维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0156-03

二甲基亚砜联合羟乙基淀粉的非程控降温法低温冻存脐血来源不成熟树突状细胞的实验研究

王逸涛,彭毅志,王 强,王永权,游 波

(第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

【摘 要】目的:联合使用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)和羟乙基淀粉(hydroxyethyl starch,HES)作为冷冻保护剂并使用非程控降温冷冻技术,研究脐血来源的不成熟树突状细胞低温冻存前后所表现的生物特性,为不成熟树突状细胞的临床应用提供保存方法。方法:GM-CSF(granulocyte-macrophage clonoy-stimulating factor)和 IL-4(interleukin-4)体外诱导单个核细胞产生不成熟树突状细胞,5%DMSO+6%HES 作为保护剂,-80 ℃冰箱降温,-196 ℃保存,37~40 ℃水浴复温,检测方法:台盼蓝拒染回收率,观察细胞形态,鉴定免疫表型,进行混合淋巴细胞反应,观察其诱导未致敏 T 淋巴细胞增殖情况。结果:冻存不成熟树突状细胞的台盼蓝拒染回收率为 88.6 %,其细胞形态,免疫表型及刺激未致敏 T 淋巴细胞的能力与新鲜 DC 相比无显著性差异。结论:冻存不成熟树突状细胞具有 DC 的显著特征,其细胞免疫表型和细胞功能实验上仍然保持了不成熟特征,联合使用二甲基亚砜和羟乙基淀粉作为冷冻保护剂对不成熟树突状细胞有良好的保护作用。

【关键词】脐血;树突状细胞;低温保存;二甲基亚砜;羟乙基淀粉。

【中国图书分类法分类号】Q813.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-21

Non-programmed processing cryopreservation of immature dendritic cells derived from cord blood with dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch

WANG Yitao, et al

(*Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combine Injury, The Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: This experiment investigated the biological properties of immature and cryopreserved DCs to develope a preservative method of immature dendritic cells for clinical use. *Method*: Immature dendritic cells were generated from human cord blood (CB) monocyte cμltured with rhGM-CSF and rhIL-4 and were cryopreservated with 5% DMSO and 6% HES in -80℃ refrigerator, then into -196℃ liquid nitrogen. We revived the cells into 37~40 ℃ water bath after a month. Recovery rate was evaluated by TBBR. imDCs' morphological changes of DCs were analyzed by expression of surface antigens and allgenetic mixed lymphocyte reaction was performed to assess allo-stimμlating abilities of imDCs. *Result*: TBBR was 88.6%. The freeze-thawed immature dendritic cells' immunophenotype and function did not changed comparing with their fresh counterparts (P>0.05). *Conclusion*: Cryopreserved DCs exhibited typical characteristics of DCs, immature in cell phenotype and cell functions, suggesting that the non-programmed process using the combined two protectants is feasible.

【Key word】Cord Blood; Dendritic Cell; Cryopreservation; Dimethyl Sulfoxide; Hydroxythyl Starch

在同种器官移植中利用不成熟树突状细胞(immature dendritic cell, imDC)诱导抗原特异性免疫耐受并维持其耐受状态正日益成为研究热点。不成熟 DC 的寿命较短,其易成熟的特性也极大限制了细胞在临床的应用。将不成熟 DC 进行长期低温冻存是最佳的解决方法。本研究采用 5%二甲基亚砜(DMSO)和 6%羟乙基淀粉(HES)作为保护剂,-80℃冰箱降温,-196 ℃保存,37~40 ℃水浴复温,观察低温冻存前后不成熟 DC 的生物学特性,取得了良好的效果。

1 材料与方法

作者介绍:王逸涛(1974-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:烧伤创面愈合机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(3027134)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料来源

脐血样本来自第三军医大学附属西南医院产科正常足月剖宫产产妇，外周血样本来自健康献血员，肝素抗凝浓度为 20～25U/ml。

1.2 实验方法

1.2.1 脐血单个核细胞的增殖培养 脐血 40～50 ml，PBS 等倍稀释，用淋巴细胞分离液（1.077，天津 TBD 公司）密度梯度离心法分离脐血单个核细胞（cord blood mononuclear cell，CBMC）。PBS 离心洗涤 4 次后，用含 10%标准胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）的 RPMI-1640 培养液制备 CBMC 悬液。将 CBMC 悬液移入组织培养瓶，6ml/ 瓶，37℃，5% CO_2 组织培养箱内培养 2h，吸去非贴壁细胞，重新加入含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液 5ml，添加细胞因子 rhGM-CSF（Santa cruz）100 ng/ml 和 rh IL-4（Santa cruz）100ng/ml，置于 37℃，5% CO_2 组织培养箱内继续培养。其间每隔 2 天半量换液并按比例补充新鲜培养液和细胞因子。第 7 天收获 imDC。

