

MyD88siRNA 诱导猪调节性树突状细胞的实验研究

周谦君^{1,2} 范慧敏¹ 刘中民^{1*}

(¹ 同济大学附属上海市东方医院中德心脏中心研究所, 上海 200120; ² 上海市第一人民医院胸外科, 上海 200080)

摘要 采用 siRNA 干扰猪外周血单核细胞来源 DC(monocyte-derived DC, MoDC)髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)基因的表达, 检测干扰前后的细胞表型, 免疫学功能及生物学活性, 探讨猪调节性 DC 诱导耐受的机制。提取猪外周血单核细胞(peripheral blood monocyte, PBMC), 经 GM-CSF 和 IL-4 诱导, 体外培养得到未成熟 MoDC。通过化学合成法制备针对 MyD88 基因 siRNA 2 对, 在 LipofectamineTM RNAiMax 转染试剂介导下转染 MoDC, Western blot 法及 Real-time PCR 检测干扰前后 MyD88 基因的表达水平。培养至第五天将 DC 分为四组: 对照组、LPS 组、干扰 1 组和干扰 2 组, 继续培养 3 天。siRNA 干扰后, MyD88 mRNA 和蛋白质表达水平下降 >80%; MyD88siRNA 序列 1 和序列 2 干扰后 MoDC CD80/86、SLA-II 表达降低, MLR 显示刺激指数下降, IFN- γ 降低, IL-4 增高, 与 LPS 组差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。脂质体介导 siRNA 技术能干扰猪 MoDC 的 MyD88 基因, 阻断 TLR 信号传导途径, 抑制 DC 成熟, 获得耐受性 DC, 表现为对同种异体 T 细胞的刺激能力降低, 诱导免疫反应向 Th2 偏移。

关键词 猪树突状细胞; RNA 干扰; 脂质体转染; MyD88

树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内最重要的一类抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC), 也是唯一能激活幼稚 T 细胞的 APC, 同时参与先天性免疫和获得性免疫, DC 的状态决定其所诱导免疫反应的方向。DC 在免疫系统的重要性在于其模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)对于病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMP)的识别, 而 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)在此识别过程中占据中心地位^[1,2]。髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是 TLR 信号传导途径中一个最关键的接头分子, 当在 TLR 识别配体后, 信号大部分通过 MyD88 继续向下游分子传递, 最终激活 NF- κ B, 导致 DC 的成熟和激活, 表现为共刺激分子表达上调, 相应细胞因子分泌增加。如能阻断 MyD88 这一信号传导的关键分子, 则可能阻止 DC 成熟, 从而诱导免疫耐受^[3]。

近年来 DC 肿瘤疫苗研究进展表明 DC 具有很强的可塑性^[4]。人工合成的长度为 21~23bp 的双链小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA), 能特异性结合体内同源 mRNA 序列并将其切割降解, 从而在转录水平上抑制基因表达。这一方法如今被越来越多地用于研究特定基因的功能, 并且已成为主流的基因沉默方法^[5]。尽管目前有一些诸如质粒、电穿孔和病毒等将 siRNA 导入 DC 的方法, 但都存在相应的缺陷,

脂质体既不会诱导 DC 成熟, 也不会影响随后 DC 对成熟刺激的反应能力, 是转染 siRNA 的理想介质^[6-8]。

猪作为免疫研究实验动物优势较之于鼠, 无论在基因还是生理上更接近于人类, 这一点在 PRRs 及其细胞分布特点上尤为明显^[9,10]; 而且猪体型较大, 能提供研究所需足够的细胞数量, 这些优点使猪成为研究 RNAi 等基因治疗新方法的理想对象。

本研究采用 siRNA 干扰猪外周血单核细胞来源 DC(monocyte-derived DC, MoDC)的 MyD88 基因的表达, 并对干扰前后的细胞表型, 免疫学功能及生物学活性进行研究, 并探讨调节性 DC 诱导耐受的机制, 为 DC 应用于临床移植耐受的诱导奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验猪采用封闭近交系繁殖的巴马小香猪和贵州小型猪, 雌雄不拘, 10~13 周龄, 体重 15~20 Kg, 购自上海交通大学农学院, 半开放式常规饲料喂养, 无特定微生物感染; Ficoll-Paque 为 Axis-Shield 公司产品; DMEM 培养液, 2-巯基乙醇, OPTI-MEM 为 Gibco

