

文章编号:1005-6947(2007)09-0859-05

· 基础研究 ·

大鼠未成熟树突状细胞体外扩增及功能鉴定

李纪鹏, 黄怡, 王为忠, 董光龙, 杜建军, 陈冬利, 季刚, 刘骥

(第四军医大学西京医院 胃肠外科, 陕西 西安 710032)

摘要:目的 探讨建立大鼠体外大量扩增未成熟树突状细胞(DC)的方法,以及不同剂量粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)对大鼠DC分化成熟的影响。**方法** 分离纯化并扩增大鼠骨髓细胞,用不同剂量GM-CSF培养,6 d和10 d后收集悬浮细胞进行扫描电镜观察和免疫表型鉴定,并行混合淋巴细胞反应,观察其诱导未致敏T淋巴细胞增殖的情况。**结果** 小剂量GM-CSF培养获得的DC(GMlowDC)形态上具有DC的典型特征,在细胞表型、细胞功能试验上具有未成熟的特性,具有DC的典型特征,细胞表面高表达CD11c,低表达CD80,CD86及MHC II类分子,与大剂量GM-CSF加IL4的联合组培养获得的DC(GMhighDC)相比,其体外刺激未致敏T淋巴细胞的增殖能力较弱。**结论** 笔者所建立的培养未成熟DC的方法是可行的;GM-CSF的剂量与细胞的成熟程度相关。

[中国普通外科杂志,2007,16(9):859-863]

关键词: 树突状细胞; 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子; 免疫耐受; 大鼠

中图分类号:R 392.4

文献标识码:A

Amplification and functional identification of immature dendritic cells from rat bone marrow in vitro

LI Ji-peng, HUANG Yi, WANG Wei-zhong, DONG Guang-long, DU Jian-jun, CHEN Dong-li, JI Gang, LIU Ji

(Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract: Objective To establish a method for amplification of immature dendritic cells (DC) from murine bone marrow in vitro and investigate correlations between maturation degree of DC and varying dosages of granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). **Methods** Dendritic cells from murine bone marrow were cultured with different dosages of rm GM-CSF. The suspension cells were examined with scanning electronic microscope, and the non-sensitized T lymphocyte proliferation was observed by mixed lymphocyte reaction. **Results** DC cultured in lower dosage of rmGM-CSF (GMlow DC) exhibited typical characteristics of DC, and had immature characteristics in cell phenotype and cell functions with high expression of CD11c and low expression of CD80, CD86 and MHC II on the surface of the cells. The ability of GmlowDC to stimulate the proliferation of non-sensitized T lymphocyte in vitro was weaker than that of GmhighDC. **Conclusions** The methods of immature DCs culturing established by allthors was feasible. The dosage of rm GM-CSF has a direct relationship with the maturation degree of DC.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(9): 859-863]

Key words: Dendritic Cells; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; Immune Tolerance; Rat

CLC number: R 392.4

Document code: A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571803)。

收稿日期:2007-03-20; 修订日期:2007-09-05。

作者简介:李纪鹏,男,河南焦作人,第四军医大学西京医院主治医师,主要从事小肠移植的基础方的研究。

通讯作者:王为忠 E-mail:weichang@fmmu.edu.cn

树突状细胞(DC)不仅是最有效的抗原提呈细胞,也是惟一能激活初始T细胞的抗原提呈细胞^[1-3]。笔者拟采用转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)修饰未成熟树突状细胞,试图诱导大鼠小肠移植免疫耐受,为解决临床小肠移植高排斥反应提供思路。为此拟先建立体外大量扩增大鼠未成熟DC的方法,即分别运用大剂量和小剂量粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)培养大鼠骨髓源的祖细胞,并从形态学、组合性细胞表面标志、混合淋巴细胞反应中刺激未致敏T淋巴细胞增殖等方面进行鉴定,探讨不同剂量GM-CSF对大鼠DC分化成熟的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

