

人 FasL 基因转染成熟树突状细胞对 T 淋巴细胞增殖和凋亡的影响 *

周 浩¹⁾ 陈专华¹⁾ 邢增术¹⁾ 王 刚¹⁾ 罗志刚¹⁾ 秦国庆¹⁾ 李建军¹⁾
钱 坤¹⁾ 蒋鸿涛¹⁾ 王 芳²⁾ 王 毅^{1)**} 廖端芳^{3)**}

(¹⁾ 南华大学附属第二医院肾移植科, 衡阳 421001; ²⁾ 长沙民政职业技术学院, 长沙 410004; ³⁾ 湖南中医药大学诊断学教研室, 长沙 410208)

摘要 探讨转染人 FasL 基因的成熟树突状细胞(DC)对异体 T 淋巴细胞增殖和凋亡的影响, 为实现临床器官移植免疫耐受提供初步实验依据。从健康成年人外周静脉血中获得成熟树突状细胞。将人 FasL 基因成功转染成熟树突状细胞, 检测其表面分子的表达和自身凋亡情况, 并对其抗原递呈功能进行分析。从异体健康成人外周血中获取 T 淋巴细胞, 将转染成功的树突状细胞与 T 淋巴细胞混合培养, 检测其对 T 淋巴细胞增殖和凋亡的影响。结果表明: 人 FasL 基因转染没有明显影响成熟树突状细胞表面分子 CD40、CD80、CD86 和 HLA-DR 的表达; 没有诱导树突状细胞自身发生凋亡; 没有影响 DC 的抗原递呈功能。转染 FasL 基因后的树突状细胞使异体 T 淋巴细胞刺激指数明显下降, 凋亡增加。因此认为, 人 FasL 基因转染对成熟树突状细胞的表面分子表达、自身凋亡、抗原递呈等生物学性状无影响; 转染 FasL 基因的树突状细胞使异体 T 淋巴细胞的增殖能力减弱, 并能明显诱导 T 淋巴细胞凋亡。

关键词 树突状细胞, FasL, 转染, 凋亡, 免疫耐受

学科分类号 R392.4, [R34]

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00222

器官移植是目前治疗终末期器官功能衰竭最有效的手段之一。免疫抑制剂虽能较好地防治移植排斥反应, 保证移植植物在一定时间内的存活, 但具有诱发肿瘤、机会菌感染、移植物失功等毒副作用, 且价格昂贵需要终身服药, 给患者在生理、心理及经济上带来沉重负担。因此在移植中获得免疫耐受成为人们所追求的目标。诱导特异性的免疫耐受不仅可以预防急性和慢性排斥反应, 避免长期服用免疫抑制剂从而减少了药物的毒副作用^[1], 而且减少诱发肿瘤、机会菌感染等风险, 为器官移植开辟新的篇章。移植排斥反应主要由反应性 T 淋巴细胞介导, 如果能够诱导这些特异性的 T 淋巴细胞凋亡, 那么, 受者处于免疫耐受状态, 移植器官则可以免遭排斥。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内最强的抗原递呈细胞。DC 与其他抗原递呈细胞相比其最大的特点是能显著刺激初始型 T 细胞增殖, 是唯一能激活初始免疫应答的抗原递呈细胞(antigen

present cell, APC)^[2]。来源于骨髓的 DC 前体经血液循环进入非淋巴组织, 分化为未成熟 DC (immature dendritic cell, imDC), 摄取了抗原后迁移到次级淋巴组织, 在迁移的过程中, DC 逐渐发育成熟, 形成成熟 DC(mature dendritic cell, mDC)。成熟 DC 高表达 MHC- II 分子和 CD40、CD80、CD86 等共刺激分子, 这些都是 T 细胞免疫应答所必需的信号分子^[3], 选择并激活有相应抗原受体的 T 细胞, 从而激活免疫应答。

Fas-Fas 配体(Fas ligand, FasL)是细胞凋亡系统之一。FasL 与 Fas 阳性细胞结合可促进 Fas 阳性

* 国家自然科学基金(30972998), 国家高技术研究发展计划(863)(2007AA02Z407), 湖南省教育厅重点项目(09A079)和湖南省自然科学基金(07JJY3032)资助项目。

** 通讯联系人。

王 毅. Tel: 0734-8899692, E-mail: wayne0108@126.com

廖端芳. Tel: 0731-88458002, E-mail: dfliao66@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-04, 接受日期: 2011-02-23

细胞的凋亡. FasL 在人体中分布相当有限, 主要表达于激活的 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞和免疫豁免区域^[4], 如睾丸基质细胞、角膜、虹膜、视网膜上皮细胞. FasL 具有保护机体免疫恒定^[5]、维持眼前房^[6]和睾丸生精细胞^[7]等免疫豁免组织的功能和维护肿瘤逃避机体免疫监督的作用^[8].

本试验将人 FasL 基因转染 mDC, 检测 mDC 中 FasL 基因的 mRNA 表达和 FasL 蛋白表达水平, 了解 FasL 基因转染对 mDC 生物学性状的影响. 将表达 FasL 的 mDC 与异体 T 淋巴细胞混合培养, 观察其对异体 T 淋巴细胞的增殖、活化及凋亡的影响, 探讨 FasL 诱导免疫耐受的可能机制.

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

PE anti-human CD1a、CD40、CD80 (B7-1)、CD83、CD86 (B7-2)、CD95 Ligand (FasL)、HLA-DR、Cocktail of PE Mouse IgG1 Isotype Control、7-AAD Viability Staining Solution (eBioscience 公司); Annexin V (human)(recombinant) (R-PE) (Alexis 公司); human IL-4、GM-CSF、TNF- α (Peprotech 公司); RPMI Media 1640 (GIBCO 公司); 卵清蛋白 (Sigma 公司); pEGFP-N1-FasL (BC017502, 武汉晶赛生物工程技术公司构建)、pEGFP-N1 (武汉晶赛生物工程技术公司提供); 脂质体转染剂 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司); 人 T 细胞富集柱试剂盒 (R&D 公司); DMSO、MTT (MP-biomedicals 公司); PVDF 膜 (Amersham 公司); 人淋巴细胞分离液 (上海恒信化学试剂有限公司); 丝裂霉素 (晶美生物公司); 倒置相差显微镜、荧光显微镜 (Olympus 公司); 扫描电镜 (AMRAY INC 公司); 流式细胞仪 (BECKMAN 公司); Safire 2 多功能酶标仪 (Tecan 公司); 蛋白质半干转印仪 (Bio-Rad 公司).

