

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.014

抑制吲哚胺 2,3-双加氧酶活性促进慢性粒细胞白血病源树突状细胞的功能

许思娟,张连生*,吴重阳,柴 晔,宋飞雪,岳玲玲,刘 瑛(兰州大学第二医院血液科,甘肃兰州 730000)

[摘要] 目的: 研究吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)在慢性粒细胞性白血病源性树突状细胞(dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia, CML-DCs)中的表达,及抑制 IDO 活性对 CML-DCs 免疫刺激功能的影响。方法: RT-PCR 检测 17 例患者 CML-DCs 的 IDO mRNA 的表达情况,流式细胞仪检测 CML-DCs 免疫表型。在有或无 IDO 抑制剂 1-甲基色氨酸(1-methyltryptophan, 1-MT)作用下,分别以不成熟 CML-DCs(imDCs)和成熟 CML-DCs(mDCs)为刺激细胞,完全缓解期(complete remission, CR)CML 患者外周 T 淋巴细胞为反应细胞建立混合淋巴细胞反应体系,ELISA 法检测 CML-DCs 上清液 IL-12 水平,MTT 法检测 CML-DCs 刺激自体 T 淋巴细胞的增殖能力。结果: 随着 CML-DCs 的诱导分化和成熟,IDO mRNA 表达逐渐上调;经 TNF- α 诱导的 DCs 免疫表型除 CD1a 外,CD80、CD86、CD83、HLA-DR 的表达均明显上调($P < 0.05$),且上述分子的表达不受 1-MT 的影响。用 1-MT 抑制 IDO 活性后的 imDCs 和 mDCs,其 IL-12 水平均明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),且激发自体 T 淋巴细胞增殖的能力也明显增强($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 抑制 IDO 活性可提高 CML-DCs 的 IL-12 分泌水平,增强其对自体 T 细胞增殖的刺激能力,IDO 对 DCs 的负性调节为白血病生物治疗提供了新的思路。

[关键词] 慢性粒细胞性白血病; 吲哚胺 2,3-双加氧酶; 树突状细胞; 1-甲基色氨酸

[中图分类号] R733.72; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0170-05

Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity promotes function of dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia

XU Si-juan, ZHANG Lian-sheng*, WU Chong-yang, CHAI Ye, SONG Fei-xue, YUE Ling-ling, LIU Ying(Department of Hematology, Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia (CML-DCs) and to study the influence of IDO inhibition on the function of CML-DCs. **Methods:** The expression of IDO mRNA in dendritic cells derived from 17 patients with chronic myeloid leukemia was detected by RT-PCR. The phenotypes of CML-DCs were analyzed by flow cytometry. The immature CML-DCs (imDCs) and the mature CML-DCs (mDCs) were used as stimulating cells and autologous T-lymphocytes were used as reactive cells for a mixed lymphocyte reaction system. IL-12 concentration was detected by ELISA kit; mix lymphocyte reaction was analyzed by MTT assay. **Results:** It was demonstrated that DCs derived from bone marrow mononuclear cells of CML displayed a typical morphology of DCs. Expressions of co-stimulatory molecules on DCs, such as CD80, CD86, CD83 and HLA-DR, except for CD1a, were obviously higher after maturation ($P < 0.05$) and were not influenced by 1-Methyltryptophan (1-MT, an inhibitor of IDO). Inhibition IDO activity in mature and immature DCs by 1-MT significantly enhanced their abilities to activate T cells proliferation and to produce IL-12 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Inhibition of IDO activity in CML-DCs can increase their abilities to produce IL-12 and activate autologous T cells. Negative regulation of DCs by IDO paves a way for DC-based leukemia immunotherapy.

[Key words] chronic myeloid leukemia; indoleamine 2,3-dioxygenase; dendritic cell; 1-methyltryptophan

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 170-174]

[基金项目] 国家重点基础研究计划(973)资助项目(No. 2004 CB 518804);国家自然科学基金杰出青年项目(No. 30325043)。Supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2004CB518804); Supported by the National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholars (No. 30325043)

[作者简介] 许思娟(1980-),女,甘肃兰州人,硕士研究生,主要从事肿瘤生物免疫治疗方面的研究。E-mail: xsj.happy@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: zls2170@yahoo.com

