

外周血树突状细胞的体外培养

陈君敏* 魏秀妹* 陈志哲**

(* 福建医科大学附属第一医院 福州 350005)

(** 福建医科大学附属协和医院 福建省血液病研究所 福州 350001)

树突状细胞(DCs)是目前发现的功能最强的抗原提呈细胞(APC),在抗肿瘤、抗感染、移植排斥和自身免疫疾病中发挥重要作用,迄今已有用DCs过继回输治疗恶性肿瘤的临床报道^[1]。要获得足够数量的DCs用于临床治疗,外周血是较理想的来源。我们自1998年底至1999年6月建立体外培养技术从外周血培养DCs,现报告如下。

材料与方 法

一、标本来源

为两名健康志愿者。

二、DC_s 的培养

取静脉血10-20ml,肝素抗凝(终浓度为50 IU/ml),经2000rpm,10min离心,收集上层血浆备用。压实的血细胞用无钙、镁的PBS稀释、重悬浮后,轻轻加到含淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)的离心管,室温下2000rpm,20min离心,取界面细胞即外周血单个核细胞(PBMNCs)。PBMNCs用PBS洗2次后,用完全培养基,即含1%自体血浆的RPMI 1640培养基(Gibco)重悬浮,调整细胞密度为约 $3-4 \times 10^6$ 细胞/ml,取5ml加入T-25塑料培养瓶(Corning),37℃,5%CO₂孵箱培养。1h后,吸除非贴壁的PBMNCs,并用PBS轻轻洗去非贴壁细胞,再加入4ml含细胞因子的完全培养基继续培养,细胞因子为:rhIL-4(Pharmingen)800IU/ml和rhGM-CSF(Kirin,中国麒麟鲲鹏生物药业有限公司惠赠)1000IU/ml。于培养的第3、5、7、9天各增加1ml新鲜的完全培养基,并添加细胞因子,剂量如下:

第3天 rhIL-44000 IU, rhGM-CSF 5000 IU

第5天 rhIL-44800 IU, rhGM-CSF 6000 IU

第7天 rhIL-45600 IU, rhGM-CSF 7000 IU

第9天 rhIL-46400 IU, rhGM-CSF 8000 IU, rhT-NF α (Pharmingen)8000 IU使rhIL-4和rhGM-CSF浓度不低于初始浓度。第12天收集所有非贴壁细胞。

三、超微结构分析

DCs悬液经离心,沉淀的细胞用3%戊二醛-1.5%多聚甲醛固定,经PBS漂洗后用1%锇酸固定,梯度乙醇-丙酮脱水,超薄切片,铅铀染色后,经Hu-12A透射电镜观察,摄片。

四、细胞表型分析

收获的DCs用PBS洗涤并重悬浮后,将PE或FITC标记的鼠抗人CD1a(harmingen)、CD14(Immunotech)或HLA-DR(Immunotech)加入DCs的PBS悬液,4℃暗处放置30min,用PBS洗涤后在FACS can(Becton-Dickinson)检测,CellQuest软件分析。

五、同种混合淋巴细胞反应

1. 反应细胞的制备 取与DCs来源不同的健康志愿者外周血,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液梯度密度离心分离PBMNCs, PBS洗2次后用含10%胎牛血清(FBS,杭州四季青生化公司)的RPMI1640培养基悬浮,调整细胞浓度为约 5×10^7 /ml,注入自制的T细胞尼龙毛柱(尼龙毛为上海化纤九厂产品),37℃温育1h后,用上述培养基冲洗出非粘附细胞作为反应细胞。反应细胞用PBS洗涤并用上述培养基重悬浮,调整细胞密度为 2×10^6 /ml备用。

2. 刺激细胞的制备 收获的DCs用PBS洗涤后用含10%FBS的RPMI1640培养基悬浮,调整细胞浓度为 5×10^5 /ml,加入丝裂霉素C(日本协和发酵工业株式会社),25 μ g/ml,37℃温育45分钟后,用PBS洗2次,并用上述培养基重悬浮,作为刺激细胞,取与DCs来源相同的健康志愿者外周血分离PBMNCs,经上述丝裂霉素C处理后用上述培养基悬浮作为对照刺激细胞。