1.2 树突状细胞(DC)分离培养及鉴定

采集外周静脉血 300 ml, 利用密度在 (1.077 ± 0.001) g/L 之间近于等渗的 Ficoll-Hypaque 混合溶液 (称为淋巴细胞分离液) 作密度梯度离心, 收集外周血单个核细胞 (PBMC). PBMC 中含有多能造血干细胞, 依据 DC 前体细胞与其他细胞贴壁能力不同而富集、纯化, 得到 DC 前体细胞. 加入细胞因子 hGM-CSF (100 μ g/L)、hIL-4 (50 μ g/L), 然后置 37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱内培养, 记为 DC 培养第 0 天. 每 3 天更换培养液并补加细胞

因子. 培养第 6 天加入细胞因子 hTNF- α (10 μ g/L), 以促进 DC 成熟.

每天在倒置显微镜下观察培养 DC 的细胞数目、形状、外观、生长状况等, 并分别于第 1、4、7、10 和 14 天在倒置显微镜下拍照. 取培养的第 7 天 DC 行扫描电镜观察. 分别取培养的第 3 天和第 7 天的 DC 行流式细胞术检测细胞表面分子 CD1a、CD83 和 CD80 表达情况.

1.3 实验分组及基因转染

pEGFP-N1-FasL 质粒构建: 获取人 FasL 基因 (BC017502), PCR 扩增 FasL 基因, 连接 PCR 产物至 T 载体中并送交基因测序. 取 DNA 基因序列完全正确的 FasL 片段将其亚克隆至真核表达载体 pEGFP-N1 上, *Xho* I, *Pst* I 双酶切鉴定, 成功构建 pEGFP-N1-FasL (由武汉晶赛生物工程技术公司构建, 并提供真核表达载体 pEGFP-N1).

实验分 3 组: a. 实验组 (FasL-DC 组): 用脂质体转染剂 Lipofectamine™ 2000 将 pEGFP-N1-FasL 质粒转染至成熟 DC; b. 对照组 (Control DC 组): 用脂质体转染剂 Lipofectamine™ 2000 将 pEGFP-N1 质粒转染至成熟 DC; c. 空白组 (未转染 DC 组): 未转染的成熟 DC.

在 DC 培养的第 7 天, 收集所培养的 DC, 分成 3 组, 用脂质体转染剂 Lipofectamine™ 2000 按分组分别进行转染 (按脂质体转染剂 Lipofectamine™ 2000 操作步骤进行转染).

1.4 FasL 基因转染成熟 DC 后鉴定

1.4.1 荧光显微镜下观察 EGFP 绿色荧光表达. 转染 24 h 后, 荧光显微镜下观察转染组 DC 报告基因 EGFP 的绿色荧光蛋白表达, 以观察转染效率.

1.4.2 RT-PCR 检测 FasL 基因 mRNA 表达. 转染 48 h 后, 分别提取实验组、对照组和空白组 DC 的总 RNA. 将提取的 RNA 进行 RT-PCR, 再将 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳确认.

1.4.3 流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测 FasL 基因蛋白质表达. 转染 72 h 后, 分别收集实验组、对照组和空白组 DC. 用流式细胞术检测 FasL 基因蛋白质表达情况.

1.5 FasL 基因转染对 DC 生物学性状的影响

观察 FasL 基因转染对 DC 生物学性状的影响. 包括 DC 表面分子表达情况, DC 自身凋亡情况, DC 的抗原递呈功能分析.

1.5.1 FCM 检测 DC 表面分子表达. 收集转染 72 h 后的实验组、对照组和空白组 DC. 用流式细胞术

检测细胞表面分子 CD40、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、和 HLA-DR 的表达情况。

1.5.2 FCM 检测 DC 自身凋亡. 收集转染 72 h 后的实验组、对照组和空白组 DC, 应用流式细胞术采用 PE-Annexin-V/7-AAD 双染法进行细胞凋亡检测. PE-Annexin-V(-)/7-AAD(-)细胞, 即正常活力细胞; PE-Annexin-V(+)/7-AAD(-)细胞, 即凋亡细胞; PE-Annexin-V(+)/7-AAD(+)细胞和 PE-Annexin-V(-)/7-AAD(+), 即已死亡细胞。

1.5.3 DC 的抗原递呈功能分析. 收集转染 24 h 后的实验组、对照组和空白组 DC, 用含有卵清蛋白(OVA, 125 mg/L)的 1640 培养基调整细胞浓度 $2 \times 10^6/\text{ml}$. 收集人 T 杂交瘤细胞, 用含有卵清蛋白(OVA, 125 mg/L)的 1640 培养基调整细胞浓度 $2 \times 10^7/\text{ml}$. 3 组 DC 分别以一定的体积比 1:1 与 T 杂交瘤细胞(即细胞浓度比为 1:10)共孵育 24 h. 收集上清用于分析 IL-2 水平. DC 递呈 OVA 抗原给 T 杂交瘤细胞后, T 杂交瘤细胞特异性增殖时, 以等比方式分泌 IL-2, 因此分泌的 IL-2 水平反映了 DC 的抗原递呈能力。

1.6 单向混合淋巴细胞培养检测 DC 对异体 T 淋巴细胞增殖的刺激能力

1.6.1 反应细胞制备. 取同种异体健康成年人外周静脉血, 经上述密度梯度离心法分离获得外周血单个核细胞, 贴壁法收集的悬浮细胞为异体淋巴细胞. 按 T 细胞富集柱试剂盒说明收集 T 淋巴细胞, 作为反应细胞。

1.6.2 刺激细胞制备. 收集转染 24 h 后的实验组、对照组和空白组 DC, 加入丝裂霉素至终浓度为 40 mg/L 灭活, 使 DC 丧失增殖、分裂能力, 即为刺激细胞。

1.6.3 MTT 法检测 T 淋巴细胞刺激指数. 将反应细胞与刺激细胞按 1:1 混合培养 3 天, MTT 法检测 T 淋巴细胞刺激指数。

1.7 FCM 检测单向混合淋巴细胞培养后 T 淋巴细胞的凋亡

混合培养 3 天后, 应用 FCM 采用 PE-Annexin-V/7-AAD 双染法进行 T 淋巴细胞凋亡检测。

1.8 统计学分析

实验数据的统计用 $\bar{x} \pm s$ 表示. 数据的比较:

a. 两样本比较. 在资料服从正态分布时, 采用两样本 t 检验法, 根据方差是否齐同选择对应 P 值; 在资料不服从正态分布时, 采用秩和检验. b. 多样本之间比较. 在资料服从正态分布时, 采用单因素方差分析, 若实验数据为方差齐的数值变量资料则采用 LSD 法进行实验数据的比较分析, 若实验数据为方差不齐的数值变量资料则进行数据转换, 方差齐同后再用 LSD 法进行实验数据的比较分析; 在资料不服从正态分布时, 采用秩和检验. 检验水准为 0.05。

