维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2006年第15卷第3期
J Regional Anat & Operative Surg, 2006, Vol. 15, No. 3

小鼠骨髓源树突状细胞的扩增及鉴定

邢敬龙[1]，史念可[2]，马晓娟[2]，陈爱霞[2]，马跃美[2]，朱理玮[1]（天津医科大学：1. 总医院普外研究所，2：基础医学院外科手术学教研室，天津 300070）

［摘 要］ **目的** 建立小鼠骨髓源树突状细胞的体外扩增方法并研究树突状细胞的相关特征。**方法** 根据不同时期树突状细胞的粘附性质不同，设计简便的树突状细胞的体外扩增和纯化方法，并利用瑞氏染色和流式细胞仪（FACS）鉴定其生物学特征。**结果** 体外培养24 h后，可见增殖性细胞集落，3 d后集落增多明显，体外培养7 d，收集悬浮细胞即为DC。光镜显示细胞表面不规则，呈树突状突起，瑞氏染色嗜碱性。流式细胞鉴定为髓系DC，高表达MHC Ⅱ类分子及共刺激分子（CD40、CD80、CD83、CD86）。**结论** 此简便方法制备的树突状细胞具有髓系树突状细胞的生物学特性，及较高的纯度，可广泛的应用于临床及实验研究。

［关键词］树突状细胞；细胞培养；小鼠；流式细胞仪
［中图分类号］R392；Q813.11 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042(2006)03-0154-03

Generation and identification of dendritic cell from murine bone marrow

XING Jing-long, SHI Nian-ke, MA Xiao-juan, CHEN Ai-xia, MA Yue-mei, ZHU Li-wei (The Gernerl Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Objective To create a method of generate dendritic cell (DC) from murine bone marrow, and explore the correlative character of DC. **Methods** According to different adhesiveness of DC in vary period, a simple method was used to generate and purificate DC, and their biology character were identified by Wright staining and FACS. **Results** The clusters of cell were saw after 24 hours cell cultured, and increased significantly after 3 days. After 7 days, the suspension cells were collected, which were DCs. The branching structures on the Dendritic Cell were visualized under the inverted light microscope. The bias nucleus of DC was basophilic after Wright staining. These DCs belonged to myeloid lineage DC with high expression of MHC II and co-stimulatory molecules (CD40, CD83, CD80, CD86). **Conclusion** The cultured murine bone marrow DC have the same characteristics as myeloid DC and are widely used for clinical study and Experiment.

Keywords: dendritic cell; cell culture; mouse; FACS

树突状细胞（dendritic cell，DC）是机体内最重要、功能最强的抗原递呈细胞（antigen presenting cell，APC），在所有参与启动特异性免疫反应的细胞中DC扮演了中心角色[1]，而且DC是唯一能够激活初始T细胞反应的APC，因此DC是决定T细胞反应状态的重要因素[2]。DC不仅能激活和调节免疫，而且在调节T细胞的功能分化和诱导自身耐受中起着重要作用。近年来DC被广泛应用于免疫治疗[3]。但由于体内缺乏成熟DC，所以如何获得大量的成熟DC便成为核心问题。本实验是在经典树突状细胞培养方法基础上加以改进，建立一种简单、有效扩增纯化DC的实验方法，为临床及实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物：雌性C57BL/6小鼠，6～8周龄，18～22 g，购自北京军事医学科学院。主要试剂：rmGM-CSF、rmIL-4和rmTNF购自PeproTech EC公司；RPMI-1640购自Gibco公司。PE标记小鼠抗小鼠MHC Ⅱ、CD11c单克隆抗体、PE/CY5标记小鼠抗小鼠CD40、CD80、CD86单克隆抗体均购自Biolegend公司。实验仪器：细胞培养箱（FORMA），流式细胞仪（FACS Calibur）。