树突状细胞(dendritic cells, DCs)因其强大的抗原提呈功能和激活抗原特异性 CTL(cytotoxic T lymphocytes)反应,成为肿瘤免疫治疗的重要载体。以 DCs 为基础的肿瘤疫苗在部分恶性肿瘤的治疗中已显示出良好的效果。白血病细胞来源的 DCs 因携带自身肿瘤抗原在白血病免疫治疗中倍受关注^[1-2]。研究表明^[3]白血病来源的 DCs 与正常 DCs 相比,其表面分子表达相似,但抗原提呈功能较弱。吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)是一种含亚铁血红素的酶,是色氨酸分解代谢所必需的酶。由于 IDO 的活化,使得游离的色氨酸减少,从而导致了 T 细胞的活化程度降低^[4]。已证实 IDO 有免疫负调节作用并参与肿瘤免疫逃逸^[5]。基于以上研究,本研究通过检测慢性粒细胞性白血病源性树突状细胞(dendritic cells derived from chronic myeloid leukemia, CML-DCs)IDO 的表达情况及抑制 IDO 活性对 CML-DCs 免疫功能的影响,探讨 IDO 对 DCs 的免疫负性调节作用,为白血病生物治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择兰州大学第二医院血液科初诊未治的 CML 慢性期住院患者 17 例,其中男 10 例,女 7 例,中位年龄 28(17~40)岁。临床表现、血象、骨髓象均符合 CML 慢性期诊断标准,染色体核型检查 Ph 阳性率为 100%。研究对象均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 粉剂购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所,1-甲基色氨酸(1-methyltryptophan, 1-MT; IDO 抑制剂)和 MTT 购自美国 Sigma 公司, rhGM-CSF、rhIL-4 和 rhTNF- α 购自 Bioscience 公司, IL-12 ELISA 试剂盒购自晶美生物公司,抗人 CD1a-PE、CD80-FITC、CD83-FITC、CD86-PE、HLA-DR-FITC 单抗为 Burlingame 公司产品。

1.3 单个核细胞的分离和冻存

取 CML 患者肝素抗凝骨髓,用 Ficoll-Hypaque 分离单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)。用 RPMI 1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青链霉素)调整细胞密度至 5×10^6 /ml。用含 40% 胎牛血清、50% RPMI 1640 和 10% 二甲基亚砷的冻存液冻存于 -196°C 液氮中备用。待患者完全缓解后,抽取缓解期(complete remission, CR) CML 患者肝素抗凝外周血 20 ml,按上述方法分离收集外周血

单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),液氮保存备用。

1.4 CML-DCs 的体外诱导、培养

常规复苏冻存的 CML-MNC,台盼蓝染色计数活细胞,用 RPMI 1640 完全培养基调整细胞密度至 3×10^6 /ml,接种 24 孔培养板,在 37°C 饱和湿度、5% CO_2 孵箱中培养 3 h 后,洗去非贴壁细胞。贴壁细胞加入含 1 000 U/ml rhGM-CSF、500 U/ml rhIL-4 的 RPMI 1640 完全培养基 1 ml/孔,置 37°C 饱和湿度、5% CO_2 孵箱中培养。将培养到第 7 天时的不成熟 DC(imDCs)分成四组:(1) imDCs 对照组,不作任何处理;(2) imDCs + 1 mmol/L 1-MT 组;(3) imDCs + 100 ng/ml TNF- α 组[即成熟 DC(mDCs)组];(4) imDCs + 100 ng/ml TNF- α + 1 mmol/L 1-MT 组(即 mDCs + 1-MT 组)。继续培养 24 h 后收集细胞。

1.5 RT-PCR 检测 CML-DCs 中 IDO mRNA 的表达

用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,逆转录成 cDNA。反应条件为 45°C 水浴 1 h,然后 70°C 水浴 10 min 以灭活逆转录酶。PCR 引物的设计根据 GenBank 库中 IDO 的 cDNA 序列进行^[6]。IDO 上游引物:5'-ATGTGTGGGGCAAAGGTCATGG-3';下游引物:5'-AAGTGTCCCGTTCTTGCAATTTGC-3',扩增片段长度为 550 bp。内参照为 GAPDH,其上游引物:5'-TATGATGACATCAAGAAGGTGG-3';下游引物:5'-CACCACCCTGTTGCTGTA-3',扩增片段 220 bp。反应体系 50 μl ,扩增条件: 90°C 预变性 3 min,然后 90°C 变性 45 s, 59°C 退火 45 s, 70°C 延伸 1 min,循环 28 次,最后 70°C 延伸 4 min。取扩增产物 5 μl ,用 2% 琼脂糖凝胶电泳,进行条带分析。