2 结 果

2.1 人外周血来源树突状细胞的鉴定

2.1.1 光镜下观察. 每天在倒置显微镜下观察培养 DC 的细胞数目、形状、外观、生长状况等, 并分别于第 1 天、第 4 天、第 7 天、第 10 天和第 14 天拍照. 可见第 1 天至第 7 天细胞体积逐渐增大、数量增多、形态由圆形演变成不规则形并伴有典型的树状突起. 第 7 天至第 14 天, 细胞体积、形态无明显变化, 数量逐渐减少. 如图 1。

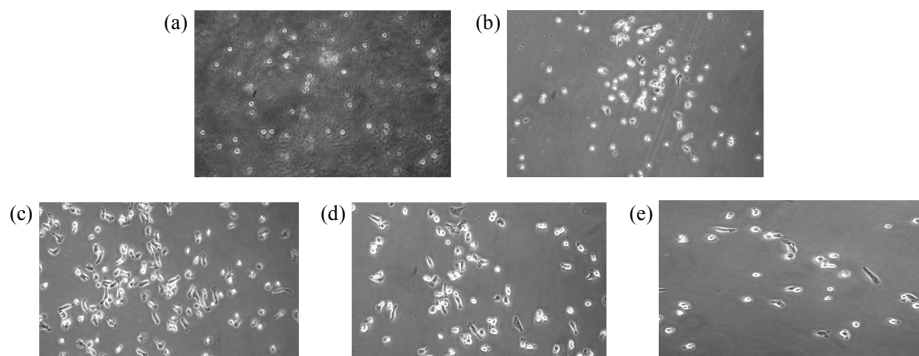


Fig. 1 Dendritic Cells observed under light microscope

(a) Day 1 DC. (b) Day 4 DC. (c) Day 7 DC. (d) Day 10 DC. (e) Day 14 DC. 100 $\times$

2.1.2 电镜下观察. 扫描电镜下观察第 7 天树突状细胞, 可见细胞形态呈不规则形, 有许多大小不一的树状突起. 如图 2.

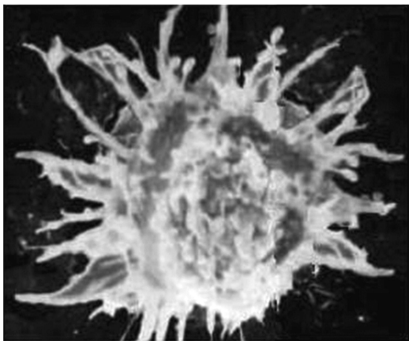


Fig. 2 Day 7 DC observed under scanning electron microscope (4000×)

2.1.3 细胞表面分子 CD1a、CD83 和 CD80 表达. 采用 FCM 检测第 3 天和第 7 天的 DC 表面分子 CD1a、CD83 和 CD80 表达情况, 结果见表 1, 图 3 和图 4. 结果提示, 第 3 天 DC 低表达 CD83 和 CD80, 第 7 天 DC 高表达 CD83 和 CD80, 结合 DC 形态学观察, 可知第 3 天 DC 为未成熟 DC 而第 7 天 DC 已经成熟.

Table 1 The expression of DC surface molecules (%)

Surface molecules	$\bar{x} \pm s$		<i>P</i> value ¹⁾
	Day 3 DC	Day 7 DC	
CD1a	31.84 ± 2.14	75.04 ± 3.17	0.000
CD83	7.84 ± 2.57	74.54 ± 4.33	0.000
CD80	10.39 ± 2.47	55.56 ± 4.31	0.000

¹⁾ The test data are normally distributed in each group, *P* value is a two-sample *t* test on day 3 DC and day 7 DC expression of surface molecules obtained by statistical analysis.

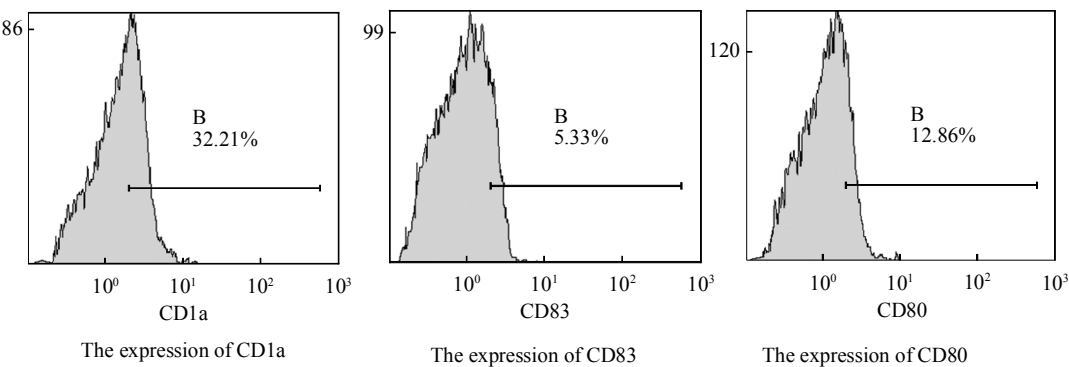


Fig. 3 Day 3 The expression of DC surface molecules

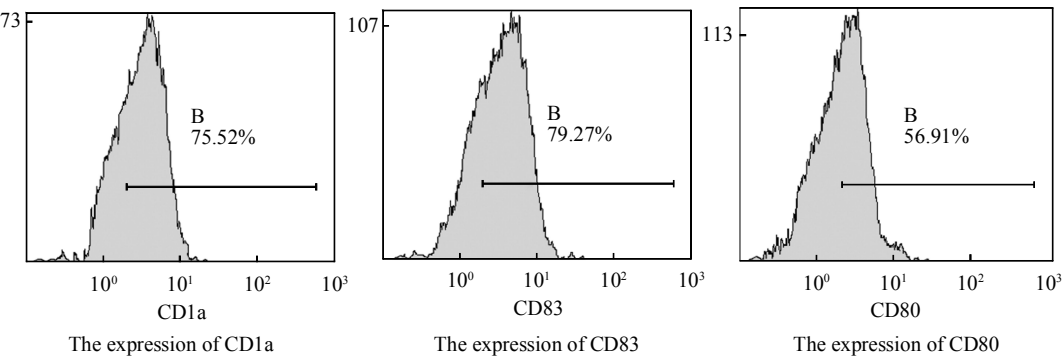


Fig. 4 Day 7 The expression of DC surface molecules

2.2 荧光显微镜下观察 EGFP 绿色荧光表达
pEGFP-N1 含增强型绿色荧光蛋白报告基因 EGFP, pEGFP-N1-FasL 和 pEGFP-N1 转染 DC 后,

EGFP 基因翻译转录的绿色荧光蛋白会使转染 DC 在荧光显微镜下呈现绿色荧光, 提示目的基因成功地转染 DC. 荧光显微镜下可见实验组(FasL-DC

组)和对照组(Control DC 组)DC 发出绿色荧光. 如图 5 和图 6.

