

# BALB/c 小鼠骨髓来源高产量成熟树突状细胞的制备和初步鉴定

谢 峻, 王 军, 郑颖城, 董玉梅, 王琼书

**【摘要】** 目的 研究制备、鉴定小鼠骨髓来源的高产量树突状细胞(dendritic cells, DC)的方法, 为制备 DC 及体外研究提供依据。方法 取 BALB/c 小鼠骨髓细胞, 经重组小鼠巨噬细胞-粒细胞集落刺激因子(recombinant mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rmGM-CSF)、重组小鼠白细胞介素 4(recombinant mouse interleukin 4, rmIL-4)诱导、脂多糖(lipopolysacchrides, LPS)刺激制备高纯度 DC。利用光学显微镜、扫描电镜对所制备细胞做形态学观察; 流式细胞术检测特定表型标记分子表达情况; 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )、干扰素  $\gamma$ (interferon gamma, IFN- $\gamma$ )的分泌量。从形态、表型标记、细胞因子分泌功能三方面对所制备细胞进行初步鉴定。结果 所制备细胞具有典型的 DC 形态学特征, 细胞表面高表达 CD1a、CD11c、CD80 和 CD86, 相对于普通 DC 细胞有大量的 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  分泌。结论 利用 BALB/c 小鼠骨髓细胞在细胞因子 rmGM-CSF、rmIL-4 诱导及 LPS 的刺激下成功制备出纯度较高的成熟 DC。

**【关键词】** 树突状细胞; 制备; 鉴定; 标记分子; 细胞因子

**【中图分类号】** R 446.1

**【文献标识码】** A

doi: 10.3969/j.issn.1009-2595.2014.06.004

## Preparation and Identification of Dendritic Cells Derived from Bone Marrow Cells of BALB/c Mouse

XIE Jun, WANG Jun, ZHENG Ying-cheng, DONG Yu-mei, WANG Qiong-shu, Department of Medical Administration, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan Hubei 430070, China

Corresponding author: WANG Qiong-shu, E-mail: whzzywqs@163.com

**【Abstract】** **Objective** To study the preparation and identification methods of dendritic cells(DCs) from bone marrow cells of mice, and supply reference for the cell preparation and in vitro research. **Methods** The bone marrow cells from BALB/c mice were treated with GM-CSF, IL-4 and LPS to prepare matured DCs. Optical microscopy and scanning electron microscopy were applied to observe the morphological character of the prepared cells. The markers of DCs on the cells' surface and some cytokines secreted by the cells were detected. **Results** Typical morphological characters were observed in the cells. The expressions of CD1a, CD11c, CD80, and CD86 in the cells and also the secretion of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  were increased significantly. **Conclusion** The treatment with GM-CSF, IL-4, LPS to BALB/c mouse bone marrow cells can induce high production of mature DCs *in vitro*.

**【Key words】** Dendritic cells; Preparation; Identification; Biomarker; Secreted cytokine

树突状细胞(dendritic cell, DC)是骨髓分化过程中形成的一类外形独特天然免疫细胞和抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)<sup>[1-2]</sup>。DC 与多种疾病相关, 包括感染性疾病、肿瘤、自身免疫性疾病等。传统的将成熟 DC 分为 cDC 和 pDC<sup>[1]</sup>。依据组织定位, 又分为位于皮肤的朗罕氏细胞<sup>[3]</sup>、位于淋巴组织 T 细胞区的交错突细胞和位于淋巴组织 B 细胞区的滤泡树突细胞等<sup>[4]</sup>。无论其分类与分布如何, 所有的 DC 均源自于多功能造血干细胞, 它们具有同源性。DC 主要是通过分泌细胞因子和激活适应性免疫细胞来发

挥作用, 抗原激活的 DC 能够分泌肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )、干扰素  $\gamma$ (interferon gamma, IFN- $\gamma$ )等细胞因子来发挥抗菌、抗肿瘤等功能, 还通过表达丰富的抗原递呈分子、共刺激因子和粘附分子等来激活适应性或固有免疫细胞发挥作用<sup>[4-5]</sup>。本实验主要是利用小鼠骨髓细胞来体外制备成熟的髓源型 DC。并对所制备的 DC 相关指标进行检测, 主要从形态学、细胞表面表型分子和相关细胞因子分泌三方面对所制备细胞进行鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 实验所用雌性 BALB/c 小鼠购自武汉

