DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.001
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0879-03

论著

大鼠树突状细胞的体外分离、纯化、扩增及鉴定

贺伟峰,吴 军,罗高兴,易绍萱,黄赤兵,陈希炜,郑峻松,马 兵,雷 晓 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨诱导及纯化大鼠树突状细胞(Dendritic cells,DC)的方法,为进一步研究树突状细胞的功能、特性及临床应用提供技术方法。方法 应用重组大鼠rGM-CSF、IL-4在体外培养大鼠骨髓前体细胞获得大量DCs,经标抗大鼠OX62单抗免疫磁珠分离纯化后的DCs经形态学观察、表型检测、功能学实验鉴定。结果 大鼠骨髓来源的DC在体外培养12~14 d后完全成熟,99.36%培养纯化后DC表达大鼠特异性表面标志OX62;典型的成熟大鼠DC形态上类似于小鼠和人类的DC,表型为MHCⅡ++,OX62++,FcγR(CD32)+/-,CD80+/-,CD86++,体外功能分析显示该DC能够强烈刺激MLR并有效递呈可溶性抗原OVA刺激初始型T细胞的增殖。结论 成功地建立了体外大量扩增大鼠骨髓DC的方法,为研究其在异种移植及诱导免疫耐受的作用打下基础。

关键词:树突状细胞;异种移植;免疫耐受
中图法分类号:R329.2;R392.2 文献标识码:A

Isolation, purification, proliferation and identification of rat bone marrow-derived dendritic cells

HE Wei-feng, WU Jun, LUO Gao-xing, YI Shao-xuan, HUANG Chi-bing, CHEN Xi-wei, ZHENG Jun-song, MA Bing, LEI Xiao (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore methods for inducing rat bone marrow cells to differentiate to dendritic cells (DCs), and for purification. **Methods** DCs obtained from SD rat bone marrow were propagated *in vitro* under the condition of GM-CSF and IL-4. DCs were purified by monoclonal antibody OX62 and magnetic beads. The DCs harvested 14 d later was identified with morphology, transmission electron microscopy, phenotype and mixed lymphocyte reaction-stimulating activity. **Results** Cultured DCs expressed OX62 (the marker of rat DCs) by 99.36%. Most mature DCs were obtained in 12~14 d cultivation as determined with morphology and high level expression of major histocompatibility complex (MHC) class II, CD80 and CD86, and they effectively stimulated MLR and present soluble ovalbumin to naive T cells. **Conclusion** A method to generate large number of DCs from rat bone marrow *in vitro* is established, and may contribute to further study on the role of DCs in xenotransplantation and tolerance.

Key words: dendritic cells; xenotransplantation; immune tolerance

树突状细胞(Dendritic cells,DC)是目前为止发现的功能最强的专职抗原提呈细胞(Antigen presenting cell,APC),它对诱导初次免疫应答具有独特的功能,在对抗原的摄取、加工、处理及提呈过程中,DC既具有一般APC的共性,也表现出一些独特的生物学特性。由于它在机体的抗感染免疫及抗肿瘤免疫应答中的作用极其重要而备受重视,成为近年来免疫学研究的热点。但DC在体内分布广泛且数量较少,因此如何获得大量的纯化的DC就成为进一步研究DC特性及功能的前提。为进一步研究树突状细胞的功能及特性,我们建立了利用大鼠骨髓细胞诱导DC及其纯化的方法,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

MiniMACS磁性分离仪为德国Miltenyi Biotec公司产品;流式细胞仪为美国FACScan BDIS产品;钴源为军事医学科学院提供;液闪计数仪为Beckman产品。rIL-4、rGM-CSF购于R&D公司,FITC标记抗大鼠MHCⅡ(Ia)、FITC标记抗大鼠CD32、抗大鼠OX62、PE标记抗大鼠CD80、PE标记抗大鼠CD152、PE标记抗大鼠CD86购于Pharmingen公司。健康SD、LEWIS大鼠,体重180~200 g,由本校实验动物中心提供。