白细胞介素4、肿瘤坏死因子和粒-巨噬细胞集落刺激因子(CYTOLAB/Peprotech asia),抗兔CD11c(OX-42, Mouse IgG 2a, FITC-conjugated, BioLegend),抗兔CD86(B7-2, B70, Mouse IgG1, κ , FITC-conjugated, BioLegend),抗兔CD80(B7-1, B7, BB1, Mouse IgG1, κ , PE-conjugated, BioLegend),抗兔MHC class II(HIS19, Mouse IgG1, PE-conjugated, eBioscience),IMDM培养基干粉(GIBCO BRL),DC完全培养液RPMI1640(GIBCO),小牛血清(杭州四季青公司),Hepes(Promega),丙酮酸钠(上海广深化工试剂有限公司),2-巯基乙醇(GIBCO BRL)。8周龄,健康F344/N大鼠(北京大学实验动物中心)。

1.2 实验方法

1.2.1 骨髓CD34⁺细胞的分离纯化及扩增

1.2.1.1 分离和原代培养 无菌取出大鼠股骨和胫腓骨,浸泡于加双抗的磷酸盐缓冲液(PBS)中,将长骨两端剪开,用针管将骨髓冲出,反复直至发白后将其抽入离心管。在离心管中反复轻柔吹打骨髓,以300r/min离心10min,弃去上层脂肪约2~3mL。在短中管中加入7mL淋巴细胞分离液。取骨髓悬液与RPMI1640充分混匀,用滴管沿管壁缓慢叠加于分层液面上,注意保持清楚的界面。水平离心2000r/min×20min。离心后管内分为3层。用直头毛细吸管插到云雾层,吸取单个核细胞,置入另一短中管中;加入5倍以上体积的RPMI1640,离心1500r/min×10min,留下细胞沉淀加入3mL红细胞裂解液,置于孵箱内5min后,加入1%血清的PBS至10mL800r/min×7min后弃上液,留下细胞沉淀加1%血清的PBS液10mL;反复离心洗涤3遍弃上清;在细胞

沉淀中加入300 μ LCD34抗体悬浮后于4℃冰箱静置1~2h后,加入含1%血清的PBS5mL离心洗涤3遍,沉淀用1mL含1%血清的PBS重悬后于4℃冰箱内静置45min后加入磁珠,在磁力架上放置2min后将阳性细胞吸出;用含10%小牛血清的1640培养液悬浮,然后装入培养瓶中,在37℃,50%CO₂环境下贴壁2h,用预热的培养液轻轻洗出非贴壁细胞。隔日观察细胞生长状况,2~3d更换培养液。

1.2.1.2 传代培养 待细胞基本长满培养瓶底时,用0.25%胰蛋白酶37℃消化6min;在倒置显微镜下见大部分细胞已经回缩,并有少量细胞悬浮于培养液中,用等量含血清的培养液终止消化;离心后用培养液再悬,按1:2比例传代。37℃孵育40min后,在倒置显微镜下观察大部分细胞已经贴壁,弃上清液加入新鲜培养液继续培养。

1.2.1.3 生长曲线的绘制 取第4代细胞消化再悬,将其稀释至 1×10^5 /mL,接种于24孔培养板中,每孔1mL,隔3d换液1次。每天取3孔,用0.25%胰蛋白酶和1%EDTA各0.5mL消化形成细胞悬液,混匀。取少量细胞悬液,滴于细胞计数板上,在倒置显微镜下计数,每孔计3次,取其平均值。以时间(d)为横坐标,细胞数为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.2 诱导骨髓CD34⁺细胞向DC分化 贴壁细胞加RPMI1640培养液,并分别加20ng/mLGM-CSF(小剂量组),100ng/mLGM-CSF(大剂量)和500~1000U/mL的IL-4(联合组)以刺激诱导DC分化,第6天收集小剂量GM-CSF刺激诱导的DC,联合组至第10天收集,每天观察记录细胞的形态和生长情况。

1.2.3 细胞形态及超微结构观察 培养第0,4,6,10d时分别在倒置相差显微镜下观察并摄片。收获的DC滴于多聚赖氨酸被覆的玻片上,37℃温育4h后用4%戊二醛固定,PBS洗涤1次,制成悬液滴片,再用质量浓度1%的锇酸固定1h,梯度乙醇脱水,扫描电镜观察并摄片(由本校电镜教研室协助进行)。

