DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.009
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
22 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)01-0022-03

rAAV-2-HBsAg和rAAV-2-GM-CSF共感染增强人外周血单核细胞来源树突状细胞免疫刺激功能

胡贵方[1],俞守义[1],吴小兵[2],尹 芳[3],陈 清[1],候云德[2] (第一军医大学:[1]流行病学教研室,[3]南方医院血液科,广州 510515;[2]中国预防医学科学院病毒学研究所基因工程国家重点实验室,北京 100052)

提 要:目的 探讨rAAV-2-HBsAg(表达乙肝表面抗原的重组腺相关病毒)和rAAV-2-GM-CSF(表达粒细胞/巨噬细胞一集落刺激因子的重组腺相关病毒)共感染对人外周血单核细胞来源树突状细胞(DC)免疫刺激功能的影响。方法 用rAAV-2-HBsAg和rAAV-2-GM-CSF同时感染新分离的树突状细胞;CytoTox 96® Non-Radioactive Ctoxicity Assay试剂盒检测细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应;混合白细胞反应(MLR)检测DC刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力;流式细胞仪检测DC表面分子CD80、CD83、CD86和HLA-DR。结果 rAAV-2-HBsAg和rAAV-2-CM-CSF共感染的DC刺激同种异体淋巴细胞增值的能力和激发的自身淋巴细胞的CTL效应增强,CD83表达水平提高。结论 内源性表达的GM-CSF能促进DC成熟、增强DC的免疫刺激功能。

关键词:重组腺相关病毒,II型;肝炎表面抗原,乙型;粒细胞/巨噬细胞一集落刺激因子;树突状细胞;免疫治疗
中图法分类号:R373;R392.12;R730.51 文献标识码:A

Coinfection of rAAV-2-HBsAg and rAAV-2-GM-CSF enhances the immunostimulatory effect of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells

HU Gui-fang[1], YU Shou-yi[1], WU Xiao-bing[2], YIN Fang[3], CHEN Qing[1], HOU Yun-de[2]([1]Department of Epidemiology, [3]Department of Hematology, First Military Medical University, Guangzhou 510515; [2]State Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China)

Abstract: **Objective** To study the immunostimulatory effect on human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells coinfected with rAAV-2-HbsAg (recombinant adeno-associated virus expressing HBV surface antigen) and rAAV-2-GM-CSF (recombinant adeno-associated virus expressing granulocyte/macrophage colony stimulating factor). **Methods** Newly isolated dendritic cells were coinfected with rAAV-2-HBsAg and rAAV-2-GM-CSF. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) reaction was detected with CytoTox 96® Non-Radioactive Cytoxicity Assay. The abilities of T cell proliferation were evaluated with mixed leukocytes reaction (MLR). Surface markers on DC, including CD80, CD83, CD86, and HLA-DR, were detected by flow cytometry. **Results** DC coinfected with rAAV-2-HBsAg and rAAV-2-CM-CSF had an enhanced ability to stimulate the proliferation of allogeneic T lymphocytes and the generation of CTL by autologus T lymphocytes, and expressed significantly higher levels of CD83. **Conclusion** Endogenous expression of GM-CSF in DC can enhance its immunostimulatory capacity and promote its maturation, and has potential application to DC-based immunotherapy.

Key words: recombinant adeno-associated virus; HBV surface antigen; granulocyte /macrophage colony stimulating factor; dendritic cell; immunotherapy

树突状细胞(dendritic cells, DC)是激发T淋巴细胞介导的免疫反应的专职抗原呈递细胞,以DC为基础的免疫治疗使对抗恶性肿瘤和慢性感染性疾病有了新的希望[1]。GM-CSF不单是维持DC活性、促进DC在体外分化、发育的重要生长因子,它还能增强DC的抗原呈递能力和刺激T细胞增殖的能力[2,3]。章卫平等[4]曾用GM-CSF基因修饰的DC经肿瘤抗原体外致敏后免疫小鼠可产生更强的特异性抗肿瘤免疫反应。重组腺相关病毒(rAAV-2)介导抗原基因感染的DC可刺激抗原特异性的CTL反应产生,但感染DC的成熟程度和CTL反

基金项目:国家"863"高科技发展计划基因治疗重大关键技术资助项目(863-BH03-05-02)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China for the Research of Key Technology for Gene Therapy (863-BH03-05-02)
作者简介:胡贵方(1966—),男,湖南省耒阳市人,博士,讲师,主要从事乙型肝炎免疫治疗方面的研究。电话:(020)61648311
收稿日期:2003-03-16;修回日期:2003-05-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

