

大鼠骨髓来源未成熟与成熟树突状细胞的对比研究

曹 姣¹ 李 杨² 杨 阳² 郭树忠^{3△} 韩 岩³

(西京医院整形外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:对比培养大鼠骨髓来源的未成熟树突状细胞与成熟树突状细胞,并从形态学、表型及功能检测等多方面进行对比研究,为后续的实验做出基础研究。方法:大鼠脱臼法处死后取两侧胫骨、股骨,PBS冲洗骨髓腔收集骨髓细胞,经GM-CSF和IL-4刺激培养六天后,对比研究经LPS刺激组与未经LPS刺激培养组细胞状况。结果:①成熟树突状细胞悬浮生长,集落分散,扫描电镜下见其突起数目明显多于未成熟树突状细胞。②成熟树突状细胞高表达表面标记分子CD80、CD86、MHC,而未成熟树突状细胞均低表达。③成熟树突状细胞培养基上清中IL-12水平高,而未成熟树突状细胞培养基上清中IL-12水平低。④成熟树突状细胞具有强的刺激T细胞增殖能力,而未成熟树突状细胞基本不具有诱导T细胞增殖能力。结论:未成熟状态的树突状细胞具备致耐受原性,可抑制T细胞的应答,而成熟状态的树突状细胞由于获得了免疫刺激潜能从而会对炎性刺激做出反应。

关键词 大鼠;未成熟树突状细胞;成熟树突状细胞

中图分类号:Q95-3,R318.15 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)06-1031-03

Contrastive Studies of Rat Bone Marrow-Derived Immature Dendritic Cells and Mature Dendritic Cells

CAO Jiao¹, LI Yang², YANG Yang², GUO Shu-zhong^{3△}, HAN Yan³

(Department of Plastic Surgery, Xi Jing Hospital, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objectives: To investigate the difference of morphology and phenotype and functionally tested between the rat bone marrow-derived immature dendritic cells and the rat bone marrow-derived mature dendritic cells as a basic research for latter experiment. **Methods:** The rats were put to death by dislocation, and then all the shin bones and thigh bones were taken to collect the bone marrow cells by flushing the marrow cavity with PBS, culture the collecting cells with GM-CSF and IL-4 for 6 days. One sample was cultured with LPS and the other without LPS. **Results:** ① Mature dendritic cells are suspending growth and have the disperse colonies, prominence increased significantly. ② Surface molecular markers including CD80 and CD86 and MHC had high expression in mature dendritic cells while which was low in immature dendritic cells. ③ The content of IL-12 in cell culture medium was detected by IL-12 kit. Mature dendritic cells had a high level and the immature dendritic cells had a low level. ④ Mature dendritic cells had strong stimulation abilities to the growth of T cells while immature dendritic cells do not have. **Conclusion:** The immature dendritic cells have the tolerance to restrain the response of T cells, while the mature dendritic cells will do a response to the inflammatory stimulation due to getting the potential of immune irritancy.

Key words: Rat; Immature dendritic cells; Mature dendritic cells

Chinese Library Classification: Q95-3, R318.15 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)06-1031-03

前言

树突状细胞是一类分布广泛且功能最强的抗原提呈细胞,同时具备调节固有免疫应答及适应性免疫应答的能力。未成熟状态的树突状细胞具备致耐受原性,可抑制T细胞的应答,而成熟状态的树突状细胞由于获得了免疫刺激潜能从而会对炎性刺激做出反应。本文对未成熟DCs与成熟DCs的培养方法及生物学性状做了详细的对比分析,为各种实验中对这两种细胞的选择做了良好的基础研究。

1 材料与方法

1.1 动物

健康8-10周龄SD大鼠,240~280g,雌雄不限,由第四军医大学动物实验中心提供。

1.2 试剂

rrGM-CSF、rrIL-4为PEPROTECH公司产品,LPS为Sigma公司产品,异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红蛋白(PE)标记的抗大鼠CD80、CD86、OX62及MHC-II购自英国Serotec公司。红细胞裂解液购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 骨髓前体细胞的制备

