文章编号:1000-5404(2013)10-0931-07

论著

小鼠骨髓浆细胞样树突状细胞亚群的体外诱导及其鉴定

李 辉,安 军,谷力加 (510630 广州,中山大学附属第三医院胸心外科)

[摘要] **目的** 建立小鼠骨髓浆细胞样树突状细胞亚群的体外培养方法,并从形态、表型特征及功能方面与髓样树突状细胞亚群进行对比研究,探讨浆细胞样树突状细胞的生物学特性。**方法** 无菌条件下提取C57BL/6小鼠骨髓细胞,体外通过特异性细胞因子Flt3-Ligand诱导其向浆细胞样及髓样树突状细胞亚群分化,并利用倒置显微镜、流式细胞仪及混合淋巴细胞反应从形态学、表型特征及功能三方面对培养得到的浆细胞样树突状细胞进行鉴定。**结果** 小鼠骨髓细胞经Flt3-Ligand体外诱导培养8 d,可获得表型为$CD11c^+CD11b^-B220^+$的浆细胞样树突状细胞亚群。形态上,浆细胞样树突状细胞亚群多为表面光滑的圆形,胞核常呈偏心分布的肾形。共刺激分子表达上,未成熟浆细胞样树突状细胞低水平表达CD80、CD86、CD40及MHC-Ⅱ类分子,不能被TLR4激动剂LPS诱导成熟,但在TLR9激动剂CpG ODN_{1826}作用下,能够迅速转化为成熟树突状细胞。功能方面,浆细胞样树突状细胞具有一定的刺激同种异基因淋巴细胞增殖的能力,但弱于同等刺激条件下的髓样树突状细胞。**结论** 小鼠骨髓细胞在Flt3-Ligand的体外刺激诱导下,可向浆细胞样树突状细胞方向分化,所培养出的浆细胞样树突状细胞形态上多呈淋巴细胞样,低表达共刺激分子,并具有一定的刺激同种异基因淋巴细胞增殖的能力。

[关键词] 骨髓细胞;浆细胞样树突状细胞;细胞培养
[中图法分类号] R329-33;R329.24;R331.22 [文献标志码] A

In vitro culture and characterization of mouse bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cell subsets

Li Hui, An Jun, Gu Lijia (Department of Cardiothoracic Surgery, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510630, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a method of inducing and culturing plasmacytoid dendritic cell subsets from mouse bone marrow *in vitro*, and to investigate the biological features of plasmacytoid dendritic cells by comparing with myeloid dendritic cell subsets in cell morphology, phenotype and function. **Methods** Bone marrow cells were isolated from C57BL/6 mice under sterile condition, and were cultured with Flt3-ligand to differentiate into plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets. The dynamic changes of the morphology, phenotype and function of the cultured cells were examined by inverted microscopy, flow cytometry and allogeneic mixed lymphocyte reaction during the culturing process. **Results** After being cultured with Flt3-ligand for 8 d, the plasmacytoid dendritic cells ($CD11c^+CD11b^-B220^+$) were generated from mouse bone marrow cells, which displayed a smooth, round and lymphoid morphology with an eccentric kidney-shaped nucleus. Compared with its myeloid counterpart, the plasmacytoid dendritic cell subsets displayed an immature phenotype with lower expression levels of costimulatory molecules of CD80, CD86, CD40 and MHC-Ⅱ under steady state. When treated with toll-like receptor 9 (TLR9) agonist CpG ODN_{1826}, the plasmacytoid dendritic cell subsets could be quickly induced into maturation, but the cells did not respond to the stimulation of LSP, a typical TLR 4 agonist. Besides, the generated plasmacytoid dendritic cell subsets had the ability to stimulate the proliferation of allogeneic mixed lymphocytes, but the ability was less potent than that of the myeloid dendritic cell subsets under the same stimulation. **Conclusion** Mouse bone marrow cells cultured with Flt3-ligand can

[基金项目] 广东省科技计划项目(2009B030801011)
[通信作者] 谷力加,E-mail:glj58430@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1542.005.html (2013-04-10)

differentiate into plasmacytoid dendritic cell subsets *in vitro*, which have a lymphoid morphology with low expression of costimulatory molecules and a certain ability to stimulate the proliferation of allogeneic lymphocytes.

[**Key words**] bone marrow cells; plasmacytoid dendritic cells; cell culture

Supported by the Project of Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2009B030801011). Corresponding author: Gu Lijia, E-mail: glj58430@163.com

