泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1144-04

Survivin 表达对鼠髓样树突状细胞成熟的影响

黎衍敏,苟 欣,何卫阳,王海峰
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 survivin 的表达变化对小鼠骨髓来源树突状细胞分化成熟的影响。方法:无菌条件下取小鼠的骨髓细胞作为树突状前体细胞,用粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)和白细胞介素 4(Interleukin 4,IL-4)的培养基定向诱导树突状前体细胞分化成未成熟树突状细胞(Immature dendritic cells,iDC),用 GM-CSF,IL-4 及肿瘤坏死因子 -α (Tumor necrosis factor-alpha,TNF-α) 定向诱导树突状前体细胞分化成成熟树突状细胞(Mature dendritic cells,mDC):运用半定量 RT-PCR,Western blot 比较树突状前体细胞、iDC 与 mDC 中 survivin mRNA、survivin 蛋白的含量变化。结果:RT-PCR 检测结果显示,树突状前体细胞 survivin mRNA 表达值为 (0.735 ± 0.081),iDC 为 (0.596 ± 0.073,$P<0.05$),mDC 为(0.393 ± 0.052,$P<0.01$);Western blot 检测结果显示:树突状前体细胞 survivin 蛋白的表达值为(0.767 ± 0.045),iDC 的表达值为(0.396 ± 0.016,$P<0.05$),mDC 的表达值为(0.168 ± 0.009,$P<0.01$)。结论:survivin 在树突状前体细胞中高表达,在 iDC 与 mDC 中表达量略低;且 survivin 在 iDC 中的表达量高于 mDC,这个结论为我们的后续实验提供了理论基础。

【关键词】树突状细胞;Survivin;分化
【中国图书分类法分类号】R392 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-14

Effect of survivin expression on the maturation of mouse marrow dendritic cells

LI Yan-min, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of survivin expression on the mature process of dendritic cells from mouse bone marrow. *Methods*: The cells in marrow as the precurosor of the dendritic cells were taken from mouse in bioclean condition. Then the iDC were induced by the precurosor of DCs with GM-CSF and IL-4 in medium. ThemDC were induced by the precurosor of DCs with GM-CSF, IL-4, and TNF-α in medium. Survivin was compared by RT-PCR, and Western-bolt among these three stages. *Results*: The RT-PCR showed that the expression ratios of survivin mRNA among the precurosor of DCs, iDC, and mDC were (0.735 ± 0.081), (0.596 ± 0.073, $P<0.05$), and (0.393 ± 0.052, $P<0.01$). Respectively, the Westernblot showed that the expression ratios of survivin proteinum among the above-mentioned DC's three stages were (0.767 ± 0.045), (0.396 ± 0.016, $P<0.05$), and (0.168 ± 0.009, $P<0.01$). *Conclusion*: Compared with thesurvivin in iDC and mDC, survivin in the precurosor of DCs was expressed more highly; And it was more highly expressed in iDC than in mDC. This conclusion is providing fundamental basis for our follow-up experiments.

【Key words】Dendritic cells; Survivin; Differentiate

器官移植是治疗多种器官功能衰竭的主要手段。但移植后的排斥反应仍然是影响移植器官存活的主要障碍之一。树突状细胞(Dendritic cells,DC)是已知机体内功能最强的抗原呈递细胞(Antigen presenting cells,APC),在器官排斥反应中起着重要的作用。不同发育和成熟状态的 DC 具有不同的免疫功能[1]。成熟树突状细(Mature dendritic cells,mDC)可以激发免疫排斥反应。而未成熟状态的 DC 低水平表达 MHC 分子,几乎不表达 CD40、B7、细胞间黏附分子 1、淋巴细胞功能相关抗原等协同刺激分子和黏附分子,不能使初始 T 细胞活化、增殖产生免疫应答,从而诱导机体产生免疫耐受反应[2]。但这些不成熟的 DC 在体内受刺激因子(如脂多糖、肿瘤坏死因子等)作用下,不可避免的会发育成熟。因此如何维持 DC 的未成熟状态及将 DC 的耐受原性放大至最大程度,已成为目前研究 DC 诱导抗原免疫

