

小干扰RNA抑制成熟树突细胞表面抗原CD80/CD86的表达

严志东¹, 闫佳², 颀孙永勋¹, 陈瑞¹, 张蔚¹, 冯素玲¹, 李建国¹ (¹中山大学孙逸仙纪念医院呼吸内科, 广东省广州市 510120; ²天津医科大学总医院重症医学科, 天津市 300052)

文章亮点:

1 实验首次通过小干扰RNA干扰技术抑制哮喘小鼠成熟树突细胞表面抗原CD80/CD86表达, 证实小干扰RNA可抑制哮喘小鼠树突细胞表面抗原CD80/CD86 mRNA及其蛋白的表达。

2 进一步将树突细胞与哮喘小鼠T淋巴细胞共培养, 证实通过小干扰RNA抑制树突细胞表面抗原CD80/CD86的表达, 能够阻断T淋巴细胞活化的协同刺激信号, 可促进哮喘小鼠Th1型细胞因子 γ 型干扰素的分泌、抑制Th2型细胞因子白细胞介素4的分泌, 从而诱导免疫耐受, 为哮喘的治疗提供一种新的思路 and 方向。

关键词:

实验动物: 组织构建; 小干扰RNA; 树突细胞; 表面抗原; CD80; CD86; T淋巴细胞; 干扰素 γ ; 白细胞介素4; 哮喘小鼠

主题词:

树突细胞; RNA, 小分子干扰; 抗原, 表面; 骨髓; 干扰素 γ ; 白细胞介素4; 哮喘

基金资助:

呼吸疾病国家重点实验室开放课题(2007DA80154F1107)

摘要

背景: 成熟树突细胞可通过其表面抗原CD80/CD86来启动Th细胞活化, 促使Th细胞向Th1细胞分化减少、向Th2细胞方向分化增多。

目的: 探讨小干扰RNA抑制哮喘小鼠成熟树突细胞表面抗原CD80/CD86表达后对Th1及Th2型细胞因子干扰素 γ 、白细胞介素4分泌的影响。

方法: 建立哮喘小鼠模型, 分离哮喘小鼠骨髓成熟树突细胞, 流式细胞术检测表面标记物CD11c、CD80、CD86的阳性表达率; 设计合成CD80/CD86相关小干扰RNA转染哮喘小鼠成熟树突细胞, 荧光定量PCR、流式细胞术检测干扰前后成熟树突细胞中CD80/CD86 mRNA和相应蛋白的表达, 将干扰组、未干扰组、转染试剂对照组的成熟树突细胞分别与小鼠T淋巴细胞共培养, ELISA检测上清液中Th1及Th2型细胞因子干扰素 γ 、白细胞介素4分泌水平。

结果与结论: ①正常组成熟树突细胞的CD80/CD86的表达与哮喘组相比均明显降低(均 $P < 0.05$)。②小干扰RNA转染哮喘小鼠成熟树突细胞后, 干扰组CD80/CD86 mRNA及其蛋白表达水平较其他组均明显降低(均 $P < 0.05$)。③小干扰RNA转染后干扰组共培养体系中干扰素 γ 水平明显高于其他组(均 $P < 0.05$), 白细胞介素4水平则明显低于其他组(均 $P < 0.05$)。提示哮喘小鼠成熟树突细胞高表达CD80/CD86, 小干扰RNA特异性抑制哮喘小鼠成熟树突细胞中CD80/CD86的表达, 能增加干扰素 γ 并减少白细胞介素4的分泌, 从而纠正Th1/Th2失衡。

严志东, 闫佳, 颀孙永勋, 陈瑞, 张蔚, 冯素玲, 李建国. 小干扰RNA抑制成熟树突细胞表面抗原CD80/CD86的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(5):754-760.

Small interfering RNA inhibits the expression of surface antigens CD80/CD86 from mature dendritic cells

Yan Zhi-dong¹, Yan Jia², Zhuansun Yong-xun¹, Chen Rui¹, Zhang Wei¹, Feng Su-ling¹, Li Jian-guo¹ (¹Department of Respiratory Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China; ²Department of Intensive Care Unit, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

Abstract

BACKGROUND: The surface antigen CD80/CD86 on mature dendritic cells can activate helper T (Th) cells, reduce the differentiation of Th cells toward Th1 cells, and promote the differentiation of Th cells toward Th2 cells.

OBJECTIVE: To investigate the effect of small interfering RNA (siRNA) inhibiting the expression of surface antigens CD80/CD86 from asthmatic murine mature dendritic cells on Th1/Th2 type cytokines, interferon- γ and interleukin-4.