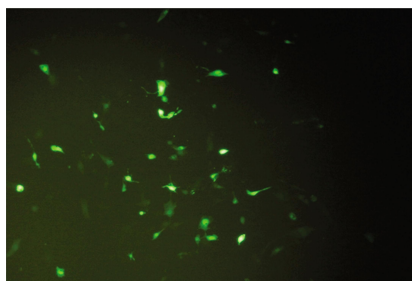


Fig. 5 DC in the experimental group were observed under fluorescence microscope (100×)

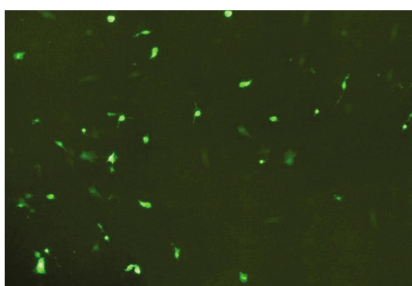


Fig. 6 DC in the control group were observed under fluorescence microscope (100×)

2.3 RT-PCR 检测 FasL 基因 mRNA 表达

凝胶图像中可见实验组(FasL-DC 组)PCR 产物有 250 bp 的 FasL mRNA 条带和 353 bp 的 β -actin 条带, 而对照组(Control DC 组)和空白组(未转染 DC 组)只见 353 bp 的 β -actin 条带, 如图 7. 说明实验组 DC 转染的 FasL 基因可有效地转录 mRNA.

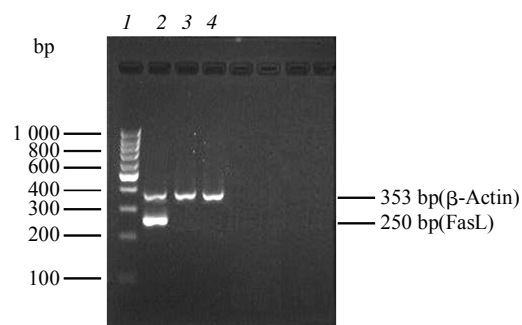


Fig. 7 Three groups of DC's RT-PCR reaction product electrophoresis

1: DNA molecular mass marker; 2: Experimental group; 3: Control group; 4: Blank group.

2.4 FCM 检测 FasL 基因蛋白质表达

采用 FCM 检测 FasL 基因在 3 组 DC 表面表达 FasL 蛋白情况. 结果如下: 实验组($30.75 \pm 1.17\%$), 对照组($4.15 \pm 0.43\%$), 空白组($3.12 \pm 0.72\%$). 如图 8.

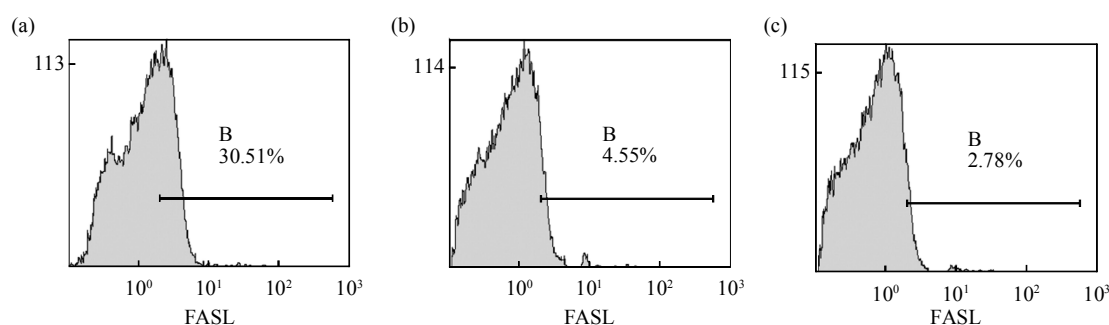


Fig. 8 FasL expression in the three groups DC

(a) FasL expression in the experimental group DC. (b) FasL expression in the control group DC. (c) FasL expression in the blank group DC.

3 组 DC 的 FasL 表达量经检验均服从正态分布, Levene 法方差齐性检验 $P = 0.269 > 0.10$, 认为 3 组 DC 的 FasL 表达量总体方差齐同, 故采用 LSD 法行单因素方差分析, 检验水准为 0.05, 两两之间比较, 结果如下: 实验组与对照组比较, P 值为 0.000; 实验组与空白组比较, P 值为 0.000; 对照组与空白组比较, P 值为 0.178.

结果提示, 实验组与对照组和空白组相比, 差

异具有显著性; 表明, 实验组 DC 转染的 FasL 基因可有效翻译为 FasL 蛋白, 使 FasL 蛋白表达升高; 对照组与空白组相比, 差异无显著性, 认为对照组和空白组 DC 的 FasL 表达量无差别.

2.5 FCM 检测 DC 表面分子表达

采用 FCM 检测 3 组 DC 表面分子表达情况. 结果见表 2, 及图 9~图 11.

