

[文章编号] 1000-4718(2006)08-1597-05

胚胎干细胞诱导发育为树突状细胞的研究*

黄璟¹, 何志旭², 黄绍良³, 吴倩倩¹, 刘俊峰²(贵阳医学院¹附院儿科,²干细胞研究中心, 贵州 贵阳 550004;³中山大学第二附属医院儿科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的: 探讨胚胎干细胞(ESC)诱导分化为树突状细胞(DC)的实验方法, 实现体外大规模扩增高纯度DC用于临床免疫治疗。方法: E14小鼠胚胎干细胞系在GM-CSF与IL-3联合作用下经胚胎体(EB)诱导分化为DC。不成熟DC(im-DC)流式细胞仪检测CD11c、CD80、CD86、MHC II-DR表达。用磷酸脂多糖(LPS)促进DC的成熟, 收获细胞后观察细胞形态及摄片并做扫描电镜检查, 分析细胞表型并与不成熟DC细胞表型做对比, 异体淋巴细胞增殖实验行功能检测。结果: ES细胞来源DC呈典型DC形态学表现。im-DC CD11c、CD80、CD86、MHC-II表达低, m-DC CD11c、CD80、CD86、MHC-II的表达均较前明显升高。功能检测发现, ES细胞来源的DC具有强烈的激发同种异体淋巴细胞增殖的作用, 证实ES细胞来源的DC具备正常的免疫学功能。结论: 使用GM-CSF联合IL-3能成功诱导E14胚胎干细胞发育为DC。故ES细胞可作为DC来源的一条新途径, 对于体外大规模制备DC用于免疫过继治疗提供了一个较好的方法。

[关键词] 树突状细胞; 胚胎干细胞**[中图分类号]** R329.2⁺8**[文献标识码]** A

Differentiation of dendritic cells from embryonic stem cells

HUANG Jing¹, HE Zhi-xu², HUANG Shao-liang³, WU Qian-qian¹, LIU Jun-feng²

(¹Department of Pediatrics, The Affiliated Hospital, ²The Stem Cell Research Center, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; ³Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

[ABSTRACT] AIM: To investigate the method of directed differentiation dendritic cells (DC) from embryonic stem cells, and to amplify high purity dendritic cells *in vitro* for immunological therapy. **METHODS:** E14 embryonic stem cell line was generated ES-DC in complete medium supplemented with GM-CSF and IL-3. Flow cytometry was used to determine CD11c, CD80, CD86, MHC-II cell-surface phenotype in immatured ES-DC. Lipopolysaccharide (LPS) was added to induce the ES-DC maturation. The matured ES-DC was harvested 24 hours later to identifying with morphology and transmission electron microscopy. The phenotype of matured ES-DC was analyzed by flow cytometry and compared with the immatured ES-DC. The antigen presenting was evaluated by mixed lymphocyte responses (MLR). **RESULTS:** The ES-DC had obviously dendritic processes under scanning electron microscope. The immature DCs expressed low level of CD11c (4.33 ± 0.23)%, CD80 (7.62 ± 0.19)%, CD86 (4.77 ± 1.22)% and MHC-II (9.68 ± 0.15)%. The mature DCs expressed higher level of CD11c (47.36 ± 2.68)%, CD80 (74.40 ± 1.47)%, CD86 (29.77 ± 2.00)% and MHC-II (87.56 ± 2.75)%. MLR showed that ES-DCs effectively stimulated lymphocyte proliferation. **CONCLUSIONS:** These results provide evidence that dendritic cells can be generated from E14 embryonic cells with the stimulations of GM-CSF and IL-3. The differentiated cells express high level of CD11c, CD80, CD86, MHC-II and effectively stimulate lymphocytes to proliferate. ES cells may become new origin of DC for immunotherapy.

[KEY WORDS] Dendritic cells; Embryonic stem cells

树突状细胞(dendritic cells, DC)是迄今发现功能最强的抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APC)。近来研究者利用DC具有抗原提呈和强烈激

活免疫系统的功能来制备DC肿瘤疫苗已成为一个非常重要的肿瘤生物治疗手段^[1,2]。但由于DC在组织中含量极微(仅占外周血的1%以下),分离培

[收稿日期] 2005-09-12

[修回日期] 2005-11-22

* [基金项目] 贵州省优秀青年科技人才专项基金资助项目; 广东省自然科学基金资助项目(021839); 广东省卫生厅基金资助项目(B2002034)

