DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.005
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0255-03

论著

猪骨髓树突状细胞的体外扩增及鉴定

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

提 要:目的 建立体外大量扩增猪树突状细胞(Dendritic cells, DC)的方法,并进行形态学和免疫学性质鉴定。方法 制备猪骨髓细胞,分离单个核细胞,以猪重组GM-CSF诱导培养,2周后收集悬浮细胞,进行形态学观察和免疫细胞表面分子鉴定,以及功能检测。结果 体外培养富集的猪DC达70%~80%,具有典型的形态、表型及功能。结论 成功地建立了体外大量扩增猪骨髓DC的方法,为研究其在异种移植及诱导免疫耐受中的作用打下基础。

关键词:树突状细胞;分离纯化
中图法分类号:R329.24;R394.2 文献标识码:A

Amplification and identification of porcine bone marrow-derived dendritic cells *in vitro*

MA Bing, WU Jun, ZHENG Jun-song, YI Sao-xuan, HE Wei-feng, YANG Shi-xing, LUO Gao-xing, CHEN Xi-wei, LEI Xiao (Institute of burn research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To amplify dendritic cells(DC) from porcine bone marrow and study their morphological, immunological characteristics. Methods Lymphocytes in porcine bone marrow were isolated on a Ficoll separation gradient. The selected cells were cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), and the suspensive cells were collected 2 weeks after cultivation. The morphological features and numbers of DC were identified and counted with light microscopy. The co-stimulation molecules on membrane surface were studied by FACS. The function was observed by means of MLR. Results The percentage of DC was 70%~80% in the DC-enriched populations as confirmed under microscope. The cells showed typical morphology of DC and expressed high level of B7 molecules and were potent stimulators of human T cells in MLR. Conclusion The method to generate large numbers of DCs from porcine bone marrow is established, which might contribute to further study on the role of DC in xenotransplantation and tolerance induction.

Key words: dendritic cells; purifying

对终末期器官衰竭的患者,器官移植是最有效的治疗手段。随着全球临床器官移植的需求增加,供体器官来源匮乏日益成为急需解决的突出问题。现代免疫学的飞速发展,使异种器官移植可能变为现实,从而从根本上解决器官来源短缺问题。在异种器官供体中,猪是最有希望过渡到临床应用的动物。近年来有关树突状细胞(Dendritic cells, DC)在移植免疫中的重要作用越来越引起人们的关注[1]。虽然DC在淋巴与非淋巴组织中均有分布,但是在各种组织中DC数量极少,在研究工作中也只能从组织中分离到极少量的DC,这给深入研究带来了很大障碍。另一方面,由于猪源性试剂来源匮乏,现有体外培养的DC主要来源于小鼠、大鼠和人,而作为异种移植器官供体及诱导免疫耐受研究大动物模型的猪,其DC的体外分离、纯化及扩增尚鲜见报道。我们借助于细胞因子[猪粒-巨噬细胞集落刺激因子(pGM-CSF)]在体外诱导培养富集猪骨髓DC,结合细胞形态学、细胞表面免疫分子及细胞功能检测,证明所获取的细胞为猪DC,其纯度达70%~80%。

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(39993430-2)
作者简介:马 兵(1968-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤临床工作,现在解放军第47医院骨科,成都 610500
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006
收稿日期:2001-10-26;修回日期:2001-12-24

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pGM-CSF由美国Biotransplant公司惠赠。重组人源CTLA-4融合蛋白(hCTLA-4Ig)由本室制备。鼠抗人单克隆抗体、FITC荧光标记羊抗鼠IgG购自Sigma。

