

## 小鼠骨髓源树突状细胞的体外培养及鉴定

王翼寅<sup>1)</sup>, 陈睿<sup>1)</sup>, 汪珺<sup>2)</sup>, 苏晓三<sup>1)</sup>, 张蕾<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学附属甘美医院生物医学实验中心, 云南昆明 650011; 2) 昆明医科大学第一附属医院麻醉科, 云南昆明 650031)

**[摘要]** **目的** 建立小鼠骨髓源树突状细胞 (bone marrow dendritic cell, BMDC) 的培养方法并对其表型和功能进行鉴定. **方法** 无菌取 BALB/c 小鼠股骨、胫骨中的骨髓细胞, 以粒-巨噬细胞集落刺激因子体外诱导分化为 BMDC, 倒置显微镜动态观察 BMDC 增殖和形态变化情况, 流式细胞术分析细胞表型, 并检测其抗原吞噬功能. **结果** 小鼠骨髓细胞体外诱导可获得大量未成熟和成熟 BMDC, 呈现典型的树突状形态. 未成熟 BMDC 的细胞表型为 CD11c<sup>high</sup>CD40<sup>low</sup>CD86<sup>low</sup> MHC-II<sup>low</sup>, 具有较强的抗原吞噬能力. 未成熟 BMDC 经细菌脂多糖刺激后可分化为高表达 CD11c、CD40、CD86 及 MHC-II 类分子的成熟 BMDC. **结论** 体外诱导培养可获得小鼠骨髓来源的未成熟和成熟 DC.

**[关键词]** 树突状细胞; 小鼠; 近交系; 骨髓细胞; 吞噬作用

**[中图分类号]** R322.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 11 - 0005 - 04

## Cultivation and Identification of Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow in Vitro

WANG Yi-yin<sup>1)</sup>, CHEN Rui<sup>1)</sup>, WANG Jun<sup>2)</sup>, SU Xiao-san<sup>1)</sup>, ZHANG Lei<sup>1)</sup>

(1) Biomedical Research Center, The Affiliated Calmette Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650011; 2) Dept. of Anesthesiology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method of cultivation of dendritic cells (DC) from mouse bone marrow in vitro and identify their phenotype and function. **Methods** Under aseptic condition, bone marrow cells were extracted from the tibia and femur bones of BALB/c mice. Bone marrow cells were cultured with recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rmGM-CSF) in vitro. The expansion and morphological changes of DC were observed with light inverted microscope. Phenotype was identified with flow cytometry and biological function was studied with antigen phagocytosis test. **Results** A large number of immature and mature DC with typical dendritic morphological characteristics could be generated from murine bone marrow. Immature DC, which had high expression in CD11c and low expression in CD40, MHC-II and CD86, could phagocytize antigen. Mature DC, which could be induced from immature DC by lipopolysaccharides, had high expression in CD11c, CD40, CD86 and MHC-II molecules. **Conclusion** Immature and mature DC can be generated from mouse bone marrow cells through cytokine induction in vitro and be used for further study associated with DC.

**[Key words]** Dendritic cells; Mice; Inbred strains; Bone marrow cells; Phagocytosis

1973 年 Steinman 等首次分离出树突状细胞 (dendritic cells, DC), DC 是目前已知功能最强的专职抗原递呈细胞 (antigen presenting cells, APC), 在激发 T 细胞免疫应答和 T 细胞依赖性抗

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (31360223)

**[作者简介]** 王翼寅 (1986~), 男, 云南昆明市人, 理学学士, 研究实习员, 主要从事肿瘤免疫与免疫治疗基础和临床研究.

**[通讯作者]** 苏晓三. E-mail:suxs163@163.com

体生成中具有重要作用<sup>[1,2]</sup>。由于 DC 在外周血中含量极少, 仅占单核细胞总数的 0.1%–10%, 分离纯化困难, 故临床应用受到极大限制<sup>[3]</sup>。DC 的来源包括骨髓、外周血和脐血, 其中骨髓以其富含 DC 的前体细胞、来源广泛及体外诱导成本低等特点倍受关注<sup>[2]</sup>。本研究从小鼠骨髓中获取 DC 的前体细胞, 然后在细胞因子的诱导下培养出不成熟和成熟 DC, 并对其进行表型和功能鉴定, 为进一步研究 DC 奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