METHODS: Asthmatic model of mice was established; then bone marrow-derived mature dendritic cells were separated and cultured. The expression of CD11c, CD80 and CD86 on mature dendritic cells were examined

严志东, 男, 1985年生, 广西壮族自治区贺州市人, 汉族, 中山大学孙逸仙纪念医院在读硕士, 主要从事哮喘和干细胞方面的研究。

通讯作者: 李建国, 博士, 教授, 硕士生导师, 中山大学呼吸疾病研究所, 中山大学孙逸仙纪念医院呼吸内科, 广东省广州市 510120

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.05.017
[http://www.crter.org]

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2014)05-00754-07
稿件接受: 2013-11-22

Yan Zhi-dong★, Studying for master's degree, Department of Respiratory Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Corresponding author: Li Jian-guo, M.D., Professor, Master's supervisor, Department of Respiratory Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Accepted: 2013-11-22

by flow cytometry. The siRNA was transferred into mature dendritic cells of asthmatic mice, and the CD80/CD86 mRNA and protein expression before and after interference were determined by fluorescent quantitative PCR and flow cytometry. The mature dendritic cells in non-siRNA group, siRNA group and negative siRNA group were co-cultured with T cells. The interferon- γ and interleukin-4 productions were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The expression of CD80/CD86 on the mature dendritic cells of asthmatic group was significantly higher than that in normal control group (all $P < 0.05$). (2) After siRNA was transferred into mature dendritic cells, the expression level of CD80/CD86 mRNA and protein in siRNA group was significantly lower than other groups (all $P < 0.05$). (3) After siRNA transfection, the level of interferon- γ from the supernatant of mature dendritic cells and T cells co-culture system was significantly increased in the siRNA group compared with other groups (all $P < 0.05$), while interleukin-4 production in the siRNA group was significantly decreased (all $P < 0.05$). These findings suggest that high expression of CD80/CD86 on mature dendritic cells of asthmatic mice is observed, specific siRNA can effectively inhibit the expression of CD80/CD86, thus increasing interferon- γ production and decreasing interleukin-4 production, which contributes to regulate the Th1/Th2 imbalance.

Subject headings: dendritic cells; RNA, small interfering; antigens, surface; bone marrow; interferon-gamma; interleukin-4; asthma

Funding: the Open Program of National Key Laboratory of Respiratory Disease, No. 2007DA80154F1107

Yan ZD, Yan J, Zhuansun YX, Chen R, Zhang W, Feng SL, Li JG. Small interfering RNA inhibits the expression of surface antigens CD80/CD86 from mature dendritic cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(5):754-760.

0 引言 Introduction

支气管哮喘是由多种炎性细胞和炎性递质参与的气道慢性炎症性疾病。T细胞在诱导哮喘气道炎症反应中起关键的作用^[1], 而T细胞的活化需要抗原提呈细胞提供的刺激信号, 树突状细胞是体内最主要的抗原提呈细胞, 是惟一初始型免疫反应细胞, 也是最强大的免疫反应诱导物, 它能捕获并呈递抗原^[2-3], 通过其表面抗原CD80/CD86(又称为共刺激分子)的表达来启动辅助性T(Th)细胞活化, 促使Th细胞向Th2 细胞方向分化增多, 向Th1细胞分化减少, 导致Th1/ Th2型细胞因子比例失调^[4]。应用小干扰RNA抑制哮喘小鼠成熟树突细胞表面共刺激分子CD80/CD86对T淋巴细胞分化及其细胞因子分泌的影响的研究目前鲜有报道。本研究通过应用小干扰RNA抑制哮喘小鼠树突细胞表面共刺激分子CD80/CD86的表达, 阻断T细胞活化的共刺激信号, 探讨小干扰RNA干扰哮喘小鼠成熟树突细胞的CD80/CD86后对Th1/Th2型细胞因子干扰素 γ 、白细胞介素4的影响, 从而为 RNA干扰(RNAi)应用于哮喘治疗提供新的靶位, 为哮喘的基因治疗开辟新的途径。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验和细胞学体外实验。

时间及地点: 2012年3月至2013年3月于中山大学孙逸仙纪念医院林百欣实验中心完成。

材料:

实验动物: 健康SPF级BALB/c小鼠20只, 雌性, 6-8周龄, 体质量(18 \pm 2) g, 购自中山大学实验动物中心, 实验动物使用许可证号: 广东省实验动物监测所合格证2008A023。

实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

小干扰RNA抑制成熟树突细胞表面抗原CD80/CD86表达实验的主要试剂:

试剂	来源
RMPI-1640 细胞培养基	Gibco, 美国
标准胎牛血清 FBS	Hyclone, 澳大利亚
重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)	Peptotech, 美国
重组小鼠白细胞介素 4 (rmIL-4)	Peptotech, 美国
FITC-小鼠 CD11c 抗体, PE-小鼠 CD80 抗体, FITC-小鼠 CD86 抗体, FITC-小鼠 CD86 抗体, PE-小鼠 MHC II 抗体	eBioscience, 美国
脂多糖(LPS), 鸡卵白蛋白(OVA V级)	Sigma, 美国
转染试剂 Lipofectamine 2000, TRIzol 试剂	Invitrogen, 美国
Opti-MEN I Reduced Serum Medium	Gibco, 美国
荧光定量 PCR 试剂盒 QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit	Takala, 日本
小鼠淋巴细胞分离液, 干扰素 γ 和白细胞介素 4 ELISA 试剂盒	达科为公司, 中国
明矾	广州化学试剂厂, 中国
CD80siRNA、CD86siRNA、FAMsiRNA	上海吉玛制药公司, 中国

实验方法:

哮喘小鼠模型的建立: 20只小鼠随机数字表法均分正常对照组、哮喘模型组。哮喘模型组: 每只小鼠腹腔注射抗原溶液0.2 mL(OVA 100 μ g/明矾20 mg), 进行致敏, 第14天和第21天以同样剂量、同样方法加强, 第28-34天把小鼠放于自制的密闭容器内(50 cm \times 50 cm \times 50 cm), 以5%OVA溶液雾化吸入, 30 min/d, 持续7 d激发。正常对照组: 以生理盐水替代OVA溶液, 方法和步骤同上。两组所有小鼠最后1次激发后24 h麻醉, 取肺脏组织, 浸泡于体积分数10%乙醇中固定24 h, 常规石蜡切片, 苏木精-伊红染色, 光镜下观察支气管、肺组织病理变化。

骨髓来源树突细胞的体外分离、培养: 所有小鼠最后1

次激发后24 h断颈处死, 浸泡在体积分数75%乙醇中5-10 min, 超净台下无菌手术取出股骨和胫骨, 去除肌肉和结缔组织, 浸泡于无菌PBS中。将骨头两端剪断暴露骨髓腔, 用1 mL注射器以RMPI-1640培养基反复冲出骨髓, 收集骨髓细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 按体积1:10比例加入红细胞裂解液混合, 静置3-5 min, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, PBS洗涤2次。用含体积分数10%FBS的RMPI-1640完全培养基重悬细胞, 以 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种至6孔板, 每孔2 mL, 加入重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(10 $\mu\text{g/L}$)和重组小鼠白细胞介素4(10 $\mu\text{g/L}$), 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、体积分数5% CO_2 培养箱中培养。48 h后首次全量换液, 去除悬浮细胞, 补充含同样浓度细胞因子的完全培养基, 隔日半量换液并补足细胞因子, 收集前1 d加入LPS(1 mg/L), 培养至第7天, 收集悬浮细胞为成熟树突细胞。用PBS洗涤2次, 分别加入荧光标记的抗体(Anti-CD11c-FITC、Anti-CD80-PE、Anti-CD86-FITC、Anti-MHC II-PE), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 用PBS洗去为标记抗体, 10 g/L多聚甲醛固定, 同型IgG作为阴性对照, 应用流式细胞仪分析样本中相应标记抗原的阳性表达率。

小干扰RNA的制备与转染哮喘小鼠骨髓来源树突细胞: 根据相关文献[5]报道的序列制作相应的小干扰RNA, 以上小干扰RNA由上海吉玛制药技术有限公司合成。将哮喘小鼠骨髓来源成熟树突细胞按照 1×10^5 /孔的密度接种于24孔板, 取3 μL Lipofectamine 2000试剂加入到50 μL 的Opti-MEN I Reduced Serum Medium培养液, 轻轻混合后在室温下孵育5 min。取12 μL 的FAM-小干扰RNA(转染FAM标记的阴性对照小干扰RNA), 用50 μL 的Opti-MEN I Reduced Serum Medium培养液稀释, 轻轻混合均匀。把稀释后的FAM-小干扰RNA与稀释后的Lipofectamine 2000轻柔混匀, 室温下孵育20 min, 构成FAM-小干扰RNA-转染试剂混合物。将FAM-小干扰RNA-转染试剂混合液加入24孔培养板, 轻轻前后摇晃培养板混匀, 置于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数5% CO_2 培养箱中, 6 h后荧光显微镜、流式细胞仪检测转染效率, 加入新鲜完全RMPI-1640培养基。

将哮喘小鼠骨髓来源成熟树突细胞分为3组: 未干扰组、干扰组、转染试剂对照组。CD80、CD86相关小干扰RNA转染哮喘小鼠骨髓来源树突细胞的剂量、方法与FAM-小干扰RNA基本相同。

各组小干扰RNA的序列:

小干扰RNA	序列
CD80	Sense: 5'-GGA AAG AGG AAC GUA UGA AdT dT-3' Antisense: 5'-UUC AUA CGU UCC UCU UUC CdT dT-3'
CD86	Sense: 5'-CAG AGA AAC UUG AUA GUG UdT dT-3' Antisense: 5'-ACA CUA UCA AGU UUC UCU GdT dT-3'
FAM	Sense: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3' Antisense: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'

实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测CD80/CD86mRNA的表达: 根据GenBank查到的相应引物序列由中山大学达安基因股份有限公司设计合成引物。转染24 h后, 使用Trizol试剂提取 1×10^6 树突细胞的总RNA, 按RT-PCR试剂盒说明书以反转录酶MMLV合成cDNA第一链, 反应条件为37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 然后95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。应用SYBR Green I 荧光染料法, 以cDNA为模板加入SYBR Green I PCR buffer、dNTPs、上游引物、下游引物和Taq酶进行PCR扩增, 反应条件为93 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 然后93 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共40循环, 每个样本做3个复孔。利用相应分析软件获得各组样本与内参GAPDH相对应的扩增曲线, 绘制出标准曲线直线回归图, 采用标准曲线定量法, 得到各样本Ct值(即在PCR扩增过程中, 扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数)和相应的每 μL cDNA的拷贝数(用X表示), 根据公式 $Y = X1(\text{目的基因}) \div X2(\text{内参基因})$, 计算各样本Y值, 进行统计学分析。