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是体内功能最强大的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),在启动、维持和调节免疫应答过程中,处于中心环节,被认为是机体免疫的始动者[1]。但体内DCs并非为一类均一的细胞,而是由数种表型、功能各异的亚群所组成的一个生物系统[2]。目前,体外培养获取大量DCs的方法已渐趋成熟,骨髓或脐血中的$CD34^+$造血干细胞以及人外周血$CD14^+$单核细胞均可作为前体细胞,通过细胞因子GM-CSF、IL-4以及TNF-α等联合诱导下分化为髓样树突状细胞(myeloid dendritic cells, mDCs)亚群[3-5],但有关浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)亚群体外培养的文献较少,同时缺乏对其生物学特性的系统性研究。本课题从C57BL/6小鼠提取骨髓细胞,然后在特异性细胞因子Flt3-Ligand的体外诱导作用下培养出浆细胞样DCs亚群,不仅从形态、免疫表型及诱导同种异基因型淋巴细胞增殖功能等方面对其进行了鉴定,还就上述生物学特性与髓样DCs亚群进行了对比研究,为今后采用DCs亚群进行肿瘤相关的免疫治疗研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8周龄雄性C57BL/6小鼠,体质量20~25 g,SPF级,购自南京大学模式动物研究所[许可证号SCXK(苏)20120001]。6~8周龄雄性BALB/c(H-2d)纯系小鼠,体质量19~21 g,SPF级,购自中山大学实验动物中心[许可证号SCXK(粤)2011-0029]。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.1.2 主要试剂 澳大利亚特级胎牛血清、RPMI1640细胞培养液、青霉素、链霉素购自美国Invitrogen公司。重组小鼠fms样酪氨酸激酶受体3配体(rmFlt3-Ligand)购自美国Peprotech公司,脂多糖(LPS)、二甲基亚砜(DMSO)、红细胞裂解液购自美国Sigma公司,2巯基乙醇(2-ME)、甲基噻唑基四唑(MTT)购自美国Amresco公司。非甲基化CpG基序的寡核苷酸(CpG ODN_{1826} 5′-TCCATGACGT-TCCTGACGTT-3′)[6],由上海生工生物工程公司合成,全链硫代磷酸化修饰,PAGE纯化。PE-labeled Anti-mouse CD11c, APC-labeled Anti-mouse CD11b, FITC-labeled Anti-mouse B220、CD80、CD40、MHC Class Ⅱ(I-A/I-E)及相应的同型对照IgG购自美国eBioscience公司。瑞氏吉姆萨染液由中山大学血液病研究所提供。

1.1.3 主要实验仪器 流式细胞仪和流式分选仪(美国BD公司,LSRⅡ型、Influx系列)、倒置相差显微镜(日本Nikon公司,TS100系列)、二氧化碳培养箱(美国Thermo Scientific,3110系列)、酶标仪(美国BioTek,Elx800系列)

1.2 骨髓细胞的培养

小鼠骨髓来源DCs的体外诱导分化、培养扩增参考Inaba等[7]方法,并略作改动,步骤如下。

1.2.1 骨髓细胞的提取 乙醚麻醉处死C57BL/6小鼠,用体积分数75%的乙醇浸泡5 min,无菌状态下游离双侧股骨、胫骨,剔净周围组织后,于75%乙醇中浸泡2 min,再以不含血清的RPMI1640冲洗2遍;然后将股骨、胫骨两端约1 mm骨骺剪除,暴露骨髓腔,并以含10% FBS的RPMI1640培养液反复缓慢冲洗,直到骨变白为止。将得到的骨髓细胞悬液通过70 μm细胞滤网过滤,收于50 mL Falcon离心管中,离心(300×*g*, 5 min)、弃上清,加入1 mL红细胞裂解液,静置反应1 min。待反应结束迅速加入6~10 mL的RPMI-1640培养液,反复洗涤2次后,再次离心(300×*g*,5 min),弃上清即得骨髓细胞用于培养。

1.2.2 骨髓细胞的培养 将获得的骨髓细胞用RPMI1640完全培养基重悬(2 mmol/L谷氨酰胺,1 mmol/L丙酮酸钠,5 μmol/L 2-ME,100 U/mL青霉素,100 μg/mL链霉素,rmFlt3-L 100 ng/mL,10% FBS),并调细胞浓度为$(1.5\sim2)\times10^6$/mL,加入24孔培养板(每孔1 mL),置于37 ℃,5% CO_2培养箱中连续培养7 d。在培养第8天将细胞分为3组:LPS刺激组、CpG ODN刺激组和未刺激组,其中LPS刺激组加入终浓度为1 μg/mL的LPS,CpG ODN刺激组加入终浓度为2 μg/mL的CpG ODN_{1826},未刺激组予补充同体积完全培养液,24 h后收集3组细胞行流式检测。

1.2.3 流式细胞术检测表型及分选 分别于培养的第0、4、8、12天收集细胞并制成单细胞悬液,离心(300×g,5 min)后,弃上清,用含1% FBS的PBS洗涤1遍后重悬,并调整细胞浓度为1×10^6/mL,加入1.5 mL EP管中(每管100 μL)。向各样本EP管中加入PE、APC或FITC标记的CD11c、CD11b、B220、CD80、CD86、CD40和MHC Ⅱ类分子单克隆抗体置4 ℃避光条件下孵育标记20 min,并以荧光标记的同型IgG作为对照。孵育结束后PBS洗涤2遍,400 μL含血清PBS液重悬后上机检测。

在培养第8天,巴氏管小心吹打各培养孔,收集细胞,300×*g*离心5 min后,弃上清。以含1% FBS的PBS液洗涤1遍,然后分别加入PE、APC、FITC标记的CD11c、CD11b、B220单克隆抗体置4 ℃避光条件下孵育20 min。孵育结束,PBS液洗涤2次,离心,加入含4% FBS的PBS液重悬,调细胞浓度为$(2\sim5)\times10^7$/mL,经70 μm滤网过滤后,收于流式上样软管中。分

选过程中以 $CD11c^+CD11b^+B220^-$、$CD11c^+CD11b^-B220^+$ 为标记分选出髓样和浆细胞样 DCs 2 个亚群。分选结束，将不同亚群细胞按 1×10^6/孔密度接种于 24 孔板中继续培养，过夜后取部分细胞重新接种于 96 孔板中（4×10^4/孔），并加入终浓度为 1 μg/mL 的 LPS 诱导成熟。

