

四种细胞因子组合从小鼠骨髓细胞体外诱导优势不成熟 CD8a⁺DC

纳 宁¹, 罗 云¹, 洪良庆¹, 欧阳斌¹, 黄正宇¹, 缪 斌¹, 华学峰¹, 杨培生¹, 徐 琳²
(中山大学 1. 附属第三医院肾移植科; 2. 中山医学院免疫教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探索从小鼠骨髓细胞体外诱导大量优势不成熟 CD8a⁺DC(DC2)的新方法。【方法】取小鼠骨髓细胞, 采用 GM-CSF 5 ng/mL, IL-4 20 ng/mL, Flt3L 25 ng/mL, SCF 100 ng/mL 4 种细胞因子组合, 37℃, 5%CO₂ 体外培养诱导。第 3、7、16 天流式细胞术 4 色荧光标记法分析细胞表型, 细胞计数分析总细胞产量, 采用电镜、免疫荧光及相差摄影观察细胞形态。【结果】小鼠骨髓细胞经 GM-CSF+IL-4+Flt3L+SCF 诱导第 3 天在 CD11c⁺的 DC 细胞群中可产生 97.09% 的 CD8a⁺ 优势 DC2 细胞(占总细胞的 34.6%), 其中 CD8a⁺MHC II⁻的不成熟 DC 占 61.77%; 随培养时间延长比例下降, 但培养第 16 天时 CD8a⁺的不成熟 DC 仍占优势。总细胞计数分析显示随培养时间延长, 细胞总数下降。电镜、免疫荧光及相差摄影等形态学检查显示所诱导的 DC 呈现典型树突状形态特征。【结论】GM-CSF+IL-4+Flt3L+SCF 可以体外快速诱导小鼠骨髓细胞产生大量优势不成熟 CD8a⁺ DC, 是体外制备不成熟 DC2 的一种较好的新方法。

关键词:不成熟树突状细胞; 细胞因子; 骨髓细胞

中图分类号: R392

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)02-0126-05

Induction of Predominant Immature CD8a⁺ Dendritic Cells from Murine Bone Marrow Cells by Four Kinds of Cytokines

NA Ning¹, LUO Yun¹, HONG Liang-qing¹, OUYANG Bin¹, HUANG Zheng-yu¹, MIAO Bin¹,
HUA Xue-feng¹, YANG Pei-sheng¹, XU Lin²

(1. Department of Kidney Transplantation, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China;

2. Department of Immunology, Zhongshan Medical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To introduce a new method to induce large number of predominant immature CD8a⁺ DC (DC2) from murine bone marrow cells. 【Methods】Bone marrow cells of C57BL/6 mice were obtained and cultured in vitro at 37℃, 5%CO₂ in the presence of 5 ng/mL GM-CSF, 25 ng/mL Flt3L, 120 ng/mL L-4, and 100 ng/mL SCF. On day 3, 7, and 16, 4-color flow cytometry analyses were carried out to analyze cell phenotype, and total cell count was used to analyze cell yield. Immunofluorescence, phase contrast observations, and electron microscope analysis were used to observe cell morphology. 【Results】On day 3, murine bone marrow cells induced by GM-CSF+IL-4+Flt3L+SCF generated 97.09% CD8a⁺ predominant DC2 (34.6% of total cells), which 61.77% of them were CD8a⁺MHC II⁻ immature DC. The proportion decreased in prolonged culture but on day 16 CD8a⁺MHC II⁻ immature DC were still predominant. Total cell count showed that the total cell decreased with prolonged culture. Immunofluorescence, phase contrast observations, and electron microscope analysis showed that those predominant DC2 bore typical morphological feature of dendritic cell. 【Conclusion】GM-CSF+IL-4+Flt3L+SCF could quickly induce large quantity of predominant immature CD8a⁺ DC in vitro from murine bone marrow cells, which is a valuable new method in preparing immature DC2 in vitro.

