

# 小鼠骨髓未成熟树突状细胞体外扩增及鉴定

王强 彭毅志

**【摘要】** **目的** 建立体外大量扩增小鼠未成熟树突状细胞(DC)的方法,从形态学、免疫表型和细胞功能试验等方面予以鉴定。 **方法** 制备小鼠骨髓细胞,分别用不同剂量重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)培养,7 d后收集悬浮细胞进行扫描电镜观察和免疫表型鉴定,并行混合淋巴细胞反应,观察其诱导未致敏T淋巴细胞增殖的情况。 **结果** 小剂量 rmGM-CSF 培养获得的DC(GM<sup>low</sup>DC)具有DC的典型特征,细胞表面高表达CD11c,低表达CD40、I-A/I-E,不表达B7-1,与大剂量 rmGM-CSF 培养获得的DC(GM<sup>high</sup>DC)相比,其体外刺激未致敏T淋巴细胞增殖的能力较弱。 **结论** 本实验中获得的GM<sup>low</sup>DC形态上具有DC的典型特征,在细胞表型、细胞功能试验上具有未成熟的特性,说明所建立的培养未成熟DC的方法是可行的;rmGM-CSF的剂量与细胞的成熟程度相关,一般说来,较大剂量的rmGM-CSF诱导生成的细胞以成熟DC为主,小剂量rmGM-CSF诱导生成的细胞以未成熟DC为主。

**【关键词】** 树突细胞; 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子; 细胞,培养的; 免疫耐受

*In vitro amplification and identification of immature dendritic cells from murine bone marrow* WANG Qiang, PENG Yi-zhi. Institute of Burn Research, Southwestern Hospital, State key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

**【Abstract】** **Objective** To establish a method for in vitro amplification of immature dendritic cells from murine bone marrow, and to identify it with morphological, immunological phenotype determination, and functional examination. **Methods** Dendritic cells from murine bone marrow were cultured with different dosage of rmGM-CSF. The suspending cells were examined with scanning electronic microscope, and the non-sensitized T lymphocyte proliferation was observed by mixed lymphocyte reaction. **Results** Dendritic cells(DC) cultured in lower dosage of rmGM-CSF(GM<sup>low</sup>DC) exhibited typical characteristics of DCs with high expression of CD11c and low expression of CD40 and I-A/I-E, and non-expression of B7-1 on the surface of the cells. The capacity of GM<sup>low</sup>DC to stimulate the proliferation of non-sensitized T lymphocyte in vitro was weaker than that of GM<sup>high</sup>DC. **Conclusion** GM<sup>low</sup>DC exhibited typical characteristics of DC, immature in cell phenotype and cell functions, suggesting that our methods of immature DCs culturing was feasible. The dosage of rm GM-CSF has direct relationship with the maturation degree of DC. Generally speaking, mature DC was mainly induced by high dosage of rmGM-CSF, while immature DC by low dosage.

**【Key words】** Dendritic cells; Granulocyte-macrophage colony stimulating factor; Cell, cultured; Immune tolerance

同种异体皮肤移植为大面积深度烧伤早期有效地覆盖创面提供了一个良好的思路,但移植后产生的排斥反应制约了该技术的应用。目前国外有学者运用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),在小鼠身上成功诱导了皮肤移植耐受<sup>[1]</sup>,而国内尚无同类研究报道。笔者采用微染色体介导的基因转移技术,构建携带皮肤供者主要组织相容性抗原的第三方未成熟DC,试图增强其诱导移植耐受的效果,为解决临床上皮源与未

成熟DC源不一致的矛盾打下基础。本实验首先建立体外大量扩增未成熟DC的方法,即分别运用大剂量和小剂量粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)对小鼠骨髓源的祖细胞进行培养,并从形态学、组合性细胞表面标志、混合淋巴细胞反应中刺激未致敏T淋巴细胞增殖3方面进行鉴定,探讨不同剂量rmGM-CSF对小鼠DC分化成熟的影响。

## 材料与方 法

1. 主要试剂:rmGM-CSF 购自美国 Sigma 公司;大鼠抗小鼠 CD40、B7-1 购自美国 Santa Cruz 公司;大鼠抗小鼠 I-A/I-E、羊抗大鼠 IgG 荧光二抗、人抗小鼠 CD4、CD8、B 细胞单抗均为美国 Phar Mingen 公司产品;山羊补体液、DMEM 培养基购自美国

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,创伤烧伤复合伤国家重点实验室

通讯作者:彭毅志(电话:023-68754175, E-mail: yizhipen@mail.tmmu.com.cn)400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所

