维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0001-03

人外周血树突状细胞的体外培养扩增

李用国，罗云萍，梁增伟，任 红

（重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆 400010）

【摘 要】目的：在体外从人外周血中培养扩增树突状细胞。方法：从正常人外周血分离PBMC，经两次孵育粘附，弃去悬浮细胞后加细胞因子（GM-CSF，IL-4）和培养液进行培养，并对培养过程进行观察鉴定。结果：培养1周后即可培养出典型的树突状细胞，经FITC-CD1a单抗标记后用流式细胞仪检测DC的CD1a表达率为65%，并能刺激同种淋巴细胞增殖反应。结论：利用GM-CSF和IL-4可以从人外周血中扩增出大量DC，可为后续研究做准备。

【关键词】树突状细胞；单核细胞；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】R392.12 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-07-07

Proliferation of human dendritic cells from monocyte in vitro

LI Yong-guo, et al

（Viral Hepatitis Institute, Chongqing Medical University, 400010）

【Abstract】 *Objective*: To proliferate dendritic cells from human peripheral blood. *Methods*: PBMC isolated from healthy human peripheral blood were incubated for 3 hours twice at 37℃ in humidified 5%CO_2. After 3 hours, nonadherent cells were gently removed, then the adherent cells were cultured at 37℃ in humidified 5%CO_2 in air,in medium with GM-CSF and IL-4 for more than 7 days. Finally, DCs were collected and identified in morphology, function and specific symbol of cell surface. *Results*: After 7 days, typical dendritic cells appeared and gradually became larger and more typical.By using flow cytometric cell surface marker analysis ,the level of expressing CD1a was 65%. DCs could also induce proliferation of allogeneic lymphocytes. *Conclusion*: A large amount of DCs could be induced from peripheral blood monocyte by adding GM-CSF and IL-4.

【Key words】Dendritic cells; Monocyte; hGM-CSF; hIL-4

树突状细胞（dendritic cell, 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。目前研究证实外周血中的单核细胞是巨噬细胞和DC的前体细胞，因此本研究从正常人外周血中获取贴壁细胞，然后在细胞因子的作用下培养出成熟的树突状细胞，并对其形态、表面标记及功能进行鉴定，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）异硫氰酸荧光素（FITC）标记的鼠抗人CD1a、CD40、IgG1单抗 购自PharMingen公司。胎牛血清购于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血液病研究所。

1.2 正常人外周血DC体外培养

取新鲜的正常人抗凝外周血20ml，用PBS以1:1的比例稀释后沿离心管壁缓慢加到淋巴细胞分离液上，离心后（1000g/min，20min）取白膜层细胞，用PBS洗涤2次，用pH 7.0的RPMI 1640洗1次，最后用RPMI 1640完全培养基重悬细胞，并以2×10^6/ml浓度加到6孔培养板中，每孔3ml，放置37℃，5% CO_2孵箱内孵育3h，吸弃细胞悬液，用pH 7.0的RPMI 1640轻洗3次，洗去非黏附细胞，获得黏附细胞，按rhGM-CSF1000U/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%），培养7～20天收集细胞用于FACS分析、形态学鉴定和MLR反应。

1.3 DC的FACS分析

收集DC并用PBS洗2次，稀释成5×10^5/ml，加入FITC标记的单抗15μl，混匀后放入4℃冰箱中孵育30min，再用PBS洗2次，然后通过流式细胞仪进行检测。

基金资助：国家自然科学基金资助（39970673）

作者介绍：李用国（1966- ），男，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4　混合淋巴细胞培养

取正常人抗凝外周血，常规分离外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC），在37℃，5% CO_2孵箱内孵育3h，取悬浮细胞，用含浓度为200U/mL白细胞介素2（inteerleukine-2，IL-2）的1640完全培养基培养7天，作为同种异体淋巴细胞。按DC与效应细胞1:5，1:10，1:20，1:40的比例加入96孔板，每组设3个复孔，终体积为200μl，在37℃，5% CO_2孵箱内培养5天，于收获前12h加入 ^{3}H-TdR，1μCi/孔。收集细胞，用液闪仪检测cpm值。