6~8 周龄 BALB/c 小鼠, 体重 18~20 g, 购自昆明医科大学动物科; 重组小鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant mouse granulocyte macrophage colony stimulating factor, rmGM-CSF); 荧光标记大鼠抗小鼠 CD11c (克隆号 N418)、CD40 (克隆号 3/23)、CD86 (克隆号 GL-1) 和 I-A/I-E (MHC-II 类分子) (克隆号 M5/114.15.2) 单克隆抗体购自美国 Biolegend 公司; RPMI1640 培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司; 脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 购自美国 Sigma 公司; FITC 标记的卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA) (OVA-FITC) 购自中科晨宇 (北京) 生物科技公司。

### 1.2 小鼠骨髓来源 DC 体外诱导和扩增

参照文献<sup>[4]</sup>的方法制备 BALB/c 小鼠骨髓来源 DC (bone marrow DC, BMDC)。脱颈处死 BALB/c 小鼠, 浸入 75% 的酒精中 2 min, 无菌游离小鼠股骨和胫骨。剪去股骨、胫骨两端骨髓, 用无血清 RPMI1640 培养基反复冲洗骨髓腔, 直至骨头变白, 冲洗液离心后弃去上清。含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基 (含青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μg/mL) 重悬细胞并调整浓度为  $1 \times 10^6$ /mL。将细胞接种到 24 孔板中, 按 10 ng/mL 加入 rmGM-CSF, 放 37 °C、饱和湿度、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。倒置显微镜观察细胞形态及增殖情况, 每 3 d 半量换液。

### 1.3 BMDC 表型分析

收集新鲜制备的小鼠骨髓细胞和体外诱导至第 5 天和第 7 天时 BMDC, 加入荧光标记大鼠抗小鼠 CD11c、CD40、CD86、I-A/I-E 单抗, 室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤细胞 1 次后用流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司) 检测。

### 1.4 BMDC 抗原吞噬实验

体外诱导小鼠骨髓细胞至第 5 天和第 7 天时收集 BMDC, 按照  $1 \times 10^6$ /mL BMDC 加入 10 μL OVA-FITC (浓度 10 μg/mL), 混匀后 37 °C 培养箱中孵育 3 h, PBS 洗 2 次, 加 1% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 600 μL, 流式细胞仪检测 BMDC 对 OVA-FITC 的吞噬率。另将 BMDC 与 OVA-FITC 共孵育后 PBS 洗 2 次, 加入 PE-CD11c 单抗室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤细胞 1 次后 4%PFA 固定, 激光共聚焦显微镜观察。

## 2 结果

### 2.1 小鼠 BMDC 体外诱导和细胞形态

小鼠骨髓细胞在体外经 rmGM-CSF 诱导 24 h, 倒置相差显微镜下可见呈簇状生长的细胞团, 形如葡萄串 (图 1A)。培养 3 d, 细胞簇较前增多, 大多数细胞仍然贴壁, 少数细胞呈半悬浮状态。培养 5 d, 大量细胞呈半悬浮生长, 细胞体积较以前增大, 呈圆形或梭型, 细胞表面可见树突状突起 (图 1B)。将第 5 天的 DC 经 LPS 刺激 48 h, 细胞体积较前显著增大, 细胞呈圆形、星形或梭形, 细胞核明显, 细胞表面突起较前增多、分支明显 (图 1C)。

### 2.2 BMDC 的吞噬功能检测

BMDC 与 OVA-FITC 共同孵育后细胞内可见绿色微粒 (图 2A), PE-CD11c 单抗标记的细胞表面呈红色 (图 2B), 激光共聚焦显微镜观察见表面呈红色的细胞内包含大量绿色微粒 (图 2C)。培养第 5 d 时 FITC 阳性细胞达 45.4% (图 2D); 第 7 d 时 FITC 的阳性细胞为 9.7% (图 2E)。结果表明未成熟 BMDC 具有极强的抗原吞噬能力; 相反, 成熟 BMDC 吞噬抗原的能力下降。