收稿日期: 2010-03-02 接受日期: 2010-05-26

上海市科委国际合作(No.055407030)资助项目

* 通讯作者。Tel: 13501832872, E-mail: zhongmin_liu@sina.com

公司产品; 胎牛血清为 PAA 公司产品; rpGM-CSF, rpIL-4, 猪 IL-4 ELISA 试剂盒, 猪 IFN- γ ELISA 试剂盒为 Biosource 公司产品; Lipofectamine™ RNAiMax 为 Invitrogen 公司产品; 抗猪 CD1 单克隆抗体(76-7-4), 抗猪 CD4a 单克隆抗体包被磁珠及 MyD88 单克隆抗体为 Abcam 公司产品; 抗猪 CD172a 单克隆抗体(BL1H7), 抗猪 CD14 单克隆抗体(MIL-2), 抗猪 CD16 单克隆抗体(G7), 抗猪 MHC I 单克隆抗体(2G5), 抗猪 SLA- II DR 单克隆抗体(2E9/13)为 AbD Serotec 公司产品; 抗人 CD80 单克隆抗体(FUN-1), 抗人 CD 86 单克隆抗体(BB1)为 BD Pharmingen 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 猪 MoDC 的培养

取巴马小型猪血 15~20 ml, 肝素钠抗凝: 0.01 mol/L PBS 1:1 稀释; 按淋巴分离液: 稀释血液 = 1:2 的体积, 沿管壁缓慢将稀释全血加入 Ficoll-Paque 淋巴细胞分离液, 梯度离心法分离单个核细胞, 离心(1 000 g, 25 min, 20 °C); 吸取白膜层细胞, 以 1:5 体积比, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞 3 次(400 \times g, 10 min, 4 °C), 细胞计数。细胞重悬于 DMEM 全培养液 10 ml(含 2 mmol/L 谷氨酰胺, 50 mmol/L 2-巯基乙醇和 10% 胎牛血清), 加入 10 cm 培养皿, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱静置, 贴壁 2 h。轻轻吸去培养皿中液体以除去悬浮的淋巴细胞, 将 DMEM 完全培养基 2 ml 加入培养皿, 轻轻将贴在培养皿底板上的贴壁细胞吹下, 接着加入 0.5% 胰酶 1.5 ml 于培养皿中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 5 分钟, 至镜下观察如细胞边界得清晰, 将含胰酶的细胞悬液也加入 15 ml 离心管。将已消化好的贴壁细胞按照每孔约 4 \times 10⁶ 个细胞总数加入六孔板, 再加入 DMEM 全培养液 2 ml。培养基中加入 rpGM-CSF(50 ng/ml)及 rpIL-4(10 ng/ml), 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育。2 天后观察细胞形态, 加入 DMEM 全培养液 2 ml(总量共 4 ml), 并加入相应量的 rpGM-CSF 和 rpIL-4, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育。第 3 天半量补充 rpGM-CSF 和 rpIL-4, 继续孵育。

1.2.2 siRNA 的构建与转染

按照 siRNA 构建原则, 委托上海吉玛基因公司合成两对 siRNA 序列和一对无义对照 siRNA 序列, 序列 1 为 siMyD88.7, sense: 5'-AUG CCU GAG CAU UUU GAU GTT-3'; antisense: 5'-CAU CAA AAU GCU CAG GCA UTT-3'; 序列 2 为 siMyD88.9, sense: 5'-GAG GAC UGC CGA AAG UAU ATT-3', antisense: 5'-UAU ACU UUC GGC AGU CCU CTT-3'; 无义对照 siNEG 为 sense: 5'-CUG CCC CAG

CGA UAU CCA GTT-3', antisense: 5'-CUG GAU AUC GCU GGG GCA GTT-3'。将各组 siRNA(5 μ mol/L) 6 瓶分别加入 Opti-MEM I 无血清培养液 250 μ l 中, 混合均匀; 将 Lipofectamine™ RNAiMax 试剂 4 μ l 和 Opti-MEM I 无血清培养液 250 μ l 在 Ep 管中混合均匀; 将稀释后的 Lipofectamine™ RNAiMax 溶液加入稀释后的双链 siRNA 溶液中, 混合均匀, 在常温下孵育 15 min; 将 siRNA 和 Lipofectamine™ RNAiMax 的混合液加入 6 孔板的培养液中, 轻柔前后摇摆培养板, 使混合均匀, siRNA 的终浓度为 10 nmol/L; 将上述三组(干扰一组、干扰二组和无义对照组) DC 与 siRNA 共同孵育, 每组设两个复孔, 48 h 后 Real-Time PCR 检测 DC 细胞中 MyD88 mRNA 水平, 72 h 后 Immunoblotting 法检测 DC 细胞 MyD88 蛋白的表达。