3. 混合淋巴细胞反应 在96孔塑料培养板(Corning)加入刺激细胞 1×10^3 /孔、 3×10^3 /孔、 1×10^4 /孔,每组2孔,每孔再加入反应细胞 2×10^5 ,终体

2000年2月17日收到,2000年8月20日接受。
本文承蒙美国哈佛大学医学院研究员刘立明博士指导,特此致谢。

积 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱培养 96h, 培养结束前 16h 加 ³H-TdR(上海原子核研究所) 1 μ Ci/孔。收集细胞, Tri Carb 2300TR 液闪分析仪(Packard 公司)检测, 结果用 2 孔均值表示。

六、rhIL-3 和重组人干细胞因子(rhSCF)对 DCs 产率的影响

取一健康志愿者外周血, 肝素抗凝, 分离 PBMNCs, 用培养 DCs 的完全培养基悬浮, 调整细胞浓度为 3 \times 10⁶/ml, 分成 4 组, 每组 3 孔, 每孔 1ml, 分别加入 6 孔塑料培养板(Corning), 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱温育 1h 后, 去除非贴壁细胞, 重新加入含细胞因子的完全培养基继续培养。细胞因子为:

第 1 组: rhIL-4(800 IU/ml), rhGM-CSF(1000 IU/ml) 和 rhTNF α (50 IU/ml)

第 2 组: rhIL-4, rhGM-CSF, rhTNF α 和 rhIL-3 (Kirin 惠赠, 50 ng/ml)

第 3 组: rhIL-4, rhGM-CSF, rhTNF α 和 rhSCF (Kirin 惠赠, 50 ng/ml)

第 4 组: rhIL-4, rhGM-CSF, rhTNF α , rhIL-3 和 rhSCF

培养第 5 天加含相应细胞因子的完全培养基 1 ml 继续培养, 第 8 天收获各孔非贴壁细胞, 分别计数, 然后将同一组的细胞混合, PBS 洗涤后 FACSscan 检测细胞免疫表型。

结 果

一、DCs 的生成

贴壁的 PBMNCs 经 3-4 天培养, 相差显微镜下可见散在的悬浮细胞有短的突起, 培养 7-10 天, 大部分悬浮细胞有伸长的大量毛刺, 为典型的 DCs 形态(图版图 1)。培养第 12 天收获悬浮细胞的细胞数见表 1。

表 1 贴壁的 PBMNCs 培养 DCs 的得率和免疫表型

标本	细胞数 $\times 10^5/1 \times 10^7$ PBMNCs	CD1a ⁺ %	HLA-DR ⁺ %	CD14 ⁺ %
1	7.2	35.22	43.99	17.99
2	4.3	22.05	36.40	4.80

二、超微结构分析

收获的细胞在透射电镜观察见多数细胞有伸长的突起, 胞浆溶酶体少, 未找到 Birbeck 颗粒(图版图 2)。

三、DCs 的免疫表型

见表 1。

四、同种混合淋巴细胞反应

如图 1 示, 少量 DCs 可刺激同种淋巴细胞增殖。

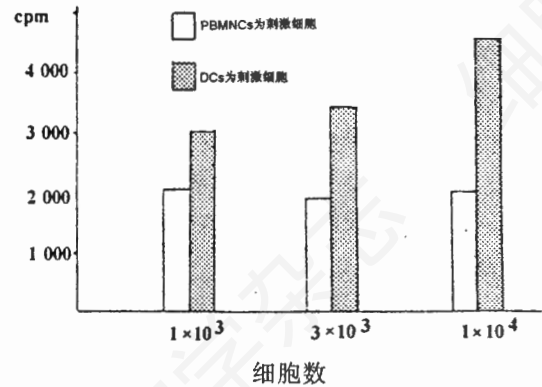


图 1 DCs 刺激同种淋巴细胞反应

五、rhIL-3 和 rhSCF 对 DCs 得率的影响

如表 2 示, 在培养体系中加入 rhIL-3 和 rhSCF 不能增加 DCs 得率, 免疫表型也无明显改变。

表 2 rhIL-3 和 rhSCF 对 DCs 培养得率和免疫表型的影响

细胞因子	细胞数 $\times 10^5/1 \times 10^7$ PBMNCs ($\bar{x} \pm SE, n=3$)	CD1a ⁺ %	HLA-DR ⁺ %	CD14 ⁺ %
不加 IL-3 或 SCF	2.03 \pm 0.68	20.05	27.85	6.50
加 IL-3	2.43 \pm 0.35	25.35	31.74	7.16
加 SCF	2.36 \pm 0.42	25.12	30.96	4.54
加 IL-3 和 SCF	2.07 \pm 0.91	26.17	32.00	6.79