1.6 流式细胞术检测 CML-DCs 表型

调整待测 CML-DCs 密度至 1×10^6 /ml,取细胞悬液 100 μl /管,分别加入 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 相应单克隆抗体^[3],混匀后室温下暗室反应 30 min,加 PBS 缓冲液,1 000 $\times g$ 5 min 离心洗涤后,以 1% 多聚甲醛固定备用,作流式细胞术检测。

1.7 ELISA 法测定 CML-DCs 上清中的 IL-12

将培养第 8 天的 DCs 离心,取上清液,用 ELISA 法测定各组 CML-DCs 上清中 IL-12 的分泌水平,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.8 混合淋巴细胞反应检测 CML-DCs 对淋巴细胞增殖的刺激作用

复苏冻存的 CR-PBMC,台盼蓝染色计数活细胞,用 RPMI 1640 完全培养基接种于 25 cm^2 培养瓶中,在 37°C 饱和湿度、5% CO_2 孵箱中培养 3 h 后,收集悬浮细胞,调整细胞密度至 1×10^6 /m,用作反

应细胞。取培养第8天的各组DCs加入丝裂霉素,37℃灭活1h,PBS液洗涤后作为刺激细胞。按刺激细胞/反应细胞为1:10、1:20、1:50的比例加入96孔培养板中(200 μl/孔),每组设3个复孔,另设一空白对照孔。在37℃饱和湿度、5%CO₂孵箱中培养4d,吸出上清,加入MTT液(5 mg/ml)20 μl/孔,培养4h后弃上清,每孔加入二甲基亚砷150 μl,振荡10 min,待MTT溶解后用酶标仪测波长550 nm时各孔光密度值(D),以3复孔均值计算增殖指数(proliferation index, PI),PI(%)=试验组D值/空白组D×100%。

1.9 统计学处理

所测数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS10.0软件,各组内及组间指标进行dunnet-t检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 IDO mRNA在CML-DCs中的表达

RT-PCR检测CML-DCs中IDO mRNA的表达,结果(图1)显示,培养第1天时CML-DCs中IDO mRNA表达率为(13.20±0.29)%,随着DCs的诱导分化IDO mRNA表达率有增高趋势,第7天上升到(73.51±1.49)%;当用TNF-α刺激后,CML-DCs中IDO mRNA表达率上升到(97.36±0.61)%。

2.2 CML-DCs的免疫表型

流式细胞仪检测4组CML-DCs的免疫表型,结果发现除CD1a外,其他表型分子(CD80、CD86、CD83、HLA-DR),imDCs+TNF-α+1-MT组和imDCs+TNF-α组均显著高于imDCs对照组(P<0.05);同时显示,无论imDCs还是mDCs,1-MT的处理并

不影响其表型分子的表达(表1)。

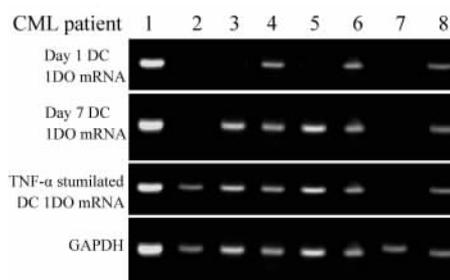


图1 CML-DCs中IDO mRNA的表达
Fig.1 Expression of IDO mRNA in CML-DCs detected by RT-PCR

2.3 抑制IDO活性可促进CML-DCs分泌IL-12

在培养第8天时收集各组CML-DCs细胞上清液,测定IL-12水平。结果显示,imDCs经TNF-α和1-MT单独或联合处理后上清中IL-12的分泌水平明显高于imDCs对照组(P<0.05);且TNF-α和1-MT联合处理后imDCs上清中IL-12的分泌水平最高(P<0.05)(表2)。

2.4 抑制IDO活性可增强CML-DCs对淋巴细胞增殖的刺激作用

自体淋巴细胞混合培养第4天,用MTT法检测淋巴细胞增殖指数,可见除对照组imDCs外,其他3组CML-DCs诱导的T细胞增殖指数随刺激细胞数量的增加而增强(P<0.05);在同一靶比例下,与对照组imDCs相比,其他3组CML-DCs均能显著刺激T细胞增殖(P<0.05),而TNF-α和1-MT联合处理组的刺激作用最强(P<0.05,表3)。