Key words: immature dendritic cell; cytokine; bone marrow cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(2): 126-130]

收稿日期: 2007-12-18

基金项目: “973”基金(2001CB509900); 国家自然科学基金(30170395); 广东省自然科学基金(070701; 07001683)

作者简介: 纳 宁(1974-), 男, 回族, 博士研究生, 主治医师; 徐琳, 通讯作者, E-mail: xulin@mail.sysu.edu.cn

树突状细胞(dendritic cell, DC)是一种专职抗原提呈细胞,在激活 T、B 细胞的特异性免疫反应及免疫耐受中均起着重要作用^[1]。成熟 DC 激活 T 细胞能力很强,主要诱导免疫应答,而不成熟 DC 可诱导免疫耐受。近年来又提出了 DC1 和 DC2 的亚类分类的概念,认为 DC1 为髓系来源的 DC,表达髓系标志,主要诱导 Th1 型应答;DC2 为淋巴系来源的 DC,表达淋巴系的表面标志如 CD8 分子(CD8a),具有诱导 Th2 型应答,参与免疫调节和免疫耐受的功能,而且无论是不成熟还是成熟 DC2 均具有诱导免疫耐受的作用。DC2 作用机制的揭示为建立移植抗原特异性免疫耐受提供了新思路,DC2 及不成熟 DC 具有诱导免疫耐受及参与 T 细胞发育的胸腺选择的功能,在诱导移植耐受的研究领域具有重要意义和良好的临床应用前景^[1,2]。鉴于目前所采用的磁珠和流式分选等方法获得 DC2 细胞操作复杂,成本高,培养时间长,虽细胞纯度高,但细胞数量太少常不够动物实验及临床使用等缺点^[3,4],因此,本研究探索一种利用 4 种细胞因子组合从小鼠骨髓细胞体外大量培养诱导不成熟优势 DC2 的新方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂

SPF 级 C57BL/6 及 Balb/c 小鼠,鼠龄 4~6 周,雄性,4~6 只(合格证号:0017563,0013056),由中山大学实验动物中心提供。重组小鼠 GM-CSF, IL-4, SCF, Flt3L(美国 PeproTech);FITC 标记的抗小鼠 DX5, Sca-1, CD3e, B220, Gr-1, CD11c;PE 标记的抗小鼠 MHC II, CD40, CD86, CD11b;APC 标记的抗小鼠 CD11c;PE-Cy5 标记的抗小鼠 CD8 α , 以及以上所有抗体的同型对照(美国 eBIOSCIENCE);DMEM(高糖,美国 GIBCO BRL),青霉素钠及硫酸链霉素,胎牛血清(中国天津中科院源洋生物工程有限公司),6、24 和 96 孔细胞培养板(美国 CORNING),PBS,细胞洗涤液,红细胞裂解液。

1.2 DC 的制备

SPF 级 4~6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠及 BALB/c 小鼠,拉颈处死后立即浸泡于 75%的酒精中体表消毒,无菌条件下机械分离双侧股骨、胫骨,剪去干骺端,用 1 mL 一次性注射器吸取含 2%胎牛血

清(FBS)的 PBS 冲出骨髓,洗涤 1 次后加入 0.15 mol/L NH₄Cl 红细胞裂解液裂解红细胞,离心去上清后洗涤 2 次,2%的台盼蓝染色液染色计数,用含 10%FBS 的 DMEM 完全培养基(美国 GIBCO BRL)重悬,以 4×10^6 /mL 的细胞浓度种于 6 孔培养板中,加入 4 种细胞因子(美国 Pepro Tech)贮存液至终浓度为 GM-CSF 5 ng/mL, IL-4 20 ng/mL, SCF 100 ng/mL, Flt3L 25 ng/mL,于 37 °C,体积分数为 5%CO₂ 培养箱培养。培养期间每 3 d 换液 1 次^[3-5]。

