

◇技术与方法◇

小鼠骨髓源性树突状细胞体外诱导培养体系的构建

刘振明 胡何节 方征东 王晓天 孙小杰 葛新宝

摘要 建立一种体外诱导培养小鼠骨髓源性的树突状细胞(DCs)方法,在镜下可观察到培养出的未成熟树突状细胞(imDCs)比成熟树突状细胞(mDCs)细胞突起少。流式细胞术检测CD80、CD86、MHC-II分子在imDCs的表达显著低于在mDCs上的表达。同种异基因混合淋巴细胞反应显示DCs刺激T细胞增殖的能力随着DCs所占比例的增大而增强,在相同比例条件下对刺激T细胞增殖的能力,imDCs显著低于成熟mDCs。该诱导方法可获得大量符合科研要求的小鼠骨髓源性DCs。

关键词 小鼠;树突状细胞;细胞培养

中图分类号 R 654.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1177-04

目前的研究^[1]认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生、发展到转归是一种慢性炎症反应的病理过程,有大量的免疫细胞和炎症介质参与其中。树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为目前已知的体内功能最强的专职抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),也是唯一能在体内直接激活初始T细胞的抗原提呈细胞,其在诱导T淋巴细胞活化,刺激初始T淋巴细胞增殖、介导免疫耐受等方面发挥着重要作用^[2]。该研究通过提取小鼠骨髓细胞体外培养DCs,旨在为后续其在AS小鼠模型上进行其免疫功能奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 健康雄性C57BL/6小鼠和BALB/c小鼠,6~8周龄,约20g,清洁级,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 南美胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购自美国Hyclone公司;RPMI 1640全培养液

购自美国Gibco公司;重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant murine granulocyte macrophage colony stimulating factor, rmGM-CSF)及重组小鼠白介素-4(recombinant murine interleukin-4, rmIL-4)购自美国Peprotech公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)及甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购自美国Sigma公司;小鼠流式单克隆抗体FITC-CD11c、PE-CD80、PE-CD86、PE-MHC-II及其同型对照抗体购自美国eBioscience公司。

1.1.3 主要仪器 流式细胞仪购自美国BD公司;倒置显微镜购自日本Olympus公司;Thermo恒温培养箱购自美国Thermo公司;酶标仪购自美国BioTek公司。

1.2 方 法

1.2.1 小鼠骨髓源性DCs的分离、培养及诱导 将C57BL/6小鼠颈椎脱臼法处死,无菌条件下取出双侧股骨、胫骨,仔细剥离附着的肌肉组织,用PBS反复洗涤,无菌剪刀剪去骨干两端,1ml注射器抽取RPMI 1640全培养液反复冲洗骨髓腔直至变白,冲洗液经400目滤网过滤去除组织碎片,收集细胞悬液至15ml离心管中,以1200r/min离心5min,去除上清液,用含12%FCS的RPMI 1640全培养液配成细胞悬液,细胞计数板计数,调整细胞浓度为 5×10^5 /ml,加入rmGM-CSF(终浓度20ng/ml)及rmIL-4(终浓度20ng/ml),分装于培养瓶,置入37℃、5%CO₂培养箱中培养。48h后收集悬浮细胞,1200r/min离心5min,去除上清液,补充含12%FCS的RPMI 1640全培养液及rmGM-CSF、rmIL-4细胞因子,以后隔日半量换液,第5天将收集的悬浮细胞分成两组,一组在培养液中加入LPS(1μg/ml)刺激成熟,培养至第7天收集悬浮细胞,流式细胞术检测其表面共刺激分子的表达,另一组不做LPS刺激处理,培养至第7天收集悬浮细胞,流式细胞术检测其表面共刺激分子的表达。

1.2.2 细胞形态学观察 倒置显微镜下动态观察DCs的形态及数量的变化并摄影记录。

1.2.3 流式细胞术检测 DCs表面分子 分别收集

2015-04-14 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH151、1408085MH177)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院普通外科,合肥 230001