表1 1-MT处理前后CML患者来源DCs表面分子的变化($\bar{x} \pm s, %$)

Tab.1 Phenotypes of DCs derived from CML before and after treatment with 1-MT($\bar{x} \pm s, %$)

Group	CD80	CD86	CD83	HLA-DR	CD1a
imDCs	13.05 ± 5.74	14.53 ± 6.84	2.90 ± 2.08	16.14 ± 6.48	23.01 ± 8.96
imDCs + TNF-α/1-MT	32.15 ± 6.61*	46.89 ± 10.41*	26.17 ± 11.21*	43.96 ± 6.66*	34.26 ± 10.26
imDCs + 1-MT	11.79 ± 8.14	12.89 ± 8.52	3.36 ± 2.31	16.89 ± 5.94	26.07 ± 11.29
imDCs + TNF-α	35.07 ± 7.34*	46.04 ± 13.43*	23.50 ± 10.01*	47.25 ± 8.13*	37.31 ± 9.32

* P<0.05 vs imDCs

3 讨论

树突状细胞不仅可以在体内维持、调控机体正常免疫反应,而且在抗肿瘤免疫治疗中也发挥了至关重要的作用[7]。最近研究发现,DCs还可通过上

调IDO的表达降解局部组织中的色氨酸,抑制淋巴细胞的功能,从而导致免疫耐受[8-9]。大量实验表明,白血病细胞可在体外诱导分化为DCs,其共刺激分子和黏附分子表达上调,能促进T细胞增殖,诱导CTL细胞,特异性地杀伤自身白血病细胞[10-11]。

但与正常 DCs 相比,白血病源性 DCs 刺激 T 淋巴细胞增殖的能力以及诱导 CTL 效应的能力均较弱^[3]。本实验旨在通过抑制白血病源性树突状细胞的 IDO 活性,观察能否增强白血病源性 DCs 的功能。

表 2 抑制 IDO 活性对 CML-DCs 分泌 IL-12 的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 2 IL-12 production by CML-DCs after inhibition of IDO activity by 1-MT($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	IL-12($\rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
imDCs	68.98 ± 45.95
imDCs + TNF- α /1-MT	350.62 ± 89.50 ^{**Δ}
imDCs + 1-MT	225.01 ± 68.43 [*]
imDCs + TNF- α	209.64 ± 62.01 [*]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs imDCs; $\Delta P < 0.05$ vs imDCs + 1-MT or imDCs + TNF- α

表 3 抑制 IDO 活性后 T 细胞的增殖指数 (SI)

Tab. 3 T cells proliferation index after inhibition of IDO activity

Group	Stimulator/responder ratio		
	1:10	1:20	1:50
imDCs	1.39 ± 0.25	1.12 ± 0.15	1.05 ± 0.09
imDCs + TNF- α /1-MT	4.42 ± 0.44 ^{*Δ}	3.32 ± 0.38 ^{*Δ}	1.95 ± 0.23 ^{*Δ}
imDCs + 1-MT	3.04 ± 0.30 [*]	2.45 ± 0.39 [*]	1.47 ± 0.12 [*]
imDCs + TNF- α	3.24 ± 0.23 [*]	2.42 ± 0.44 [*]	1.55 ± 0.22 [*]

* $P < 0.05$ vs imDCs; $\Delta P < 0.05$ vs imDCs + 1-MT or imDCs + TNF- α

RT-PCR 检测 CML-DCs 的 IDO mRNA 的表达显示,随着 DCs 成熟,IDO 表达率逐渐增高,在培养第 7 天时 IDO 的表达率上升至(73.51 ± 1.49)%,表明随着 CML 细胞被诱导分化为 DCs 的同时也伴随着 IDO 表达的上调。以 TNF- α 诱导 DCs 进一步成熟后,IDO 表达再度增强,高达(97.36 ± 0.61)%,表明 TNF- α 可诱导 IDO 的表达,这与文献报道的结果一致^[12-13],同时也表明成熟 DCs 伴有较高水平的 IDO 表达。采用流式细胞仪检测各组 DCs 表型,在加与不加 1-MT 的两实验组中,均检测到 DCs 表型,说明 DCs 诱导成功。

