

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520091153002

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

尼古丁增强树突状细胞功能的机制研究

The Mechanism Study of Nicotine Stimulation Enhanced
Dendritic Cells Function

金 浩 杰

指 导 教 师: 高丰光 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论 文 提 交 日 期: 2012 年 4 月

论 文 答 辩 时 间: 2012 年 5 月

学 位 授 予 日 期: 2012 年 6 月

答 辩 委 员 会 主 席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

缩略语索引

缩略语	英文全名	中文全名
APC	antigen presenting cell	抗原提呈细胞
AP-2 α	transcription factor activator protein-2 α	转录因子活化蛋白-2 α
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine	5-溴尿嘧啶
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BTX	α -bungarotoxin	α 银环蛇毒素
CTL	cytotoxic T lymphocyte	杀伤性 T 淋巴细胞
DCs	dendritic cells	树突状细胞
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
ELISPOT	enzyme linked immunospot	酶联免疫斑点试验
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase	细胞外信号调节蛋白激酶
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FCM	flow cytometry	流式细胞术
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
HBcAg	hepatitis B virus core antigen	HBV 核心抗原
HBeAg	hepatitis B virus e antigen	HBV e 抗原
HBV	hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor-1 α	缺氧诱导因子 1 α
IFN- γ	interferon- γ	干扰素- γ
imDCs	immature dendritic cells	未成熟树突状细胞
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun 氨基末端激酶
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
MAPK	mitogen activated protein kinase	丝裂原活化的蛋白激酶
MFI	mean fluorescent intensity	平均荧光密度
MHC	major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
MLR	mixed lymphocyte reaction	混合淋巴细胞反应
nAChR	nicotinic cholinergic receptor	烟碱性胆碱能受体
OVA	ovalbumin	鸡卵白蛋白
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
Tc	tubocurarine	筒箭毒碱
TCR	T cell receptor	T 细胞受体
Th	T helper cells	辅助性 T 淋巴细胞
TMB	tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TNFR	tumor necrosis factor receptor	肿瘤坏死因子受体

摘要

树突状细胞 (DCs) 是功能最强的专职抗原递呈细胞 (APC), 可以诱导抗原特异性的 CTL 反应。有研究报道, 在小鼠实验中 DCs 联合负载抗原肽可以预防和治疗肿瘤。近年, 尼古丁已经成为神经退行性疾病、结肠癌和唐氏综合症的治疗性药物。我们的前期研究发现尼古丁处理的未成熟树突状细胞 (imDCs) 具有抗肿瘤效应, 但并未对尼古丁增强 DCs 功能的机制进行深入探讨。本研究首先以尼古丁刺激自骨髓诱导的 imDCs, 分别以流式细胞术、Western Blot 和 RT-PCR 检测尼古丁刺激对 DCs 表达 CD11c、 $\alpha 7$ nAChR、4-1BBL 和 OX40L 的影响; 其次, 以 BrdU 掺入试验和 ELISA 分别检测尼古丁刺激对 DCs 介导的抗原特异性 T 细胞增殖反应和 IL-12 分泌的影响; 再以 BrdU 掺入试验和 ELISPOT 探讨 DCs 表面共刺激分子 CD80/CD86 和 4-1BBL 在尼古丁增强 DCs 功能中的作用及肿瘤预防作用; 继以信号通路抑制剂, 通过 Western Blot 和 BrdU 掺入试验分别检测了尼古丁上调 DCs 表面分子 $\alpha 7$ nAChR、4-1BBL 和 OX40L 表达的机制; 最后以 BrdU 掺入试验和 ELISA 对比评估了尼古丁和 IFN- γ 对 DCs 功能的增强效果。

