

# 恒河猴树突状细胞生物学特性的初步研究

葛长勇 李鸿钧<sup>1</sup> 谢天宏<sup>1</sup> 张光明<sup>1</sup> 易山<sup>1</sup> 孙茂盛<sup>1</sup> 吴南屏\*

(浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室, 杭州 310003;

<sup>1</sup>中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

**摘要** 树突状细胞(dendritic cell, DC)在 HIV 初次感染和潜伏感染中发挥着关键作用。恒河猴的生物学性质与人类非常接近, 所以恒河猴是研究 HIV 感染的常用动物模型。以恒河猴为实验动物进行 DC 的研究首先需要对恒河猴 DC 的生物学性质有初步的了解。本研究从健康恒河猴外周血中分离单个核细胞, 用 rhGM-CSF、rhIL-4 和 rhTNF- $\alpha$  等细胞因子组合体外扩增诱导恒河猴 DC, 成功诱导出具有典型形态特征的 DC, 所获 DC 高表达 MHC II 类分子和 CD86 共刺激分子, 在混合淋巴细胞反应中能刺激 T 细胞增殖, 培养至第 9 天表达 CD1a 的细胞比例为 60.5% $\pm$ 2.0%, 表达 CD83 的比例为 43.8% $\pm$ 1.5%, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)内吞实验说明诱导的猴 DC 在第 6 天吞噬能力最强。本研究为以恒河猴为实验动物进行 DC 的研究打下了基础。

**关键词** 恒河猴; 树突状细胞; 生物学特性

恒河猴是生物学性质与人类最为接近的实验动物之一, 其在形态结构、生理生化、遗传代谢等方面与人类非常相似。基因测序结果表明, 恒河猴基因组与人类的基因组序列相似度为 92%~95%, 是目前已知的除黑猩猩外, 基因组序列与人类最接近的灵长类动物<sup>[1]</sup>。使用恒河猴进行实验研究, 所得结果很容易外推于人类。树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知功能最强大的抗原提呈细胞, 在初次免疫应答过程中发挥着枢纽作用。外来抗原经 DC 加工提呈后既可引发免疫激活, 也可诱导免疫耐受, 揭示 DC 介导的免疫激活和免疫耐受对于感染性疾病的防治具有重要意义。研究显示, 树突状细胞在 HIV 初次感染和潜伏感染中发挥着关键作用<sup>[2-4]</sup>。以恒河猴为动物模型进行 DC 相关的 HIV 感染和潜伏病毒库形成机制研究的前提是要有一套成熟的体外扩增诱导猴 DC 的实验方法并对猴 DC 的生物学特性有深入的了解。猴细胞因子供应相对匮乏, 但使用 rhGM-CSF 和 rhIL-4 组合培养方案诱导外周血单核细胞来源的 DC 已在黑猩猩、食蟹猴、恒河猴等非人灵长类动物获得成功<sup>[5-7]</sup>。本文采用类似方案进行恒河猴 DC 的扩增诱导并对其生物学特性进行系统分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 恒河猴血标本

恒河猴外周血来源于成年雌性恒河猴, 年龄 6~10 岁, 体重 4~6 kg, 由国家灵长类实验动物中心提供。

### 1.2 主要试剂

PE 标记的抗人 CD1a 单抗; PE 标记的抗猴 CD83 单抗; FITC 标记的抗猴 HLA-DR、CD86 单抗; PerCP 标记的抗猴 CD45 单抗均为美国贝克曼库尔特公司产品。rhGM-CSF 为中国医学科学院医学生物学研究所产品; rhIL-4 和 rhTNF- $\alpha$  为 Israel CytoLab 有限公司产品。人淋巴细胞分离液为天津灏洋(TBD)生物制品科技有限责任公司产品; RPMI-1640 培养基为美国 Gibco 公司产品; 胎牛血清为美国 GM 公司产品。<sup>[3</sup>H]-TdR 为北京原子高科核技术应用股份有限公司产品。灭活 SV40 由中国医学科学院医学生物学研究所制备保存<sup>[8]</sup>; 2,5-二苯基噁唑(PPO)和 1,4-双(5-苯基-2-噁唑基)苯(POPOP)为国药集团化学试剂有限公司产品。