1.2.4　分选后瑞氏吉姆萨染色　取分选后的 pDCs 与 mDCs 细胞悬液，分别加入已放入盖玻片的 6 孔培养板中，过夜，待细胞贴于盖玻片后，将盖玻片取出，PBS 缓冲液缓慢冲洗，逐滴加入少量甲醇，静置固定 3 min。固定完毕，取 PBS 缓冲溶液再次冲洗。待玻片基本干燥时，滴加瑞氏-吉姆萨染液，覆盖细胞层，然后再以 1∶1.2 体积比加入染色缓冲液，充分混匀后，静置染色 2 min，染色结束，分别予 PBS 缓冲液、去离子水冲洗，待玻片基本干燥时，用显微镜观察细胞染色情况。

1.2.5　MTT 法检测各亚群 DCs 刺激同种异基因型淋巴细胞增殖的能力　取 BALB/c 小鼠，麻醉后取正常脾脏制备脾细胞悬液。红细胞裂解后，以含 10% FBS 的 RPMI1640 重悬细胞，并调节细胞浓度至 2×10^6/mL。将得到的脾脏淋巴细胞分别与前述 LPS 刺激的 mDCs 及 pDCs 按 5∶1 的比例在 96 孔板中混合，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 48 h（每组设 3 个复孔，同时设单一 T 细胞孔及调零孔作对照）。在培养结束前 4 h，向各培养孔中加入 20 μL MTT（5 mg/mL）。4 h 后，1 500 r/min，离心 10 min，弃上清，加入 150 μL DMSO 置摇床低速震荡 10 min，待镜下观察结晶物充分溶解后，用酶标仪在 490 nm 处测量光密度值，计算细胞刺激指数（SI）。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用独立样本 t 检验比较组间差异。

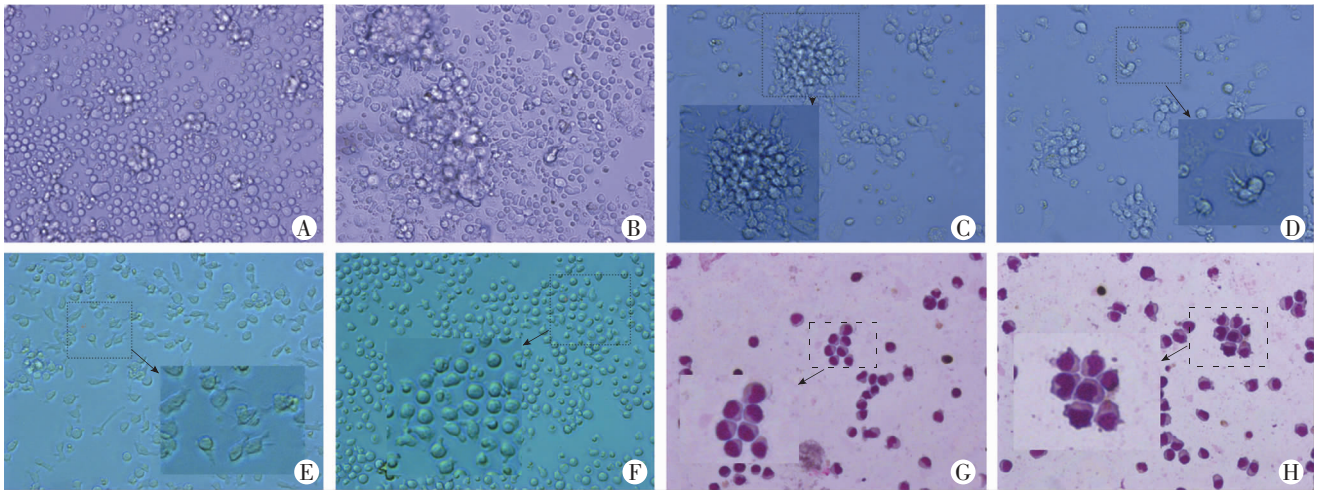
2　结果

2.1　培养细胞的镜下形态变化

每只小鼠双侧股骨及胫骨可分离的细胞总数为（4.4 ~ 8.7）$\times10^7$ 个，经红细胞裂解后，可获得（2.1 ~ 4.8）$\times10^7$ 个骨髓细胞用于培养。倒置显微镜下可见，在细胞接种至培养板后 3 ~ 4 h，培养液中充满了大量的骨髓原始细胞，大小一致，分布均匀，多数为悬浮状态。24 h 后大部分细胞转为贴壁生长，体积增大，圆形，透亮，并可见散在的小集落形成（图 1A）。培养第 3 ~ 4 天，细胞体积较前继续增大，多数为圆形，部分细胞表面可见小的突起（1 ~ 2 个），并可见少量梭形、蝌蚪状、星形或其他不规则形状的细胞。培养液中集落较前明显增大、增多（图 1B）。培养第 5 ~ 8 天，集落数量及集落内细胞数逐渐减少，而培养液中圆形或具有小突起的悬浮细胞逐渐增多，部分细胞可见典型的“毛刺”状突起。加入 LPS 或 CpG ODN 刺激后，细胞体积增大，并呈聚集趋势（图 1C）。但随着刺激时间的延长，上述聚集的细胞再次散开，呈半悬浮状态散在生长，同时胞膜向外伸出明显的树枝样突起，突起粗大且较长，胞体饱满，呈现典型的 DCs 形态（图 1D）。流式分选后单独培养，可见 mDCs 形态上体积稍大，以不规则形居多，且细胞周边可见较多短小“毛刺”（图 1E）。而 pDCs 则体积略小，多数为圆形，部分细胞表面可见独立、短小的“棒状”突起（图 1F）。将分选得到的 pDCs 与 mDCs 予瑞氏吉姆萨染色，可见形态上，pDCs 多为圆形或卵圆形，胞膜光滑，无明显突起，细胞质嗜碱性，并可见有一灰白亮区；胞核偏心分布，且细胞质一侧常轻微凹陷，呈肾形（图 1G）。而 mDCs 则体积稍大，细胞形态不规则，胞膜可见较多突起；细胞质同 pDCs 类似，亦呈嗜碱性，但胞核形态不一，呈马蹄形或肾形（图 1H）。培养结束后每只小鼠通过分选可得到（4.1 ~ 9.4）$\times10^5$ 个 pDCs 和（1.6 ~ 3.7）$\times10^6$ 个 mDCs。

