DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.032
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003 

文章编号:1000-5404(2003)23-2141-02

技术方法

# 小鼠脾脏树突细胞的分离培养及鉴定

# Isolation culture and identification of spleen-derived DC from mice

程晓明,王长征,李淑平,钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 分离小鼠脾脏树突细胞(Dentritic cell,DC)。方法 运用脾脏DC先贴壁后悬浮的特性进行分离、培养。从形态学、功能及表型进行鉴定。结果 电镜显示了DC特有的形态;混合淋巴细胞反应表明少量的DC即可明显促进T淋巴细胞增殖($P<0.01$);流式细胞仪分析显示其表面分子CD11c及MHCⅡ呈高表达。结论 从脾脏中可分离培养高纯度的功能性DC,可用于研究其生物学特性。

树突细胞(Dentritic cell,DC)是体内最重要的抗原呈递细胞(APC)[1],它的表面表达丰富的与抗原呈递有关的MHCⅠ类和Ⅱ类分子以及多种共刺激分子,可在其分布的部位捕获、加工抗原,迁移至淋巴器官中活化T、B淋巴细胞,从而在免疫应答中发挥启动作用,因此,分离高纯度的功能性DC是研究其生物学特性机制的前提。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

4~6周健康BALB/c小鼠20只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,体质量16~20 g。

### 1.2 完全培养基(pH 7.2~7.4)

每1 000 ml完全培养基含胎牛血清(FCS,Hyclone公司)100 ml,丙酮酸钠(0.1 mol/L,Hyclone公司)10 ml,2-巯基乙醇(2-ME)(0.1 mol/L,Sigm公司)0.5 ml,RPMI1640(Hyclone公司)890 ml。临用前新鲜配制。

### 1.3 小鼠脾脏树突细胞的分离培养

脱颈法处死小鼠,无菌打开腹腔,取出脾脏放入冷PBS中,将其捻碎并滤过100目无菌钢网,收集脾细胞悬液;1 300 r/min洗涤5 min×3次;用完全培养基20 ml重悬细胞于250 ml培养瓶(Falcon公司)中,37 ℃,5%$CO_2$培养箱内孵育2 h;用完全培养基20 ml剧烈洗摇培养瓶,并吸弃悬液,共4次;加入完全培养基20 ml,37 ℃,5%$CO_2$培养箱内孵育过夜;收集悬浮细胞。

### 1.4 DC形态学观察

1.4.1 普通光学显微镜观察 在倒置显微镜下观察培养瓶内的悬浮细胞。

1.4.2 电镜观察 取新制备的细胞悬液,加入PBS,1 000 r/min洗涤5 min×3次,加入3%戊二醛固定30 min;加入PBS,1 000 r/min洗涤10 min×3次,加入50%、70%、90%和100%的酒精逐级脱水,每次各5 min;进一步的浸透、包埋和超薄切片的制备由电镜室完成。

### 1.5 DC功能的检测

采用混合淋巴细胞反应(MLR)检测DC的抗原呈递功能。步骤如下:用完全培养基调DC至浓度$1\times10^5$/ml,加入丝裂霉素C至终浓度25 μg/ml,37 ℃、5%$CO_2$培养箱内孵育45 min;加入完全培养基,1 300 r/min洗涤5 min×3次,用完全培养基重悬DC,按不同细胞数加入96孔板,每组设3复孔,以不加DC孔作为对照;采用尼龙毛柱法分离小鼠脾脏T淋巴细胞,用完全培养基重悬T淋巴细胞,按每$1\times10^5$个细胞加入上述各孔同时每孔分别加入不同数量的DC,使各孔终体积为200 μl,37 ℃、5%$CO_2$培养箱内孵育78 h;加入[$^3$H-TdR] 1 μCi/孔,继续培养18 h;收集细胞,用液闪仪检测每分钟计数率(cpm)。

6 DC表型鉴定:将新鲜制备的DC每$1\times10^6$个加入1.5 ml Ep管中,,按以下步骤进行荧光标记:加入PBS,2 000 r/min洗涤5 min×2次,分别加入藻红蛋白(PE)标记的仓鼠抗小鼠CD11c单克隆抗体(mAb)(B.D公司)1 μg及PE-大鼠抗小鼠MHCⅡmAb 0.2 μg(SouthernBiotech公司),对照管内分别加入PE-仓鼠IgG溶液0.2 μg(SouthernBiotech公司)及PE-大鼠IgG溶液0.2 μg(SouthemBiotech公司),4 ℃放置30 min;加入PBS,2 000 r/min洗涤5 min×3次,吹打混匀细胞,行流式细胞仪(FACS)分析。

### 1.6 统计学处理

采用$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 DC的形态学特征

200倍光镜下可见悬浮细胞体积较大,细胞表面粗糙。扫描电镜显示,DC表面伸出许多很长的膜性面纱状、梭状或扁平长突起,类似于神经细胞的突起,有的突起末端呈不规则球状膨大,众多突起甚至遮盖了胞体,偶见细胞呈多边形或不规则形和少量突起的单核巨噬细胞。透射电镜显示,细胞膜伸出长而形态不规则的突起,细胞质中线粒体相当丰富,有少量溶酶体和粗面内质网,胞质内还含有吞饮小泡和吞饮大泡,细胞核形状不不规则,多偏于一端,见图1、2。