结论如下: 第一, 在蛋白水平, 尼古丁刺激可以上调 DCs CD11c、 $\alpha 7$ nAChR 和 OX40L 的表达, 而尼古丁刺激 DCs 在蛋白水平和 mRNA 水平都能增加 4-1BBL 表达; 第二, 尼古丁刺激能够增强抗原特异性 T 细胞增殖反应及 IL-12 分泌; 第三, 封闭 CD80、CD86 和 4-1BBL 的作用均能有效逆转尼古丁对 DCs 介导的 T 细胞增殖反应、CTLs 诱生和抗肿瘤功能; 第四, 尼古丁能快速激活 DCs 的 Jak2、c-Raf、MEK1/2、Erk1/2、p38MAPK、PI3K、Akt 及 mTOR 的磷酸化; 第五, 尼古丁主要通过 PI3K/Akt 信号通路上调 $\alpha 7$ nAChR、4-1BBL 和 OX40L 表达, MEK/Erk 信号通路也参与了上调 4-1BBL 表达; 最后, 我们发现尼古丁和 2 ng/ml IFN- γ 在 DCs 介导的 T 细胞增殖反应中有同样的效果。上述结果均预示尼古丁刺激的 DCs 能够成为抗肿瘤和抗病毒感染的新式免疫疗法, 我们的研究为尼古丁刺激 DCs 应用于临床治疗提供了理论依据。

关键词: 尼古丁 树突状细胞 免疫治疗

Abstract

Dendritic cells (DCs) are one of the important antigen presenting cells (APC) for inducing antigenic-specific cytotoxic T-lymphocyte (CTL) priming. Some reports have showed that DCs loaded with antigens could induce therapeutic and protective anti-tumor immunity in mice. Several groups have documented that nicotine has positive effects in the treatment of neurodegenerative diseases, ulcerative colitis and Tourette syndromem. Our previous studies have revealed that nicotine-treated immature dendritic cells (imDCs) have anti-tumor effects. The present study is to explore the mechanism of nicotine to enhance the function of dendritic cells. In order to achieve the aim of our study, firstly, bone marrow-derived imDCs were stimulated with nicotine in vitro and CD11c, $\alpha 7$ nAChR, 4-1BBL and OX40L expressions were determined by flow cytometry, Western Blot and RT-PCR respectively. Then, DCs-dependent antigen-specific T cell proliferation and IL-12 secretion were secondly determined by BrdU cell proliferation assay and ELISA respectively. Thirdly, the roles of CD80/CD86 and 4-1BBL in nicotine-augmented DCs-dependent T cell proliferation and CTL priming were investigated by BrdU cell proliferation assay, enzyme-linked immunospot assay and in vivo preventive effect on tumor development respectively. Using relative kinase inhibitors, the mechanism of $\alpha 7$ nAChR, 4-1BBL and OX40L upregulation by nicotine stimulation and the pathway related to nicotine-augmented DCs-dependent T cell proliferation were further explored by Western Blot and BrdU cell proliferation assay respectively. Taking the clinical application of the nicotine-treated DCs into account, finally, we compared the efficiency of nicotine and IFN- γ in augmentation of DCs-dependent T cell proliferation and IL-12 secretion by BrdU cell proliferation assay and ELISA respectively.

The results showed that: Firstly, nicotine could upregulate CD11c, $\alpha 7$

nAChR and OX40L in DCs in protein level, and increased 4-1BBL expression in DCs both in protein and mRNA level; Secondly, nicotine stimulation could enhance DCs' ability of HBV-specific T cell proliferation and IL-12 secretion; Thirdly, the effects of nicotine-augmented DCs-dependent T-cell proliferation, CTL priming and anti-tumor activity could be significantly decreased by blocking CD80, CD86 or 4-1BBL respectively; Fourthly, nicotine rapidly increased the phosphorylation of c-Raf, MEK1/2, Erk1/2 and p38 MAPK in the early 0-15 minutes and PI3K, Akt and mTOR were continuously activated from 0-60 minutes; Fifthly, $\alpha 7$ nAChR, 4-1BBL and OX40L upregulation by nicotine stimulation was mainly dependent on the activation of PI3K/Akt pathway, and MEK/Erk pathway also involved in the upregulation of 4-1BBL; Finally, nicotine had equal efficiencies to 2 ng/ml IFN- γ in DCs-mediated T cell proliferation. All these data presented here indicated that nicotine treated imDCs might be considered as a potential candidate for anti-tumor vaccination and anti-virus immunotherapy. Our study also provides a theoretical basis for nicotine-stimulated DCs applied to clinical treatment in future.