讨 论

DCs 有多种细胞来源, 大多数 DCs 来源于髓系干细胞, 此外, 还有淋巴系干细胞来源的胸腺内 DCs 和来源尚不明的滤泡 DCs, 它们各司不同的功能^[2]。骨髓来源的 DCs 分布于除脑以外的全身各脏器, 含量极微, 为初始 T 细胞免疫反应的激活所必需。

从人外周血产生大量 DCs, 可以用分离的 CD34⁺ 细胞^[3,4] 或用贴壁的 PBMNCs^[5,6] 在含细胞因子如 rhGM-CSF、rhTNF α 、rhIL-4 等的培养基培养生成。本文用贴壁的 PBMNCs 在含有 rhIL-4、rhGM-CSF 和 rhTNF α 的条件下

培养,获得的细胞在相差和电子显微镜下有典型的 DCs 形态学特征,表达 MHC II 类分子 HLA-DR 和成熟 DCs 的特异性标记 CD1a,少量细胞能刺激同种异体淋巴细胞增殖,这些均符合鉴定 DCs 的标准。与国内、外类似研究^[5,6]比较,我们培养 DCs 的得率与之接近。按治疗用 DCs 的细胞数 5×10^6 的要求^[7],采集 200-400 ml 外周血可以满足。不过所获细胞的 HLA-DR 和 CD1a 阳性率较低,可能与培养体系含较少血浆(或血清)(本文用 1%,类似的研究用 10%)有关。

CD34⁺细胞是 DCs 的祖细胞,体外分离的 CD34⁺细胞在 rhGM-CSF^[3]或 rhIL-3^[4]与 rhTNF α 协同作用下可形成有典型 DCs 形态的细胞,电镜下可见 Birbeck 颗粒,为树突状 Langerhans' DCs,在培养体系中加入 SCF^[8]或 Flt₃ 配体^[9]可显著增加 DCs 的产量。本文从贴壁的 PBMNCs 培养 DCs,收获的细胞在电镜下未见 Birbeck 颗粒,在培养体系中加入 rhSCF 和/或 rhIL-3,收获细胞的得率及其中的 CD1a⁺和 HLA-DR⁺细胞比例均无明显增加,说明这些细胞来源于 PBMNCs 中的单核细胞而不是 CD34⁺细胞,所获的细胞与上述树突状 Langerhans' DCs 不同,接近皮肤间质性 DCs (dermal interstitial DCs)^[2]。

本文的培养方法除了能从 PBMNCs 获得较高数量的 DCs 外还有以下优点:(1)从塑料贴壁的 PBMNCs 培养生成,没有 CD34⁺细胞分离过程,简便、经济;(2)培养体系中除了 RPMI1640 培养基及细胞因子 rhGM-CSF、rhIL-4 和 rhTNF α 外无其他外源物质;(3)用自体血浆代替 FBS,避免外来抗原对 DCs 的刺激,这一点对 DCs 用于免疫治疗非常重要;(4)采取隔日增加培养液的“换液”办法,不仅减少细胞损失,而且降低污染危险。这些方面均较适应

临床治疗需要,可以作为获得大量 DCs 用于临床免疫治疗的很好方法。

摘 要

本文用塑料贴壁的外周血单个核细胞(PBMNCs)在含自体血浆、rhGM-CSF、rhIL-4 和 TNF α 的 RPMI1640 培养基,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 湿化空气培养树突状细胞(DCs)。经 10 天培养,可获得大量具 DCs 形态学特征的细胞,其有很强的刺激同种淋巴细胞增殖功能,约 30% 的细胞表达 HLA-DR 和 CD1a。健康志愿者每 1×10^7 PBMNCs 可收获细胞约 5×10^5 。本文培养方法产率高,培养体系简单,用自体血浆代替小牛血清,培养过程简便,这些均适应临床治疗要求。

