

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.09.005

· 基础研究 ·

Toll样受体-4表达对树突状细胞表型及功能的影响

谢云青¹, 栗世铀², 刘施佳¹, 黄丽洁¹, 郑秋红¹ (1. 福建医科大学附属肿瘤医院 福建省肿瘤医院 福建省肿瘤生物治疗重点实验室, 福建 福州 350014; 2. 中国科学院 北京基因组研究所, 北京 100020)

[摘要] **目的:** 探讨 Toll 样受体-4 (TLR-4) 表达对树突状细胞 (DC) 表型及功能的影响及其机制。 **方法:** 以构建的含有 *TLR-4* 全基因序列的 pCDNA3.1 质粒载体为模板, 通过 mMESSAGE mMACHINE T7 Kit 体外转录获得 *TLR-4* mRNA, 并采用脂质体法将其转染健康人外周血 PBMC 来源的 DC, 用流式细胞术检测鉴定转染后 DC 表面功能性分子的表达及 DC 体外诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 分泌细胞因子的能力。 **结果:** 成功构建人 TLR-4-pCDNA3.1 质粒载体; 体外扩增成功人 *TLR-4* 和 *EGFP* mRNA 片段。 *TLR-4* mRNA 转染后的 DC 表面趋化因子 CCR7 及功能性分子 HLA-DR 的表达显著高于 control mRNA 转染 DC、转染前成熟 DC [CCR-7: (42.4±4.93)% vs (20.1±3.09)%、(17.1±4.33)%], $P<0.05$; HLA-DR: (62.1±7.23)% vs (17.7±6.01)%、(25.8±4.16)%, $P<0.05$], 同时转染后的 DC 体外诱导 CTL 分泌 IFN- γ 细胞因子的能力强于 control mRNA -DC、空载转染 DC 诱导的 CTL 及加入 DC 前 CTL [(66.5±3.58)% vs (41.1±4.27)%、(37.9±2.96)%、(3.2±2.03)%], $P<0.05$ 。 **结论:** *TLR-4* mRNA 转染 DC 可显著增强 DC 的功能, 提高了 DC 抗原提呈及诱导 CTL 的能力, 为增强 DC 疫苗抗肿瘤效应提供实验依据。

[关键词] 树突状细胞; 细胞毒性 T 淋巴细胞; Toll 样受体-4; 抗原提呈; 免疫应答

[中图分类号] R737.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)09-0851-05

Effect of TLR-4 on phenotype and function of dendritic cells

XIE Yunqing¹, LI Shiyou², LIU Shijia¹, HUANG Lijie¹, ZHENG Qiuhong¹ (1. Fujian Provincial Key Laboratory of Tumor Biotherapy, Affiliated Tumor Hospital of Fujian Medical University and Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100020, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether the expression of Toll like receptor-4 (TLR-4) has an effect on the phenotype and function of dendritic cells (DCs) and the possible mechanism. **Methods:** pCDNA3.1 plasmid encoding full *TLR-4* gene sequence was constructed as a template to obtain *TLR-4* mRNA through *in vitro* transcription using mMESSAGE mMACHINE T7 Kit; DCs from healthy human peripheral blood were transfected with *TLR-4* mRNA by liposomal transfection. The functional molecule expression on DC surface and the ability of DC inducing cytotoxic T lymphocytes (CTL) to secrete cytokines *in vitro* were detected by Flow cytometry after transfection. **Results:** Human TLR-4-pCDNA3.1 plasmid was successfully constructed; human *TLR-4* and *EGFP* mRNA fragments were successfully amplified. The Flow cytometry results showed that the expressions of chemokine CCR7 and functional molecule HLA-DR on dendritic cell surface were significantly increased after transfection with *TLR-4* mRNA compared with control mRNA transfection or pre-transfection (CCR7: [42.4±4.93]% vs [20.1±3.09]%, [17.1±4.33]%, $P<0.05$; HLA-DR: [62.1±7.23]% vs [17.7±6.01]%, [25.8±4.16]%, $P<0.05$);

