人外周血单核细胞来源的树突状细胞的体外 “2+2”快速法培养及其鉴定

陆小鹏^{1,3}, 李 剑², 孙正华^{1,3}, 赵 娜^{1,3}, 刘 洁¹, 张华堂^{1,*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所 免疫生物学实验室, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院昆明动物研究所 中心实验室, 云南 昆明 650223; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 以人浓缩白细胞来源的 CD14⁺单核细胞为前体, 建立体外快速培养树突状细胞 (dendritic cell, DC) 的方法。采用密度梯度离心和 MACS 磁珠分选系统, 收集高纯度的 CD14⁺单核细胞; 以 rGM-CSF、rIL-4 联合分化 2 天诱导不成熟 DC, 再将分化后的细胞以 rTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 共同活化 2 天得到成熟 DC。流式细胞仪检测结果表明, 分化 2 天的不成熟 DC 具有吞噬能力, 且表型 HLA-DR、CD40、CD80 表达在 80% 以上, CD83、CD86 基本不表达, 成熟后的 DC 能够激活 T 细胞增殖, HLA-DR 表达增高, CD83、CD86 表达占 85%。

关键词: 单核细胞; 树突状细胞; “2+2”快速法

中图分类号: Q25 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)04-0415-06

A “2+2 days” Fast Protocol for the Generation of Dendritic Cells from Human Blood Monocytes

LU Xiao-peng^{1,3}, LI Jian², SUN Zheng-hua^{1,3}, ZHAO Na^{1,3}, LIU Jie¹, ZHANG Hua-tang^{1,*}

(1. Immunobiology Lab, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming 650223, China; 2. Core Faculty, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming 650223, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: A “2+2 days” fast protocol for the generation of dendritic cells (DC) from high purity human monocytes *in vitro* has been established. During the 2-step differentiation and activation process, we demonstrated that 2 days of culture with GM-CSF and IL-4 were sufficient to generate immature DCs capable of antigen uptake. Similarly the mature DCs were activated with a cocktail of rTNF- α , IL-1 β , IL-6, and PGE₂ from immature DC in 2 days. This “2+2” fast DC had the same phenotype and function as the “6+2” standard DC.

Key words: Monocyte; Dendritic cell; “2+2 days” fast method

树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是体内高效的抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC)。它们以未成熟状态分布于机体的皮下或黏膜组织内, 通过识别捕获微环境内的“异己”成分, 将其加工并携带至淋巴组织, 完成抗原呈递和 DC 成熟的过程, 进而激活静息 T 淋巴细胞 (resting T cell) 应答, 启动免疫反应 (Sousa, 2006)。

目前, 在基础研究和临床应用领域, DC 的获得主要有 3 种方式: ①直接从外周血分离; ②从脐带血和骨髓来源的 CD34⁺细胞诱导; ③由外周血来源

的 CD14⁺单核细胞 (monocyte) 诱导 (Tuyaerts et al, 2007)。由于外周血 DC 含量不到 1%, 脐带血和骨髓中 CD34⁺细胞仅有 1% 左右 (Jeras Bergant & Repnik, 2005), 而外周血中 CD14⁺单核细胞达 15% 左右 (Campbell-AnsonKantor & Radvanyi 2008), 所以通常选择 CD14⁺单核细胞为前体, 按“6+2”传统法, 经过分化和活化两个阶段诱导 DC (standard DC)。即将贴壁收集的 CD14⁺单核细胞, 用分化因子诱导 5—7 天得到具有抗原摄取能力的不成熟 DC (immature DC, iDC), 再用活化因子刺激 2—3 天得

收稿日期: 2008-04-03; 接受日期: 2008-06-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30771951); 中国科学院“百人计划”项目; 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX1-YW-R-16)

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zhanght@post.kiz.ac

第一作者简介: 硕士研究生, E-mail: luxiaopengcas@yahoo.cn

到能够激活T细胞增殖的成熟DC (mature DC, mDC) (Romani et al, 1996; Zhou & Tedder, 1996)。

由于CD14⁺单核细胞向DC分化的过程中并不发生增殖, 随着体外培养时间的延长细胞大量死亡, 传统法诱导DC的得率相对较低。另一方面, DC为终末分化细胞, 无法在体外形成稳定的细胞系。传统法极大的制约了DC的实验研究, 其在DC诱导周期与得率两方面的不足亟待改进。