2.2　细胞表型检测

在培养过程中，两亚群 DCs 比例不断变化，其中 pDCs 在培养开始时仅占骨髓细胞总数的 1.78%，第 4 天升至 6.39%，第 8 天时达到高峰，为 26.70%，而在第 12 天时又降为 19.20%。mDCs 比例则随着培养时间的延长不断上升，在上述各时间点分别为 2.24%、15.80%、47.20%、60.10%（图 2）。



A：培养 24 h；B：培养第 3 天；C：加入 LPS 刺激后早期；D：加入 LPS 刺激 24 h 后；E：流式分选后的 mDCs；F：流式分选后的 pDCs；G：分选后 pDCs 瑞氏吉姆萨染色；H：分选后 mDCs 瑞氏吉姆萨染色

图 1　培养过程中细胞形态变化　（倒置相差显微镜　×400）

另外,在共刺激分子CD80、CD86、CD40及MHC-Ⅱ类分子表达上,两亚群DCs有所不同。在未予刺激的条件下,pDCs共刺激分子CD80、CD86、CD40及MHC-Ⅱ类分子的表达比例分别为(2.33±0.80)%、(2.76±1.73)%、(8.72±2.34)%、(10.29±2.73)%,而mDCs上述表面分子表达则略高,分别为(9.10±2.22)%、(13.83±3.84)%、(13.13±2.28)%、(69.57±4.66)%,2组在上述分子表达上差异具有显著性($P<0.05$),但两亚群CD80、CD86及CD40表达水平均较低,为不成熟DCs表型(图3)。在培养第8天给予CpG ODN_{1826}刺激后,pDCs与mDCs共刺激分子CD80、CD86、CD40及MHC-Ⅱ类分子表达均有明显升高($P<0.05$),其中pDCs表面CD80、CD86、CD40及MHC-Ⅱ类分子阳性率分别为(51.26±7.63)%、(77.20±2.78)%、(95.96±1.23)%、(83.00±2.65)%,mDCs上述表面分子比例则升至(86.00±3.63)%、(96.20±1.73)%、(96.76±2.31)%、(93.73±2.16)%,均为成熟DCs表型(图4),同时细胞在形态上体积增大,胞体饱满,胞膜向外伸出明显的树枝样突起,呈现典型的DCs形态。与CpG ODN刺激不同的是,加入LPS刺激后,仅mDCs能够被诱导成熟,在给予LPS(1 μg/mL)刺激后24 h,其CD80、CD86、CD40及MHC-Ⅱ类分子表达明显升高($P<0.05$),分别升至(95.10±4.99)%、(95.76±3.61)%、(95.50±2.44)%、(82.70±5.10)%,而pDCs依然为不成熟DCs表型,共刺激分子表达分别为(4.53±2.49)%、(4.51±0.72)%、(14.16±3.61)%、(17.30±6.95)%,与未刺激比较,各指标变化无统计学意义($P>0.05$,图5)。

2.3 混合淋巴细胞反应

实验中将分选后的pDCs与mDCs分别予终浓度为1 μg/mL的LPS刺激24 h后,按1∶5的比例加入同种异基因型小鼠脾脏淋巴细胞行MTT实验,结果分选出的pDCs与mDCs均可不同程度地刺激同种异基因型淋巴细胞增殖,刺激指数分别为5.23±1.23、8.05±1.20,2组间诱导淋巴细胞增殖的功能差异有统计学意义($t=2.83$,$P=0.04$)。