1.3 细胞形态学分析

细胞培养的第 3、7、16 天采用相差显微摄影拍摄培养状态下的活细胞形态。吹打收集细胞因子诱导的实验组的半悬浮细胞,2.5%戊二醛-锇酸固定,超薄切片,透射电镜观察。用无菌盖玻片置于 6 孔板中后滴加骨髓细胞诱导 DC,第 3 天时取出细胞爬片,PBS 洗 1 次,PBS-甲醛固定 10 min,丙酮固定 10 min,-20 °C 贮存。免疫荧光法染色时取出玻片,100%、95%、90%、75%酒精梯度至水各 3 min,浸泡于 PBS 中 3 min,滴加 1:200 稀释的 FITC-CD11c 荧光抗体,37 °C 孵育 45 min,以 FITC-Armenian HamsterIgG 同型对照作为阴性对照,PBS 洗 3 次,BX51 系统生物显微镜观察并拍照。

1.4 细胞计数及总细胞数曲线

骨髓细胞以 4×10^6 /mL 浓度置于 24 孔细胞培养板中,加入 4 种细胞因子诱导培养,取第 3、7、16、22 天的细胞,每次取 3 孔分别计数活细胞并取平均值,计数方法如下:取细胞悬液 1 滴加入 2 滴 2%的台盼蓝液,混匀后滴入细胞计数板内,低倍镜下计数 4 角 4 个大方格内未着色细胞数。细胞密度(个/mL)=(4 大格细胞总数/4) $\times 10^4 \times$ 稀释倍数。以培养时间为横坐标,细胞密度为纵坐标,绘制总细胞数曲线图。

1.5 流式细胞术分析 DC 表型

在诱导培养的第 3、7、16 天进行流式细胞术分析 DC 的比例和表型^[3,6]。用吸管吹下半悬浮细胞和成团生长的细胞,收集后离心,洗涤 1 次,2%的台盼蓝染色液染色计数活细胞,重悬于 PBS 中配成 1×10^6 /mL 的浓度,加入相应的荧光抗体或同型对照抗体 1 μ g,混匀后置 4 °C 放置 30 min,PBS 洗 2 次,加入 40 g/L 多聚甲醛固定,上机分析。先根据物理参数设活细胞门,再设门选出 Lin-CD11c⁺细胞(检测的谱系抗原包括 FITC-DX5,

Sca-1, CD3 ϵ , B220, Gr-1), 进一步分析这群 Lin-CD11c⁺ 细胞中 CD8 α , MHC II, CD86, CD40 及 CD11b 的表达情况。

2 结果

2.1 形态和生长特点

经 GM-CSF 5 ng/mL, Flt3L 25 ng/mL, SCF 100 ng/mL 和 IL-4 20 ng/mL 诱导后, 第 3 天即可见典型的半悬浮细胞团块(图 1A), 多数细胞呈半悬浮或悬浮状生长, 松散贴壁, 用吸管或枪头即可直接吹打下来。随着培养时间延长, 第 7 天和第 16 天观察到越来越多的细胞表现出巨噬细胞样形态(图 1B,C), 紧密贴壁, 难以直接吹打下来, 半悬浮细胞团块则逐渐减少(图 1B,C)。免疫荧光染色可见 CD11c⁺ 细胞表面有较多长短不一的突起(图 2)。细胞经透射电镜观察可见许多长短不一的突起, 核偏居一侧, 胞浆中含有空泡、内质网和糖原颗粒, 可见较多线粒体和吞噬体(图 3)。以上结果符合树突状细胞的典型形态特征。

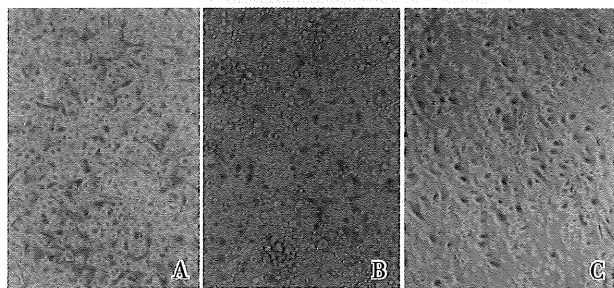


图 1 GM-CSF+IL-4+SCF+Flt3L 诱导的骨髓细胞形态

Fig.1 Cell morphology of bone marrow cells induced by GM-CSF+IL-4+SCF+Flt3L.

