

A20 对脂多糖诱导人树突状细胞成熟度及功能的影响

何跃¹, 黄丽¹, 姚天玉¹, 张芷茹¹, 陈洁²(西南医科大学附属医院眼科¹, 风湿免疫科², 四川 泸州 646000)

摘要:目的 探讨 A20 对脂多糖诱导的树突状细胞成熟度及功能的影响。方法 在脂多糖诱导树突状细胞成熟过程中, 沉默 A20, 采用定量 RT-PCR 检测树突状细胞中 A20 的表达水平, 流式细胞术检测树突状细胞表面共刺激分子 CD80、CD86 及 HLA-DR 的表达水平, ELISA 检测树突状细胞分泌的细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-27 的水平。结果 荧光显微镜下观察到绝大部分 DCs 被携带有 GFP 荧光基团标记的腺病毒转染, 呈绿色荧光表达; 定量 RT-PCR 检测显示, 转染 A20-shRNA 腺病毒的树突状细胞 A20 的表达低于未转染腺病毒的树突状细胞 ($P < 0.05$); 流式细胞术检测显示, 沉默 A20 后, 树突状细胞细胞表面的成熟标记分子 CD80、CD86 和 HLA-DR 的表达水平没有变化; ELISA 检测显示, 沉默 A20 的树突状细胞分泌 IL-1 β 和 IL-6 的水平增加 ($P < 0.05$), 而 IL-27 的水平降低 ($P < 0.05$)。结论 携带 A20-shRNA 的腺病毒能够顺利转染树突状细胞, 且 A20 对树突状细胞的成熟度无调控作用, 但沉默 A20 后能够促进树突状细胞分泌促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-6, 降低抑炎细胞因子 IL-27 的表达水平。

关键词: 树突状细胞; A20; 脂多糖; 成熟度; 细胞因子

中图分类号: R392.9

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2023.01.016

文章编号: 1006-1959(2023)01-0086-04

Effect of A20 on the Maturity and Function of Human Dendritic Cells Induced by Lipopolysaccharide

HE Yue¹, HUANG Li¹, YAO Tian-yu¹, ZHANG Zhi-ru¹, CHEN Jie²(Department of Ophthalmology¹, Department of Rheumatology and Immunology², the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of A20 on the maturity and function of human dendritic cells induced by lipopolysaccharide. **Methods** During the maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, A20 was silenced. The expression level of A20 in dendritic cells was detected by quantitative RT-PCR. The expression levels of costimulatory molecules CD80, CD86 and HLA-DR on dendritic cells were detected by flow cytometry. The levels of cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-27 secreted by dendritic cells were detected by ELISA. **Results** Under the fluorescence microscope, most of the DCs were transfected with adenovirus carrying GFP fluorescent group, showing green fluorescence expression. Quantitative RT-PCR showed that the expression of A20 in dendritic cells transfected with A20-shRNA adenovirus was lower than that in dendritic cells not transfected with adenovirus ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that the expression levels of mature marker molecules CD80, CD86 and HLA-DR on the surface of dendritic cells did not change after silencing A20. ELISA showed that the levels of IL-1 β and IL-6 secreted by A20 dendritic cells increased ($P < 0.05$), while the level of IL-27 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Adenovirus carrying A20-shRNA can successfully transfect dendritic cells, and A20 has no regulatory effect on the maturity of dendritic cells. However, silencing A20 can promote the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 by dendritic cells and reduce the expression of anti-inflammatory cytokine IL-27.

Key words: Dendritic cells; A20; Lipopolysaccharides; Maturation; Cytokines

20 世纪 70 年代, Steinman RM 等^[1,2]在小鼠外周淋巴器官中鉴定出具有现代免疫学概念的树突状细胞(dendritic cells, DCs)。DCs 不仅是天然免疫和适应性免疫之间的桥梁, 也能启动免疫应答, 诱导免疫耐受^[3]。DCs8 是最重要抗原提呈细胞, 其所诱导的适应性免疫应答在肿瘤、免疫中具有重要意义^[4,5]。A20 又称为肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的蛋白3, 是泛

素(Ub)依赖性信号的有效调节剂, 其能够通过去泛素化功能减弱 NF- κ B 信号系统的活性, 从而发挥对天然免疫反应的负性调节作用^[6]。A20 在多种炎症性和免疫性疾病中都发挥着重要的作用^[7,8], 但在免疫及感染性疾病中的作用机制尚未完全明确。本研究主要探讨 A20 对脂多糖诱导的树突状细胞成熟度及功能的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象及材料 收集 2021 年 5 月西南医科大学附属医院 14 名健康志愿者临床资料; 人淋巴细胞分离液购自上海生物工程有限公司; Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒与荧光定量 PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司; GM-CSF 和人重组 IL-4 购自美国 ACRO Biosystems 公司; CD14⁺磁珠购自德国 Miltenyi 公司; 细胞培养液 1640 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 腺病毒购自上海汉恒生物

