

· 烧伤创面处理与局部免疫 ·

低剂量粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 诱导的小鼠骨髓未成熟树突状细胞 抗成熟特性的研究

王强 彭毅志

【摘要】 目的 观察内毒素/脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)等促成熟物质对低剂量粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)诱导的小鼠骨髓未成熟树突状细胞(DC)成熟特性的影响。方法 制备小鼠骨髓细胞,分别用不同剂量rmGM-CSF培养,6 d后收集悬浮细胞进行检测。用LPS、TNF- α 、IFN- γ 与小剂量rmGM-CSF培养获得的DC(GM^{low}DC)共同孵育3 d后,行混合淋巴细胞反应,观察其诱导未致敏脾淋巴细胞增殖的情况,并与大剂量rmGM-CSF培养获得的DC(GM^{high}DC)进行比较。结果 GM^{low}DC不能激活未致敏脾淋巴细胞,且在与LPS、TNF- α 和IFN- γ 共同培养3 d后,仍不能有效诱导未致敏脾淋巴细胞增殖,刺激指数(SI)均 < 2.00 ;而GM^{high}DC刺激未致敏脾淋巴细胞增殖的能力较强,SI为4.71。结论 GM^{low}DC具有对LPS、TNF- α 和IFN- γ 刺激不敏感的抗成熟特性。

【关键词】 树突细胞; 内毒素类; 肿瘤坏死因子; 干扰素II型; 淋巴细胞培养试验,混合

Study on the anti-maturation features of immature dendritic cells induced by low dosage of granulocyte macrophage colony stimulating factor WANG Qiang, PENG Yi-zhi. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing, 400038, P. R. China

Corresponding author: PENG Yi-zhi, Email: yizhipen@tmmu.com.cn. Tel: 023-68754175

【Abstract】 Objective To investigate the influence of maturative agents, including lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interferon γ (IFN- γ) on the maturation of immature dendritic cells originated from murine bone marrow induced by low dose of granulocyte macrophage colony stimulating factor (rm GM-CSF). Methods Dendritic cells from murine bone marrow progenitors were cultured in low and high doses of GM-CSF for 6 days, and then the suspending cells were harvested for the experiment. After 3 days of co-culture of the obtained DC with low dose rmGM-CSF (GM^{low}DC) with LPS, TNF- α and IFN- γ , the stimulatory capacity of inducing proliferation of non-sensitized splenocytes of GM^{low}DC in mixed lymphocyte reaction (MLR) was observed and compared with that of GM^{high}DC. Results GM^{low}DC could not activate the non-sensitized splenocytes or induce it into proliferation after 3 days of co-incubation with LPS, TNF- α , IFN- γ , with the stimulation index (SI) lower than 2. Whereas GM^{high}DC could strongly activate naive splenocytes (SI = 4.71). Conclusion GM^{low}DC was resistant to maturation and insensitive to the stimulation by LPS, TNF- α or IFN- γ .

【Key words】 Dendritic cells; Endotoxins; Tumor necrosis factor; Interferon Type II; Lymphocyte reaction, mixed

研究证实,联合移植来自同一供者的皮肤和未成熟树突状细胞(dendritic cell, DC)可以成功地诱导耐受,但烧伤患者体内存在的内毒素/脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等物质能增加未成熟DC表面主要组织相容性复合体(MHC) II类分子和协同刺激分子的表达,促使其发

育成熟,而未成熟DC与异基因皮肤联合移植,可借助未成熟DC的不成熟特性,诱导抗原特异性T淋巴细胞无能,从而延长异基因皮肤的存活时间^[1]。本实验拟在体外用LPS、TNF- α 、干扰素 γ (IFN- γ)与未成熟DC共同孵育,观察其诱导小鼠未致敏脾淋巴细胞增殖的情况。

材 料 与 方 法

1. 主要试剂:粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)、LPS购自美国Sigma公司;人抗小鼠CD4、CD8、B淋巴细胞单克隆抗体为美国PharMingen公司产品;TNF- α 、IFN- γ 购自美国Genzyme公

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271341)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信(讯)作者:彭毅志,Email: yizhipen@mail.tmmu.com.cn, 电话:023-68754175

