

· 论 著 ·

基因修饰的树突状细胞体外免疫功能的初步研究

孔练花, 李 军, 韩亚萍, 刘 源, 黄祖瑚

【摘要】 目的 制备转染乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)基因、人外周血单个核细胞(PBMC)来源的树突状细胞(DC)疫苗,观察 HBcAg 的表达效率,检测其在体外诱导的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)对 HepG2. 2. 15 细胞的杀伤效应。**方法** 体外诱导并培养 DC;将 HBcAg 基因导入 DC,检测 HBcAg 的表达率;将基因转染后的 DC 与自体淋巴细胞混合培养,MTT 法检测其对 HepG2. 2. 15 细胞的杀伤毒力。**结果** 成功培养了人外周血 PBMC 来源的 DC,并通过脂质体的方法获得表达 HBcAg 的特异性 DC 疫苗,脂质体转染后 DC 的形态未发生明显变化,CD83 表达增加,与对照组比较有显著性差异。HBcAg 基因转染 DC 后 72 h 的 HBcAg 表达率为 55. 8%;MTT 法检测特异性细胞毒作用结果显示,试验组效靶比为 10: 1、20: 1、40: 1 的杀伤率分别为 $(62. 5 \pm 4. 8)\%$ 、 $(71. 8 \pm 5. 3)\%$ 、 $(81. 5 \pm 5. 0)\%$,与空转组、未转组比较,均有统计学差异(均 $P < 0. 05$)。**结论** 应用阳离子脂质体能有效地将 HBcAg 基因转染到人 PBMC 来源的 DC,转染 HBcAg 基因的 DC 具有诱导 CTL 体外杀伤 HepG2. 2. 15 细胞的作用。

【关键词】 树突状细胞;基因转染,脂质体;T 淋巴细胞,细胞毒性

【中图分类号】 R349. 64 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2011)06-0481-04

The preliminary study on the immune function of the gene modified dendritic cells in vitro

KONG Lian-hua, LI Jun, HAN Ya-ping, LIU Yuan, HUANG Zu-hu. Department of Infection Disease, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China

【Abstract】 Objective To prepare the dendritic cell (DC) vaccine derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and transfected by the cation liposome bearing the hepatitis B core gene in vitro, and to observe the inductive therapeutic effect of cytotoxic T lymphocyte (CTL) on HepG2. 2. 15 cells. **Methods** DC proliferated from human peripheral blood monocytes by adding GM-CSF and IL-4 and PBMC centrifugated by the HES centrifugation were cultured and stimulated into DC by granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4). Their morphology and phenotype were determined by the inverted microscope and flow cytometry respectively. The hepatitis B core gene was transfected into DC on the fifth day by the liposome. The morphology and phenotype of the transfected DC were observed. The expression efficiency of hepatitis B core gene at 72 hours was tested using the flow cytometry. DC vaccine was used to induce specific CTL and subsequently co-cultured with HepG2. 2. 15 cells. The killing effect of CTL against HepG2. 2. 15 was determined using MTT method. **Results** The morphology of the DC transfected by the liposome did not change significantly. The expressing of CD83 in the transfected DC was higher. The expression efficiency of hepatitis B core gene at 72 hours was 55. 8%. The killing effect was higher in transfected DC group than those in untransfected and the vacancy plasmid group ($P < 0. 05$). **Conclusion** Genetically modified DC vaccine can successfully be prepared by liposome, and it has a significant effect on triggering of specific CTL against HepG2. 2. 15 cells.

【Key words】 dendritic cells; gene transfection, liposome; T lymphocyte, cytotoxicity

树突状细胞(dendritic cells, DC)是迄今所知作

用最强的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),能够刺激并致敏 T 淋巴细胞,产生细胞毒性 T 淋巴细胞,从而启动人体的早期免疫反应^[1-2]。但是,在慢性乙型肝炎(CHB)患者中 DC 的功能却是低下的^[3],因此,DC 功能的异常可能导致抗原提呈功能失调,引起体液和细胞免疫紊乱,最终导致患者病情迁延不愈。本研究旨在研究以阳离子脂质体为

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972618)