1.2.4 细胞表型检测 收集培养至第6天及第10天的细胞进行免疫荧光染色,步骤:将CD11c,CD80,CD86和MHC-II的单抗贮存液用PBS稀释50倍,终浓度为10 μ g/mL;用PBS将 $1 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞洗2次(800r/min×5min),分别加稀释后的抗体80 μ L,4℃染色2h;再用PBS洗3次,去除多余的荧光抗体。用同型无关抗体染色作阴性对照,流式细胞仪分析。

1.2.5 DC 对混合淋巴细胞反应 (MLR) 采用 MACS 方法从 BN 大鼠脾脏细胞中纯化 CD4⁺ T 淋巴细胞,用 IMDM 调整至 2 × 10⁶ 细胞/mL,于 96 孔圆底培养板小孔内加入 0.1 mL 作为反应细胞。刺激细胞为收获的 DC,用 IMDM 调整至 2 × 10⁶ 细胞/mL,加入 50 μg/mL 丝裂霉素,37℃ 水浴温育 30 min 后,离心洗涤 3 次,重悬于 IMDM 中。调整至适当细胞浓度 (6.7 × 10² 细胞/mL, 2 × 10² 细胞/mL, 6.7 × 10² 细胞/mL, 2 × 10³ 细胞/mL, 6.7 × 10³ 细胞/mL, 2 × 10⁴ 细胞/mL, 6.7 × 10⁴ 细胞/mL, 2 × 10⁵ 细胞/mL) 后每孔加入 0.1 mL。各浓度组重复 8 个孔,同时设反应细胞和刺激细胞单独培养组作为对照。培养 4d 后用 MTT 法测定活细胞^[4]。

1.3 统计学处理

采用 Student t 检验作组间统计学分析。

2 结果

2.1 CD34⁺ 细胞生长曲线和倍增时间

接种后 1d,细胞数量有所下降,接种后 2d 开始增加,至第 3d 进入对数生长期,第 6 天进入平台期,第 8 天开始下降,整个曲线呈“S”形(图 1)。根据下列公式计算细胞倍增时间(DT):

$$DT = \frac{(t-t_0) \log 2}{\log N_t - \log N_0}$$

t₀ 为培养起始时间;t 为培养终止时间;N₀ 为培养起始细胞数;N_t 为培养终止细胞数。根据公式推算出大鼠 CD34⁺ 细胞的倍增时间为 30.28h。

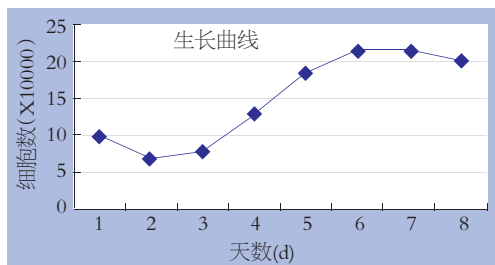


图 1 大鼠 CD34⁺ 干细胞的生长曲线图

2.2 CD34⁺ 细胞的体外培养扩增

从骨髓中采用 MACS 技术获取的 CD34⁺ 细胞大小均一,为圆形的非黏附细胞;在加入小剂量 GM-CSF 培养 24h 后,倒置相差显微镜下可见贴壁的单核细胞聚集成均匀分布的细胞聚体,2d 后大量细胞疏松地贴附于板壁上呈松散黏附的圆形细胞团块。随着培养时间的延长,细胞逐渐发育呈悬浮生长状态,形态不规则,细胞表面仅有不规则的毛刺状突起,培养板上留有少量贴壁伸展的巨噬细胞(图 2A)。扫描电镜下(图 2B)可见毛刺状细胞形态不规则,表面粗糙,如罩薄纱,有少量皱褶和不规则突起,有较少分叉的树突状胞浆突起,符合未成熟树突状细胞的形态特征。大剂量 GM-CSF 培养的树突状细胞于第 6 天细胞表面即出现明显的毛刺,至第 10 天已完全成熟,可见大量毛刺状的非黏附细胞(图 3A)。扫描电镜下这些毛刺状细胞表面可见丰富的,成分叉状的胞浆突起(图 3B),符合典型的成熟树突状细胞形态特征。