作者简介:刘振明,男,硕士研究生;

胡何节,男,主任医师,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: huhejie@hotmail.com

两组细胞离心后去上清液,将约 4×10^5 个 DCs 悬于 300 μ l PBS,按照流式抗体说明书进行抗体标记及同型对照标记,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,加 1 ml PBS 洗涤离心,重悬于 300 μ l PBS 中,流式检测两组细胞表面 CD80、CD86、MHC-II 的表达情况。

1.2.4 MTT 法检测同种异基因混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 颈椎脱臼法处死 BALB/c 小鼠,无菌条件下取出其脾脏,剪碎研磨经 400 目滤网过滤,得到细胞悬液,用淋巴细胞分离液分离出单核细胞,尼龙毛柱法获得同种异体 T 细胞作为反应细胞,调整密度为 2×10^6 /ml。取上述方法获得的 C57BL/6 小鼠骨髓性未成熟树突状细胞 (immature dendritic cells, imDCs) 和成熟树突状细胞 (mature dendritic cells, mDCs),加入终浓度为 25 μ g/ml 的丝裂霉素 C,37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min, PBS 洗涤 2 遍,按照 DC : T 细胞比例为 1 : 5、1 : 10、1 : 20、1 : 40 的反应比铺于 96 孔板中,每个比例设置 3 个复孔,设单纯的 DC 细胞和单纯 T 细胞为阴性对照组,设培养液为空白对照组,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下共培养 72 h,共培养结束前 4 h,在每孔中加入 20 μ l MTT 继续培养 4 h,每孔吸取培养液后加入 150 μ l 的 DMSO,室温震荡 10 min,酶标仪测定各孔的吸光度 (absorbance, A) 值,检测波长为 570 nm。刺激指数 (stimulation index, SI) = (待测样品孔 A 值 - 培养液对照组 A 值) / (阴性对照组 A 值 - 培养液对照组 A 值)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 倒置显微镜下动态观察 DCs 的形态及数量的变化 倒置显微镜下可见细胞在开始的 48 h 内呈贴壁生长,细胞体积较小,有少量的细胞聚集现象。培养 48 h 后,部分细胞开始出现半悬浮状态,并形成细胞集落,少量细胞表面出现毛刺状突起。培养的第 5 天镜下观察可见大量细胞集落,细胞集落表

面可见大量长短不一的突起,细胞体积进一步增大,呈悬浮状态。加入 LPS 刺激 48 h 后,可见大量毛刺状突起的 DCs 从集落释放出来,呈游离状态,而未加 LPS 刺激的 DCs 仍呈集落聚集生长。见图 1。

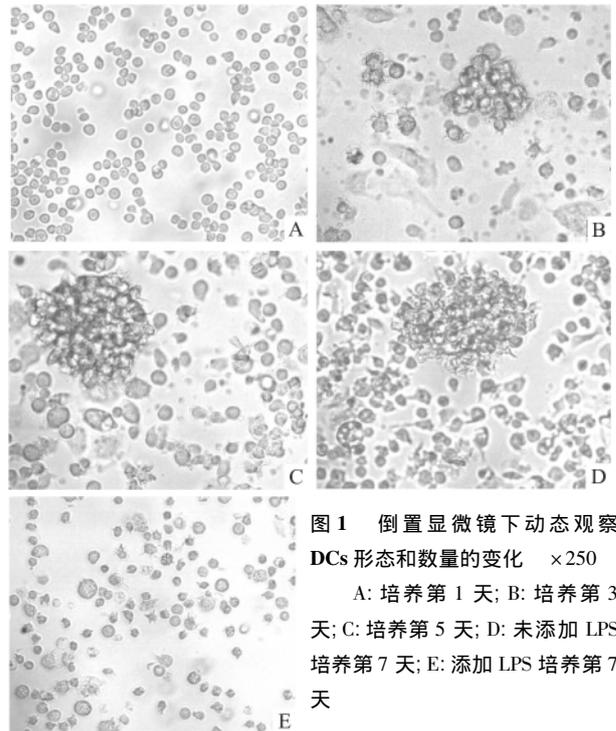


图 1 倒置显微镜下动态观察 DCs 形态和数量的变化 $\times 250$
A: 培养第 1 天; B: 培养第 3 天; C: 培养第 5 天; D: 未添加 LPS 培养第 7 天; E: 添加 LPS 培养第 7 天