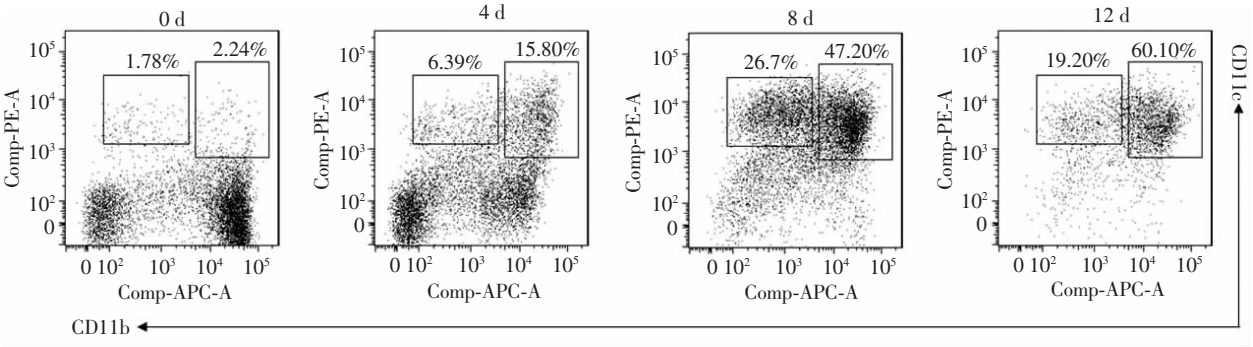
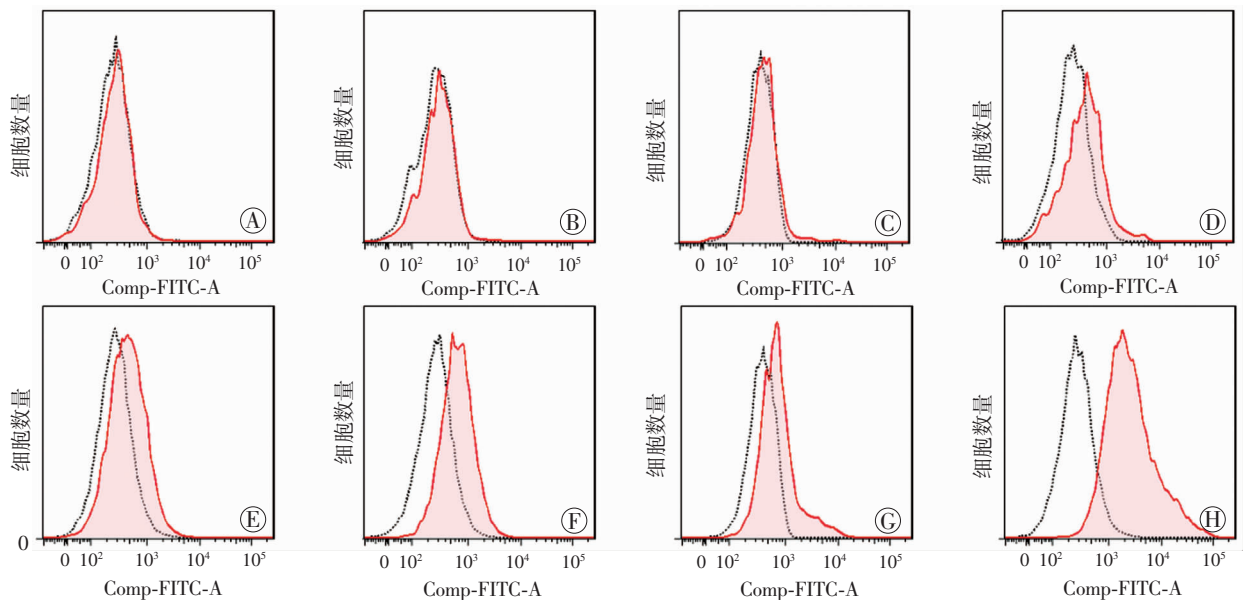
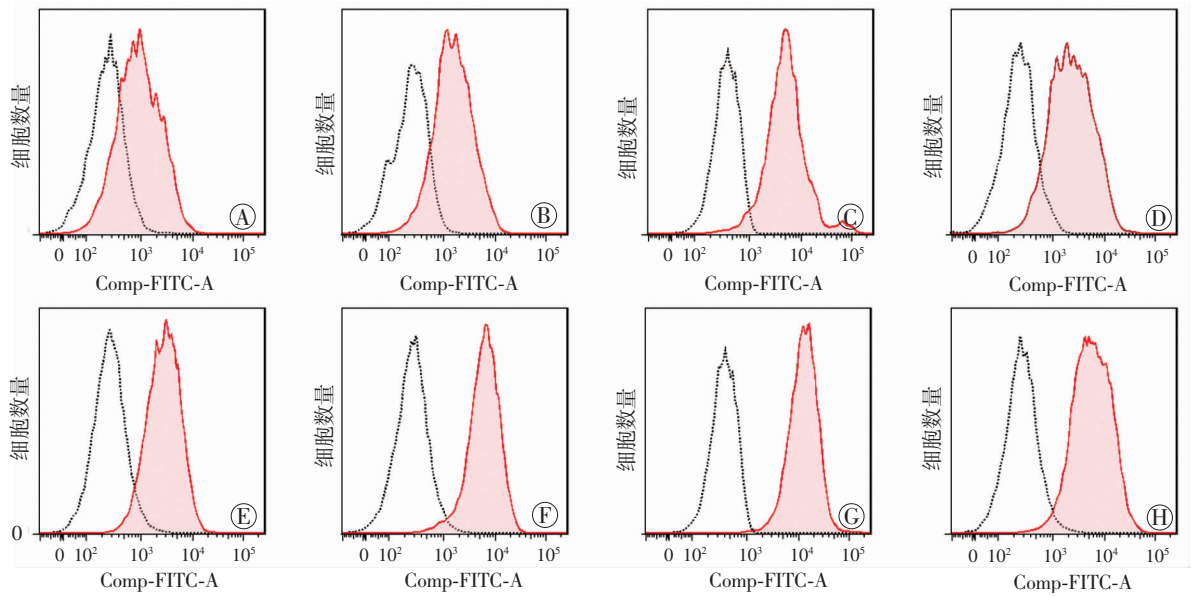