养有一定的困难,限制了人们对其进一步的应用。目前 DC 培养方法较多,可由 CD34⁺ 细胞或单核细胞诱导、衍生,大量增殖培养,但大多培养方法较复杂。另一方面,由于受配型的限制,目前使用的主要是来自患者自身的 DC,使用起来存在不安全因素。因此如何获得大量正常的 DC 以供临床治疗和临床研究就成为当前一个重要的课题。而胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES cell) 是具有全能分化特性的细胞。同时,近期的研究发现 ES 细胞具有较明显的免疫耐受性,有可能在不同的个体使用^[3]。因此,我们拟利用 ES 细胞全能分化的特性,在体外建立 ES 细胞定向分化为 DC 的方法,以提供基础研究和临床应用。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

DMEM 培养基:购自 Gibco 公司。胎牛血清:购自 Hyclone 公司。重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant mouse granulocyte - macrophage colony - stimulating factor, rmGM - CSF)、重组小鼠白细胞介素 3 (recombinant mouse interleukin - 3, rmIL - 3)、磷酸脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS): 购自 Sigma 公司。重组小鼠白血病抑制因子 (recombinant mouse leukemia inhibitory factor, rmLIF): 为 Chemicon 公司产品。抗小鼠 MHC II - PE, 抗小鼠 CD80 - FITC, 抗小鼠 CD86 - FITC, 抗小鼠 CD11c - FITC: 购自 Pharmingen 公司。^{[3]H} - TdR: 购自中国原子能研究所。

2 主要溶液的配制

ES 细胞培养液:高糖 DMEM + 15% 胎牛血清。在无饲养层时另加入 rmLIF 10 μg/L。胚胎体 (embryoid bodies, EB) 培养液:同 ES 细胞培养液,不加 rmLIF。ES 细胞来源的树突状细胞 (ES cell - derived dendritic cells, ES - DC) 培养液:高糖 DMEM + 15% 胎牛血清 + rmGM - CSF 25 μg/L + rmIL - 3 1 × 10⁶ U/L。

3 细胞株

小鼠胚胎干细胞 E14 细胞株由中山大学干细胞中心提供。

4 方法

4.1 小鼠胚胎干细胞饲养层细胞 (胚胎成纤维细胞, mouse embryo fibroblasts, MEF) 的培养 取 12 - 14 d 的胎鼠,去除头、尾、四肢和内脏,眼科剪把组织块减至 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小,加入适量的胰蛋白酶 - EDTA 消化后置于培养箱中培养。传 3 - 5 代

的细胞可作为饲养层使用。

4.2 E14 胚胎干细胞的培养 E14 细胞以 1 × 10⁸ cells/L 的密度接种于用丝裂霉素处理过的饲养单层上,换成 ES 细胞培养液。37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱内培养,每天观察,及时更换培养液,每 2 - 3 d 以 1:3 至 1:6 的比例传代。

4.3 E14 发育为胚胎体 (EB) ES 细胞在含 LIF 的 ES 培养液中培养 2 - 3 代,转入 90 mm 细菌培养皿中悬浮培养,换成 EB 培养液,37 °C、5% CO₂、100% 湿度孵箱内培养。

4.4 EB 诱导分化为 DC (ES 细胞来源的 DC, ES - DC) 的培养 用吸管将 12 - 14 d 形态较好的 EB 吸出,放入 6 孔板中,每孔中放 4 - 5 个 EB,加入 DC 培养液,每孔约 2 mL。每日观察,据培养液颜色每 1 - 2 d 半量换液 1 次。部分细胞于培养 14 d,轻轻吹打收获后用于上流式细胞仪,部分细胞培养第 15 d 加入 LPS 1 mg/L,继续培养 24 h 后收获悬浮细胞,用于上流式细胞仪、电镜观察及做混合淋巴细胞培养 (mixed lymphocyte reaction, MLR)。

4.5 扫描电镜观察 收获悬浮细胞加入 2.5% 戊二醛固定 2 h, PBS 洗涤 1 次,制成悬液滴片,再用 1% 的锇酸固定 1 h,乙醇梯度脱水后,真空镀膜,在扫描电子显微镜下观察摄片。

4.6 流式细胞术 收集细胞于离心管中, FITC 标记的单抗 CD11c、CD80、CD86 分别与 PE 标记的 MHC II - DR 10 μL 两两混合加入上述离心管中,振荡混匀后置 4 °C 避光孵育 30 min。PBS 悬浮细胞后上机检测。