2.2 流式检测 DCs 表面分子 细胞培养第 7 天分别收集两组细胞,用流式细胞术分析其表面分子的表达情况。结果显示,两组细胞均高表达 CD11c 分子,纯度 > 90%。未加 LPS 刺激组的 DCs 低表达 CD80、CD86、MHC-II 分子,细胞表现为未成熟状态,而在 LPS 刺激组这些表面分子则呈现出明显的高表达,细胞表现为成熟状态。见图 2。

2.3 MTT 法测两组 DCs 对同种异基因 T 细胞的刺激增殖能力 单因素析因方差分析结果显示两组 DCs 刺激 T 细胞增殖的能力随着 DCs 所占比例的增大而增强,在相同比例条件下,imDCs 刺激 T 细胞增殖的能力显著低于 mDCs 刺激 T 细胞增殖的能力,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 MLR 中 imDCs 和 mDCs 对 T 细胞的 SI ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	DC : T 细胞比例				F 值	P 值
		1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40		
imDCs	3	1.38 \pm 0.04	1.29 \pm 0.02	1.16 \pm 0.04	1.04 \pm 0.06	39.243	0.000
mDCs	3	2.35 \pm 0.07	1.95 \pm 0.05	1.43 \pm 0.02	1.31 \pm 0.11	149.699	0.000
F 值		504.0	410.2	129.3	14.8		
P 值		0.000	0.000	0.000	0.020		