健康8-10周龄SD大鼠,颈椎脱臼法处死后下腹及双后肢备皮,以75%医用酒精浸泡5-10min。无菌手术取出大鼠两侧股骨及胫骨,用PBS冲洗3次后,用盛有PBS的培养皿移至超净台中进行操作。咬骨钳咬去长骨两端,10ml灭菌注射器抽

作者简介:曹姣(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:复合组织移植

△通讯作者:郭树忠,电话:029-84775301,

E-mail: shuzhong@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-10-07 接受日期:2011-10-31)

取PBS,将针头分别插入骨髓腔两端,进行反复冲洗,将骨髓腔内的骨髓冲至新培养皿中,吹打均匀后收集入离心管。 4°C 1300-1500 rpm/min,离心 3-5 min,弃上清。加入红细胞裂解液 1-2 ml,重悬,混匀,离心,弃上清。加入 PBS 2 ml 重悬,混匀,离心,弃上清,重复 2 次后,收集沉淀的骨髓细胞。

1.4 未成熟树突状细胞的分离与培养

DC 细胞培养基(即含 rrGM-CSF 20 ng/ml、rrIL-4 10 ng/ml、1%青、链霉素、10% FBS 的 RPMI 1640 培养基)将制备的骨髓细胞重悬至 10 ml,接种于无菌大培养皿中, 37°C 5% CO_2 培养。第 2、4 天半量更换培养基,即轻轻吸出半量培养上清后,补充等量的 DC 细胞培养基,第 6 天收获细胞,吸弃悬浮细胞的培养基上清,以 PBS 轻轻吹打剩余的贴壁细胞并收集之即可得到未成熟的树突状细胞。

1.5 脂多糖刺激未成熟树突状细胞成熟

将收获的未成熟树突状细胞重悬于 10 ml DC 培养基中,接种于无菌大培养皿,加入 LPS 浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 培养 3 天(总培养流程的第 9 天)收获悬浮细胞,为成熟的树突状细胞。

1.6 培养液上清 IL-12 的检测

分别收集第 6 天未成熟树突状细胞的培养液上清及第 9 天成熟树突状细胞的培养液上清,采用双抗夹心 ELISA 法测定 IL-12 含量,按试剂盒说明书操作,根据标准曲线用间接法求出各孔 IL-12 的含量(pg/mL)。

1.7 流式细胞分析术

在两组细胞中,分别取 1×10^6 个/ml 细胞,分别加入 $1\mu\text{g}$ 的 CD80-FITC、CD86-FITC、MHCII-FITC, 4°C 孵育 30 min,1500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 漂洗,应用流式细胞仪检测,CellQuest Plot 软件分析数据。

1.8 混合淋巴细胞反应

取 200gSD 大鼠外周血,Percoll 分离液提取外周血单个核细胞(PBMC),以 RPMI1640 重悬, 37°C 5% CO_2 条件下贴壁 2h,收集悬浮细胞,并用尼龙毛刷柱富集 T 淋巴细胞作为效应细胞。分别取未成熟树突状细胞、诱导至成熟的树突状细胞、未经诱导的骨髓间充质干细胞(对照)经 60°C (30Gy)照射灭活,作为刺激细胞。将刺激细胞和效应细胞以 1:6.6、1:20、1:66、1:200、1:666、1:2000 的比例(其中效应细胞为 2×10^5 孔,每组 4 个复孔)混合,终体积 $200\mu\text{L}$, 37°C 、5% CO_2 、100%湿度条件下进行混合淋巴细胞培养,96h 后,加入 MTT $20\mu\text{L}/\text{孔}$ 继续孵育 4h 终止培养,离心(1000 rpm 5 min)后弃去上清,加入 DMSO $150\mu\text{L}/\text{孔}$,震荡 10 min,酶联免疫分析仪于波长 490 nm 处检测 A490 值,结果以 4 孔均值表示。最后的刺激指数 SI = (实验孔 - 空白)/(对照孔 - 空白)。