### 1.3 主要仪器和设备

Hitachi S-3000N 型扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEC)为日本日立公司产品; 普通倒置显微镜和相差显微镜为日本尼康公司产品; 离心机为 Eppendorf 公司产品; CO<sub>2</sub> 细胞培养箱为 Revco 公司产品; 流式细胞仪、LS6500 型闪烁计数器为美国贝克曼库尔特有限公司产品; ZT-VI 型多头细胞样品

收稿日期: 2008-11-21 接受日期: 2009-06-08

国家“十一五”科技重大专项(No.2008ZX10103)和浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室开放基金项目(No.2008A06)资助

\* 通讯作者。Tel: 0571-87236580, E-mail: flwnp@yahoo.com.cn

收集器为浙江绍兴东浦医疗仪器厂产品。

#### 1.4 外周血单核细胞和淋巴细胞的分离

采集乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝的恒河猴外周血,每份 5 ml,用 PBS 液将抗凝血稀释 1 倍。采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,采用粘附贴壁法分离单核细胞和淋巴细胞,采用花环沉降法分离 T 细胞和 B 细胞。

#### 1.5 恒河猴 DC 的诱导

将所获贴壁的单核细胞分为 3 组。分别在 RPMI-1640 完全培养液中加入以下组分:① 300 ng/ml rhGM-CSF;② 300 ng/ml rhGM-CSF+20 ng/ml rhIL-4+50 ng/ml rhTNF- $\alpha$ ;③ 300 ng/ml rhGM-CSF+20 ng/ml rhIL-4+50 ng/ml 灭活 SV40+50 ng/ml rhTNF- $\alpha$ 。50 ng/ml 灭活 SV40 于培养的第 4 天加入并在此之后保持其浓度,50 ng/ml rhTNF- $\alpha$  于培养的第 7 天加入并在此之后保持其浓度。将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每 3 天换液一次。

#### 1.6 生物学特征鉴定

**1.6.1 细胞的形态学观察** 每天于倒置显微镜和相差显微镜下观察细胞生长情况并拍照记录。另取第 3 组培养至第 12 天的 DC,用 PBS 洗 3 次,以 2.5% 戊二醛(pH 7.2~7.4) 4 °C 下固定 1~2 h,再用 PBS 漂洗 3 次,1% 锇酸 4 °C 下固定 1~2 h, PBS 漂洗 3 次,酒精梯度脱水 2 次,样品在每一级浓度中停留 5 min,叔丁醇梯度置换 2 次,样品在每一级浓度中停留 3 min,真空冷冻干燥,离子溅射镀膜。于 HITACHI S-3000N 扫描电子显微镜下观察记录细胞形态。

**1.6.2 细胞表面分子的检测** 取培养至第 5、7、9 天的细胞,每组取 3 个样品,用 FACS 标记液 PBA (PBS 中加入 1% BSA、0.02% 叠氮钠)调整细胞浓度为  $5 \times 10^6$  个/ml,将样品转移到流式管中,每管 100  $\mu$ l 细胞悬液,按下列组合加入荧光标记抗体各 10  $\mu$ l: 组合①: PerCP-CD45+FITC-CD86+PE-CD83; 组合②: PerCP-CD45+PE-CD1a+FITC-HLA-DR、DP、DQ, 4 °C 避光放置 15~30 min。PBA 洗 3 次,上流式细胞仪检测。测定结果用 3 个样本的均值表示。

**1.6.3 刺激 T 细胞增殖的能力评价** 使用 [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入法测定恒河猴 DC 在混合淋巴细胞反应中刺激自体 T 细胞增殖的能力。收集培养至第 12 天的细胞作为混合淋巴细胞反应中的刺激细胞,用不含酚红的 RPMI-1640 完全培养液将 DC 的密度调整为  $1 \times 10^7$  个/ml、 $1 \times 10^6$  个/ml、 $2 \times 10^5$  个/ml、 $1 \times 10^5$  个/ml、 $2 \times 10^4$  个/ml 等共 5 个浓度。将 T 细胞密度调整为  $1 \times 10^7$  个/ml。使用 96 孔培养板,共设 12 组测定孔,每组