作者简介: 孔练花(1981-),女,江苏盐城人,硕士,医师,从事病毒性肝炎的免疫学研究

作者单位: 210029 江苏南京,南京医科大学第一附属医院感染病科

通讯作者: 李 军, E-mail: dr_lijun@vip. 163. com

载体将 HBcAg 基因转染入 DC, 研究其抗原的表达效率, 以及其刺激的自体淋巴细胞对 HepG2. 2. 15 细胞的杀伤能力, 为今后基于 HBcAg 基因修饰的 DC 疫苗的临床研究提供实验基础, 现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 15 例慢性乙型肝炎来自江苏省人民医院肝炎门诊及住院患者, 诊断符合乙型病毒性肝炎诊断标准。患者均未经过免疫治疗及抗病毒治疗, 并排除其他肝炎病毒混合感染, 其中男 9 例, 女 6 例。年龄 23 ~ 50 岁, 平均 36. 5 岁。

1.2 主要材料 重组人白细胞介素-4 (IL-4) 购自 Peprotech 公司, 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 购自华北制药厂, 无血清 AIM-V 培养基、胎牛血清、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 及 G418 购自美国 Gibco 公司。单克隆荧光抗体 CD3、CD8、HLA-DR、CD86、CD83、CD1a、CD80、CD40、羊抗鼠单克隆抗体购自美国 BD 公司。含有乙肝核心抗原基因的 pJW4303/HBc 质粒及空质粒 pJW4303 由本科室实验室保存, 质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司, 脂质体转染试剂购自 GTS 公司。HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂购自深圳匹基生物工程股份有限公司, HBV 血清标志物 ELISA 诊断试剂盒购自北京万泰生物药业有限公司。

1.3 DC 的培养及鉴定 新鲜采集慢性乙型肝炎患者抗凝外周血, 按文献方法^[4-5]分离单个核细胞, 以无血清培养基 (AIM-V) 调整细胞浓度至 $5 \times 10^6/\text{ml}$, 接种于 6 孔培养板, 37°C 5% CO_2 孵育 2 h 后移去非贴壁细胞, 补充内含 GM-CSF 1000 U/ml, IL-4 120 U/ml 的无血清培养基继续培养, 1. 5 ml/孔, 隔天换液 1 次。取培养第 5 天的 DC, 用鼠抗人单克隆抗体标记的 FITC 或 PE 的 HLA-DR、CD86、CD1a、CD80、CD83、CD40 染色后流式细胞仪进行检测。

1.4 脂质体介导细胞转染及转染后 DC 表面分子的检测 收集培养第 5 天的 DC 进行计数, 用无血清培养基调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于 6 孔培养板, 1 ml/孔, 加入转染液, 转染液为脂质体质粒 (pJW4303/HBc) 复合物, 脂质体终浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, HBcAg 基因与脂质体比例为 1:5。转染后 24 h 换含 10% 胎牛血清的 AIM-V 培养基。收集转染后 48 h 的 DC, 加入标记有 FITC 或 PE 的鼠抗人单克隆抗体 HLA-DR、CD86、CD1a、CD80、CD40、CD83 各 10 μl , 不同荧光素标记的抗体两两组合成 1 管, 避光反应 30 min。细胞反应完成后, PBS 洗两遍, 重悬后立

即上流式细胞仪进行检测。转染 DC (pJW4303/HBc-DC) 称为试验组, 空质粒转染组 (pJW4303-DC) 称为空转组和未转染 DC 组称为未转组。

1.5 HBcAg 表达率的测定 收集转染 72 h 的 DC, 离心去上清, 经 4% 的多聚甲醛固定后以 PBS 洗涤, 用 0. 1% 皂素破膜, 加鼠抗人单克隆抗 HBcAg 的抗体 2 μl , 37°C 反应 20 min, PBS 洗 2 遍, 加带有 FITC 荧光的羊抗鼠单克隆抗体 2 μl , 37°C 避光反应 20 min, PBS 洗 2 遍后重悬, 立即用流式细胞仪检测, 获取 30 000 个细胞, 以 CellQuest 软件分析数据。