1.2.2 不成熟树突状细胞的冻存和复苏 取 DMSO（SIGMA）100μl，HES（SIGMA）120μl 加入 4℃预冷的 RPMI-1640 至 1 ml 作为保护剂。收获的 imDC 重悬于 1ml 含 10% FBS 的 RPMI-1640，置于 4℃冰箱 1 h，逐滴缓慢加入保护剂，总体积为 2ml，DMSO 终浓度为 5%，HES 终浓度为 6%，转入冻存管，放入 -80℃冰箱 12 h 后投入 -196℃液氮液相保存。30～35 天后取出冻存管，迅速放入 37～40℃水浴复温，待细胞融化后立即吸出细胞悬液，用 5 倍的含 20% FBS 的 RPMI-1640 稀释，1500r/min 离心 5min，重复洗涤 3 次，细胞重悬于含 10%FBS 的 RPMI-1640 待检。

1.2.3 细胞台盼蓝拒染回收率（trypan blue recovery rate，TBRR）检测

TBRR（%）= 冻后细胞数 / 冻前细胞数 × 台盼蓝拒染率。

1.2.4 细胞的形态学观察 新鲜与冻存后的细胞悬液在光学相差显微镜下观察和照相。调整细胞密度为 5×10^5/ml，吸取 0.5 ml 置于清洁盖玻片上，自然干燥后 2.5%戊二醛固定，送第三军医大学中心实验室，扫描电镜观察摄片。

1.2.5 细胞免疫表型的检测 细胞每 2×10^5 重悬于 1ml 的 PBS，离心洗涤 2 次（4000r/min，5min）后重悬于 0.2ml PBS，加入异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记的鼠抗人 CD1a（Biolegend）20μl，CD80（Diaclone）10μl，CD83（Diaclone）10μl，CD86（Diaclone）10μl，CD14（Diaclone）20μl，HLA-DR（Diaclone）10μl 及相应同型对照，4℃孵育 30min 后，PBS 离心洗涤 2 次（4000r/min，5min），细胞重悬于 0.5mlPBS，流式细胞仪检测（美国 BD 公司 FACS Calibur）。

1.2.6 混合淋巴细胞反应（MLR） DC 重悬于 1ml RPMI-1640，加入丝裂霉素 C，37℃孵育 40min，RPMI-1640 洗涤 3 次后调整细胞密度为 1×10^5/ml。尼龙毛法收集外周血单个核细胞中的 T 细胞，调整密度为 1×10^6/ml。分为对照组、新鲜不成熟 DC 组和冻存不成熟 DC 组 3 组，每组 5 个复孔。对照组每孔加入 T 淋巴细胞 2×10^5 个，新鲜不成熟 DC 组每孔加入新鲜 DC 和 T 淋巴细胞各 1×10^5 个，冻存不成熟 DC 组每孔加入冻存 DC 和 T 淋巴细胞各 1×10^5 个，终体积均为 200μl。培养板置于 37℃，5% CO_2 组织培养箱孵育 72 h，结束前 18h，每孔加入 0.5μl Cr3H-TdR。液闪计数仪（美国 LS6000TA）检测放射形核素每分钟闪烁计数（CPM）值。刺激指数（Stimulating Index）SI = 实验组 cpm 值 / 对照组 cpm 值。SI 的标准值为 2.00，SI < 2.00 表示淋巴细胞无明显增殖，SI > 2.00 表示淋巴细胞增殖明显。

1.2.7 数据的统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t test，采用 spss11.0 统计学软件分析。

2 结 果

2.1 不成熟 DC 的形态学观察

脐血单个核细胞体外在 GM-CSF 和 IL-4 诱导下可向 DC 分化，光学相差显微镜显示细胞形态不规则，细胞表面呈树枝样突起，扫描电镜显示细胞表面不规则，有树枝样突起和不规则皱褶。冻存不