设四个复孔。12 组测定孔分别为空白对照孔、T 细胞孔、5 个浓度梯度的 DC 孔、5 种不同 T/DC 细胞比例(1:1、10:1、50:1、100:1、500:1)的混合孔,培养液总体积为 200  $\mu$ l。DC 加入前经 30  $\mu$ g/ml 丝裂霉素 C (MMC) 37 °C 处理 30 min。加样完毕后将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5 天。取 200  $\mu$ l [<sup>3</sup>H]-TdR 储存液(1 mCi/ml) 稀释 10 倍,每孔加 10  $\mu$ l,即 1  $\mu$ Ci。重新将细胞放于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16~24 h,用 ZT-VI 型多头细胞样品收集器和 Whatman 玻璃纤维滤纸收集细胞,生理盐水、5% 三氯乙酸、无水乙醇冲洗,用剪刀将细胞片剪下,置于 55 °C 烘干 2 h。然后将滤膜片放入液闪杯中,加入 5 ml 闪烁液,暗处放置 15 min。于贝克曼库尔特 LS6500 型闪烁计数器上测定每分钟脉冲数(counts per minute, cpm)。自体 T 细胞孔 cpm 值作为处理前数据,DC 加上自体 T 细胞混合孔 cpm 值减去 DC 孔 cpm 值作为处理后的数据。

**1.6.4 群体内存能力测定** 取 4 份猴血标本,分别将其单个核细胞悬液分成 10 份转移到 24 孔细胞培养板中,添加 RPMI-1640 完全培养液 1~2 ml。将培养板平放于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中温育 2~4 h,吸弃未贴壁细胞,加入含 300 ng/ml rhGM-CSF、20 ng/ml rhIL-4 的 RPMI-1640 完全培养液 1~2 ml; 每天每个标本取 1 孔进行吞噬能力测定。加入 100  $\mu$ l 1 mg/ml 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP),放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中温育 30 min。PBS 洗 3 次,细胞沉淀中加入 100  $\mu$ l 1% Triton X-100 裂解细胞 10~15 min,于各反应孔中加入临时配制的四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)使用液(含 0.1 mg/ml TMB) 100  $\mu$ l, 37 °C 显色 30 min。于各反应孔加入 100  $\mu$ l 2 mol/L HCl 终止反应。于 450 nm 测定 A 值,校正波长 630 nm。显色反应终止后立即比色。用 100  $\mu$ l TMB 使用液加入 100  $\mu$ l 2 mol/L HCl 作空白对照。结果用 4 孔均值表示,代表 DC 的群体内存能力。

#### 1.7 统计学处理

使用 SPSS15.0 统计软件进行统计学分析,数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较使用 *t* 检验,3 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 恒河猴 DC 的形态学观察

以单核细胞在单纯 rhGM-CSF 刺激下扩增时的形态学变化为对照,连续观察了 DC 诱导组在体外扩

增诱导时的形态学变化(图 1)。结果显示 rhGM-CSF 能够使猴单核细胞在体外有效扩增, rhIL-4 可以诱导细胞向具有 DC 特征的方向分化, 刺激抗原灭活 SV40 可以使细胞的生长状态发生明显改变。

收集 rhGM-CSF+rhIL-4+ 灭活 SV40+rhTNF- $\alpha$  组培养至第 12 天的细胞, 样品经过处理后于扫描电子显微镜下观察并照像记录。可以看到在抗原刺激下培养至第 12 天的细胞仍处于不同的发育阶段, 其中以面纱细胞居多, 这可能与体外培养的环境有关; 细

胞大小差异很大, 直径在 20~50  $\mu\text{m}$  之间; 细胞的形态多种多样, 有圆形、椭圆形、杆状等多种形态; 突起的形式有蟹状、棘状、绒球状、鳞片状、花瓣状等多种形式(图 2)。

## 2.2 细胞表面分子的表达

于培养的第 5、7、9 天收集不同培养条件的细胞进行流式细胞术检测, 用 PerCP 标记的鼠抗非人灵长类 CD45 单克隆抗体圈定白细胞, 检测细胞表面 HLA-DR、CD86、CD1a 和 CD83 等分子的表达, 结

