DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.035
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol.25, No.13
1204 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 200

技术方法

文章编号:1000-5404(2003)13-1204-02

人脐血CD34$^+$细胞和贴壁细胞体外诱导树突状细胞及其鉴定

Generation and identification of dendritic cells from human cord blood CD34$^+$ cells and adherent cells

裴 莉,陈洁平,梁后杰 (第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038)

提 要:目的 从人脐血中不同的前体细胞扩增树突状细胞(DCs),并对其进行鉴定。方法 用免疫磁珠法分离人脐血CD34$^+$细胞,以GM-CSF、TNF-α、FL、SCF和IL-4诱导生成DC;用Ficoll分离脐血单个核细胞,2 h贴壁后的细胞,以GM-CSF、IL-4和TNF-α诱导生成DC。观察细胞形态,流式细胞仪分析表面标志(CD1a、CD80、HLA-DR),并检测其刺激同种异体T细胞增殖的能力。结果 人脐血CD34$^+$细胞和贴壁细胞体外诱导生成的细胞均具有典型的DC形态特征,表达高水平的DC分化抗原CD1a,MHCⅡ类抗原递呈分子HLA-DR和CD80共刺激分子,并具有刺激同种异体T细胞增殖的能力。前者扩增DC的效率更高。结论 从人脐血CD34$^+$细胞和贴壁细胞均可诱生出功能性DC,是DC理想的组织来源。

树突状细胞(Dendritic cells,DCs)是目前已知的功能最强的抗原提呈细胞,它能显著地刺激初始T细胞的增殖[1],启动机体免疫反应,在许多疾病,尤其是肿瘤的生物治疗中起着重要的作用[2,3]。但在正常人组织中DC含量少,单纯的分离、纯化DC难以满足需要。所以,在体外扩增出大量DC,对其生物学特征的研究和临床应用具有重要意义。本研究从人脐血中分离出CD34$^+$细胞和单核细胞两种DC前体细胞,用不同方法诱生出DC,并对其形态、表面标记和功能进行鉴定,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 资料来源

脐血样本来自第三军医大学附属西南医院妇产科正常足月分娩产妇。

1.2 脐带血CD34$^+$细胞分离和DC体外诱导

脐血经Ficoll分离出单个核细胞(MNC),然后按照产品生产商提供方法,应用Mini Macs系统阳性分离法分离CD34$^+$细胞,流式细胞仪检测其纯度为99.08%。DC体外诱导分化用含15%胎牛血清的IMDM培养液,并加入GM-CSF(100 ng/ml)、SCF(100 ng/ml)、IL-4(1 000 U/ml)、FL(40 ng/ml)和TNF-α(50 U/ml),置于5%CO_2、37 ℃的培养箱培养,每3天半量换液一次。

1.3 脐带血贴壁细胞分离和DC体外诱导

脐带血分离出MNC,置于5%CO_2、37 ℃的培养箱培养孵育2 h,吸弃悬浮细胞,用37 ℃预热的IMDM培养轻洗2次,贴壁细胞继续培养,用含15%胎牛血清的IMDM培养液,并加入GM-CSF、IL-4和TNF-α(浓度同1.2),置于5% CO_2、37 ℃的培养箱培养,每3天半量换液一次。

1.4 DC形态观察

细胞培养过程中倒置显微镜观察。收集培养第10天细胞,常规制作透射电镜和扫描电镜标本,分别用透射和扫描电镜观察并摄片。

1.5 流式细胞仪检测细胞表型

直接免疫荧光法标记细胞,其然后用流式细胞仪检测细胞表型CD1a、CD80和HLA-DR。

1.6 DC刺激同种异体T细胞增殖反应

常规分离成人外周血MNC,用尼龙毛法获得T淋巴细胞。DC以每孔1×10^3、2×10^3、1×10^4接种于96孔板,每组5个复孔,经^{60}Co γ射线照射灭活(3 000 cGy),然后以1∶10、1∶50、1∶100加入T淋巴细胞,培养72 h,然后加入^3H-TdR,3.7×10^4 Bq/孔,作用14 h后收集细胞,液闪计数仪检测放射性核素每分钟闪烁计数值。

