

· 论 著 ·

慢病毒载体介导的 $TGF-\beta 1$ 基因修饰小鼠未成熟树突状细胞的实验研究*陈 亮, 许 飞, 温桂兰[△]

(南昌大学第一附属医院呼吸内科, 江西南昌 330006)

摘 要:目的 探讨慢病毒载体介导的转化生长因子 $\beta 1$ ($TGF-\beta 1$) 基因修饰小鼠未成熟树突状细胞 (iDCs) 的方法。方法 体外原代培养小鼠骨髓细胞, 经粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和白细胞介素 4 (IL-4) 诱导以及抗 CD11c 抗体包被的免疫磁珠分选获得 iDCs, 取部分 iDCs 经肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导为成熟 DCs (mDCs), 用光学显微镜观察细胞形态, 流式细胞术分析细胞的表面分子。将 iDCs 分为感染组 [感染携带绿色荧光蛋白 (GFP) 与 $TGF-\beta 1$ 基因的慢病毒颗粒]、感染对照组 (感染携带 GFP、不携带 $TGF-\beta 1$ 基因的慢病毒颗粒) 及空白对照组 (未感染慢病毒颗粒)。采用倒置荧光显微镜及酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对各组 iDCs 中 GFP 及 $TGF-\beta 1$ 的表达进行检测。结果 经体外诱导培养及免疫磁珠分选后, 获得大量高纯度 iDCs, 随培养时间延长, iDCs 表现出典型的树突状形态; iDCs 表面 MHC II、CD80 及 CD86 表达水平均明显低于 mDCs。感染组 iDCs 中 GFP 与 $TGF-\beta 1$ 蛋白表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$)。结论 携有 $TGF-\beta 1$ 基因的慢病毒成功感染小鼠 iDCs, 并使其表达目的蛋白。

关键词: 树突细胞; 转化生长因子 β ; 慢病毒感染; 转导, 遗传; 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.17.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)17-1665-03

Experimental research of lentivirus vector-mediated $TGF-\beta 1$ gene-modified immature dendritic cells in mice*Chen Liang, Xu Fei, Wen Guilian[△]

(Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: **Objective** To discuss the method of modification of immature dendritic cells (iDCs) in mice by lentivirus vector-mediated transforming growth factor-beta1 ($TGF-\beta 1$) gene. **Methods** Mice bone marrow cells were primary cultured *in vitro*, induced by granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4), and sorted by anti-CD11c antibody-coated immunomagnetic beads to obtain iDCs. Some iDCs were induced into mature DCs (mDCs) by tumor necrosis factor- α (TNF- α). The morphological changes of DCs were observed by optical microscope and the cellular surface molecules of DCs were detected by flow cytometry. iDCs were divided into 3 groups: infection group [infected with lentiviral particles carrying green fluorescent protein (GFP) and $TGF-\beta 1$ gene], infection control group (infected with lentiviral particles carrying GFP, but no $TGF-\beta 1$ gene) and blank control group (not infected with lentiviral particles). Inverted fluorescence microscope and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were employed to detect the expression of GFP and $TGF-\beta 1$ of iDCs. **Results** A large number of high-purity iDCs were obtained through induction culture *in vitro* and immunomagnetic beads sorting. With the incubation time, iDCs exhibited typical dendritic morphology. Expression levels of MHC II, CD80 and CD86 on the surface of iDCs were markedly lower than those on the surface of mDC. Expression levels of GFP and $TGF-\beta 1$ protein in iDCs in infection group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Lentivirus carrying $TGF-\beta 1$ gene can successfully infect mice iDCs, and cause them to express target protein.

Key words: dendritic cells; transforming growth factor beta; lentivirus infections; transduction, genetic; granulocyte macrophage colony-stimulating factor

树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 是体内最重要的抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC), 是启动、调控和维持免疫应答的中心环节^[1-2]。成熟 DCs (mature DCs, mDCs) 能刺激免疫应答, 未成熟 DCs (immature DCs, iDCs) 则通过表达低水平的共刺激因子介导免疫耐受 (immunological tolerance)^[3-7]。

然而, iDCs 自身稳定性差, 易受周围环境刺激发生诱导成熟而失去其原有的免疫耐受介导作用。有研究发现转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, $TGF-\beta 1$) 具有抑制 DCs 成熟的生物学活性, 是维持 DCs 未成熟状态的重要因子^[8]。目前, 还没有找到理想的载体使 $TGF-\beta 1$ 基因修饰 iDCs 以保