基金项目: 1. 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(编号: 16PJ560); 2. 四川省医学科研青年创新课题(编号: Q15014); 3. 泸州医学院-泸医附院联合科研项目(编号: 2015-PT-017)

作者简介: 何跃(1978.6-), 男, 四川南充人, 博士, 副主任医师, 主要从事眼底疾病、眼免疫性疾病研究

通讯作者: 陈洁(1979.8-), 女, 四川自贡人, 博士, 副主任医师, 主要从事风湿免疫性疾病、眼免疫性疾病研究

科技有限公司;Anti-human CD80、CD86 及 HLA-DR 购自美国 eBioscience 公司;LPS 购自美国 Sigma 公司;人 IL-1 β 、IL-10、IL-27、IL-6 ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D Systems 公司。

1.2 方法

1.2.1 DCs 的分离和培养 抽取健康志愿者静脉血约 10 ml,再缓慢加入 10 ml 的磷酸缓冲盐溶液,轻轻将二者混匀,然后将其加入至 5 ml 人淋巴细胞分离液中,在温度 4 $^{\circ}\text{C}$,离心力 800 g,按升 4 降 0 的升降速度进行离心,离心 26 min。离心后用巴氏管将单个核细胞吸出、洗涤、离心。加入磁珠 buffer 和单核细胞磁珠(CD14 $^{+}$ 磁珠)。过 MS 柱后得到 CD14 $^{+}$ T 细胞。按照 1×10^6 细胞/ml 接种到 1640 培养基中,并加入人重组 GM-CSF (100 ng/ml) 和人重组 IL-4 (50 ng/ml)进行 DCs 诱导。细胞培养第 6 天时,加入 LPS(100 ng/ml)继续培养 24 h 获得成熟的 DCs 细胞。

1.2.2 腺病毒感染 DCs 人 A20 基因干扰 (A20-shRNA)腺病毒的制备、包装、扩增和纯化由上海汉恒生物科技有限公司完成 (A20 基因 ID: NM_001270508.1)。上述细胞培养至第 3 天,将细胞分为两部分,一部分细胞加入腺病毒载体,培养 2 h 后换液,而另一部分细胞为对照,直接换液。48 h 后,观察 GFP 绿色荧光的表达情况并进行后续实验。

1.2.3 流式细胞术检测 DCs 表型 取出培养好的 DCs,PBS 洗涤细胞、离心,加入抗 CD80、CD86 及 HLA-DR 流式抗体,孵育 30 min 后,用流式细胞仪检测 CD80、CD86 及 HLA-DR 的表达情况。

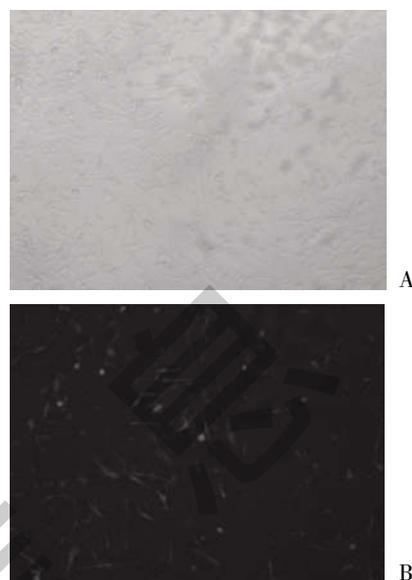
1.2.4 定量 RT-PCR 从细胞中提取总的 RNA,反转录合成 cDNA,采用 SYBR Green 进行 RT-PCR,参照试剂盒配置相应的体系进行扩增,引物由上海生工生物有限公司合成,其中引物序列如下:A20 上游引物:5'-TGGCTGAACAAGTCCTTCCT-3',下游引物:5'-CTTCAGGGTCACCAAGGTA-3'; β -actin 上游引物:5'-CGAGAAGATGACCCAGATCATG-3',下游引物:5'-CAGAGCGTACAGGGATAGCA-3'。ABI7500 仪器上进行 RT-PCR 反应,反应体系为 20 μl 。用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 A20 的相对表达量。

1.2.5 细胞因子的测定 按照 ELISA 的说明检测细胞培养液上清中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-27 的水平,所有分析都进行 3 次。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