4.7 混合淋巴细胞培养 (MLR) 16 d 的 ES - DC 作为刺激细胞,小鼠淋巴细胞作为反应细胞,将刺激细胞与反应细胞按细胞数 1:10、1:50、1:100 比例混合分成 3 组,加入 96 孔板,每组均设 3 个复孔,终体积为 200 μL,不足者以培养液补足。另设一组对照,仅加入反应细胞,不加刺激细胞。将 96 孔板放入温箱中培养 96 h,培养结束前 24 h 加入 ^{[3]H} - TdR 3.7 × 10⁴ Bq/well。收集细胞后用液闪仪测每分钟脉冲数 (counts/min)。

5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学检验采用 *t* 检验。

结 果

1 E14 的形态观察

E14 细胞呈一典型的克隆状生长,克隆内细胞紧密地聚集在一起,界限不清,形似鸟窝,克隆周边与饲养细胞层界限清楚,无分化迹象。E14 细胞脱饲

养层加入 LIF 后,仍能维持良好的克隆状生长,保持未分化状态,与在饲养层上生长相比,细胞克隆较小,呈岛屿状生长,边界清楚。

2 EB 的形成

E14 细胞转入 90 mm 细菌培养皿中,2-3 d 起可见悬浮生长的 EB 出现,由几个细胞构成。第 7 d 部分 EB 开始膨胀为囊状拟胚体,拟胚体内出现腔隙,且随着天数增加,腔隙逐渐增大。14 d 后部分 EB 贴壁生长,部分 EB 仍悬浮成囊状但维持 1 周后逐渐萎缩直至消失。

3 ES-DC 的形成

生长 14 d 的 EB 转入 24 孔板培养,换成 DC 培养液,内含 GM-CSF 及 IL-3 以诱导 ES 的定向分化。第 2 d,可见大部分胚体贴壁,周围有少量细胞游离出来,形态多样,随时间推移,第 4-5 d 时胚体外缘部分细胞呈圆形,集落式生长,轻微贴壁,没有明显的树突状突起(图 1),以后此类圆形、轻微贴壁细胞逐渐增多。于培养第 15 d,在培养液中加入 LPS 1 mg/L 以促使 DC 成熟,第 16 d 可见成熟 ES-DC (mature ES-DC, m-DC) 从细胞集落中释放出来悬浮生长,并逐渐增多,细胞胞体有毛刺,呈典型的树突状细胞形态表现(图 2)。

4 ES-DC 扫描电镜观察(图 3)

细胞形态不规则,有长短不一的突起,细胞表面粗糙,有层叠状的皱襞,呈典型 DC 表现。

5 ES-DC 细胞表型测定

未成熟 ES-DC CD11c、CD80、CD86、MHC-II 表达均低,而 LPS 促成熟后的 DC CD11c、CD80、CD86、MHC-II 表达均明显高于前者。差异显著($P < 0.01$),表 1。

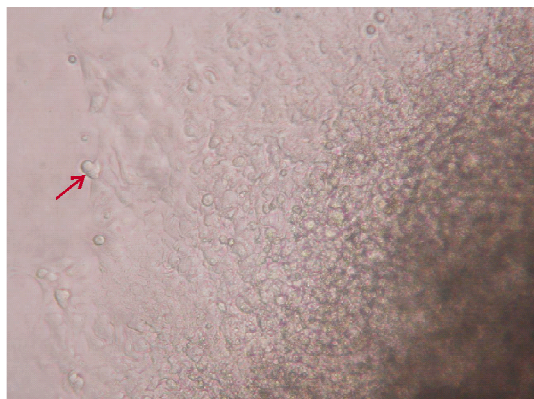


Fig 1 The adherence and culture of EB on days 5 ($\times 100$). The edge of EBs show the early immature DC which adhere slightly and have no apparently dendritic.

图 1 EB 贴壁培养后第 5 d

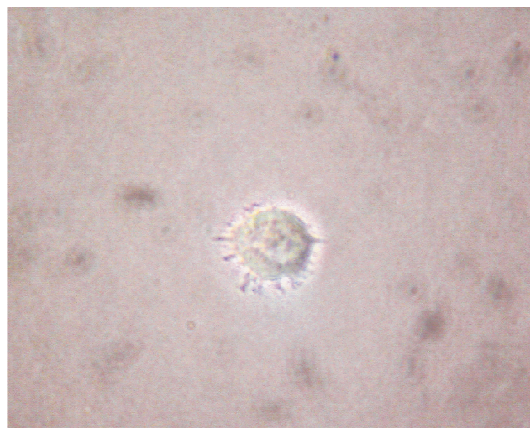


Fig 2 Mature DC ($\times 400$). The suspension mature DC show a pronounced dendritic morphology.