### 2.3 BMDC 表型分析

第 0 天时小鼠骨髓细胞 CD11c、CD40、CD86、I-A/I-E 阳性表达率分别为 14.0%、18.2%、31.1%、30.6%; 体外诱导至第 5 天时 CD11c、CD40、CD86、I-A/I-E 的阳性表达率 44.8%、31.5%、53.9% 和 26%; 经 LPS 刺激 48 h 后细胞 CD11c、CD40、CD86、I-A/I-E 的阳性表达率 76%、81.5%、79% 和 72.9% (图 3), 为成熟 DC 表型。

## 3 讨论

目前已知 DC 可从骨髓、脾脏、脐血及外周血单个核细胞等多种途径获得<sup>[4]</sup>。小鼠 DC 常用制备

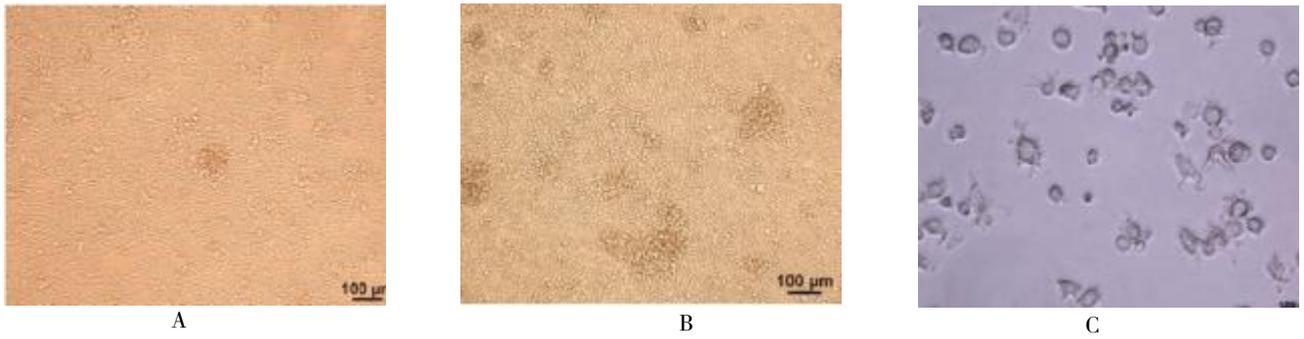


图 1 体外诱导小鼠 BMDC 倒置显微镜像

Fig. 1 Morphology of mice BMDC under inverted microscope

A: BALB/c 小鼠骨髓细胞体外诱导 DC (1 d, 10×); B: BALB/c 小鼠骨髓细胞体外诱导获得不成熟 DC (5 d, 10×);  
 C: BALB/c 小鼠骨髓细胞体外诱导获得成熟 DC (7 d, 40×)