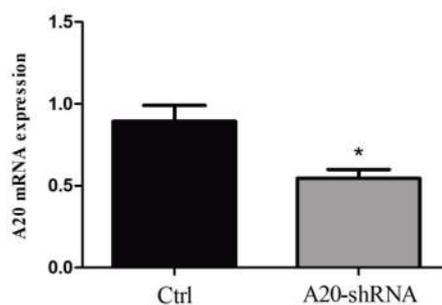
2.1 腺病毒转染 DCs 情况 荧光显微镜下观察到绝大部分 DCs 被携带有 GFP 荧光基因标记的腺病毒转染,呈绿色荧光表达,见图 1。



注:A:对照;B:带 GFP 荧光基因标记

图 1 带 GFP 荧光基因标记的腺病毒转染 DCs($\times 200$)

2.2 腺病毒转染 DCs 后 A20 的表达水平 携带有 A20-shRNA 腺病毒转染 DCs 后,定量 RT-PCR 检测显示,转染 A20-shRNA 腺病毒的树突状细胞 A20 的表达低于未转染腺病毒的树突状细胞 ($P<0.05$),见图 2。

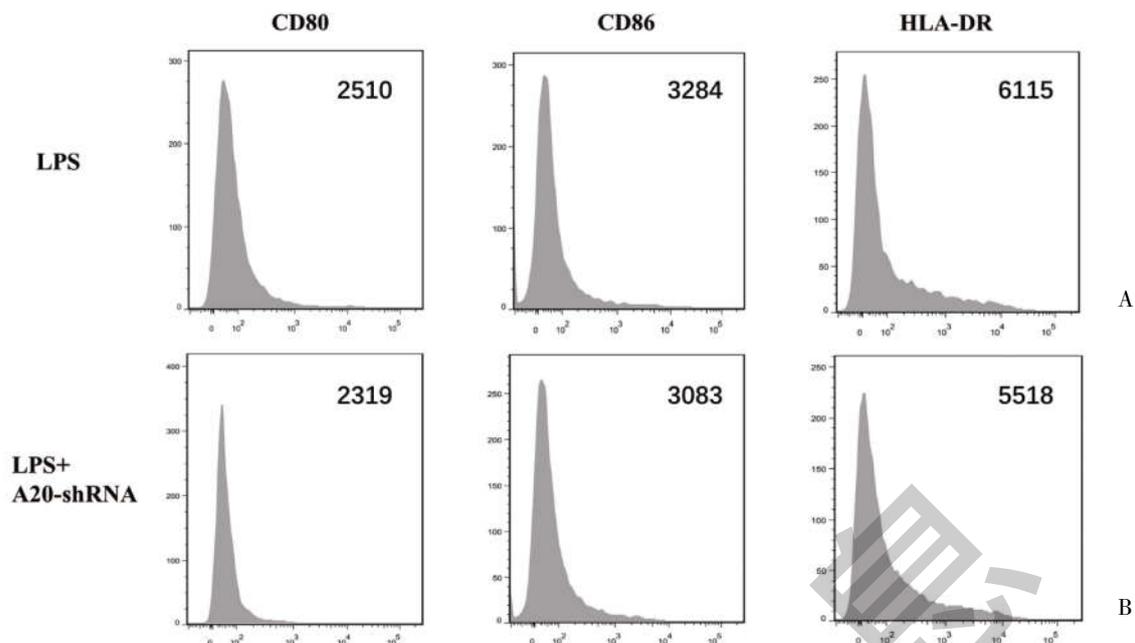


注: * $P<0.05$

图 2 腺病毒转染 DCs 后 A20 的表达情况

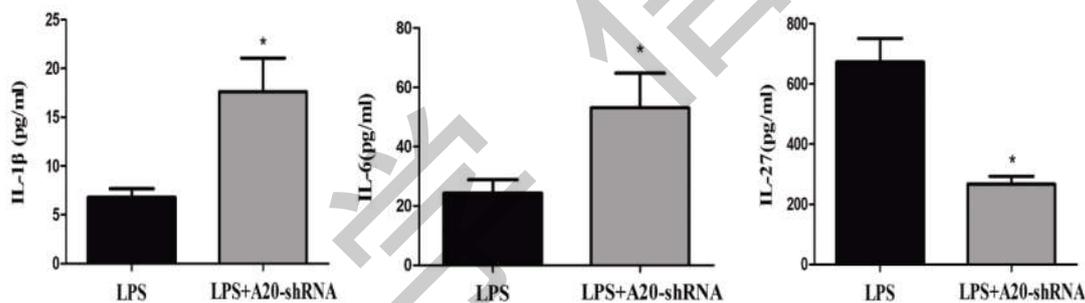
2.3 沉默 A20 后对 DCs 成熟度的影响 沉默 A20 后,DCs 细胞表面的成熟标记分子 CD80、CD86 和 HLA-DR 的表达水平没有变化,见图 3。