1.2 动物

封闭群巴马小香猪,雄性,10 kg,4周龄,购自第三军医大学实验动物中心。

1.3 猪骨髓DC的分离、纯化及扩增

无菌条件下取出股骨,去尽附着的肌肉及结缔组织。用含肝素(100 U/ml)的RPMI1640液(Hyclon)冲洗骨髓腔,收集细胞悬液。以淋巴细胞分离液(Ficoll,相对密度1.077,购自天津血液研究所)常规密度梯度离心富集单个核细胞。调整细胞密度,以1×10^6/ml的细胞密度接种细胞于24孔板,加入含10%小牛血清的RPMI1640液(含青霉素100 U/ml,链霉素100 μg/ml)1 ml,添加pGM-CSF(终浓度50 ng/ml),在5% CO_2、饱和湿度及37 ℃的恒温箱中培养。未添加pGM-CSF组为对照组。每隔2天半量换液,并添加细胞因子。2周后收集细胞,进行细胞表面免疫分子检测及混合淋巴细胞培养试验[2,3]。

1.4 细胞表面分子表达的流式细胞仪分析

将上述收集的细胞(密度调至5×10^5/ml)在含10 μg hCTLA-4Ig的2% BSA-PBS中,于4 ℃孵育30 min。PBS洗两遍后,加

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

大鼠抗人 IgG, 4 ℃孵育 30 min。PBS 洗两遍后, 加入 FITC 荧光标记的羊抗大鼠 IgG, 4 ℃孵育 40 min。PBS 洗 2 遍后, 重悬于 2%BSA-PBS 中, 用流式细胞仪(FACS, 美国 Coulter 公司)检测。

1.5 混合淋巴细胞反应

人外周血来源于西南医院血库。Ficoll 梯度离心收集单个核细胞。用尼龙毛柱 4 ℃孵育 40 min 后, 收集人 T 淋巴细胞。酸性-醋酸奈酯酶(Acid α-naphthl acetate esterase, ANAE)染色法鉴定细胞纯度为 96%。常规台盼蓝染色鉴定细胞存活率为 98%。在圆底 96 孔板中, 用 2×10^5 人 T 淋巴细胞为反应细胞, 分别以 500、1 000、10 000 猪 DC 为刺激细胞, 进行混合淋巴细胞培养[4,5]。每组设 3 个复孔。于培养第 5 天加入 5 mg/ml MTT 10 μl, 继续培养 4 h, 用酶联免疫仪(Model 450, Bio-Rad, Japan)以 595 nm 测定各孔吸光度[6]。

2 结果

2.1 猪骨髓 DC 体外培养、富集及光镜观察

由骨髓直接分离的 DC 量很少。培养 3 d 后 DC 逐渐增多, 2 周后可扩增至 70%~80%。光镜下, 细胞成簇生长, 随着培养时间的延长, 细胞逐渐成熟而悬浮生长, 见图 1。电镜下, 该细胞形态不规则, 细胞表面呈毛刺状, 具有典型的 DC 外形, 与小鼠、人来源的 DC 相似, 见图 2。而对照组未见此类细胞。

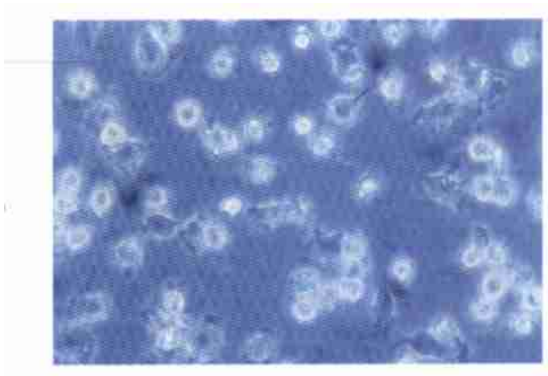


图 1 光镜下猪树突状细胞形态 (×200)

Fig 1 Morphology of DC from porcine bone marrow under a light microscope



图 2 猪树突状细胞电镜下形态 (SME×2 540)

Fig 2 Morphology of DC from porcine bone marrow under an electron microscope (SME×2 540)