1.2 制备大鼠骨髓细胞

取健康6~8周龄的雌雄不拘SD大鼠,断颈处死,浸入75%的乙醇中5~10 min,无菌手术取出股骨和胫骨,尽量剥去肌肉组织,用PBS洗涤3次;剪去骨两端,再洗涤2次;再用灭菌注射器抽取5 ml PBS,将其针头分别从两端插入骨髓腔,反复冲洗出骨髓直至骨变白,收入50 ml离心管中;离心1 500~3 000 r/min,弃上清,沉淀细胞用PBS重悬,离心洗涤3次,收集沉淀的骨髓细胞。

1.3 DCs及其前体的分离与培养

取已扩增的骨髓细胞,重悬于10%FCS-1640完全培养液中,2×10^6细胞/孔置于24孔板中,加细胞因子GM-CSF 4 ng/ml,IL-4 4 ng/ml,37 ℃、5%CO_2培养2周,每2 d加细胞因子1次,培养第3天,轻轻吸出培养上清后重新加入培养液,继续培养两周后收获悬浮细胞。

1.4 DCs的分离纯化

采用MiniMACS免疫磁性分离系统进行[5]。收获的悬浮细

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39993430-2);国家自然科学基金资助面上项目(39970756);国家科技部重点项目(96-920-20-10)
作者简介:贺伟峰(1974-),男,湖南省双峰县人,硕士,医师,主要从事烧伤以及移植免疫方面的研究。电话:(023)68754000-73172
收稿日期:2001-09-11;修回日期:2002-02-25

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

胞经 5 g/L 的甲基纤维素沉降，经 Ficoll（相对密度为 1.077）梯度离心分离出低密度细胞，洗涤后标记抗体 OX62 与磁珠。标记细胞在通过置于磁场中的分离柱时，洗脱除去 OX62-细胞，将分离柱移出磁场，加压洗脱，收集组分为 OX62+ 细胞。

1.5 DC 的形态学检测

1.5.1 显微镜观察 分别在第 8、10、12、14 天用倒置显微镜观察、摄影。并以台盼蓝拒染法检测细胞的存活率。

1.5.2 扫描电镜观察 培养第 14 天 DC 悬液用 PBS 洗涤 2 次，4% 的戊二醛固定 2 h 后用 PBS 洗涤 1 次。制成悬液滴片膜，1% 锇酸固定，酒精梯度脱水，扫描电镜观察并摄片。

1.6 表型检测

1.6.1 表面分子 OX62 的检测 收获的 DC 用 FACS 标记液 PBA（PBS+1% BSA+0.02% 叠氮钠）调细胞密度为 1×10^6/ml，加入离心管，100 μl/管未直接标记荧光素的抗 OX62 单抗 100 μl，4 ℃，30 min 后用 PBA 洗细胞 2 次，加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG 荧光二抗 100 μl/管，悬浮细胞。二抗标记终浓度为 5 μg/ml。4 ℃暗处标记 45 min，PBA 洗 2 次，细胞悬浮于含 1% 的多聚甲醛的 PBA 中通过流式细胞仪检测，对照组用同类无关一抗代替 OX62 单抗，其余步骤相同。

1.6.2 表面 MHC Ⅱ 的表达 收获的 DC 用 FACS 标记液 PBA 调细胞密度为 1×10^6/ml，加入离心管，100 μl/管。再加入 PBA 稀释的 FITC 荧光素直接标记的抗 MHC Ⅱ（Ia）单抗标记至终浓度为 5 μg/ml，4 ℃避光标记 30 min 后用 PBA 洗细胞 2 次后，细胞悬浮于含 1% 的多聚甲醛的 PBA 中通过流式细胞仪（FACS calibur）检测细胞表型。对照组用同类荧光素直接标记的同分异构抗体代替检测抗体，其余步骤相同。

1.6.3 面共刺激分子 CD80、CD86 的表达 以 PE 标记的抗 CD80、CD86 单抗替代 FITC 标记的抗 MHC Ⅱ（Ia）单抗，其余步骤同上。