**【作者单位】** 430070 湖北武汉, 广州军区武汉总医院科训科(谢峻), 血液科(王 军), 感染控制科(郑颖城、董玉梅、王琼书)

**【通讯作者】** 王琼书, E-mail: whzzywqs@163.com

大学实验动物中心,鼠龄为5~6周。于清洁级环境饲养,稳定3~5 d后进行实验。

1.1.2 试剂 重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rmGM-CSF)购自杭州基隆生物公司,重组小鼠白细胞介素4(recombinant mouse interleukin 4, rmIL-4)及脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)购自美国Sigma公司, RPMI-1640培养基购自美国Hyclone公司,新生牛血清及双抗购自美国Gibco公司,戊二醛购自国药化学试剂厂,流式细胞术专用固定缓冲液及抗小鼠CD80-PE-Cy5抗体和抗小鼠CD1a-FITC购自美国eBioscience公司,抗小鼠CD11c-PE抗体购自美国BD公司,抗小鼠CD86-FITC抗体购自美国Surgen Biotech公司。独立型抗体购自各抗体的对应厂家。

1.1.3 主要设备和仪器 CO<sub>2</sub>细胞培养箱购自美国Forma公司,超净工作台购自美国Air Tech公司,流式细胞仪购自美国Beckman公司,倒置显微镜及折光显微镜购自日本Olympus公司,扫描电镜购自日本HITACHI公司。

## 1.2 方法

1.2.1 骨髓细胞提取 将BALB/c小鼠颈椎离断处死,浸入75%的乙醇溶液中约10 min。解剖取其胫骨和股骨,将骨表面所有附着组织剔除干净,浸入无菌玻皿装载的75%乙醇溶液1 min。用无菌玻皿装载的4℃预冷磷酸盐缓冲液荡洗后,浸入无菌玻皿装载的4℃预冷的RPMI-1640培养基中。在超净操作台中,用1 ml注射器吸取RPMI-1640培养基,刺穿骨髓端冲洗骨髓腔,将骨髓冲洗到另一无菌培养皿中,每根骨头反复冲洗3~4遍。用巴氏吸管吹打组织悬液,将组织块吹散。将所得悬液用50 μm尼龙滤网过滤后室温下以1000 r/min离心5 min,弃上清。用5 ml氯化铵红细胞液裂解液重悬细胞,室温静置2 min,室温下以1000 r/min离心5 min后弃上清。用4℃预冷RPMI-1640培养基以1000 r/min的离心5 min,将获取细胞洗两次。所获得细胞即为小鼠骨髓细胞。再用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基重悬细胞,收集移入培养皿中。

1.2.2 DC的制备 调整所得骨髓细胞浓度达 $1 \times 10^5$ /ml~ $1 \times 10^6$ /ml,加入rmIL-4(使其终浓度达到10 ng/ml)和rmGM-CSF(使其终浓度达到20 ng/ml);放入37℃,5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中,培养2 d后,轻晃培养皿,去除悬浮细胞,保留贴壁细胞;加入新鲜的RPMI-1640培养基及相同浓度的rmIL-4、rmGM-CSF

继续培养;每隔2 d换一次液,每次半量换液并且补充适量rmIL-4、rmGM-CSF,使其达到相同浓度;培养至第6天用巴氏吸管轻轻吸吹培养基,收集所有悬浮细胞。调整其浓度至 $1 \times 10^5$ /ml~ $1 \times 10^6$ /ml,加入LPS(使其终浓度达到200 mg/ml)刺激24 h使其成熟。收集细胞后,0.4%台盼蓝染色后用血细胞计数板计活细胞数,活细胞数在95%以上,再进行后续观察与鉴定。

1.2.3 DC形态观察 ①光镜观察:骨髓细胞经rmGM-CSF和rmIL-4诱导的第2天、第4天、第6天和LPS刺激24 h,利用普通光学显微镜和折光显微镜观察细胞集落及细胞形态。②扫描电镜观察细胞表面结构:收集最终制备成熟的DC(将第6天收集的细胞,接种到盖玻片表面,经LPS刺激24 h后,戊二醛固定),利用扫描电镜观察细胞表面形态。

