

外周血PBMC来源的树突状细胞的快速无血清培养方法及细胞信号转导机制

树突状细胞(dendritic cell, DC)是近10年来研究得最为透彻的抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)。对DC的研究不仅有助于深刻了解机体免疫应答的调控机制,而且可以通过调节DC的功能来调节机体的免疫应答,对肿瘤、移植排斥、感染、自身免疫性疾病的发生机制的认识和防治均具有重要意义。目前,人们已建立并完善了多种培养扩增DC的方法,其中应用粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和IL-4从人外周血单核细胞(peripheral blood monocyte, PBMC)、应用GM-CSF和肿瘤坏死因子(TNF)- α 从人CD34+造血干细胞扩增DC的方法得到了广泛应用。但大多数方法均需要体外培养1~2周甚至更长时间才能获得成熟的DC,增加了污染机会,同时不能给患者及时回输;而且培养体系中所需要的胎牛血清或人AB型血清对需要治疗的对象来说,均为不安全的异体血清;另外多种细胞因子的组合及血清的使用大大增加了实验及治疗的成本。为解决上述问题,近来国外的某些实验室相继报道了DC的快速无血清培养方法[1][2][3][4][5][6][7][8],主要涉及的试剂为钙离子载体(calcium ionophore, CI)。以下是我们实验室关于CI在体外快速诱导PBMC生成DC的研究及其信号转导机制的初步探讨。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

人重组GM-CSF(rhGM-CSF)购自南方医科大学中心实验室;淋巴细胞分离液Ficoll为上海生化试剂二厂产品;FITC标记的鼠抗人CD14、CD83、CD80、CD86单克隆抗体及流式细胞仪均为BD公司产品;无血清培养基(SFM)为Life Technologies公司产品;TNF- α 为Pharmlingen公司产品;RPMI 1640培养液、A23187(CI)为Sigma公司产品;环孢菌素A(cy-closporin A, CsA)为Sandoz公司产品;胎牛血清FCS为Hyclone公司产品;酶标仪(BIOCELL HT)为奥地利 Anthos Labtec Instruments Ges. m. b. H公司产品。

1.2 DC及混合T淋巴细胞的制备

采集健康献血员外周血(由我院输血科提供),经Ficoll密度梯度离心分离单个核细胞(PBMC),以RPMI 1640调整细胞浓度至 1×10^7 /ml,于5% CO₂、37 °C条件下培养4 h。用力晃动培养瓶后洗出非粘附细胞,在剩下的贴壁细胞(即PBMC)中加入SFM及终浓度为50 ng/ml的rhGM-CSF培养20 h。然后分别加入100 ng/ml的A23187或50 ng/ml的TNF- α ,或预先加入0.5 μ g/ml的磷酸蛋白酶拮抗剂CsA 30 min后,再加入A23187、TNF- α ,继续培养20 h,即所有实验组均置于5% CO₂、37 °C条件下共培养40 h。另取其它健康献血员的外周血经Ficoll密度梯度离心分离出PBMC,以RPMI 1640悬浮,注入T细胞尼龙毛柱,37 °C孵育1 h后,冲洗出非粘附细胞为同种异体T淋巴细胞,用作混合T淋巴细胞的刺激增殖实验。

1.3 形态学观察及细胞表型分析

用相差倒置显微镜每6~8 h观察细胞的生长状态及形态变化。40 h后,收集各组细胞经PBS悬浮、离心(4 °C、1 250 r/min、5 min),弃上清。采用直接免疫荧光法,加入FITC标记的鼠抗人CD80、抗CD86、抗CD83、抗CD14单克隆抗体,4 °C避光标记30 min后,PBS洗涤2次,用1%多聚甲醛固定,流式细胞仪检测细胞表面分子的表达。

1.4 T淋巴细胞的刺激增殖实验

分别将不同方法处理的上述细胞洗涤3遍,用 γ -射线照射灭活(30 Gy)后作抗原呈递细胞,用含10% FCS的RPMI 1640制成浓度为 1×10^6 /ml,倍比稀释后加入96孔培养板中(100 μ l/孔)。然后每孔加入固定数量的混合T淋巴细胞(5×10^6 /ml,100 μ l/孔),使APC:T分别为1:5、1:20、1:80、1:320、1:1 280。同时设无APC组为对照,在5% CO₂、37 °C条件下培养96 h。加入MTT 20 μ l(5 g/L),于5% CO₂、37 °C条件下继续培养4 h。离心、弃上清,加入DMSO 100 μ l/孔溶解结晶,用酶标仪双波长检测(检测波长570 nm,参考波长630 nm),测定D(λ)值,并计算刺激指数(SI),SI= D(λ)实验组/ D(λ)对照组[9]。