持后者长期稳定的免疫耐受的介导作用, 研究人员多采用质粒、脂质体及腺病毒等载体进行基因修饰实验, 但这些载体都存在转染效率低及稳定性差等不同程度的缺陷。本实验采用慢病毒这一新型载体作为媒介, 通过感染小鼠 iDCs 达到对其进行基因修饰的目的, 为后续的体内免疫耐受实验打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 4~6 周龄无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 BALB/c 雌性小鼠购自军事医学科学院动物中心, 动物合格证号: SCXK (军)-2007-004。实验过程中对动物处置方法符合动物伦理学要求。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860105)。 [△] 通讯作者, Tel: 13707089818; E-mail: guilianwen2008@sina.com。

1.2 主要试剂与仪器 RPMI-1640 细胞培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司;重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant murine granulocyte macrophage colony-stimulating factor, rmGM-CSF)、重组小鼠白细胞介素 4(recombinant murine interleukin-4, rmIL-4)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)均购自英国 PeproTech 公司;CD11c 免疫磁珠为德国 MiltenyiBiotec 公司产品;APC 标记的抗小鼠白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD)11c 单抗(克隆号 HL3)购自美国 BD Pharmingen 公司;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗小鼠 CD86 抗体(克隆号 GL-1)、APC 标记的抗小鼠 CD80 抗体(克隆号 16-10A1)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗小鼠主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC) II 分子抗体(克隆号 14-4-4S)均购自美国 eBioscience 公司;TGF- β 1 及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)慢病毒颗粒由本实验室构建包装,病毒滴度为 2×10^8 TU/mL;TGF- β 1 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒为美国 R&D 公司产品;主要实验仪器包括免疫磁珠分离仪(MiltenyiBiotec 公司)、流式细胞仪(德国 Leica 公司)及 CK40-F200 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)等。

1.3 骨髓细胞的制备 将 BALB/c 雌鼠采用颈椎脱臼法处死,浸泡于 75%乙醇 5 min,无菌条件下取双侧胫、股骨,注意游离关节,保持长骨的完整。剔净附着的肌肉,剪开骨两端,用 1 mL 注射器吸取无血清 RPMI-1640 细胞培养基,反复冲洗骨髓腔直至发白,用 50 mL 离心管收集冲洗出的骨髓液。用 400 目滤网滤除骨髓悬液中的组织碎块,加入预热 37 °C 的 Tris-NH₄Cl 裂解液,混匀后静置 2 min,加 5 mL 无血清 RPMI-1640 细胞培养基终止反应。4 °C 250 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液以除去已裂解的红细胞,用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基重悬,细胞计数,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。

1.4 DCs 的诱导扩增及分选 将培养基以 2 mL/孔接种于 6 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。4 h 后轻摇培养板,吸弃培养基和悬浮细胞,保留贴壁和半贴壁细胞,按 2 mL/孔重新加入含 rmGM-CSF(20 ng/mL)、rmIL-4(2 ng/mL)及 10%FBS 的 RPMI-1640 完全培养基继续培养,其后隔日半量换液,并补充等剂量的细胞因子。第 7 天轻轻吹打培养板,收集悬浮细胞,用磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤细胞 2 次,加入 CD11c 免疫磁珠,4 °C 反应 20 min,离心洗涤后将细胞悬液加入免疫磁珠分离仪中进行分离纯化,获取 CD11c 阳性的骨髓来源 iDCs,取部分细胞加入 TNF- α (10 ng/mL)诱导其成熟,继续培养 2 d 后收集,即为 mDCs,备用于后续试验。用光学显微镜观察培养第 2、5、7 天的 DCs 形态及数量变化,并拍照。取第 7 天的 iDCs 悬液 10 μ L 滴于玻片上,用 2%台盼蓝染色,光镜下观察 200 个细胞,计算细胞存活百分率(细胞存活百分率=活细胞数/所有细胞数)。

1.5 DCs 表型分析 分别收集培养第 7 天的 iDCs 悬液及第 9 天的 mDCs 悬液,细胞计数均为 0.5×10^6 个细胞,离心后用 PBS 重悬,调整细胞密度为 5×10^5 /mL,分别加入 1 μ g 的 FITC-抗鼠 CD11c、FITC-抗鼠 CD86、APC-抗鼠 CD80 及 PE-抗鼠 MHC II 抗体,4 °C 避光孵育 30 min,每 10 min 混匀 1 次,加入 PBS,400 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液以去除未结合抗体,沉