1.5　电镜标本制作

透射电镜：取培养的细胞标本，用磷酸缓冲液洗涤两次后，用3%戊二醛固定，然后用酒精逐级脱水。进一步的浸透、包埋和超薄切片的制作由电镜室完成。

扫描电镜：取培养的细胞，用生理盐水洗涤2次，用3%戊二醛及1%四氧化锇（OsO_4）分前后两次固定，再用不同浓度酒精逐级脱水，以后的置换、干燥镀膜等制备程序由电镜室完成。

2　结　果

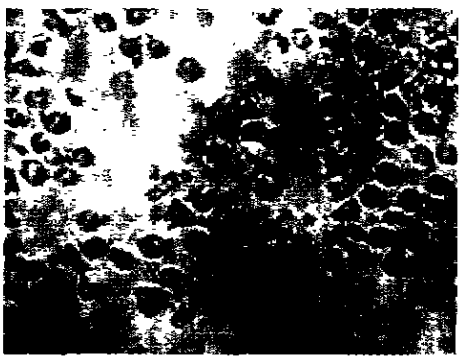


图1　培养七天光镜下的DC形态×400



图2　培养七天扫描电镜下的形态×2400

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（见图1～2），并随着培养时间的延长，细胞变大，突起更加明显。同时观察到，从第三天起出现贴壁拉长的“巨噬细胞”，