应的强度还有待进一步提高[5,6]。本研究拟用 rAAV-2-HBsAg 和 rAAV-2-GM-CSF 共感染人外周血单核细胞来源的 DC, 探讨其免疫刺激功能的变化。

1　材料与方法

1.1　载体与细胞

表达乙肝表面抗原主蛋白基因的重组腺相关病毒(rAAV-2-HBsAg)和表达粒细胞—巨噬细胞—集落刺激因子的重组腺相关病毒(rAAV-2-GM-CSF)构建、包装和纯化参照文献[7]进行, 滴度分别为 5×10^{11}、8×10^{11}病毒颗粒数/毫升(virus paticles/ml, vp/ml); 转染 HBV 基因组并表达 HBsAg 的 HepG2.2.15 细胞株由中国预防医学科学院病毒学研究所基因工程国家重点实验室保存; 人白细胞购自北京市北太平庄血站。

1.2　主要试剂

AIM-V 培养液、RPMI1164 培养液和 T 细胞尼龙毛柱购自 Gibco-BRL 公司; G418 购自 Life Technologies™公司, 白介素-2(IL-2)、白介素-4(IL-4)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)购自深圳晶美公司; 淋巴细胞分离液购自北京宝芝林公司; CytoTox 96® Non-Radioactive Cytoxicity Assay 试剂盒购自 Promega 公司。

1.3　人外周血 DC 的分离和培养、病毒的感染

参照文献[5,6]并对感染方法略作改进: 贴壁 2 h, 弃悬浮细胞后立即在 6 孔板中加入 MOI 为 5×10^{6} vp/cell 的 rAAV-2-HBsAg, 或同时加入 MOI 为 1×10^{7} vp/cell 的 rAAV-2-GM-CSF, 总体积为 500 μl, 3 h 后弃去各孔液体, 加入含 GM-CSF(1 000 U/ml)和 IL-4(400 U/ml)的 AIM-V 3 ml 培养液继续培养。

1.4　细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应

1.4.1　靶细胞的制备　复苏的 $HepG_2$.2.15 细胞培养于含 2%的 FBS 的 RPMI1640 中, 加经浓度为 800 μg/ml 的 G418 压力筛选 10 d, 挑取阳性克隆扩大培养作为靶细胞。

1.4.2　效应细胞的制备　分别以培养 7 d 的 rAAV-2-HBsAg 和 rAAV-2-GM-CSF 共感染的 DC(coinfection-DC)、rAAV-2-HBsAg 感染的 DC(rAAV-2-HBsAg-DC)和培养同样长时间未感染的 DC(N-DC)作为刺激细胞, 以经 T 细胞尼龙毛柱分离的自体 T 淋巴细胞为效应细胞。将二者按 1∶10 的比例(刺激细胞比效应细胞, S/E)共孵育 7 d, 同时以不与 DC 共孵育的自体淋巴细胞为对照, 每组设 3 复孔。

1.4.3　CTL 的测定　以 E/T(效应细胞比靶细胞)为 20∶1 和 50∶1, 按 CytoTox 96® non-radioactive cytoxicity assay 试剂盒说明书测定细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应, 以对靶细胞细胞数的杀伤率表示 CTL 活性。CTL 活性(%)=(实验组 LDH 释放值−效应细胞 LDH 释放本底−靶细胞 LDH 释放本底)×100/(靶细胞最大 LDH 释放值−靶细胞 LDH 释放本底)

1.5　混合白细胞反应(MLR)检测 DC 刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力

MLR 中的 T 淋巴细胞与 DC 分别来自不同的自愿献血者, 分别取培养 7 d 的 rAAV-2-HBsAg-DC、coinfection-DC, 以及培养同样长时间 N-DC 用 25 μg/ml 的丝裂霉素 C 在 37 ℃水浴中作用 30 min, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀细胞用 PBS 洗 3 次, 悬浮于 AIM-V 中。分别以 1×10^{5}/孔、2×10^{4}/孔、1×10^{4}/孔、2×10^{3}/孔和 1×10^{3}/孔将 DC 加入 96 孔板中, 以 T 淋巴细胞供者自身的 PBMC 为对照组, 每组 3 个复孔。每孔均加入 1×10^{5} 的 T 淋巴细胞, 刺激应答比(S/R)分别为 1∶1、1∶5、1∶10、1∶50 和 1∶100, 终体积 200 μl, 37 ℃, 5% CO_2 培养 96 h。终止培养前 6 h 加入 MTT 200 μl(5 mg/ml), 培养终止后加酸化异丙醇 100 μl, 充分混匀, 静置数分钟后在波长为 570 nm 处测 *A* 值, 刺激指数(SI)=实验孔 *A* 均值/对照孔 *A* 均值。