Key Words: Nicotine; Dendritic cells; Immunotherapy

目 录

缩略语索引	I
中文摘要	II
英文摘要	III
前 言	1
实验材料	4
实验方法	10
实验结果	20
1 尼古丁促进 DCs 的分化	20
2 尼古丁上调 DCs $\alpha 7$ nAChR、4-1BBL 和 OX40L 的表达	21
3 尼古丁增强 HBV 特异性 T 细胞增殖反应和 IL-12 分泌	25
4 共刺激信号在尼古丁增强 DCs 功能中的作用研究	26
5 尼古丁激活 DCs 的信号通路研究	31
6 尼古丁上调 $\alpha 7$ nAChR、4-1BBL 和 OX40L 的机制研究	31
7 尼古丁与不同剂量 IFN- γ 刺激 DCs 的功能比较	34
讨 论	35
结 论	41
参考文献	42
文献综述	48
攻读学位期间所发表文章	61
致谢	62

Table of Contents

Abbreviations	I
Abstract in Chinese.....	II
Abstract in English	III
Introduction.....	1
Materials	4
Methods.....	10
Results	20
1 Nicotine can promote the differentiation of DCs	20
2 Nicotine increased the expression of $\alpha 7$ nAChR, 4-1BBL and OX40L....	21
3 Nicotine enhanced HBV specific T cell proliferation and IL-12 secretion.	25
4 The role of costimulatory signals in nicotine enhanced DCs functions.....	26
5 The study of signaling pathways activated by nicotine in DCs.....	31
6 The mechanism of nicotine increasing the expression of $\alpha 7$ nAChR, 4-1BBL and OX40L.....	31
7 The efficiencies of nicotine and different doses IFN-γ in DCs function.....	34
Discussion.....	35
Conclusion	41
References	42
Article Review	48
Achievements.....	61
Acknowledgement.....	62

前 言

DCs 是人体内最活跃、功能最强的专职抗原提呈细胞 (antigen-presenting cells, APC), 在人体各种组织器官中广泛分布。人体对抗原发生免疫反应, 必须先经过 APC 识别、加工和处理。DCs 在抗肿瘤、抗感染、移植排斥、变态反应性疾病和自身免疫性疾病的发生和治疗中发挥重要作用^[1,2]。近年来, DCs 肿瘤疫苗已成为肿瘤生物治疗研究的热点, 通过体外细胞因子诱导联合培养扩增出 DCs, 再模拟 DCs 在体内的成熟过程, 然后使其接触相应抗原物质, 这些抗原物质可以是人工合成的肿瘤多肽、肿瘤细胞溶解物或肿瘤蛋白抗原 DNA 或 RNA 等, 也可以应用基因工程通过载体将肿瘤抗原基因导入 DCs, 最后将这些致敏的 DCs 回输到体内作为疫苗, 这样就可以诱导机体产生有效的抗肿瘤免疫应答。在这种过继性免疫治疗方式中, DCs 激活的细胞免疫在抗肿瘤过程中起着主导作用。在抗肿瘤领域, DCs 免疫疗法可用于治疗恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、恶性胶质瘤和脑瘤^[1]等。在抗感染领域, 携带病原体抗原编码基因的载体转染 DCs 后, 可诱导产生抗感染免疫, 并产生 CTL 杀伤病原体感染的细胞。

尼古丁俗称烟碱, 化学名称为 1-甲基-2-吡咯烷, 是由芳香族六元环和脂族五元环通过单键连接而形成的天然化合物。近些年, 尼古丁已成为神经退行性疾病、结肠癌和唐氏综合症的治疗性药物^[4-6]。近期, 关于尼古丁在免疫细胞作用方面的研究越来越多。尼古丁可以上调 DCs 表面共刺激分子的表达, 同时还能增强其抗原提呈功能^[7]。尼古丁刺激 DCs 结合肿瘤抗原负载不仅对淋巴瘤具有预防和治疗作用^[8], 而且也在实体瘤如 Lewis 肺癌 (LLC) 和肝癌 (Hepa 1-6) 模型中取得成功^[9]。但上述研究并未对尼古丁增强 DCs 功能的机制作深入探讨。