1.9 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行数据处理及图表绘制。

2 结果

2.1 形态学观察的结果

未经 LPS 刺激的未成熟树突状细胞,在光镜下可观察到呈葡萄串样生长,轻轻吹打可脱落。电镜下观察到细胞表面褶皱多、短刺状突起少,经 LPS 刺激成熟的树突状细胞,光镜下见集落分散,大部分呈细胞悬浮生长,细胞体积进一步增大,分布较均匀,边界可见明显的毛刺样突起。电镜下观察到细胞表面大量褶皱和粗细不等的树枝样突起。图 1 为 LPS 刺激前后,电镜下观察 DC 突起数目大于 50 和小于 50 细胞数占总细胞数的百分比。

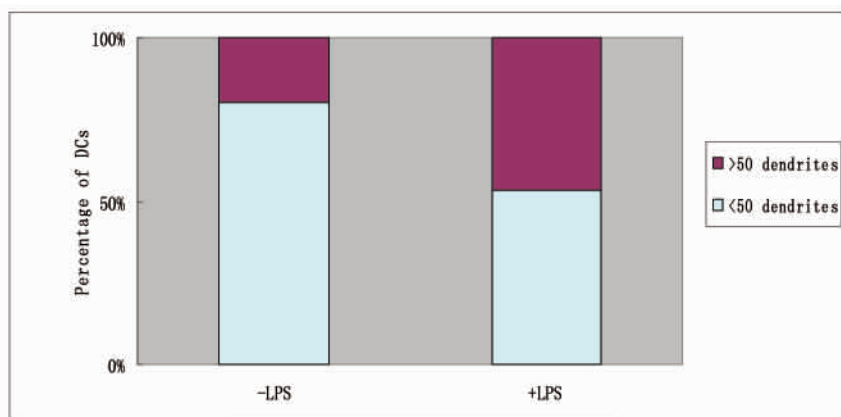


图 1 电镜下观察 DC 突起数目大于 50 和小于 50 细胞数占总细胞数的百分比

Fig. 1 Percentage of cells accounted for the total cell number refers to <50%, >50% by observing dendrite number of DCs in electron microscopy

2.2 表型检测

培养至第 6 天的未成熟树突状细胞,其表面标志分子 OX62 的表达率为 61.10%,OX62 阳性细胞的 CD80、86、MHC II 低表达 3.72%、6.44%、6.58%。培养至第 9 天经 LPS 刺激成熟的树突状细胞其表面标志分子 OX62 的表达率为 72.41%,OX62 阳性细胞的 CD80、CD86、MHC 高表达 79.12%、74.85%、84.73%。

2.3 测上清 IL-12 的表达情况

细胞因子检测结果表明:未经 LPS 刺激组,上清中 IL-12

水平为 252.6 pg/ml,经脂多糖刺激成熟组,上清中 IL-12 的水平为 836.9 pg/ml,明显高于未经 LPS 刺激组。如图 2(1 为未经脂多糖刺激组,2 为经脂多糖刺激成熟组)所示。