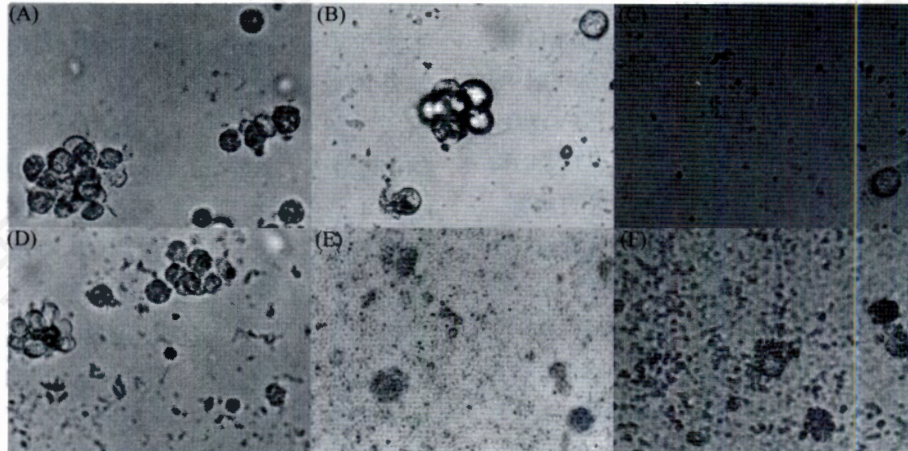


Fig.1 Dendritic cell morphology of rhesus macaques (I)

A: rhGM-CSF control group, d4 of culture (400 $\times$ ); B: rhGM-CSF control group, d8 of culture (400 $\times$ ); C: rhGM-CSF control group, d12 of culture (400 $\times$ ); D: rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$  group, d4 of culture (400 $\times$ ); E: rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$  group, d8 of culture (400 $\times$ ); F: rhGM-CSF+rhIL-4+inactive SV40+rhTNF- $\alpha$  group, d12 of culture (400 $\times$ ).

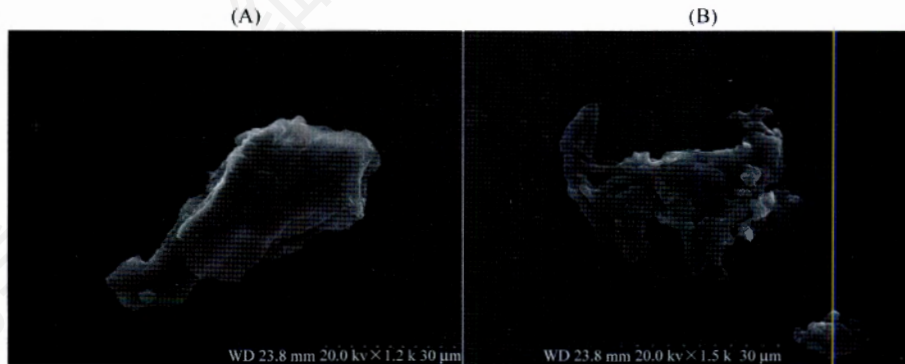


Fig.2 Dendritic cell morphology of rhesus macaques (II)

A: rhGM-CSF+rhIL-4+inactive SV40+rhTNF- $\alpha$  group, d12 of culture (1 200 $\times$ ); B: rhGM-CSF+rhIL-4+inactive SV40+rhTNF- $\alpha$  group, d12 of culture (1 500 $\times$ ).