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目资助; 福建省科技计划项目资助 (No.2017Y0022); 福建省自然科学基金项目资助 (No.2016J01514)。Project supported by the National Clinical Key Specialty Construction Program, the Fujian Science and Technology Plan (No.2017Y0022), and the Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2016J01514)

[作者简介] 谢云青 (1972-), 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事肿瘤的细胞免疫学研究, E-mail: 1249826653@qq.com

[通信作者] 郑秋红 (ZHENG Qiuhong, corresponding author), 学士, 教授、主任医师, 研究生导师, 主要从事肿瘤的细胞免疫学研究, E-mail: zqh2858@foxmail.com

[优先发表]

and the ability of secreting IFN- γ from CTL induced by *TLR-4* mRNA-DCS was significantly enhanced *in vitro* compared with control mRNA-DC, empty-DC and PBMC ([66.5 \pm 3.58]% vs [41.1 \pm 4.27]%, [37.9 \pm 2.96]%, [3.2 \pm 2.03]%, $P < 0.05$). **Conclusion:** The function of dendritic cells could be significantly enhanced by *TLR-4* mRNA transfection. The ability of antigen presentation and inducing CTL of dendritic cell were improved, which would provide an experimental basis for enhancing the anti-tumor effect of DC vaccines.

[Key words] dendritic cell; cytotoxic T lymphocyte(CTL); Toll-like receptor-4(TLR4); antigen presenting; immune response

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(9): 913-925. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.006]

树突状细胞(DC)是启动肿瘤特异性免疫应答的中枢细胞,在肿瘤免疫治疗中起着关键性的作用。自1996年Hsu等^[1]首次在*Nature Medicine*上报道的利用DC肿瘤疫苗回输治疗滤泡B细胞淋巴瘤以来,国内外在DC肿瘤疫苗的开发和临床应用取得了重大进展,并显示了良好的安全性^[2-4]。但肿瘤DC疫苗实际治疗效果尚不如预期的理想^[5]。如何提高DC的免疫原性,增强DC抗原提呈及诱导免疫应答功能,是开发以DC为基础的肿瘤免疫治疗需要解决的关键问题。DC的抗原提呈能力是DC疫苗活化抗肿瘤免疫反应的关键因素。因此,DC疫苗的改进策略便聚焦在DC抗原提呈能力的调节上^[6-8]。Toll样受体-4(Toll-like receptor-4, TLR-4)是DC表面存在的调节非特异性免疫反应的细胞受体,其持续表达可以有效地维持TLR和JAK-STAT通路的活化状态,促进DC表面B7、CD83等功能性分子的表达,增强DC的抗原提呈功能,形成一种肿瘤抗原特异性的免疫耐受突破,获得有效抗肿瘤能力^[9-10]。因此,本课题通过*TLR-4*基因mRNA转染DC的方法,增强TLR-4在DC表面表达,以期提高DC的免疫原性,增强DC抗原提呈及诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的免疫应答的能力。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF, 150 μ g/支)、IL-4、IFN- γ 及TNF- α 购自Peprotech公司,GT-T551 H3培养基购自北京宝日医生物技术有限公司,淋巴细胞分离液购自美国General Electric公司。流式细胞仪(Beckman Coulter FC500)、CD8/CD80/CD83/HLA-DR/CCR7流式抗体及细胞因子检测试剂盒均购自Beckman公司,人TLR-4全长表达载体pCMV3-ORF-TLR4购自Sino Biological公司。EGFP-pCDNA3.1(+)质粒购自北京华越洋生物公司,pCDNA3.1(+)质粒为福建省肿瘤生物治疗重点实验室保存。

