基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0424-04

不同浓度粒巨噬细胞集落刺激因子在未成熟树突状细胞培养中的效果研究

李闻颖,邓 锋,王豫蓉,陈允嘉,胡 辉
(重庆医科大学附属口腔医院正畸科,重庆 400015)

【摘 要】目的:探讨不同浓度细胞因子在培养小鼠骨髓来源未成熟树突状细胞(Dendritic cells,DC)中的作用,寻找培养所需最佳细胞因子浓度。方法:分别用低、中、高剂量粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)联合或不联合白细胞介素 4(Interlenkin-4,IL-4)培养小鼠骨髓源性未成熟 DC,对其进行形态学观察和细胞表型检测。结果:培养第 7 d,低剂量组 DC 数量最少、突起细小,CD80、CD86 及主要组织相容(Major histocompatibility complex,MHC Ⅱ)类分子表达低,如联合 IL-4 培养可提高 DC 数量;中等剂量组与高剂量组 DC 较低剂量组为多,CD80、CD86 及 MHC Ⅱ类分子表达亦较前者提高,但二组无明显差异,有无联合 IL-4 培养的差异亦不显著。结论:GM-CSF 低剂量时,可诱导出纯度较高的未成熟 DC,而 GM-CSF 中等剂量和高剂量时,无论是否联合诱导 IL-4 培养,诱导未成熟 DC 的产量及纯度无明显差异。

【关键词】树突状细胞;粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;白细胞介素-4
【中国图书分类法分类号】R392;Q813 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-17

Generation of immature dendritic cells with different dose of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

LI Wen-ying, et al
(*Department of Orthodontics, the Affiliated Stomatologic Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To demonstrate the effect of cytokine with different concentration in mouse bone marrow-derived immature DCs and find the optimal cytokine dose for DC culture. *Methods*: mouse bone marrow-derived immature DCs were cultured in the presence of low, moderate and high dose of GM-CSF cytokine with or without IL-4. The morphology of cells were observed and the phenotype were detected. *Results*: On day 7, DCs in low dose group had the least quantity, small cell process and low expression of CD80, CD86 and MHC class II. The quantity of DCs increased if cultured with IL-4; DCs in moderate dose group and high dose group were more than that in low dose group and the expression of CD80, CD86 and MHC class Ⅱ were higher, but it is no difference between moderate dose group and high dose group, however cultured with or without IL-4. *Conclusion*: Higher purity of immature DCs could be get when cultured with low dose of GM-CSF. It was no difference of yield and purity of immature DCs when cultured with moderate or high dose of GM-CSF whether or not combine IL-4.

【Key words】Dendritic cells; Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Interleukin-4

树突状细胞(Dendritic cells,DC)是功能强大的抗原提呈细胞,因成熟时伸出许多树突样突起而得名[1]。DC 起源于骨髓,由骨髓进入循环系统,分布于除脑以外的全身各组织器官,大多处于未成熟状态,当摄取抗原或接受某些刺激因素后可分化成熟。未成熟 DC 因主要参与免疫耐受的诱导而在抑制移植排斥反应的研究中被广泛应用,对异体牙移植排斥反应作用的相关研究也正在进行。DC 在体内分布稀少,研究及运用主要依靠体外培养扩增[2]。培养最常用的细胞因子为 GM-CSF 和 IL-4,但对于培养未成熟状态 DC 适宜的细胞因子浓度及不同浓度细胞因子对 DC 培养成熟度的影响目前仍没有明确的研究结果[3-6]。因此,本研究将探讨不同浓度细胞因子作用下对未成熟 DC 培养的影响,寻找出培养未成熟 DC 所需的适宜细胞因子浓度,为今后的实验研究提供参考。

作者介绍:李闻颖(1982-),女,硕士,
研究方向:树突状细胞与异体牙移植排斥反应。
通讯作者:王豫蓉,女,副教授,E-mail: rywmin66@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠，6~8 周，雄性，购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂和材料

