论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0942-03

小鼠骨髓来源的树突状细胞体外扩增与鉴定

夏俊波,吴 奎,孙 鲲,王长征 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 改进目前体外大量扩增树突状细胞(DC)的方法,以获得大量高纯度的树突状细胞,从形态学和免疫表型等方面给予鉴定。**方法** 用20 ng/ml重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)诱导小鼠骨髓细胞体外分化为树突状细胞,用相差显微镜观察形态学变化,进行扫描、电镜观察和FACS检测细胞表面分子。**结果** 培养10 d,可获得大量典型DC,经流式细胞仪检测,DC表达表面分子CD11$_C$、CD80、MHCⅡ。**结论** 本实验方法可以获得大量高纯度的树突状细胞。

关键词:树突状细胞;重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子;分离纯化

中图法分类号:R329.24;R329.21;R394.2 **文献标识码**:A

Amplification and identification of dendritic cells from mouse bone marrow

XIA Jun-bo, WU Kui, SUN Kun, WANG Chang-zheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medicine University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To improve the methods for *in vitro* generating dendritic cells (DCs) from mouse bone marrow and to identify it with morphological, phenotype determination. **Methods** Cells isolated from mice bone marrow were cultured in GM-CSF (20 ng/ml), differentiating into dendritic cells. Morphological changes were observed by optical phase contrast microscopy, and surface molecules including CD11$_C$, CD80, MHCⅡ were detected by FACS. **Results** A large number of typical DCs were observed after culturing for 10 d. FACS analysis showed that the amplified DCs could express CD11$_C$, CD80, MHCⅡ. **Conclusion** A large quantity of highly pure BM-DC can be obtained by this method.

Key words: dendritic cell; granulocyte macrophage colony stimulation factor; purification

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前为止发现的功能最强的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)。DC在体内分布广泛且数量较少,因此,如何获得大量的纯化的DC就成为进一步研究DC特性及功能的前提。目前,每只小鼠骨髓细胞经GM-CSF体外8 d培养可以获得纯度为70%,数量约5×10^6的树突状细胞[1],而且步骤多,成本高。经过改进,用GM-CSF体外可大量扩增纯度高的树突状细胞。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8周龄,雌性,BALB/c小鼠,体质量18~20 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)购自Sigma公司;RPMI1640(GIBCO公司);FITC标记的仓鼠抗小鼠的CD80 mAb,FITC标记的仓鼠抗小鼠的CD11$_C$ mAb与FITC标记的仓鼠IgG同型对照均购自eBioLegend公司,PE标记的大鼠抗小鼠的MHCⅡ mAb与PE标记的大鼠IgG同型对照购自eBioscience公司,小鼠血清自制。

1.3 骨髓细胞的制备

颈椎脱臼法处死BALB/c小鼠,取其完整的股骨、胫骨,剔净周围组织,用70%的乙醇浸泡消毒2~5 min,用0.1 mol/L PBS冲洗,然后离断干骺端后,用1 ml注射器抽吸RPMI1640培养液冲洗髓腔4~5次,获得单细胞悬液。每只小鼠可以得到1×10^7~1.4×10^7骨髓细胞。

1.4 骨髓DC的诱导扩增

将制备骨髓细胞2×10^6,加入装有RPMI1640完全培养基(含100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素、2 mmol/L谷氨酸、体积分数10%FBS, 50 U/ml β-巯基乙醇)10 ml的100 mm的培养皿中培养,再加入剂量为200 ng重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF),放入37.5 ℃、5%细胞培养箱中培养。第3天重新加入含有200 ng rmGM-CSF的RPMI1640完全培养基10 ml。分别于第6天和第8天收集半量培养液,2 000 r/min离心

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170403)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170403)
作者简介:夏俊波(1976-),男,四川省威远县人,硕士研究生,医师,主要从事哮喘发病机制方面的研究,现在成都医学院第一附属医院传染科。电话:(023)66567980
通讯作者:王长征,电话:(023)68774603
收稿日期:2005-01-05;修回日期:2005-02-12