2.2 细胞表面免疫分子的流式细胞仪检测

与 hCTLA-4Ig 结合的共刺激分子 B7-1, B7-2 表达经 t 检验, 明显增加, 见表 1。

表 1 B7-1, B7-2 的表达

Tab 1 Expression of B7-1 and B7-2

	Control	Experimental group
B7-1	12.70±3.05	70.50±6.90*
B7-2	9.87±5.01	61.25±5.60*

*: $P<0.01$ *vs* control

2.3 混合淋巴细胞反应

猪 DC 具有强大的刺激人 T 细胞增殖的能力。随猪 DC 数量增加, 刺激人 T 细胞增殖反应越明显, 见表 2。结果以刺激指数表示(Stimulating index, SI)。

SI=(刺激组均值/阴性对照组均值)×100%

刺激组: 100 μl 人 T 细胞悬液+猪 100 μl DC 悬液

阴性对照组: 100 μl 人 T 细胞悬液+100 μl RPMI1640 液

各刺激组吸光度均值与阴性对照组吸光度均值间相差具有显著性($P<0.05$), 见图 3。

表 2 MLR 实验结果

Tab 2 Results of MLR

	500	1 000	10 000
SI	183.29	253.42	401.33

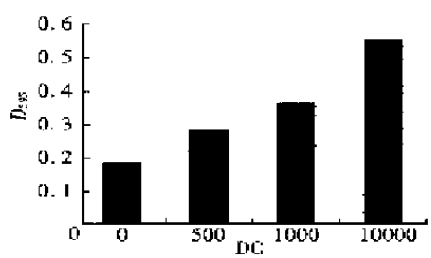


图 3 混合淋巴细胞反应 MTT 测定结果

Fig 3 Results of MLR by MTT assy

3 讨论

树突状细胞是目前发现的功能最强大的抗原提呈细胞(Antigen present cell, APC)。它们能在外周捕获抗原, 迁移至淋巴结, 并将抗原递呈于 T 淋巴细胞。DC 细胞膜表面高水平表达 MHC-Ⅱ及共刺激分子, 可以有效地刺激 T 淋巴细胞。最近发现, T 淋巴细胞辅助的细胞毒性 T 淋巴细胞反应, 也是由 DC 介导的[7]。因此, 在诱导免疫耐受中 DC 起着重要的作用。在异种移植中, T 淋巴细胞反应会十分剧烈。由猪 DC 细胞直接向人 T 淋巴细胞递呈抗原的直接抗原递呈途径十分重要。通过过路白细胞, 猪 DC 可能富集于人体, 引发排斥反应。为了进一步研究猪 DC 在异种移植排斥反应及诱导免疫耐受中的作用, 需要在体外分离、纯化、扩增及培养猪 DC。

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

目前已在人和小鼠的骨髓细胞中鉴定出 DC 的造血祖细胞克隆，它在 GM-CSF 培育下分化成 DC[8~10]。GM-CSF 具有种族特异性。在猪 GM-CSF 诱导下，我们成功培养出猪 DC。根据：① 猪 DC 具有的特征性的形态。② 流式细胞仪检测结果显示该细胞与 hCTLA-4Ig 结合明显增加，提示细胞膜表面表达了大量的 B7 家族共刺激分子。③该细胞具有强大的刺激人 T 细胞增殖的能力，且在一定范围内与数量呈正比关系。

