

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

吴军¹, 王晓怀², 杨德懋², 杨太成², 王捷², 陈政良¹ (¹南方医科大学免疫学教研室, 广东 广州 510515; ²广州军区广州总医院肿瘤分子生物学研究所, 广东 广州 510010)

摘要:目的 探讨体外无血清条件下诱导人外周血单核细胞(PBMC)迅速生成树突状细胞(DC)的方法,并初步探讨钙离子载体(CI)诱导分化的信号转导途径与肿瘤坏死因子(TNF)- α 所诱导的是否相同。方法 分离健康献血者的PBMC,给予无血清培养基及50 ng/ml的rhGM-CSF过夜培养后,再分别给予100 ng/ml的A23187或50 ng/ml的TNF- α ,或预先加入0.5 μ g/ml的环孢菌素A(CsA)30 min后,再加入A23187、TNF- α ,共培养40 h。于相差显微镜下观察细胞形态的变化,流式细胞仪检测细胞的表面标志,MTT比色法检测不同方法处理的PBMC刺激同种异体T细胞的增殖作用。结果 健康献血者的PBMC在无血清条件下,给予rhGM-CSF及CI或TNF- α 培养40 h,均可获得DC的典型形态,包括CD14表达下调、CD83及共刺激分子(CD80、CD86)表达上调,以及较强刺激同种异体T细胞增殖的作用;上述由CI诱导的细胞形态的改变、表面分子的表达以及刺激T细胞增殖的作用均可被CsA所抑制。而TNF- α 所诱导的细胞形态的改变、表面分子的表达以及刺激T细胞增殖的作用均不受CsA影响。结论 健康献血者的PBMCs在体外无血清条件下,可以被rhGM-CSF及CI或TNF- α 迅速诱导成DC,但CI与TNF- α 诱导PBMC分化为DC的细胞信号转导途径不同。

关键词:树突状细胞;肿瘤坏死因子- α ;钙离子载体;细胞信号转导

中图分类号:R392.3 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)11-1263-04

Rapid serum-free culture of dendritic cells from human peripheral blood monocytes and their intracellular signal transduction

WU Jun¹, WANG Xiao-huai², YANG De-mao², YANG Tai-cheng², WANG Jie², CHEN Zheng-liang¹

¹Department of Immunology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To explore the methods for rapid *in vitro* culture of the dendritic cells (DCs) from human peripheral blood monocytes (PBMCs) under serum-free conditions and ascertain whether intracellular signal transduction pathway differs between calcium ionophore (CI) and tumor necrosis factor (TNF)- α during their induction of dendritic cell differentiation. **Methods** PBMCs isolated from healthy donors were plated in serum-free medium supplemented with 50 ng/ml rhGM-CSF. Cells cultured overnight were induced to differentiate with 100 ng/ml A23187 or 50 ng/ml TNF- α , given before or 30 min after pre-treatment with 0.5 μ g/ml cyclosporine A (CsA). After culture for 40 h, the cell morphology was observed under phase-contrast microscope, and the surface markers on treated PBMCs were analyzed by flow cytometry. MTT colorimetry was employed to assess the proliferation of the allogeneic T cells. **Results** PBMCs of healthy donors treated with 50 ng/ml rhGM-CSF in combination with 100 ng/ml CI or 50 ng/ml TNF- α for 40 h exhibited typical morphology of DCs with rapidly decreased CD14 expression and increased expressions of CD83 and co-stimulatory molecules (CD80 and CD86), showing also enhanced ability of stimulating allogeneic T cell proliferation. Calcineurin antagonist CsA inhibited the differentiation induced by CI, but not that induced by TNF- α . **Conclusions** Under serum-free conditions, both CI and TNF- α are capable of inducing rapid DC differentiation from human PBMCs, but the intracellular signal transduction of CI-induced differentiation is different from that induced by TNF- α .