A: Cell appearance of day 3; B: Cell appearance of day 7; C: Cell appearance of day 16; Phase contrast, $\times 200$

2.2 细胞计数

4 种细胞因子诱导后第 3 天总细胞浓度高于第 1 天接种时细胞浓度(图 4), 达 $(4.20 \pm 0.22) \times 10^6/\text{mL}$, 之后开始下降, 第 7 天为 $(2.44 \pm 0.51) \times 10^6/\text{mL}$, 第 16 天为 $(0.34 \pm 0.03) \times 10^6$ 个/mL, 第 22 天仍保持 $(0.34 \pm 0.03) \times 10^6/\text{mL}$ 。表明加入细胞因子后, 细胞因子可诱导骨髓细胞扩增, 但随培养时间的延长, 细胞总数下降。

2.3 流式细胞术分析

从细胞表型来看, 所诱导的 DC 主要为

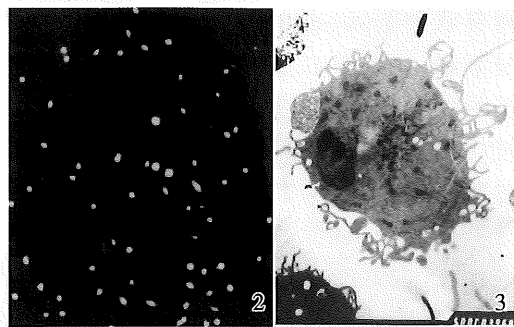


图 2 GM-CSF+IL-4+SCF+Flt3L 诱导的骨髓细胞 CD11c 免疫荧光分析

Fig.2 CD11c immunofluorescent assay of bone marrow cells induced by GM-CSF+IL-4+SCF+Flt3L.

图 3 GM-CSF+Flt3L+SCF+IL-4 诱导的 DC 电镜观察

Fig.3 Electron microscopy of dendritic cells induced by GM-CSF+IL-4+SCF+Flt3L ($\times 5000$)

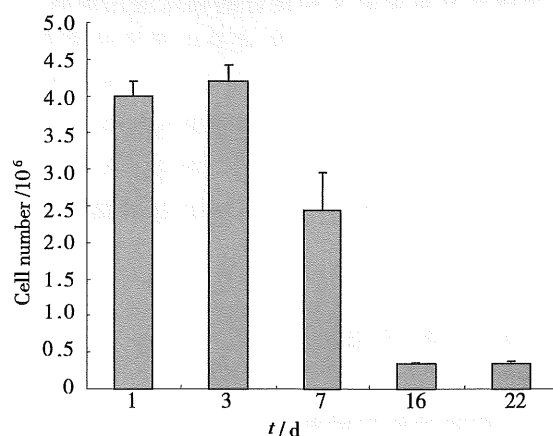


图 4 小鼠骨髓细胞在 GM-CSF+IL-4+SCF+Flt3L 诱导下的总细胞计数(/mL)

Fig.4 Total cell count (/mL) of murine bone marrow cells induced by GM-CSF+IL-4+SCF+Flt3L