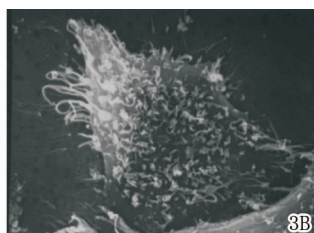
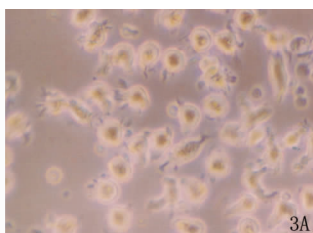
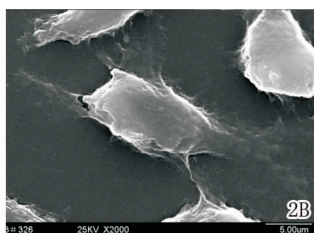
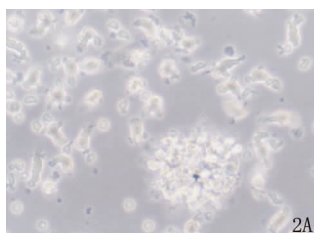


图 2A 未成熟的 DC 细胞 (×200)

图 2B 未成熟的 DC 细胞扫描电镜(×2 000)

图 3A 成熟的 DC 细胞 (×200)

图 3B 成熟的 DC 细胞扫描电镜(×4 000)

2.3 DC 体外鉴定

在大剂量 GM-CSF 加 IL-4 的联合组培养的细胞中 80.62% 高表达共刺激分子 CD80 (B7-1), 93.26% 表达 CD86 (B7-2), 95.43% 表达 MHC II 类分子, CD11c 阳性率为 64.8%; 小剂量 GM-CSF 组培养的细胞中 39.85% 低表达共刺激分子

CD80 (B7-1), 25.67% 表达 CD86 (B7-2), 43.6% 表达 MHC II 类分子, CD11c 阳性率为 70.2% (图 4)。此结果与文献报道的未成熟 DC 表型特征^[3]一致。

2.4 树突状细胞在 MLR 中的刺激作用

不同浓度的成熟的 DC (0, 1:3 000, 1:1 000,

1:300, 1:100, 1:30, 1:10) 与 2×10^5 反应细胞一并培养, 能有效地刺激 T 细胞增殖。将刺激细胞数量降低 300 倍时, DC 仍保持明显的刺激作用。而不同浓度未成熟 DC (B 组) 与 2×10^5 反

应细胞一起培养, 不但不能有效地刺激 T 细胞增殖, 甚至无法维持 T 细胞的存活(图 5)。成熟与未成熟 DC 两组间的差异具有显著性 ($P < 0.01$)。