1.6.4 面功能分子 FcγRⅡ 的表达 以 FITC 标记的抗 FcγRⅡ 单抗替代 FITC 标记的抗 MHC Ⅱ（Ia）单抗，其余步骤同上。

1.7 大鼠 DC 功能学检测

1.7.1 大鼠脾脏 T 淋巴细胞和单核细胞的分离 尼龙毛法分离大鼠脾脏 T 淋巴细胞，以 α-醋酸萘酯酶染色法鉴定分离 T 淋巴细胞悬液纯度。常规台盼蓝染色法检测分离 T 淋巴细胞存活率。将分离出的大鼠单个核细胞，置于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基中，37 ℃，5%CO_2，饱和湿度条件下孵育 2 h，再取出轻轻震荡，小心洗去非贴壁细胞。然后重复上述过程 1 次。所得的细胞即为贴壁的单核细胞。

1.7.2 DC 激活同种混合淋巴细胞增殖反应的作用 用前述方法制备 LEWIS 大鼠 T 淋巴细胞和 SD 大鼠 DC 及单核细胞。RPMI1640 完全培养基悬浮 DC、单核细胞、T 淋巴细胞，实验前 ^{60}Co 20 Gy 灭活 DC 细胞和单核细胞，并调整 3 种细胞浓度为 1×10^6/ml、1×10^6/ml、1×10^6/ml。在 96 孔板上，DC 和单核细胞分别以 5×10^4/孔，10^4/孔、5×10^3/孔、10^3/孔加 4 实验组，每实验组 3 个复孔。另设 1 组作对照组。每孔加入与同量的 SD 大鼠单核细胞，终体积为 200 μl，不足者以培养基补足。37 ℃，5% CO_2、饱和湿度条件下，培养 96 h。培养结束前 18 h 加 18.5×10^3 Bq/孔 ^{3}H-TdR。用细胞收集器将细胞收集于玻璃纤微滤纸上，用蒸馏水反复冲洗，80 ℃烘干。液闪计数 A/Bq 值，结果用 3 孔平均值表示。

1.7.3 负载 OVA 抗原 DC 对 T 淋巴细胞增殖刺激能力 用 5 μg/ml OVA 刺激以上制备好的 SD 大鼠骨髓来源的 DC 和新鲜分离的 SD 大鼠脾细胞，37 ℃，2 h 后，^{60}Co 20 Gy 照射灭活，调 DC 和脾细胞浓度为：1×10^6/ml，作为刺激细胞。分别以 5×10^4/孔，10^4/孔、5×10^3/孔、10^3/孔加 8 个复孔。再加入浓度为 1×10^6/ml 的 SD 大鼠脾 T 淋巴细胞 100 μl。每孔终体积为 200 μl。37 ℃，5%CO_2，饱和湿度条件下培养 96 h。培养结束前 18 h 加 18.5×10^3 Bq/孔 ^{3}H-TdR。用细胞收集器将细胞收集于玻璃纤微滤纸上，用蒸馏水反复冲洗，80 ℃烘干。液闪计数 cpm 值，结果用 3 孔平均值表示。

1.8 统计学处理

采用两样本均数比较的 t 检验。

2 结果

2.1 形态学观察

2.1.1 光镜观察 大鼠 DCs 于培养的前两天细胞悬浮生长，并不贴壁，这点与人和小鼠 DCs 培养前期就可贴壁生长的特点不一致。第 3 天才见部分骨髓前体细胞贴壁生长，细胞形态以小而圆为主，无树枝样突起，大约 8～10 d 可见部分细胞悬浮，但毛刺较短，分支较少。10～12 d 细胞悬浮增多，突起增多，12～14 d 后则大部分细胞脱壁并已出现典型的 DCs 形态，细胞表面伸出树枝样突起，不规则，经进一步用 OX62 磁珠分选纯化后，可见形态典型，大小均一的 DCs。经体外培养扩增纯化，从每只大鼠骨髓中可以获得的 DCs 达 1×10^7。经台盼蓝拒染法测活细胞率高于 95% 以上。