CD8 α 为主, 表面低表达 MHC II, 几乎不表达协同刺激分子 CD40、CD86, 从 CD11b 的表达情况来看, 可分为 CD11b⁻ CD8 α ⁺、CD11b⁺ CD8 α ⁻ 以及 CD11b⁺ CD8 α ⁺ 3 群细胞。表明所产生的主要是不成熟 CD8 α ⁺DC, 其表面低表达协同刺激分子提示其功能可能以免疫抑制和诱导免疫耐受为主。4 种细胞因子诱导第 3 天, 在 Lin⁻CD11c⁺ 的 DC 细胞中可产生 97.09% 的优势 CD8 α ⁺DC 细胞, 其中 MHC II⁻ 的不成熟 CD8 α ⁺DC 占 61.77%; 第 7 天 CD8 α ⁺DC 占总 DC 的 60.53%, 其中不成熟 CD8 α ⁺DC 占 37.77%; 第 16 天 CD8 α ⁺DC 占总 DC 的 77.78%, 其中不成熟 CD8 α ⁺DC 占 61.85%(表 1), 表明经 GM-CSF+IL-4+SCF+Flt3L 诱导可产生优势不成熟 CD8 α ⁺DC(DC2)。结合总细胞计数, 可得出

CD8 α ⁺DC 的含量第3天为 $(1.45 \pm 0.08) \times 10^6$ 个/mL,第7天为 $(0.47 \pm 0.01) \times 10^6$ 个/mL,第16天为 $(0.04 \pm 0.00) \times 10^6$ 个/mL,表明采用本法可获得 CD8 α ⁺DC 占绝对优势的细胞,且主要以不成熟

CD8 α ⁺DC 为主。随培养时间的延长,MHC II 的表达水平并未增加,仍保持以不成熟 CD8 α ⁺DC 细胞为主,直至培养第16天时仍是如此,但第16天后细胞总数已很少,不再有应用价值(图5)。

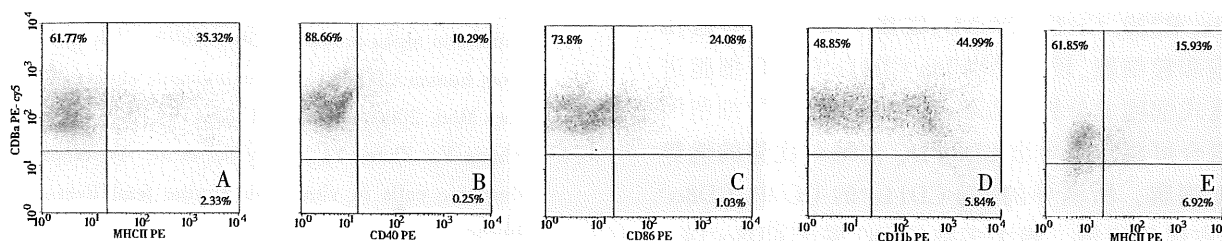


图5 流式细胞术分析细胞表型

Fig. 5 Flow cytometry analysis of dendritic cells

A: Analysis of CD8 α and MHC II among Lin-CD11c⁺ DC on day 3; B: Analysis of CD8 α and CD40 among Lin-CD11c⁺ DC on day 3; C: Analysis of CD8 α and CD86 among Lin-CD11c⁺ DC on day 3; D: Analysis of CD8 α and CD11b among Lin-CD11c⁺ DC on day 3; E: Analysis of CD8 α and MHC II among Lin-CD11c⁺ DC on day 16

表1 流式细胞术分析诱导不同时间的 CD8 α ⁺DC 的比例

Table 1 Flow cytometry analysis of the proportion of induced CD8 α ⁺ DC at different time (%)

Proportion	3 d	7 d	16 d
DC/total cell number	35.65	31.64	15.70
CD8 α ⁺ DC/total cell number	34.61	19.15	12.21
CD8 α ⁺ DC/total DC	97.09	60.53	77.78
CD8 α +MHC II -DC/total DC	61.77	37.77	61.85