Gibco-BRL 公司; RPMI 1640 培养液、胎牛血清 (FBS) 为美国 Hyclon 公司产品; 氘标记胸腺嘧啶脱氧核苷 ( $^3\text{H-TdR}$ ) 购自中国原子能研究所。

2. 动物来源: 8 ~ 12 周龄 BALB/c 小鼠由本校实验动物中心提供, 并由该中心监测动物健康指标。

3. 小鼠骨髓 DC 悬液的制备参照文献 [2]。颈椎脱臼法处死 BALB/c 小鼠, 取其完整的股骨、胫骨, 剔净周围组织, 离断干骺端后, 用皮试针抽吸 RPMI 1640 培养液冲洗髓腔, 获得单细胞悬液。然后用质量浓度 0.8% Tris- $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶解红细胞, 加入抗鼠 CD4 单抗、抗鼠 CD8 单抗、抗鼠 B 细胞单抗各 0.5 ml, 置 4℃ 冰箱 30 min, 离心洗涤 2 次。按沉淀细胞比容, 以 1:10 的体积比加入补体工作液 (66.7 mg/L) 重悬细胞, 混匀, 37℃ 水浴 30 min。用 PBS 洗涤 2 次, 将细胞重悬于 RPMI 1640 培养液中 (含 100 U/ml 青霉素、100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素、2 mmol/L 谷氨酸、体积分数 10% FBS), 接种于 6 孔培养板内, 细胞密度  $1 \times 10^5/\text{ml}$ , 4 ml/孔。分为两组, 小剂量组每孔加入 rmGM-CSF 0.8 ng; 大剂量组每孔加入 13.2 ng。隔天轻轻振荡培养板 1 min, 用胶头滴管吸弃大部分培养液, 以去除悬浮生长的粒细胞, 并补充新鲜培养液。培养至第 6 天, 收集悬浮细胞进行实验。

4. 扫描电镜分析: 用胶头滴管收集悬浮生长的小剂量 rmGM-CSF 培养获得的 DC ( $\text{GM}^{\text{low}}$  DC) 于离心管中, 调节细胞密度至  $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。吸取 1 ml 细胞悬液于 1.5 ml 尖底离心管中, 离心后弃上清, 加入体积分数 4% 戊二醛摇匀、固定, PBS 洗涤 1 次, 制成悬液滴片, 再用质量浓度 1% 的锇酸固定 1 h, 梯度乙醇脱水后, 在扫描电子显微镜下观察摄片。

5. 细胞表面标志物的流式细胞仪 (美国 Beckman 公司) 检测: 将上述收集的细胞 (密度调至  $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) 分别在含 5  $\mu\text{g}$  单抗 [(大鼠抗小鼠 CD40、B7-1、I-A/I-E、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的仓鼠抗小鼠 CD11c)] 的 PBS 中冰浴 30 min; PBS 洗涤细胞 2 次后, 于前 3 管中加入 FITC 标记的羊抗大鼠 IgG, 冰浴 30 min, 洗涤 2 次重悬于 1 ml PBS 溶液中, 用流式细胞仪检测。

6. 同种混合淋巴细胞反应: 颈椎脱臼法处死 C57 小鼠 (本校实验动物中心), 取其脾脏置于盛有少量 DMEM 培养液的培养皿中, 用玻璃针筒研磨, 匀浆用 100 目铜网过滤后移至离心管, 用质量浓度 0.8% Tris- $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶解红细胞, 洗涤后的细胞即为同种异体 T 细胞。取 96 孔圆底培养板, 分 3 组, 每组各 4 个复孔。对照组: 每孔加入未致敏的 T 细胞

$2 \times 10^5$  个;  $\text{GM}^{\text{low}}$  DC 组: 每孔各加入  $\text{GM}^{\text{low}}$  DC 和未致敏 T 细胞各  $1 \times 10^5$  个; 大剂量 rmGM-CSF 培养获得的 DC ( $\text{GM}^{\text{high}}$  DC) 组: 每孔各加入  $\text{GM}^{\text{high}}$  DC 和未致敏 T 细胞各  $1 \times 10^5$  个。3 组终体积均为 200  $\mu\text{l}$ , 并在 37℃、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 96 h, 培养结束前 16 h, 在各孔中加入  $3.7 \times 10^4$  Bq  $^3\text{H-TdR}$ 。收集细胞, 用液闪计数器检测每分钟放射性荧光闪烁计数值, 结果以 3 孔均值表示。