1.2 DC的培养

抽取健康献血者50~100 ml外周静脉血,经Fi-

coll密度梯度离心分离出单个核细胞(PBMC),加入GT-T551 H3培养基,以密度 2×10^6 /ml铺入75 cm²的细胞培养瓶,摇匀后平放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱培养2 h后,收集上清悬浮淋巴细胞冻存。贴壁细胞加入20 ml GT-T551H3培养基(含GM-CSF 500 ng/ml、IL-4 500 ng/ml),隔天补液1次,于第7天收集成熟DC进行转染。

1.3 人TLR-4-pCDNA3.1(+)质粒载体的构建

将含*TLR-4*全长基因的pCMV3-ORF-TLR4质粒用*Kpn* I和*Not* I双酶切,TLR-4酶切产物回收后定向克隆至pCDNA3.1(+)质粒上,构建人TLR-4-pCDNA3.1(+)质粒载体,转化后,挑取阳性克隆提取质粒,并进行质粒PCR鉴定。*TLR-4*引物由大连宝生物公司合成,正向引物序列为5'-ATATAAGCTTTGCCAG-GATGATGTCTGC-3',反向引物序列为5'-ATATG-GATCCGAACAAGTGTGGACCCAG-3'。

1.4 人TLR-4 mRNA的体外扩增

利用*Sma* I酶切位点将人TLR-4-pCDNA3.1、EGFP-pCDNA3.1质粒线性化,回收酶切后的线性化质粒,以此为模板,通过mMESSAGE mMACHINE T7 Kit进行*TLR-4*、*EGFP* mRNA的体外扩增,并采用LiCl回收的方法进行mRNA纯化回收,1%甲醛变性凝胶电泳鉴定回收的mRNA,NANODROP 2000c分光光度计检测mRNA的浓度。

1.5 EGFP、TLR-4 mRNA转染人外周血DC

采用Lipofectamine™ 2000试剂盒进行mRNA的转染。*TLR-4* mRNA 3 μ g与脂质体按1:2的比例混合入1 ml无抗生素培养基,混匀后,室温静置30 min,以2 000 \times g离心5 min收集培养7 d后的悬浮的成熟DC,用上述1 ml脂质体混合物重悬细胞,加入12孔板(1×10^6 个细胞/孔),37 $^{\circ}$ C、5%CO₂静置6 h后,加入1 ml GT-T551H3培养基(含GM-CSF 500 ng/ml, IL-4 500 ng/ml、TNF- α 500 ng/ml)。*EGFP* mRNA以同样方式转染DC作为阳性对照。24 h后,荧光显微镜下观察细胞,并收集转染后的DC,加CD80/CD83/HLA-DR/CCR7抗体进行荧光标记,流式细胞仪检测转染后DC的表型。用试剂盒中pTRI-Xef

control mRNA 转染 DC 以验证 mRNA 转染对 DC 是否可引起非特异性激活。

1.6 流式细胞术检测 CTL 的细胞因子分泌水平

将转染后的 DC 与 1.2 中收集的淋巴细胞以 1: 20 的比例进行混合,培养 24 h 后,收集细胞,10%血清封闭 Fc 抗体,CD8-PC5 抗体进行细胞表面染色 20 min,固定、破膜后,加入 IFN γ -FITC 抗体染色 20 min,洗涤离心后,100 μ l PBS 重悬细胞,进行流式检测。

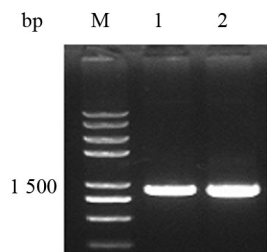
1.7 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建人 TLR-4-pCDNA3.1 质粒载体

鉴定结果(图 1)显示,所扩增 TLR-4 mRNA 片段长度约为 2.0 kb,与预估片段大小相符。



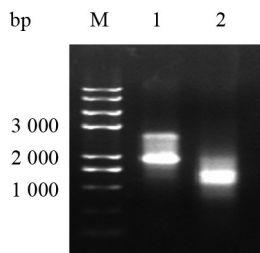
M:DL2504 DNA marker; 1,2: TLR-4 PCR products