在体外大量培养猪 DC 的方法建立，为深入研究异种移植中直接抗原提呈及诱导免疫耐受打下了基础。

（感谢加拿大 Dalhousie 大学 Geoffery Rowden 教授对本研究的帮助！）

参考文献：

[1] Steinman R M, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell area of lymphoid organs[J]. Immunol Rev, 1997, 156: 25－37.
[2] West K A, Li A, al-Alwan M M, *et al*. Characterization of porcine dendritic cells grown *in vitro*[J]. Transplant Proc, 1999, 31(1-2): 666－667.
[3] Inaba K, Inaba M, Romani N, *et al*. Generation of large number of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. J Exp Med, 1992, 176(6): 1 693－1 695.
[4] Yamada K, Sachs D H, DerSimonian H. Human anti-porcine xenogenic T cell response[J]. J Immunol, 1995, 155(11): 5 249－5 256.
[5] Yamada K. Direct and indirect recognition of pig class Ⅱ antigens by human T cells[J]. Transplant Proc, 1995, 27(1): 258－259.
[6] Sladowski D, Steer S J, Clothier R H, *et al*. An improved MTT assy[J]. J Immunol Methods, 1993, 157(1-2): 203－207.
[7] Ridge J P, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell[J]. Nature, 1998, 393(6 684): 474－478.
[8] Caux C, Dezutter D C, Schmitt D, *et al*. GM-CSF and TNF-a cocoperate in the generation of dendritic Langerhans cells[J]. Nature, 1992, 360(6 401): 258－261.
[9] 谢志芳，曹雪涛. 小鼠骨髓树突状细胞的扩增及其超微结构观察[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(8): 513－515.
[10] 辛　宏，陈　虎. 人外周血树突状细胞的超微结构及其细胞化学特征[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(11): 592－595.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2002)03-0257-01

个案与短篇

抗-Mi^{a}引起配血不合及临床意义

Anti-Mi^a induced incompatibility in blood matching and its clinical significance

吴　毅，肖瑞卿，林武存　（第三军医大学附属西南医院输血科，重庆 400038）

1　临床资料

患者何××，女性，49 岁。4 年前因反复便血行结肠镜检查诊断为直肠癌。于 1996 年 1 月在我院行直肠癌根治性前切除术，术后恢复良好。出现肛门胀痛，排便困难 4 d，于 2000 年 4 月 17 日在我院行剖腹探查术，术中发现直肠腹膜反折以下约 5 cm处有 5 cm×5 cm 的肿块，漫及整个直肠壁，肿瘤侵犯浆膜，无法切除，行预防性横结肠造瘘术，术后恢复好。18 日行化疗，申请备血。在交叉配血时与 ABO 血型相同的献血者的血样在 BioVue 抗人球蛋白配血中主侧发生凝集，现将检测结果报告如下。

2　血型血清学检查

血型鉴定：患者血型 A，ccDE，N。

患者不规则抗体鉴定：患者血清和Ⅲ号筛选细胞在 BioVue 抗人球蛋白试剂中反应为阳性，与Ⅰ、Ⅱ号细胞为阴性。

抗体鉴定结果：详见表 1，通过排除概率从表中可以确定患者血清中含抗-Mi^a。

表 1　抗体鉴定结果

号	D	C	E	c	e	C^w	K	k	Kp^a	Kp^b	Js^a	Js^b	Fy^a	Fy^b	Jk^a	Jk^b	Le^a	Le^b	P$_1$	M	N	S	s	Lu^a	Lu^b	Xg^a	Mi^a	BioVue
Ⅰ	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0
Ⅱ	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0
Ⅲ	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+

吸收放散试验：用 A，Mi^{a}洗涤红细胞同患者血清在 4 ℃条件下吸收 1 h，经吸收后的血清与 A，Mi^{a}和 O，Mi^{a}型红细胞无凝集及溶血现象。吸收后的红细胞洗涤 3 次后在 56 ℃水浴中放散 10 min，放散液与 A，Mi^{a}和 O，Mi^{a}型红细胞均凝集，进一步证明患者血清中含有抗-Mi^a。

抗体效价滴定：用 A，Mi^{a}和 O，Mi^{a}型红细胞测得抗-Mi^{a}效价均为 1∶1。

作者简介：吴　毅（1961－），女，江苏省无锡市人，主管技师，主要从事血型血清学方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(023)68754198

收稿日期：2000-10-10；修回日期：2001-03-25

（下转 260 页）

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