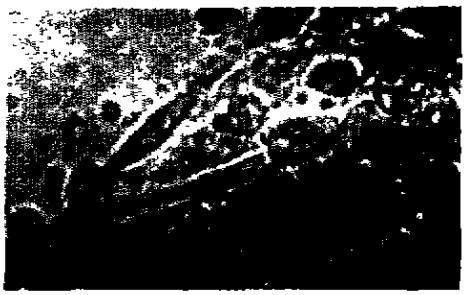


图3　培养10天光镜下的巨噬细胞形态×400



图4　巨噬细胞的超微结构×10000



图5　DC细胞的超微结构×12000

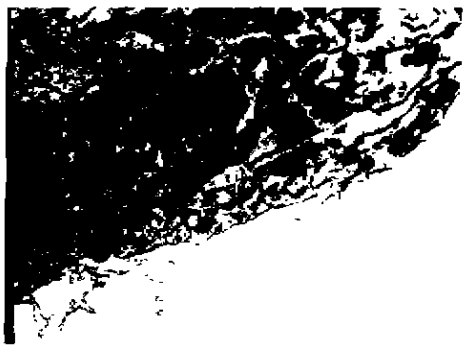


图6　粒细胞的超微结构×15000

同样也随培养时间延长，细胞逐渐变大(见图3)。

2.2　通过透射电镜初步鉴定黏附细胞

对培养12天的贴壁细胞经透射电镜鉴定（由本校电镜室鉴定），结果，在贴壁细胞中至少有三种细胞：巨噬细胞、树突状细胞和粒细胞。图4～6显示三种不同细胞的超微结构。

2.3　同种混合淋巴细胞培养

以DC为刺激细胞，按不同比例与同种淋巴细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

混合，可产生很强的增殖效应（图7）。

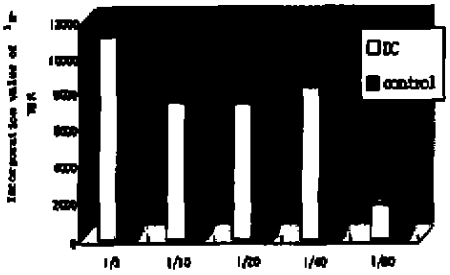


图7 DC刺激同种淋巴细胞增殖能力

2.4 DC表型检测

培养7天的外周血DC和培养22天的贴壁细胞，被鼠抗人的CD1a单抗标记后，经流式细胞仪检测。结果，$CD1a^+$的表达分别为65%和10%。

3 讨 论

3.1 体外由单核细胞向DC分化

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、小鼠骨髓及人外周血和脐血中扩增出大量DC[1,2]，并广泛地应用于抗病毒、抗肿瘤免疫研究。因此我们借鉴前人培养DC的基础上，从外周血中获取PBMC，经反复贴壁培养后得到黏附的单核细胞，再加GM-CSF和IL-4诱生出大量DC，同时对培养过程进行详细的观察和分析。

单核细胞属黏附型细胞，但在培养过程中发现，PBMC经3h的贴壁培养后仍有大量没有贴壁的单核细胞，因此，采取两次孵育的方法（即第一次孵育3h后，吸出细胞悬液加到另一个培养孔中，继续孵育3h）使培养的DC总量约从2×10^6/20ml增加到2.5×10^6/20ml左右。在血液来源困难的情况下，该方法是增加DC数量的最佳途径。

单核细胞是巨噬细胞和DC的共同前体，因此单加GM-CSF可诱生出DC和巨噬细胞，而且以巨噬细胞为主。由于IL-4可封闭单核细胞向巨噬细胞转化，因此联合应用IL-4后使DC的量增加而巨噬细胞减少。作者对黏附细胞通过透射电镜初步鉴定了培养过程中这两类细胞共存现象。同时在培养过程中还发现，在第一次收集DC后，以后产生的DC主要由贴壁的巨噬细胞产生，撤除IL-4后，只有极少量DC产生。因此，IL-4在诱生DC的过程中起到重要作用。尽管GM-CSF是体外扩增DC的关键因子，但必须协同IL-4才能扩增出足量的DC，以满足后续实验的需要。此外，通过电镜观察，在黏附细胞中还发现了粒细胞(由本校电镜室鉴定)，这可能是粒细胞与单核巨噬细胞及DC有共同的前体，在细胞因子的作用下互相转化有关。

3.2 DC表型鉴定

CD1a是人外周血DC的特征性标志，因此用FITC标记的CD1a单克隆抗体包被DC，再经流式细胞仪检测，其表达仅为65%左右，低于国外报道的结果。Francoise[3]等人对培养不同时期DC表面CD1a表达情况进行比较。结果，培养第4天CD1a的表达在60%左右，第7天可高达80%。这一差异，目前还未找出原因。因为本实验采用的细胞因子及单抗都是世界著名公司的近期产品，而且所培养的细胞无论通过电镜还是光镜观察，的确具备DC的形态和结构特征。此外，我们也对贴壁的细胞进行检测，结果只有10%左右。这可能是由巨噬细胞转化而来的DC尚未成熟释放，但已具有CD1a的表达。

3.3 混合淋巴细胞培养

图4所示，从人外周血培养的DC，按不同比例与同种淋巴细胞混合培养，均可产生强烈的增殖效应，而且当DC与T细胞比值为1:5时增殖效应最明显。这一结果说明DC具有很强的刺激T细胞增殖能力，同时也表明DC具有很强的抗原提呈功能。

近年来，由于DC培养扩增方法的建立，DC的生物学特性及功能得到了进一步的认识，特别是其强大的抗原递呈作用在抗肿瘤免疫及抗病毒免疫研究中得到了广泛的应用。因此，该研究从外周血中培养出大量的DC，并对其部分生物学特性及功能进行研究，为进一步研究DC在抗乙肝病毒和抗肝癌免疫中的作用奠定基础。

参 考 文 献

[1] 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;176:1693-1702.

[2] Sallusto F ,Lanzavecchia A.Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintianed by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α [J]. J Exp Med, 1994;179:1109-1117.

[3] Chapuis F,Rosenzwajg M, Yagello M, et al. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro[J]. Eur J Immunol, 1997;27:431-441.