图 1 TLR-4-pCDNA3.1 PCR 鉴定

Fig. 1 TLR-4- pCDNA3.1 was identified by PCR amplification

2.2 体外扩增成功人 TLR-4 和 EGFP mRNA 片段

利用 mMESSAGE mMACHINE T7 Kit 进行 mRNA 体外扩增结果(图 2)显示,所扩增的 TLR-4 mRNA 片段大小约为 2.0 kb,EGFP mRNA 片段约为 1.2 kb,与预估片段大小相符。



M: RNA marker; 1: TLR-4 mRNA; 2: EGFP mRNA

图 2 体外扩增的 TLR-4 和 EGFP mRNA 片段

Fig. 2 TLR-4 and EGFP mRNA fragments amplified in vitro by mMESSAGE mMACHINE T7 Kit

2.3 mRNA 转染后 DC 的形态及表型

流式细胞术检测 EGFP mRNA 转染后 DC 的荧光强度结果(图 3)显示,转染后 DC 的 EGFP mRNA 表达率为(43.1 \pm 6.34)%。

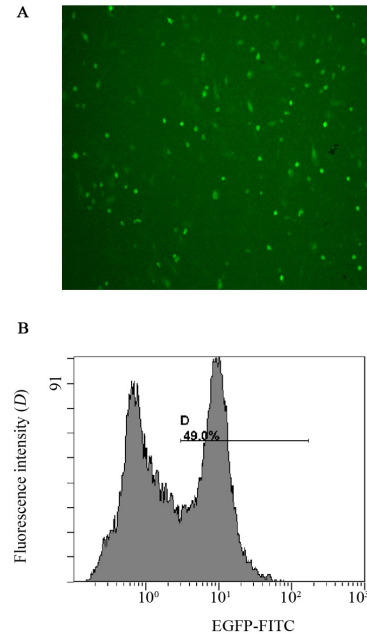


图 3 EGFP mRNA 转染 24 h 后 DC 的形态(A)及绿色荧光强度(B)

Fig. 3 DC Morphology (A) and green fluorescence intensity (B) after EGFP mRNA transfection for 24 h

流式细胞术检测结果(图 4)显示,TLR-4 mRNA 转染后的 DC 表面 CCR7、HLA-DR 的表达显著高于 control mRNA 转染 DC、转染前 DC[CCR7: (42.4 \pm 4.93)% vs (20.1 \pm 3.09)%、(17.1 \pm 4.33)% , $t=8.99$ 、4.76, 均 $P < 0.05$; HLA-DR: (62.1 \pm 7.23)% vs (17.7 \pm 6.01)%、(25.8 \pm 4.16)% , $t=5.72$ 、19.56, $P < 0.05$], CD83 的表达率与 pTRI-Xef control mRNA 转染的 DC 相比差异无统计学意义[(93.5 \pm 5.12)% vs (91.2 \pm 7.32)% , $t=1.81$, $P > 0.05$], 而与转染前成熟 DC 相比差异明显 [(93.5 \pm 5.12)% vs (82.1 \pm 2.03)% , $t=4.44$, $P < 0.05$]; CD80 的表达与 control RNA 转染 DC 及转染前成熟 DC 相比没有明显差异 [(96.6 \pm 2.75)% vs (93.2 \pm 4.14)%、97.0 \pm 2.25)% , $t=1.66$ 、3.27, 均 $P > 0.05$)]。

2.4 TLR-4 mRNA 转染后 DC 体外促进 CTL 的细胞因子分泌功能

流式细胞术检测结果(图 5)显示,TLR-4 mRNA 转染的 DC 体外诱导后的 CTL 的分泌 IFN- γ 的表达率显著高于 control mRNA 转染后 DC、空载 DC 诱导的 CTL 及加入 DC 前 CTL[(66.5 \pm 3.58)% vs (41.1 \pm 4.27)%、(37.9 \pm 2.96)%、(3.2 \pm 2.03)% , $t=11.01$ 、14.83、35.1, 均 $P < 0.05$)。