10 min，弃上清，用含有 200 ng rmGM-CSF 的 RPMI1640 完全培养基 10 ml 重悬，然后将细胞悬液倒回原来培养皿中。第 10 天收获细胞使用。为减少粒细胞的污染，提高纯度第 10 天换液时仅加入 rmGM-CSF 5 ng/ml，或者为提高成熟 DC 的比例，可以加入 LPS 1 μg/ml，共培养 2 d。

1.5　扫描电镜分析

用胶头滴管收集悬浮生长的 DC 于离心管中，2 000 r/min，离心洗涤 2 次，调节细胞密度至 2×10^6/ml。吸取 4～5 滴细胞悬液于多聚赖氨酸包被的载玻璃上，细胞自然沉降 10 min，放入 0.01 mol/L PBS 中浸泡漂洗 3 次，甩干，然后放入 2.5% 戊二醛固定 1 h，送第三军医大学电镜室制片，扫描电子显微镜下观察摄片。

1.6　透射电镜分析

用胶头滴管收集悬浮生长的 DC 于离心管中，3 000 r/min，5 min 离心洗涤 2 次，弃上清，加入 2.5% 戊二醛固定 1 h，送电镜室制片观察。

1.7　细胞表面标志物的流式细胞仪（美国 Benkman 公司）检测

用 100 μl 0.1 mol/L PBS 重悬新鲜制备的 DC 1×10^6，加入 100 μl 小鼠血清，4 ℃下置 20 min，然后分别加入 PE-MHC Ⅱ mAb 2 μg、FITC-CD80 2 μg 及 FITC-$CD11_C$ 2 μg 进行荧光标记、同型对照管中分别加入 PE-大鼠 IgG 和 FITC-仓鼠 IgG，4 ℃放置 30 min，然后加入 PBS，2 000 r/min 洗涤 3 次，重悬于 0.4 ml PBS 中，上机分析。

2　结果

2.1　细胞各阶段的生长情况

前 3 d 可见少量圆形细胞悬浮生长，大量细胞贴壁生长，第 4 天开始出现少量成簇、悬浮生长的带有突起的细胞，即树突状细胞，并随着时间的延长，突起变得细长，体积逐渐增大，但有的突起细胞大小不一致，突起长短不一致，部分细胞聚集成团，形似葡萄样。

2.2　扫描电镜观察

DC 细胞形态类圆形，表面粗糙，有大量皱褶和长短不一的突起（图 1）。

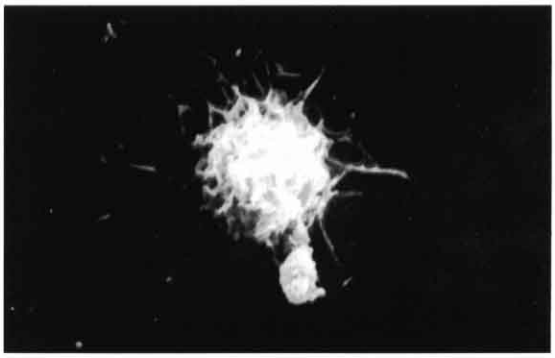
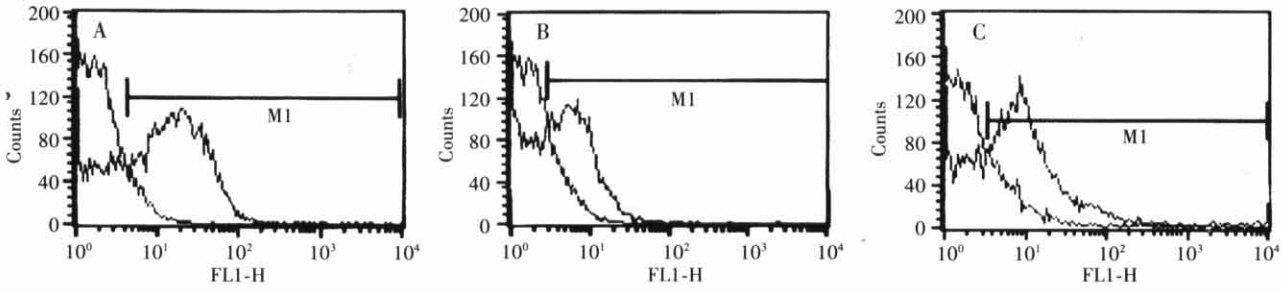