Table 1 Expression of DC surface molecules ( $\bar{x}\pm s$ )

DC surface molecules	rhGM-CSF group			rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$ group			rhGM-CSF+rhIL-4+inactive SV40+rhTNF- $\alpha$ group		
	d5	d7	d9	d5	d7*	d9*	d5	d7*	d9*
HLA-DR (%)	25.9 $\pm$ 1.0	28.3 $\pm$ 1.0	33.9 $\pm$ 2.3	41.4 $\pm$ 2.1	46.1 $\pm$ 1.1	55.1 $\pm$ 2.3	41.0 $\pm$ 2.0	62.9 $\pm$ 1.1	75.7 $\pm$ 3.7
CD86 (%)	33.3 $\pm$ 1.5	39.0 $\pm$ 1.8	43.6 $\pm$ 1.2	51.1 $\pm$ 1.9	54.4 $\pm$ 1.7	67.8 $\pm$ 5.3	51.0 $\pm$ 1.7	91.4 $\pm$ 2.59	93.4 $\pm$ 2.2
CD1a (%)	22.8 $\pm$ 1.3	36.0 $\pm$ 1.0	37.8 $\pm$ 0.8	50.7 $\pm$ 1.6	53.9 $\pm$ 0.8	60.5 $\pm$ 2.0	49.0 $\pm$ 2.2	63.6 $\pm$ 1.3	77.0 $\pm$ 2.0
CD83 (%)	1.0 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.5	42.4 $\pm$ 1.2	43.8 $\pm$ 1.5	1.3 $\pm$ 0.4	45.3 $\pm$ 1.3	51.1 $\pm$ 1.8

\* $P < 0.05$ , compared with GM-CSF group.

果见表1。以单纯 rhGM-CSF 培养组为对照进行统计学分析, 培养至第7天和第9天四种表面分子的表达差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

灭活 SV40 抗原刺激组培养至第12天的细胞以面纱细胞为主, 这和 DC 摄取抗原后的功能变化相一致, 四种表面分子的表达分别为  $73.5\% \pm 4.1\%$  (HLA-DR)、 $91.7\% \pm 3.3\%$  (CD86)、 $75.7\% \pm 3.7\%$  (CD1a)、 $53.2\% \pm 2.7\%$  (CD83), 与培养至第9天的细胞相比, 四种细胞表面分子的表达差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。rhTNF- $\alpha$  能够促进 DC 成熟特异性分子 CD83 的表达, 在没有外来抗原刺激的 rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$  组, CD83 表达的增加并不明显( $P > 0.05$ ), 在灭活 SV40 刺激的 rhGM-CSF+rhIL-4+ 灭活 SV40+rhTNF- $\alpha$  组, CD83 的表达明显增加( $P < 0.05$ )。说明这种促进作用有赖于特异抗原的刺激。

### 2.3 混合淋巴细胞反应中刺激 T 细胞增殖的能力

恒河猴 DC 刺激自体 T 细胞增殖能力的结果如图3所示, 与 DC 未处理组 T 细胞相比 T/DC 混合孔自体 T 细胞 cpm 增加明显( $P < 0.05$ ), 故可认为处理前后 T 细胞的增殖差别有统计学意义, 诱导出的猴 DC 在体外能够有效刺激 T 细胞增殖。

### 2.4 细胞内吞能力

使用 HRP 作为吞噬底物评价 rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$  组合扩增诱导的 DC 的吞噬能力, 裂解细胞后用 TMB 显色, 于 450 nm 测定 A 值, 校正波长 630

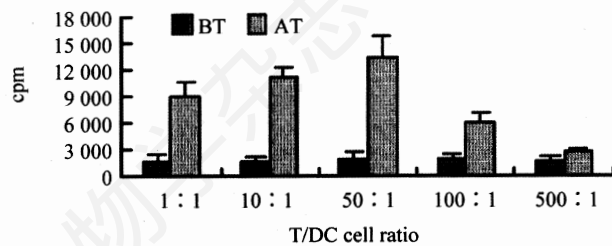


Fig.3 Proliferation of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction

BT: DC-untreated T cells; AT: DC-treated T cells; cpm: counts per minute.