各组mRNA引物序列:

mRNA	引物序列
CD80	Forward primer: 5'-CTG GGA AAA ACC CCC AGA AG-3' Reverse primer: 5'-TGA CAA CGA TGA CGA CGA CTG-3'
CD86	Forward primer: 5'-CAT GGG CTT GGC AAT CCT TA-3' Reverse primer: 5'-AAA TGG GCA CGG CAG ATA TG-3'
GAPDH	Forward primer: 5'-CGT GTT CCT ACC CCC AAT GT-3' Reverse primer: 5'-TGT CAT CAT ACT TGG CAG GTT TCT-3'

流式细胞术(FACS)检测CD80/CD86蛋白的表达: 收集树突细胞, 用PBS洗涤2次, 分别加入带有荧光标记的抗体(Anti-CD80-PE、Anti-CD86-FITC), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, PBS洗涤, 10 g/L多聚甲醛固定, 同型IgG作为阴性对照, 放入流式细胞仪检测标本中相应标记的阳性表达率。

T淋巴细胞的分离: 根据小鼠淋巴细胞分离液(达科为公司, 中国)说明书, 断颈处死健康BALB/c小鼠, 浸泡于体积分数75%的乙醇中, 无菌条件下在超净台中取出小鼠脾脏。在35 mm培养皿中放入4.0-5.0 mL小鼠淋巴细胞分离液, 将脾脏剪成小块, 于400目细胞筛网上研磨。把悬有脾脏细胞的分离液立即转移到15 mL离心管中, 覆盖500 μL 的RMPI-1640培养基, 保持液面分界明显, 室温下1 200 r/min离心30 min。离心结束后, 沿管壁轻轻吸出中间灰白色淋巴细胞层, 再加入10 mL RMPI-1640培养基, 颠倒洗涤, 室温下1 200 r/min离心10 min收集细胞。PBS洗涤后去上清液, 用含体积分数10%的FBS的RMPI-1640培养基重悬细胞, 细胞计数, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 备用。

ELISA检测成熟树突细胞与T细胞共培养后上清液中干扰素 γ 、白细胞介素4的含量: 将 1×10^4 /孔哮喘小鼠骨髓来源树突细胞与 1×10^5 /孔健康小鼠T细胞共同培养于96孔

板内, 每孔加入OVA至终浓度为10 mg/L, 每孔终体积为200 μ L。具体分组为: 未干扰组: 未转染的成熟树突细胞+T细胞; 干扰组: 转染CD80/CD86小干扰RNA的成熟树突细胞+T细胞; 转染试剂对照组: 转染阴性对照的成熟树突细胞+T细胞。置于37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、体积分数5%CO₂培养箱培养72 h后, 1 000 r/min离心10 min, 收集上清液。根据干扰素 γ 、白细胞介素4 ELISA试剂盒的说明进行操作, 经过加样、加抗体、温育、洗板、加酶、温育、洗板、显色、终止反应, 于酶标仪450 nm处读取吸光度值。

主要观察指标: RT-PCR检测CD80/CD86 mRNA的表达, FACS检测CD80/CD86蛋白水平的表达, ELISA检测成熟树突细胞与T细胞共培养后上清液中干扰素 γ 、白细胞介素4的含量。

统计学分析: 所有数据采用SPSS13.0统计学软件分析, 定量资料应用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间均数比较采用方差分析(F 检验), 组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入健康SPF级BALB/c小鼠20只, 正常对照组和哮喘模型组各10只, 全数进入结果分析, 无实验动物的脱失。

2.2 哮喘小鼠模型的建立 小鼠经激发后可出现点头样呼吸, 呼吸频率加快、减慢或节律不规则, 成团聚集在一起, 行动缓慢或俯伏不动, 反应迟钝, 毛色灰暗, 体质量减轻。肺组织病理观察显示: 哮喘组与正常对照组相比, 支气管、血管周围有大量以嗜酸性粒细胞、淋巴细胞为主的炎性细胞浸润, 支气管黏膜增厚, 黏液分泌增多, 气道上皮细胞脱落, 平滑肌增厚, 管腔狭窄, 于肺间质可见到散在较多的炎性细胞(图1A)。正常对照组未见明显病理改变(图1B)。

2.3 FACS检测成熟树突细胞表面分子的表达 正常组成熟树突细胞与哮喘组成熟树突细胞均高表达CD11c, 差异无显著性意义($P > 0.05$); 正常组成熟树突细胞的CD80/CD86与哮喘组相比明显降低, 差异有显著性意义($P < 0.05$, 图2)。

2.4 小干扰RNA转染哮喘小鼠成熟树突细胞效率的检测 转染6 h后, 荧光显微镜下可观察到小干扰RNA转染成熟树突细胞的效果(图3A), FACS检测转染率均为75%左右(图3B)。

2.5 RT-PCR检测小干扰RNA对CD80/CD86 mRNA表达水平的影响 干扰组成熟树突细胞的CD80/CD86 mRNA表达水平低于未干扰组和转染试剂对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 未干扰组成熟树突细胞的CD80/CD86mRNA表达水平与转染试剂对照组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$, 图4)。