淀细胞用含 0.5%甲醛的 PBS 液 200 μ L 避光混匀、固定,用流式细胞仪检测其表面标记。

1.6 TGF- β 1 慢病毒颗粒感染 将 iDCs 分为感染组(感染携带 GFP 与 TGF- β 1 基因的慢病毒颗粒)、感染对照组(感染携带 GFP、不携带 TGF- β 1 基因的慢病毒颗粒)及空白对照组(未感染慢病毒颗粒)。感染前,iDCs 以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,过夜后换新鲜培养基,感染组 iDCs 加入 1×10^8 TU/mL 的 GFP、TGF- β 1 慢病毒液 20 μ L;感染对照组 iDCs 加入同滴度等体积 GFP 慢病毒液;空白对照组 iDCs 加入等体积 PBS。培养 24 h,换新鲜培养基继续培养 24 h 后,在荧光显微镜下观察 iDCs 中 GFP 蛋白的表达情况,并估测其感染效率。

1.7 TGF- β 1 表达水平 按照试剂盒说明书用标准稀释缓冲液溶解重组的标准品(浓度 10 mg/mL),振荡混匀 10 min,加 0.02 mL 标准液到 0.98 mL 标准稀释缓冲液中,此后依次对倍稀释,配成 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25、0 pg/mL 共 8 个标准点。于 96 孔板的各孔中分别加 100 μ L 标准液和样本,空白孔加稀释液,加 100 μ L 酶联抗体,封膜,37 °C 孵育 1 h,弃去反应孔内液体,用洗涤液注满各孔,静置 1 min,甩干,洗 4 次,加 50 μ L 显色剂,封膜,室温暗室孵育 15 min,每孔加 50 μ L 终止液,混匀,在 450 nm 处测吸光度值,计算上清液中 TGF- β 1 浓度。

1.8 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 iDCs 的形态学观察 小鼠骨髓细胞诱导培养 2 d 后,可见部分细胞悬浮并相互聚集,见封 2 图 1。细胞如图中箭头所示。随培养时间的增加,细胞体积逐渐增大,细胞由规则均一圆形变为大小不等的不规则形状,细胞边缘出现大量细突起,呈树枝状,毛刺更加明显。经台盼蓝染色后,镜下计数细胞,其存活率为 92%。

2.2 iDCs 的表型 iDCs 及 mDCs 均高表达 CD11c; iDCs 的 CD80、CD86 及 MHC II 的表达分别为(11.3 $\pm$ 1.2)%、(22.6 $\pm$ 2.7)%及(33.9 $\pm$ 3.3)%,mDCs 的 CD80、CD86 及 MHC II 的表达分别为(26.3 $\pm$ 1.3)%、(43.6 $\pm$ 1.6)%及(85.7 $\pm$ 3.5)%,见图 2。iDCs 的 CD80、CD86 及 MHC II 表达均明显低于 mDCs,符合其低表达的特征^[9-10]。

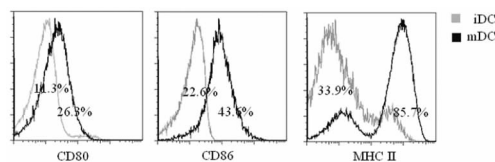


图 2 iDCs 和 mDCs 表面分子 CD80、CD86 及 MHC II 的表达情况(流式细胞术)

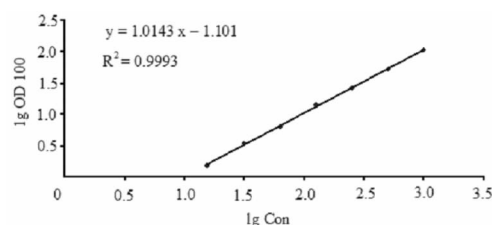


图 4 TGF- β 1 标准曲线

2.3 DCs 的慢病毒颗粒感染 感染组和感染对照组均高表达 GFP,感染效率为 75.5%左右,见封 2 图 3。

2.4 iDCs 的 TGF- β 1 表达水平 感染组 iDCs 的 TGF- β 1 表达水平明显高于感染对照组及空白对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),感染对照组与空白对照组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 4、5。