1.2 骨髓树突状细胞的制备

脱颈法处死小鼠，75%酒精浸泡5 min，超净工作台无菌条件下取小鼠股骨、胫骨，pH7.4的PBS液冲洗骨髓至髓腔变白，收集冲洗液。冲洗液离心（1 300 r/min）5 min，PBS洗2次。用含10% FBS、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺、2 mmol/L丙酮酸钠、50 μmol/L 2-ME、20 ng/ml rmGM-CSF和1 ng/ml rmIL-4的完全1640培养基，重悬至（1～2）×10^6/ml。台盼蓝拒染法测定细胞活力大于95%，转移入25 ml塑料培养瓶，置37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱培养24 h后，可见增殖性细胞集落悬浮于瓶底部。第3天更换培养液，轻轻晃动培养瓶底部，弃去全部上清，补入浓度相同的含细胞因子的完全1640培养基。第6天细胞换液，稍用力晃动培养瓶底部，收集上清，1 300 r/min离心5 min，加入含10% FBS、20 ng/ml rmGM-CSF、1 ng/ml rmIL-4和15 ng/ml rmTNF的等体积完全1640培养基重悬细胞，分别转移入25 ml培养瓶中。继续置于培养箱中培养24 h后收获细胞。

1.3 瑞氏染色

培养第7天收集DC，固定后瑞氏染色[4]。显微镜下观察细胞形态特征。

［作者简介］邢敬龙（1976-），男，天津市人，讲师，在读硕士，主要从事器官移植与肿瘤方面的研究。电话：(022)23542573

［收稿日期］2006-02-23 ［修回日期］2006-03-10

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 细胞表型流式细胞仪分析

收集第7天细胞，用NS悬浮为1×10^6/ml，离心后加入1 ml NS，重悬细胞，1 300 r/min离心5 min，去上清后加入NS 100 μl，加入MHC Ⅱ类分子（Ia）及共刺激分子（CD40，CD80，CD86）荧光标记抗体各1 μl。混匀后于4 ℃孵育30 min，加入NS 1 ml洗去多余抗体，1 300 r/min离心5 min，倾去上清后加入1%多聚甲醛0.6 ml，混匀使细胞呈单细胞悬液，应用流式细胞仪（FACS）检测。

2 结果

2.1 DC的体外扩增

骨髓细胞在加入rmGM-CSF、rmIL-4体外培养24 h后，培养瓶底部可见半贴壁细胞，少量的刺激细胞集落形成。体外培养3 d后，可见疏松粘附于瓶壁的增殖性细胞集落增多，并可见少量单个存在的DC，瓶底可见贴壁生长伴伪足样突起的形态不规则的巨噬细胞。此时轻轻晃动培养瓶，倾去培养基及悬浮细胞，弃去的悬浮细胞中主要包括T细胞、B细胞、粒细胞、死细胞、细胞碎片及少量单核细胞和DC。体外培养第5天，增殖性细胞集落增多，体外培养第7天，集落分散，培养液中悬浮细胞增多，高倍镜下可见表面有许多树枝状、刺状突起，收集悬浮细胞即为扩增的骨髓DC。