司;山羊补体液、DMEM 培养基均购自美国 Gibco-BRL 公司;RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)为美国 Hyclone 公司产品;氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷 (³H-TdR)购自中国原子能研究所。

2. 动物来源:8~12 周龄 BALB/c 及 C₅₇ 小鼠由本校实验动物中心提供,并由该中心监测所售动物的健康指标。

3. 小鼠骨髓 DC 悬液的制备:参照文献[2]。

4. 未致敏脾淋巴细胞的制备:颈椎脱臼法处死 C₅₇ 小鼠,取出脾脏,置于盛有少量 DMEM 培养液的培养皿中研磨,收集浆液用 100 目铜网过滤后转移至离心管,用 8 g/L Tris-NH₄Cl 溶解红细胞,洗涤后的细胞即为同种异体脾淋巴细胞。

5. 同种混合淋巴细胞反应:将小剂量(0.2 μg/L) rmGM-CSF 培养获得的 DC(GM^{low} DC 悬液,细胞密度为 1 × 10⁵/ml)分为 4 部分:(1) GM^{low} DC;(2) GM^{low} DC + LPS,将 GM^{low} DC 与 25 μg/L LPS 共同孵育;(3) GM^{low} DC + TNF-α,将 GM^{low} DC 与 50 μg/L TNF-α 共同孵育;(4) GM^{low} DC + IFN-γ,将 GM^{low} DC 与 1 000 U/ml IFN-γ 共同孵育。3 d 后,取 96 孔圆底培养板,分为 6 组,每组各 3 个复孔。对照组,每孔加入未致敏脾淋巴细胞 2 × 10⁵ 个;GM^{low} DC 组,每孔加入 GM^{low} DC 和未致敏脾淋巴细胞分别 1 × 10⁵ 个;GM^{low} DC + LPS 组,每孔加入前述与 LPS 共同孵育的 GM^{low} DC 及未致敏脾淋巴细胞各 1 × 10⁵ 个;GM^{low} DC + IFN-γ 组,每孔加入前述与 IFN-γ 共同孵育的 GM^{low} DC 和未致敏脾淋巴细胞各 1 × 10⁵ 个;GM^{low} DC + TNF-α 组,每孔加入前述与 TNF-α 共同孵育的 GM^{low} DC 及未致敏脾淋巴细胞各 1 × 10⁵ 个;大剂量(3.3 μg/L) rmGM-CSF 培养获得的 DC(GM^{high} DC)组,每孔加入 GM^{high} DC 和未致敏脾淋巴细胞各 1 × 10⁵ 个。6 组终体积均为 200 μl,在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱中培养 96 h,培养结束前 16 h,在各孔中加入 3.7 × 10⁴ Bq ³H-TdR。收集细胞,用液体闪烁计数器检测每分钟放射性荧光闪烁计数(cpm)值。计算各组的刺激指数(SI),SI = 实验组 cpm 值/对照组 cpm 值。SI 的标准值为 2.00,SI < 2.00 表示脾淋巴细胞无明显增殖,SI > 2.00 表示脾淋巴细胞增殖明显。

6. 统计学处理:各组 cpm 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行均值配对,行 *t* 检验。

结 果

1. GM^{low} DC 体外培养生长情况:从小鼠骨髓中

获取的祖细胞在加入小剂量 rmGM-CSF 培养 24 h 后,即见贴壁的单核细胞聚集成均匀散在分布的细胞聚体。培养 2 d 后,大量的细胞疏松地贴附于板壁上,呈簇状生长,形如葡萄串。随着培养时间的延长,细胞逐渐发育而悬浮生长。6~7 d,大部分细胞呈悬浮状,形态不规则,可见大量伸展的毛刺。培养板上留有少量贴壁伸展的巨噬细胞(图 1)。