1.2.4 siRNA 转染后 MyD88 mRNA 的实时定量 RT-PCR 分析

4~5 \times 10⁶ 个细胞, 加入 1 ml ISOGEN, 按照说明书的步骤提取总 RNA。采用紫外分光光度法测定 RNA 的浓度和纯度, RNA 的完整性经变性琼脂糖电泳法鉴定, 28 s 和 18 s 两条电泳带的强度为 2:1。以 3' 寡聚(dT)₁₂ 为引物, superscript III reverse transcriptase 为反转录酶将 mRNA 反转录合成 cDNA。实时定量 PCR 反应采用 SYBR Premix Ex Tag™ (TaKaRa 公司), 在 ABI PRISM 7900HT 序列分析仪上进行。具体的 PCR 反应为: 总体积 20 μ l, 包括 SYBR Premix Ex Tag (2 \times) 10 μ l, 前向引物和逆向引物各(10 μ mol/L) 0.4 μ l, 灭菌蒸馏水 3.8 μ l, 模板 5 μ l。PCR 反应: 初始变性 95 °C 10 s, 继之为 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 30 s 共 40 个循环。用 18s rRNA 作为阳性内对照。引物序列为: 5' 引物 TCC AGG TGC CCA TCA GAA G, 3' 引物 TGA TGA ACC GCA GGA TGC T。引物采用罗氏应用科学提供的 Universal probe library 软件在线设计。

1.2.3 siRNA 转染后 MyD88 蛋白的 Western blot 分析

收集悬浮的 DC 1 \times 10⁶ 细胞, 加入 TNE 裂解缓冲液(1% NP-40, 20 mmol/L Tris-HCl [pH 7.5], 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaF, 10 mmol/L β -glycerophosphate) 1 ml, 离心吸取上清获得蛋白裂解液。用标准蛋白曲线法测定蛋白质的浓度。调整至相同量蛋白质, 加入 3 \times 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 半干式电转至 Immobilon-P 膜上, 3% 脱脂奶粉过夜封闭。次日, 加入一抗兔抗 MyD88 抗体(1:1 000), 小鼠抗 α -tubulin 抗体(1:1 000) 常温下孵育 1 h 以上, 3% 脱脂

奶粉洗膜 3 次, 每次 10~15 min。室温下相应加入二抗, 辣根过氧化物酶偶联的抗兔 IgG 抗体或碱性磷酸酶偶联的抗小鼠 IgG 抗体(1:3 000) 常温下孵育 1 h 以上, TBS-T 溶液洗膜 3 次, 用化学发光法显色, 进行 X 光片曝光后显影分析。

1.2.4 免疫荧光分析检测细胞表面 CD172a, CD1, CD14, CD16, CD80, CD86, SLA-I, SLA-II 分子表达 收集 DC 悬浮细胞于离心管中, PBS 离心洗涤细胞 2 次, 调细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 将 40 μl 细胞悬液加入每个 EP 管, 分别加入荧光标记的各单克隆抗体 10 μl , 混匀, 避光, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 30 min, PBS 离心洗涤细胞 2 次, PBS600 μl 重悬细胞, 上机检测, 采用荧光激活的流式细胞计数仪(FACS), FACSDiva 软件, 用前向角散射(FSC)和侧向角散射(SSC)设定阈值, 排除破碎细胞、死细胞和污染的红细胞。

1.2.5 siRNA 干扰后免疫表型和生物学功能的改变

(1)实验设组: MoDC 培养至第五天将 DC 分为 4 组: 对照组: DC 培养过程中不加入任何刺激剂; LPS 组: 加入浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LPS; 干扰一组, 加入 MyD88siRNA 序列一 8h 后, 再加入 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LPS; 干扰二组, 为加入 MyD88siRNA 序列二 8 h 后, 再加入 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LPS。四组细胞继续培养 3 d。(2)流式细胞仪测定免疫表型, 方法同 1.2.4。(3)混合淋巴细胞反应: PBS 配制丝裂霉素 C 终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 分别重悬上述四组 DC 密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 45 min, 进行灭活处理, PBS 离心洗涤灭活 DC 细胞 2 次($\times 1 400$ 转, 7min), DMEM 培养基重悬细胞 $5 \times 10^5/\text{ml}$, 作为刺激细胞; 提取贵州小型猪的 PBMC (方法同前), 进行贴壁 2 h, 获取的未贴壁细胞单个核细胞, 经 MACS 磁珠分选(抗猪 CD4a 抗体包被磁珠), 得到非致敏 T 淋巴细胞, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 作为反应细胞; 取 96 孔培养板, 将以上四

组 DC 细胞和同种异体猪 T 细胞按照刺激细胞: 反应细胞分别为 1:100, 1:10, 1:5 的比例, 予以混合培养, 每组设 3 个复孔, 其中每孔 T 细胞数为 5×10^5 个, 反应终体积为 200 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵育 72 h 后, 加入 20 μl BrdU, 继续孵育 24h, BrdU ELISA 试剂盒检测掺入的 BrdU, 酶标仪测 A_{450} 值, 取三孔的平均值作为结果。MLR 反应的结果以刺激指数表示(SI): $\text{SI} = \text{实测 A 值} / \text{空白孔 A 值}$ 。(4)ELISA 法检测细胞因子: 将以上四组 DC 细胞和同种异体猪 T 细胞按照 1:10 的比例混合共培养, 方法同前混合淋巴细胞反应, 用 ELISA 法检测共培养第 3dDC 培养上清中 γ 干扰素 (IFN- γ) 和白细胞介素 4(IL-4) 的含量, 具体操作步骤参见试剂盒。