图2 培养过程中pDCs与mDCs比例变化



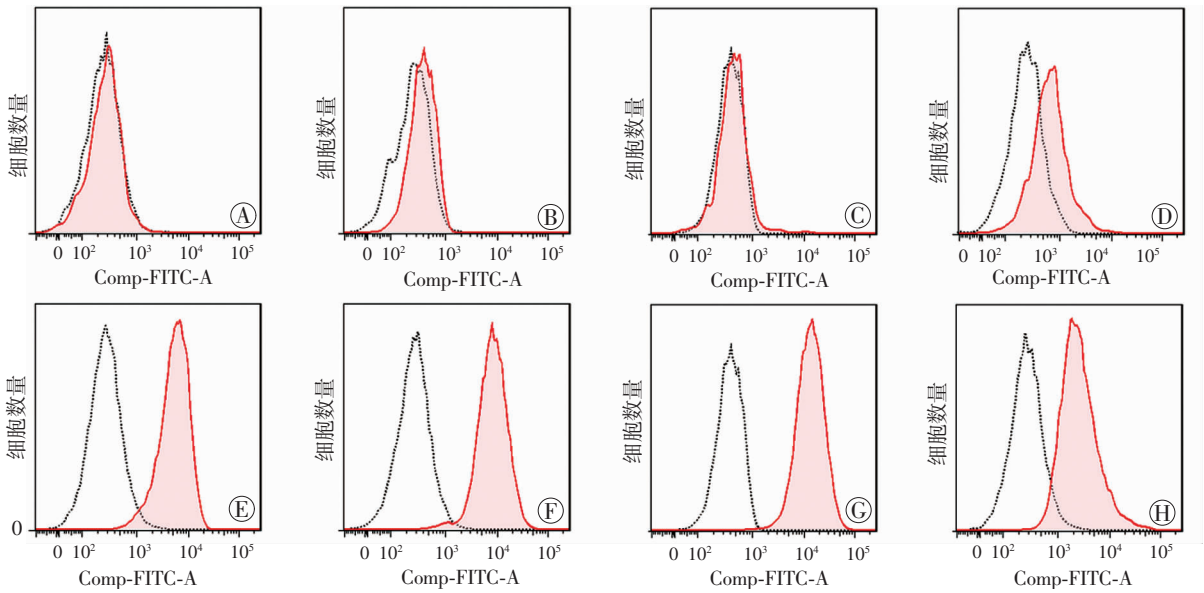
A~D:pDCs未刺激;E~H:mDCs未刺激;A、E:CD80;B、F:CD86;C、G:CD40;D、H:MHC-Ⅱ

图3 未予刺激时两亚群DCs共刺激分子及MHC-Ⅱ类分子表达



A～D:pDCs CpG 刺激;E～H:mDCs CpG 刺激;A、E:CD80;B、F:CD86;C、G:CD40;D、H:MHC-Ⅱ

图 4　给予 CpG ODN 刺激后 pDCs 与 mDCs 共刺激分子及 MHC-Ⅱ类分子表达



A～D:pDCs LPS 刺激;E～H:mDCs LPS 刺激;A、E:CD80;B、F:CD86;C、G:CD40;D、H:MHC-Ⅱ

图 5　给予 LPS 刺激后 pDCs 与 mDCs 共刺激分子及 MHC-Ⅱ类分子表达

3　讨论

随着免疫学理论及实验技术手段的不断发展及完善,近年来对 DCs 分化发育、抗原呈递、功能调控等诸多方面功能的认识较以前有了长足的进步。目前认为体内 DCs 并非为一类均一的细胞,而是由数种表型、功能、解剖分布各异的亚群所组成的一个生物系统。该系统中每一个亚群在免疫反应中发挥着不同的作用,共同参与对机体免疫应答的调节[2,8]。

现知体内的树突状细胞按照来源至少分为两个亚群:髓样树突状细胞(mDCs)和浆细胞样树突状细胞(pDCs)。其中 mDCs 是研究最早和体内分布最广泛的一类树突状细胞,通常所称的常规树突状细胞(conventional dendritic cells,cDCs)皆指 mDCs,其与粒细胞、单核巨噬细胞均由骨髓中的髓样前体(common myeloid progenitor,CMP)分化而来[9]。mDCs 具备典型的树突状形态,膜表面中高度表达 MHC-Ⅱ类分子及 Toll 样受体(Toll like receptor,TLR)2、3、4、5、6、8,能移行至淋巴器官和刺激初始型 T 细胞增殖活化,参与机体免疫应答的启动和调控[10]。而 pDCs 则是一类近年来被认识并被证明在机体抵抗病毒感染以及在自身免疫性疾病和肿瘤的发生、发展方面发挥着重要调控作用的免疫细胞,主要源自骨髓中的淋巴样祖细胞(common lymphoid progenitor,CLP)[11]。与 mDCs 不

同,pDCs 在形态上表面光滑、圆形类似于浆细胞,主要分布于骨髓、外周血及 T 细胞丰富的淋巴组织内[12]。在 TLR 受体表达上,pDCs 特征性地表达单链病毒 RNA 配体 TLR 7 和 DNA 病毒及 CpG 寡聚脱氧核苷酸(CpG ODN)的配体 TLR 9。这种独特的 TLR 受体表达使之在功能上与 mDCs 形成互补,在病毒、CpG ODN 刺激下可以迅速分泌大量的Ⅰ型干扰素,发挥抗病毒等生物学效应[12]。另外,pDCs 还通过释放的Ⅰ型干扰素(INF-α、INF-β)促进 NK 细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞以及 mDCs 等免疫效应细胞的功能,之后在自身分泌的Ⅰ型干扰素和 TNF-α 等细胞因子的作用下分化为一类独特的成熟 DCs,参与对活化型 T 细胞和调节性 T 细胞的诱导生成[13-14]。