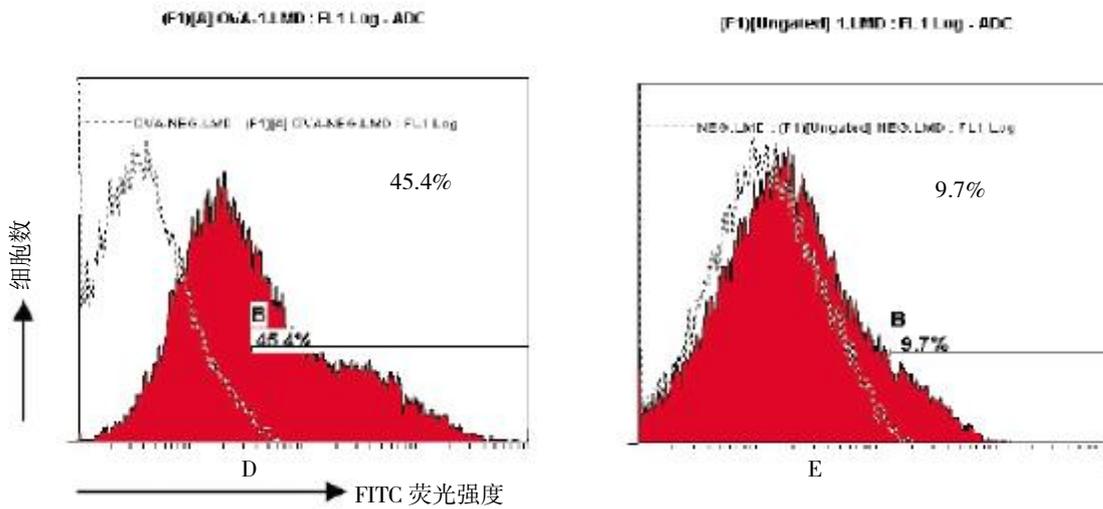
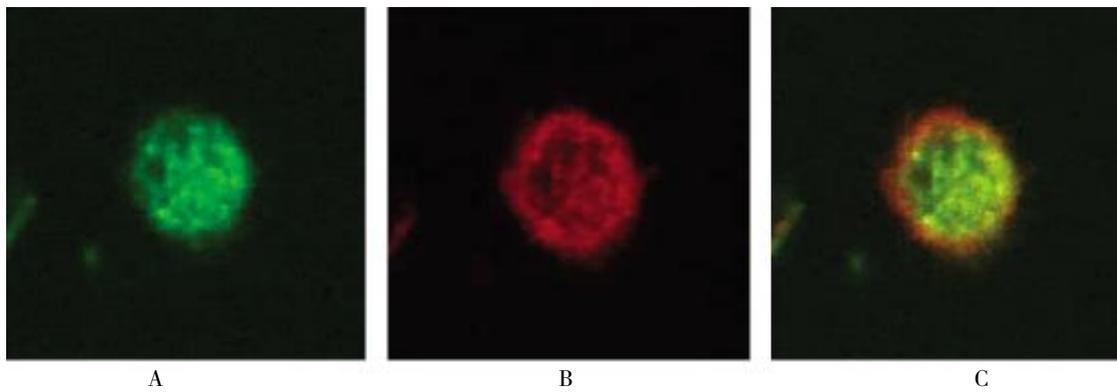


图 2 小鼠 BMDC 吞噬功能检测

Fig. 2 Phagocytosis test of mice BMDC

A, B, C: 激光共聚焦显微镜观察 BMDC 吞噬 OVA-FITC (100×); D: 流式细胞仪检测不成熟 BMDC 对 OVA-FITC 吞噬;  
 E: 流式细胞仪检测成熟 BMDC 对 OVA-FITC 吞噬