3 讨论

不成熟的 DC 以及某些亚群的 DC(DC2)具有免疫抑制和诱导免疫耐受的作用,已引起了人们的兴趣,显示出了良好的临床应用前景^[1-6]。在小鼠,表达淋巴系表面分子 CD8 α 的 DC 细胞被认为是 DC2^[8]。目前国内外对 DC1 细胞的扩增制备和应用研究已较为成熟,但对于 DC2 的起源、分化发育、功能、诱导和表面标志的研究正在进行之中^[9],从骨髓细胞诱导优势 DC2 细胞尚未见报道。目前国内外制备 DC2 还没有很好的方法,主要采用从脾和淋巴组织中直接分离后使用的方法^[9],而通过骨髓诱导 DC 往往经费昂贵而且复杂的纯化手段,通常采用单抗或磁珠法纯化,培养时间也较长(6~7 d)^[4-7],得到的成熟 DC1 多而 DC2 少,操作复杂,成本高,细胞纯度很高但是纯化出来的细胞数少,往往不够动物实验大批量使用,更难应用于临床。为了能快速大量制备耐受性 DC 细胞用于动物

实验和临床研究,本研究采用了一种新的方法从小鼠骨髓细胞诱导优势不成熟 CD8 α ⁺DC,为其进一步纯化和应用于临床打下了坚实的基础。

许多常用的从骨髓细胞制备 DC 的方法要求去除基质细胞、淋巴细胞和粒细胞等,只保留造血干细胞,这些方法去除了某些杂细胞,但同时也可能去除了能支持、促进 DC 产生的细胞^[4]。有证据表明滋养层细胞和基质细胞能促进 DC 的产生^[5],而且纯化过程可降低细胞活力和细胞产量,因此,本研究中采用保留了骨髓基质细胞的骨髓有核细胞来诱导 DC。在去除了红细胞后,骨髓细胞以高密度(4×10^6 /mL)接种于培养基中培养,此密度高于文献报道的常用密度(5×10^5 /mL~ 1×10^6 /mL)^[4-7],主要用以增加细胞之间的接触,更好地提供 DC 分化过程中所需的信号,并提高由骨髓细胞自发产生的细胞因子浓度。GM-CSF,IL-10,TNF,IL-4,Flt3L,LPS 等都曾报道用于 DC 的诱导,其中 IL-10 和 IL-4 可以抑制 DC 细胞成熟,SCF 可以扩增造血干细胞,提高细胞产量,因此,本法采用 GM-CSF,IL-4,Flt3L 和 SCF 来诱导优势不成熟 CD8 α ⁺DC,并采用高密度短时间诱导的方案,这种方法国内外未见文献报道。文献报道诱导 DC 常诱导至第7天收获,但采用本法的4种细胞因子组合诱导不成熟 CD8 α ⁺DC,第3天总细胞数及 CD8 α ⁺DC 数均高于第7天,比文献常用的第7天更有应用价值。

迄今为止,仍没有特异性抗原可以鉴别 DC 细胞,主要是通过形态特征、表面分子表达和 MLR

反应综合判定。因此通过表面标志来鉴定 DC 往往需要结合其它谱系抗原的标志来进行,即表达 DC 相对特征性标志如 CD11c 但不表达 T 细胞、B 细胞、NK 细胞等其它细胞的谱系抗原的细胞方能认为是 DC 细胞。故本研究采用了 DX5, Sca-1, CD3 ϵ , B220, Gr-1 排除 NK、造血干细胞、T 细胞、B 细胞和粒细胞,设门选出 Lin⁻CD11c⁺的 DC 细胞进行流式细胞术分析。结果表明:采用这 4 种细胞因子组合可成功诱导出 CD8 α ⁺DC 占绝对优势的优势 DC2 细胞,所诱导的 Lin⁻CD11c⁺的 DC 中,CD8 α ⁺DC 占优势比例,绝大多数的 DC 属于 CD8 α ⁺DC,表面低表达 MHC II,几乎不表达协同刺激分子 CD40、CD86,主要为不成熟 CD8 α ⁺DC,CD8 α ⁻DC 的比例很小,且细胞形态符合 DC 的典型特征,并且随培养时间的延长,MHC II 的表达水平并不增加,仍保持以不成熟 CD8 α ⁺DC 细胞为主。从 CD11b 的表达情况来看,可分为 CD11b⁻CD8 α ⁺、CD11b⁺CD8 α ⁻以及 CD11b⁺CD8 α ⁺ 3 群细胞,而且 CD11b⁻CD8 α ⁺和 CD11b⁺CD8 α ⁺比例接近,表明 CD8 α ⁺DC 也可以表达髓系的标志 CD11b,支持了近年来认为 CD8 α ⁺和 CD8 α ⁻的 DC 细胞都可以来源于髓系和淋巴系前体细胞的新观点^[10-13],值得进一步研究和探讨。