Key words: dendritic cells; TNF- α ; calcium ionophore; intracellular signal transduction

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

收稿日期:2003-11-08

基金项目:广东省科技计划项目(20034286)

Supported by Science and Technology Research Program of Guangdong Province (20034286)

作者简介:吴军(1967-),女,南方医科大学在读博士研究生,主治医师,电话:020-36222205-53479, E-mail: Juwuwang@Hotmail

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^[1-8], 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 Pharmingen 公司产品; RPMI 1640 培养液、A23187 (CI) 为 Sigma 公司产品; 环孢菌素 A(cyclosporin 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(PBMNC), 以 RPMI 1640 调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 PBMNC, 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 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 倍比稀释后加入 96 孔培养板中(100 ml/孔)。然后每孔加入固定数量的混合 T 淋巴细胞 ($5 \times 10^6/\text{ml}$, 100 ml/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 μl (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 μl /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), $SI = D(\lambda)_{\text{实验组}} / D(\lambda)_{\text{对照组}}$ ^[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。

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)。

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

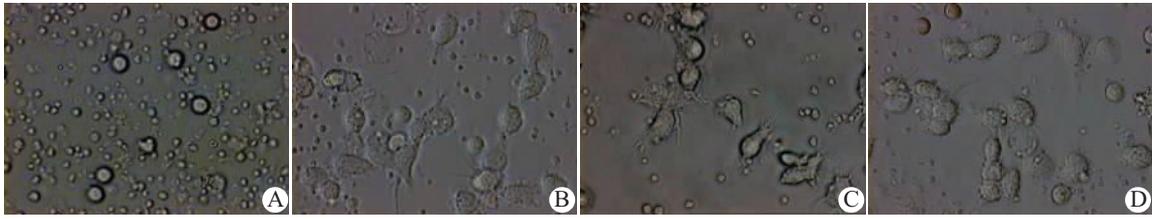


图 1 外周血单核细胞在 rhGM-CSF 和 A23187 或 TNF- α 处理前及处理 40 h 后相差显微镜下的形态变化 (原放大倍数: $\times 400$)

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

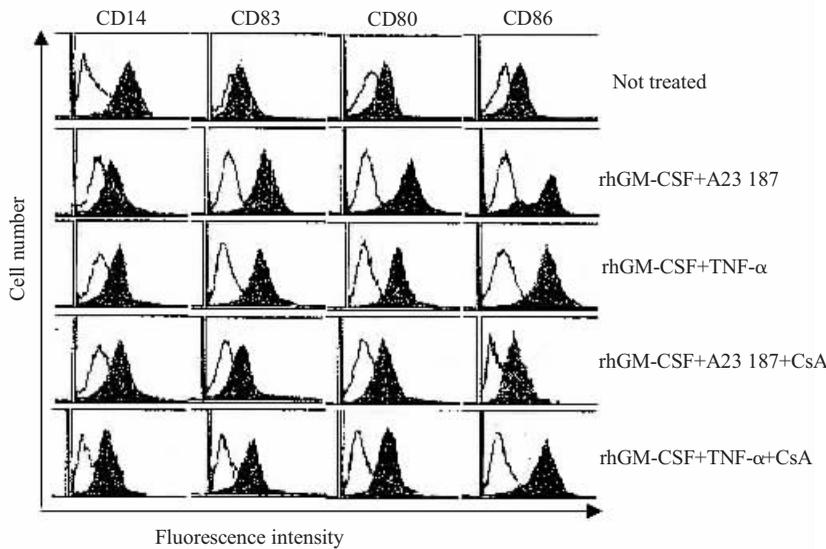


图 2 外周血单核细胞经不同方法培养 40 h 后细胞表面分子的变化

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

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)。

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 Ca^{2+} 浓度,导致 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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

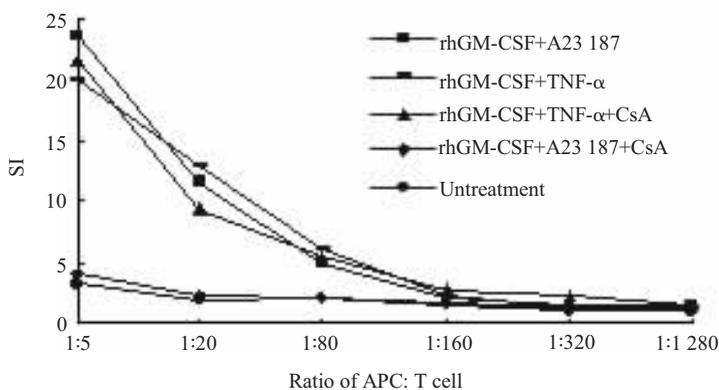


图 3 不同方法培养的抗原呈递细胞对同种异体 T 淋巴细胞的刺激增殖作用

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

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 interleukin-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. Phobol 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.