在表型上,人类 pDCs 表达 CD4、CD123、BDCA-2、BDCA-4、ILT3 和 ILT 7,但缺乏系列标志物及树突状细胞的经典标记 CD11c。其中,BDCA-2、BDCA-4 和 ILT 7 可作为 pDCs 的特异性表面标志物用于组织中 pDCs 检测以及外周血及组织单细胞悬液中 pDCs 的分选。而在小鼠中,pDCs 可以被认定为 $CD11c^+CD11b^-B220^+$ 细胞,可采用流式细胞仪或通过特异性的单克隆抗体 120G8、Siglec-H、mPDCA-1 进行体内外检测、分选及相关研究[15-16]。但体内 pDCs 数量却极少,在人外周血单个核细胞中,不足 0.1%[17-18],单纯依靠分选难以获得足够的细胞数量用于体内、外及临床应用研究。随着人们对 DCs 起源以及分化发育过程认识的进一步加深,发现 FMS 样酪氨酸激酶 3 配体(Flt3-Ligand,Flt3-L)是人类和小鼠的造血干细胞发育成 pDCs 的关键调节因子[19],骨髓中 Flt3 受体阳性表达的 CMP 及 CLP 均能够在特异性配体 Flt3-L 的作用下,向 pDCs 以及 mDCs 的方向分化。皮下注射 Flt3-L 的人类志愿者其外周血中 pDCs 和 mDCs 都有显著的增加[20],转染 Flt3-L 基因的小鼠 pDCs 和 mDCs 亦有明显的增高,而 Flt3-L 基因敲除的小鼠产生 pDCs 的数量则显著下降[21-22]。虽然有研究及文献报道采用 M-CSF 或多种细胞因子(SCF、IL-3、GM-CSF、IL-4、IL-10)能够诱导骨髓造血干细胞向 pDCs 分化,但比较而言,Flt3-L 作为正常生理情况下骨髓造血干细胞发育的关键因子,通过其所诱导产生的 DCs(mDCs 及 pDCs 亚群)较 GM-CSF/IL-4 等大剂量炎性细胞因子作用下产生的 DCs 更能够反映机体稳定状态下 DCs 的功能[23-24]。

本实验提取 C57BL/6 小鼠骨髓细胞,在体外通过细胞因子 Flt3-L 的诱导,成功培养出骨髓源性的浆细胞样树突状细胞亚群。首先在表型方面,与文献[25]报道相符,pDCs 具备小鼠 DCs 相对特异性的标记 CD11c,但不表达 CD11b,而高表达小鼠全 B 细胞标记 B220。在培养不同阶段对 pDCs 表面共刺激分子表达进行检测,可以看到未成熟状态下 pDCs 共刺激分子 CD80、CD86、CD40 以及 MHC-Ⅱ类分子表达水平均较 mDCs 偏低,其中 CD80、CD86 几乎不表达,并且在 MHC-Ⅱ类分子表达上与 mDCs 更是具有显著性差异,说明 pDCs 在发育成熟度上少不及 mDCs。而在分别给予 TLR4 激动剂 LPS 和 TLR9 激动剂 CpG ODN_{1826} 诱导后,pDCs 表现出与 mDCs 不同的反应性。对于 TLR4 特异性激动剂 LPS,mDCs 能够迅速被诱导成熟,其 MHC-Ⅱ类分子及共刺激分子 CD80、CD86、CD40 表达较未刺激时明显升高,而 pDCs 上述分子的表达则不明显,说明 pDCs 不具备 LPS 特异性受体 TLR4 的表达。在给予 TLR 9 激动剂 CpG ODN_{1826} 后,pDCs 与 mDCs 上述指标均出现明显升高,提示两亚群 DCs 均具有 TLR9 的表达,能够接受特异性受体激动剂 CpG OND_{1826} 的刺激向成熟 DCs 分化,这与小鼠 TLR 的表达情况相符(在人体仅 pDCs 表达 TLR9,而在小鼠 mDCs 与 pDCs 均表达 TLR9,但不论人还是小鼠,仅 mDCs 表达 TLR4)[26]。另外,pDCs 培养过程中比例的变化与 mDCs 亦不相同,pDCs 在培养第 8 天左右数量上达到高峰,接近 30%,而 mDCs 则进行性增高,至 15 d 左右才逐渐下降。

在形态方面,通过对分选后 pDCs 及 mDCs 的形态进行观察,发现两者各具特点,其中 pDCs 更类似于淋巴或单核细胞,圆形,表面突起较少,而 mDCs 多为不规则形,表面可见较多的“毛刺状”突起,为典型的 DCs 形态[12]。予瑞氏吉姆萨染色后,两亚群 DCs 形态上差异更为典型,pDCs 多为圆形、表面光滑,而 mDCs 则多为不规则形,胞膜可见较多突起。并且在细胞核形态及分布上,两亚群亦有明显不同,pDCs 胞核多为偏心分布,核浆比大,细胞核形态上常呈一侧凹陷的肾形,而 mDCs 则胞核形态不一,多呈马蹄形成肾形。但无论 pDCs 或 mDCs 在加入相应 TLR 激动剂诱导成熟后,均表现出典型的成熟 DCs 形态特征,胞体饱满,呈悬浮状态生长,同时胞膜向外伸出粗大且较长的突起。