### 2.2 DC的功能

MLR显示,与对照组比较,当DC与T淋巴细胞以1∶200混合培养时,即可出现明显的促进T淋巴细胞增殖作用($P<0.01$),随着DC数量的增加,T淋巴细胞的增殖效应也明显加强($P<0.01$),见图3。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170403;30200120)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170403;30200120)
作者简介:程晓明(1973-),女,安徽省淮南市人,博士,主治医师,主要从事哮喘发病机制及免疫干预方面的研究。电话:(023)68774603
收稿日期:2003-04-10;修回日期:2003-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

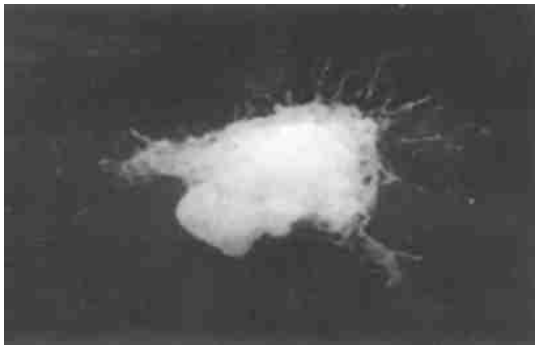


图1 DC扫描电镜 (SEM× 2 500)

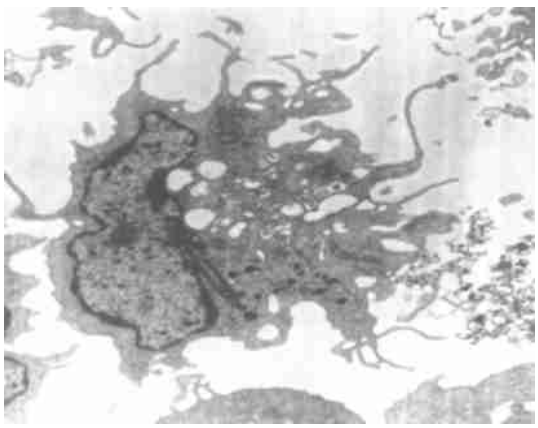
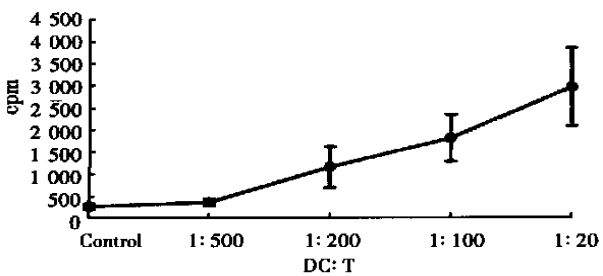


图2 DC透射电镜 (TEM× 4 000)




$P<0.01$ 与对照组比较

图3 MLR检测DC的免疫刺激活性

### 2.3 DC的表型

FACS显示, DC表面CD11c阳性表达率为81.18%~89.54%, MHC Ⅱ分子阳性表达率为87.81%~89.48%

## 3 讨论

目前, 可通过多种途径获得DC: ①直接分选, 根据DC的表面标志采用阳性或阴性筛选法。但DC并无特异性的表面标志, 采用表达较高的MHC Ⅱ及其他CD分子进行筛选, 不仅费用高, 而且步骤较复杂, 最终分离的DC数量有限; ②运用外周血单核细胞[2]、骨髓[3]及脐血[2] $CD34^+$ 细胞体外诱导、扩增、纯化的方法, 主要用于人体实验。此方法需要粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-4(IL-4)等多种细胞因子进行体外诱导, 可获得大量的DC。但此类DC不能反应它在疾病发生、发展中的变化, 即DC本身的作用机制。本研究从小鼠脾脏分离、培养的DC, 操作方法简单、纯度较高、并保持了刺激淋巴细胞增殖的能力; 同时, 运用此法分离的DC仅在体外短期培养, 能真实反应它在疾病当中的生物学变化, 为研究DC在各类免疫性疾病中的作用机制提供了直接的观察手段。

关键词: 树突细胞; 小鼠; 脾脏

中图法分类号: R-331; R322.21 文献标识码: B

参考文献:

[1] Gurunathan S, Klinman D M, Seder. DNA vaccines: Immunology, application, and optimization[J]. Ann Rev Immunol, 2000, 18: 927—974.

[2] 王 晓, 裴血涛, 李 梁, 等. 脐血CD34+细胞和外周血单核细胞两种来源的树突状细胞特性的比较研究[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(11): 583—585.

[3] 董强刚, 叶闻斐, 王亦宾, 等. 诱导体外扩增的小鼠CD34+造血细胞分化为树突状细胞[J]. 肿瘤, 1999, 19(3): 132—136.

(编辑 郭建秀)

## 离心机转速的写法及相对离心力的正确表示

有的作者将离心机转速用rpm表示, 这已是非法定单位写法了。正确的写法是: 当低速离心时用r/min表示; 当高速或超速离心时用相对离心力"×$g$"表示, $g$是斜体, 前面是乘号。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net