1.7 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$采用Student's test非配对t检验。

2 结果

2.1 DC形态学观察

脐血CD34$^+$细胞培养至第5天以后,光镜下可见细胞体积增大,胞体出现树枝状突起。扫描电镜观察,胞浆突起形成不规则树枝样,细胞表面粗糙,有层叠状的皱襞。透射电镜观察细胞表面突起明显,细胞核形态不规则,多偏于一侧,胞浆内线粒体丰富,偶见溶酶体。脐血单个核细胞贴壁2 h后(主要为单核细胞),加入细胞因子诱导,第3天即可见细胞胞体出现数枝状突起,随着培养时间延长,细胞变大,不规则突起更加明显。电镜下形态结构与CD34$^+$细胞来源DC无明显差别($P>0.05$)。

2.2 DC表型分析和扩增效率

脐血CD34$^+$在细胞因子GM-CSF+TNF-α+FL+SCF+IL-4的诱导下,生长迅速,细胞数量不断增加,10 d左右细胞量达到最多,以后细胞增殖渐缓。细胞总数约为培养前CD34$^+$细胞数的70~85倍,CD1a$^+$、CD80$^+$和HLA-DR$^+$细胞的比例分别为(47.08±7.10)%、(68.00±7.30)%和(85.77±5.80)%。而脐血单个核贴壁细胞在GM-CSF+TNF-α+IL-4的作用下迅速分化成熟,但培养后细胞总数仅为培养前的1.2倍,CD1a$^+$、CD80$^+$和HLA-DR$^+$细胞的比例分别为(41.30±5.20)%、(73.10±6.50)和(81.10±11.30)%。从增殖效率来看,在本实验细胞因子组合

作者简介:裴 莉(1972—),女,四川省渠县人,硕士研究生,医师。电话:(023)65460696

收稿日期:2003-03-10;修回日期:2003-04-23

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

的作用下，每 1×10^6 个脐血 MNC 中分离纯化的 $CD34^+$ 细胞可以扩增出约 3×10^6 的 $CD1a^+$ 细胞；而 1×10^6 个 MNC 贴壁 2 h 后细胞数约为 1×10^5，诱导分化后可获得 0.5×10^5 的 $CD1a^+$ 细胞。可见，前者扩增 DC 的效率明显高于后者。

2.3 DC 刺激同种 T 细胞增殖反应

从脐血 $CD34^+$ 细胞和贴壁细胞分化而来的 DC，按不同比例，即 1∶100、1∶50、1∶10 与同种 T 淋巴细胞混合培养，均可以产生明显的增殖效应。1∶10 时刺激效果最为明显，细胞 ^{3}H-TdR 的掺入率分别为(3 883±176)%和(3 266±201)%，两组比较无显著性差异，但两组分别与对照组 CPM 值(316±112)和(297±76)比较有显著性差异。说明脐血 $CD34^+$ 细胞和贴壁细胞诱导分化形成的 DCs 均能刺激同种异体 T 细胞增殖反应，有较强的抗原提呈能力。

3 讨论

研究表明，在细胞因子作用下，外周血 $CD34^+$ 单核细胞，以及骨髓、脐血和 G-CSF 动员后的外周血 $CD34^+$ 细胞均可以在体外诱导分化为 DC。外周血来源方便，制备简单经济，所以采集肿瘤患者自体外周血单核细胞诱导生成 DC 已用于临床试验治疗。但是肿瘤患者经过放疗、化疗后常会出现骨髓抑制和外周血白细胞减少，难以从外周血中获得足量 DC 满足临床需要。脐血来源广泛、采集方便，免疫原性弱，同时富含造血干祖细胞和单核细胞两种 DC 的前体细胞，有可能成为 DC 的较好的组织来源。