而在体内, DC前体细胞分化成DC只需要1—4天, Randolph et al (1998)、Santini et al (2000) 和 Landi et al (2007) 等以此为基础, 在体外培养体系中加入内皮细胞、I类干扰素, 缩短了体外诱导DC的时间周期。Dauer在前人研究的基础上, 提出了48h “Fast DC”快速诱导DC模型 (Dauer et al, 2003)。但其成熟阶段的特征表型CD83表达不高, 小于60% (Obermaier et al, 2003)。其可行性还存有较大争议, 所以在DC的体外培养过程中, 诱导所需的确切时间以及培养条件仍需进一步探讨。

为此, 本研究利用 MACS 磁珠分选系统, 从人浓缩白细胞中分选出高纯度的 CD14⁺单核细胞, 分阶段用 rGM-CSF、rIL-4 分化, rTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 联合活化, 定向诱导在表型和功能上与传统法相一致的 DC。建立了一种快捷、可靠的体外“2+2”培养 DC (fast DC) 的优化方法。

1 材料方法

1.1 试剂

RPMI1640 培养基, 胎牛血清为 GIBICO 公司产品; 淋巴细胞分离液为上海恒信有限公司产品; CD14 MicroBeads human monocyte kit 德国 Miltenyibiotec 产品; rGM-CSF、rIL-4、rTNF- α 购自 R&D 公司; IL-1 β 、IL-6 为 Peprotech 公司产品; PGE₂ 为 Alexis 公司产品。PE 标记的 CD80、CD86、CD83、HLA-DR、CD14、CD40、CD1a 及同型对照 IgG1、IgG2b、IgG2a 购于 BioLegend 公司; Monoclonal Anti-human DC-SIGN-Phycoerythrin 购于 R&D 公司; FITC-dextran 和 CFSE 染料购自 Sigma 公司。

1.2 仪器设备

LSM510 META激光共聚焦扫描显微镜 (德国 Zeiss公司), FACS Vantage SE流式细胞分析仪 (BD 公司), HEPA Class100细胞培养箱和Forma ClassII A2生物安全柜 (Thermo公司), Nikon TS 100倒置

相差显微镜 (Nikon公司)。

1.3 CD14⁺单核细胞收集

采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法, 从浓缩白细胞 (取自昆明市血液中心) 收集外周血单个核细胞 (PBMC); 按 CD14 MicroBeads human monocyte kit 操作说明, 分离收集 CD14⁺单核细胞, 并将 CD14⁻细胞冻存用于 T 细胞增殖实验。

1.4 DC 诱导

将CD14⁺单核细胞按 1×10^6 cells/mL接种于6孔板中, 用3mL含10%胎牛血清、2mmol/L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI1640完全培养基培养, 并加诱导因子rGM-CSF (1 000 U/mL)、rIL-4 (500 U/mL), 5%CO₂, 37℃条件下培养。每隔2天换半液, 保持细胞因子终浓度一致, 分别诱导2天或6天后加入成熟诱导因子rTNF- α (10 ng/mL)、IL-1 β (10ng/mL)、IL-6 (10ng/mL)、PGE₂ (1 μ g/mL) 培养2天。

1.5 流式检测细胞表型

采用 1 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上述培养时间的细胞, 再用含 0.1%BSA 的 PBS 冲洗封闭细胞一次, 离心去上清后将细胞按 $5 \times 10^5/50 \mu$ L 重悬于 1.5mL 的 EP 管中, 加入 2 μ L 荧光标记的抗体, 常温下染色 20min, 离心并取 300 μ L PBS 把染色后的细胞转移于流式管, 用于流式细胞仪检测, 软件 WinMDI 2.9 分析数据。

1.6 FITC-dextran 摄取检测

收集单核细胞, 不成熟 DC 和成熟 DC 分别按 1×10^6 cells/mL 悬于 RPMI1640 完全培养基中, 再加入 FITC-dextran (0.5mg/mL), 37℃培养箱或 0℃孵育 30min, 1000r/min 离心 10min 收集细胞, 用 PBS 清洗 3 次, 最后重悬于流式管, 分析检测细胞的荧光强度, 以 0℃条件为基准, 判断细胞的抗原摄取能力。