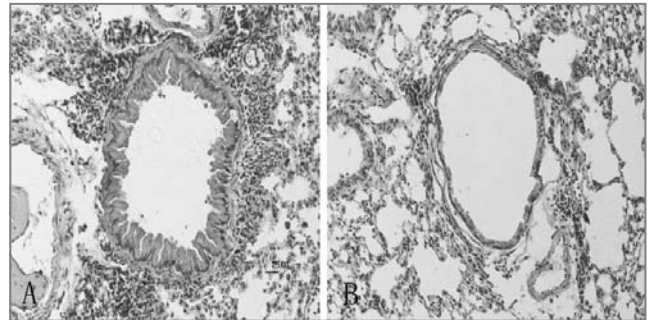


图1 哮喘模型小鼠与正常小鼠肺组织病理表现(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Figure 1 The lung histopathology of asthmatic mice and normal mice (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

图注: 图中 A 为哮喘组, 可见支气管、血管周围有大量以嗜酸性粒细胞、淋巴细胞为主的炎性细胞浸润, 管腔狭窄, 于肺间质可见到散在较多的炎性细胞; 图中 B 为对照组, 未见明显病理改变。

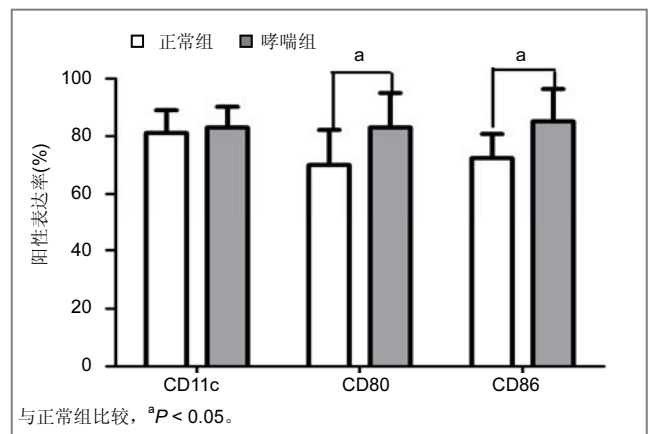


图2 成熟树突细胞表面分子CD11c、CD80、CD86阳性表达率(%)
Figure 2 The positive expression rate of CD11c, CD80 and CD86 on mature dendritic cells (%)

图注: 哮喘组成熟树突细胞的CD80/CD86阳性表达率显著增高。

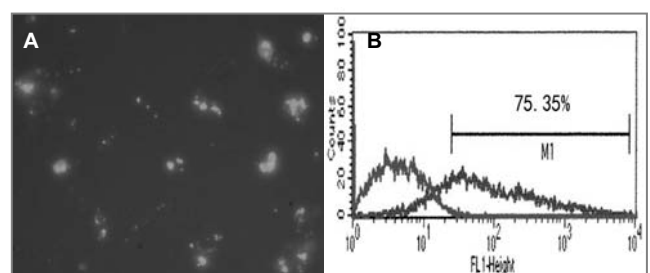
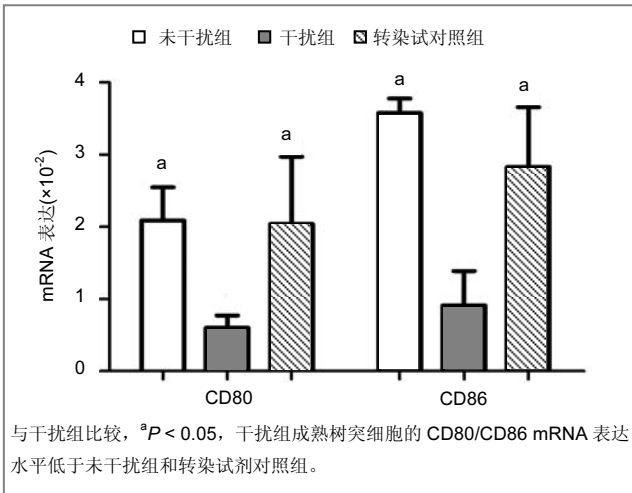


图3 荧光显微镜下观察小干扰RNA转染效率及FACS检测小干扰RNA转染效率

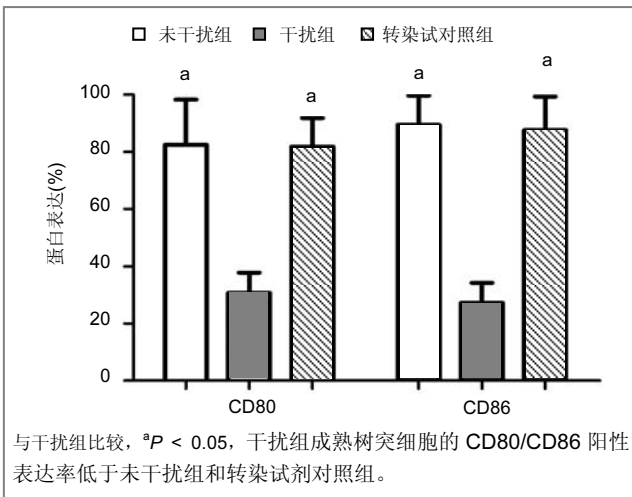
Figure 3 Transfection efficiency of small interfering RNA observed by fluorescence microscope and detected by flow cytometry

