维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)01-0090-02

健康人外周血树突状细胞的体外培养扩增及其 CD1a 等表面分子的表达分析

李用国,陈 敏,梁增伟,许红梅,罗云萍,任 红

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【中国图书分类法分类号】R392.1 【文献标识码】B 【收稿日期】2002-06-11

树突状细胞(DC)是一种功能最强的抗原提呈细胞,其最显著的特征是能够刺激初始型 T 细胞增殖,而 B 细胞和巨噬细胞只能刺激记忆型或被活化的 T 细胞,因此 DC 在免疫应答诱导中起重要作用。然而,由于 DC 在外周血中含量极低,因此限制了 DC 的研究和应用,所以,在体外分离扩增 DC 对 DC 生物学特性的研究和临床应用具有重要意义。在以往的研究中,已成功地完成了健康人 DC 的培养扩增和鉴定[1],本研究在此基础之上,进一步对 DC 在诱导分化过程中特异性分子表达的变化进行分析,以找出最佳收集细胞的时间,为 DC 的进一步研究提供必要条件。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组人白细胞介素 4(rhIL-4)、CD1a-异硫氰酸荧光素(FITC)、CD40-FITC、CD86-FITC、HLA-DR-FITC、HLA-ABC-FITC、鼠抗人 IgG1 购自 PharMingen 公司。

Hyclone 小牛血清购于 Hyclone 公司。

1640 培养液购于 GIBCO。

淋巴细胞分离液(Ficoll)购于中国医学科学院基础医学研究所血液病研究所。

正常人外周血源于研究者自身。

1.2 正常人外周血 DC 体外培养

参照文献[1]。取人抗凝外周血 20ml,常规分离外周血单个核细胞(PBMC)。用 RPMI 1640 完全培养基重悬细胞,并以 2×10^6/ml 浓度加到 24 孔培养板中,每孔 1ml,放置于 37℃,5%CO_2 孵箱内培养 3h,吸弃细胞悬液,用 pH 7.0 的 RPMI 1640 轻洗 3 次,洗去非粘附细胞,获得粘附细胞,按 rhGM-CSF 1000U/mL,rhIL-4 500U/mL 终浓度加入细胞因子,隔日加细胞因子(首次浓度的 1/2)和培养基(吸弃 30%,加 50%),收集细胞,以待作进一步的分析。

1.3 DC 特异性表面分子的表达分析

收集第 8 天的 DC 细胞,用 PBS 洗 2 次,加入 CD40-FITC、CD86-FITC、HLA-DR-FITC、HLA-ABC-FITC,4℃避光,30min,再用预冷的 PBS 洗两次,用 FACS 分析。

1.4 DC 表面 CD1a 的 FACS 动态分析

收集不同培养时期的 DC,如前法用 FITC-CD1a 单抗标记后,FACS 进行分析,动态观察其表达情况。

2 结 果

2.1 DC 体外培养过程中形态学观察

PBMC 贴壁 3h 后获得黏附细胞,加入细胞因子 24h 后可见到贴壁细胞有所减少,而悬浮细胞增多,并呈细胞积聚现象,以后悬浮细胞逐渐增多并具有树突样突起。培养至 7 天以后,可见到大量具有树突样突起的悬浮细胞,并随着培养时间的延长,细胞逐渐增大,突起更加明显,而在培养 1 周以后细胞状态逐渐变差。

2.2 DC 表型检测

收集诱导培养第 8 天的细胞,经 FACS 分析,用 GM-CSF 和 IL-4 扩增到的树突状细胞表达高水平的 CD1a、CD40、CD86,HLA-DR 和 HLA-ABC 分子,其表达率分别为 65%、98%、73%,78% 和 99%。

2.3 DC 表面特异性表面分子 CD1a 表达的动态观察

分别在培养的第 3、5、8、9、10、13 天收集细胞,用流式细胞仪检测 CD1a 表达情况。结果,其分子

作者介绍:李用国(1966-),男,主治医师,博士后,
主要研究方向:基因修饰的 DC 治疗慢性乙肝。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表达分别为 32.8%、50%、65%、72.4%、49% 和 51%,即在培养的前 9 天内,随着培养时间的延长,CD1a 表达逐渐增高,9 天后呈下降趋势(图 1)。

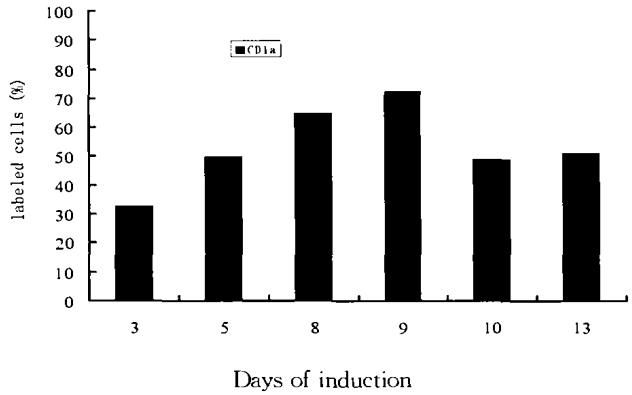


图 1 GM-CSF 和 IL-4 诱导扩增的人外周血树突状细胞

3 讨 论

树突状细胞是功能最强的抗原提呈细胞,由于在血液中含量极低,因此限制了 DC 的研究和应用。但自 90 年代,DC 体外扩增的方法成功建立以后,才使 DC 研究进入快速发展的阶段,目前已从大鼠、小鼠骨髓、人外周血和脐血中扩增出大量 DC[2,3],并广泛地应用于抗病毒、抗肿瘤免疫研究。目前,已成功地从外周血单核细胞中培养扩增出 DC[1],并证明其对乙肝表面抗原具有显著的提呈作用[4]。然而,在反复培养 DC 过程中发现,培养 7 天后,DC 表面的树突状突起虽然更加明显,但细胞状态逐渐变差。DC 的成熟程度、数量和细胞状态直接影响 DC 疫苗的临床治疗效果,因此,选择收集细胞的最佳时期至关重要。

该研究就是基于临床治疗的需要,系统观察细胞分化过程中,细胞的生长状态,以及在不同培养时期特异性表面标记 CD1a 的表达情况。结果,在培养的第3、5、8、9、10、13 天,CD1a 表达分别为 32.8%、50%、65%、72.4%、49% 和 51%,即在培养的前 9 天内,随着培养时间的延长,CD1a 表达逐渐增高,9 天后呈下降趋势(图 1),其细胞状态也逐渐变差,一直到培养的第 22 天,已发现大部分细胞已经死亡。

从该实验结果可以得出初步的结论,选择培养第 7 天或第 8 天的 DC 可能更利于基础研究和临床治疗的需要。

参 考 文 献

[1] 李用国,罗云萍,梁增伟,等. 人外周血树突状细胞的体外培养扩增[J]. 重庆医科大学学报,2001;26(1):1-3.

[2] 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.

[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 α[J]. J Exp Med, 1994;179(4):1109-1118.

[4] 李用国,罗云萍,梁增伟,等. 慢性乙型肝炎病人外周血树突状细胞对 HBsAg 的提呈作用[J]. 中华肝脏病杂志,2000;8(6):330-331.