1.6　DC 表面标记的 FACS 分析

收集培养 7 d 的共感染 DC、rAAV-2-HBsAg-DC 和 N-DC, 计数, 细胞悬液浓度应≥10^{5}/ml, 分别取 500 μl 细胞悬液加入各测定管中, 用 PE 或 FITC 标记的抗体孵育 30 min, PBS 洗 2 次, 在 FACSort™流式细胞仪(becton dickinson)上检测 DC 表面标记。

1.7　统计学处理

采用 SPSS 软件进行方差分析。

2　结果

2.1　CTL 测定

在 E/T 分别为 20∶1 和 50∶1 时, rAAV-2-HBsAg 和 rAAV-2-GM-CSF 共感染的 DC 所诱发的 CTL 活性分别为 25.63% 和 46.68%, rAAV-2-HBsAg 感染 DC 诱发的 CTL 活性只有 14.33% 和 24.84%, N-DC 组的 CTL 活性只有 12.32%和 6.81%。

2.2　DC 刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力检测

rAAV-2-HBsAg 和 rAAV-2-GM-CSF 共感染的 DC 刺激同种异体淋巴细胞的增值能力明显增强。在 MLR 中, S/R 为 1∶1、1∶5、1∶10 和 1∶50 时, 共感染 DC 组的 SI 值显著高于 rAAV-2-HBsAg-DC 组和 N-DC 组($P<0.01$), 但 rAAV-2-HBsAg-DC 组与 N-DC 组之间无显著性差异($P>0.05$), 见图 1。

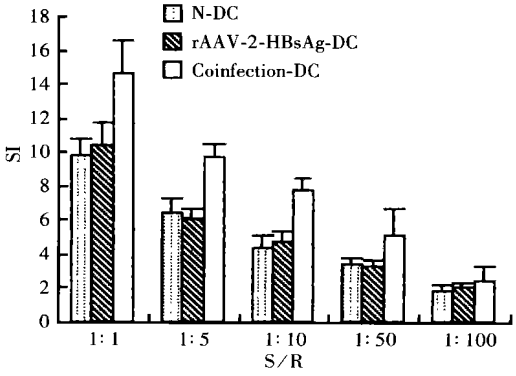


图 1　共感染 DC 刺激 T 细胞增值的能力评价

Fig 1　Evaluation of the ability of DC coinfected with rAAV-2-HBsAg and rAAV-2-GM-CSF to stimulate T cell proliferation

2.3　细胞表型分析

FACS 分析显示, 3 组均高水平表达 CD80、CD86 和 HLADR, CD14(单核细胞表面标记)表达水平较低, 提示本实验从外周血单核细胞所分离的 DC 具有较高的纯度。成熟 DC 的标记——CD83 在 3 组之间表达水平不一样, coinfection-DC 组明显高于 rAAV-2-HBsAg-DC 组和 N-DC 组(图 2)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