DCs 对 T 细胞的激活作用需要 CD80/CD86 (即 B7H1/B7H2) 与 CD28 的相互作用提供第二信号^[2]。然而 CD28-CD80/CD86 共刺激信号并不能完全解释对 T 细胞的持续高效的激活作用以及记忆性 T 细胞的产生^[3]。T 细胞激活后的细胞增殖和生存, 还有记忆性 T 细胞的发生发展还依赖于另一对共刺激分子,

即肿瘤坏死因子 (TNF) 和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族^[4]。我们前期的研究发现, 尼古丁能上调 DCs 共刺激分子 CD80/86 的表达^[8]。而 4-1BBL 和 OX40L 都是肿瘤坏死因子家族的重要成员。其中 4-1BBL 在淋巴细胞扩张和功能成熟过程中起关键作用^[13, 14], OX40L 与 T 细胞表面分子 OX40 结合后能够促进 CD4⁺T 细胞的活化、增殖、迁移, 并延长 CD4⁺T 细胞的寿命。因此, 我们有理由假设: 尼古丁可能通过上调 DCs 表面共刺激分子 CD80/86、4-1BBL 和 OX40L 的表达, 来增强 DCs 诱导 T 细胞活化的信号从而启动 Th1 型免疫应答。但到目前为止, 并不清楚尼古丁上调 DCs 表面共刺激分子 CD80/86 表达的分子机制及尼古丁能否上调 4-1BBL 和 OX40L 的表达。近期研究发现, 尼古丁通过激活 $\alpha 7$ nAChR-PI3K-mTOR 通路且抑制 AP-2 α 激活而上调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 表达^[15]、通过激活 PI3K-MAPK-Erk1/2-mTOR 通路调控 HIF-1 α 表达^[16]、通过激活 PI3K-Erk1/2-mTOR 通路调控纤连蛋白表达^[17]。因此在我们的实验中也选择性地检测了尼古丁对 Jak2、c-Raf、MEK1/2、Erk1/2、p38MAPK、PI3K、Akt 和 mTOR 的激活情况。

为了研究尼古丁增强 DCs 功能的机制, 首先在体外从骨髓中诱导出 imDCs, 分别用流式细胞术、Western Blot 和 RT-PCR 对 CD11c, $\alpha 7$ nAChR, 4-1BBL 和 OX40L 的表达变化进行检测。然后分别用 BrdU 和 ELISA 检测 DCs 介导的 HBV 抗原肽特异性的 T 细胞增殖反应和 IL-12 分泌; 其次, 为了研究 CD80/CD86 和 4-1BBL 在尼古丁刺激增强 DCs 功能中的作用, 分别先用抗 CD80 单克隆封闭抗体 16-10A1、抗 CD86 单克隆抗体 PO3.1 和抗 4-1BBL 单克隆抗体 TKS-1 对 DCs 进行封闭, 然后通过 BrdU 掺入试验来检测抗原特异性 T 细胞的增殖反应、酶联免疫斑点实验 (Enzyme Linked Immunospot, ELISPOT) 来检测抗原特异性 CTL 的增殖反应以及用动物实验来检测肿瘤预防效果; 继而, 通过使用各种相关信号通路的抑制剂, 我们进一步用 Western Blot 和 BrdU 掺入试验研究尼古丁上调 DCs 表面分子 $\alpha 7$ nAChR, 4-1BBL 和 OX40L 的机制以及参与调控尼古丁增强 DCs 介导的 T 细胞增殖反应的相关信号通路。最后, 考虑到尼古丁刺激的 DCs 有临床应用的前景, 我们还通过 BrdU 掺入试验和 ELISA 对比研究了尼古丁和不同剂量 IFN- γ 增强 DCs 功能的作用效果。