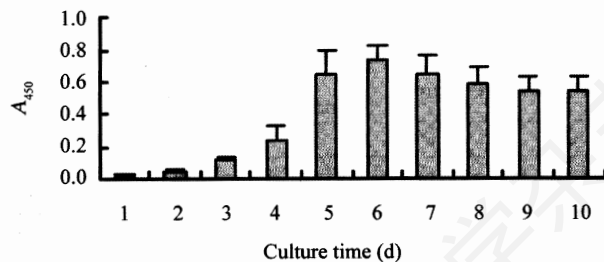


Fig.4 Phagocytosis of rhesus monkey dendritic cells

nm。结果表明体外诱导的外周血来源的猴 DC 在培养的第 5~7 天吞噬能力最强, 然后逐渐下降(图 4)。因此在体外进行抗原冲击时, 选择在第 4 天以后加入为宜。

## 3 讨论

DC 的体外诱导有多种不同的方案, 大体上可分为两类, 一类是以骨髓或脐血中的 CD34<sup>+</sup>造血干细胞为前体细胞进行扩增诱导, 另一类是以外周血单核细胞为前体细胞进行扩增诱导。大多数有关人 DC 生物学特性的资料是通过使用 GM-CSF+IL-4 组合培养外周血单核细胞获得的。研究表明, 这一方案可以成功用于黑猩猩、食蟹猴、恒河猴等非人灵长类 DC 的培养。Barratt-Boyes 等<sup>[5]</sup>使用 rhGM-CSF 和 rhIL-4 培养黑猩猩外周血来源的 DC 并获得成功, 在培养的第 7~8 天可以观察到具有典型 DC 形态的细胞, 使用与黑猩猩有交叉反应的抗人 DC 相关分子单克隆抗体进行鉴定表明, 表达 DC 特异性分子 CD83 的细胞比例约为 5%, 细胞表面同时高表达 MHC II 类分子和共刺激分子。O'Doherty 等<sup>[7]</sup>使用这一方案时, 使用 1% 人或猴血清替代 10% 牛血清, 在培养的第 7 天半量换液时加入单核细胞条件培养液(monocyte-conditioned medium, MCM)。MCM 含有能促进 DC 分化成熟的细胞因子如 IL-1 和 TNF- $\alpha$ , 可以促进 DC 成熟, 增强混合淋巴细胞反应中刺激 T 细胞增殖的能力。单纯使用单核细胞条件培养基可以在 1~2 天内诱导外周血 DC 前体的发育分化, 但不能大量扩增。使用这一方案培养至第 11 天的悬浮细胞高表达 HLA-DR、CD83、CD86、CD40 等已知灵长类 DC 表面分子。O'Doherty 等培养的 DC 细胞的形态多呈毛刺状, 与本文 rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$  组合培养组结果相似, 与 rhGM-CSF+rhrhIL-4+ 灭活 SV40+rhTNF- $\alpha$  实验组存在较大差异, 这与所加刺激因子的不同有关。MCM 与 TNF- $\alpha$  作用类似, 而刺激抗原的加入会引细胞形态及功能状态发生剧烈变化。外周血 CD14<sup>+</sup> 单核细胞在 GM-CSF 和 IL-4 作用下可分化为未成熟 DC, 这类细胞具有较强的抗原捕获能力, 但刺激初始型 T 增殖的能力较弱。若给予一定的刺激信号, 如 TNF- $\alpha$ 、CD40L 等, 这些细胞就会表现出成熟 DC 的特征, 具有较强的刺激初始型 T 增殖的能力。研究表明, 单核细胞在 M-CSF 作用下主要向巨噬细胞(M $\phi$ )方向分化, 在 GM-CSF 作用下既可向 M $\phi$  方向分化又可向 DC 方向分化, 这取决于

影响其分化的细胞因子的类型<sup>[9,10]</sup>, IL-4的作用就是抑制巨噬细胞克隆的形成, 诱导单核细胞向DC方向分化, TNF- $\alpha$ 的作用则是使这种分化成为一种不可逆分化。