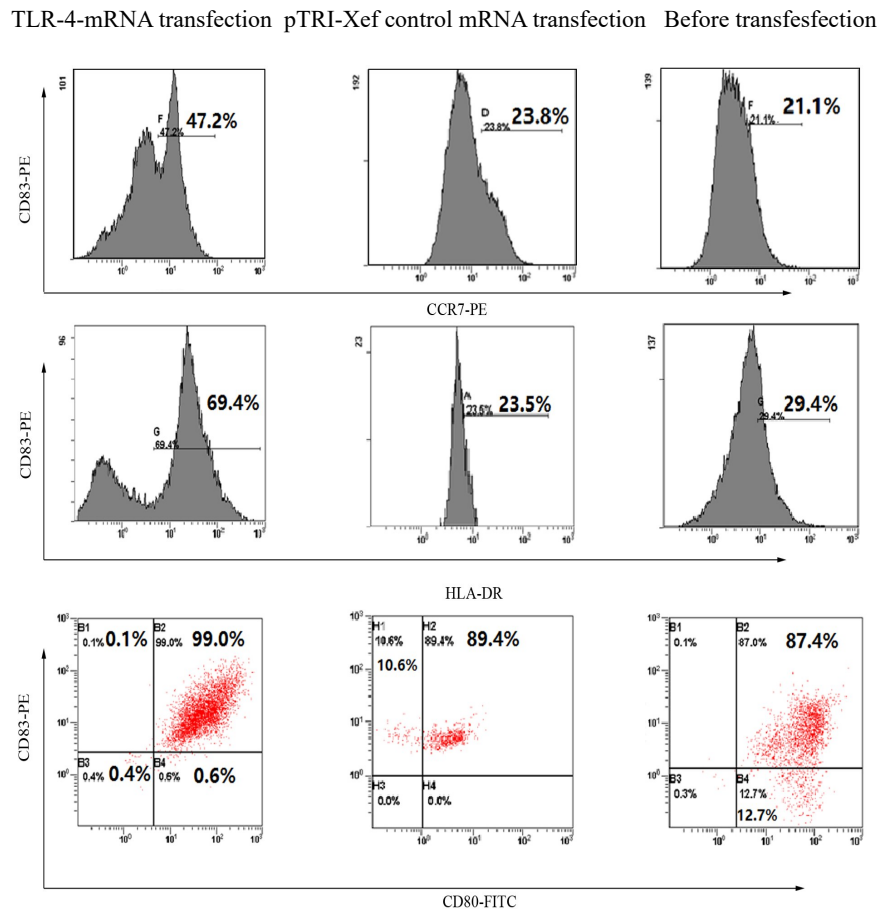


图4 转染前后成熟DC表面CCR-7、HLA-DR、CD80和CD83的表达
Fig.4 Expression of CCR-7, HLA-DR, CD80 and CD83 on the surface of mature DC before and after transfection

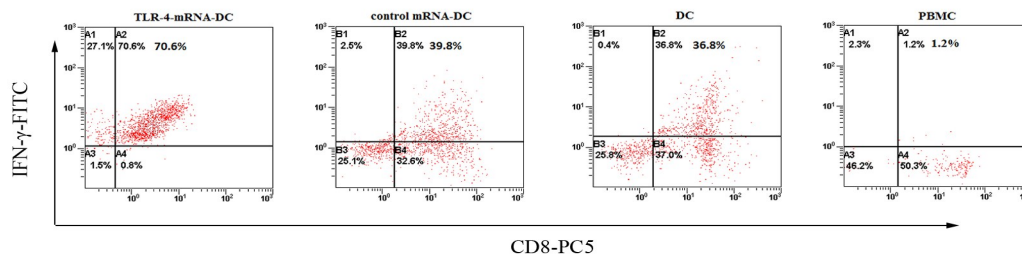


图5 DC诱导24 h后CTL胞内细胞因子分泌水平
Fig. 5 Cytokine secretion levels in CTL cells induced by DCs for 24 h