1.2.4 DC表面标记分子检测 用巴氏吸管轻轻吹打培养基,收集最终制备的所有悬浮细胞,用磷酸盐缓冲液以1000 r/min离心5 min洗两遍。用流式细胞仪专用细胞固定液调整细胞浓度至 $1 \times 10^6$ /ml,取300 μl细胞悬液分别加入1 μl的抗小鼠CD1a-FITC抗体、抗小鼠CD11c-PE抗体、抗小鼠CD80-PE-Cy5抗体和抗小鼠CD86-FITC抗体,冰上避光孵育30 min。用2 ml的流式细胞仪专用细胞固定液以1000 r/min离心5 min洗两遍细胞。300 μl重悬细胞后用流式细胞仪检测荧光标记。

1.2.5 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定所制备细胞TNF-α和IFN-γ的分泌量 骨髓细胞经rmGM-CSF和rmIL-4诱导的第6天和LPS刺激24 h后,收集培养基,按照ELISA试剂盒说明书进行操作,做出标准曲线,依据标准曲线求出具体值。

## 2 结果

### 2.1 所制备DC前体细胞特异性集落形成

自小鼠股骨、胫骨取出的骨髓原代细胞呈圆形,细胞表面光滑,细胞均匀分布于培养基中。利用细胞因子rmGM-CSF(20 ng/ml)和rmIL-4(10 ng/ml)持续诱导BALB/c小鼠骨髓细胞,经2 d后,轻摇荡培养皿,丢弃悬浮细胞后,在培养皿的底部发现细胞集落,这些细胞集落呈半贴壁状态,集落大小不一,分布散落,集落间可见散在细胞,集落中央细胞较多,边缘较少,整体呈中央厚而边缘薄的状态。集落内细胞呈近圆不规则形且大小不一。这些细胞集落是髓系DC诱

导过程中出现的特异性细胞集落(如图 1 所示)。

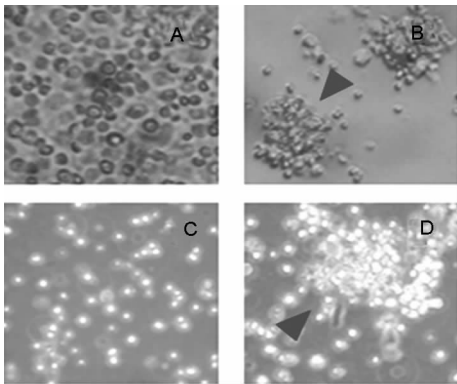


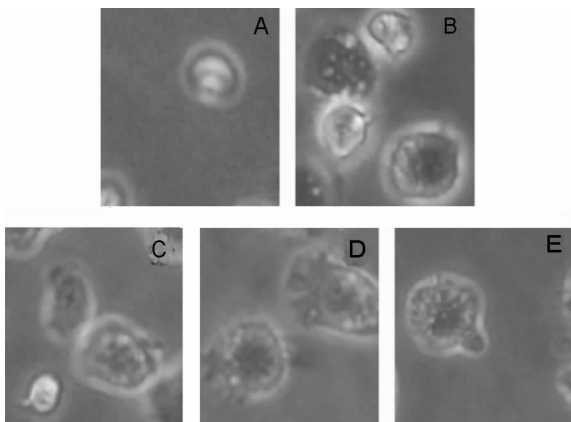
图 1 骨髓原代细胞及细胞因子 rmGM-CSF 和 IrmL-4 诱导 2 d 去除悬浮细胞后培养皿底部的细胞集落 (×200)

Figure 1 Bone marrow primary cells and the colony formed with the DC progenitor cells induced with rmGM-CSF and rmIL-4 after two days (×200)

### 2.2 所制备 DC 的形态

成熟 DC 在折光显微镜下细胞表面观察到明显毛刺。再经 LPS(200 mg/ml)刺激 24 h 后,细胞形状略不规则,表面毛刺更为明显(如图 2 所示)。

与此同时,作者利用扫描电镜观察诱导过程中的细胞表面形态。经 LPS 刺激成熟的 DC 细胞表面呈现出毛刺状表面粗糙,有多个典型的树突状细长的突触,可见伸出的伪足,胞体略小,呈现出典型的树突状,为成熟 DC 形态(如图 3C、D 所示)。