在功能方面,将分选出的 pDCs 及 mDCs 分别予 LPS 刺激后,再与同种异基因型淋巴细胞混合培养进行 MTT 实验,可以看到无论是 pDCs 及 mDCs 均具有刺激同种异基因型淋巴细胞增殖的能力,但 pDCs 刺激能力显著的低于 mDCs($P<0.05$)。而 DCs 刺激能力的高低与其 MHC-Ⅱ类分子及共刺激分子的表达水平呈正相关,mDCs 由于具有特异性受体 TLR4,使之能够被 LPS 刺激诱导成熟,大幅提高共刺激分子及 MHC-Ⅱ类分子的表达,因此诱导异基因型淋巴细胞增殖的能力明显增强,而 pDCs 由于不具备 TLR4 受体,在同等数量下对同种异基因淋巴细胞的增殖能力不及

mDCs。因此,从细胞形态、表型特征以及刺激同种异基因型淋巴细胞增殖能力三方面综合判断,本实验所培养的pDCs具备相应的生物学特点。

另外,在实验中我们观察到pDCs的培养方法较为特殊,既往采用GM-CSF/IL-4进行mDCs的培养,通常需要3 d半量换液,以维持细胞因子浓度及补充培养液中营养物质的消耗。但采用Flt3-L进行pDCs的培养,按照上述换液频率非但没有增加DCs的产生量,反而会降低pDCs的比例,这在以往的文献中未见报道。分析原因可能与培养过程中细胞自身分泌的某些具有促分化功能的细胞因子在换液过程中被稀释有关,因此在培养过程中我们延长了换液的时间,根据细胞状态择期换液或不换液。

本实验中我们利用细胞因子Flt3-Ligand在体外成功诱导出小鼠骨髓源性的浆细胞样DCs亚群,并从形态、表面标记、共刺激分子表达、TLR表达及其诱导同种异基因型淋巴细胞增殖功能等方面将培养得到的pDCs亚群与mDCs亚群进行了对比。但研究较为初步,尚未对pDCs细胞因子分泌、抗原提呈及与诱导肿瘤抗原特异性免疫应答等生物学特性进行研究,另外对各DCs亚群间功能上的相互作用还不甚明确,这些均需在今后的实验中继续予以探索和完善,以便为下一步开展DCs亚群相关的肿瘤疫苗研究奠定工作基础。

参考文献:

[1] Steinman R M, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 311: 17-58.
[2] 曲春枫, 杜君, 孙宗棠. 不同单核细胞亚群来源树突状细胞的特性及其在肿瘤免疫治疗中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(3): 211-215.
[3] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha[J]. J Exp Med, 1994, 179(4): 1109-1118.
[4] 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.
[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] Krieg A M, Yi A K, Matson S, *et al*. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation[J]. Nature, 1995, 374(6522): 546-549.
[7] Inaba K, Inaba M, Romani N, *et al*. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. J Exp Med, 1992, 176(6): 1693-1702.
[8] Sathe P, Wu L. The network of cytokines, receptors and transcription factors governing the development of dendritic cell subsets[J]. Protein Cell, 2011, 2(8): 620-630.
[9] Liu Y J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity[J]. Cell, 2001, 106(3): 259-262.
[10] Liu K J. Dendritic Cell, Toll-like receptor, and the immune system[J]. J Cancer Mol, 2006, 2(6): 213-215.
[11] Naik S H, Sathe P, Park H Y, *et al*. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and *in vivo*[J]. Nat Immunol, 2007, 8(11): 1217-1226.
[12] Liu Y J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 275-306.
[13] Lou Y, Liu C, Kim G J, *et al*. Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses[J]. J Immunol, 2007, 178(3): 1534-1541.
[14] Piccioli D, Sammicheli C, Tavarini S, *et al*. Human plasmacytoid dendritic cells are unresponsive to bacterial stimulation and require a novel type of cooperation with myeloid dendritic cells for maturation[J]. Blood, 2009, 113(18): 4232-4239.
[15] Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1183: 89-103.
[16] Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin J J, *et al*. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody[J]. J Immunol, 2003, 171(12): 6466-6477.
[17] Jegalian A G, Facchetti F, Jaffe E S. Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states[J]. Adv Anat Pathol, 2009, 16(6): 392-404.
[18] Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, *et al*. CD34$^+$ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis[J]. Blood, 1997, 90(4): 1458-1470.
[19] Naik S H, Corcoran L M, Wu L. Development of murine plasmacytoid dendritic cell subsets[J]. Immunol Cell Biol, 2005, 83(5): 563-570.
[20] Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, *et al*. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets *in vivo*[J]. J Immunol, 2000, 165(1): 566-572.
[21] Manfra D J, Chen S C, Jensen K K, *et al*. Conditional expression of murine Flt3 ligand leads to expansion of multiple dendritic cell subsets in peripheral blood and tissues of transgenic mice[J]. J Immunol, 2003, 170(6): 2843-2852.
[22] Brawand P, Fitzpatrick D R, Greenfield B W, *et al*. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs[J]. J Immunol, 2002, 169(12): 6711-6719.
[23] Fancke B, Suter M, Hochrein H, *et al*. M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin[J]. Blood, 2008, 111(1): 150-159.
[24] 夏育民, 程鸿. 小鼠骨髓lin$^-$CD117$^+$造血干细胞定向分化成浆细胞样树突状细胞的研究[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(1): 1-4.
[25] Angelov G S, Tomkowiak M, Marcais A, *et al*. Flt3 ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells *in vivo*[J]. J Immunol, 2005, 175(1): 189-195.
[26] Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily[J]. Trends Immunol, 2004, 25(7): 381-386.

(**收稿**:2013-01-28;**修回**:2013-03-04)
(编辑 吴培红)