1.2.6 统计学方法 显著性差异分析通过 Student's *t* 检验进行, 多组间的比较通过方差分析(analysis of variance, ANOVA)或是 Kruskal-Wallis 检验。所有的数据均以均数 标准差(means \pm SD)表示; $P < 0.05$ 时为有显著统计学差异。数据结果统计在 SPSS16.0 软件上完成。

2 结果

2.1 猪 MoDC 体外生长及转染后形态

倒置相差显微镜下观察, 贴壁 2 h 后去掉悬浮细胞可见单核细胞贴壁, 形成均匀散在分布的体积较小而圆的单核细胞群, 培养 1 d, 部分细胞形态开始出现不规则, 培养 2 d 后, 出现簇状生长, 随培养时间的增加, 细胞发育而呈悬浮状态, 培养 6~8 d 后, 大部分细胞呈悬浮状态, 细胞体积继续增大并不规则, 呈现树突细胞的典型特征性形态。

2.2 siRNA 干扰后 MyD88 mRNA 的表达降低

采用 Real-time PCR 法检测, MyD88 相对 mRNA 水平计算按照如下的公式: $(2^{\text{Ct}_{\text{rRNA}} - \text{Ct}_{\text{干扰后}}}) / (2^{\text{Ct}_{\text{rRNA}} - \text{Ct}_{\text{干扰前}}})$,

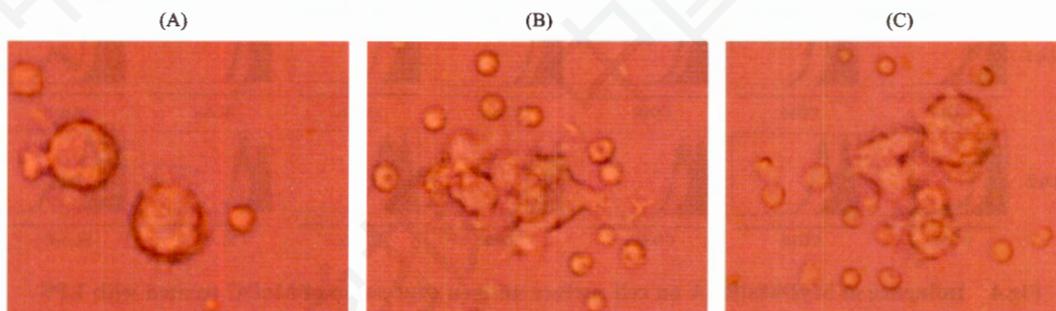


Fig.1 Phase contrast photomicrographs of MoDC

A: specific processes, veils; B: change of morphology after stimulation with LPS, surrounded by T cells; C: no prominent morphological change was observed after transfection by Myd88 siRNA.

以干扰前 MyD88 相对 mRNA 水平为 1。

2.3 Western blot 检测 siRNA 干扰后 MyD88 蛋白表达降低

Western blot 检测显示 MyD88 siRNA 干扰后 MyD88 蛋白表达较无义 siRNA 对照组显著降低, α -tubulin 蛋白检测显示各泳道上样蛋白量相同。

2.4 MyD88 siRNA 干扰后 DC 表型的免疫荧光分析

流式细胞术检测发现, 体外培养的 MoDC 高表达 CD1 和 CD172a, 低表达 CD80, CD86 和 SLA-II 类分子以及 CD14, CD16, CD11c。

2.5 siRNA 干扰对混合淋巴细胞反应的影响

MLR 的结果提示对照和 LPS 组, 随着混合细胞中刺激细胞的比例增加, T 细胞反应性逐渐增强, LPS 组最强, 转染 Myd88 siRNA 后 T 细胞刺激指数下降, 反应性下降, 与 LPS 组差异均具有统计学意义 ($P <$

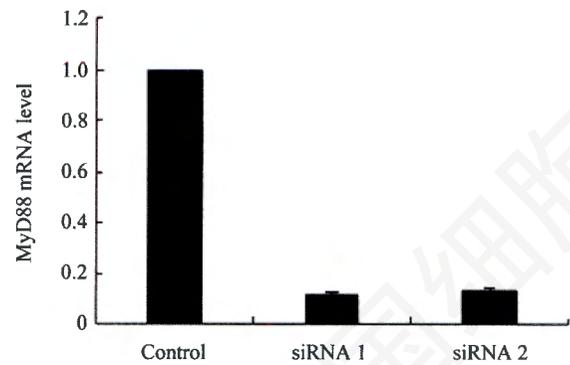


Fig. 2 MyD88 mRNA detection by Real-Time PCR

Control: added with siNEG; siRNA1: added with Myd88 siRNA1; siRNA2: added with Myd88 siRNA2. MyD88 relative mRNA level of siNEG group is 1; inhibition rate of MyD88 relative mRNA level in MyD88 transfection group is beyond 80%.