2.4 A20 对 DCs 分泌细胞因子的影响 LPS 刺激 DCs 后,通过 ELISA 检测 DCs 分泌细胞因子的水平,结果显示沉默 A20 的 DCs 分泌 IL-1 β 和 IL-6 的水平增加 ($P<0.05$),而 IL-27 的水平降低 ($P<0.05$),见图 4。



注:A:LPS 刺激 24 h 后 DCs 表面成熟标记分子 CD80、CD86 及 HLA-DR 的表达;B:LPS 刺激沉默 A20 预处理的 DCs 24 h 后 CD80、CD86 及 HLA-DR 的表达

图 3 沉默 A20 后对 DCs 成熟度的影响



注: *P<0.05

图 4 A20 对 DCs 分泌细胞因子的影响

3 讨论

A20 是 TNF- α 与脐静脉内皮细胞反应中发现的一种诱导性表达蛋白,因此也被称为 TNF- α 诱导蛋白(3TNFAIP3)。A20 通过减弱 NF- κ B 信号通道,发挥对天然免疫反应的负性调节作用^[9]。DCs 是目前已知的最强大的抗原呈递细胞,它除了能够激活 T 细胞产生免疫应答,还可以对体内和体外的各种刺激做出应答诱发免疫耐受。研究发现^[10,11],A20 在 SLE、干燥综合征等免疫性疾病中均发挥着重要的作用。另外,研究发现^[12],在啮齿动物和非人灵长类动物的移植模型中,DCs 在同种异体免疫反应的负调节中具有核心作用。DCs 除了在自身免疫性疾病中发挥作用,在抗肿瘤免疫反应中也起着关键作用。DCs 通过分泌 IFN- λ ,从而提高 IL-12p70、IFN- γ 和细胞毒性淋巴细胞募集趋化因子的水平,促进

TH1 微环境,最终在抗肿瘤免疫反应中发挥重要作用,而且 IFN- λ 及其受体在乳腺肿瘤中与患者预后情况密切相关^[13]。然而,对于 DCs 在各种感染性疾病和免疫性疾病中的具体机制仍未明确。

A20 存在于多个免疫器官如脾脏、胸腺和肠相关免疫组织等,本研究结果发现,A20 在 DCs 中也有表达,因 A20 没有相应的抑制剂或激动剂,为了研究 A20 对 DCs 成熟度及功能的研究,本研究将包装好的人 A20-shRNA 腺病毒转染 DCs,最终使 DCs 中 A20 低表达,这也为后面研究 A20 对 DCs 的影响打下了基础。DCs 有未成熟和成熟两种类型,二者之间有明显的差别,未成熟的 DCs 具有较高的吞噬功能,抗原呈递较弱,免疫刺激较弱^[14]。成熟的 DCs 表达高水平的 MHC-I 类和 MHC-II 类分子,具有强大的抗原递呈能力。既往有文献报道^[15],在系统性红

斑狼疮、类风湿性关节炎等许多免疫性疾病中,DCs 通过增加其成熟度发挥作用。为了证实 A20 是否对 DCs 成熟度有影响,本研究沉默 A20,检测 DCs 成熟表面细胞因子 CD80、CD86 及 HLA-DR 的表达,结果表明沉默 A20 对 DCs 的成熟度无明显影响,这也说明 A20 对 DCs 的作用与其他因子是不同的。研究报道^[16],miR-21 在肾缺血再灌注损伤中能够增强 DCs 的成熟,减轻肾脏缺血再灌注诱导的促炎细胞因子的产生和急性肾损伤。而在 Johnson DJ 等^[17]报道中表明,A20 对 DCs 成熟度是没有影响,考虑造成这种差异的原因可能是 A20 是一种重组蛋白,而 microRNA 是一种小 RNA。