1.7 混合淋巴细胞增殖反应

将冻存的 CD14⁻细胞复苏用于做同种异体 T 细胞增殖实验。1 000 r/min 离心 10 min, 收集复苏 1 天的 CD14⁻细胞, PBS 洗两遍, 37℃标记 CFSE (羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯) 染料 10 min, 2×10^5 cells/200 μ L 植于 96 孔板, 再按 1:1、1:10、1:100、1:1000 (DC/CD14⁻) 加入成熟 DC, 共同培养 3 天后, 收集细胞, 做流式检测, 以 CFSE 荧光强度的衰减次数显示细胞增殖变化。

2 结 果

2.1 MACS 磁珠分选得到高纯度的 CD14⁺单核细胞

将经淋巴分离液离心收集的 PBMC 与 MACS 磁珠分选后的细胞分别标记 CD14 荧光抗体，流式检测表明在 PBMC 中 CD14⁺单核细胞约占 11% (图 1a)，而磁珠分选后 CD14⁺单核细胞纯度达 95% 以上 (图 1c)。

2.2 “2+2”快速法与“6+2”传统法诱导 DC 的形态观察比较

CD14 磁珠分选收集的单核细胞中加入 rGM-CSF、rIL-4 联合分化 2 天或 6 天 (iDC)，再用成熟刺激因子活化 2 天 (mDC)。在传统法成熟过程中，选择加入 LPS 或 rTNF- α 或 rTNF- α 、IL-1 β 、

IL-6、PGE₂ 联合活化，其中 LPS 或 rTNF- α 单独作用时成熟 DC 的特征表面分子 CD83 表达不高 (数据未给出)，而 rTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 联合作用后 CD83 表达在 85% 以上 (图 3e)，所以在快速法诱导的成熟过程中选择此 4 种因子共同活化。从形态变化来看，CD14⁺单核细胞呈圆形 (图 2a)，经 rGM-CSF 和 rIL-4 的诱导 2 天后，细胞聚集成大小不均的集落，并在细胞表面有少许的突起 (图 2b)，到 6 天后，细胞贴壁，外形不规则，表面有少许明显的细刺状突起 (图 2c)，经 rTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 成熟刺激 2 天后，细胞表现出典型的成熟 DC 形态，悬浮细胞增多，体积变大，表面长出大量细刺状的触须 (图 2d、e、f)。“2+2”快速法诱导的不成熟 DC 形态不及“6+2”传统法明显，而成熟 DC 形态基本一致。

图 1 CD14⁺单核细胞在磁珠分选前后的含量

Fig. 1 The purity of monocytes before and after MACS selection

a: PBMC; b: 分选后细胞同型对照 Isotype control; c: 分选后细胞纯度 Purity post selection.

图 2 DC 在诱导分化过程中的形态变化

Fig. 2 The morphology of monocytes and DC

a: 单核细胞; b: 诱导 2 天不成熟 DC; c: 诱导 6 天不成熟 DC; d、e: 2+2 成熟 DC, f: 6+2 成熟 DC。

(a—d、f: 共聚焦扫描图片×200; e: 倒置显微镜照片×200)。

a: monocyte, b: 2d iDC, c: 6d iDC and d, e: fast mDC, f: standard mDC. (a-d, f: laser confocal scanning, ×200; e: invert microscope, ×200)。

2.3 单核细胞、不成熟 DC、成熟 DC 的表型分析

利用流式细胞仪检测单核细胞和 DC 细胞表面分子的结果表明, 刚分离的 CD14⁺ 单核细胞表达 HLA-DR、CD80, 低表达 DC-SIGN, 不表达 CD86、CD83、CD40、CD1a (图 3a)。经 2 天或 6 天刺激后的 iDC, CD14 明显下调, HLA-DR、CD40、CD1a、CD80、CD86、DC-SIGN 上调, CD83 基本无变化 (图 3b、d)。经 2 天成熟诱导后的 mDC, 基本不表达 CD14, 高表达 HLA-DR、CD40、CD80、CD86、CD83、中度表达 CD1a 和 DC-SIGN (图 3c、e)。快速法与经典法在表面标志上的差别在于, 在 iDC 分化阶段, “2+2”法下调 CD14, 上调 HLA-DR、DC-SIGN 的程度不及传统法明显 (图 3b、d); 而 mDC 活化阶段, DC-SIGN 和 CD1a 的下调, 快速法更加明显 (图 3c、e); 但在诱导 DC 的全部过程中, 两种方