1.6 肝癌细胞系 HepG2. 2. 15 的培养基鉴定 肝癌细胞系 HepG2. 2. 15 由上海第二军医大学缪晓辉教授馈赠, 它整合了 HBV 全基因组, 可分泌 HBsAg 和 HBeAg, 培养在含 10% 胎牛血清以及 380 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的 RPMI-1640 的培养基中, 3 ~ 4 d 换液 1 次, 长到覆盖瓶底 70% ~ 80% 时以含 0. 25% 胰酶与 0. 02% EDTA (乙二胺四乙酸盐) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 消化分瓶。荧光定量 PCR 方法检测培养上清中的 HBV DNA 含量, 乙肝两对半试剂盒检测细胞分泌的抗原情况。

1.7 MTT 法检测 DC 疫苗体外诱导 CTL 对 HepG2. 2. 15 细胞的杀伤作用 收集转染后 48 h 的各组 DC 作为刺激细胞, 复苏自体 T 淋巴细胞作为反应细胞, 将反应细胞与刺激细胞按 10:1 比例混合接种于 24 孔培养板, 1 ml/孔, 于 5% CO_2 孵箱 37°C 培养 5 d, 隔天半量换液 1 次。以对数生长期的 HepG2. 2. 15 细胞作为靶细胞, 将效应细胞与靶细胞按 40:1、20:1、10:1 比例混合接种于 96 孔板中, 终体积为 200 μl , 培养 24 h 后加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl , 继续培养 4 h 后收集细胞, 离心 10 min (3000 转/min, 离心半径 8 cm), 弃去上清, 加入 150 μl 的 DMSO 振荡 10 min, 在酶标仪上检测各组的 $A_{490\text{nm}}$ 值, CTL 杀伤效率 = $[1 - (\text{靶细胞 } A_{490\text{nm}} \text{ 值} - \text{效应细胞 } A_{490\text{nm}} \text{ 值}) / \text{靶细胞 } A_{490\text{nm}} \text{ 值}] \times 100\%$ 。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学分析, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DC 的形态 第 1 天细胞呈规则贴壁生长, 加刺激因子后, 细胞逐渐增大、形态逐渐不规整。第 3 天时可见数量不等的贴壁细胞聚集, 呈单个或簇样生长, 并出现毛刺状突起, 第 5 天细胞胞体继续增大, 胞质突起逐渐丰富清晰, 并逐渐呈悬浮生长。

2.2 HepG2. 2. 15 细胞培养上清的 HBV DNA 定量

以及两对半结果 收集 HepG2. 2. 15 细胞的培养上清, 荧光定量 PCR 方法检测 HBV DNA 结果显示 $(5.5 \pm 0.6) \times 10^5$ 拷贝/ml, 两对半结果为 HBsAg (+), HBeAg (+), 而 HBsAb、HBeAb、HBcAb(-)。

2.3 转染 pJW4303/HBc 后的形态及其细胞表面分子 转染 DC 与未转染 DC 在倒置显微镜下的形态无明显变化, 见图 1; 转染 pJW4303/HBc 组 HLA-DR、CD86、CD1a、CD80、CD40、CD83 的表达率分别为: $(71.60 \pm 3.26)\%$ 、 $(95.86 \pm 1.96)\%$ 、 $(36.43 \pm 3.31)\%$ 、 $(86.70 \pm 3.19)\%$ 、 $(70.13 \pm 1.78)\%$ 、 $(66.70 \pm 2.51)\%$, 未转染组分别为: $(73.15 \pm 3.22)\%$ 、 $(94.83 \pm 3.36)\%$ 、 $(39.35 \pm 3.44)\%$ 、 $(77.73 \pm 2.31)\%$ 、 $(72.73 \pm 4.85)\%$ 、 $(30.63 \pm 3.49)\%$; 转染后的 CD83 比未转染组表达增高, 差异有统计学意义($P=0.007$), 其余的表面分子的表达无明显差异。

2.4 CellQuest 软件分析 HBcAg 的表达率 72 h HBcAg 的表达率为 55.8%, 见图 2。

2.5 CTL 反应测定结果 MTT 结果表明不同效靶条件下试验组能诱导出高特异性的 CTL 杀伤活性, 其杀伤能力与效应细胞数量成正相关($r=0.893$), 试验组显著高于空转组和未转组, 差异均有统计学意义。见表 1。

表 1 不同效靶比时 CTL 对 HepG2. 2. 15 的杀伤率比较(%)