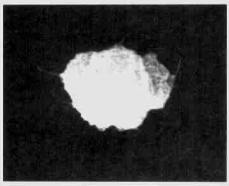
A 新鲜不成熟 DC



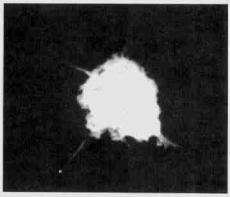
B 冻存不成熟 DC

图 1 荧光显微镜下的未成熟 DC 形态（FITC 标记）×400

维普资讯 http://www.cqvip.com



A 新鲜不成熟 DC



B 冻存不成熟 DC

图 2 扫描电镜下的未成熟 DC 形态×4000

成熟 DC 复苏后台盼蓝拒染回收率 TBRR 为(89.2±3.2)%,冻存不成熟 DC 在形态上与新鲜不成熟 DC 无明显差异。

2.2 不成熟 DC 的免疫表型检测

流式细胞仪检测细胞表型显示:脐血单个核细胞体外经 GM-CSF 和 IL-4 诱导生成的不成熟 DC 表面 CD1a 阳性率为(62.49±8.53)%;细胞表面共刺激分子 CD80 和 CD86 分别为(12.46±7.02)%和(11.51±5.30)%;反映 DC 成熟的表面标志 CD83 阳性率为 (4.60±1.98)%;CD14 阳性率为(18.28±6.77)%;HLA-DR 阳性率为 (67.4±4.50)%。符合未成熟 DC 的表型特征。冻存不成熟 DC 的 CD80 和 CD86 分别为 (10.49±9.81)%和(17.29±8.76)%,CD83 为(6.53±6.47)%。从以上流式细胞仪检查结果可以看出,冻存前后不成熟 DC 的免疫表型并未发生显著改变,冻存后 DC 仍保持其不成熟状态($P>0.05$)。

2.3 同种混合淋巴细胞反应

本次实验中新鲜不成熟 DC 和冻存不成熟 DC 均不能有效刺激同种未致敏 T 淋巴细胞增殖,其刺激指数(SI)均小于 2。新鲜不成熟 DC 组的 CMP 值(463.25±104.32)与冻存不成熟 DC (278.76±63.45)无显著性差异($P>0.05$)。不成熟 DC 不能刺激同种未致敏 T 淋巴细胞增殖,而且细胞经低温冻存后仍能够保持这一重要的免疫学特性。

3 讨 论

大面积深度烧伤救治工作中,及时有效地覆盖创面是关键所在。但在自体皮源有限的情况下,异体皮的替代作用往往受到排斥反应的制约。免疫抑制剂虽然可以延长其存活时间,但对大面积深度烧伤患者而言,同时也增加了感染的危险性。因此诱导受体对供体皮肤产生特异性免疫耐受而保持受体正常的免疫状态至关重要。同种异体皮肤移植后的排斥反应为 T 细胞介导的细胞性排斥反应。不成熟树突状细胞(immature dendritic cell, imDC)由于其细胞表面低表达 MHC-Ⅱ类分子和共刺激分子(CD40,CD80,CD86),非但不能激活 T 细胞,反而能诱导抗原特异性 T 细胞无能或凋亡,从而诱导了对该抗原的耐受[1],在器官移植的生物治疗中扮演重要角色。国内学者利用不成熟 DC 术前预处理受体,成功延长了大鼠异体皮存活时间[2]。临床上使用的异体皮都来自死后捐赠者,如何在术前提供足够数量的供者不成熟 DC 成为治疗的关键。

通过单个核细胞体外诱导扩增可以获得足够数量的不成熟 DC[3-5]。由于从分离单个核细胞到收获不成熟 DC 需 7 天左右,其体内寿命 3 天~4w,而在体外培养时,有 GM-CSF 存在情况下最长可至 3 月。而如何长期有效的保存所获得的细胞,使它能够有效地发挥诱导耐受作用,进而在临床推广应用成为 DC 研究和临床应用急待解决的难题。