Table 1 Mixed lymphocyte reaction after Myd88 interference

Groups	S:E(1:1 000)	S:E(1:10)	S:E(1:5)
Control	1.35±0.05	1.73±0.08	2.25±0.16
LPS	1.71±0.11	2.38±0.12	3.00±0.13
siRNA1 ^a	1.05±0.04	1.09±0.02	1.24±0.06
siRNA2 ^b	1.16±0.06	1.17±0.06	1.40±0.09

^aCompared with group LPS, $P < 0.05$; ^b compared with group siRNA1, $P > 0.05$. Group siRNA1: interfered with Myd88 siRNA sequence 1, stimulated by LPS; group siRNA2: interfered with Myd88 siRNA sequence 2, stimulated by LPS. Data are expressed as SI.

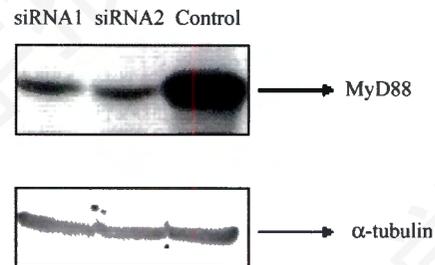


Fig. 3 MyD88 expression detected by Western blot

siRNA1: added with Myd88 siRNA1; siRNA 2: added with Myd88 siRNA2; Control: added with siNEG. Level of α -tubulin showed the same quantity of protein in all lanes.

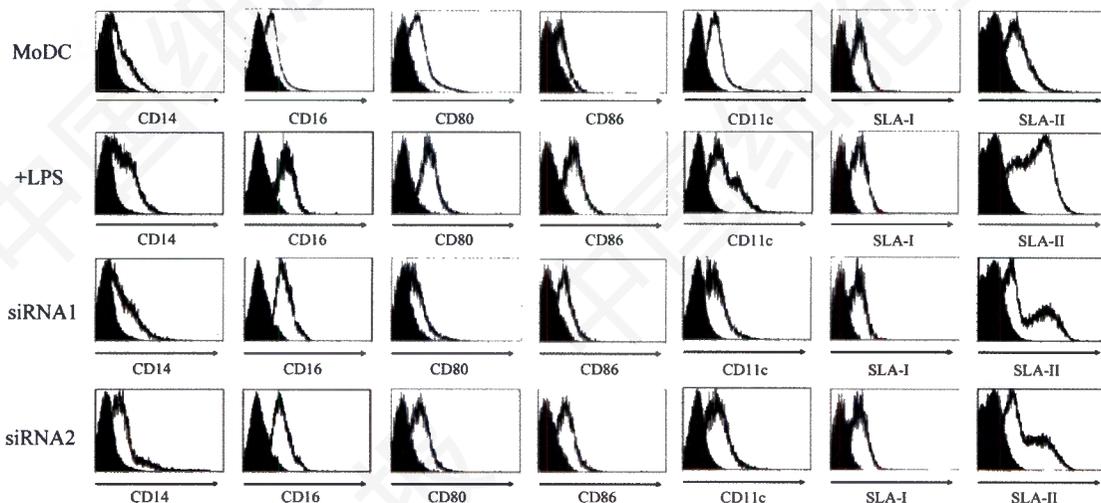


Fig. 4 Influence of MyD88siRNA on cell surface antigen expression of MoDC treated with LPS

Expression of CD14, CD16, CD11c, CD80, CD86 and SLA-II in swine MoDC; after stimulation with LPS, expression of CD80, CD86 and SLA-II elevated, expression of CD14, CD16, CD11c had no significant difference. Expression of CD80, CD86 and SLA-II in MyD88siRNA1 group and MyD88siRNA2 group were significantly down-regulated, while CD14, CD16, CD11c were slightly down-regulated. There was no difference between siRNA1 group and siRNA2 group as to the surface molecular.

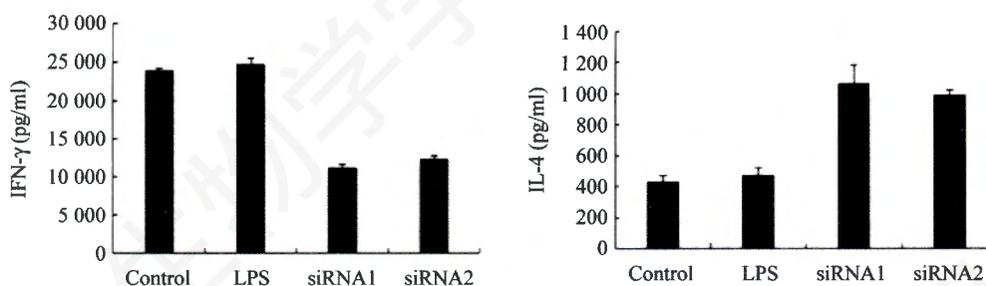


Fig.5 MoDC-induced T cell polarization after Myd88 interference

According to the ratio of S:E=1:10 of MLR, the content of IFN- γ and IL-4 was examined by ELISA in the supernatant of MLR, after MyD88 siRNA transfection, the secretion of IFN- γ was significantly inhibited ($P<0.05$), the secretion of IL-4 was significantly elevated ($P<0.05$).