法影响表型变化的趋势一致, CD14 表达明显减低, HLA-DR、CD86 和 CD83 在成熟阶段表达显著增强, CD1a、DC-SIGN 集中表达在不成熟阶段, 而后则下调; CD40 在不成熟阶段的表达量与成熟阶段基本维持不变。

2.4 不成熟 DC 的吞噬功能

抗原吞噬能力是 iDC 的主要功能之一, 为此用流式的方法比较单核细胞、iDC 和 mDC 在 37℃ 条件下对 Dextran 的摄取能力的差异, 结果证实, iDC 具有吞噬功能 (图 4b、d), 而 mDC 吞噬能力丧失 (图 3c、e); 单核细胞有微弱的吞噬能力 (图 3a)。两种方法诱导的 iDC 吞噬能力基本相同, 在成熟过程中吞噬能力的变化也基本一致 (图 4b、c)。

2.5 成熟 DC 刺激 T 细胞增殖反应

iDC 在摄入抗原后, 逐渐成熟并迁移到 T 淋巴细

图 3 传统法与快速法诱导 DC 的表面标志流式检测变化
Fig. 3 The characteristic phenotype of fast DC versus stand DC

a: 单核细胞; b: 2 天不成熟 DC; c: 2+2 成熟 DC; d: 6 天不成熟 DC; e: 6+2 成熟 DC。
a: monocyte; b: fast iDC; c: fast mDC; d: standard iDC; e: standard mDC.

图 4 DC 对 Dextran 摄取能力变化
Fig. 4 Dextran uptake capacity of DC

a: 单核细胞; b: 2 天不成熟 DC; c: 2+2 成熟 DC; d: 6 天不成熟 DC; e: 6+2 成熟 DC。
a: monocyte; b: fast iDC; c: fast mDC; d: standard iDC; e: standard mDC.

胞区域，递呈抗原刺激T细胞增殖引发免疫反应。本实验也同时用混合淋巴细胞培养（Mix Lymphocyte Reaction, MLR）分析比较了两种方法诱导的mDC激活T细胞增殖能力的差异。发现两种

方法诱导的mDC在激活T细胞的能力上基本相同，DC与PBMC共同培养3天后，PBMC增殖趋势相似，且在DC与PBMC细胞数量相近时（1：1），细胞明显增殖两次。（图5a、b）。

图 5 混合淋巴细胞培养检测成熟DC激活T细胞增殖的能力

Fig. 5 The stimulatory capacity of mature DC in the primary allogeneic MLR.

a: 2+2成熟DC, b: 6+2成熟DC. a: fast mDC, b: standard mDC

3 讨论

体外诱导DC的关键在于：高纯度的前体细胞，培养过程中保持细胞高存活力，稳定的培养体系和恰当的诱导因子，以及合适的培养时间。本实验在收集CD14⁺细胞时，放弃了传统贴壁的办法，而采用MACS分选系统，通过在磁场中阳性筛选，快速而且高纯度的收集单核细胞。避免了PBMC贴壁培养过程和悬浮细胞淘洗过程，减少了对细胞的物理损伤，保证了CD14⁺单核细胞的纯度与活力。体外培养过程中，同时也发现单核细胞培养72 h后，细胞开始大量死亡。为提高得率，本实验通过细胞因子搭配和培养时间调整，使单核细胞在48 h实现分化，96 h完成成熟，提高了单核细胞向DC诱导的效率。

在诱导DC的细胞因子选择方面，本实验以 Sallusto & Lanzavecchia(1994) 和 Zhou & Tedder(1996)建立的分阶段两步诱导DC的方法为基础，用GM-CSF、IL-4、rTNF- α 将CD14⁺单核细胞向DC诱导，但在培养过程中出现了大量巨噬细胞，且成熟阶段的特征表型CD83表达较低、仅占30%左右。通过调整细胞因子IL-4和GM-CSF在培养体系的浓度用量，证实GM-CSF是诱导DC的主要因子，而IL-4的作用是阻止单核细胞分化为巨噬细胞（Caux et al, 1992），只需要保持比GM-CSF更低

的浓度。成熟活化阶段，则尝试将rTNF- α 改为LPS（KoskiLyakh & Rice, 2001）或者rTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂多种因子联合活化iDC成熟（Feuerstein et al, 2000）。结果发现GM-CSF（1000 U/mL）、IL-4（500 U/mL）和rTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂联合激活能更快速高效的诱导DC。