组别	效靶比		
	10:1	20:1	40:1
未转组	16.1±3.3	33.6±5.2	44.0±3.7
空转组	19.5±1.5**	36.8±3.0**	43.8±4.4*
试验组	62.5±4.8△△	71.8±5.3△	81.5±5.0△

注: 与未转组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与空转组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$

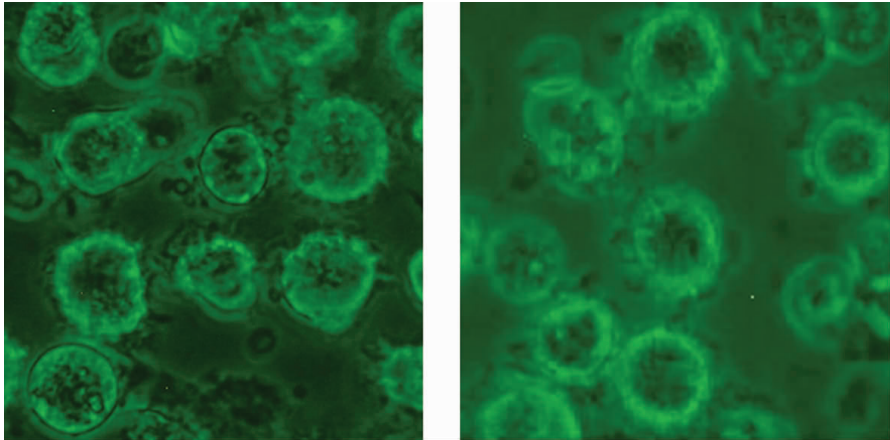


图 1 DC 在倒置显微镜下的形态 (×400), 左图为未转染 DC, 右图为转染后 DC

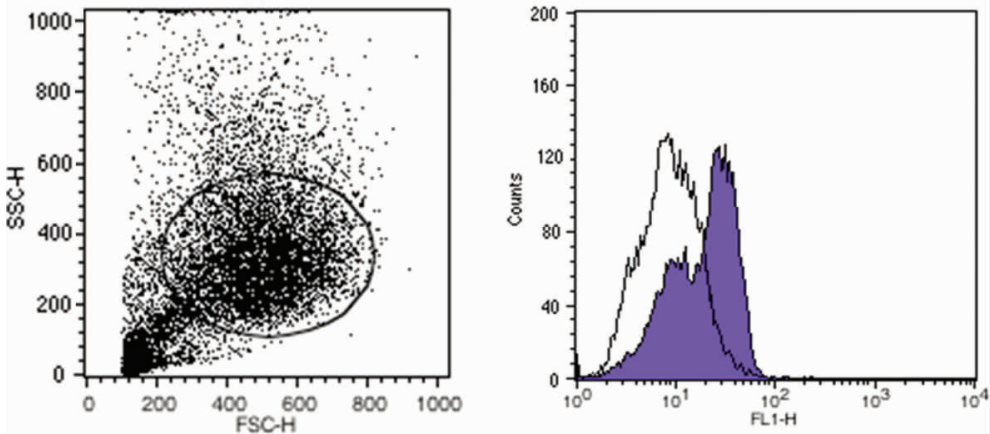


图 2 转染 HBcAg 72h 的 DC 与未转染的 DC 在流式细胞仪上以 CellQuest 软件叠加 (overlay) 的结果, 无填充色的代表未转染 DC, 有填充色的代表转染 DC

3 讨 论

慢性乙型肝炎患者在 HBV 持续感染的状态下, APC 无法识别内源性抗原,无法完成抗原摄取及提呈功能,因而不能启动抗原特异性免疫应答,改善 DC 功能以打破慢性 HBV 感染形成的免疫耐受^[6-7]。在打破机体的免疫耐受中,增强 DC 介导的特异免疫反应就有可能终止慢性 HBV 感染。肝炎病毒抗原基因转染的 DC 疫苗因其能够直接在 DC 中表达抗原蛋白,提供更多更有效的可供识别的抗原表位递呈给 T 淋巴细胞,而且可以在体内较长期表达目的蛋白,持续刺激免疫系统,诱导产生更为有效的抗病毒特异性免疫应答,因而有可能成为最具有发展前途的慢性病毒性肝炎的免疫治疗手段。