图 1　小鼠 BM-DC 培养第 10 天扫描电镜形态　（SEM×4 000）

Fig 1　Morphology of mouse BM-DC at the culture day 10
（SEM×4 000）

2.3　细胞表面分子的检测

FACS 检测表明，第 10 天培养细胞表达 DC 相对特异性表面分子 $CD11_C$ 77.50%，MHC Ⅱ 分子 30.12%，共刺激分子 CD80 为 27.34%（图 2）。



A：$CD11_C$；B：CD80；C：MHC Ⅱ

图 2　小鼠 BM-DC 表面分子 $CD11_C$、CD80、MHC Ⅱ FACS 检测结果

Fig 2　FACS results for surface molecules $CD11_C$, CD80 and MHC Ⅱ of BM-DCs

3　讨论

自从 20 世纪 70 年代 Steinman 和 Cohn 首次报道 DC，DC 的研究已得到发展。90 年代初 DC 体培养获成功，人们通过深入研究发现，体内 DC 可分为髓系 DC 和淋巴系 DC[1]。体内 DC 主要来源于骨髓，从骨髓中进入血液成为 DC 前体细胞，然后再分布到全身组织中。外周血单核细胞是淋巴器官 DC 的直接前体细胞。骨髓细胞在体外，用不同的细胞因子如 Flt3-Ligand[2]、GM-CSF、SCF 等均可扩增出 DC，具有髓系 DC 的特征，$CD11_C^+$ $CD11b^{dull}$ $CD8^+$[1]。

经典的小鼠 BM-DC 培养方法[3~6]主要采用细胞因子组合是 GM-CSF、IL-4 和/或 TNF-α 组合刺激骨髓中的造血干细胞定向分化，在制备骨髓细胞时用红细胞裂解液去除红细胞、用抗鼠 CD4 单抗、抗鼠 CD8 单抗、抗鼠 B 细胞去除 T、B 淋巴细胞。其中 GM-CSF 可促进髓系细胞的发育，是维持分化和发育环节最基本的细胞因子；IL-4 在诱导过程中仅起抑制粒细胞和巨

噬细胞产生的作用，并维持 DC 成熟；TNF-α 可阻止粒系的分化而刺激 DC 的成熟。而且为提高纯度，减少粒细胞的污染，在前 2 d 还需要吸弃大量的细胞培养悬液。

分析上述经典的培养过程以及系统的分析了影响细胞数量和成熟的原因，本实验从以下几个方面改进，可以提高树突状细胞的数量与纯度。首先，对骨髓细胞不做任何的筛除，避免了造血干细胞的丢失。其次，延长培养的时间，本实验细胞的培养时间是 10～12 d。因为在培养条件下树突状细胞只有在第 4 天出现或分化，因此早期的收获（普遍是 7 d）细胞，可能进一步导致细胞数量的减少。再次，我们采用培养皿而不是培养板或培养瓶培养细胞，也可以提高细胞数量。因为用培养皿培养可以抑制巨噬细胞的生长，巨噬细胞可以阻碍 DC 的成熟[4]，而且培养皿底面积大可以保证骨髓细胞在低密度条件下生长，当然如果采用与培养皿同质的培养瓶培养也可以得到相同的效果。如果需要进一步纯化细胞，可以把细胞转移至细胞培养板，这样，巨噬细胞能更容易贴壁，达到提高纯度的目的。以上就是本培养方法能提高细胞数量的原因：直接把新鲜的骨髓细胞，不做任何的分离，以较低密度悬浮在含有 GM-CSF 的培养液中生长。