得出的结论如下: 第一, 在蛋白水平, 尼古丁刺激可以上调 DCs 表面

CD11c、 $\alpha 7$ nAChR、4-1BBL 和 OX40L 的表达，而在 mRNA 水平，尼古丁刺激 DCs 还可以增加 4-1BBL 的转录；第二，尼古丁刺激能够增强 HBV 特异性 T 细胞的增殖反应以及 IL-12 的分泌；第三，阻断 CD80、CD86 和 4-1BBL 能有效逆转尼古丁增强的 T 细胞增殖反应、CTLs 的诱生能力和抗肿瘤功能；第四，在 0-15 分钟内尼古丁能快速激活 DCs Jak2、c-Raf、MEK1/2、Erk1/2 和 p38MAPK 的磷酸化，在 0-60 分钟内尼古丁能持续激活 PI3K，Akt 以及 mTOR 的磷酸化；第五，尼古丁主要通过 PI3K/Akt 信号通路上调 $\alpha 7$ nAChR、4-1BBL 和 OX40L 的表达，而 MEK/Erk 信号通路也参与了上调 4-1BBL 的表达。最后，我们发现尼古丁和 2 ng/ml IFN- γ 在 DCs 介导的 T 细胞增殖反应中有相似的效果。所有的结果都预示尼古丁刺激的 DCs 能够成为抗肿瘤的新式免疫疗法。我们的研究为尼古丁刺激的 DCs 作为抗肿瘤 DCs 疫苗应用于临床治疗提供了理论依据。

实验材料

1 实验动物

C57BL/6 (H-2Kb) 近交系小鼠, 4-6 周左右, 雌性。购自中国科学院上海实验动物中心, 饲养于厦门大学实验动物中心 SPF 级的动物房中。

2 主要试剂

2.1 细胞培养相关试剂

- (1). 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) (美国 PeproTech)
- (2). 白细胞介素-4 (IL-4) (美国 PeproTech)
- (3). RPMI 1640 培养液 (RPMI Medium 1640) (美国 Gibco)
- (4). DMEM 培养液 (美国 Thermo)
- (5). 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (美国 Gibco)
- (6). HEPES (美国 Sanland Chemical)
- (7). β -巯基乙醇 (鹭隆生物)
- (8). 胰酶 (Trypsin) (鹭隆生物)
- (9). 尼古丁 [Nicotine, (S)-3-(1-甲基-2-吡咯烷基)吡啶] (美国 Sigma)
- (10). α 银环蛇毒素 (α -Bungarotoxin, α -BTX) (德国 EMD Biosciences)
- (11). 筒箭毒碱 (Tubocurarine, Tc) (美国 Sigma)
- (12). HBe₍₉₃₋₁₀₀₎: MGLKFRQL (由上海生工合成)
- (13). HBe₍₁₈₋₂₇₎: FLPSDFFPSV (由上海生工合成)
- (14). OVA 的多肽 SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) (由上海生工合成)
- (15). Anti-Mouse CD80 (B7-1) Purified (美国 eBioscience)
- (16). Anti-Mouse CD86 (B7-2) Purified (美国 eBioscience)
- (17). Anti-Mouse CD137 Ligand (4-1BB Ligand) Purified (美国 eBioscience)

- (18). Anti-Mouse CD252(OX40 Ligand) Purified (美国 eBioscience)
- (19). p38 MAPK 抑制剂 SB203580 (美国 Cayman Chemical)
- (20). PI3K 抑制剂 LY294002 (美国 Cayman Chemical)
- (21). MEK1/2 抑制剂 U0126 (美国 CST)
- (22). mTOR 抑制剂 Rapamycin (美国 Alexis)
- (23). 重组小鼠 IFN- γ (Recombinant Mouse IFN- γ) (美国 R&D)
- (24). 红细胞裂解液:
NH₄Cl 8.025 g, KHCO₃ 1 g, Na₂EDTA·2H₂O 0.037 g
800 ml 双蒸水溶解, 调节酸碱度为 pH7.2, 双蒸水定容至 1 L, 121℃
灭菌。
- (25). 磷酸盐缓冲液 (PBS):
NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, 溶于 800 ml
双蒸水中, 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 双蒸水定容至 1 L。

2.2 Western Blot 相关试剂

- (1). RIPA 裂解液 (强) (碧云天)
- (2). 蛋白磷酸酶抑制剂 (北京普利来)
- (3). 磷酸酶抑制剂 (瑞士 Roche)
- (4). 兔抗 GAPDH 一抗 (北京康为世纪生物科技有限公司)
- (5). 羊抗 CD137L 一抗 (美国 Santa Cruz)
- (6). 鼠抗 β -actin 一抗 (美国 Santa Cruz)
- (7). 兔抗 α 7 nAChR 一抗 (美国 Millipore)
- (8). 兔抗磷酸化 p44/42 MAPK 一抗 (美国 CST)
- (9). 兔抗磷酸化 p38 MAPK 一抗 (美国 CST)
- (10). 兔抗磷酸化 Jak2 一抗 (美国 CST)
- (11). 兔抗磷酸化 mTOR 一抗 (美国 CST)
- (12). 兔抗磷酸化 PI3K 一抗 (美国 CST)
- (13). 兔抗磷酸化 Akt 一抗 (美国 CST)