RPMI1640 培养液（含 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、2 mmol/L L- 谷胺酰胺、50 μmol/L2- 巯基乙醇）本室配制，10%胎牛血清（Gibco 公司）、rmGM-CSF、IL-4（Peprotech 公司）、流式单克隆抗小鼠 CD11c、CD80、CD86 、抗小鼠 MHC Ⅱ类分子抗体（eb 公司）、小鼠淋巴细胞分离液（TBD 公司）。

1.3 骨髓制备

Inaba 法[7]稍加改动颈椎脱臼处死 C57BL/6小鼠，2%碘酊浸泡 10 min，75%乙醇脱碘，无菌条件下取双侧股骨、胫骨剥出附着的肌肉，1 ml 注射器抽取 RPMI1640，分别从骨两端插入骨髓腔反复冲洗直至变白，清洗骨髓细胞，加入淋巴细胞分离液，吸取中间白膜层，清洗所获细胞，以含 10%胎牛血清的 RPMI1640 混悬成 2×10^6 个的细胞悬液。

1.4 未成熟 DC 的培养

按加入 GM-CSF 的剂量分为 3 组，低剂量组浓度为 50 U/ml，中等剂量组浓度为 200 U/ml，高剂量组浓度为 1 000 U/ml。再将各剂量组分为 2 个小组，其中一小组加入恒定 100 U/ml 的 IL-4。将细胞悬液接种于 6 孔培养板中，每孔 4 ml，置于 37℃，5%CO_2 培养箱中孵育。3 h 贴壁后吸走上清液，重新加入全培养液，加入预定剂量细胞因子，隔天半量换液，并补充等量细胞因子。连续培养至第 7 d，轻轻吹打培养板，收集悬浮细胞用于实验。

1.5 DC 的形态观察

在培养第 0、2、4、7 d 用光学倒置显微镜观察细胞形态及数量，并拍照。

1.6 流式细胞术分析

在培养的第 7 d 每组收集约（1~5）$\times10^5$ 个 DC，离心后悬于 100 μl PBS，加入 MHC Ⅱ类分子及共刺激分子CD11c、CD80、CD86 荧光标记抗体。4℃避光孵育 30 min，离心去上清液，加 1 ml PBS 清洗细胞后，将细胞重悬于 0.5 ml PBS 避光置于 4℃，24 h 内上机检测。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 进行表示，采用方差分析及 q 检验（Newman-Keuls 法），经 SAS6.12 统计软件计算。$P<0.05$ 认为差异有显著性。

2 结 果

2.1 形态学观察

细胞贴壁 3 h 除去未贴壁细胞，可见贴壁细胞呈圆形、胞体小，边缘清晰，均匀分布，在培养液中悬浮生长。每只小鼠约能分离出（1~2）$\times10^7$ 个单个核细胞。补充含细胞因子的完全培养基后第 2 d，各剂量组均可见贴壁细胞体积增大，低剂量组无明显的细胞聚集生长；中等剂量组表现出贴壁细胞聚集生长趋势；高剂量 GM-CSF 组聚集生长趋势较中等剂量组和低剂量组明显，有集落开始形成。培养第 4 d，各剂量组均可见贴壁的巨噬细胞及半贴壁 DC，半贴壁 DC 集落形成，低剂量 GM-CSF 组形成集落较小较少、散在分布、细胞表面稍粗糙；中等剂量 GM-CSF 组形成集落较多，集落更大，细胞表面偶可见少量细小突起；高剂量 GM-CSF 组集落细胞表面可见2~3 支短小突起，但集落大小及密度反较中等剂量组少。培养第 7 d，各剂量组细胞集落均开始减少，DC 从集落中脱落释放出来，呈半悬浮状。低剂量组 DC 可见 2~3 支细小突起（图 1，2）；中等剂量组 DC 较低剂量组密集，仍可见少许集落，细胞表面 3~6 支突起，突起较低剂量组明显（图 3，4）；高剂量组 DC 密度与中等剂量组相似，但细胞突起在 3 组之中最为明显，突起细长（图 5，6）。低剂量+IL-4 组 DC 较低剂量未加 IL-4 组多，细胞突起亦稍显明显。中等剂量和高剂量组+IL-4 与不加 IL-4 组之间未见明显差异，但+IL-4 组巨噬细胞似较未加 IL-4者似稍少。