0.05)。干扰1组和干扰2组差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.6 干扰前后的细胞因子检测的结果

用ELISA法检测DC混合淋巴细胞培养上清液中的细胞因子IFN- γ 和IL-4的分泌。LPS刺激后,IFN- γ 和IL-4分泌稍有增高,但与对照组相比,差异无显著性($P>0.05$)。MyD88 siRNA转染后,IFN- γ 分泌降低,IL-4分泌增高,与对照组相比,差异具有显著性($P<0.05$)。

3 讨论

我们的结果表明,猪类似于其它的物种,联合应用IL-4和GM-CSF同样可以刺激其外周血单核细胞,从而获得猪MoDC。经过3~7d的培养,收获的悬浮细胞具有DC典型的形态学特征:悬浮细胞出现葡萄串状的细胞集落;表面可见特征性毛刺状突起;周围可以见到少量贴壁呈杆状的巨噬细胞。我们采用流式细胞术检测了猪MoDC细胞表面的白细胞抗原,表达CD172, SLA-II, CD1, CD14, CD16, 共刺激分子CD80, CD86低表达,其免疫表型结果为CD1⁺CD14⁺CD80⁺CD86⁺CD172a⁺SLAII⁺,与文献的报道一致,符合猪MoDC的免疫表型特征^[11-13]。我们发现在LPS刺激后,MoDC的CD80/86和SLA-II表达明显上升。我们认为,通过IL-4和GM-CSF培养出的MoDC是未成熟DC(imature DC, iDC),共刺激分子CD80, CD86低表达,是研究DC成熟过程的良好模型。

DC在先天性免疫中的重要性在于其模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)对于PAMP的识别,而TLR在此识别过程中起重要作用^[2]。DC识别了PAMP之后,随即被激活并成熟,并产生大量的细胞因子和趋化因子,而所有这一切都对适应性免疫

来说是必须的。如果DC在提呈抗原的过程中没有被激活,将直接导致免疫耐受,或者是没有免疫记忆功能的短效免疫反应。MyD88是TLR信号传导途径中一个关键的接头分子,大多数TLR通过MyD88途径进行信号传导。MyD88是一种胞浆可溶性蛋白,结构上包括N端的死亡结构域(death domain, DD),中间区域及C端的Toll区共3个功能区域。当TLR与PAMPs结合后,受体发生二聚化,构象改变,此时胞质中Toll的TIR结构域与MyD88的C端相互作用,MyD88 N端的DD募集下游同样含DD的白介素1受体相关激酶(IL-1 receptor-associated kinase)IRAK1和IRAK2,导致IRAK自身磷酸化,磷酸化的IRAK脱离MyD88与肿瘤坏死因子受体相关因子-6(TNFR associated factor-6, TRAF6)结合,最终导致NF- κ B和MAPK(mitogen-activated protein kinases, MAPKS)的激活,从而导致共刺激分子表达上调,促炎症因子的分泌^[14]。

RNA干扰是存在于动植物细胞中由双链RNA(dsRNA)介导的序列特异性mRNA降解过程。人工合成的长度为21~23 bp的双链siRNA可诱导产生RNA诱导沉默复合体(RISC),它能特异性结合体内与之同源的mRNA序列并将其切割,随后被切割成片段的mRNA被核酸外切酶降解,从而在后转录水平抑制基因表达^[5]。这种方法不激活寡腺苷酸合成酶(OAS1)、蛋白激酶R(PKR),不会引起广泛的蛋白合成抑制,因此细胞正常蛋白合成和功能并不受到影响^[15]。siRNA与传统的反义核苷酸或抗体介导等基因沉默方法相比好处在于其作用强、特异性高、抑制作用可传数代、体外转染效率高且表达稳定,体内应用时所需浓度低故安全性高,可结合特定的载体从而靶向特定组织或细胞,并且可同时干扰数个基因或外显子^[16,17]。将核酸导入DC细胞的方法包括电穿