鉴于以上的设想,本研究采用脂质体的方法转染 HBcAg 基因至人 DC,构建人 HBcAg 核酸 DC 疫苗。通过观察其活化自身 T 淋巴细胞对 HepG2. 2. 15 细胞的杀伤情况,研究慢性乙型肝炎患者自体核酸 DC 疫苗诱导产生特异性细胞免疫应答的能力,探索慢性乙型肝炎免疫治疗的新策略。本课题以 HepG2. 2. 15 为靶细胞,研究显示 HBcAg 基因转染后的 DC,可明显增强自身 T 淋巴细胞对 HepG2. 2. 15 细胞的杀伤活性,最大杀伤率可达 81. 5%,其杀伤活性显著高于转染空质粒组的 DC 及未转染的 DC 刺激的 T 细胞; DC 刺激 T 细胞增殖的活性随着 DC 量的增加而提高。

由此可见,转染 HBcAg 基因后的 DC 能够有效的活化自身的 T 淋巴细胞,产生针对病毒的特异性细胞毒性 T 淋巴细胞反应,对 HepG2. 2. 15 细胞有显著的杀伤作用,同时也可增强自身 T 淋巴细胞产生细胞因子的功能,因而推测其诱导的 CTL 抗病毒免疫机制可能包括直接攻击受感染的细胞或与细胞因子(如 IL-12、IL-2 和 IFN- γ 等)的联合作用来清除病毒。机体清除乙型肝炎病毒的最重要方式之一是通过依赖于 HLA- I、II 类分子限制的 CD8 细胞

CTL 介导的细胞免疫应答,而在 HBV 慢性感染者体内 CTL 介导的免疫应答往往是低下的。本研究结果提示脂质体转染 HBcAg 基因后促使 DC 成熟(CD83 表达增加),产生有效的 CTL 应答反应发挥清除病毒的作用,该研究结果将为治疗性核酸 DC 疫苗的临床应用奠定了良好的实验基础。

总之,肿瘤 DC 疫苗的基础研究和临床免疫治疗所获得的可喜结果,也为慢性感染性疾病的治疗性 DC 疫苗的研究和应用展示了诱人的前景。以 HBcAg 基因转染构建自体核酸 DC 疫苗,将有可能改善慢性乙型肝炎患者的 DC 功能,打破患者的特异性免疫耐受,而成为慢性肝炎治疗的新策略^[8]。

【参考文献】

- [1] Lu FM, Zhuang H. Management of hepatitis B in China [J]. ChinMed J, 2009, 122(1): 3-4.
- [2] 冯晓霞,王磊,邢练军. 树突状细胞在慢性乙型肝炎发病中的研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(2): 144-147.
- [3] Arima S, Akbar SM, Michitaka K, et al. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: Localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization [J]. Int J Mol Med, 2003, 11(2): 169-174.
- [4] 韩亚萍,刘源,章莉莉,等. 不同方法分离外周血单个核细胞对树突状细胞增殖的影响[J]. 放射免疫学杂志, 2004, 17(4): 315-316.
- [5] 韩亚萍,李军,刘源,等. 外周血树突状细胞免疫治疗体外培养条件的优化[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(8): 852-854.
- [6] Akbar SM, Horiike N, Onji M. Immune therapy including dendritic cell based therapy in chronic hepatitis B virus infection [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(18): 2876-2883.
- [7] Fajardo-Moser M, Berzel S, Moll H. Mechanisms of dendritic cell-based vaccination against infection [J]. Int J Med Microbiol, 2008, 298(1-2): 11-20.
- [8] 汪茂荣. 解读《2008 亚太肝病研学会慢性乙型肝炎防治指南》[J]. 东南国防医药, 2008, 10(4): 241-242.

(收稿日期: 2011-10-08; 修回日期: 2011-10-23)

(本文编辑: 潘雪飞; 英文编辑: 王建东)