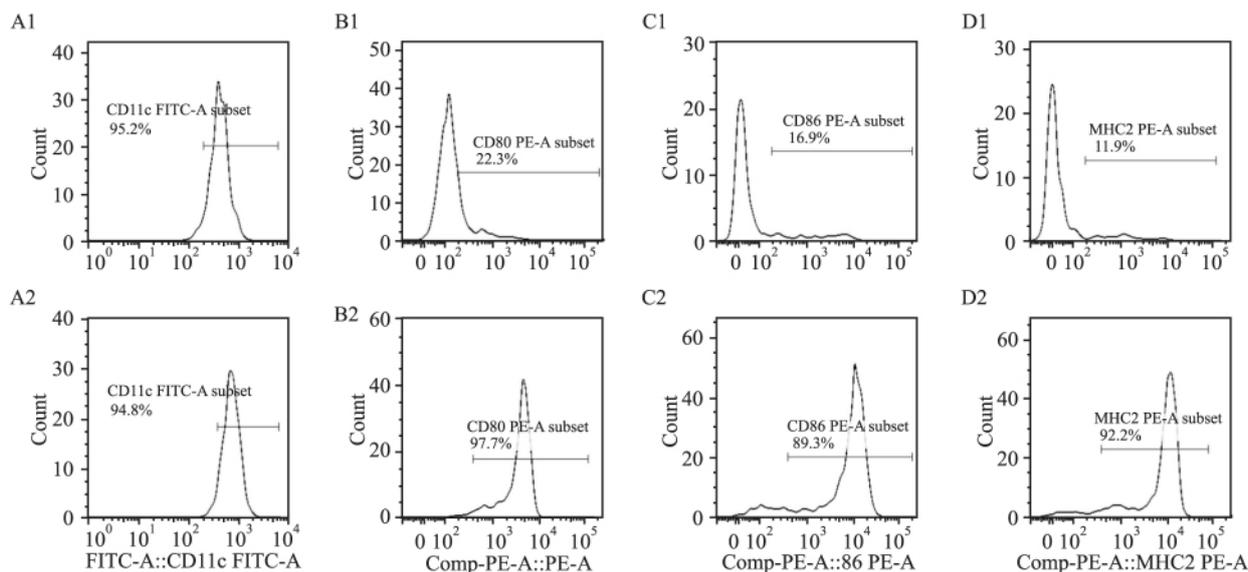


图2 流式分析 imDCs 和 mDCs 表面分子

A: CD11c; B: CD80; C: CD86; D: MHC-II; 1: 未添加 LPS 组; 2: 添加 LPS 组

3 讨论

本实验采用 Lutz et al^[3] 创建的小鼠骨髓性 DCs 培养方法, 利用细胞的悬浮性能去除贴壁的单核细胞, 收集培养液中的悬浮细胞, 可筛选出高纯度的 DCs。对于诱导体系所采用的细胞因子浓度, 不同的文献报道差异较大, 本实验在培养过程中发现, 在 rmGM-CSF 浓度为 20 ng/ml 时 DCs 即可有比较满意的获得率, 随着细胞因子浓度的增加, DCs 的获得率并没有明显增加, 而当 rmGM-CSF 浓度达到 100 ng/ml 时, imDCs 培养体系中 imDCs 所占的比例反而减少, mDCs 所占比例增加, 该结果与先前的文献^[4-5] 报道一致。

DCs 通过不同的成熟状态改变细胞表面分子的表达及细胞因子的分泌, 调节抗原特异性 T 细胞向不同亚群分化, 参与免疫应答和免疫耐受的发生。其免疫原性和耐受性双重功能主要与其表达共刺激分子相关, 在免疫应答过程中, APC 将抗原提呈给 T 淋巴细胞需要两个信号的参与, 第一信号由 APC 表面的抗原肽-MHCII 类分子复合物与 TCR 相互作用, 诱导 T 淋巴细胞的活化, 第二信号则是由 CD80、CD86 等协同刺激分子共同调节 T 淋巴细胞的增殖活化^[6]。本研究显示, imDCs 组中 CD80、CD86 等协同刺激分子和 MHC-II 类分子呈现出低表达, 抗原提呈能力较弱, T 淋巴细胞活化信号受阻, 此时的 DCs 表现为免疫耐受状态, 而在 mDCs 组中 CD80、CD86 等协同刺激分子和 MHC-II 类分子表达明显

升高, MLR 实验显示, mDCs 对同种异基因的 T 细胞刺激能力明显高于 imDCs。刺激成熟后的 DCs 调节 T 淋巴细胞的活化, 参与机体免疫应答, 而未刺激成熟的 DCs 在体内下调免疫应答和维持免疫耐受, 又称之为耐受性树突状细胞 (tolerogenic dendritic cells, tolDCs)。本实验从细胞形态、分子表达和 MLR 三个方面鉴定培养体系中 imDCs 和 mDCs 的形态和功能特点, 可以判定培养出的 DCs 符合科研要求。

有文献^[7] 报道, 尽管在人和老鼠的正常动脉上也能发现 DCs, 但当这些血管发生动脉粥样硬化时, DCs 在数量和分布上会发生很大的改变。本课题组的前期研究^[8] 显示, 在人颈动脉粥样硬化血管中免疫原性的 CD83⁺ mDCs 的分布增多, 而耐受性的 CD11b⁺ tolDCs 分布减少。由此可见, DCs 的免疫调节作用参与了 AS 的发生和发展, 然而 DCs 在体内的数量较少, 仅占外周单核细胞的 1% 左右^[9], 如此稀少的数量给其免疫功能的研究带来了不小的困难。因此, 本实验利用 rmGM-CSF 及 rmIL-4 从小鼠骨髓细胞中诱导培养出大量可供研究的 DCs, 为后续在 AS 小鼠模型上进行其免疫功能研究创造了有利的条件。

参考文献

- [1] 任涛, 李枚娟, 王焱. 动脉粥样硬化与炎症反应关系的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(10): 1464-7.
- [2] 滕广帅, 邵宗鸿. 树突细胞与自身免疫性疾病关系的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(12): 859-61.