3 讨论

DC是启动肿瘤特异性免疫应答的中枢细胞,在机体的抗肿瘤免疫中发挥着极为重要的作用。尽管近二十多年来关于肿瘤DC疫苗的临床研究显示了良好的安全性,但Anguille等^[5]指出,基于DC的免疫治疗的客观反应率很小,在黑色素瘤患者中为8.5%、前列腺癌为7.1%、肾细胞癌为11.5%、神经胶质瘤为15.6%。因此寻找DC的优化策略,是发展新一代DC疫苗和提高其临床疗效的关键。

负载肿瘤抗原的DC具有双向免疫调节作用,

DC成熟状态决定了其诱导的免疫反应类型和程度。成熟DC主要诱导免疫激活,体外研究^[11]显示,成熟DC与T细胞共培养上清,IL-2、IFN-γ的水平明显增加,通过致敏DC活化的CTL能显著的杀伤肿瘤细胞,并随着效靶比的增加杀伤作用增强。在体内,DC必须通过迁移至T淋巴细胞富集的二级淋巴器官,才能激活针对肿瘤抗原的特异性CTL抗肿瘤免疫反应^[12]。

DC功能成熟的主要标志是CD80、CD86等共刺激分子和趋化因子受体的表达上调及IL-12分泌的增加^[13]。CD80、CD86等共刺激分子可调节T细胞的功能,而趋化因子可增强DC的移行能力,在DC成熟

后向二级淋巴器官的归巢和定居过程中具有关键作用^[14-15]。因此,增强DC疫苗的抗原提呈及迁移能力,是优化DC疫苗的主要策略之一。TLR-4是DC表面存在的调节非特异性免疫反应的细胞受体,DC通过膜表面表达的TLR4受体,活化NF- κ B启动核内相关基因转录,从而合成IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 及IFN- γ 等细胞因子并释放到胞外,引起粒细胞、巨噬细胞趋化聚集,毛细血管通透性增高,淋巴细胞浸润等炎症反应,发挥早期免疫应答的效应^[16-17]。

本研究以编码TLR-4分子的mRNA转染DC,与其他抗原负载方式相比具有明显的优势:如无需进行抗原表位的鉴定,可跨越MHC分子的障碍从而解决了新抗原表位的限制性,且可同时向DC转染多个抗原mRNA分子;同时,mRNA容易降解,且不会整合至宿主细胞基因组,无安全隐患;更为重要的是应用mRNA转导的方式有利于延长抗原在DC中持续的时间^[18]。本研究结果显示,转染后的DC不仅显著提高了表面共刺激分子CD83、HLA-DR及表面趋化因子CCR7的表达,而且在体外可显著增强诱导T淋巴细胞分泌细胞因子的能力,此结果与有关报道^[19]结果相符。但是,本研究结果显示,control mRNA转染的DC组CD83的表达率也显著增强,是否为mRNA非特异性激活的结果有待增加检测次数来进一步验证。