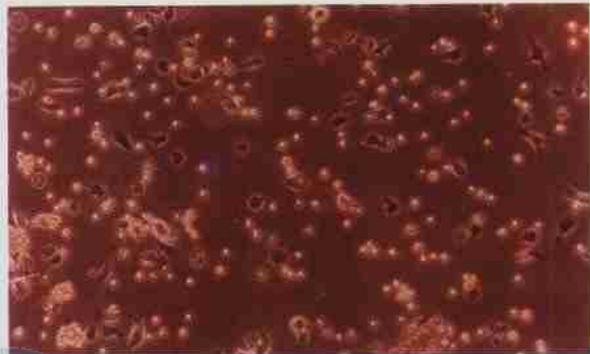


图 1 小鼠骨髓 GM^{low} DC 培养至第 6 天的形态(倒置相差显微镜 ×100)

Fig 1 Typical appearance of GM^{low} DC from murine bone marrow after 6 days of culture. AMR ×100

2. LPS、TNF-α、IFN-γ 对 GM^{low} DC 增殖能力的影响:与对照组相比,GM^{low} DC 组的 cpm 值轻微升高,SI 为 1.18;GM^{high} DC 组的 cpm 值明显升高,SI 为 4.71;GM^{low} DC + LPS、GM^{low} DC + IFN-γ、GM^{low} DC + TNF-α 组 cpm 值有不同程度的升高,但均明显低于 GM^{high} DC 组,SI 均 < 2.00(表 1)。

表 1 各组 DC 激发未致敏脾淋巴细胞增殖能力的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the proliferative power of non-sensitized splenic lymphocytes activated by DC in all groups($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(个)	放射性荧光闪烁计数值(mm ⁻¹)	刺激指数
对照组	3	384.26 ± 76.79	-
GM ^{low} DC 组	3	453.43 ± 98.44	1.18
GM ^{low} DC + LPS 组	3	576.39 ± 110.07	1.50
GM ^{low} DC + IFN-γ 组	3	657.08 ± 135.59	1.71
GM ^{low} DC + TNF-α 组	3	764.68 ± 153.25	1.99
GM ^{high} DC 组	3	1809.86 ± 353.47*	4.71

注:与对照组比较,**P* < 0.01;“-”表示未测此项

讨 论

研究认为,成熟 DC 倾向于免疫激活,未成熟 DC 倾向于免疫耐受,表明 DC 所表达的 MHC 分子、协同刺激分子、黏附分子在很大程度上决定了其对 T 淋巴细胞的影响^[3]。Fu 等^[4]观察到,用协同刺激分子缺乏的未成熟 DC 可以延长心脏移植物的存活。Khanna 等^[5]用肝脏分离的小鼠未成熟 DC 刺激同种 T 淋巴细胞,仅导致微弱的增殖及细胞毒性

反应,而骨髓分离的成熟 DC 则强烈刺激 T 淋巴细胞的上述反应;两种 DC 分别注入受体后,前者出现单个核细胞克隆,其能分泌白细胞介素(IL)10 等可诱导耐受的细胞因子;后者出现 IFN- γ 阳性的可诱发排斥反应的细胞克隆。因此,在诱导免疫耐受中一般采用未成熟 DC。

DC 由未成熟前体细胞向成熟细胞转变的过程,可受多种因素的影响,并同时伴有 DC 表面标志及功能的改变。其中细胞因子是调节 DC 成熟过程的重要因素。参与 DC 个体发育起始阶段的细胞因子种类很多,有促进 DC 分化的 GM-CSF、IL-4、IL-7、Flt-3L、干细胞因子(SCF)、转化生长因子 β (TGF- β)、TNF- α 等。Flt-3L + SCF + IL-7 主要诱导淋巴系 DC 前体细胞分化为 DC;GM-CSF + TNF- α + SCF + IL-4 主要诱导髓系 DC 前体细胞分化 DC,而 TGF- β 主要抑制 DC 前体细胞分化发育和成熟。此外,DC 所处的局部微环境在调节其成熟的过程中也起着十分重要的作用。例如,小鼠肝脏的 DC 在成熟过程中,需要 I 型胶原作为其生长的基质^[6]。