A: 骨髓原代细胞, B: 诱导 2 d 时, C: 诱导 4 d 时, D: 诱导 6 d 时, E: 继续用 LPS 刺激 24 h 后

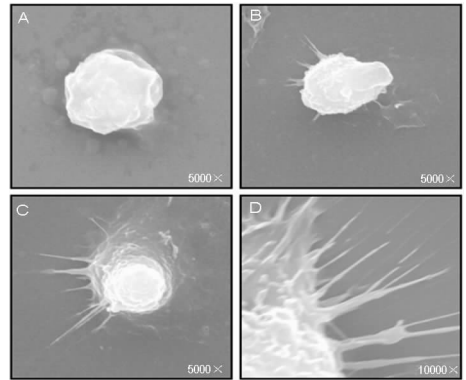
图 2 诱导不同时间长和 LPS 刺激 24 h 后的细胞形态 (×400)

Figure 2 The morphological character of the cells induced with GM-CSF and IL-4 at different timepoints (×400)

### 2.3 所制备 DC 形态表面标记分子表达

经细胞因子诱导 6 d 和 LPS 刺激所制备 DC 的

CD1a、CD11c(髓源型 DC 标记)及其刺激因子 CD80 和 CD86 分子表达率明显增高( $n = 3, ** P < 0.01$ )。细胞表面 DC 的其刺激分子表达情况可以看出成功制备了纯度较好的成熟髓系 DC(如图4所示)。



A: 骨髓原代细胞, B: 诱导 2 d 时的状态, C: 成熟 DC, D: 细胞树突

图 3 扫描电镜图

Figure 3 The cells' morphologic character observed by SEM

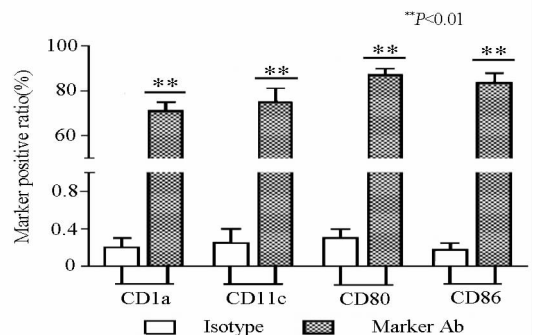
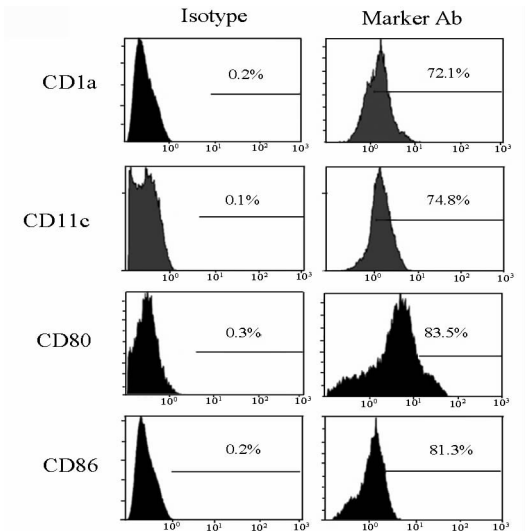


图 4 细胞 CD1a、CD11c、CD80 和 CD86 分子表达情况

Figure 4 The expression of CD1a、CD11c、CD80 and CD86 of the generated DC

### 2.4 所制备细胞 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 分泌量

ELISA 对所制备 DC 培养液中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  分泌量进行测定,与原代细胞相比,细胞对 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  分泌量明显增加 ( $n = 4, ** P < 0.01$ )。由此看出所制备的细胞具有天然免疫细胞活性(如图5所示)。

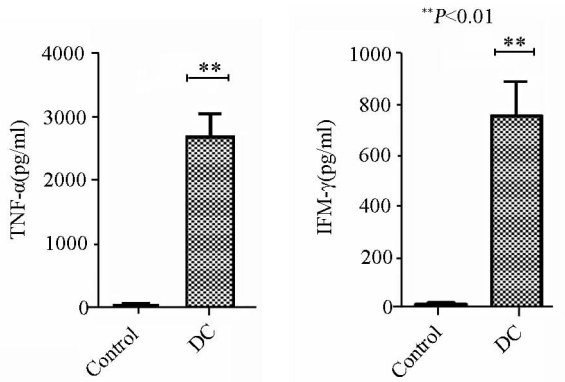


图5 细胞分泌 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的情况

Figure 5 TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production levels of the generated DC