2.4 混合淋巴细胞反应

由图 3 可见,未成熟树突状细胞基本不具有诱导 T 细胞增殖能力,而成熟的树突状细胞具有强的刺激 T 细胞增殖能力。

3 讨论

DCs 引发免疫应答依赖于其成熟状态及机能分化^[4],其前

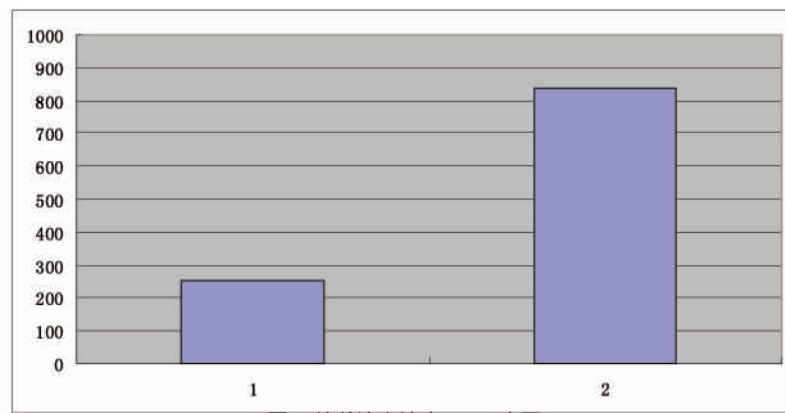


图2 培养液上清中IL-12水平

Fig. 2 The content of IL-12 in cell supernatant

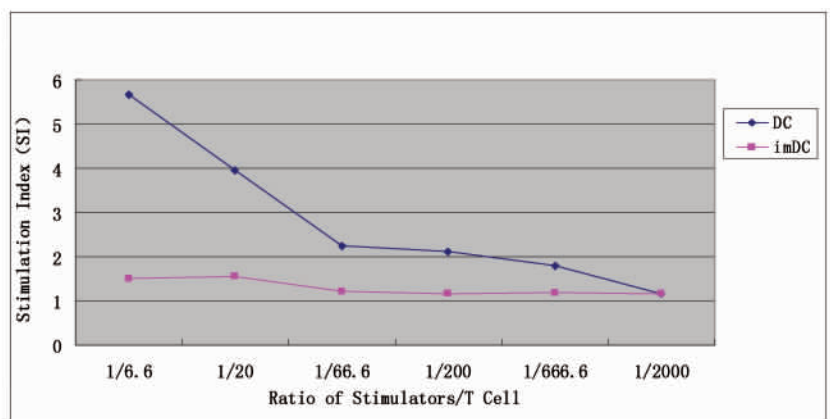


图3 未成熟与成熟树突状细胞诱导的混合淋巴细胞反应

Fig. 3 MLR induced by immature dendritic cells and mature dendritic cells

体来源于骨髓多能干细胞,从骨髓进入外周血,继续发育并经血液循环穿过血管内皮进入外周各组织成为非淋巴组织内定居的未成熟树突状细胞^[2]。未成熟状态的树突状细胞具备耐受原性^[3],可抑制T细胞的应答^[4,5],而成熟状态的树突状细胞由于获得了免疫刺激潜能从而会对炎性刺激做出反应^[4]。DCs的这双重功能为调节性DCs应用于临床治疗提供了基础^[6]。GM-CSF是维持DCs发育、分化的根本,大剂量GM-CSF可促使imDCs成熟,而单独应用GM-CSF诱导则生成以单核细胞为主的细胞群^[7]。IL-4能抑制细胞群内巨噬细胞和中性粒细胞的产生,并使DCs维持于未成熟状态,并具备强大的加工异体抗原的能力^[8,9]。LPS是人革兰氏阴性菌的主要致病物质,在研究DC成熟的实验中,通常在DC培养的后期用LPS短期刺激,以诱导DC成熟^[10]。表现为MHC-、共刺激分子和某些黏附分子表达增加,摄取抗原的能力降低,提呈抗原的能力增强,刺激同种转基因T细胞增殖能力提高。OX62是大鼠DCs的特异性表面标记物^[11],共刺激分子CD80、CD86为B7分子家族成员,通过第二信号途径诱导T细胞活化,MHC分子是主要组织相容性抗原复合物,是提呈抗原的结构功能单位。本研究对扩增培养出的大鼠未成熟树突状细胞及成熟树突状细胞进行形态学、表型及体外功能鉴定。典型的未成熟树突状细胞呈半贴壁生长,在GM-CSF的作用下形成葡萄串样集落,细胞大而形态不规则,表面皱褶多,亦可见少量短刺状突起,胞内细胞器丰富并可见吞噬泡^[12];而成熟的树突状细胞呈悬浮生长,细胞体积进一步增大,表面大量粗细不等的树枝样突起。每只SD

大鼠可成功收获未成熟或成熟树突状细胞约 2.0×10^7 个,纯度61.0%,活细胞率91.0%,为后续实验做了良好的基础研究。

参考文献(References)

- [1] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 685-711
- [2] Scandella E. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells[J]. *Blood*, 2002, 100(4): 1354-1361
- [3] 自波, 宋文刚. 调节性树突状细胞研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25: 97-99, 103-107
Zi Bo, Song Wen-gang. Research progress of regulatory dendritic cells[J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2009, 25: 97-99, 103-107
- [4] Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction[J]. *Immunol Rev*, 2003, 196: 125-146
- [5] Adorini L, Penna G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin receptor agonists[J]. *Human Immunol*, 2009, 70: 345-352
- [6] Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(1): 24-34
- [7] Hanada K, Tsunoda R, Hamada H. GM-CSF-induced in vivo expansion of splenic dendritic cells and their strong costimulation activity[J]. *Leukoc Biol*, 1996, 60(2): 181-190 (下转第1064页)