在 DCs 发育成熟过程中,IL-12 的分泌对 DCs 功能的发挥起着至关重要的作用,被认为是继抗原刺激信号(第 1 信号)和共刺激信号(第 2 信号)后的第 3

信号^[14]。DCs 通过分泌 IL-12 促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化,从而产生 Th1 应答,辅助 CTL 效应,进而表现为 IFN- γ 等细胞因子分泌和较强细胞毒活性。在本实验中,1-MT 处理后,无论不成熟 DCs 还是成熟 DCs,它们的 IL-2 分泌水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明抑制 IDO 活性可增强 DCs 分泌 IL-12,进而加强了 DCs 功能。通常只有成熟 DCs 才能有效刺激淋巴细胞增殖与激发免疫应答,而不成熟 DCs 则诱导 T 细胞无能^[15]。Uyttenhove 等^[4]的研究发现,部分实体肿瘤细胞(宫颈癌、胃癌、结肠癌、黑素瘤和胰腺癌等)高表达的 IDO 分子使局部 T 淋巴细胞增殖受抑,从而介导肿瘤细胞逃避免疫系统的攻击。本实验则进一步观察了抑制 IDO 活性对 CML-DCs 刺激自体 T 细胞增殖能力的影响。本实验结果显示,在相同的效靶比例下,1-MT 处理组刺激淋巴细胞增殖能力明显高于对应的无 1-MT 处理组($P < 0.05$),表明无论 DCs 成熟与否,抑制 IDO 活性均可增强 DCs 激发免疫应答的能力。

当抑制 IDO 活性后,DCs 分泌 IL-12 和刺激自体淋巴细胞增殖的能力均明显增强,如果分别比较 TNF 组处理和非处理的成熟 DCs 和不成熟 DCs 就可发现,抑制 IDO 活性对不成熟 DCs 功能的影响最大。可能的解释是:DCs 的正性共刺激分子(例如 CD80、CD86)和负性调节分子(例如 IDO)处于一种动态平衡中。虽然不成熟 DCs 中 IDO 的表达低于成熟 DCs,但是不成熟 DCs 表面的正性共刺激分子则更是远远低于成熟 DCs 的表达,因此,不成熟 DCs 的 IDO 活性被抑制后可使其正性共刺激分子的免疫刺激作用得以显现;而成熟 DCs 本身高表达正性共刺激分子,IDO 的免疫负调节作用被掩盖。所以,抑制 IDO 活性后其分泌 IL-12 和刺激淋巴细胞增殖能力的效果在不成熟 DCs 表现更为明显。

本实验结果显示,DCs 的负性调节分子 IDO 随着 CML-DCs 成熟表达不断升高,经 1-MT 处理后的 CML-DCs 其 IL-12 分泌水平及刺激自体 T 淋巴细胞增殖的能力均明显高于对照组,说明 IDO 在 DCs 负性调节中起着极为重要的作用。抑制 IDO 活性的策略将使 CML-DCs 疫苗发挥更强的抗白血病效应,对临床清除微小残留病灶、防止复发并最终治愈白血病有着潜在的应用价值,为白血病生物治疗提供了全新的思路。

[参考文献]

- [1] Choudhury A, Liang JC, Thomas EK, et al. Dendritic cells derived *in vitro* from acute myelogenous leukemia cells stimulate au-