2.2 瑞氏染色鉴定

染色后的小鼠骨髓源DC，核嗜碱性，核圆，细胞形态不规则（图1）。



图1 小鼠骨髓源DC(→)瑞氏染色（×40）

2.3 流式细胞仪检测鉴定

FACS检测结果见图2，CD11c、CDIa显示其为髓系而非淋巴系DC，成熟DC高表达MHC Ⅱ及共刺激分子CD40、CD8O、CD86。

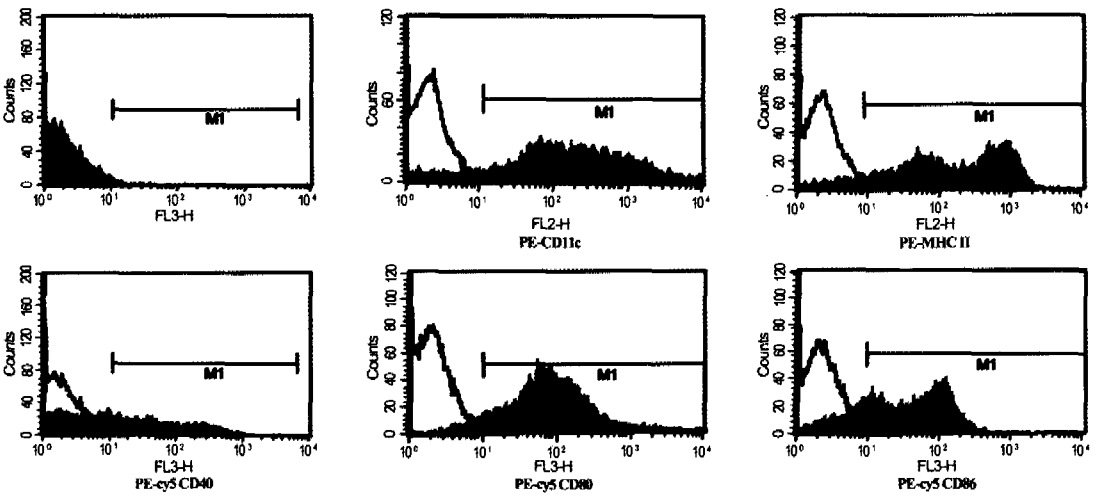


图2 FACS分析结果

3 讨论

机体的免疫系统是一个精密、准确的反应体系，免疫应答的触发、进展、终止受到精确的调控，免疫应答的主体是免疫细胞，而树突细胞作为专职APC是免疫应答的中心环节[5]。在人体及实验小鼠DC的功能和表型因其来源、迁移位置、不同的发育阶段而不同，DC的高度不均匀性和不同亚群是免疫平衡与免疫耐受的重要环节。DC根据来源分为淋巴源DC（LDC）和骨髓来源DC（MDC）；根据表面标记可分为$CD8^+$、$CD8^-$及$CD220^+$等亚群；根据刺激Th分化可分DC1、DC2、DC3[6]；根据移行部位不同可分为定位于淋巴滤泡的滤泡状细胞（FDC）、定位于淋巴组织胸腺依赖区的并指状细胞（IDC）、定位于皮肤和胃肠上皮层的朗罕氏细胞（LC）、及分布于淋巴管的隐蔽细胞（VC）。目前认为髓系DC主要介导免疫激活功能，能摄取、加工、递呈抗原并表达高水平的MHC Ⅱ类分子及共刺激分子，具有激活初始型T细胞的能力。淋巴系DC则通过杀伤与之作用的T细胞而起免疫抑制作用。而未成熟的DC及DC的前体细胞仅有一定的吞噬、胞饮抗原的能力，成熟DC高度表达MHC Ⅱ类分子及共刺激分子CD40、CD80、CD86、细胞间粘附分子（ICAM-1）、

维普资讯 http://www.cqvip.com

LFA-3/CD58,能诱导特异性细胞毒性T细胞(CTL)和T辅助细胞(Th)的增殖。小鼠髓系DC起源于骨髓的$CD34^+$,可经过体外扩增,在培养基及细胞因子的作用下,发育为成熟DC,具有体内DC的相同功能。目前DC已成为重要的科研载体与治疗靶细胞,应用于器官移植和自身免疫疾病及治疗癌症[7-8]。为了更好的研究和开发利用DC的功能,DC的制备成为首要问题。而体内成熟DC较少,体外DC的分离纯化和扩增成为必要。目前对DC体外扩增方法有培养板亲和粘附法、免疫磁珠法、$CD34^+$体外细胞因子诱生法。后者研究主要集中在粒/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素-4(IL-4)、肿瘤坏死因子-a(TNF-a)等细胞因子,不同组合及不同刺激时机对DC产量和功能均有影响。相关机制为:GM-CSF可以促进髓系细胞发育,是维持DC发育和分化的最根本的细胞因子;IL-4协同CSF增强细胞集落的生成,刺激细胞增殖,并维持DC成熟;TNF-a可以刺激DC的成熟[9]。经典的DC培养细胞因子组合是GM-CSF + IL-4[10]。本实验在经典的细胞因子组合上加以改进,刺激DC的分化和成熟,并根据DC的粘附性不同,利用物理方法建立了简便的DC体外扩增方法。DC的鉴定主要依靠细胞形态,其表面有不规则树突样突起及细胞表面的粘附分子,高度表达MHC Ⅱ类分子及共刺激分子CD40、CD80、CD86。本实验中体外扩增DC的FACS分析结果与DC的以上的生物学特性相符。本文认为该简单有效的DC扩增方法具有较好的应用前景。