形态学观察,把 Gxu03 鉴定为嗜热子囊菌。Gxu04 与嗜热革节孢(*Scytalidium thermophilum*)的 3 个菌株相聚一起,自展支持率为 100%,尽管其序列与其它菌株有一定的差异性,可视为种内差异,因此把 Gxu04 鉴定为嗜热革节孢。从系统树还可看出,4 个嗜热真菌中,杜邦青霉与疏绵状嗜热丝孢菌亲缘关系最近,其次是嗜热子囊菌,最远的是嗜热革节孢。

参考文献(References)

- [1] Liu B, Liu XZ, Zhuang WY. A new species of *Hyaloriblia* and its anamorph from China[M]. *Nova Hedwigia*, 2005, 81: 145-156
- [2] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15
- [3] Stolk A C. Thermophilic species of *Talaromyces* Benjamin and *Thermoascus* Miehe[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1965, 31: 262-276
- [4] Austwick P K C. Environmental aspects of *Mortierella wolffii* infection in cattle[J]. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1976, 19: 25-33
- [5] Straatsma G, Samson, RA. Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost [J]. *Mycological Research*, 1993, 97: 321-328
- [6] Thaxter R. New or peculiar North American Hyphomycetes. III [J]. *Botanical Gazette*, 1903, 35: 153-159
- [7] Tubaki, K. *Cephalophora irregularis* newly found in Japan [J]. *the Journal of Japanese Botany*, 1956, 31: 161-164
- [8] Subramanian, C.V. Fungi imperfecti from Madras-IV. Proceedings of the Indian Academy of Sciences[J]. Section B, 1953, 37: 96-105
- [9] Tzean S.S., Barron, G.L. A new predatory hyphomycete capturing bdelloid rotifers in soil [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1982, 60(7): 1212-1215
- [10] Barron, G.L., Morikawa, C., Saikawa, M. New *Cephalophora* species capturing rotifers and tardigrades [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1990, 68: 685-690
- [11] Cooney, D G., Emerson, R. Thermophilic Fungi. An account of their biology, activities and classification[J]. W H Freeman & Co, San Francisco, 1964, 27-42
- [12] Mouchacca, J. Thermophilic fungi: Biodiversity and Taxonomic Status[J]. *Crypt Mycol*, 1997, 18: 19-69
- [13] Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64: 461-488
- [14] Lindt, W. Mitteilungen über einige neue pathogene schimmelpilze [J]. *Arch Exp Path Pharmacol*, 1886, 21: 269-298
- [15] Tsiklinskaya, P. Sur les mucédinées thermophiles[J]. *Annales Institute Pasteur Paris*, 1899, 13: 500-505
- [16] Miehe, H. Die Selbsterhitzung des Heus. Eine biologische Studie[M]. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 1907, 1-127
- [17] Griffon, E., Maublance, A. Deux moisissures thermophiles [J]. *Bull Soc Mycol France*. 1911, 27: 68-71
- [18] Latouche, C J. On a thermophile species of *Chaetomium*. *Trans Brit Mycol Soc*, 1950, 33: 94-104
- [19] Salar, R., Aneja, K R. Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography [J]. *Journal of Agricultural Technology*, 2007, 3(1): 77-107
- [20] Chen, G Y, Chen, Z .C. Thermophilic and thermotolerant fungi in Taiwan [J]. *Transactions of the Mycological Society of Republic of China*, 1988, 3(6): 1-72

(上接第 1033 页)

- [8] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha[J]. *Exp Med*, 1994, 179(4): 1109-1118
- [9] Mayordomo JI. Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines [J]. *Stem Cells*, 1997, 15(2): 94-103
- [10] Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3: 667-672
- [11] Talmor M. Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures [J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(3): 811-817
- [12] Charbonnier LM, Van Duivenvoorde LM, Apparailly F, et al. Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cells[J]. *Immunol*, 2006, 177: 3806-3813