2.1.2 电镜观察 扫描电镜观察，具有典型的 DC 细胞形态的细胞，细胞表面突起形成不规则形态。见图 1。



图 1 DC 电镜观察 （×2 020）

Fig 1 Scanning EM of DC （×2 020）

2.2 表型检测

2.2.1 大鼠 DC 特异性表面分子 OX62 的表达 80% 以上培养 14 d 的 DC 表达大鼠 DC 特异性标志 OX62。

2.2.2 大鼠 DC 表面分子 MHC Ⅱ 的表达 MHCⅡ（Ia）在第 6 天阳性表达率仅为 24.8%，而第 14 天阳性表达率高达 75.1%。

2.2.3 大鼠 DC 表面共刺激分子 CD80、CD86 的表达 培养 14 d 的 DC 对比培养 6 d 的 DC，表面分子 CD80、CD86 的表达峰右移，且 B7-2 分子还有一个强表达的小峰。

2.2.4 大鼠 DC 表面功能分子 FcγRⅡ 的表达 68.37% 培养 6 d 的 DC 表达 FcγRⅡ 分子，而培养 14 d DCFcγRⅡ 分子表阴性。

2.3 大鼠 DC 功能学检测

2.3.1 大鼠脾脏 T 淋巴细胞和单核细胞的分离 α-醋酸萘酯酶染色法鉴定分离 T 淋巴细胞悬液纯度为 95% 以上。台盼蓝染色法检测分离 T 淋巴细胞存活率在 98% 以上。

2.3.2 DC 激活同种混合淋巴细胞增殖反应的作用 结果

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

见图 2 显示在不同浓度 DC 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖效应均比单核细胞强, 两者之间有显著差异($P<0.05$)。

2.3.3　负载 OVA 抗原 DC 对 T 淋巴细胞增殖刺激能力的影响

DC 负载可溶性抗原对 T 淋巴细胞增殖刺激能力非常强。结果见图 3 显示在不同浓度负载可溶性抗原 DC 刺激 T 淋巴细胞增殖效应均比单核细胞强, 两者之间有显著差异($P<0.05$)。

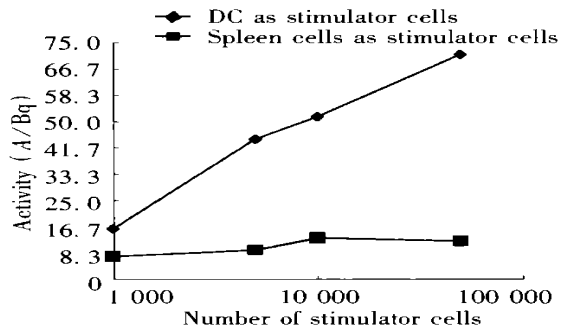


图 2　DC 和单核细胞刺激 MLR 的能力

Fig 2　The stimulatory ability of DC and monocyte in one-way MLR

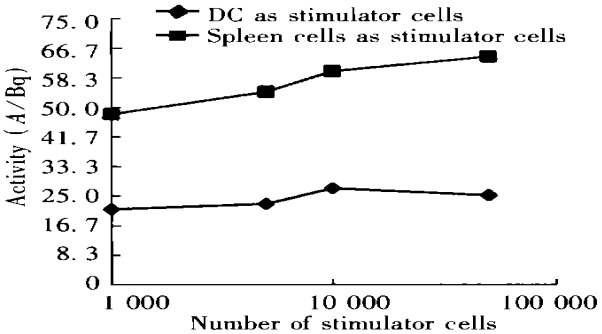


图 3　DC 和单核细胞负载可溶性抗原对 T 淋巴细胞增殖刺激能力

Fig 3　The ability of DC and monocyte to present soluble antigen OVA to T cells

3　讨论

1973 年 Steinman 和 Cohn 首次分离出一类与粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞形态和功能不同的细胞, 命名为树突状细胞(DC)[1]。DC 在机体分布广泛, 但数量极小, 它们只占 PBMC 的 0.1%到 0.5%[2]。DC 的数量甚微, 极大地限制了 DC 的研究和应用。Koch 等[3]首先发现, GM-CSF 联合 TNFα 可以诱导具有典型 DC 形态及特征的细胞生长, 与未经培养直接分离的 DC 对同种混合淋巴细胞反应完全相同。