我们的实验结果表明，脐血 $CD34^+$ 细胞在细胞因子 GM-CSF＋TNF-α＋FL＋SCF＋IL-4 作用下，以及单核细胞在 GM-CSF＋IL-4＋TNF-α 作用下，诱导生成的细胞均具有典型的 DC 形态特征，表达高水平的 DC 分化抗原 CD1a，以及 MHC II类抗原递呈分子 HLA-DR 和 CD80 共刺激分子，并具有刺激同种异体 T 细胞增殖的能力。

可见我们从人脐血两种前体细胞中诱导扩增出的细胞均具有良好刺激活性的 DCs，脐血是 DC 理想的来源。脐血分离 $CD34^+$ 细胞诱导分化可获得更大量的 DC，而单个核细胞 2 h 贴壁细胞诱生 DC 则更简单经济，我们可根据不同目的对其进行选择。

关键词：胎血；树突细胞；细胞因子
中图法分类号：R329.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] Steinman R M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity[J]. Ann Rev Immunol, 1991, 9: 271－296.
[2] Timmerman J M, Czerwinski D K, Davis T A, *et al*. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients[J]. Blood, 2002, 99(5): 1517－1526.
[3] Mackensen A, Herbst B, Chen J L, *et al*. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated *in vitro* from $CD34^+$ hematopoietic progenitor cells[J]. Int J Cancer, 2000, 86(3): 385－392.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2003)13-1205-02

技术方法

细胞培养法应用聚乙二醇提高沙眼衣原体检测灵敏度初探

Preliminary study on the increased detective sensitivity to Chlamydia trachomatis by using polyethylene glycol in cell culture

刘官信，韦 红，吴仕孝 （重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所，重庆 400014）

提 要：目的 探讨聚乙二醇(PEG)提高沙眼衣原体(CT)细胞培养灵敏度的方法。方法 使用含有 PEG 的生长培养基增殖 CT 标准株，用碘染色法检测 CT。并对 100 例新生儿肺炎鼻咽部标本 CT 进行检测。结果 用含 7%PEG 的生长培养基培养增殖的 CT 是不含 PEG 生长培养基的 1.5～2.5 倍。用于临床检测新生儿肺炎鼻咽部标本，包涵体数目明显增多。结论 在 CT 细胞培养中应用 PEG，可提高检测 CT 的灵敏度。含 7%PEG 的生长培养基最适合增殖 CT。

1956 年我国汤飞凡教授首次用鸡胚卵黄囊培养沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis，CT)获得成功。10 年后细胞培养成功。此法特异性高，一直被认为是诊断 CT 的“金标准”，且能检出病人是否存在活的病原体，可作为疗效的判断，但其敏感性较低。聚乙二醇(Polyethylene glycol，PEG)是常用的细胞融合诱导剂，用于 CT 的培养中可增加 CT 包涵体数目，从而提高培养检测的敏感性。我们对 PEG 在 CT 培养的作用及最佳作用浓度进行了初步研究，报告如下。

1 资料和方法

1.1 标本采集

CT 标准株 B/TW-5(2×10^8 IFU/ml)，由我室保存。选择我院住院的新生儿肺炎患儿的鼻咽部拭子共 145 例，置入 0.5 ml 衣原体运输保护液[0.2 mol/L 蔗糖-磷酸盐缓冲液(2SP)]，含 3.3%胎牛血清，链霉素 50 μg/ml，万古霉素 50 μg/ml，洗片刻后弃去。4 ℃转运到实验室，24 h 内接种或贮存于－70 ℃待接种。

作者简介：刘官信(1950－)，男，重庆市人，主管技师，主要从事细胞培养方面的研究，发表论文 7 篇。电话：(023)63632756-3546

收稿日期：2002-12-30；修回日期：2003-04-07

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