单纯单核细胞扩增组(rhGM-CSF组)和DC扩增诱导组(rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$ 组)在培养的第2天即可见到少量较小的细胞集落形成, 集落大小、细胞形态均无明显差异。随后, 集落逐渐变大, 数目不断增多。培养至第5天, 两组细胞大小形态仍未见明显差异。从第6天开始, 两组细胞的生长状态及细胞形态开始出现明显差异。虽然细胞集落开始消散, 但rhGM-CSF组仍可见到较多细胞集落, 散在细胞呈圆形, 形态规则, 大小均一。rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$ 组细胞集落消散明显, 细胞生长状态逐步转变为悬浮游走状态, 加入灭活SV40抗原后, 细胞形态开始发生明显变化。培养至第8天, rhGM-CSF组细胞集落的数量显著减少, 散在细胞呈圆形, 大小均一, 表面无突起。rhGM-CSF+rhIL-4+灭活SV40+rhTNF- $\alpha$ 组细胞集落多已消散, 细胞呈悬浮游走状态, 大小不一, 形态不规则, 表面可见多种突起。显微镜下可见明显差异(图1)。培养至第12天, 细胞集落完全消散。rhGM-CSF组细胞大小均一, 也有少量悬浮生长细胞表面出现突起, 说明在单纯使用rhGM-CSF扩增单核细胞时也会有少数细胞向树突状细胞方向分化, 但因缺乏抗原刺激, 细胞大小并无明显改变。rhGM-CSF+rhIL-4+灭活SV40+rhTNF- $\alpha$ 组细胞呈悬浮生长, 大小不一, 形态各异, 表面突起明显(图1)。扫描电镜下可见细胞直径在20~50  $\mu\text{m}$ 之间, 形态极不规则, 突起变化多端, 呈棘状、蜂窝状、鳞片状、花瓣状等多种形式, 但以面纱细胞居多, 这可能与体外培养环境有关。在体外培养条件下, 细胞吞噬抗原后由于不能迁移至淋巴结继续发育, 因此细胞形态主要以面纱细胞的形态为特征。若不加抗原刺激物而只加促进细胞分化的MCM或TNF- $\alpha$ , 细胞则多呈毛刺状<sup>[7]</sup>。

与单纯rhGM-CSF培养组细胞相比, rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$ 组细胞HLA-DR、CD86、CD1a、CD83四种表面分子的表达明显增高( $P < 0.05$ ), 从rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$ 组和rhGM-CSF+rhIL-4+灭活SV40+rhTNF- $\alpha$ 组培养至第7天的数据可以看出, 灭活SV40抗原可以增加四种表面分子的表达( $P < 0.05$ )。比较rhGM-CSF+rhIL-4+rhTNF- $\alpha$ 组内和rhGM-CSF+rhIL-4+灭活SV40+rhTNF- $\alpha$ 组内第7天和第9天的数据, 可以看出rhTNF- $\alpha$ 可以促进DC的发育, 提高表达CD83分子的比例。统计分

析发现, 只有灭活SV40抗原刺激组CD83表达的增加有统计学意义, 说明rhTNF- $\alpha$ 的促成成熟作用与抗原刺激密切相关。单纯rhGM-CSF培养组3次取样结果显示表达CD83的细胞比例无明显差异( $P > 0.05$ ), 说明在不加rhIL-4和刺激抗原时, rhGM-CSF刺激下的细胞不会向成熟DC的方向分化。

混合淋巴细胞反应中刺激T细胞增殖的能力是评价DC功能的重要指标之一。O'Doherty等<sup>[7]</sup>测定的是单纯细胞因子诱导的DC刺激T细胞增殖的能力, 这与自然成熟的DC存在较大差异。本实验测定的是在外界抗原刺激作用下DC刺激T细胞增殖的能力, 相对而言, 更加接近自然状态。<sup>[3H]</sup>-TdR掺入法测定结果显示, 不同T/DC细胞比例下, DC均可刺激自体T细胞增殖, 在T/DC细胞比例为50:1时刺激效率最高, 与对照组相比各混合孔T细胞cpm值的增高均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

HRP内吞实验显示, 猴DC的内吞能力在培养的第4天开始明显升高, 于培养的第6天达到峰值, 之后逐渐下降, 但仍具有较强内吞能力, 说明DC分化为未成熟DC后, 在未接触外来抗原的情况下能够保持其捕获抗原的能力。在制备猴DC疫苗时, 刺激抗原在培养的第4天以后加入比较合适。

本文对使用重组人相关细胞因子培养猴DC的可行性进行了初步研究, 结果成功诱导出了具有典型细胞形态、表面特异性分子和刺激T细胞增殖能力的DC, 并对其吞噬抗原的时间特征进行了分析。本研究为以恒河猴为动物模型进行DC相关的疫苗研究及HIV感染机制研究打下了基础。