关键词:树突状细胞 细胞培养 外周血

参 考 文 献

- [1] Westermann J. et al., 1998, In Recent results in cancer research, ed. by Haas R. et al., pp70-, Springer-Verlag, Berlin. 1998:70-77.
- [2] Shortman K and Caux C., 1997, *Stem Cells.*, **15**: 409-419.
- [3] Caux C. et al., 1992, *Nature*, **360**:258-261.
- [4] Caux C. et al., 1996, *Blood*, **87**:2376-2385.
- [5] Akagawa K. S. et al., 1996, *Blood*, **88**:4029-4039.
- [6] 朱学军等, 1997, 中国肿瘤生物治疗杂志, **4**:302-306.
- [7] 朱学军, 曹雪涛, 1998, 国外医学免疫学分册, **21**: 322-325.
- [8] Szabolcs P. et al., 1995, *J. Immunol.*, **154**:5851-5861.
- [9] Siena S. et al., 1995, *Exp. Hematol.*, **23**: 1463-1471.

EX VIVO CULTURE OF DENDRITIC CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD

CHEN Jun Min* WEI Xiu Mei* CHEN Zhi Zhe**

(*The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005)

(**Fujian Institute of Hematology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001)

ABSTRACT

In order to set up an ex vivo culture procedure obtaining DCs from peripheral blood, peripheral blood cells were collected from healthy volunteers. Plastic-adherent peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultured in PRMI 1640 medium containing autologous plasma, rhGM-CSF, rhIL-4 and rhTNF α at 37°C, 5% CO₂ humidified atmosphere. After 10 days of culture we collected large quantity of cells exhibiting a characteristic dendritic cell morphology and potential capability to stimulate allogeneic lymphocyte proliferation. Cytometric analysis showed that some 30% of cells expressed HLA class-II antigen HLA-DR and the characteristic marker of mature DCs CD1a. About 5×10^5 cells could be obtained from 1×10^7 PBMCs of healthy volunteer. The advantages of the procedure were higher DCs production, less reagents needed in culture system, unlaboured procedure and unexposure to xenogenic antigen. All these are suitable for purpose in the setting of clinical practice.

Key words: Dendritic cells Cell culture Peripheral blood

嗅神经鞘细胞的培养纯化及体外生长特性*

杨浩 王春婷 程华玲 鞠躬

(第四军医大学全军神经科学研究所细胞生物学研究室 西安 710032)

神经再生的问题一直是困扰着神经科技工作者的难题,近年来,随着神经细胞生物学、分子生物学、神经生理学、神经移植的飞速发展,使得中枢神经系统(CNS)损伤与再生的研究有了突破性的进展。嗅神经鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)作为一种具有 CNS 星形胶质细胞、少突胶质细胞和外周神经系统(PNS)雪旺氏细胞特性的特殊细胞类型,已被广泛用于神经系统(NS)损伤的细胞移植研究。OECs 以它独具一格细胞学特性使得 CNS 再生潜力得以发挥,已有研究表明^[1~7]移植在中枢神经损伤处的 OECs 能形成细胞桥引导神经突起生长,并向很远距离延伸。使中枢神经损伤得以修复。OECs 作为移植材料,其需求量大,纯度要求高,活性要求好,因此必须通过体外培

养纯化获得,本实验通过观察成年大鼠 OECS 的体外生长特性,比较不同时期细胞的活性,结合嗅球组织的细胞生长和细胞学等特性得出了一种简单、快捷的纯化方案,为移植提供了活性较好的 OECS。

材料和方法

1. 材料和试剂

2.5 月的 SD 大鼠(第四军医大学实验动物中心提供),DF₁₂ 培养基,胎牛血清(FCS)(GIBCO 产品),Forskolin,牛垂体提取液(BPE)、阿糖胞苷(Ara-C),胰蛋白酶,胰蛋白酶终止剂,EDTA,DMSO,MTT,Poly-L-lysine(SIGMA 产品),DI-SGH, P⁷⁵ 抗体,25cm² 塑料培

本文 2000 年 7 月 30 日收到,12 月 5 日接受。

* 国家“973”课题资助项目。