7. 统计学处理: 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验进行统计学分析。

## 结 果

1.  $\text{GM}^{\text{low}}$  DC 体外培养生长情况: 从骨髓中获取的祖细胞在加入小剂量 rmGM-CSF 培养 24 h 后, 倒置相差显微镜下可见贴壁的单核细胞聚集成均匀分布的细胞聚集体, 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 (图 1)。随着培养时间的延长, 细胞逐渐发育呈悬浮生长, 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 2)。

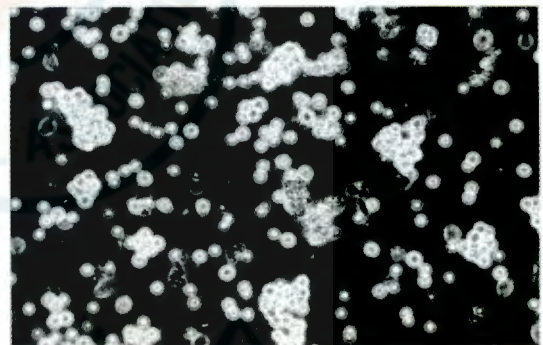


图 1 小鼠骨髓  $\text{GM}^{\text{low}}$  DC 培养第 3 天生长情况 倒置相差显微镜  $\times 100$

Fig1 The growth conditions of  $\text{GM}^{\text{low}}$  DC on the 3<sup>rd</sup> day of culture AMR  $\times 4\ 000$

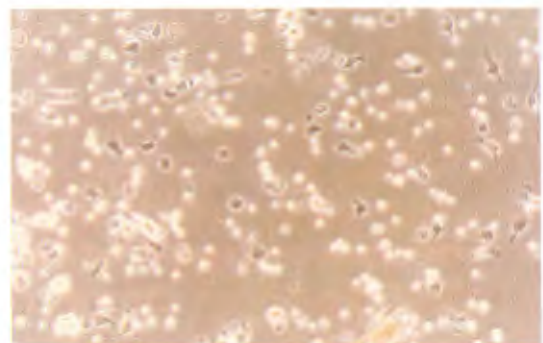


图 2 小鼠骨髓  $\text{GM}^{\text{low}}$  DC 培养第 7 天生长情况 倒置相差显微镜  $\times 100$

Fig2 The growth conditions of  $\text{GM}^{\text{low}}$  DC on the 7<sup>th</sup> day of culture AMR  $\times 4\ 000$

2. 扫描电镜观察:  $\text{GM}^{\text{low}}$  DC 细胞形态不规则, 表面粗糙, 如罩薄纱, 有大量皱褶和不规则突起 (图 3)。

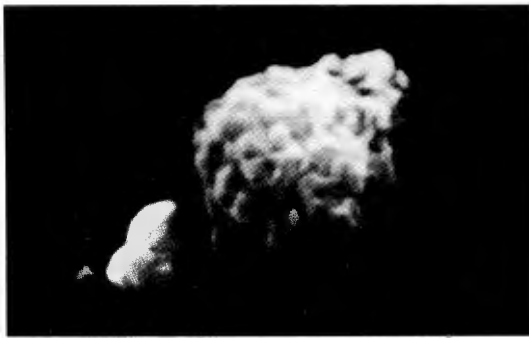


图3 小鼠骨髓 GM<sup>low</sup> DC 电镜下的形态 扫描电镜 × 4 000

Fig3 Morphology of Gm<sup>low</sup> DC under scanning electronic microscope AMR × 4 000

3. 细胞表面标志物的检测:小剂量 rmGM-CSF 培养骨髓源祖细胞 6 d 所获得的悬浮细胞表面,DC 标志物 CD11c 阳性率为 72.4%, 远高于对照组的 28.1%; CD40、I-A/I-E 的阳性率分别为 33.8% 和 34.8%, 与对照组比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); B7-1 的阳性率低于对照组。该细胞的表型为 CD11c<sup>high</sup>、CD40<sup>low</sup>、I-A/I-E<sup>low</sup>、B7-1<sup>neg</sup>, 与文献报道的未成熟 DC 表型特征<sup>[3]</sup>一致。

4. 同种混合淋巴细胞反应:本实验中与对照组相比,GM<sup>low</sup> DC 组的每分钟放射性荧光闪烁计数均值轻微升高,刺激指数(SI)为 1.15 < 2; GM<sup>high</sup> DC 组的每分钟放射性荧光闪烁计数均值明显升高, SI 为 3.39 > 2(表 1)。