Table 2 Three groups of DC surface molecules CD40, CD80, CD86, HLA-DR expression (%)

Groups	$\bar{x} \pm s$			
	CD40	CD80	CD86	HLA-DR
Experimental group	55.76 $\pm$ 2.63	50.83 $\pm$ 3.08	76.05 $\pm$ 3.79	75.47 $\pm$ 2.57
Control group	57.39 $\pm$ 2.58	51.94 $\pm$ 5.89	77.11 $\pm$ 3.66	76.19 $\pm$ 2.40
Blank group	55.08 $\pm$ 2.78	52.22 $\pm$ 2.00	75.54 $\pm$ 4.02	76.09 $\pm$ 2.35

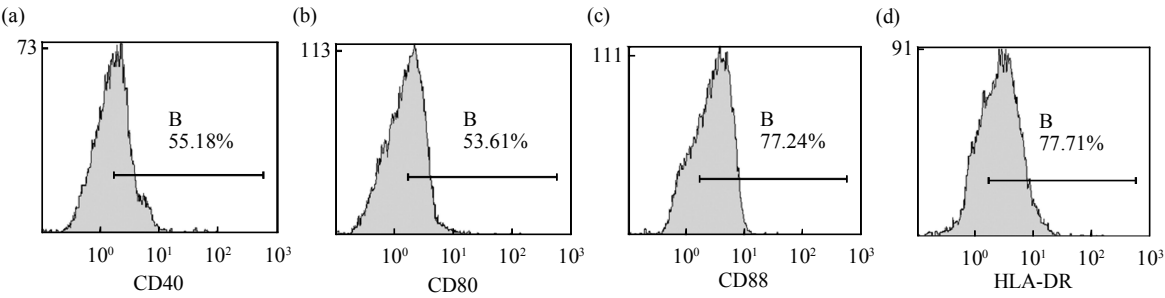


Fig. 9 Surface molecules expression in the experimental group DC

(a) The expression of CD40. (b) The expression of CD80. (c) The expression of CD86. (d) The expression of HLA-DR.

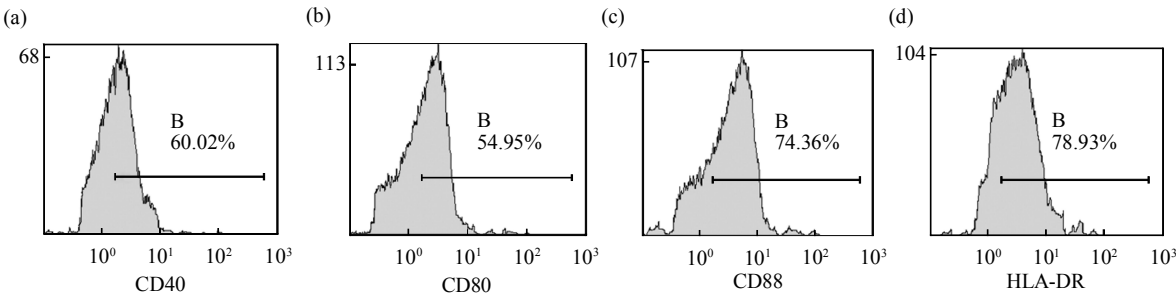


Fig. 10 Surface molecules expression in the control group DC

(a) The expression of CD40. (b) The expression of CD80. (c) The expression of CD86. (d) The expression of HLA-DR.

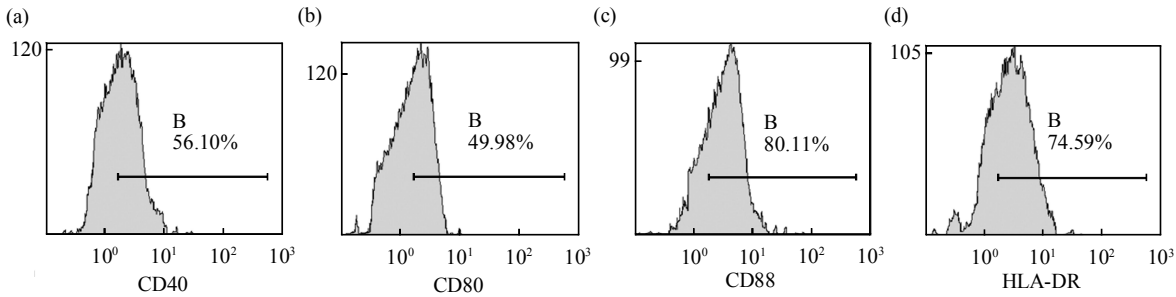


Fig. 11 Surface molecules expression in the blank group DC

(a) The expression of CD40. (b) The expression of CD80. (c) The expression of CD86. (d) The expression of HLA-DR.

3 组 DC 的各表面分子表达量经检验均服从正态分布, Levene 法方差齐性检验, P 值均 > 0.10 , 认为 3 组 DC 的表面分子表达量总体方差均齐同,

采用 LSD 法行单因素方差分析, 检验水准为 0.05, 两两之间比较, 结果如表 3.

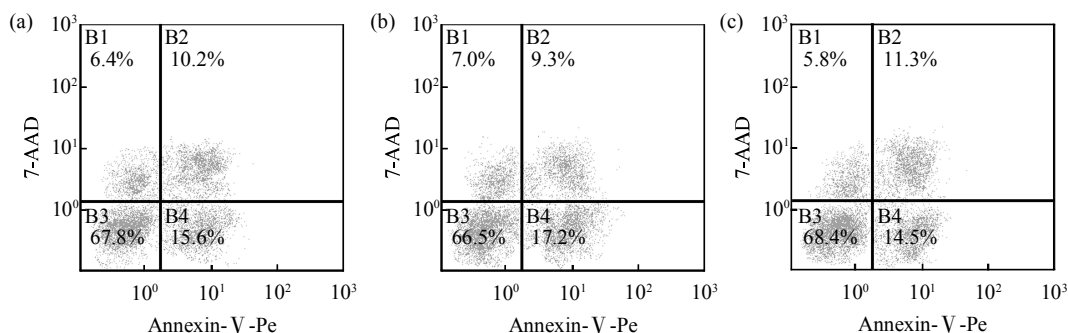
Table 3 Surface molecules expression comparison results between two groups DC

Group comparison	P value			
	CD40	CD80	CD86	HLA-DR
Experimental group and control group	0.480	0.744	0.747	0.730
Experimental group and blank group	0.767	0.684	0.875	0.766
Control group and blank group	0.329	0.935	0.633	0.962

结果提示, 表面分子 CD40、CD80、CD86 和 HLA-DR 在实验组、对照组和空白组中, 任意两组相比, P 值均大于 0.05, 说明差异均没有统计学意义, FasL 基因转染没有明显影响 DC 表面分子 CD40、CD80、CD86 和 HLA-DR 的表达。

2.6 FCM 检测 DC 自身凋亡

FCM 检测 DC 自身凋亡情况, 以了解 FasL 基因转染是否会诱导 DC 自身发生凋亡。凋亡率结果如下: 实验组(14.77 ± 1.71)%, 对照组(15.03 ± 3.01)%, 空白组(14.93 ± 1.12)%。如图 12。

**Fig. 12** Apoptosis in the three groups DC

(a) Apoptosis in the experimental group DC. (b) Apoptosis in the control group DC. (c) Apoptosis in the blank group DC.