### 3 讨论

DC 的体外制备和鉴定是对其进行体外研究的基础。可以利用脾或骨髓中的 DC 前体细胞进行制备<sup>[6-7]</sup>,相对于脾来源的 DC 来说,骨髓来源的 DC 具有更多优点。首先,由于所有亚型的 DC 均来自于位于骨髓的多功能造血干细胞<sup>[8-9]</sup>,因此它能更好的反映广泛的 DC 特点和功能。其次就是骨髓细胞诱导的 DC 产量较脾来说较高。另外,还可以利用外周血中的单核细胞进行体外制备<sup>[10-11]</sup>,这也是常见的体外制备 DC 的方法之一。体外制备 DC 主要是依赖于特定的细胞因子的诱导来完成的,利用不同的细胞因子可以诱导出不同的 DC 亚群,这使得对 DC 亚群的体外研究得以实现。制备髓源型 DC 主要依赖的细胞因子是 GM-CSF 和 IL-4 来实现的。本实验利用这两种细胞因子诱导,并用 LPS 刺激制备成熟的髓系 DC。LPS 可以通过 CD14 等受体使 DC 分化成熟<sup>[12-13]</sup>。体外制备 DC 不仅对 DC 的基础研究至关重要,它对当下较为热门的肿瘤过继细胞疗法也很关键<sup>[14]</sup>。

无论是组织分离还是体外制备的 DC,都要对其进行质量的鉴定,这对于 DC 的体外研究和依赖于 DC 的临床治疗都是必须的。DC 作为最强大的 APC,细胞表面有丰富的抗原递呈分子(MCH-I、MCH-II)、共刺激因子(CD80/B7-1、CD86/B7-2、CD40、CD40L)和

粘附分子(ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、LFA-1、LFA-3等)<sup>[4-5]</sup>,再加之其亚型特定的分子,这样就完成了对其的鉴别和鉴定。例如,CD11c 和 CD1a 就是髓源型 DC 的标记性分子之属,因此对这两个分子进行检测,以此来对制备细胞的质量进行评估。LPS 作为细菌的重要组分,能够激活多种天然免疫细胞,这些免疫细胞中包括 DC。LPS 能够通过 Toll 样受体 4 使 DC 成熟,对 TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  等多种炎性因子的分泌量增加<sup>[15-16]</sup>。DC 的体外制备目前虽已较为成熟,但是对于提高制备纯度和对特定亚型 DC 的制备仍旧是一个艰巨的挑战。

### 参 考 文 献

- [1] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity[J]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9: 271-296
- [2] Hume DA. Macrophage as APC and dendritic cell myth[J]. *Immunol*, 2008, 181(9): 5829-5835
- [3] Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood[J]. *J Exp Med*, 1994, 180(1): 83-93
- [4] Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(3): 151-161
- [5] Ganguly D, Haak S, Sisirak V, et al. The role of dendritic cells in autoimmunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(8): 566-577
- [6] Chijioko O, Münz C. Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 365
- [7] Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, et al. Isolation of dendritic cells[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2009, 3: 7
- [8] Segovia M, Cuturi MC, Hill M. Preparation of mouse bone marrow-derived dendritic cells with immunoregulatory properties[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 677: 161-168
- [9] Ardavin C, Martínez del Hoyo G, Martín P, et al. Origin and differentiation of dendritic cells[J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(12): 691-700
- [10] Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(7): 582-591
- [11] O'Neill DW, Bhardwaj N. Differentiation of peripheral blood monocytes into dendritic cells[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2005, 22: 4
- [12] Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein [J]. *Science*, 1990, 249(4975): 1431-1433
- [13] Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin[J]. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 437-457
- [14] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 265-277
- [15] Messmer D, Yang H, Telusma G, et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization[J]. *J Immunol*, 2004, 173(1): 307-313
- [16] Varma TK, Lin CY. Endotoxin-induced gamma interferon production: contributing cell types and key regulation and key regulatory factors[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(3): 530-543