表 1 各试验组 DC 激发未致敏 T 淋巴细胞增殖能力的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab1 Comparison of proliferation capacity of non-sensitized T lymphocyte in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 试验分组                    | 孔数 | 放射性荧光闪烁计数值( $\text{min}^{-1}$ ) | 刺激指数  |
|-------------------------|----|---------------------------------|-------|
| 对照组                     | 4  | 429.33 ± 166.02                 | -     |
| GM <sup>low</sup> DC 组  | 4  | 492.67 ± 111.42                 | 1.15  |
| GM <sup>high</sup> DC 组 | 4  | 1 454.00 ± 780.53*              | 3.39* |

注:刺激指数 = 试验组每分钟放射性荧光闪烁计数值/对照组每分钟放射性荧光闪烁计数值;与对照组比较, \*  $P < 0.05$

### 讨 论

在大面积深度烧伤患者的救治中,创面处理是核心问题,因为大面积的深度烧伤不仅创面渗出和体液丢失量大,而且创面是伤后细菌感染的主要来源,是引起患者死亡的重要原因。早期如果能及时、有效地覆盖创面,将对后续的治疗产生积极的影响。但由于患者创面较大,自体皮源有限,异体皮移植容易产生排斥反应,如何成功解决这一难题,多年来一直困扰着临床医生。

随着免疫学的发展,人们对器官移植后免疫排

斥反应发生的机制有了新的认识,如何诱导同种异体器官移植耐受成为众多学者瞩目的焦点。Rao 等<sup>[5]</sup>在研究实质脏器移植时指出,如果与骨髓细胞(内含造血干细胞、DC 祖细胞、未成熟 DC 等)联合移植,将显著延长移植物的存活时间,其中主要是未成熟 DC 参与了免疫耐受的诱导。近几年关于来自同一供者的器官和未成熟 DC 联合移植的研究较多,效果也较肯定。有学者观察到在术前输入供者源的未成熟 DC,将使移植物的存活时间达到 1 年以上,并在此基础上提出“克隆清除”(clonal deletion)学说,其机制为:移植术前给予供者源的未成熟 DC,由于其细胞表面携带有供者抗原又缺乏 B7 分子,当它与受者体内能特异性识别供者抗原的 T 细胞结合后,诱导该细胞无能,导致受者特异性的对供者抗原不应答,从而建立移植耐受<sup>[6]</sup>。本实验混合淋巴细胞反应中,T 细胞转化时要复制染色体,其转化程度与染色体复制成正比,后者又与 DNA 合成即<sup>3</sup>H-TdR 掺入量成正比,<sup>3</sup>H-TdR 的掺入量由每分钟放射性荧光闪烁计数反映出来<sup>[4]</sup>。结果 GM<sup>low</sup> DC 组 SI 值略大于 1,说明 T 细胞大量失活,也印证了上述学说。

临床所使用的未成熟 DC 主要来自健康志愿者,异体皮主要来自死后捐赠者,因此患者往往接受的是来自并非同一供者的皮肤和未成熟 DC,即第三方(third-party type)模式。由于第三方的未成熟 DC 表面并不携带皮肤供者抗原,进入受者体内后要发挥诱导耐受的作用首先必须摄取、加工、提呈供者抗原,使它的作用大打折扣。因此如何改造第三方的未成熟 DC,使它能更好地发挥诱导耐受作用,已成为临床应用中急待解决的问题。本研究是采用转基因技术制备转基因未成熟 DC,即将皮肤供者的主要组织相容性抗原基因转染第三方的未成熟 DC,使其表面携带皮肤供者抗原,以增强其诱导异基因皮肤移植耐受的效应。

由于人体内 DC 的数目较少,仅相当于单核细胞成分的 1% 左右,其中未成熟 DC 主要分布于非淋巴组织如皮肤、胃肠道、泌尿生殖道以及实质器官如肾脏等部位。直接从组织中分离提纯未成熟 DC,不仅步骤繁杂而且获得的细胞数量少,不能满足实验和临床应用的需要。令人欣慰的是目前关于 DC 的体外培养扩增已取得了一定的进展,人们已能应用细胞因子诱导 DC 前体细胞从而获得一定数量的不同发育阶段的 DC。研究结果较肯定的是 GM-CSF 的量与培养 DC 的成熟程度明显相关,一般说来,较