3 组 DC 的凋亡率经检验均服从正态分布, Levene 法方差齐性检验 $P = 0.133 > 0.10$, 认为 3 组 DC 的凋亡率总体方差齐同, 故采用 LSD 法行单因素方差分析, 检验水准为 0.05, 两两之间比较, 结果如下: 实验组与对照组比较, P 值为 0.881; 实验组与空白组比较, P 值为 0.926; 对照组与空白组比较, P 值为 0.955。

结果提示: 凋亡率在实验组、对照组和空白组中, 任意两组相比, P 值均大于 0.05, 说明差异均没有统计学意义, FasL 基因转染没有诱导 DC 自身发生凋亡。

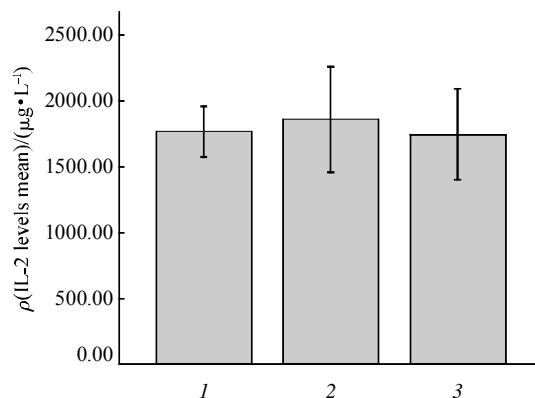
2.7 DC 的抗原递呈功能分析

DC 与人 T 杂交瘤细胞在含有卵清蛋白(OVA)的细胞培养液中共孵育 24 h。收集上清用于分析 IL-2 水平。

以标准品浓度作横坐标, 测得的标准品 A_{450} 值为纵坐标, 以平滑线连接各标准品的坐标点绘制标准曲线。通过待测标本的 A_{450} 值在标准曲线上查出

IL-2 浓度。结果如下: 实验组(1770.83 ± 95.47) $\mu\text{g/L}$, 对照组(1860.00 ± 202.50) $\mu\text{g/L}$, 空白组(1746.67 ± 172.71) $\mu\text{g/L}$ 。

为了便于直观观察, 将 3 组 IL-2 浓度以柱状图表示, 如图 13。

**Fig. 13** Three groups of IL-2 concentration in bar chart

1: Experimental group; 2: Control group; 3: Blank group.

3 组 IL-2 浓度经检验均服从正态分布, Levene 法方差齐性检验 $P=0.640 > 0.10$, 认为 3 组 IL-2 浓度的总体方差齐同, 故采用 LSD 法行单因素方差分析, 检验水准为 0.05. 两两之间比较, 结果如下: 实验组与对照组比较, P 值为 0.528; 实验组与空白组比较, P 值为 0.862; 对照组与空白组比较, P 值为 0.428.

由结果可知, 3 组 IL-2 浓度两两比较 P 值均大于 0.05, 差异没有统计学意义. 认为 3 组 DC 抗原递呈功能没有差别, FasL 基因转染没有影响 DC 的抗原递呈功能.

2.8 单向混合淋巴细胞培养检测 DC 对异体 T 淋巴细胞增殖的刺激能力

单向混合淋巴细胞培养后, MTT 法检测实验组、对照组和空白组异体 T 淋巴细胞增殖的刺激指数, 结果如下: 实验组(0.645 ± 0.043)%, 对照组(1.121 ± 0.113)%, 空白组(1.276 ± 0.069)%.

3 组 T 淋巴细胞增殖的刺激指数经检验均服从

正态分布, Levene 法方差齐性检验 $P > 0.10$, 认为 3 组 SI 的总体方差齐同, 故采用 LSD 法行单因素方差分析, 检验水准为 0.05. 两两之间比较, 结果如下: 实验组与对照组比较, P 值为 0.000; 实验组与空白组比较, P 值为 0.000; 对照组与空白组比较, P 值为 0.056.

结果提示, 实验组与对照组和空白组相比, 差异均具有显著性, 结合刺激指数数值, 说明实验组 DC 对 T 淋巴细胞增殖的刺激能力减弱. 对照组与空白组相比, 差异无显著性, 认为对照组和空白组 DC 对 T 淋巴细胞增殖的刺激能力相同.

2.9 FCM 检测单向混合淋巴细胞培养后异体 T 淋巴细胞的凋亡

单向混合淋巴细胞培养后, 用 FCM 检测 3 组异体 T 淋巴细胞的凋亡, 凋亡率结果如下: 实验组(69.13 ± 0.57)%, 对照组(15.23 ± 0.60)%, 空白组(13.07 ± 0.35)%. 如图 14.

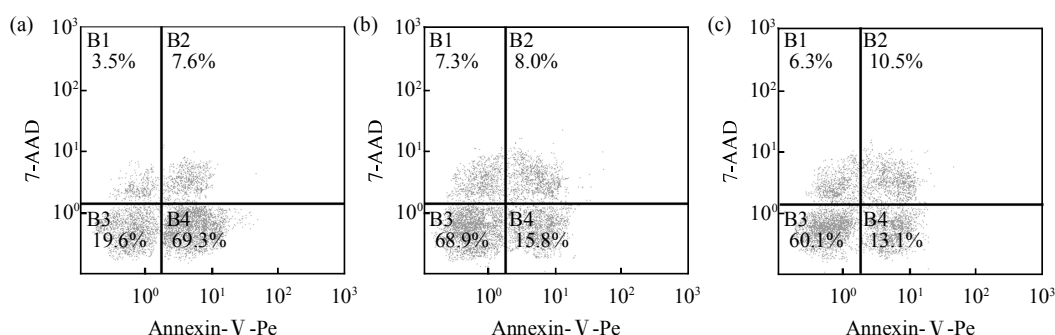


Fig. 14 Three groups of DC induced apoptosis of T lymphocytes

(a) T cell apoptosis in experimental group. (b) T cell apoptosis in control group. (c) T cell apoptosis in blank group.

3 组 T 淋巴细胞的凋亡率经检验均服从正态分布, Levene 法方差齐性检验 $P > 0.10$, 认为 3 组 T 淋巴细胞的凋亡率总体方差齐同, 故采用 LSD 法行单因素方差分析, 检验水准为 0.05. 两两之间比较, 结果如下: 实验组与对照组比较, P 值为 0.000; 实验组与空白组比较, P 值为 0.000; 对照组与空白组比较, P 值为 0.096.