图注: 图中 A 可观察到小干扰RNA转染的成熟树突细胞($\times 400$); B 为 FACS 检测转染率, 均为75%左右, 说明小干扰RNA转染成熟树突细胞的效果较为成功, 可提供后续实验的使用。

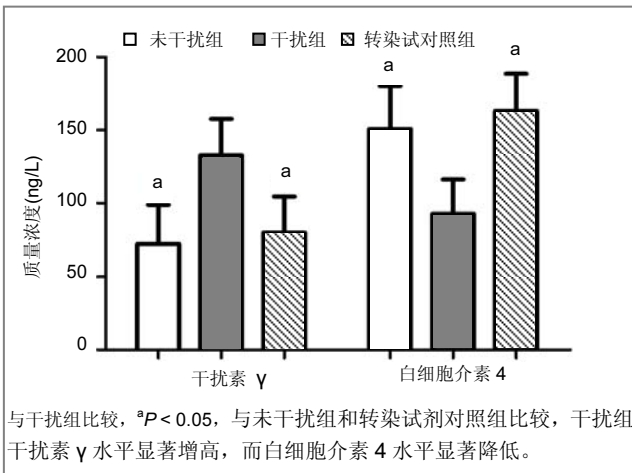
2.6 FACS检测小干扰RNA对CD80/CD86蛋白表达水平的影响 干扰组成熟树突细胞的CD80/CD86阳性表达率低于未干扰组和转染试剂对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 未干扰组成熟树突细胞的CD80/CD86阳性表达率与转染试剂对照组相比差异无显著性意义($P > 0.05$, 图5)。



与干扰组比较, ^a*P* < 0.05, 干扰组成熟树突细胞的 CD80/CD86 mRNA 表达水平低于未干扰组和转染试剂对照组。
 Figure 4 CD80/CD86 mRNA expression after different treatments as detected by reverse transcription PCR



与干扰组比较, ^a*P* < 0.05, 干扰组成熟树突细胞的 CD80/CD86 阳性表达率低于未干扰组和转染试剂对照组。
 Figure 5 CD80/CD86 protein expression after different treatments as detected by flow cytometry



与干扰组比较, ^a*P* < 0.05, 与未干扰组和转染试剂对照组比较, 干扰组干扰素 γ 水平显著增高, 而白细胞介素 4 水平显著降低。
 Figure 6 Production of interferon-γ and interleukin-4 in the mature dendritic cells and T cells co-culture system after different treatments as detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ng/L)

2.7 ELISA检测成熟树突细胞与T细胞共培养后上清液中干扰素γ、白细胞介素4水平变化 共培养72 h后, 干扰组干扰素γ水平高于未干扰组和转染试剂对照组, 差异有显著性意义(*P* < 0.05); 未干扰组干扰素γ水平与转染试剂对照组相比差异无显著性意义(*P* > 0.05)。干扰组白细胞介素4水平低于未干扰组和转染试剂对照组, 差异有显著性意义(均*P* < 0.05); 未干扰组白细胞介素4水平与转染试剂对照组比较, 差异无显著性意义(*P* > 0.05, 图6)。

3 讨论 Discussion

支气管哮喘是由多种炎性细胞, 如肥大细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等, 和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病^[6-9]。机体接触变应原后, 由抗原提呈细胞将抗原呈递给T细胞, 促使其活化^[3]。抗原提呈细胞包括树突状细胞、巨噬细胞、B细胞等^[10], 其中树突细胞是目前已知功能最强的抗原提呈细胞, 它是体内免疫反应的始动者, 高表达共刺激分子CD80/CD86的成熟树突细胞(成熟树突细胞)诱导T细胞活化, 低表达共刺激分子CD80/CD86的未成熟树突细胞抑制T细胞反应, 诱导免疫耐受^[11-12]; 研究显示支气管哮喘患者树突细胞功能亢进^[13]。近年来, 许多研究发现, 树突细胞表面共刺激分子CD80/CD86的表达水平与Th2细胞反应及哮喘气道炎症有密切关系^[14-15], 高表达CD80/CD86的树突细胞能够刺激CD4⁺初始型Th细胞的活化并向Th2细胞分化, 导致Th1/Th2比例失调, Th1型细胞因子干扰素γ等分泌不足, Th2型细胞因子如白细胞介素4、白细胞介素5等分泌增多, 从而引起气道的变态反应性炎症^[15-17]。树突细胞诱导T细胞活化需要两个信号^[18-20]: 第一信号为树突细胞表面的抗原-MHC复合物与T细胞表面T细胞受体TCR-CD3复合物特异性结合产生; 第二信号树突细胞表面多种共刺激分子和初始型T细胞表面相应受体结合, 形成共刺激通路^[21]。近年有研究提出第三信号^[22], 为树突细胞产生的某些细胞分子如胸腺间质的淋巴细胞素(TSLP), 影响Th细胞的分化方向。其中, 最经典、最重要的是CD80/CD86-CD28共刺激通路, Chen等^[17]应用CD80/CD86单克隆抗体阻断CD80/CD86-CD28共刺激通路可抑制哮喘小鼠炎症反映, Crosby等^[23]应用反义寡核苷酸阻断CD86共刺激通路可抑制哮喘小鼠的气道高反应性, 提示阻断CD80/CD86-CD28共刺激通路是治疗哮喘的有效靶位。