图 1 低剂量未加 IL-4 组

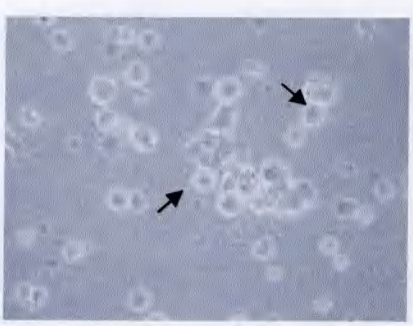


图 2 低剂量+IL-4 组

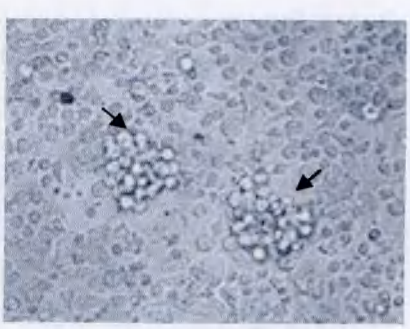


图 3 中等剂量未加 IL-4 组

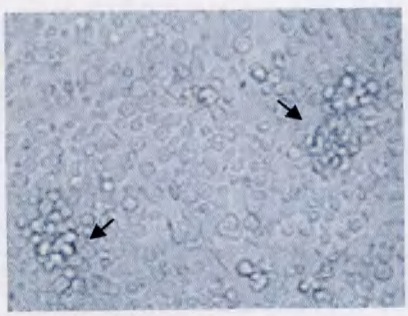


图 4　中等剂量+IL-4 组

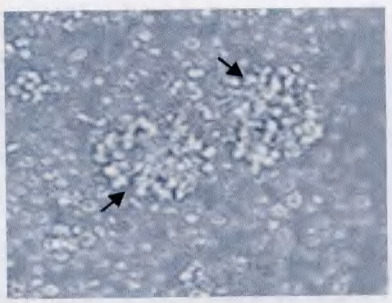


图 5　高剂量未加 IL-4 组

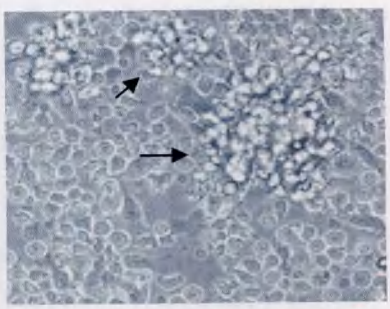


图 6　高剂量+IL-4 组

2.2　流式细胞术细胞表型分析

收集第 7 d 的细胞，经不同荧光抗体染色后流式细胞仪上机检测。以流式单克隆抗小鼠 CD11c 抗体首先圈出阳性表达的细胞，再检测 $CD11c^+$细胞的 MHC Ⅱ类分子及 CD80、CD86 表达。结果显示如下。

表 1　GM-CSF 低剂量组 DC 表型流式细胞术检测结果（$\bar{x}\pm s$）

	$CD11c^+$%	$CD80^+$%	$CD86^+$%	MHC Ⅱ类分子$^+$%
GM-CSF	36.97 ± 2.78	10.97 ± 2.63	17.54 ± 2.99	40.18 ± 3.11
GM-CSF+IL-4	48.29 ± 1.93	18.22 ± 2.35	25.16 ± 3.87	51.54 ± 2.72

表 2　GM-CSF 中等剂量组 DC 表型流式细胞术检测结果（$\bar{x}\pm s$）

	$CD11c^+$%	$CD80^+$%	$CD86^+$%	MHC Ⅱ类分子$^+$%
GM-CSF	56.32 ± 3.01	24.76 ± 4.76	32.19 ± 3.34	67.14 ± 5.04
GM-CSF+IL-4	59.03 ± 4.12	27.69 ± 3.92	33.76 ± 4.73	66.09 ± 5.33