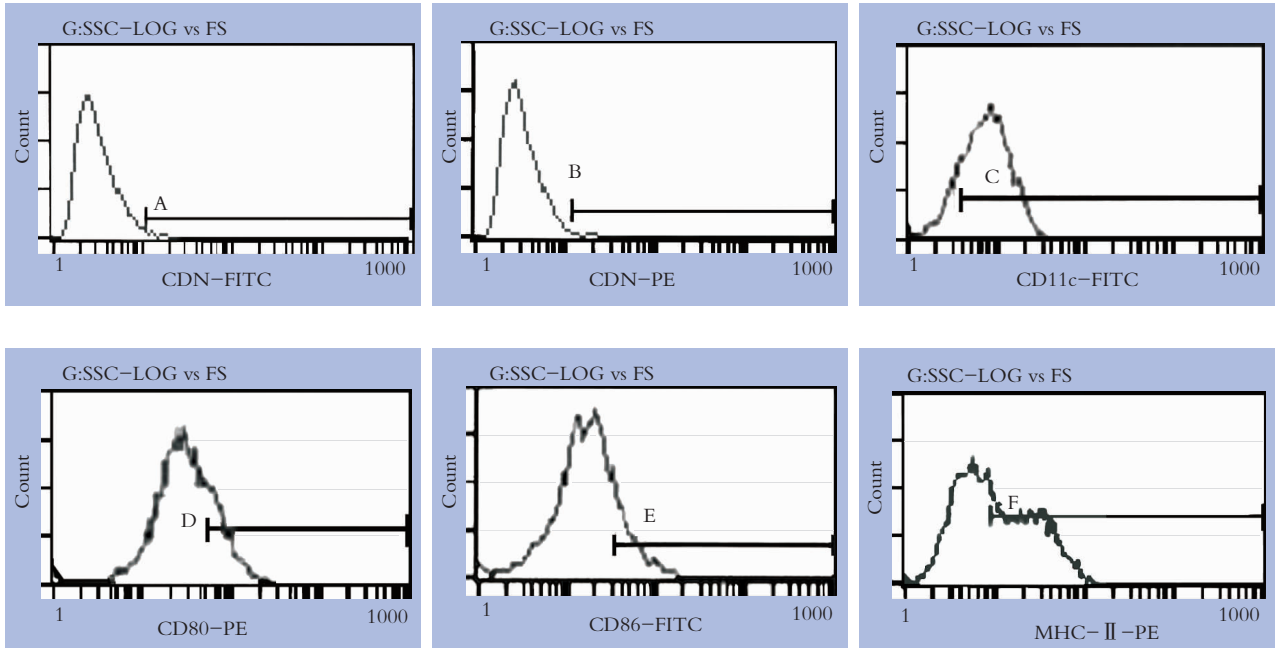


图 4 未成熟的树突状细胞表型分析

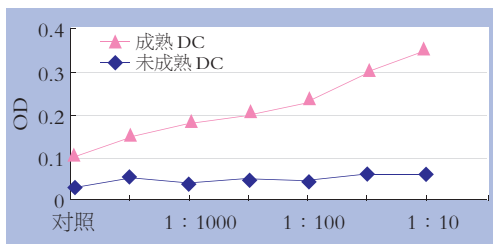


图 5 DC 的混合淋巴细胞反应

3 讨论

器官移植前给予来源于供者的未成熟 DC, 由于其细胞表面携有供者抗原又缺乏 B7 分子; 当它与受者体内能特异性识别供者抗原的 T 细胞结合, 可诱导该细胞无能, 导致受者特异性地对供者抗原不应答, 从而建立移植耐受^[5-6]。体内成熟和不成熟 DC 数量极少, 要获得足够的 DC 以供研究和应用, 只有依赖体外培养增殖。骨髓、脐血、外周血单核细胞, 都可作为前体用以诱导分化为 DC。但无论用何种前体细胞作体外诱导, 要获得足够数量 DC 目前尚存在很大困难。

有报道用 GM-CSF, TNF- α 和 IL-4 刺激的骨髓 CD34⁺ 细胞培养体系中加入 Flt3 配体可使 DC 的收获率提高 5 倍, 再加入 CSF 可进一步提高^[7]。人体 CD34⁺ 细胞是 DC 的前体细胞, 经过体外培养仍可被诱导分化为 DC。据此, 一些学者^[8] 提出先对 CD34⁺ 细胞进行体外培养扩增, 诱导扩增后的造血细胞分化为 DC。

GM-CSF 的量与培养 DC 的成熟程度明显相关。一般说来, 较大剂量的 GM-CSF 诱导生成的细胞以成熟 DC 为主, 而小剂量 GM-CSF 诱导生成的细胞以未成熟 DC 为主。IL-4 浓度为 500 ~ 1 000 U/mL 时可抑制巨噬细胞的生成, 并与小剂量 GM-CSF 有协同作用, 增加收获细胞的数量和成熟程度; 而与大剂量的 GM-CSF 时, 未观察到明显的效果^[9]。TNF- α 和 γ 型干扰素 (IFN- γ) 是被公认的促使 DC 成熟的因子, 而 IL-10 和 TGF- β 则可抑制 DC 的发育成熟; 其中经 IL-10 处理的 DC 可致 T 细胞无能或凋亡。有报道这些细胞可引起 Th1 向 Th2 的免疫偏离; TGF- β 则不仅抑制 DC 成熟, 还可增加 DC 的产量^[10]。上述细胞因子对