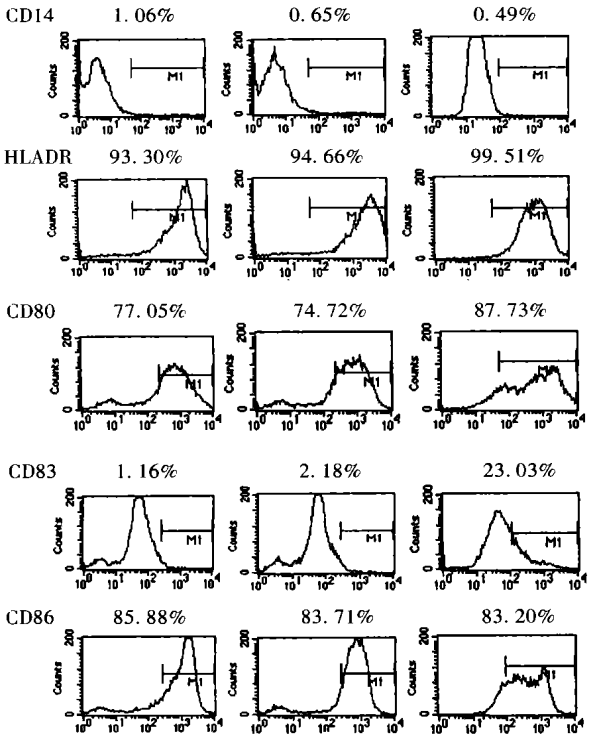


图2 DC表型的FACS分析

Fig 2 Phenotypic analysis of DC by FACS

3 讨论

目前普遍认为,通过各种方式对DC等抗原呈递细胞进行修饰以增强机体的免疫反应是一种行之有效的免疫治疗方案。分离DC的技术发展成熟为精确修饰DC提供了便利条件,从而使以DC为基础的免疫治疗广泛应用于恶性肿瘤、慢性感染性疾病和自身免疫疾病的临床研究变为可能[8]。现阶段修饰DC的方法主要有肿瘤细胞或其裂解产物、抗原肽和抗原蛋白冲击DC,通过病毒载体或非病毒载体等将编码抗原和/或细胞因子的基因导入DC。相比较而言,利用病毒载体介导编码基抗原或/和细胞因子因修饰DC因具有能持续表达、提供更广谱MHC限制性表位并可调节DC表面受体的表达和刺激DC分泌调节免疫反应的细胞因子等优势而受到青睐。作为一种活病毒载体,rAAV-2具有稳定表达、定点整合、安全性较高,且不表达任何病毒自身蛋白基因等优势,是基因治疗研究应用较广泛的载体系统之一。

在免疫治疗方面,rAAV-2介导16型人乳头瘤病毒E6和E7抗原基因感染的DC也可刺激E6和E7特异性的CTL反应产生,但感染的DC免疫刺激功能和成熟度有待进一步增强和提高[5,6]。

本研究结果表明,与rAAV-2-HBsAg单独感染的DC相比,共感染的DC诱发抗原特异性的CTL产生的能力和刺激同种异体淋巴细胞增殖的功能均明显提高和增强。提示用rAAV-2载体介导抗原基因与细胞因子基因共感染DC可能是一种增强DC免疫刺激功能的行之有效的策略。Miller等[9]用表达GM-CSF的重组腺病毒静脉注射小鼠使其在体内过表达,能大幅度增加DC的数量,提高DC摄取抗原的能力和刺激T细胞增值的能力,同时Th2型细胞因子IL-6分泌增多。与之相比,我们所采用的策略似乎稍具优势,因为ex vivo途径在表达方式、时机和表达量等方面更容易调控,从而在临床免疫治疗应用方面更为可行。

CD83是成熟DC重要标志,主要由DC和胸腺上皮细胞表达,在T细胞的分化和发育过程中以及维持DC的抗原呈递功能等方面起重要作用[10]。本实验结果同时也显示共感染可提高DC表面CD83分子的表达水平,这一方面说明DC内源性表达GM-CSF可促进其自身的成熟,另一方面也说明共感染的DC免疫刺激功能增强也可能与CD83分子表达水平提高有关。总而言之,采用共感染策略在一定程度上可弥补rAAV-2载体体外遗传修饰DC的不足之处,因而在恶性肿瘤、慢性乙型肝炎等的以DC为基础的免疫治疗方面具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells[J]. Cell, 2001, 106(3): 263—266.

[2] Banchereau J, Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity [J]. Nature, 1998, 392(6673): 245—252.

[3] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha[J]. J Exp Med, 1994, 179(4): 1109—1118.

[4] 章卫平, 曹雪涛, 张明徽, 等. GM-CSF重组腺病毒扩增的骨髓树突状细胞体外经肿瘤抗原刺激后诱导抗肿瘤免疫应答[J]. 中国免疫学杂志, 1997, 13(1): 29—33.

[5] Chiriva-Internati M, Liu Y, Salati E, *et al*. Efficient generation of cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by adeno-associated virus/human papillomavirus type 16 E7 antigen gene transduction into dendritic cells [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(1): 30—38.

[6] Liu Y, Chiriva-Internati M, Salati E, *et al*. Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(12): 948—957.

[7] 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 等. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法[J]. 科学通报, 2000, 45(19): 2071—2075.

[8] 吴 刚, 韩本立, 裴雪涛. 人树突状细胞体外提呈凋亡胆管癌细胞抗原的研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(2): 142—145.

[9] Miller G, Pillarisetty V G, Shah A B, *et al*. Endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor overexpression *in vivo* results in the long-term recruitment of a distinct dendritic cell population with enhanced immunostimulatory function[J]. J Immunol, 2002, 169(6): 2875—2885.

[10] Fujimoto Y, Tu L, Miller A S, *et al*. CD83 expression influences $CD4^+$ T cell development in the thymus[J]. Cell, 2002, 108(6): 755—767.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net