利用定量加压充气球囊制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型

许士进, 何淑芳, 金世云, 胡军, 张野

摘要 雄性 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 20 只: 假手术组 (SHAM 组)、球囊缺血再灌注组 (SI/R 组)、经典缺血再灌注组 (I/R 组)。3 组均在冠状动脉左前降支下穿线, SHAM 组仅将未充气的球囊固定于穿线处; SI/R 组固定球囊后, 通过加压泵对球囊充气和放气建立缺血再灌注损伤模型; I/R 组采用传统的造模方法。记录血流动力学和心电图的特异性改变, 再灌注 2 h 后取心脏进行 TTC 染色测心肌梗死面积。结果显示, SI/R 和 I/R 组均可造成显著心肌缺血, 两组死亡率和心肌梗死体积 (IS/ARR) 的差异无统计学意义。

关键词 动物模型; 心脏; 缺血再灌注; 充气; 球囊

中图分类号 R 654.2; R-332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1180-04

2015-04-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81471145)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院麻醉科, 合肥 230601

作者简介: 许士进, 男, 硕士研究生;

张野, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhangye_hassan@sina.com

心肌缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 是指心肌组织在经历较长时间缺血后, 当恢复血流灌注时反而使心肌缺血后损伤加重的病理生理现象^[1]。心肌 IRI 的防治及机制研究已成为目前心血管领域的热点问题。大鼠以其冠状动脉侧支循环少、心肌坏死出现早、重复性、稳定性好, 成为制作心肌 IRI 模型的首选实验动物^[2]。目前制备大鼠心肌 IRI 的经典方法为推管法^[3], 但反复推管操作易损伤心肌和冠状血管, 且无法满足核磁共振 (MRI) 成像^[4]、心肌灌注断层显像^[5]等新技术在进行动物心肌 IRI 研究时对实时、远程操控的要求。该研究利用定量加压充气球囊制备心肌 IRI 模型, 并可通过与延长管连接实施实时远程操作, 模型成功率高、损伤小、操作方便。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周龄健康雄性清洁级 SD 大

- [3] Lutz M B, Kukutsch N, Ogilvie A L, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 223(1): 77-92.
- [4] 李闻颖, 邓锋, 王豫蓉, 等. 不同浓度粒巨噬细胞集落刺激因子在未成熟树突状细胞培养中的效果研究 [J]. *重庆医科大学学报* 2009, 34(4): 424-7.
- [5] 王晓婧, 梅晓冬. 不同浓度粒巨噬细胞集落刺激因子及白介素-4 对树突状细胞体外诱导培养的影响 [J]. *中国临床保健杂志* 2014, 17(2): 157-9.

- [6] 张安莉, 仇超, 徐建青. 淋巴细胞膜分子 CD160 结构与功能的研究进展 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31(4): 380-4.
- [7] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis [J]. *Annual Review of Immunology* 2009 27: 165-97.
- [8] 邓琼, 胡何节, 方征东, 等. CD83⁺ 成熟树突状细胞和 CD11b⁺ 耐受性树突状细胞在人颈动脉粥样硬化病变中的分布 [J]. *中国临床保健杂志* 2014, 17(1): 45-7.
- [9] Steinman R M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity [J]. *Annu Rev Immunol*, 1991 9: 271-96.

A culture system for dendritic cells induced from murine bone marrow *in vitro*

Liu Zhenming, Hu Hejie, Fang Zhengdong, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001)

Abstract To establish a culture system for dendritic cells (DCs) induced from murine bone marrow *in vitro*. Compared with mature DCs, fewer spines were observed in immature DCs under microscopy. The expressions of cell surface molecules in immature DCs were significantly lower than those of mature DCs. MLR indicated T cells proliferation capacities of same-reaction ratio in immature DCs were significantly lower than those in mature DCs. The methods of culturing DCs established by us can be used in the future experiment.

Key words mice; dendritic cells; cell culture