DC 的作用机制比较复杂,其效果与 DC 的组织来源和培养方法有关^[11]。

本实验所得的细胞具有典型的 DC 形态特征,综合上述观察指标,可以认定本实验获得的细胞确系 DC,而 6d 时所获的 DC,高表达 DC 的特异性抗原 CD11c,低表达主要组织相容性复合物 II 类分子和协同刺激分子 B7-1 等,体外激发未致敏 T 淋巴细胞增殖能力较弱,实为未成熟 DC。因此大鼠 CD34⁺ 细胞无论是否经过体外培养均能被诱导分化为 DC。通过 CD34⁺ 细胞体外培养后再使其分化为 DC,旨在是显著提高 DC 产量。但究竟能多大程度提高 DC 产量,目前还缺乏确切的数据。本实验表明,1 只大鼠骨髓经过体外培养扩增后可分离获得 1×10^7 CD34⁺ 细胞,经诱导后可得 3×10^7 DC;而直接从骨髓中分离仅能获得约 3×10^5 CD34⁺ 细胞(约占骨髓细胞总数的 1%) ,经诱导后可得 7×10^5 DC。因此通过 CD34⁺ 细胞培养可使 DC 数量增加 40 余倍。此外,培养扩增的骨髓细胞含有高比例的 CD34⁺ 细胞,可不经分离纯化步骤直接用于 DC 诱导,而正常骨髓细胞不经分离纯化不能用于 DC 诱导。因此,应用培养的骨髓细胞诱导 DC 不仅能显著节省费用,而且还能进一步使 DC 数量达到 3×10^8 细胞/鼠,约增加 400 余倍。本实验还证实应用本方法能稳定地诱导获得高纯度的 DC 细胞群。

综上所述,大鼠骨髓 CD34⁺ 细胞不论是否经过体外培养均可被诱导分化为 DC;提示大鼠 DC 与人体的相应细胞相似,是由 CD34⁺ 细胞分化而成。本实验提示用此方法可在体外大量扩增未成熟 DC,为对其下一步研究及临床应用打下基础。本实验所建立的一种经济、高效的 DC 诱导方法,能在体外大量培养高纯度 DC,供进一步研究。

参考文献:

- [1] Marland G, Bakker AB, A dema GJ, *et al.* Dendritic cells in immune response induction [J]. *J Stem Cells*, 1996, 14 (5): 501 - 507.
- [2] Steinman RM. . Dendritic cells and immune based the rapies [J]. *Exp Hematol*, 1996, 24 (6): 859 - 865.
- [3] Mayordomo J I, Zo rina T, Struk sWJ, *et al.* Bone marrow derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide based antitumorvaccines [J]. *Stem Cells*, 1997, 15 (1): 94 - 101.
- [4] Szabo les P, Moo reMA S, Young JW. Expansion of immuno stimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34⁺ bonemarrow precursors cultured with ckit ligand, GM-CSF and TNF α [J]. *J Immunol*, 1995, 154 (49): 5851 - 5860.
- [5] Higuchi M, Zeng D. Immune tolerance to combin marrow transplants after fractionated lymphoid regulatory NK T cells and clonal deletion [J]. *J Immunol*, 2002, 169 (46): 5564 - 5570.
- [6] 赵刚,王芳,王春友,等. 免疫缺陷树突状细胞诱导异种胰岛细胞移植耐受 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (5): 347 - 350.
- [7] Maraskovsky E. The effect of Fltligand and/or c-kit ligand on the generation of dendritic cells from human CD34⁺ bone marrow [J]. *Blood*, 1996, 88 (Suppl): 159 - 167.
- [8] Scheduling S, Kratz Albers K, M eister B, *et al.* Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells for clinical use [J]. *Sem inHematol*, 1998, 35 (4): 232 - 237.
- [9] Hope JC, Werling D. Flt-ligand in combin at granulocyte macrophage colony stimulating factor and interleukin, promotes the growth of bovine bone marrow derived dendritic cells [J]. *Scand J Immunol*, 2000, 51 (1): 60 - 66.
- [10] De ST, Van MM. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function [J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27 (20): 1229 - 1235.
- [11] Yang D, Howard OM. Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF- β 1 express functional C-C chemokine receptor [J]. *J Immunol*, 1999, 163 (16): 1737 - 1741.