低温冻存是保存细胞的最佳方法。将细胞储存在液氮中,温度达 -196℃,理论上储存时间是无限的[6]。在细胞冻存的降温过程中,DMSO 作为细胞保护剂的作用得到公认[7,8]。由于 DMSO 具有细胞毒作用,可与细胞的蛋白质结合,损伤细胞。如何配制一种降低 DMSO 浓度的保护剂成为保存不成熟 DC 技术的关键。在本次实验中与 DMSO 联合应用的 HES,属于一种非穿透性冷冻保护剂,在冷冻过程中能够减少细胞内冰晶的形成,复温时还可以减轻由于细胞内外渗透压改变所致的细胞肿胀。HES 与穿透性保护剂 DMSO 合用,发挥了协同作用,同时还降低了 DMSO 的浓度,从而减少 DMSO 的细胞毒作用。

本研究利用脐血来源的单个核细胞培育出的不成熟 DC,经过低温冻存后能够获得满意的回收率,同时具有不成熟 DC 的典型形 (下转第 174 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

北京:人民军医出版社,1997;26-28.

[3] Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion[J]. Hepatology, 1999;29(3):976-984.

[4] Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group [J]. Hepatology, 2001;33(1): 218-223.

[5] Lok AS, Akarca U, Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal[J]. Proc Natl Sci USA, 1994; 91:4077-4081.

[6] Li JS, Tong SP, Wen YM, et al. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region[J]. J Virol, 1993;67: 5402-5410.

[7] Friedt M, Gerner P, Lausch E, et al. Mutations in the basic core promotor and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 1999;29(4):1252-1258.

[8] Luo K. Hot spot mutations of hepatitis B virus pre-C/C gene and its promotor in Chinese patients and the clinical implications [J]. Chin Med J (Engl), 1999;112(2): 182-184.

[9] Nagasaka A, Hige S, Marutani M, et al. Prevalence of mutations in core promoter/precore region in Japanese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Dig Dis Sci, 1998;43(11): 2473-2478.

[10] Aritomi T, Yatsuhashi H, Fujino T, et al. Association of mutations in the core promoter and precore region of hepatitis virus with fulminant and severe acute hepatitis in Japan[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1998;13(11): 1125-1132.

[11] Kurosaki M, Enomoto N, Asahina Y, et al. Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B [J]. J Med Virol, 1996; 49(2):115-123.

[12] Kao JH, Chen PJ, Lai MY,et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis [J]. Gastroenterology, 2000;118(3):554-559.

[13] Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor[J]. J Virol, 2001;75(18): 8400-8406.

[14] Ritter SE, Whitten TM, Quets AT, et al. An internal domain of hepatitis B X antigen is necessary for transactivating activity[J]. Virology, 1991;182:841-845.

(上接第 158 页) 态,低水平表达共刺激分子 CD80 和 CD86,体外激发未致敏 T 细胞增殖的能力较弱。结果表明二甲基亚砜联合羟乙基淀粉的非程控降温的保存方法能够长期有效的保存不成熟 DC,为不成熟 DC 的临床应用打下了基础。

Corresponding author:Peng Yizhi E-mail: yizhipen@mail.tmmu.com.cn, Tel:023-68754175

参 考 文 献

[1] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells [J]. Annu Rev Immunol, 2003;21:685-711.

[2] 刘 芳,魏 力.供者未成熟树突状细胞对大鼠皮肤移植免疫耐受的诱导 [J]. 咸宁医学院学报, 2002;2:110-112.

[3] Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, et al. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation [J]. J-Immunol-Methods, 2004;288 (1-2): 123-34.

[4] 王 强,彭毅志.小鼠骨髓未成熟树突状细胞体外扩增及鉴定 [J]. 中华烧伤杂志, 2003;19(6):332-335.

[5] 姜 艳,彭毅志,袁志强.人外周血未成熟树突状细胞的体外扩增和鉴定及抗成熟特性的研究[J].中国医师杂志,2005;3:289-291.

[6] 黄友章,杨平地,沈建良,等.低温冻存脐血树突状细胞的生物特性研究[J].海军总医院学报,2002;15(4):202-206.

[7] Jorg Westerman, Ida J. Korner, Joachom Kopp, et al. Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination: influence on phenotype and functional properties[J]. Cancer Immunol Immunother, 2003;52:194-198.

[8] Justin John, Angus Dalgleish, Alan Melcher, et al. Cryopreserved dendritic cells for intratumoral immunotherapy do not require re-culture prior to human vaccination [J]. Journal of Immunological Methods, 2005;299:37-46.