- (14). 兔抗磷酸化 MEK1/2 一抗 (美国 CST)
- (15). 兔抗磷酸化 c-Raf 一抗 (美国 CST)
- (16). HRP-羊抗兔二抗 (鹭隆生物)
- (17). HRP-驴抗鼠二抗 (美国 CST)
- (18). HRP-驴抗羊二抗 (美国 Santa Cruz)
- (19). 化学发光底物试剂盒 (美国 Millipore)
- (20). 预染蛋白 Marker (美国 Fermentas)
- (21). Loading Buffer (5×):
溴酚蓝 25 mg, SDS 0.5 g, 甘油 2.5 ml ;
用 2.5ml 0.5 M Tris (pH6.8) 溶液溶解后再加 2.5 ml 甘油混匀, 500 μ l/
份分装, 每份使用前加 25 μ l β -巯基乙醇。
- (22). 电泳缓冲液 (1×):
Tris 碱 3.03 g, 甘氨酸 18.8 g, SDS 1 g;
溶于 800 ml 双蒸水中, 用少量浓 HCl 调酸碱度为 pH8.3, 双蒸水定
容至 1L。
- (23). 半干转液 (1×):
Tris 碱 2.9 g, 甘氨酸 14.4 g, 甲醇 200 ml;
加双蒸水溶解并定容至 1L。
- (24). TBST 缓冲液 (1×):
Tris 碱 2.42 g, Nacl 8.8 g, Tween-20 500 μ l;
溶于 800 ml 双蒸水中, 调酸碱度为 pH7.5, 双蒸水定容至 1L。
- (25). 封闭液: 5 g 脱脂奶粉溶于 100 ml TBST 中溶解混匀。
- (26). 丽春红染色液:
丽春红 S 0.2 g, 三氯乙酸 3 g, 5-磺基水杨酸 3 g;
加双蒸水溶解并定容至 100 ml。

2.3 流式细胞术检测相关试剂

- (1). PE 标记的 anti-mouse 4-1BBL (美国 eBioscience)

- (2). PE 标记的 anti-mouse OX40L (美国 eBioscience)
- (3). FITC 标记的 anti-mouse CD11c (美国 eBioscience)
- (4). FITC 标记的 α -BTX (美国 eBioscience)

2.4 RT-PCR 相关试剂

- (1). TRIzol (中国大连 Tarkara)
- (2). PrimeScript Reverse Transcriptase (中国大连 Tarkara)
- (3). SYBR® Premix Ex Taq™ (中国大连 Tarkara)
- (4). 引物:
4-1BBL: sense 5'-ACTTCTGTTCCCGCCACCCA-3'
 antisense 5'-AGGTTGGGCGAGGTGGTGAT-3';
 β -Actin: sense 5'-CGTTGACATCCGTAAGACC-3'
 antisense 5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCAC-3';
(由北京华大基因合成)
- (5). 溴化乙锭 (EB 染液): 用双蒸水配成 10 mg/ml, 磁力搅拌器搅拌 2 小时,
避光室温保存。
- (6). TAE (50 \times):
Tris Base 242 g, 冰乙酸 57.1 ml, 0.5 mol/L EDTA (PH 8.0) 100 ml;
加水至总体积为 1L。

3 试剂盒

- (1). 细胞增殖检测试剂盒 (Cell Proliferation ELISA, BrdU) (瑞士 Roche)
- (2). 小鼠 IL-12 检测试剂盒 (Mouse IL-12 Module Set)
(奥地利 Bender MedSystem)
- (3). 小鼠 IFN- γ ELISPOT 试剂盒 (Mouse IFN- γ ELISPOT kit)
(荷兰 U-Cytech)

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库