孔, 病毒和脂质体等。尽管有电穿孔法成功转染人 DC 的报道, 但目前认为电穿孔对细胞的损伤较大^[6]。以病毒作为载体进行转染, 很难保证 DC 不被激活^[7]。因此我们选择脂质体作为将 siRNA 导入 DC 的介质, 因为脂质体转染试剂既不会诱导 DC 成熟, 也不会影响随后 DC 对 LPS 等成熟刺激信号的反应能力。在脂质体转染试剂中, 我们采用了 Invitrogen 的 Lipofectamine™ RNAiMax 试剂, 其优势在于能以最小的最适 siRNA 浓度达到最大的靶基因敲除效应, 并尽可能减少转染试剂造成的细胞毒性反应。根据预实验的结果, 我们发现 Lipofectamine™ RNAiMax 最适剂量为 4 μl, siRNA (5 mol/L) 为 6 μl, 因此确定 siRNA 最小的最适浓度为 10 nmol/L。转染后, 观察 DC 形态, 数量与同时相的未转染细胞均无明显改变。根据 MyD88 基因的序列, 我们设计了针对 MyD88 的 4 对 siRNA, 通过预实验筛选比较后我们选取了其中的两对, 即干扰一序列和干扰二序列。将 siRNA 导入细胞后, 其干扰的基因发生 mRNA 裂解。有关 DC 基因沉默的持续时间, 在 DC 培养的早期 (第 5d) 加入 siRNA, 干扰效果一直可持续到 DC 培养的终末阶段 (转染后第 7 d), 在蛋白质水平, 蛋白表达降低在转染后 3 d 出现, 后逐渐增强, 转染 7 d 后到达顶峰。我们在转染后第 48 h 运用 Real-time RT-PCR 检测 MyD88 mRNA 表达, 结果发现在干扰组相对 MyD88 mRNA 表达被抑制到 20% 以下, 这说明转染试剂 Lipofectamine™ RNAiMax 具有高效性, siRNA 干扰序列一的干扰效率略优于干扰序列二。转染后第 72 h 采用 Immunoblotting 法检测到 DC 细胞中 MyD88 蛋白的表达在干扰一组和二组均受到抑制, 与无义 siRNA 对照相比差异显著。通过 MLR, 我们发现干扰后的 DC 刺激 T 细胞增殖能力与对照组相比明显下降, 说明经 siRNA 干扰后的 DC 对 LPS 等成熟刺激信号无法像原先一样通过 MyD88 进行传递, 导致其免疫刺激作用被大大抑制。进一步的 ELISA 法检测 MLR 培养上清液中的细胞因子后, 发现干扰组 IFN-γ 分泌下降, 而 IL-4 分泌上升, 表明干扰后的 DC 诱导了 T 细胞向 Th2 反应的偏移^[18]。导入针对 MyD88 的 siRNA 后, 流式细胞仪检测 DC 细胞的表型, 我们发现 MHCII 分子和共刺激分子 CD80, CD86 表达均降低, 符合耐受性 DC 的免疫表型^[19,20]。

耐受性 DC 以抗原特异性的方式激活 Treg, 并使其增殖, 使后者发挥抑制效应 T 细胞的作用从而诱导免疫耐受。我们发现经 MyD88 干扰后所获得的调节性 DC 与同种异体反应性 T 细胞共培养后, T 细胞的

增殖明显下降, 且呈现量效关系。但其作用机制, 是否通过这种 DC 的直接作用还是通过进一步诱导 Treg 生成来发挥抑制同种反应性 T 细胞的作用等还有待于今后深入的研究加以证实。

我们将针对 MyD88 的 siRNA 转染到猪外周血单核细胞来源的 DC 中, 由于 TLR 信号传导途径中重要的链接分子 MyD88 表达受到抑制, DC 细胞的成熟和激活过程受到抑制, 形成耐受性 DC, 表现为同种 T 细胞反应降低, 免疫反应向 Th2 偏移。实验猪较之小鼠或大鼠与人体器官更为接近, 采用 RNA 干扰的方法干扰猪 DC 的 MyD88, 对于研究人类 DC 的基因治疗具有很重要的参考价值。本实验的结果为进一步的移植耐受实验和临床应用治疗 GVHD、自身免疫性疾病等提供了细胞实验基础、理论依据和新的角度。

参考文献 (References)

- 1 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-76.
- 2 Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117 (5): 979-87; quiz 88.
- 3 Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, *et al.* Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998; 9 (1): 143-50.
- 4 Yoshikawa T, Niwa T, Mizuguchi H, Okada N, Nakagawa S. Engineering of highly immunogenic long-lived DC vaccines by antiapoptotic protein gene transfer to enhance cancer vaccine potency. *Gene Ther* 2008; 15 (19): 1321-9.
- 5 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418 (6894): 244-51.
- 6 Laderach D, Compagno D, Danos O, Vainchenker W, Galy A. RNA interference shows critical requirement for NF-kappa B p50 in the production of IL-12 by human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171 (4): 1750-7.
- 7 Tomar RS, Matta H, Chaudhary PM. Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene* 2003; 22 (36): 5712-5.
- 8 Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 2003; 327 (4): 761-6.
- 9 Guzylack-Piriou L, Balmelli C, McCullough KC, Summerfield A. Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12. *Immunology* 2004; 112 (1): 28-37.
- 10 Hochrein H, Wagner H. Of men, mice and pigs: looking at their plasmacytoid dendritic cells [corrected]. *Immunology* 2004; 112 (1): 26-7.
- 11 Haverson K, Saalmuller A, Chen Z, Huang CA, Simon A, Seebach J, *et al.* Summary of the first round analyses of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 80 (1-2): 25-34.

