子。研究发现 $4\times10^5\sim8\times10^5$ U/L 的 GM-CSF 就可以诱导 DC 的生成;$4\times10^5\sim1\times10^6$ U/L 的 IL-4 可促进诱导 DC 的生成。本实验中,我们根据大鼠 DC 的前体细胞大部分可贴壁生长的特性,通过一系列的纯化步骤,吸弃中性粒细胞、T 细胞及 B 细胞等。最后得到纯度较高的 DC。

本实验所培养的 DC 从形态学观察方面,经 HBsAg 冲击成熟后 DC 悬浮,体积较大,树突一般较其它细胞长,突起呈"树突状",而巨噬细胞贴壁,且突起巨大,呈"伪足状",成纤维细胞则形体巨大,长条状,贴壁;DCs 细胞表面较光滑,不象淋巴细胞有很多褶皱和微绒毛,胞内细胞器也较丰富。这些特点可明显区别于培养瓶中的其它细胞。共刺激分子 CD40、CD80 为提供 T 细胞协同刺激信号,是目前检测 DC 成熟程度的最常用标志;我们实验发现,HBsAg 冲击 DCs 后,CD40、CD80 的表达明显上调,表明 DC 迅速成熟。由于 DC 在分离过程中和分离后只要与培养器皿接触发生粘附,即可被激活,由于目前对 DC 功能的检测尚无统一的方法。我们采用 MLR,测定了 HBsAg 冲击 DCs 的免疫生物学活性。MLR 是源于不同的淋巴细胞在体外混合培养时,由于细胞表面的 HLA-Ⅱ类抗原的 D 和 DP 抗原不同,可相互刺激对方淋巴细胞转化,并产生多种细胞因子,促进 NK, CTL, LAK 等杀伤细胞活性。而我们将 DCs 和 HBsAg-DCs 预先经丝裂霉素 C 处理使其丧失增殖能力,但仍保持刺激对方淋巴细胞增殖的能力,该方法目前被广泛应用于初步判断 DC 抗原递呈能力。我们试验结果表明:分离的 DC 能激活初始型 T 细胞,具有明显刺激同种异体 T 细胞增殖的能力,经 HBsAg 冲击后 DCs 的刺激 T 细胞增殖的能力明显增强,并且该效应呈量效关系,即随着 DC 数量的增加,刺激 T 细胞增殖的作用逐渐增强;该效应还有一定的时间性,经 HBsAg 冲击后的 4 d 内,随培养时间的延长,该效应也逐渐增强。上述结果也提示下一步体内试验,应采用较大量的 HBsAg 冲击后 4 d 的 DCs,以获得最佳的效应。

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0816-03

pcDNA3.1 载体对内参基因表达影响分析

陈 可,王增产

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究转染质粒 pcDNA3.1 对内参基因表达影响差别,为今后在采用 pcDNA3.1 载体进行表达分析时内参基因的选择提供参考。方法:选用 HepG2、HEK293、Hela、A549、QGY 共 5 种细胞转染 pcDNA3.1 空载体质粒,转染后 48 h 提取细胞总 RNA 荧光定量 PCR 法比较内参基因甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphste dehydrogenase,GAPDH)、肌动蛋白(β-actin)、18sRNA 表达水平差异,提取细胞总蛋白,检测 GAPDH、β-actin 表达水平差异。结果:5 种细胞在转染质粒 pcDNA3.1 后,内参基因转录和蛋白表达均出现不同程度的下降,其中以 β-actin 下降最为明显,GAPDH 及 18sRNA 在转录水平下降幅度小,且下降程度接近。结论:pcDNA3.1 质粒转染造成基因表达非特异性抑制,其中对管家基因 β-actin 影响较大,因此在应用 pcDNA3.1 来源载体进行基因功能分析时,不推荐使用 β-actin 作为内参基因。

【关键词】pcDNA3.1;内参基因;转染;转录;表达

【中国图书分类法分类号】Q753 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-31

Analysis of the effect of pcDNA3.1 on house keeping gene expression

CHEN Ke, et al

(*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of pcDNA3.1 vector on housekeeping gene expression and set guide to further study work in using pcDNA3.1. *Methods*: 5 cell lines were transfected with pcDNA3.1, 48 h post transfection total RNA was extracted and applied for real time PCR to detect the RNA level of GAPDH、β-actin、18sRNA difference. Meanwhile, extract total protein and

作者简介:陈 可(1968-),男,实验师,研究方向:分子生物学。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30600520)。

目前关于几种乙肝治疗性疫苗的研究,主要分为抗原蛋白或肽负荷/冲击的 DC 以及抗原基因导入的 DC 两种类型,我们的实验结果均提示 HBsAg 冲击的 DC 比同样蛋白冲击的巨噬细胞在体内能刺激更强的 MHC 类限制性 CTL 应答[9],表明 DC 疫苗具有突出的诱导细胞免疫应答的能力[10]。HBV 特异性 CTL 是控制病毒持续感染进而清除病毒的重要因素,而慢性 HBV 感染者 DC 的抗原提呈功能有缺陷,不能把病毒抗原的信号传递给机体的免疫系统,引起 CTL 应答不足。本实验中,我们用 HBsAg 冲击的 DC 制备的 HBsAg-DC 疫苗,并初步观察其体外的免疫刺激活性,也发现经此处理对 DC 的成熟表型、及刺激同种异体 T 细胞增殖的功能均有增强作用。

参 考 文 献

[1] Su W J, Ho M C, Ni Y H, *et al*. *Clinical course of de novo hepatitis B infection after pediatric liver transplantation*[J]. Liver Transpl, 2010, 16(2): 215-221.

[2] Woltman A M, Boonstra A, Janssen H L. Dendritic cells in chronic viral hepatitis B and C: victims or guardian angels[J]? Gut, 2010, 9(1): 115-125.

[3] Yang J Y, Cao D Y, Xue Y, et al. Improvement of dendritic-based vaccine efficacy against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by two tumor-associated antigen gene-infected dendritic cells[J]. Hum Immunol, 2010, 1(3): 255-262.

[4] Huang Y, Chen Z, Zhou C, et al. The modulation of thymosin alpha 1 in the maturation, differentiation and function of murine bone marrow-derived dendritic cells in the absence or presence of tumor necrosis factor-alpha[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(4): 539-546.

[5] Fazle Akbar S M, Furukawa S, Yoshida O, et al. Induction of anti-HBs in HB vaccine nonresponders in vivo by hepatitis B surface antigen-pulsed blood dendritic cells[J]. J Hepatol. 2007, 7(1): 60-66.

[6] Akbar SM, Furukawa S, Hasebe A, et al. Production and efficacy of a dendritic cell-based therapeutic vaccine for murine chronic hepatitis B virus carriere [J]r. Int J Mol Med, 2004, 4(2): 295-299.

[7] Akbar SM, Horiike N, Onji M, et al. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers [J]. Intervirology, 2001, 4(4): 199-208.

[8] 达万明,曹雪涛.外周血干细胞移植 [M].第 1 版.北京:人民卫生出版社,2000.222.

[9] Carotenuto P, Artsen A, Niesters H G, et al. In vitro use of autologous dendritic cells improves detection of T cell responses to hepatitis B virus (HBV) antigens [J]. J Med Virol, 2009, 81(2): 332-339.

[10] Boonstra A, Woltman A M, Janssen H L. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2008, 22(6): 1049-1061.

(责任编辑:关蕴良)