作者介绍:黎衍敏(1982-),男,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤肾脏移植。
通讯作者:苟 欣,男,教授,E-mail:gouxincq@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772043)。

耐受的热点 。

Survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白家族的新成员，主要表达于肿瘤细胞，其可以抑制肿瘤细胞的凋亡[3]。目前，还有研究发现，Survivin 还与多种细胞的分化成熟有关。Survivin 是否与 DC 的分化成熟有关呢？目前很少有这方面的研究。本研究通过比较成熟的树突状细胞与未成熟的树突状细胞中 Survivin 表达的差异，从而探讨 Survivin 是否在 DC 的分化成熟中起着重要的作用，为进一步研究 Survivin 与器官排斥反应的关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄的 C57B/L 小鼠，雌雄不限，体重(20 ± 2) g，购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 试剂和仪器

RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司)；胎牛血清(杭州四季青)；小鼠粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)，白介素 -4 (interleukin-4，IL-4)，肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor，TNF)(美国 PEPROTECH 公司)；Trizol、DEPC、AMV、dNTP、rNasin、Taq 酶和 DL1000 Marker(TakaRa 公司)；抗小鼠 survivin 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)；兔抗小鼠 β -actin (37 kD)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(武汉博士德公司)，细胞计数仪(贝克曼公司)；GeneAMP PCRsysten (Thermo 公司)；凝胶图像分析系统(Bio-Rad 公司)。

1.3 树突状前体细胞的获取

将 6 周龄健康 C57B/L 小鼠用 75%酒精溺死后，用眼科剪剖开皮肤，取胫骨和股骨骨髓，用 1 ml 注射器吸取无菌 PBS 冲洗骨髓腔，冲洗液经 400 目的单细胞过滤筛过滤，收集过滤液，1 500 r/min 离心 5 min 后，弃上清，加 4%的 Tris-NH_4Cl 溶液低渗去红细胞，反应 1 min，1 500 r/min 再次离心 5 min 以去除裂解的红细胞，弃上清，细胞团重悬于含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养液中，调整细胞浓度为 2×10^6 个 /ml，转移至 6 孔培养板内，每孔 2 ml，培养 4 h 后，无菌 PBS 洗涤两次，去除未贴壁细胞，所获得细胞即为树突状前体细胞。

1.4 实验分组

将获取的细胞分成 3 组培养：树突状前体细胞组：即只用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养；iDC 组：用 GM-CSF+ IL-4 刺激；mDC 组：用 GM-CSF+ IL-4+TNF-α 刺激，在培养结束前 24 h 加入 40 ng/ml 的 TNF-α 刺激 DC。培养过程中，在光学显微镜下观察细胞的形态、类型、纯度和成熟情况。

1.5 RT-PCR 测定 survivin mRNA

用 Trizol 法提取树突状前体细胞、iDC、mDC 细胞总 RNA。采用两步法 RT-PCR，参照 TaKaRa 公司 AMV 反转录酶说明书进行反转录。反转录程序为 37℃15 min→85℃5 s。survivin cDNA 的 PCR 反应体系如下：2 μl 的上述反转录产物，5 μl 的 10 × PCR Buffer(Mg^{2+} Free)，3 μl $MgCl_2$(25 mmol/l)，4 μl 的 dNTPMixture(2.5 mmol/l)，0.25 μl 的 Taq 酶(5 U/μl)，上下引物各 1 μl(20 μmol/l)，加灭菌蒸馏水调至 50 μl 体系。根据小鼠 survivin mRNA 序列(NM-009689)设计引物，其序列如下：上游引 5'-gacaacccgatagaggagca-3'，退火温度为 57℃，产物为 609 bp；下游引物 5'-accccgtggtaggaaaactc-3'。选用小鼠 GAPDH 作内参，内参引物序列号如下：上游引物 5'- atatggtacgcgaggtgagg-3'，下游引物 5'-gtgattttagggacgctcca-3'，退火温度为 57℃，产物为 284 bp。内参 GAPDH 的反应体系与反应程序 survivin 的条件相同。PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳，GV 染色后紫外线投射仪下观察结果，经凝胶扫描成像系统拍照，用 Quantity one 软件半定量分析结果，即 survivin mRNA 条带的灰度值 /GAPDH 条带的灰度值，取各组平均值进行统计学分析。实验重复 3 次。