- tologus, antileukemia T cell responses [J]. *Blood*, 1999, 93 (3):780-786.
- [2] Kater AP, van Oers MH, Kipps TJ. Cellular immune therapy for chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2007, 110(8): 2811-2818.
- [3] 童向民, 金洁, 李敏伟, 等. 白血病细胞和正常细胞生成树突状细胞的比较研究 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2005, 20(1): 49-52.
- [4] Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2, 3-dioxygenase [J]. *Nat Med*, 2003, 9(10): 1269-1274.
- [5] Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape [J]. *Immunol Rev*, 2008, 222(2): 206-221.
- [6] Terness P, Chuang JJ, Bauer T, *et al.* Regulation of human auto and alloreactive T cells by indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) producing dendritic cells: too much ado about IDO? [J]. *Blood*, 2005, 105(6): 2480-2486.
- [7] Tan YF, Sim GC, Habsah A, *et al.* Experimental production of clinical-grade dendritic cell vaccine for acute myeloid leukemia [J]. *Malays J Pathol*, 2008, 30(2): 72-79.
- [8] Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, *et al.* The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology [J]. *Blood*, 2009, 113(11): 2394-2401.
- [9] Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a maker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 6030-6039.
- [10] Wang C, Amar HM, Radvanyi L, *et al.* Clonal heterogeneity of dendritic cells derived from patients with chronic myeloid leukemia and enhancement of their T cells stimulatory activity by IFN- α [J]. *Exp Hematol*, 1999, 27(7): 1176-1184.
- [11] Zhu XP, Chen ZZ, Li CT, *et al.* *In vitro* inducing effect of dendritic cells cotransfected with survivin and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on cytotoxic T cell to kill leukemic cells [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121(21): 2180-2184.
- [12] Boasso A, Hardy AW, Anderson SA, *et al.* HIV-induced type I interferon and tryptophan catabolism drive T cell dysfunction despite phenotypic activation [J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(8): e2961.
- [13] Brandacher G, Cakar F, Winkler C, *et al.* Non-invasive monitoring of kidney allograft rejection through IDO metabolism evaluation [J]. *Kidney Int*, 2007, 71(1): 60-67.
- [14] Miyake S, Yamamura T. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases [J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2005, 5(3): 315-322.
- [15] Muraille E, De Trez C, Pajak B, *et al.* T cell-dependent maturation of dendritic cells in response to bacterial superantigens [J]. *J Immunol*, 2002, 168(9): 4352-4360.
- [收稿日期] 2008 - 12 - 24 [修回日期] 2009 - 02 - 20
- [本文编辑] 徐红梅

· 科技动态 ·

AIM2 炎性复合体识别细胞内 DNA 启动机体固有免疫应答

天然免疫应答在机体抵抗病毒感染中起到非常重要的作用。多数情况下,进入机体的病毒被免疫细胞表面的模式识别受体识别,引起多种细胞因子包括干扰素等的释放,触发固有免疫应答。但目前对于识别胞浆 DNA 的受体尚不甚了解。目前发现 DAI(DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors)和 NALP3(neutrophilic alkaline phosphatase)能够参与识别 DNA。NALP3 识别腺病毒来源的 DNA。但有研究发现某些其他类型的 DNA 可以诱导 IL-1 β 产生,但不依赖于 NALP3 炎性复合体。这提示还存在其他类型的尚未鉴定的受体。

本文作者设想胞质内的 DNA 受体应该具有以下两个特征:一是能够结合并识别 DNA;二是能够被细胞因子正反馈调控以保证免疫应答的强度。根据以上两点作者筛选出 7 个候选分子,根据这几个候选分子的结构域组成,优先选择 IFI204、IFI205 和 AIM2(absent in melanoma 2)作为主要的研究对象。利用 confocal 技术,实验发现在 IFI204、IFI205 和 AIM2 3 个候选分子当中,只有 AIM2 是细胞质定位的。因此,后续的研究以 AIM2 作为对象,利用免疫沉淀结合核酸亲和纯化的方法,发现 AIM2 能够在体外和 DNA 直接结合,其 HIN 结构域的 165 位氨基酸对于其 DNA 识别是至关重要的。这满足了 AIM2 作为胞质 DNA 识别受体的先决条件。利用免疫共沉淀和 confocal 技术也发现 AIM2 能够和炎性复合体的关键接头蛋白 ASC 相互结合,两者呈现共定位。接下来,作者在 THP1 细胞中研究 AIM2 是否参与 DNA 的识别,发现 THP1 细胞被 PMA 诱导分化的过程中,AIM2 的 mRNA 水平明显上调,这提示 AIM2 参与 DNA 的识别。利用 siRNA 干扰 AIM2 的表达后,能够明显抑制 DNA 诱导的 IL-1 β 的释放,这说明 AIM2 对于 DNA 介导 IL-1 β 的释放是必须的。最后,作者在 HEK-293 细胞中重构 AIM2 炎性复合体,发现 AIM2 确实能够作为炎性复合体的重要部分参与介导 IL-1 β 的释放。AIM2 氨基端 Pyrin 结构域的 14 位氨基酸对于其结合 ASC 并最终促进 caspase-1 活化、IL-1 β 释放是至关重要的。该研究最终证明了,AIM2 炎性复合体识别胞质 DNA,从而引起炎性因子释放,启动固有免疫应答。

[刘海波 摘译,陈涛涌 审阅. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datla P, *et al.* *Nature*, 2009, 458(7237): 509-513]