目前应用的 DC 主要是从不同组织里的 DC 前体细胞分化、诱导而来, 如骨髓、脐带血中的造血干细胞可以用细胞因子 GM-CSF、IL-4、TNFα 进行定向诱导分化而得到成熟的 DC, GM-CSF 是 DC 诱导中的最基本的细胞因子, IL-4 抑制培养体系中的中性粒细胞和巨噬细胞的生成, 并维持 DC 处于未成熟状态, TNFα 一方面抑制粒细胞的产生, 另一方面促进 DC 的成熟, 使其具有很强的刺激 T 淋巴细胞的活性。

作者联用重组大鼠 GM-CSF 和 IL-4 协同诱导培育大鼠骨髓细胞, 使 DC 前体细胞分化发育为成熟细胞并扩增, 同时阻抑巨噬细胞发育生长, 经体外培养扩增, 从每只大鼠骨髓中可以获得 2×10^7 的 DC, 基本上满足了进一步实验对 DC 量的要求。

从大鼠骨髓中扩增大量 DC 必须首先去除骨髓细胞中的粒细胞、T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞和巨噬细胞及其前体细胞, 这样富集的造血干、祖细胞在 GM-CSF 的刺激下逐渐分化成 DC, 在培养中通过一系列的纯化步骤, 最后可得到纯度较高的 DC。

目前, 国外分离 DC 的方法主要有两种: 一种是"培养粘附法", 根据 DC 和单核细胞粘附性的不同, 收集未粘附细胞即为 DC 组分, DC 纯度达 60%～80%[4]。另一种为"单抗法", 是以密度梯度离心法为基础, 继以免疫磁珠清除法或流式细胞仪法, DC 纯度达 90%以上[5]。两种方法各有优缺点。"培养粘附法"收集的 DC 常出现抗原标志的改变[6]; "单抗法"分离纯度高, 可保持 DC 原有特征, 但单抗量消耗大, 而且单抗选用不当, 很容易丢失部分 DC。

在本实验中, 我们将两种方法联合运用, 首先用"培养粘附法"在培养 14 d 的骨髓前体细胞中收集未粘附细胞, 再利用免疫磁珠分离法通过 OX62 单抗纯化 DC, 最后获得了纯度为 99.36%的大鼠 DC。

DC 最初概念是形态学概念。但现在它已是一个综合性的概念。目前比较统一的观点认为它是具有典型的树突状细胞形态, 高表达 MHC Ⅱ类和共刺激分子, 能激活初始型 T 细胞, 并启动基础免疫应答的功能十分活跃的免疫细胞。

我们对培养出的大鼠 DC 从形态学、特异性表面标志、MHC Ⅱ类和共刺激分子、启动基础免疫应答几方面作一个全面鉴定, 以确保我们分离培养体系的正确。

参考文献:

[1] Steinman R M, Lustig D S, Cohn Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo[J]. J Exp Med, 1974, 139(6): 1 431－1 445.

[2] Hart D N, Hill G R. Dendritic cell immunotherapy for cancer: Application to low-grade lymphoma and multiply myeloma[J]. Immunol Cell Biol, 1999, 77(5): 451－459.

[3] Kock F, Heufler C, Kanpgen E, *et al*. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture, but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, without inducing their functional maturation[J]. J Exp Med, 1990, 171(1): 159－171.

[4] Vremec D, Zorbas M, Scollay R, *et al*. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells[J]. J Exp Med, 1992, 176(1): 47－58.

[5] Winkel K, Sotzik F, Vremec D, *et al*. CD4 and CD8 expression by human and mouse thymic dendritic cells[J]. Immunol Lett, 1994, 40(2): 93－99.

[6] Lafontaine M, Landry D, Montplaisir S. The human thymic dendritic cell phenotype and its modification in culture[J]. Cell Immunol, 1992, 142(2): 238－251.

（编辑　陈聪连）

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