在诱导的时间上，通过在不同时间点收集细胞，分析比较其形态、表型和功能，寻找诱导 DC 所需的恰当时间。结果发现在不成熟因子 rGM-CSF、rIL-4 作用下，分化 24h 后细胞仍高表达 CD14，低表达 CD1a，能够吞噬 dextran，与文献报道基本相符，表面标志的表达水平不及典型 iDC 高（Jarnjak-Jankovic et al, 2007）。但 48 小时后细胞已具有较高吞噬 dextran 的能力，且 CD14 表达减少，HLA-DR、CD40、CD1a、CD80、DC-SIGN 的表达水平升高，与诱导 6 天的 iDC 表型基本一致，仅 DC-SIGN 的表达相对略低。综合细胞表型和抗原摄取功能，本实验将诱导 iDC 的时间改变为 2 天。成熟阶段，仍以传统法为标准，用 rTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂ 联合激活 2 天确保 iDC 的充分活化和成熟。形态、表型、功能结果表明活化后的细胞具备典型 mDC 的特征，细胞突起增多，高表达 HLA-DR、CD40、CD86、CD83，能激活 T 细胞增殖。

综上所述，“2+2”法通过缩短分化阶段的时间

和选择成熟阶段的细胞因子组合诱导的 DC, 在未成熟和成熟阶段, 其形态、表型和功能都具备了传统法刺激形成的 DC 的特征。这种方法缩短了实验

周期, 节省实验成本, 为肿瘤 DC 疫苗研制和 DC 功能研究提供了一种更便捷的途径。

参考文献:

- Campbell-Anson RE, Kentor D, Wang YJ, Bushnell KM, Li Y, Vence LM, Radvanyi LG. 2008. A new approach for the large-scale generation of mature dendritic cells from adherent PBMC using roller bottle technology [J]. *J Immune Based Therapies and Vaccines*, **6**(1): 1-10.
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. 1992. GM-CSF and TNF-Alpha cooperate in the generation of dendritic langerhans cells [J]. *Nature*, **360**(6401): 258-261.
- Daue M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. 2003. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: A novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors [J]. *J Immunol*, **170**(8): 4069-4076.
- Feuerstein B, Berger TG, Maczeka C, Rödera C, Schreiner D, Hirsch U, Haendle I, Leisgang W, Glaser A, Kuss O, Diepgen T, Schuler G, Thurner BS. 2000. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use [J]. *J Immunol Methods*, **245**(1-2): 15-29.
- Jarnjak-Jankovic S, Hammerstad H, Sæbøe-Larssen S, Kvalheim G, Gaudernack G. 2007. A full scale comparative study of methods for generation of functional dendritic cells for use as cancer vaccines [J]. *Bmc Cancer*, **7**(119):2-9.
- Jeras M, Bergant M, Repnik U. 2005. *In vitro* preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses [J]. *Transpl Immunol*, **14**(3-4): 231-244.
- Joeri ST, Corthals AJ, t Neyns B, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K, Bonehill A. 2007. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immu*, **56**(10): 1513-1537.
- Koski GK, Lyakh LA, Rice NR. 2001. Rapid lipopolysaccharide-induced differentiation of CD14⁺ monocytes into CD83⁺ dendritic cells is modulated under serum-free conditions by exogenously added IFN- γ and endogenously produced IL-10 [J]. *Eur J Immunol*, **31**(14): 3773-3781.
- Landi A, Babiuk LA, Hurk S. 2007. High transfection efficiency, gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells after nonviral gene transfer [J]. *J Leukocyte Bio*, **82**(4): 849-860.
- Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A. 2003. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes[J]. *Biol Proced Online*, **5**(1): 197-203.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking [J]. *Science*, **282**(5388): 480-483.
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability [J]. *J Immunol Methods*, **196**(2): 137-151.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble-antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by Tumor-Necrosis-Factor-Alpha [J]. *J Exp Med*, **179**(4): 1109-1118.
- Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Pucchio TD, Belardelli F. 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity *in vitro* and in Hu-PBL-SCID mice [J]. *J Exp Med*, **191**(10): 1777-1788.
- Sousa CR. 2006. Dendritic cells in a mature age [J]. *Nat Rev Immunol*, **6**(6): 476-483.
- Zhou LJ, Tedder TF. 1996. CD14⁽⁺⁾ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁽⁺⁾ dendritic cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(6): 2588-2592.