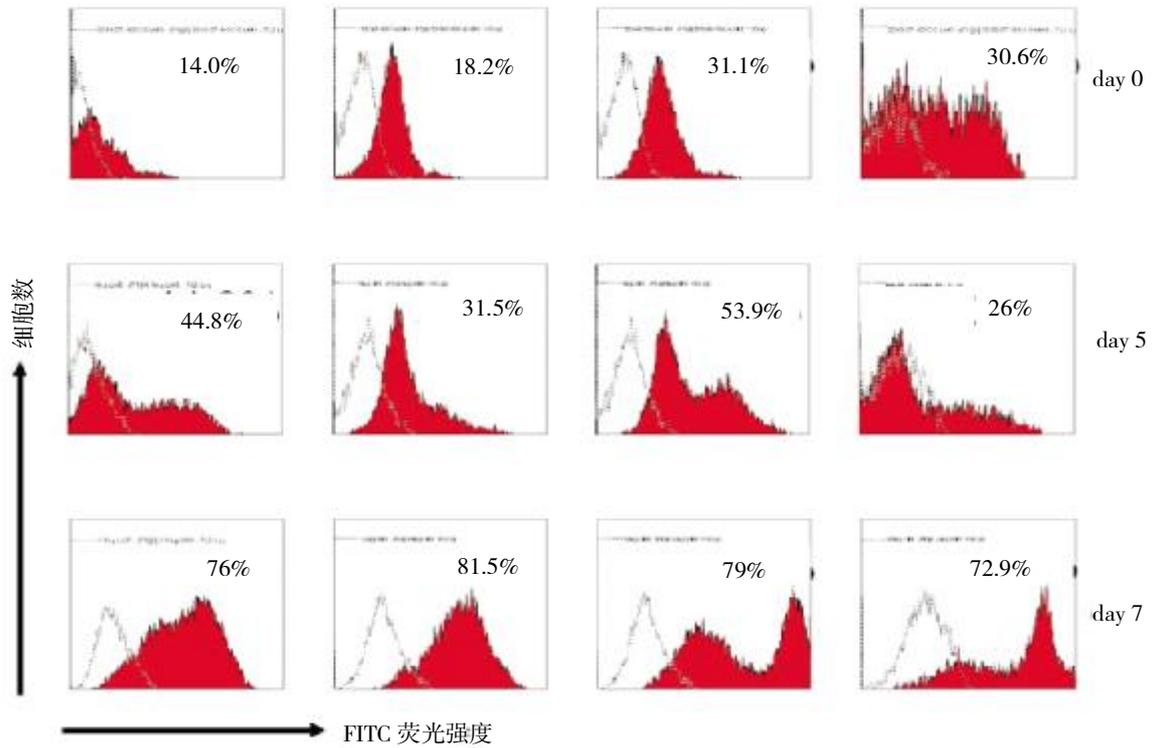


图 3 小鼠 BMDC 表型分析

Fig. 3 Phenotypic analysis of BMDC

方法主要包括：(1) 直接分选：该方法根据 DC 表面标志进行阳性或阴性筛选，但由于 DC 缺乏特异性的表面标志，常采用表达较高的 MHC 及其他 CD 分子进行筛选，不仅费用高而且步骤较复杂，最终获得的 DC 数量有限；(2) 运用外周血、骨髓及脾脏单核细胞体外诱导的方法：此方法采用 GM-CSF、白细胞介素 (interleukine, IL) -4 及肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等多种细胞因子进行体外定向诱导而获得大量的 DC<sup>[5]</sup>。本研究采用 rmGM-CSF 体外诱导小鼠骨髓细胞的方法获得 DC，该细胞在体外培养 3~5 d 时增殖显著，呈贴壁或半贴壁生长，细胞增大并可见树突状突起，此时主要为未成熟 DC；LPS 刺激后 DC 逐渐分化成熟，呈悬浮生长，细胞表面突起增多，分支明显。未成熟 DC 高表达 CD11c，低表达 CD40、CD86 和 MHC-II 类分子并具有极强的吞噬抗原的能力；成熟 DC 表面 CD11c 表达进一步增加，同时高表达 CD40、CD86 和 MHC-II 类分子，但其吞噬抗原能力显著下降。根据以上结果，可判定培养的细胞为 DC 且纯度较高 (CD11c<sup>+</sup> 细胞 >75%)。本实验所采用的 DC 体外原代培养的方法，可为进一步研究 DC 的特性和功能提供足量的实验材料，而且培养的 DC 具有一定的纯度和保持体内 DC 所具

有的生物学特征，这不仅为 DC 的体外培养提供了有效的研究方法，而且也能够在细胞水平研究 DC 的表型、功能及抗肿瘤作用提供可靠的体外实验材料。

#### [参考文献]

- [1] STEINMAN R M, COHN Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution [J]. *J Exp Med*, 1973, 137(5): 142 - 162.
- [2] STEINMAN R M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity [J]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9(1): 271 - 296.
- [3] SON Y I, EGAWA S, TATSUMI T, et al. A novel bulk - culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells [J]. *J Immunol Methods*, 2002, 262(1-2): 145 - 157.
- [4] 王克玲, 郭力, 施荣富, 等. 成熟与未成熟小鼠树突状细胞的生物免疫学特性研究 [J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(45): 3225 - 3228.
- [5] ARDAVIN C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(7): 582 - 590.

(2013 - 11 - 10 收稿)