大剂量的 GM-CSF 诱导生成的细胞以成熟 DC 为主,而小剂量 GM-CSF 诱导生成的细胞以未成熟 DC 为主。白细胞介素 4(IL-4)浓度为 500~1 000 U/ml 时,可抑制巨噬细胞的生成,并与小剂量 GM-CSF 有协同作用,增加收获细胞的数量和成熟程度;而与大剂量的 GM-CSF 联合使用时,未观察到明显的效果<sup>[7]</sup>。LPS、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$  型干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 是被公认的促使 DC 成熟的因子,而 IL-10 和转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 则可抑制 DC 的发育成熟,其中经 IL-10 处理的 DC 可致 T 细胞无能或凋亡,有报道这些细胞可引起 Th1 向 Th2 的免疫偏离, TGF- $\beta$  则不仅抑制 DC 成熟,还可增加 DC 的产量<sup>[8]</sup>。这些细胞因子对 DC 的作用机制比较复杂,其效果与 DC 的组织来源和培养方法有关<sup>[9]</sup>。

本实验采用了直接分离与体外诱生相结合的方法。首先利用低渗裂解、特异性 T 细胞和 B 细胞单抗、补体依赖的细胞毒性作用、黏附性差,从骨髓细胞中分离出纯度较高的 DC 前体,它在 GM-CSF 刺激下可继续分化为 3 种细胞,分别是 DC、粒细胞、巨噬细胞。利用其不同的生长特性即粒细胞悬浮生长、DC 疏松贴壁、巨噬细胞紧密贴壁,可将它们分离。若用小剂量的 GM-CSF 体外诱生及扩增,且无其他促成熟因素如 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、LPS 等存在时,获得的相当数量的 DC 在表型和功能上是未成熟的,对 LPS、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  等促成熟物质的刺激有耐受现象,其确切机制有待阐明。在本实验中,平均每只小鼠股骨、胫骨骨髓可收获  $8 \times 10^5$  个未成熟 DC,这与所用 GM-CSF 量少有关。如果增大 GM-CSF 的剂量,有可能提高细胞的产量,增加 DC 的成熟程度,降低未成熟 DC 的纯度。国外有学者曾利用免疫磁珠阳性选择的方法进一步去除其中的粒细胞,使未成熟 DC 纯度达 99% 以上<sup>[10]</sup>。

按本实验建立的方法扩增产生的细胞具有 DC

的典型形态,高表达 DC 的特异性抗原 CD11c,低表达人类主要组织相容性复合物 II 类分子和协同刺激分子 B7-1 等,体外激发未致敏 T 淋巴细胞增殖能力较弱。结果表明该方法可以在体外大量扩增未成熟 DC,为关于未成熟 DC 的下一步研究及临床应用打下了基础。

#### 参 考 文 献

- 1 Eto Masatoshi, Hackstein Holger. Promotion of skin graft tolerance across MHC barriers by mobilization of dendritic cells in donor hematopoietic cell infusions. *J Immunol*, 2002, 169: 2390-2396.
- 2 Yamaguchi Y, Tsumura H. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells*, 1997, 15: 144-153.
- 3 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.
- 4 朱立平,主编. 免疫学常用实验方法. 北京:人民军医出版社, 2000. 179-180.
- 5 Rao AS, Phil D, Starzl TE. An attempt to induce tolerance with infusion of donor bone marrow in organ allograft recipients. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 417: 269-274.
- 6 Higuchi M, Zeng D. Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NK T cells and clonal deletion. *J Immunol*, 2002, 15, 169: 5564-5570.
- 7 Hope JC, Werling D. Flt-3 ligand, in combination with bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-4, promotes the growth of bovine bone marrow derived dendritic cells. *Scand J Immunol*, 2000, 51: 60-66.
- 8 De ST, Van MM. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol*, 1997, 27: 1229-1235.
- 9 Yang D, Howard OM. Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J Immunol*, 1999, 163: 1737-1741.
- 10 Inaba K, Inaba M. Generation of large number of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 1992, 176: 1693.

(收稿日期:2003-06-19)

(本文编辑:赵敏 王旭)

#### · 消息 ·

### 欢迎订阅《中华整形外科杂志》

《中华整形外科杂志》创刊于 1985 年,为中华医学会主办的整形外科专业学术期刊。刊登对整形外科发展具有导向性、指导性的评论文章,报道整形外科领域先进的科研成果和诊疗经验,以及对整形外科临床有指导作用、与整形外科临床密切结合的基础理论研究。主要栏目有:论著、工作研究、经验交流、病例报告、技术改进、综述、讲座、警钟等。本刊为双月刊,大 16 开,定价 12 元,全年 72 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号为 18-95。本刊编辑部亦可随时为广大读者代办邮购(免邮寄费),如需挂号邮寄,每期增加 2 元挂号费。编辑部地址:北京市石景山区八大处路整形医院《中华整形外科杂志》编辑部,邮编:100041;电话:(010)88703789;传真:(010)88960006;E-mail:cmazhx@Public.sti.ac.cn。

《中华整形外科杂志》编辑部