另外，非粘着的 DC 的污染主要来自粒细胞，骨髓细胞在用 GM-CSF 刺激后第 2 天就可以见到圆形的成簇的粒细胞。经典的培养方法是在培养的第 2～4 天用吸管轻轻的吸弃培养液，以达到去除粒细胞的目的。但是，这样会造成部分正在分化阶段的 BM-DC 丢失，而且在文献中也证实，在第 7 天收获细胞时仍然可以发现有粒细胞的污染。有人发现绝大多数共分化的粒细胞不能存活至 10～12 d，特别是在 GM-CSF 剂量减少后。因此，在培养的第 10 天，减少 GM-CSF 的剂量至 5 ng/ml，减少粒细胞的污染，提高 DC 的比例，达到纯化的目的。

透射电镜下观察，培养第 8 天，大部分细胞表面突起比较细小，处于未成熟状态。少部分小突起细长。培养第 10 天，部分细胞表面突起变长，细胞体积增大。FACS 检测，培养细胞表达 DC 相对特异性表面分子 $CD11_C$ 为 77.50%，MHC Ⅱ 分子（30.12%）与共刺激分子 CD80（27.34%）较低，此阶段占比例较大的未成熟 DC 存在，文献[8]报道此型细胞表型为 $CD11_C^{high}$ MHC $Ⅱ^{low}$ $CD80^{negetive}$。第 12 天，少部分 DC 出现变性，极少部分细胞发生凋亡。培养时间越长，凋亡细胞增多。因此在第 10 天可以收获细胞进行实验，效果最佳。

收集培养第 10 天的 DC 进行扫描电镜观察，可见细胞表面突起细长、长短不一，大部分细胞突起较短，用 FACS 检测小鼠 DC 特异性表面标志 $CD11_C$ 达到 77.50%。如果再延长培养 2 d，还可以提高纯度。总之，在低密度条件下，延长培养时间，单用 GM-CSF 可以得到大量高纯度的 DC，比已往的细胞培养都要多[3～7]，总数达 4.76×10^7。在培养的第 12 天的 DC 中含有成熟 DC 和未成熟的 DC，其中未成熟 DC 占多数，经过 LPS 刺激以后成熟 DC 比例提高，可以到达 70%。本实验还无法将所有未成熟 DC 变成成熟的 DC，有待进一步的研究。

因此，按照本实验方法可以扩增出的细胞具有 DC 典型的形态，高表达 DC 的特异性抗原 $CD11_C$，而且可以获得数量较多的 DC，为 DC 的进一步研究及临床的运用打下了基础。

参考文献：

[1] Ardavin C. Origin, precursors and defferentiation of mouse dendritic cells [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(7): 582－590.

[2] Brasel K, De Smedt T, Smith J L, *et al*. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures [J]. Blood, 2000 96(9), 3029－3039.

[3] Inaba K, Inaba M, Romani N, *et al*. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyter/macrophage colony-stimulatingfactor[J]. J Exp Med, 1992, 176(6): 1693－1702.

[4] Zhang Y, Mukaida N, Wang J, *et al*. Induction of dendritic cell differentiation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, stem cell factor, and tumor necrosis factor a *in vitro* from lineage phenotypes-negative c-kit＋ murine hematopoietic progenitor cells[J]. Blood, 1997, 90(12): 4842－4853.

[5] Son Y I, Egawa S, Tatsumi T, *et al*. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells[J]. J Immunol Methods, 2002, 262(1-2): 145－157.

[6] Lutz M B, Kukutsch N, Ogilvie A-L, *et al*. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow[J]. J Immunol Methods, 1999, 223(1): 77－92.

[7] Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, *et al*. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells[J]. Blood, 2003, 101(9): 3501－3508.

[8] Mahnke K, Qian Y, Knop J, *et al*. Induction of $CD4^+/CD25^+$ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells[J]. Blood, 2003, 101(12): 4862－4869.

（编辑 陈聪连）