1.6 Western-blot 检测 survivin 蛋白的表达

收集培养至第 7 d 的细胞，采用快速制备法提取核蛋白，蛋白样品经 10%SDS，PAGE 分离，湿转法电转移至 NC 膜上。转移后的 NC 膜经 3%BSA 封闭 3 h，加入兔抗小鼠 survivin 多克隆抗体为一抗及兔抗小鼠 β -acting 作为内参。4℃过夜。洗涤缓冲液洗膜 3 遍，加入相应辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 为二抗，37℃反应 2 h，洗膜，显色，水洗终止反应。结果经 Quantity One 软件处理，各组的 Survivin/ β -actin 条带灰度值比值作为其 Survivin 蛋白的相对表达量。

1.7 统计学分析

所有数据资料中计量资料均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)的形式表示，组间差异采用方差分析，两组间均数比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为有显著差异。采用 SPSS13 软件进行统计学处理。

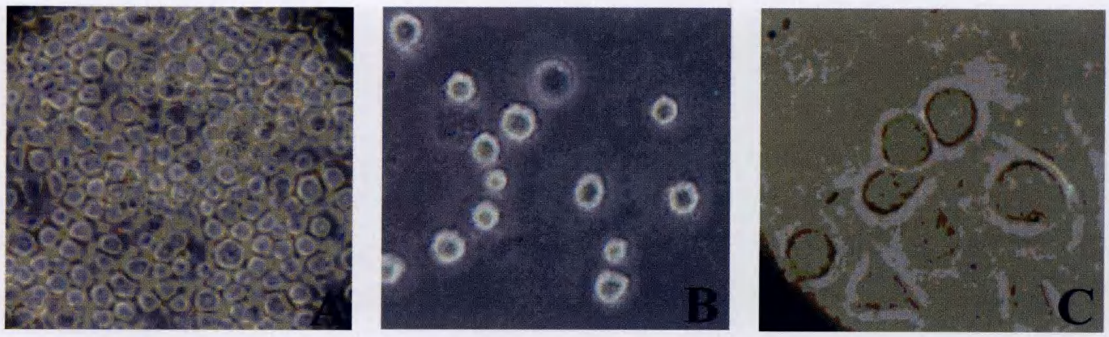
2 结 果

2.1 DC 培养的光镜观察

在倒置显微镜下观察，树突状前体细胞为贴壁的细胞有集落形成，呈葡萄状(见图 1A)。iDC 体积增大，细胞集落减少，无明显突起(见图 1B)。mDC 有明显突起(见图 1C)。

2.2 各组细胞 surviving mRNA 的表达

树突状前体细胞 Survivin mRNA 的表达为 (0.735±0.081)较 iDC(0.596±0.073，$P<0.05$)及 mDC (0.393±0.052，$P<0.01$)明显增多，而 iDC Survivin mRNA 的表达又明显高于 mDC($P<0.05$)，见图 2，图 4，表 1。