表 3　GM-CSF 高剂量组 DC 表型流式细胞术检测结果（$\bar{x}\pm s$）

	$CD11c^+$%	$CD80^+$%	$CD86^+$%	MHC Ⅱ类分子$^+$%
GM-CSF	62.28 ± 4.95	28.40 ± 2.76	35.33 ± 5.01	70.36 ± 4.17
GM-CSF+IL-4	62.90 ± 4.67	26.15 ± 4.01	34.08 ± 4.62	64.09 ± 5.04

3　讨　论

成熟及未成熟 DC 在免疫应答中具有不同的作用，未成熟 DC 具有很强的抗原摄取加工能力，其细胞表面突起短小，细胞表面低表达 MHC Ⅱ类分子和共刺激分子 CD80、CD86 和 CD40 等，由于缺乏多种共同刺激分子，不能活化 T 细胞，导致 T 细胞的无能或低反应性，主要参与免疫耐受的诱导[8]，因此在抑制各组织器官移植排斥反应的研究中被广泛应用。但 DC 数量极为有限，无法直接从活体组织大量分离获得，对其进行的研究几乎均依赖体外扩增。

目前公认的诱导方法是由 Inaba 等人建立的[7]，随后 Lutz 等人[5]改进方法收获了更多的 DC。培养扩增未成熟 DC 中最常用的细胞因子为 GM-CSF 联合 IL-4。GM-CSF 调控 $CD34^+$细胞向粒系分化并产生 CFU-Mo-DC，是维持 DC 发育及分化的最根本细胞因子[9]。但至今为止对诱导未成熟 DC 时 GM-CSF 的最佳剂量仍然没有统一的认识，诱导剂量从 50-2 000 U/ml 不等[3,4,7]。对 IL-4 的浓度及在其中的作用亦无定论，有学者认为，IL-4 能抑制单核细胞的发展，抑制培养物中粒细胞和巨噬细胞的产生，下调 CD14 的表达，促使 $CD14^+$细胞向 DC 方向分化，并维持 DC 处于未成熟状态[9]，但也有学者认为，GM-CSF 联合 IL-4 比单用 GM-CSF 会导致更多的早期 DC 成熟[10]。

实验中单纯培养未成熟 DC 较为困难，因未成熟 DC 在培养过程中会自分化成熟，通常获得的 DC 为成熟与未成熟的混合物，且未成熟 DC 所占比例因所用诱导细胞因子浓度不同而变异很大，如需获得纯度较高的未成熟 DC 则需加入抑制成熟的细胞因子或选用分离提纯方法，操作繁琐且费用昂贵。因

此，掌握培养未成熟 DC 适宜的细胞因子浓度就显得尤为重要。

本实验通过不同浓度 GM-CSF 联合或不联合 IL-4 培养出未成熟 DC，旨在摸索培养未成熟 DC 所需的基本细胞因子 GM-CSF 的最佳浓度，以及不同 GM-CSF 浓度下，联合与不联合 IL-4 的区别。而 IL-4 用于联合培养的浓度及其对培养未成熟 DC 的影响没有定论，因此，为排除 IL-4 浓度差异对诱导未成熟 DC 的影响，本实验设计中将实验条件标准化，参考以往的研究[11]，设定 IL-4 浓度固定为 100 U/ml。