成熟 DCs 作为主要抗原提呈细胞,根据刺激分泌不同的细胞因子,并通过 Th1 或 Th2 途径使 Naive T 细胞分化,从而造成炎症或免疫抑制的环境。例如,DCs 分泌的 IL-12 可以诱导 Th1 分化,分泌的 IL-6 和 IL-1 β 等细胞因子促进免疫炎症环境。本研究通过沉默 A20,结果发现 DCs 分泌 IL-1 β 和 IL-6 的水平增加,而 IL-27 的水平降低。Javan MR 等^[18]使用慢病毒转染的方法发现,A20 能够导致 DCs 分泌 IL-10 和 TGF- β 细胞因子的水平升高。另有研究报道^[19],A20 能够通过 NF- κ B 和 STAT1 信号途径调控 DCs 分泌 TNF- α 和 IL-6。由此可以发现,A20 对 DCs 的作用主要是引起 DCs 分泌不同的细胞因子。

综上所述,A20 可抑制脂多糖诱导的人树突状细胞的免疫功能,其机制可能与其影响 DCs 的分泌功能相关。

参考文献:

[1]Steinman RM,Cohn ZA.Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.II.Functional properties in vitro[J].J Exp Med,1974,139(2):380-397.
[2]Steinman RM,Lustig DS,Cohn ZA.Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.3.Functional properties in vivo[J].J Exp Med,1974,139(6):1431-1445.
[3]Liu YJ.Dendritic cell subsets and lineages,and their functions in innate and adaptive immunity[J].Cell,2001,106(3):259-262.
[4]Blander JM.Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation[J].Annu Rev Immunol,2018,36:717-753.
[5]Alloati A,Kotsias F,Magalhaes JG,et al.Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! [J].Immunol Rev, 2016,272(1):97-108.
[6]Giridharan S,Srinivasan M.Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation [J].J Inflamm Res, 2018,11:407-419.

[7]Wang Y,Song M,Zhou P,et al.TNFAIP3-upregulated RIP3 exacerbates acute pancreatitis via activating NLRP3 inflammasome[J].Int Immunopharmacol,2021,100:108067.
[8]Zhou J,Hu M,He M,et al.TNFAIP3 Interacting Protein 3 Is an Activator of Hippo-YAP Signaling Protecting Against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury [J].Hepatology,2021,74 (4): 2133-2153.
[9]Deng HJ,Deji Q,Zhaba W,et al.A20 Establishes Negative Feedback With TRAF6/NF- κ B and Attenuates Early Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage [J].Front Immunol,2021,12:623256.
[10]Ciccacci C,Latini A,Perricone C,et al.TNFAIP3 Gene Polymorphisms in Three Common Autoimmune Diseases: Systemic Lupus Erythematosus,Rheumatoid Arthritis,and Primary Sjogren Syndrome-Association with Disease Susceptibility and Clinical Phenotypes in Italian Patients [J].J Immunol Res,2019,2019: 6728694.
[11]Sun L,Zou LX,Han YC,et al.A20 overexpression exerts protective effects on podocyte injury in lupus nephritis by downregulating UCH-L1 [J].J Cell Physiol,2019,234(9):16191-16204.
[12]Ochando J,Ordikhani F,Jordan S,et al.Tolerogenic dendritic cells in organ transplantation[J].Transpl Int,2020,33(2):113-127.
[13]Hubert M,Gobbini E,Couillault C,et al.IFN-III is selectively produced by cDC1 and predicts good clinical outcome in breast cancer[J].Sci Immunol,2020,5(46):eaav3942.
[14]Bobryshev YV.Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance [J].Eur Heart J,2005,26 (17):1700-1704.
[15]Song X,Zhang H,Zhao Y,et al.HMGB1 Activates Myeloid Dendritic Cells by Up-Regulating mTOR Pathway in Systemic Lupus Erythematosus[J].Front Med (Lausanne),2021,8:636188.
[16]Jia P,Pan T,Xu S,et al.Depletion of miR-21 in dendritic cells aggravates renal ischemia-reperfusion injury [J].FASEB J, 2020,34(9):11729-11740.
[17]Johnson DJ,Ohashi PS.Molecular programming of steady-state dendritic cells: impact on autoimmunity and tumor immune surveillance[J].Ann N Y Acad Sci,2013,1284:46-51.
[18]Javan MR,Rahimpour A,Moazzeni SM.Simultaneous transduction of dendritic cells with A20 and BTLA genes stimulates the development of stable and efficient tolerogenic dendritic cells and induces regulatory T cells [J].Int Immunopharmacol, 2021,99:107966.
[19]Duy PN,Thuy NT,Trang BK,et al.Regulation of NF- κ B- and STAT1-mediated plasmacytoid dendritic cell functions by A20[J].PLoS One,2019,14(9):e0222697.

收稿日期:2022-03-08;修回日期:2022-03-23

编辑/杜帆