本研究通过 GM-CSF、IL-4、Flt3L 和 SCF 这 4 种细胞因子组合探讨体外诱导优势不成熟 CD8 α ⁺DC 的新方法,获得了成功,小鼠骨髓细胞经高密度短时间诱导第 3 天可产生较大量的 CD8 α ⁺DC,培养时间短,细胞产量大,操作简便,非常适合于动物试验使用,并可在此基础上纯化用于进一步的研究,显示出了良好的应用潜力,为功能研究和体内试验打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] O'Connell PJ, Li W, Wang Z, et al. Immature and mature CD8 α ⁺ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts [J]. Immunology, 2002, 168(1): 143-154.
- [2] 郑磊,包杰,王前,等.小鼠骨髓源性树突状细胞和 DC2.4 中 RelB 基因表达水平的比较研究 [J]. 热带医学杂志, 2006, 6(7): 745-748, 772.
- [3] Teshima T, Reddy P, Lowler KP, et al. Flt3 ligand therapy for recipients of allogeneic bone marrow transplants expands host CD8 α ⁺ dendritic cells and reduces experimental acute graft-versus-host disease [J]. Blood, 2002, 99 (5): 1825-1832.
- [4] Blom B, Ho S, Antonenko S, et al. Generation of interferon alpha-producing pre-dendritic cell (pre-DC) 2 from human CD34⁺ hematopoietic stem cells [J]. Exp Med, 2000, 192 (12): 1785-1795.
- [5] Zhang Y, Zhang Y, Wang Y, et al. Development of dendritic cells in vitro from murine fetal liver-derived lineage phenotype-negative c-kit⁺ hematopoietic progenitor cells [J]. Blood, 2000, 95(1): 138-146.
- [6] Miller G, Pillarisetty VG, Shah AB, et al. Murine Flt3 ligand expands distinct dendritic cells with both tolerogenic and immunogenic properties [J]. Immunology, 2003, 170(7): 3554-3564.
- [7] 张红梅,任军,张利旺,等.外周血造血干细胞体外定向诱导树突状细胞及功能鉴定 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(1): 83-85.
- [8] Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes [J]. Nature Rev Immunol, 2002, 2(3): 151-161.
- [9] 蔡颖谦,潘春华,姜晓丹,等.原子力显微镜观察人外周血树突状细胞表面超微结构 [J]. 中华神经医学杂志, 2005, 4(7): 661-663.
- [10] Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell homeostatic expansion [J]. Nature Immunol, 2004, 5(4): 426-434.
- [11] MacDonald KP, Rowe V, Clouston AD, et al. Cytokine expanded myeloid precursors function as regulatory anti-gen-presenting cells and promote tolerance through IL-10-producing regulatory T cells [J]. J Immunol, 2005, 174(4): 1841-1850.
- [12] Giver CR, Li JM, Hossain MS, et al. Reconstructing immunity after allogeneic transplantation [J]. Immunol Res, 2004, 29(1-3): 269-282.
- [13] Lore K, Adams WC, Havenga MJ, et al. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells are susceptible to recombinant adenovirus vectors and stimulate polyfunctional memory T cell responses [J]. J Immunol, 2007, 179(3): 1721-1729.

(编辑 徐杰)