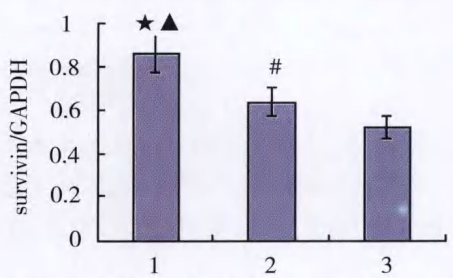
A. 树突状前体细胞　　B. iDC　　C. mDC

图 1　各组细胞形态学观察



1 为树突状前体细胞;2 为 iDC;3 为 mDC; M 为 Marker

图 2　各组细胞 survivin mRNA 的表达



1 为树突状前体细胞组;2 为 iDC;3 为 mDC

注:与 2 相比,★P<0.05;与 3 相比,▲P<0.01;与 3 相比,#P<0.05

图 4　各组细胞 survivin mRNA/GAPDH 相对比值柱状图

表 2　各组细胞 survivin 蛋白与 β-actin 灰度的相对比值($\bar{x}$±s,n=3)

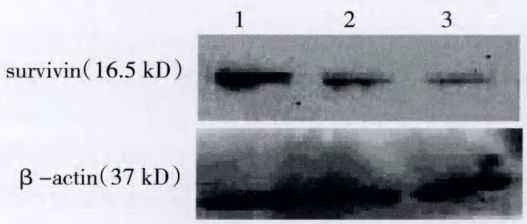
分组	Survivin/β-actin
树突状前体细胞	0.767±0.045
iDC	0.396±0.016
mDC	0.168±0.009

2.3　Western blot 检测结果

树突状前体细胞 Surviving 蛋白的表达为(0.767±0.045)较 iDC (0.396±0.016, P<0.05)及 mDC (0.168±0.009,P<0.01)明显增多,而 iDC Survivin 蛋白的表达又明显高于 mDC(P<0.05),见图 3,图 5,表 2。

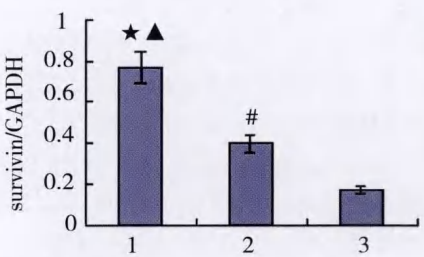
表 1　各组细胞 survivin mRNA/GAPDH 的相对比值($\bar{x}$±s,n=3)

分组	Survivin/GAPDH
树突状前体细胞	0.735±0.081
iDC	0.596±0.073
mDC	0.393±0.052



1 为树突状前体细胞组;2 为 iDC;
3 为 mDC; β-actin 为内参

图 3　各组细胞 survivin 蛋白的表达



1 为树突状前体细胞组;2 为 iDC;3 为 mDC

注:与 2 相比,★P<0.05;与 3 相比,▲P<0.01;与 3 相比,#P<0.05

图 5　各组细胞 survivin 蛋白与 β-actin 相对比值柱状图

3　讨　论

诱导受体对供体特异性抗原的免疫耐受成为同种异体器官移植中追求的理想目标。DC 是近年

来倍受人们关注的 APC,能摄取、加工及呈递抗原,启动 T 淋巴细胞介导的免疫应答。目前公认的 DC 存在 3 个分化阶段,即树突状前体细胞,iDC 和 mDC。mDC 在多种器官的移植排斥反应中起着重要的作用。已有研究表明:mDC 在肝移植排斥反应中起着重要的作用,而抑制 DC 的成熟可能减轻器官的排斥反应[4]。iDC 表面仅中度表达 MHC Ⅱ类分子,不表达或低水平表达共刺激分子,由于缺乏 T 细胞活化的共刺激信号,从而诱导异体组织或自身抗原反应性 T 细胞无能或者凋亡。研究 DC 的分化成熟机制成为防止器官移植排斥反应的一个重要途径。而如何维持 iDC 的不成熟状态成为研究 DC 分化成熟机制的关键。本实验通过用 GM-CSF、IL-4、TNF-α 刺激小鼠树突前体细胞后,细胞树枝状突起明显,胞体相对饱满,细胞形态呈星形、多边形或梭形,呈典型的 DC 表现。而只用 GM-CSF、IL-4 刺激后,细胞只有少量突起,呈 iDC 表现。表明 GM-CSF、IL-4 可以促进树突状前体细胞向 DC 转化,但不能进入成熟状态。而加用 TNF-α 后可以促进 DC 的成熟。这与国内外文献报道一致[5~7]。

Survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白家族新成员,它广泛表达于胚胎组织及大部分的人类肿瘤细胞,如肺癌、胰腺癌、肠癌、非霍奇金淋巴瘤等,也包括白血病细胞系[8]。其不仅具有抑制凋亡的功能,还参与细胞增殖分化的调控。已有研究表明:Survivin 在胚胎干细胞中高表达,而在分化成熟组织中的低表达,甚至不表达,表现出随着细胞的增殖分化,survivin 表达总体下降的趋势[9]。此外,Huiyuan Hu 等[10]研究发现,成熟的中性粒细胞较非成熟的中性粒细胞 survivin 的表达明显减少。MaAC 等[11]研究发现,随着造血干细胞的分化成熟,survivin 的表达也明显减少。本研究发现,树突状前体细胞有较多 survivin 的表达,随着前体细胞向 DC 的分化,其表达明显减少。并且成熟的 DCsurvivin mRNA 及蛋白质的表达较未成熟组明显降低。这说明:survivin 可能也参与了 DC 的分化成熟,但是具体机制还需进一步研究。

综上所述,本实验通过比较树突状前体细胞、iDC 及 mDC survivin 的表达差异,说明了 survivin 可能参与了 DC 的分化成熟。提示通过促进 survivin 的表达可能抑制 DC 的分化成熟,进而可以抑制移植排斥反应,为减轻器官的移植排斥反应提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Jan K,Christian B,Edgar S,et al. Dendritic cells:sentinels of immunity and tolerance[J]. Int Hepatol,2005,81(3):197-120.

[2] Steinman RM,Hawiger D,Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol,2003,21(5):685-711.

[3] Schimmer A D.Inhibitor of apoptosis proteins:translating basic knowledge into clinical practice[J]. Cancer Res,2004,64(20):7183.

[4] SumpterTL,Abe M,Tokita D,et al. Dendritic cells,the liver,and transplantation [J].Hepatology,2007,46(6):2021-2031.

[5] InabaK,InabaM,Romani N,et al. Generation of large number of dendritic cels from mouse bone cultures supplemented with granulocyte/a-macrophage colony - stimulating factor[J]. Exp Med,1992,176(6):1693-1702.

[6] Sallu-to F,Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down regulated by tumor necrosis factor-α [J]. J Exp Med,1994,179(4):1109-1117.

[7] 丁英俊,程 翔,廖玉华,等.大鼠未成熟树突状细胞体外分离、扩增与鉴定[J].免疫学杂志,2008,24(4):483-485.

[8] Carter BZ,Milella M ,Atteiri DC,et al.Cytokine-regulated expression of Survivin in myeloid leukemia[J].Blood,2001,97(9):2784-2790.

[9] BaratelliF, Krysan K, Heuz é -Vourc'h N,et al. PGE2 confers survivin-dependent apoptosis resistance in human monocyte-derived dendritic cells [J]. LeukocBiol,2005,78(2):555-564.

[10] Hu H, Shikama Y, Matsuoka I,et al. Terminally differentiated neutrophils predominantly express Survivin-2 alpha, a dominant-negative isoform of surviving[J]. J Leukoc Biol,2008, 83(2):393-400.

[11] Ma AC, Chung MI, Liang R,et al. The role of survivin2 in primitive hematopoiesis during zebrafish development[J]. Leukemia,2009,23(4):712-720.

(责任编辑:关蕴良)