- 12 Carrasco CP, Rigden RC, Schaffner R, Gerber H, Neuhaus V, Inumaru S, *et al.* Porcine dendritic cells generated *in vitro*: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* 2001; 104 (2): 175-84.
- 13 Foss DL, Bennaars AM, Pennell CA, Moody MD, Murtaugh MP. Differentiation of porcine dendritic cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expressed in *Pichia pastoris*. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91 (3-4): 205-15.
- 14 Kaisho T, Hoshino K, Iwabe T, Takeuchi O, Yasui T, Akira S. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int Immunol* 2002; 14 (7): 695-700.
- 15 Timmons L. The long and short of siRNAs. *Mol Cell* 2002; 10 (3): 435-7.
- 16 Bagasra O, Prilliman KR. RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histol* 2004; 35 (6): 545-53.
- 17 Grimm D. Small silencing RNAs: state-of-the-art. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61 (9): 672-703.
- 18 Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000; 1 (4): 311-6.
- 19 Li M, Zhang X, Zheng X, Lian D, Zhang ZX, Ge W, *et al.* Immune modulation and tolerance induction by RelB-silenced dendritic cells through RNA interference. *J Immunol* 2007; 178 (9): 5480-7.
- 20 Pearson TC, Trambley J, Odom K, Anderson DC, Cowan S, Bray R, *et al.* Anti-CD40 therapy extends renal allograft survival in rhesus macaques. *Transplantation* 2002; 74 (7): 933-40.

MyD88 Knockdown by Liposome-mediated RNA Interference to Porcine Monocyte-derived Dendritic Cell

Qian-Jun Zhou^{1,2}, Hui-Min Fan¹, Zhong-Min Liu^{1*}

¹*Institute of Sino-german heart institute, Shanghai east hospital, Tongji University, Shanghai 200120;* ²*Department of General Thoracic Surgery, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)*

Abstract To interfere the swine monocyte derived dendritic cell (MoDC) with small interferon RNA (siRNA) targeting myeloid differentiation factor 88 (MyD88) to induce the porcine tolerogenic DC, then study the phenotype, immunologic and biological function of DC, immature DC (iDC) was gained by inducing PBMC with IL-4 and GM-CSF. Two pairs of siRNA (siRNA1 and siRNA2) were synthesized and transfected into DC by LipofectamineTM RNAiMax controlled with siNEG transfection. Western blot and Real-time PCR were employed to examine the expression of MyD88. DCs were divided into four groups at the fifth day of culture: blank control: no stimulant; LPS group: added with LPS 1ug/ml; interference group (one and two): added with LPS 1ug/ml after transfection by siRNA MyD88 for 8 hours. All the cells were cultured for 72 hours. Flowcytometry(FCM)was used for phenotype detection such as CD80, CD86, SLA-g. BrdU method was applied for mixed lymphocyte reaction (MLR), and the concentrations of IFN-g and IL-4 of supernatant in MLR were measured by ELISA. Porcine MoDC was gained by inducing PBMC with IL-4 and GM-CSF. Phenotype of porcine MoDC was CD1⁺CD14⁺CD80⁺CD86⁺CD172a⁺SLAII⁺; the expression of CD80, CD86 and SLAII elevated after LPS stimulation. MyD88 mRNA and protein level reduced to 80% in both siRNA groups compared with siNEG group, while expression of CD80, CD86 and SLAII decreased in siRNA1 and siRNA2 groups. Stimulating index (SI) in siRNA group was reduced compared with LPS group ($P<0.05$), but no significant difference between two groups. The concentrations of IFN-g and IL-4 in supernatant of MLR of LPS group slightly increased compared with blank control ($P>0.05$). IFN-g decreased and IL-4 increased in both siRNA groups with comparison to LPS group ($P<0.05$). The siRNA transfected by liposome was able to interfere the expression of MyD88 in porcine DC by which TLR signal transduction was blocked to inhibit the maturation of DC. This tolerogenic DC was weaker stimulant for allogenic T cells and induce the deviation to Th2.

Key words porcine dendritic cell; RNA interference; liposome transfection; MyD88

Received: March 2, 2010 Accepted: May 26, 2010

This work is supported by the Science Technical Committee of Shanghai for International Cooperation (No.055407030)

*Corresponding author. Tel: 13501832872, E-mail: zhongmin_liu@sina.com