2 结果

2.1 A23187诱导前后细胞的形态

在相差显微镜下，未处理的PBMC呈球形，表面光滑(图1A)。经50 ng/ml的 rhGM-CSF和100 ng/ml的A23187联合刺激40 h，就可见胞体变大及不规则，具有典型树突状及细刺状突起(图1B)。经50 ng/ml的 rhGM-CSF和50 ng/ml的TNF- α 联合刺激40 h，也可见典型DC形态的变化(图1C)。但给予CsA预先处理30 min后，再给予rhGM-CSF 及A23187联合刺激的细胞，细胞形态明显受抑制(图1D)。而CsA基本不影响TNF- α 诱导的细胞形态的改变(图略)。相差显微镜下DC周围的小亮点为血小板。

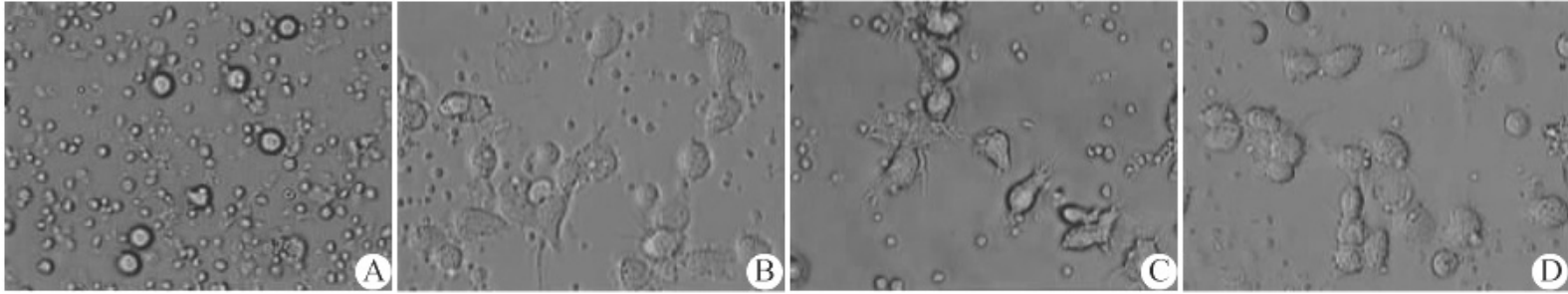


图1 外周血单核细胞在rhGM-CSF 和A23187或TNF- α 处理前及处理40 h后相差显微镜下的形态变化(原放大倍数： $\times 400$)

Fig.1 Morphological changes of PBMCs observed under phase-contrast microscope before and after the treatment of rhGM-CSF in combination with A23187 or TNF- α (Original magnification: $\times 400$)

A: Untreated; B: Treated with rhGM-CSF and A23187; C: Treated with rhGM-CSF and TNF- α ; D: Treated with rhGM-CSF and A23187 after being pre-treated with CsA

2.2 免疫表型检测

采用直接免疫荧光法和流式细胞仪对不同方法培养40 h所获的细胞进行表型分析。结果表明，经50 ng/ml的rhGM-CSF和100 ng/ml的A23187联合刺激40 h，细胞表面CD83、CD80和CD86等分子的表达明显增高，CD14分子的表达明显下降。经50 ng/ml的rhGM-CSF和50 ng/ml的TNF- α 联合刺激40 h，细胞表面上述分子的表达有同样的改变。但给予CsA预先处理30 min后，再给予rhGM-CSF 及A23187联合刺激的细胞，CD83、CD80和CD86等分子的上调被明显抑制，CD14分子的下调基本不受影响。而经rhGM-CSF和TNF- α 联合刺激40 h的细胞，CD83、CD80和CD86等分子的上调及CD14分子的下调均不受CsA的影响(图2)。