RNA干扰(RNAi)是指内源性或外源性双链RNA(dsRNA)介导的细胞内的mRNA发生特异性降解, 导致靶基因的表达沉默, 产生相应的功能表型缺失的技术, 具有高特异性、高效性、传递性以及时间依赖性等特点。1998年由Fire等^[24]首次发现并进行了研究, RNA干扰作为近年来基础医学及临床医学研究的热点, 其抑制致病基因的表达, 已经被广泛应用于治疗各类疾病^[25-27]。RNA干扰在支气管哮喘的诊断及治疗方面也有大量的研究报道^[28-31]。

RNA干扰应用于树突细胞和哮喘的防治近年国内外均有报道, Darcan等^[32]发现用OVA致敏BALB/c小鼠建立哮喘模型中,通过滴鼻给小干扰RNA沉默气道上皮细胞STAT6,可以明显的减轻过敏性哮喘的两个主要表现:气道炎症和气道高反应性,这样的结果是因为废除了气道局部Th2细胞因子的产生及其功能。Moriwaki等^[33]研究证实用小干扰RNA沉默哮喘小鼠的SOCS3基因后,能改善过敏原刺激引起的气道反应性和嗜酸粒细胞浸润。陈家军等^[34]采用RNAi技术抑制小鼠骨髓树突状细胞髓样分化因子88 (MyD88)的表达,显著抑制LPS促树突细胞成熟的效应。Yang等^[35]应用RNAi抑制精氨酸酶I的表达可减轻白细胞介素13引起的气道高反应性。Mao等^[36]应用RNAi抑制白细胞介素5受体 α 可减轻哮喘小鼠的气道炎症。郑永华等^[37]应用小干扰RNA能够有效抑制哮喘小鼠树突细胞酪氨酸蛋白激酶基因的表达,阻遏树突细胞的抗原递呈作用以及活化、分化T细胞的功能。但是应用小干扰RNA抑制哮喘小鼠树突细胞表面共刺激分子CD80/CD86对T淋巴细胞分化影响的研究目前鲜有报道。

实验根据前期的报道的方法建立哮喘小鼠模型^[38],分离培养出哮喘小鼠骨髓树突细胞,流式细胞术检测表面标记物CD11c、CD80、CD86的阳性表达率,根据相关文献化学合成CD80/CD86相关小干扰RNA序列并转染哮喘小鼠成熟树突细胞^[5],荧光定量RT-PCR、流式细胞术检测干扰前后成熟树突细胞中CD80/CD86 mRNA及其蛋白的表达,将干扰前后的成熟树突细胞分别与小鼠T淋巴细胞共培养,ELISA检测上清液中Th1型细胞因子干扰素 γ 和Th2型细胞因子白细胞介素4的水平。研究发现哮喘组和正常对照组成熟树突细胞均高表达CD11c,无明显差异,正常组成熟树突细胞的CD80/CD86的表达与哮喘组相比均明显降低,表明哮喘小鼠成熟树突细胞表达共刺激分子CD80/CD86的能力增强。小干扰RNA转染小鼠成熟树突细胞后,CD80/CD86 mRNA表达水平和蛋白阳性表达率明显均降低,在转录和蛋白表达水平证实了小干扰RNA对共刺激分子CD80/CD86的抑制作用。在成熟树突细胞与T细胞共培养的上清液中,干扰后干扰素 γ 水平明显升高,白细胞介素4水平明显下降,这说明经小干扰RNA干扰后,哮喘小鼠成熟树突细胞表面共刺激分子CD80/CD86的表达下降,导致CD80/CD86-CD28共刺激信号减弱,从而影响到Th1/Th2细胞因子的表达,使原来Th1/Th2型细胞的偏移得到纠正,诱导免疫耐受,从而为RNAi应用于哮喘治疗提供新的靶位,为哮喘的基因治疗开辟新的途径。