我们的形态学结果表明，随着 GM-CSF 浓度的提高，DC 的集落生长趋势及细胞突起均更加明显，未+IL-4 组巨噬细胞较+IL-4 组稍多，但差异不甚明显。

CD11c 即 N418，小鼠 DC 高表达 N418。本研究发现，CD11c 阳性率表达率在 GM-CSF 低浓度时最低，随着 GM-CSF 浓度提高，CD11c 阳性表达率随之提高（$P<0.01$），但中等剂量组和高剂量组之间 CD11c 阳性表达率差异不显著，无统计学意义（$P>0.05$）。低浓度 GM-CSF 如联合同浓度 IL-4 培养时，CD11c 阳性率有提高（$P<0.01$），而中等剂量组和高剂量组联合 IL-4 培养，虽显示阳性率可少量提高，但提高幅度较低剂量 GM-CSF 诱导时明显减少，组间差异无统计学意义（$P>0.05$）。CD80、CD86 和 MHC Ⅱ类分子是 DC 成熟程度的指标，未成熟 DC 低表达 CD80、CD86 及 MHC Ⅱ类分子。通过表一、二、三可以看出，本实验中培养至第 7 天的 DC 均主要为未成熟 DC，但不同组别其未成熟 DC 纯度与所用于诱导的细胞因子浓度有关。低剂量联合 IL-4 组与不联合 IL-4 组 CD80、CD86 及 MHC Ⅱ类分子表达率均较其余组低（$P<0.05$），未成熟 DC 纯度最高，其中联合 IL-4 者 CD80、CD86 及 MHC Ⅱ类分子表达率较不加 IL-4 者表达高（$P<0.05$），表明联合 IL-4培养有一定程度促成熟作用。中等剂量组和高剂量组未成熟 DC 纯度降低，CD80、CD86 及 MHC Ⅱ类分子表达无明显差异（$P>0.05$），加入 IL-4 者 CD80、CD86 及 MHC Ⅱ类分子表达较不加者略高，但差异亦无统计学意义（$P>0.05$）。

因此，可以得出结论，DC 细胞产量与 GM-CSF 剂量有关，随着 GM-CSF 剂量的降低，总 DC 产量减少，但当 GM-CSF 增加至一定浓度后，DC 产量提高不显著。降低 GM-CSF 剂量会导致成熟 DC 显著降低，因此未成熟 DC 相对增多。GM-CSF 低剂量组加入 IL-4 能补偿 DC 产量的降低，但有一定程度促成熟作用。GM-CSF 剂量提高，DC 产量随之增加，但未成熟 DC 相对减少，联合 IL-4 培养所得 DC 与未联合 IL-4 者无明显差异。

综上所述，本文认为，GM-CSF 低剂量时，可诱导出纯度较高的未成熟 DC，IL-4 提高 DC 产量仅在 GM-CSF 低剂量时才明显，其在促 DC 成熟中的作用，也仅在低剂量 GM-CSF 培养时才明显。而 GM-CSF 中等剂量和高剂量时，无论是否联合诱导 IL-4 培养，诱导未成熟 DC 的产量及纯度无明显差异。

参 考 文 献

[1] Steinman R M, Cohn Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution[J]. Exp Med, 1973, 137(5): 1142-1162.

[2] Culter C W, Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface [J]. J Dent Res, 2006, 85(8): 678-689.

[3] Ureta G, F.Sorio O, Morales J. Generation of Dendritic Cells With Regulatory Properties[J]. Transplantation Proceedings, 2007, 39(3): 633-637.

[4] Lutz M B, Suri R M, Niimi M. Immature dendritic cells genertated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo [J]. Eur.J.Immunol, 2000, 30(7): 1813-1822.

[5] Lutz M B.Kukutsch N, Alexandra L J. Ogilvie. An advanced culture method of generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow[J]. Journal of Immunological Methods, 1999, 233 (1): 77-92.

[6] Ariane V, Schouten H C, Gerard M J. Murine dendritic cells that are resistant to maturation are unable to induce tolerance to allogeneic stem cells[J]. Transplant Immunology, 2006, 16(1): 8-13.

[7] Inaba K, In aba 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] Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4 (+)T cells with regulatory properties by repeties by stimulation with allogeneic immature human dendritic cells [J]. J.Exp.Med, 2000, 192(9): 1213-1222.

[9] 赵 勇，移植免疫耐受[M].第 1 版，中国医药科技出版社，2002.85-104.

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

[11] Menges M, Baumeister T, Rossner S, et al. IL-4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered ndocytosis capacity[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2005, 77(4): 535-543.

（责任编辑：关蕴良）