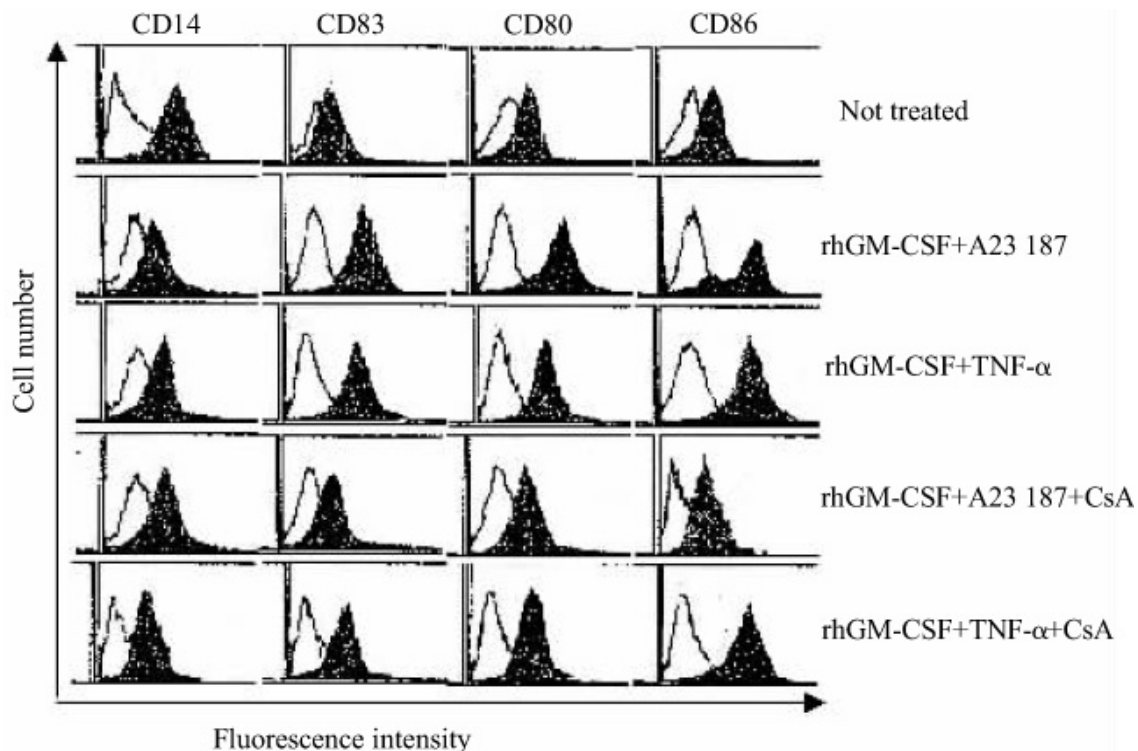


图2 外周血单核细胞经不同方法培养40 h后细胞表面分子的变化

Fig.2 Changes of surface markers of PBMCs cultured in different media for 40 h

2.3 混合T淋巴细胞的刺激增殖实验

正常人的PBMC在体外经50 ng/ml的rhGM-CSF 和100 ng/ml的A23187联合刺激40 h后, 具有明显刺激同种异体T淋巴细胞增殖的作用, 但这种强有力的刺激增殖作用可以被CsA完全抑制; 而PBMC经50 ng/ml的rhGM-CSF 和50 ng/ml的TNF- α 联合刺激40 h后, 同样具有较强的刺激同种异体T淋巴细胞增殖的作用, 但这种对混合T淋巴细胞的刺激增殖作用却不受CsA的影响(图3)。

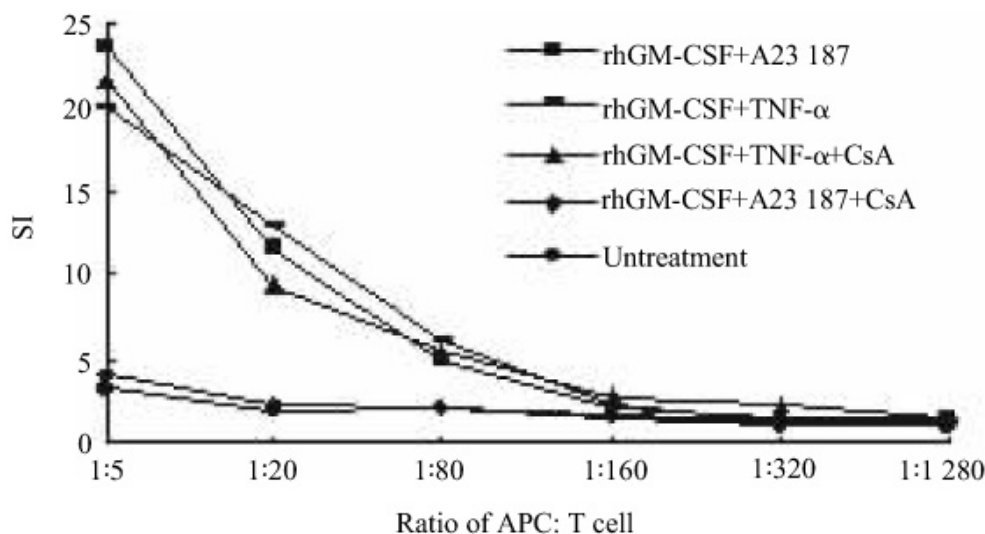


图3 不同方法培养的抗原呈递细胞对同种异体T淋巴细胞的刺激增殖作用

Fig.3 Proliferation of allogeneic T lymphocytes stimulated by different antigen-presenting cells (APC)