结果提示, 实验组与对照组和空白组相比, 差异均具有显著性; 结合凋亡率数值, 说明实验组 DC 能诱导 T 淋巴细胞凋亡, 使凋亡增加. 对照组与空白组相比, 差异无显著性, 认为两组凋亡相同.

3 讨 论

DC 是目前已知的功能最强的 APC, 其激活 T 淋巴细胞的能力较巨噬细胞、B 淋巴细胞强 100~1 000 倍^[9], 并且是唯一能激活初始免疫应答的 APC^[2], 具有激活移植排斥反应的作用. 由于激活排斥反应的 DC 可以是供者的 DC, 也可以是受者体内的 DC, 而存在于供体器官之中的 DC, 被称为“过客白细胞”(passenger leucocytes), 对受体 T 细胞有直接激活作用, 往往是导致早期急性排斥反应发生的主要原因.

DC 在体内有 mDC 和 imDC 两种状态. mDC

高表达 MHC- II 和共刺激分子(CD40、CD80、CD86 等),为 T 细胞活化提供双信号以启动免疫反应. imDC 因缺少或低表达表面分子 CD40、CD80、CD86 等,不能正常递呈抗原,破坏、干扰了 DC 与 T 细胞间的相互作用,能够诱导免疫耐受.随着基因技术的快速发展,利用基因修饰的方法处理供者 DC,抑制其免疫原性,提高其致耐受活性,是被移植领域普遍看好的一种耐受诱导策略.

Fas/FasL 是介导细胞凋亡的重要的免疫活性分子,它不仅参与了胸腺选择、免疫豁免(immune-privilege)、协调平衡免疫反应等许多重要的生理过程,而且与一些肿瘤的发生发展、器官移植耐受和排斥反应、自身免疫性疾病的产生以及感染、炎症等许多病理生理反应密切相关^[10-11].人们研究发现^[6-7,12],在睾丸、眼前房等部位在移植同种异型抗原组织时,并不诱导免疫应答,移植植物不被排斥,研究^[13]还证实这些免疫特赦组织上固有的高表达 FasL,能够有效地清除 Fas 阳性的免疫效应细胞.因此,如果提高移植植物 FasL 的表达,则可能会导致排斥反应的主要效应细胞发生凋亡,从而达到抗移植排斥的目的.

本实验中,纯化的 DC 前体细胞通过添加细胞因子诱导、扩增,可获得大量 DC,其中文献报道最为经典、效果最好的组合是 GM-CSF 和 IL-4 之间的组合^[14],GM-CSF 是维持 DC 发育、分化最根本的细胞因子,大剂量的 GM-CSF 可以促使其成熟,IL-4 抑制粒细胞和巨噬细胞产生,TNF- α 可进一步促进 DC 成熟^[15].我们采用低浓度 hGM-CSF+hIL-4 细胞因子联合刺激 DC 前体细胞 5 天,获得 imDC,第 6 天后加用 TNF- α 联合诱导至 7~9 天,获得成熟的具有典型树枝状突起的 DC.

CD1a 和 CD83 是目前国内外鉴定人 DC 常用的主要分子.CD1a 主要表达于人胸腺细胞、DC 细胞表面,是鉴定人外周血与脐血来源 DC 的最好标记^[16].CD83 是 DC 的成熟标志,在 DC 培养早期不表达 CD83 分子,当成熟时才表达 CD83 分子,此时 DC 激活 T 细胞功能最强^[17].DC 经细胞因子联合诱导培养,分别在第 3 天和第 7 天予流式细胞术检测其表面分子 CD1a,CD83,CD80 的表达情况.结合 DC 光镜及电镜观察,可知第 7 天 DC 已为 mDC.

转染后荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白,提示转染成功.RT-PCR 检测 FasL 基因 mRNA 表

达,在凝胶图像中可见实验组 PCR 产物有 250 bp 的 FasL mRNA 条带和 353 bp 的 β -actin 条带,而对照组和空白组只见 353 bp 的 β -actin 条带.说明实验组 DC 转染的 FasL 基因可有效地转录 mRNA,但 mRNA 水平不能反映细胞中的蛋白质水平,因而我们选择流式细胞术检测了 FasL 蛋白表达.实验组、对照组和空白组分别为 $(30.75 \pm 1.17)\%$ 、 $(4.15 \pm 0.43)\%$ 、 $(3.12 \pm 0.72)\%$,经分析进一步证实 FasL 基因转染成功,并且可以合成高水平的 FasL 蛋白.研究表明,DC 表面 Fas 也有一定的表达.DC 转染 FasL 基因后是否也会通过 Fas/FasL 途径而引起自身凋亡?对于这一问题目前仍存在不同观点.Buonocore 等^[18]研究认为 FasL 基因转染 DC 可能引起 DC 本身的凋亡.而 Seon 等^[19]将 FasL 基因转染 DC 后,发现 FasL 基因转染的 DC 并未出现大量凋亡,转染后 DC 的活性维持在 90%以上.我们在实验中用流式细胞术检测了实验组、对照组和空白组的 DC 凋亡率,分别为 $(14.77 \pm 1.71)\%$ 、 $(15.03 \pm 3.01)\%$ 、 $(14.93 \pm 1.12)\%$.经分析提示 FasL 基因转染没有诱导 DC 自身发生凋亡,其原因可能与 DC 的来源、DC 的表型、DC 表面凋亡抑制基因及凋亡促进基因的表达水平等有关^[20].DC 是目前已知的功能最强的抗原递呈细胞,其主要功能是递呈抗原,本实验对转染后的 DC 进行了抗原递呈功能分析,结果提示实验组、对照组和空白组的 DC 抗原递呈功能没有差别,因而认为 FasL 基因转染没有影响 DC 的抗原递呈功能.

急性移植排斥反应主要由 T 淋巴细胞介导,如果能够诱导这些特异性 T 细胞凋亡,则受体处于免疫耐受状态,不会发生急性排斥反应^[21].本实验将 FasL 基因转染至成熟树突状细胞,经处理后与同种异体 T 淋巴细胞混合培养,检测转染 FasL 基因的树突状细胞对异体 T 淋巴细胞增殖及凋亡的影响.结果表明,实验组 DC 即转染 FasL 基因的树突状细胞对异体 T 淋巴细胞增殖的刺激能力减弱,并且能诱导异体 T 淋巴细胞的凋亡,使凋亡增加,因而可诱导免疫耐受状态的产生.