图 2 成熟的 DC(m-DC)

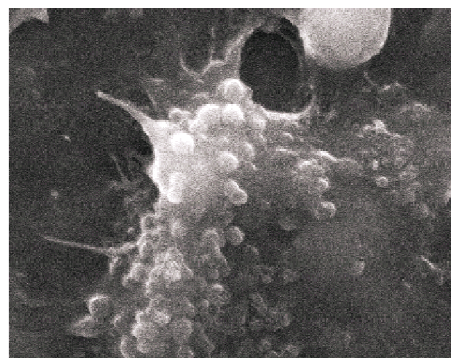


Fig 3 Morphology of m-DC in scanning electronic microscope ($\times 3000$).

图 3 m-DC 扫描电镜下的形态

表 1 未成熟 DC 与成熟 DC 的细胞表型比较

Tab 1 Phenotype of immature DC and mature DC (%. $\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

| | CD11c | CD80 | CD86 | MHC-II |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Immature DC | 4.33 \pm 0.23 | 7.62 \pm 0.19 | 4.77 \pm 0.22 | 9.68 \pm 0.15 |
| Mature DC | 47.36 \pm 2.68 * | 74.40 \pm 1.47 * | 29.77 \pm 2.00 * | 87.56 \pm 2.75 * |

* $P < 0.01$ vs immature DC group.

表 2 混合淋巴细胞反应

Tab 2 Mixed leukocyte reaction ($n = 3$)

| Stimulator: | Numbers of stimulator cells | Numbers of responder cells | Counts/min |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Control | 0 | 100 000 | 47.3 \pm 6.4 |
| 1:10 | 10 000 | 100 000 | 50 331.4 \pm 1 073.3 * |
| 1:50 | 2 000 | 100 000 | 20 313.4 \pm 410.8 * |
| 1:100 | 1 000 | 100 000 | 7 468.7 \pm 251.6 * |

* $P < 0.05$ vs control group.

6 ES-DC 的免疫刺激活性

同种异体混合淋巴细胞反应表明,本法诱导获得的 DC 在不同比例情况下对小鼠淋巴细胞具有强

烈激发同种异体淋巴细胞增殖的作用。刺激细胞数越多,反应越强。各组与对照组比较及组间两两比较均有显著差异($P < 0.05$)。

讨 论

DC 是迄今发现功能最强的抗原递呈细胞(APC),近年来在肿瘤感染等治疗的应用中受到越来越广泛的关注。在寻找一个扩增容易、安全可靠的 DC 来源途径中,我们注意到近年来的一个研究热点:胚胎干细胞(ES)的全能分化性。ES 是一种多能的未分化细胞,是从早期胚胎内细胞团或桑椹胚分离出来能在体外长期培养的高度未分化的全能细胞系。Thomson 等^[6]报道人 ES 细胞系建立成功,以后陆续在澳大利亚、以色列、日本和欧洲等地成功建立起人的 ES 细胞系,这就为体外使用人的 ES 细胞定向分化为 DC 提供了可能性。

本试验中,我们利用胚胎干细胞有向机体各种组织细胞分化潜能特性,体外诱导 ES 细胞分化为 DC,以期找到体外大规模“工厂化”地培育出高纯度、功能正常 DC 用于免疫过继治疗的方法。在探讨诱导分化的过程中,我们复习了相关文献资料,选择了分阶段诱导的方法。与 ES 细胞分化为其它目的细胞一样,首先应将 ES 发育为胚胎体(EB),EB 中含有大量向目的细胞分化的前体细胞,在特定分化微环境中,并配合相关分化生长因子的使用,可以定向分化为目的细胞。具体到 ES 来源的 DC 的诱导分化,其方法也遵循上述原则。要成功诱导 ES - DC 的形成,ES 及 EB 的质量至关重要。ES 细胞在传代培养过程中维持 ES 细胞的未分化多能状态对保持 ES 的分化潜能很重要。EB 为 ES 细胞悬浮生长自发分化形成,含有内中外 3 个胚层组织,能基本上模拟体内的发育过程。已有很多研究利用拟胚体研究胚胎发育学和定向诱导各组织器官^[7,8]。本实验中发现 ES 细胞用 LIF 脱饲养层培养 3 代以上才能形成 EB,因为残存的饲养层仍会分泌一定量的 LIF,不利于 ES 细胞形成 EB。此外,要控制 EB 朝 DC 方向分化,还须加入一些外源性的细胞因子。在选择特定的分化生长因子时,结合骨髓及外周血来源的 DC 诱导分化因子使用的经验,可以采用 GM - CSF、IL - 3、或 IL - 4 等细胞因子。在具体诱导分化方案上,我们注意到 Fairchild 等^[9]曾使用 ESF116 ES 细胞株通过先悬浮培养为 EB,再加入 GM - CSF 与 IL - 3 诱导出 DC。而日本学者 Senju 等^[10]使用骨髓基质细胞 OP9 细胞系为饲养层,培养液中加入 GM - CSF 将