3 讨论

早在1991年Liu等[10]的研究就表明A23187可以增强DC的免疫辅佐功能。CI可提高胞浆游离Ca²⁺浓度, 导致Ca²⁺结合其调节蛋白即钙调蛋白(CaM), 使CaM的构象发生改变, 从而结合各种蛋白受体分子, 如依赖CaM的蛋白激酶(CaMK)和蛋白磷酸酶(CaN), 进而参与诱导依赖Ca²⁺的基因转录, 导致多基因活化。已有多个实验室证实[1][4][5][11], 不管是健康人还是癌症患者的单核细胞, CI处理后20~40 h皆可迅速获得活化DC的许多典型特征, 它包括DC的典型形态, 上调表达MHC分子、共刺激分子CD80和CD86、粘附分子CD40和CD54、新表达DC的活化标志CD83分子、不再表达单核细胞的免疫标志CD14分子, 明显提高初次和回忆抗原致敏T细胞增殖的能力等。

CsA的主要作用靶点为CaN, 可选择性地结合CaN的亚单位, 关闭CaN的活性部位, 从而抑制依赖CaN的事件。由实验结果可知, CaN拮抗剂(CsA)不阻断CI诱导的CD14分子的下调, 但却明显阻断由CI引起的CD83、CD80、CD86分子的上调, 故推测CI诱导PBMC向DC的分化, 可能受控于Ca²⁺/CaM下游的某些信号转导途径的调节。TNF- α 等细胞因子主要通过细胞因子受体如造血细胞因子受体超家族、具有蛋白酪氨酸激酶活性的受体、TNF受体等的受体/配体膜信号转导机制, 来诱导DC的分化。尽管CI诱导PBMC发生DCs样变化与细胞因子诱导PBMC分化为DC之RelB的表达无差异[4], 但CsA却不影响TNF- α 诱导的PBMC分化为DC, 故推测, 由CI诱导PBMC向DC分化的信号, 与TNF- α 诱导PBMC分化为DC的信号转导途径不完全相同。CI诱导DC的分化过程可能是通过干扰细胞内Ca²⁺内平衡, 而直接激活核内转录因子, 而不必向细胞因子一样, 需首先通过受体/配体介导的膜信号转导。

另外, Koski等[5]报道, 在无血清及有血清两种培养条件下, CI均能诱导CD14⁺单核细胞下调CD14分子及上调CD80、CD86、CD83分子。但在无血清培养条件下, CI诱导PBMC分化的最佳浓度为90~180 ng/ml; 而在含有10%人血清培养条件下, CI诱导PBMC分化的最佳浓度为375~750 ng/ml; 而且在有血清培养条件下, 须尽早加入CI(最好在开始培养时)才能获得较好活性的DC。在DC的培养过程中是否使用含血清的培养基、使用血清的种类、联合什么样的细胞因子或配体以及加入诱导剂的种类、时间及顺序等可能都对DC的成熟时间、DC的功能及其诱导的免疫应答类型有影响。

参考文献:

[1] Czerniecki BJ, Carter C, Rivoltini L, et al. Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells[J]. J Immunol, 1997, 159(8): 3823-37.

[2] Bedrosian I, Roros JG, Xu S, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-12 synergize with calcium ionophore to enhance dendritic cell function

[J]. J Immunother, 2000, 23(3): 311-20.

[3] Faries MB, Bedrosian I, Xu S, et al. Calcium signaling inhibits inter-leukin-12 production and activates CD83+ dendritic cells that induce Th2 cell development[J]. Blood, 2001, 98(8): 2489-97.

[4] Lyakh LA, Koski GK, Telford W, et al. Bacterial lipopolysaccharide, TNF-alpha, and calcium ionophore under serum-free conditions promote rapid dendritic cell-like differentiation in CD14+ monocytes through distinct pathways that activate NK-kappa B[J]. J Immunol, 2000, 165(7): 3647-55.

[5] Koski GK, Schwartz GN, Weng DE, et al. Calcium mobilization in human myeloid cells results in acquisition of individual dendritic cell-like characteristics through discrete signaling pathways[J]. J Immunol, 1999, 163(1): 82-92.