致谢: 感谢中山大学孙逸仙纪念医院林百欣实验中心的各位老师。

作者贡献: 第一作者及通讯作者进行实验设计,实验实施为全部作者,实验评估,成文,审校为第一作者及通讯作者,并对

文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: RNA干扰(RNAi)是指内源性或外源性双链RNA(dsRNA)介导的细胞内的mRNA发生特异性降解,导致靶基因的表达沉默,产生相应的功能表型缺失的技术,具有高特异性、高效性、传递性以及时间依赖性等特点。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Markey KA, Koyama M, Kuns RD, et al. Immune insufficiency during GVHD is due to defective antigen presentation within dendritic cell subsets. *Blood*. 2012; 119(24):5918-5930.
- [2] Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*. 2012;18(5):673-683.
- [3] Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(3):450-63, 464.
- [4] Lim TS, Goh JK, Mortellaro A, et al. CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-cells. *PLoS One*. 2012;7(9):e45185.
- [5] Gu X, Xiang J, Yao Y, et al. Effects of RNA interference on CD80 and CD86 expression in bone marrow-derived murine dendritic cells. *Scand J Immunol*. 2006;64(6): 588-594.
- [6] Fanta CH. Asthma. *N Engl J Med*. 2009;360(10):1002-1014.
- [7] Lambrecht BN, Hammad H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:243-270.
- [8] Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012;18(5):716-725.
- [9] Hansel TT, Johnston SL, Openshaw PJ. Microbes and mucosal immune responses in asthma. *Lancet*. 2013;381 (9869):861-873.
- [10] Goyvaerts C, Dingemans J, De Groeve K, et al. Targeting of human antigen-presenting cell subsets. *J Virol*. 2013; 87(20): 11304-11308.
- [11] Reis ESC. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(6):476-483.
- [12] Gill MA. The role of dendritic cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):889-901.
- [13] 施举红,林耀广,李太生.树突细胞在抗原递呈和支气管哮喘发病机制中的作用[J].中华结核和呼吸杂志, 2005,28(1):22-27.
- [14] Wong CK, Lun SW, Ko FW, et al. Increased expression of plasma and cell surface co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(1):122-129.
- [15] Bellou A, Finn PW. Costimulation: critical pathways in the immunologic regulation of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005;5(2):149-154.
- [16] van Rijt LS, Vos N, Willart M, et al. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(1):166-173.

- [17] Chen YQ, Shi HZ. CD28/CTLA-4--CD80/CD86 and ICOS--B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. *Allergy*. 2006;61(1):15-26.
- [18] Bieber T, Novak N, Herrmann N, et al. Role of dendritic cells in atopic dermatitis: an update. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41(3):254-258.
- [19] Hespel C, Moser M. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*. 2012;42(10):2535-2543.
- [20] Novak N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):879-886.
- [21] Lombardi V, Singh AK, Akbari O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(3):179-189.
- [22] Zhang Y, Zhou X, Zhou B. DC-derived TSLP promotes Th2 polarization in LPS-primed allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2012;42(7):1735-1743.
- [23] Crosby JR, Guha M, Tung D, et al. Inhaled CD86 antisense oligonucleotide suppresses pulmonary inflammation and airway hyper-responsiveness in allergic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(3):938-946.
- [24] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-811.
- [25] Ghafouri-Fard S, Ghafouri-Fard S. siRNA and cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2012;4(9):907-917.
- [26] Gavrillov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med*. 2012;85(2):187-200.
- [27] 闫文娟,徐树军,谢苗苗,等.外源性单磷酸鸟苷环二聚体对变形链球菌基因表达的影响[J].中国组织工程研究, 2012,16(8):1451-1454.
- [28] Lee CC, Huang HY, Chiang BL. Lentiviral-mediated interleukin-4 and interleukin-13 RNA interference decrease airway inflammation and hyperresponsiveness. *Hum Gene Ther*. 2011;22(5):577-586.
- [29] Li Y, Sun M, Cheng H, et al. Silencing IL-23 expression by a small hairpin RNA protects against asthma in mice. *Exp Mol Med*. 2011;43(4):197-204.
- [30] Woska JJ, Gillespie ME. Small-interfering RNA-mediated identification and regulation of the ternary SNARE complex mediating RBL-2H3 mast cell degranulation. *Scand J Immunol*. 2011;73(1):8-17.
- [31] Lu XX, McCoy KS, Xu JL, et al. Small interfering RNA targeting T-cell Ig mucin-3 decreases allergic airway inflammation and hyperresponsiveness. *Inflammation*. 2013;36(3):582-591.
- [32] Darcan-Nicolaisen Y, Meinicke H, Fels G, et al. Small interfering RNA against transcription factor STAT6 inhibits allergic airway inflammation and hyperreactivity in mice. *J Immunol*. 2009;182(12):7501-7508.
- [33] Moriwaki A, Inoue H, Nakano T, et al. T cell treatment with small interfering RNA for suppressor of cytokine signaling 3 modulates allergic airway responses in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(4):448-455.
- [34] 陈家军,孙宗全,董念国,等.RNA干扰抑制MyD88表达对小鼠骨髓树突状细胞生物学活性的影响[J].细胞与分子免疫学杂志, 2007;23(3):193-196.
- [35] Yang M, Rangasamy D, Matthaei KI, et al. Inhibition of arginase I activity by RNA interference attenuates IL-13-induced airways hyperresponsiveness. *J Immunol*. 2006;177(8):5595-5603.
- [36] Mao H, Wen FQ, Liu CT, et al.Effect of interleukin-5 receptor-alpha short hairpin RNA-expressing vector on bone marrow eosinophilopoiesis in asthmatic mice. *Adv Ther*. 2006;23(6):938-956.
- [37] 郑永华,陆晶晶,郭忠良,等. RNA干扰靶向抑制酪氨酸蛋白激酶对哮喘小鼠树突状细胞功能的影响[J].中国呼吸与危重监护杂志,2009,8(5):487-491.
- [38] 李建国,颀孙永勋,冉丕鑫,等.骨髓间充质干细胞对哮喘小鼠CD4+CD25+调节性T细胞及气道炎症的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(47):9302-9205.