本研究证实了可通过体外扩增的方法获得携带肿瘤抗原信息的mRNA,并在转染DC后,能成功在DC表面表达其携带的信息,这为解决负载DC的抗原来源的局限性提供了一种解决途径。同时以TLR-4 mRNA转染DC后能提高DC的免疫原性,增强DC抗原提呈功能及诱导CTL抗肿瘤效应的能力,是DC增效的重要手段。本研究可为DC疫苗临床转化应用的优化策略提供思路,并为将来进一步设计抗原特异性DC疫苗提供更安全、便捷、有效的抗原负载方式奠定实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] HSU F J, BENIKE C, FAGNONI F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen pulsed dendritic cell[J]. *J Exp Med*, 1996, 2(1): 52-58.
- [2] 高艳荣,贾绍昌,江龙委. 树突状细胞疫苗肿瘤抗原负载方式的临床转化研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(5): 646-650. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.016.
- [3] 郭振红,曹雪涛. 肿瘤免疫细胞治疗的现状及展望[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(2): 149-160. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.001.
- [4] 冯鹏飞,韩双印. 树突状细胞疫苗治疗恶性肿瘤研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2015, 29(5): 420-422. DOI: 10.13507/j.issn.1674-3474.2015.05.002.
- [5] ANGUILLE S, SMITS E L, LION E, et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e257-267 [2017-04-06]. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/14702045/>. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70585-0.
- [6] 徐榕,江虹虹,宋海峰. 树突状细胞疫苗研究的新策略[J]. *中国肿瘤*, 2011, 20(2): 92-97. DOI: 1004-0242(2011)02-0092-06.
- [7] 陆虹旻,李林凤,高建新. 基于树突状细胞的肿瘤疫苗研究进展[J]. *胃肠病学*, 2016, 21(5): 257-262. DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2016.05.001.
- [8] WEI X X, FONG L, SMALL E J. Prostate cancer immunotherapy with sipuleucel-T: current standards and future directions[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(12): 1529-1541. DOI:10.1586/14760584.2015.1099437.
- [9] 李玉灵,赵华,魏枫,等. VEGF-C/VEGFR3通路对肿瘤患者外周血来源DC的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(3): 392-396. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.017.
- [10] 胥阶英,丁娜,操跃,等. 应用Toll样受体激动剂促进DC成熟的研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2017, 39(4): 389-393. DOI: 10.11844/cjcb.2017.04.0343.
- [11] 荆雪宁,邱波,王金凤,等. 黄芪多糖诱导成熟的树突状细胞肿瘤疫苗体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(9): 1103-1107. DOI:10.7661/CJIM.2014.09.1103.
- [12] 刘方方,谢军平. 以树突状细胞为基础的肿瘤免疫治疗策略研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(12): 1338-1340. DOI: 10.13423/j.cnki.cjemi.007192.
- [13] RADFORD K J, TULLETT K M, LAHOUD M H. Dendritic cells and cancer immunotherapy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 7(27): 26-32. DOI:10.1016/j.coi.2014.01.005.
- [14] YIN W, DULUC D, JOO H, et al. Dendritic cell targeting vaccine for HPV associated cancer[J/OL]. *Cancer Cell Microenviron*, 2016, 3(4): e1482[2017-04-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5267343/>. PMID:PMC5267343.
- [15] MITCHELL D A, BATICH K A, GUNN M D, et al. Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients[J]. *Nature*, 2015, 519(7543): 366-369. DOI:10.1038/nature14320.
- [16] PANZER R, BLOBEL C, FOLSTER-HOLST R, et al. TLR2 and TLR4 expression in atopic dermatitis, contact dermatitis and psoriasis[J]. *Exp Dermatol*, 2014, 23(5): 364-366. DOI: 10.1111/exd.12383.
- [17] 李丛哲,吴利先,王国富. Toll样受体4在结核分枝杆菌感染中的作用和研究进展[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(4): 289-292. DOI: 10.13350/j.cjpb.170421.
- [18] BENTEYD D, HEIRMAN C, BONEHILL A, et al. mRNA-based dendritic cell vaccines[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(2): 161-176. DOI:10.1586/14760584.2014.957684.
- [19] VAN LINT S, WILGENHOF S, HEIRMAN C, et al. Optimized dendritic cell based immunotherapy for melanoma: the TriMix-formula[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(9): 959-967. DOI: 10.1007/s00262-014-1558-3.

[收稿日期] 2017-04-10

[修回日期] 2017-06-15

[本文编辑] 党瑞山