[6] St Louis DC, Woodcock JB, Fransozo G, et al. Evidence for distinct intracellular signaling pathways in CD34+ progenitor to dendritic cell differentiation from a human cell line model[J]. J Immunol, 1999, 162(6): 3237-48.

[7] Engels FH, Kreisel D, Faries MB, et al. Calcium ionophore activation of chronic myelogenous leukemia progenitor cells into dendritic cells is mediated by calcineurin phosphatase[J]. Leuk Res, 2000, 24(10): 795-804.

[8] Koski GK, Schwartz GN, Weng DE, et al. Calcium ionophore-treated myeloid cells acquire many dendritic cell characteristics independent of prior differentiation state, transformation status, or sensitivity to biologic agents[J]. Blood, 1999, 94(4): 1359-71.

[9] 吴军, 王晓怀, 杨太成, 等. 植物血凝素及淋巴因子激活的杀伤细胞体外抗肿瘤作用的MTT比色法分析[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(11): 841-3.

Wu J, Wang XH, Yang TC, et al. The detection of phytohemagglutinin-lymphokine activated killer cells' in vitro antitumor action with MTT colorimetry[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(11): 841-3.

[10] Liu CZ, Zhang YH. Phorbol myristate acetate and calcium ionophore A23187 modulate the accessory cell function of mouse dendritic cells[J]. Chin Med Sci J, 1991, 6(1): 18-23.

[11] 吴军, 王晓怀, 王捷, 等. 钙离子载体对外周血单核细胞来源的树突状细胞的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(1): 52-53, 89.

Wu J, Wang XH, Wang J, et al. The effect of calcium ionophore on dendritic cells derived from peripheral blood mononuclear cells[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2003, 19(1): 176-80.

参考文献:

[1] Czerniecki BJ, Carter C, Rivoltini L, et al. Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells[J]. J Immunol, 1997, 159(8): 3823-37.

[2] Bedrosian I, Roros JG, Xu S, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-12 synergize with calcium ionophore to enhance dendritic cell function[J]. J Immunother, 2000, 23(3): 311-20.

[3] Faries MB, Bedrosian I, Xu S, et al. Calcium signaling inhibits inter-leukin-12 production and activates CD83+ dendritic cells that induce Th2 cell development[J]. Blood, 2001, 98(8): 2489-97.

[4] Lyakh LA, Koski GK, Telford W, et al. Bacterial lipopolysaccharide, TNF-alpha, and calcium ionophore under serum-free conditions promote rapid dendritic cell-like differentiation in CD14+ monocytes through distinct pathways that activate NK-kappa B[J]. J Immunol, 2000, 165(7): 3647-55.

[5] Koski GK, Schwartz GN, Weng DE, et al. Calcium mobilization in human myeloid cells results in acquisition of individual dendritic cell-like characteristics through discrete signaling pathways[J]. J Immunol, 1999, 163(1): 82-92.

[6] St Louis DC, Woodcock JB, Fransozo G, et al. Evidence for distinct intracellular signaling pathways in CD34+ progenitor to dendritic cell differentiation from a human cell line model[J]. J Immunol, 1999, 162(6): 3237-48.

[7] Engels FH, Kreisel D, Faries MB, et al. Calcium ionophore activation of chronic myelogenous leukemia progenitor cells into dendritic cells is mediated by calcineurin phosphatase[J]. Leuk Res, 2000, 24(10): 795-804.

[8] Koski GK, Schwartz GN, Weng DE, et al. Calcium ionophore-treated myeloid cells acquire many dendritic cell characteristics independent of prior differentiation state, transformation status, or sensitivity to biologic agents[J]. *Blood*, 1999, 94(4): 1359-71.

[9] 吴军, 王晓怀, 杨太成, 等. 植物血凝素及淋巴因子激活的杀伤细胞体外抗肿瘤作用的MTT比色法分析[J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21(11): 841-3.

Wu J, Wang XH, Yang TC, et al. The detection of phytohemagglutinin-lymphokine activated killer cells' in vitro antitumor action with MTT colorimetry[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2001, 21(11): 841-3.

[10] Liu CZ, Zhang YH. Phorbol myristate acetate and calcium ionophore A23187 modulate the accessory cell function of mouse dendritic cells[J]. *Chin Med Sci J*, 1991, 6(1): 18-23.

[11] 吴军, 王晓怀, 王捷, 等. 钙离子载体对外周血单核细胞来源的树突状细胞的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(1): 52-53, 89.

Wu J, Wang XH, Wang J, et al. The effect of calcium ionophore on dendritic cells derived from peripheral blood mononuclear cells[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2003, 19(1): 176-80.

[回结果列表](#)