### 参考文献(References)

- [1] Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, *et al.* Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome, *Science*, 2007, 316(5822): 222-234
- [2] Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells, *Cell*, 2000, 100(5): 587-597
- [3] de Witte L, Nabatov A, Pion M, *et al.* Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells, *Nat Med*, 2007, 13(3): 367-371
- [4] de Witte L, Nabatov A, Geijtenbeek TB. Distinct roles for DC-SIGN<sup>+</sup>-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission, *Trends Mol Med*, 2008, 14(1): 12-19
- [5] Barratt-Boyes SM, Henderson RA, Finn OJ. Chimpanzee dendritic cells with potent immunostimulatory function can be propagated from peripheral blood, *Immunology*, 1996, 87(4): 528-534
- [6] Söderlund J, Nilsson C, Ekman M, *et al.* Recruitment of monocyte derived dendritic cells *ex vivo* from SIV infected and

- non-infected cynomolgus monkeys, *Scand J Immunol*, 2000, 51(2): 186-194
- [7] O'Doherty U, Ignatius R, Bhardwaj N, *et al.* Generation of monocyte-derived dendritic cells from precursors in rhesus macaque blood, *J Immunol Methods*, 1997, 207(2): 185-194
- [8] 曹增, 孙强明, 孙娟, 等。SV40 灭活疫苗的制备及其对小鼠免疫的研究, *中国病毒学*, 2005, 20(2): 159-163
- [9] Häusser G, Ludewig B, Gelderblom HR, *et al.* Monocyte-derived dendritic cells represent a transient stage of differentiation in the myeloid lineage, *Immunobiology*, 1997, 197(5): 534-542
- [10] Akagawa K. Differentiation and function of human monocytes, *Hum Cell*, 1994, 7(3): 116-120

## Preliminary Studies on Biological Characteristics of Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Dendritic Cells

Chang-Yong Ge, Hong-Jun Li<sup>1</sup>, Tian-Hong Xie<sup>1</sup>, Guang-Ming Zhang<sup>1</sup>, Shan Yi<sup>1</sup>, Mao-Sheng Sun, Nan-Ping Wu\*  
 (State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; <sup>1</sup>Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

**Abstract** Dendritic cell (DC) play a crucial role both in the primary HIV infection stage and in the latent HIV infection period. The rhesus macaque, whose biological characteristics are remarkably similar to those of humans, is a good animal model to study the AIDS pathogenesis. The biological characteristics of the rhesus monkey dendritic cells need to be known before the immune function of rhesus monkey dendritic cells in HIV infection will be studied. Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) monocytes were separated from peripheral blood. Monocytes were proliferated and induced to differentiate toward DC by using recombinant human granulocyte-rhGM-CSF, rhIL-4, and impulsed by using inactive SV40 antigen, and promoted for mature DC by using rhTNF- $\alpha$ . The morphocytology of DC was observed under ordinary light microscope and scanning electron microscope. The characteristic dendritic morphology was observed on some DC surface. High expression of HLA-DR and CD86 on rhesus monkey DC were mensurated. Rhesus monkey DC derived from inducement *in vitro* can cause auto T cell proliferation effectively in mixed lymphocyte reaction (MLR). At day 9 of cell culture, flow cytometric analysis showed that cells with CD1a account for 60.5% $\pm$ 2.0%, and cells with CD83 account for 43.8% $\pm$ 1.5%. DC endocytosis of horseradish peroxidase (HRP) showed that the peak value of endocytic capacity of DC lies at the sixth day of cell culture. This study laid the foundation for the research and development of DC by using rhesus monkey as animal model.

**Key words** rhesus monkey; dendritic cells; biological characteristics

Received: January 21, 2008 Accepted: June 8, 2009

This work was supported by the National S&T Major Project of China during the 11th Five-Year Plan Period (No.2008ZX10103) and the Opening Foundation of the State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Medical College, Zhejiang University (No.2008A06)

\* Corresponding author. Tel: 86-571-87236580, E-mail: flwnp@yahoo.com.cn