[参考文献]

[1] Wu L, Dakic A. Development of dendritic cell system[J]. Cell Mol Immunol, 2004,1(2):112-118.
[2] Wan H, Dupasquier M. Dendritic cells in vivo and in vitro[J]. Cell Mol Immunol, 2005,2(1):28-35.
[3] Osada T, Nagawa H, Takahashi T, et al. Dendritic cells cultured in anti-CD40 antibody-immobilized plates elicit a highly efficient peptide-specific T-cell response[J]. J Immunother, 2002,25(2):176-184.
[4] Spector DL. 细胞实验指南[M]. 北京:科学技术出版社, 1999. 220.
[5] Steinman RM, Banchereau J. Dendritic cells and the control of immunity[J]. Nature, 1998,392(6673):245-252.
[6] Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, et al. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal[J]. Immunol Today, 1999,20(12):561-567.
[7] Lotze MT, Shurin M, Davis I, et al. Dendritic cell based therapy of cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 1997,417: 551-569.
[8] 顾春瑜,王前,郑磊,等. 小鼠骨髓耐受性树突状细胞的体外培养与鉴定[J]. 第一军医大学学报,2005,25(8):959-962.
[9] 张坤,余佩武,高朋芬,等. 胃癌-树突状细胞融合细胞疫苗制备及其形态学观察[J]. 局解手术学杂志,2005,14(5):301-303.
[10] 任颖,银平章,孔令非,等. 树突状细胞的制备及生物学特性的研究[J]. 实用诊断与治疗杂志,2004,18(3):183-185.

(编辑:余汇洋)

·个案与短篇·

浅谈接触抗肿瘤药物的防护

李晓风,芦 侠 (新疆兵团奎屯中医医院护理部,新疆 奎屯 833200)

[关键词] 化疗药物; 防护
[中图分类号] R979.1 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2006)03-0156-01

抗肿瘤药物在临床上的应用十分广泛,但是大多数化疗药物又具有致畸、致癌等副作用,不但使化疗病人出现一系列副反应,并且通过操作时的反复接触,经过皮肤、呼吸道等途径使护理人员受到伤害。目前我国对化疗药物缺乏规范管理,操作者缺少必要的防护用具以及存在对抗肿瘤药物废弃物管理不善等一系列问题。本文就化疗药物的防护措施及操作规程作一介绍。

1 接触抗肿瘤药物的防护措施

1.1 护理人员要求

抗肿瘤药物的配制一定要由接受过专门训练的护理人员在必要的防护条件下进行操作,同时尽量减少对化疗药物不必要的接触。护理人员应定期体检,检查肝肾功能、白细胞及血小板计数等,一旦出现毒副反应征象,应立即进行人员调整。护士怀孕和哺乳期应考虑暂时停止接触化疗药物。医院应加强管理,除增强护士的防护意识,进行专职培训,实行常规性防护知识考核外,还要制定相应的操作规程。

1.2 防护设施

条件较好的医院应设置专门的配制室、层流操作台,同时配备一次性口罩、帽子、防护衣裤、一次性隔离衣、聚氯乙烯手套、乳胶手套、防护镜、一次性注射器、防护垫、污物专用袋及污物箱。条件稍差时也应将抗肿瘤药物配制室设置在人流较少处,并在室内安装排风设备,保证空气流通。

[收稿日期] 2006-01-10 [修回日期] 2006-02-22

(下转159页)