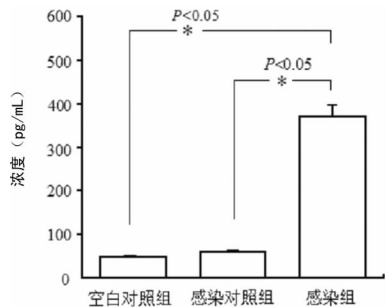


图 5 各组 iDCs TGF- β 1 表达的比较

3 讨 论

DCs 作为免疫学研究热点,在人体内分布广泛,但数量甚微,在外周血单核细胞中 DCs 不足 1%。通过细胞因子诱导体外培养 DCs 的方法,可获得大量较高纯度的 DCs,为进一步研究 DCs 的生物学功能创造了有利条件^[11-12]。DCs 的诱导培养可采用不同细胞因子的组合,其中 GM-CSF 和 IL-4 是公认的最基本的细胞因子。GM-CSF 可诱导 DCs 前体细胞产生 DCs 和巨噬细胞,但以巨噬细胞为主,IL-4 可抑制单核细胞向巨噬细胞转化,因此,GM-CSF 联合 IL-4 可使 DCs 所占比例增加而巨噬细胞相应降低^[13]。本研究通过 rmGM-CSF 和 rmIL-4 联合诱导骨髓单核细胞,根据 DCs 与其他细胞的黏附特性不同,采用贴壁分离的方法依次离弃杂质细胞,再对所收获细胞采用免疫磁珠分选法进行提纯,并对其形态、表面分子进行鉴定证实,此法可获得大量高纯度的 iDCs。

目前较常用的基因治疗载体有逆转录病毒、腺病毒及慢病毒载体。逆转录病毒载体虽可使目的基因整合至靶细胞基因组并实现稳定表达,但其缺点在于无法感染不分裂细胞。有研究发现腺病毒载体可通过感染小鼠骨髓来源的 DCs,使之表达病毒所携带的目的基因,具有表达时间快、效率高的优点^[14],由于病毒基因组游离于宿主基因组外,仅能瞬时表达外源基因,无法实现稳定表达;另外,腺病毒载体有较高的免疫性,会诱导 DCs 成熟^[15]。慢病毒载体是一种复制缺陷型逆转录病毒载体,其病毒基因组是 RNA 病毒,可整合于宿主基因中而使宿主长期、稳定表达外源基因,并且免疫反应小,可同时感染分裂期细胞和非分裂期细胞,主要缺点是感染所需时间较长。慢病毒载体是目前研究 DCs 基因治疗方面的最佳载体,日益受到重视。本实验将 TGF- β 1 过表达的慢病毒载体稳定感染 iDCs,48 h 后置于倒置荧光显微镜下观察发现 GFP 高表达,感染对照组同样高表达 GFP,说明该病毒基因组已成功转导进入 DCs 宿主内;另外,通过 ELISA 测定上清液 TGF- β 1 表达水平的结果亦证明了以上的结论。

综上所述,本研究通过 rmGM-CSF 和 rmIL-4 联合诱导小鼠骨髓单核细胞,扩增出大量高纯度的 iDCs 细胞,并将携带有 TGF- β 1 目的基因的慢病毒载体稳定感染进 iDCs 中,使其获得高分泌 TGF- β 1 蛋白的特征,为进一步研究 TGF- β 1 及 iDCs 对诱导体内免疫耐受的影响提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Gatti E, Pierre P. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(4): 468-473.
- [2] Santiago-Schwarz F. Positive and negative regulation of the myeloid dendritic cell lineage[J]. J Leukoc Biol, 1999, 66(2): 209-216.
- [3] Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, et al. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion[J]. J Immunol, 1996, 157(4): 1406-1414.
- [4] Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines[J]. Cell, 2001, 106(3): 255-258.
- [5] Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity[J]. Trends Immunol, 2002, 23(9): 445-449.
- [6] Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses[J]. Nat Immunol, 2010, 11(8): 647-655.
- [7] Yu P, Xiong S, He Q, et al. Induction of allogeneic mixed chimerism by immature dendritic cells and bone marrow transplantation leads to prolonged tolerance to major histocompatibility complex disparate allografts[J]. Immunology, 2009, 127(4): 500-511.
- [8] 郭庆东, 李兵, 章翔, 等. TGF- β 1 基因转染对未成熟树突状细胞表型和功能的影响[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2008, 7(3): 227-231.
- [9] 余思, 何晓顺, 胡安斌, 等. 雷帕霉素联合未成熟树突状细胞诱导小鼠皮肤移植免疫耐受[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(3): 399-402.
- [10] Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, et al. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells[J]. Immunol Cell Biol, 2002, 80(5): 477-483.
- [11] Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. J Exp Med, 1992, 176(6): 1693-1702.
- [12] Li GB, Lu GX. Adherent cells in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced bone marrow-derived dendritic cell culture system are qualified dendritic cells[J]. Cell Immunol, 2010, 264(1): 4-6.
- [13] 李国用, 罗云萍, 梁增伟, 等. 人外周血树突状细胞的体外培养扩增[J]. 重庆医科大学学报, 2001, 26(1): 1-3.
- [14] 许飞, 陈传辉, 林耀广, 等. 小鼠白细胞介素 10 重组腺病毒载体构建及对树突状细胞的基因修饰[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(5): 848-853.
- [15] 包杰, 王前, 郑磊, 等. 慢病毒载体介导的小鼠骨髓树突状细胞 RelB 基因沉默[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(9): 857-860.