本研究表明,对培养至第 7 天的 DC 进行体外 FasL 基因转染能够获得有效的目的基因表达,FasL 基因转染后 DC 表面主要免疫分子的表达没有明显改变,对其抗原递呈功能亦无明显影响.在单向混合淋巴细胞培养中,转染 FasL 基因的树突状细胞能减弱异体 T 淋巴细胞的增殖,诱导其凋亡.因此,为实现临床免疫耐受提供一种新的思路.

参 考 文 献

- [1] Fehr T, Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. *Transplant Immunology*, 2004(13): 117-130
- [2] Xia C Q, Kao K J. Monocyte-derived CD1a⁺ dendritic cells generated in two different culture systems: immunophenotypic and functional comparison. *Scand J Immunol*, 2003, **57**(4): 324-332
- [3] Min M P, Zhou D, Ichim T E, *et al.* Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cell in transplant tolerance. *J Immunol*, 2003, **170**(3): 1304-1312
- [4] Liu Z, Liu R, Qiu J, *et al.* Combination of human Fas (CD95/Apo-1) ligand with adriamycin significantly enhances the efficacy of antitumor response. *Cell Mol Immunol*, 2009, **6**(3): 167-174
- [5] Wu T L, Ertl H C. Immune barriers to successful gene therapy. *Trends Mol Med*, 2009, **15**(1): 32-39
- [6] Niederkorn J Y, Kaplan H J. Immune response and the eye. *Chem Immunol Allergy*, Basel, Karger, 2007, **92**(1): 11-26
- [7] D' Alessio A, Riccioli A, Lauretti P, *et al.* Testicular FasL is expressed by sperm cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(6): 3316-3321
- [8] Grandics P. The cancer stem cell: evidence for its origin as an injured autoreactive T cell. *Mol Cancer*, 2006, **5**(1): 6
- [9] Zeng Z, Liu X, Jiang Y H, *et al.* Biophysical studies on the differentiation of human CD14⁺ monocytes into dendritic cells. *Cell Biochem Biophys*, 2006, **45**(1): 19-30
- [10] Gomez G G, Kruse C A. Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther Mol Biol*, 2006, **10**(A): 133-146
- [11] Alice L, Okechukwu O, Alan E. Saving death: Apoptosis for intervention in transplantation and autoimmunity. *Clinical & Developmental Immunology*, 2006, **13**(2-4): 273-282
- [12] Zhenhua D, Isam W N, Michael R, *et al.* Impaired recall of CD8 memory T cells in immunologically privileged tissue. *J Immunology*, 2005, **174**(3): 1165-1170
- [13] Takahiko H, Satoru Y, Kazumi T, *et al.* Immunologic mechanisms of corneal allografts reconstituted from cultured allogeneic endothelial cells in an immune-privileged site. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2009, **50**(7): 3151-3158
- [14] 任 颖, 银平章, 孔令非, 等. 树突状细胞的制备及生物学特性的研究. *实用诊断与治疗杂志*, 2004, **18**(3): 183-185
Ren Y, Yin P Z, Kong L F, *et al.* *J Practical Diagnosis and Therapy*, 2004, **18**(3): 183-185
- [15] Yufang S, Catherine H L, Arthur I R, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research*, 2006, **16**(2): 126-133
- [16] Schulke L, Berbic M, Manconi F, *et al.* Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Human Reproduction*, 2009, **24**(7): 1695-1703
- [17] Shirin M, Cyril L N, Cindy L, *et al.* Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *J Virology*, 2008, **82**(17): 8780-8796
- [18] Buonocore S, Paulart F, Le Moine A, *et al.* Dendritic cells overexpressing CD95(Fas) ligand elicit vigorous allospecific T-cell responses *in vivo*. *Blood*, 2003, **101**(4): 1469-1476
- [19] Seon H K, Nicole B, Rajasree M, *et al.* Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. *Molecular Therapy*, 2006, **13**(2): 289-300
- [20] McLellan A D, Terbeck G, Mengling T, *et al.* Differential susceptibility to CD95 (Apo-1/Fas) and MHC class II-induced apoptosis during murine dendritic cell development. *Cell Death Differ*, 2000, **7**(10): 933-938
- [21] Tung T C, Oshima K, Cui G, *et al.* Dual upregulation of Fas and Bax promotes alloreactive T cell apoptosis in IL-10 gene targeting of cardiac allografts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **285**(3): 964-973

Dendritic Cells Genetically Engineered to Express Fas Ligand Regulate T Lymphocyte Proliferation and Apoptosis*

ZHOU Hao¹⁾, CHEN Zhuan-Hua¹⁾, XING Zeng-Shu¹⁾, WANG Gang¹⁾, LUO Zhi-Gang¹⁾, QIN Guo-Qing¹⁾,
LI Jian-Jun¹⁾, QIAN Kun¹⁾, JIANG Hong-Tao¹⁾, WANG Fang²⁾, WANG Yi^{1)**}, LIAO Duan-Fang^{3)**}

¹⁾ Center of Kidney Transplantation, The Second Affiliated Hospital of The University of South China, Hengyang 421001, China;

²⁾ Changsha Social Work College, Changsha 410004, China; ³⁾ Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract To investigate the effects of dendritic cells on T lymphocyte proliferation and apoptosis, providing an *in vitro* model of clinical transplant immunological tolerance. After mature dendritic cells (mDCs) from peripheral blood of healthy adults was successfully transfected with human FasL gene, mDCs were analyzed for the expression of cell surface molecules, antigen presenting function and their apoptosis. Effects of mDCs on T lymphocyte proliferation and apoptosis were further detected based on co-culture of mDCs and T lymphocytes. The results show that, FasL did not significantly change the expression level of mDC's surface molecules CD40, CD80, CD86 and HLA-DR; FasL did not induce apoptosis of mDC. No effects on the antigen presenting function of mDC were observed as well. The mDC transfected with FasL decreased stimulation index and increased apoptosis of allogeneic T-lymphocyte significantly. So that, human mDCs transfected with FasL may regulate T lymphocyte proliferation and apoptosis without alteration of cell surface molecules and antigen presentation characteristics on human mDC.

Key words dendritic cell, FasL, transfection, apoptosis, immunological tolerance

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00222

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30972998), Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA02Z407), The Key Project of Hunan Provincial Department of Education (09A079) and The Nature Science Found of Hunan Province (07JJY3032).

**Corresponding author.

WANG Yi. Tel: 86-734-8899692, E-mail: wayne0108@126.com

LIAO Duan-Fang. Tel: 86-731-88458002, E-mail: dfliao66@yahoo.com.cn

Received: December 4, 2010 Accepted: February 23, 2011