来源于骨髓的 DC 前体经血液循环进入非淋巴组织,分化为未成熟的 DC,定居于上皮组织、胃肠道、生殖和泌尿道、气道以及肝、心、肾等实质脏器的间质。这种未成熟 DC 具有很强的摄取、处理和加工抗原的能力,但其递呈抗原的能力很弱。在微环境中炎性因子(如 TNF- α 、LPS)和抗原物质的刺激下,DC 逐渐成熟,细胞表面表达归巢受体 CCR-7,并进入局部淋巴结。在迁移过程中,DC 逐渐成熟,其摄取和加工抗原的能力逐渐减弱,而抗原递呈能力逐渐增强,表现为形态学的改变,诸如胞浆减少,树枝状形态的增加以及表型的改变,使 DC 中 MHC-II 类分子的表达保持在较高水平,并上调 CD40、CD80、CD86 等辅助分子的表达,同时其产生 IL-1 等细胞因子的能力增强。

大面积烧伤患者体内存在大量的 LPS 以及炎性介质,这些物质已被证实能促进 DC 的成熟,提高协同刺激分子水平的表达^[7]。而对于原先建立的体外培养 DC 的方法,已有研究报道,依靠这些方法获得的细胞在与 LPS、TNF- α 和 IFN- γ 共同孵育一段时间后,从表型和功能上均有进一步发育成熟的倾向。因此,当这些细胞与异基因皮肤进行联合移植时,容易被体内的促成熟物质刺激而继续发育,不能很好地保持诱导免疫耐受的特性,最终导致移植皮肤的排斥。

在本研究中,笔者采用小剂量(较以往的浓度

低 40 ~ 100 倍)rmGM-CSF 体外培养扩增小鼠骨髓单个核细胞获得 GM^{low} DC,它们除在表型和功能上保持了未成熟 DC 的特性外,还对 LPS、TNF- α 和 IFN- γ 等促成熟物质的刺激有耐受现象,但其确切机制有待阐明。笔者认为,小剂量的 rmGM-CSF 诱导增生的 GM^{low} DC 主要是未成熟 DC,它具有 DC 的典型形态,在体外不能激发未致敏脾淋巴细胞增殖,并且与 LPS、TNF- α 和 IFN- γ 等促成熟物质共同孵育后,其诱导未致敏脾淋巴细胞增殖的能力无明显增强,说明 GM^{low} DC 并不完全等同于以往意义上的未成熟 DC,它具有抗成熟的特性;而大剂量的 rmGM-CSF 培养获得的 GM^{high} DC 主要是成熟 DC,能够强烈地激发未致敏脾淋巴细胞增殖。Austyn^[8] 从小鼠骨髓中获得了具有抗成熟特性的 DC,并在动物实验中成功诱导耐受,这与笔者的结果相似。在此基础上,有学者提出该种细胞可能是一种新型的 DC,不同于体内处于某一发育阶段的未成熟 DC,关于它的分类及细胞行为有待进一步研究^[9]。本研究中,笔者建立的方法所获得的未成熟 DC 不仅可诱导未致敏脾淋巴细胞无能,还有对抗 LPS、TNF- α 和 IFN- γ 等促成熟物质的特性,拥有良好的应用前景,为今后的研究奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- 1 Eto M, Hackstein H. Promotion of skin graft tolerance across MHC barriers by mobilization of dendritic cells in donor hemopoietic cell infusions. *J Immunol*, 2002, 169: 2390 - 2396.
- 2 王强, 彭毅志. 小鼠骨髓未成熟树突状细胞体外扩增及鉴定. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 332 - 335.
- 3 曹雪涛. 树突状细胞的研究热点及其与疾病的防治. *中华医学杂志*, 1999, 79: 163 - 165.
- 4 Fu F, Li Y, Oian S, et al. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation*, 1996, 62: 659 - 665.
- 5 Khanna A, Morelli AE, Zhong C, et al. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J Immunol*, 2000, 164: 1346 - 1354.
- 6 Lina L, Jack W. Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using GM-CSF and their maturational development in the presence of type-I collagen. *J Exp Med*, 1994, 179: 1823 - 1834.
- 7 李建明, 肖光夏. 细菌及内毒素活化树突状细胞的研究进展. *中华烧伤杂志*, 2003, 19: 123 - 125.
- 8 Austyn JM. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162: 146 - 150.
- 9 Lutz MB, Suri RM. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol*, 2000, 30: 1813 - 1822.

(收稿日期: 2004 - 03 - 24)

(本文编辑: 张 红)