TT2 ES 细胞株不经 EB 阶段直接诱导为 DC 获得成功。因此,我们认为正确的细胞因子的组合是成功分化 ES 细胞形成 DC 的关键。经典的细胞因子组合为粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子(GM - CSF)、白细胞介素 - 4(IL - 4)或肿瘤坏死因子(TNF - α),然该组合中 IL - 4 及 TNF - α 均有促使 DC 成熟的作用,虽然成熟的 DC 具备抗原提呈功能,但是 DC 一旦成熟后很快会衰老、死亡,不利于体外长期培养及建系。生理条件下,机体的 DC 一般呈未成熟状态,这种 DC 具备摄取及加工抗原作用,在摄入抗原后 DC 才分化成熟,因此我们需要的是未成熟 DC。我们按文献^[9]选择了 GM - CSF 与白细胞介素 - 3(IL - 3),可以成功诱导出未成熟 DC。GM - CSF 可以作用于干细胞促进髓系细胞的发育,是维持 DC 发育及分化最根本的细胞因子,而 IL - 3 在 EB 向造血系的分化过程中起促进作用,且无促 DC 成熟作用。非成熟 DC 仅表达低水平的共刺激分子和粘附分子,不能激活 T 细胞,主要特征是能有效捕捉抗原,通过巨胞饮,受体介导的内吞及吞噬 3 种方式摄取抗原,具极强的抗原加工和处理能力。成熟 DC 共刺激分子和粘附分子表达上调,捕捉抗原能力下降,但可激发有抗原受体的 T 细胞。我们的研究发现,在本试验条件下 ES - DC 在体外培养中与其它来源的 DC 有所不同的是,ES - DC 不能自发成熟,如果没有外源性的刺激,ES - DC 会一直处于未成熟状态。未成熟的 ES - DC 为圆形轻微贴壁生长,表面没有明显的突起,细胞表面 MHC - II 及共刺激分子 CD11c、CD80、CD86 的表达均低。而在加入 LPS 刺激后,可诱导 ES - DC 成熟,细胞从集落中释放出来并有明显的树突状突起,流式细胞仪测 CD11c、CD80、CD86、MHC - II 的表达均明显升高,且具有较强的刺激 T 细胞增殖功能。表明该试验方法诱导获得的 ES - DC 具有典型的细胞学形态及正常的生物学功能。

目前国内外文献多见骨髓或外周血 CD34⁺ 细胞或单核细胞来源的 DC^[11,12],途径较单一,DC 制备量小。本试验利用胚胎干细胞诱导发育为树突状细胞,为树突状细胞的体外培养扩增探索一条新的方法,拓宽了 ES 细胞的应用范围。若结合细胞分选技术,将 ES - DC 进一步纯化,可于体外大规模、高纯度扩增 DC,为研究树突状细胞功能及制备特异性强和功能正常的疫苗研究打下了基础。

[参 考 文 献]

[1] John M, Timmerman, Debrak, et al. Idiotype - pulsed

- dendritic cell vaccination for B - cell lymphoma clinical and immune response in 35 patients [J]. *Blood*, 2002, 99 (5) : 1517 - 1526.
- [2] Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype - pulsed dendritic cell vaccination for B - cell lymphoma : clinical and immune responses in 35 patients [J]. *Blood*, 2002, 99(5) : 1517 - 1526.
- [3] Fairchild PJ, Cartland S, Nolan KF, et al. Embryonic stem cells and the challenge of transplantation tolerance [J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25(9) : 465 - 469.
- [4] Gong J, Avigan D, Chen D, et al. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(6) : 2715 - 2718.
- [5] Lindner M, Schirmacher V. Tumour cell - dendritic cell fusion for cancer immunotherapy : comparison of therapeutic efficiency of polyethylen - glycol versus electro - fusion protocols [J]. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32 (3) : 207 - 217.
- [6] Thomson JA, Itskovitz - Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391) : 1145 - 1147.
- [7] 何志旭, 黄绍良, 周其峰, 等. 体外定向诱导小鼠胚胎干细胞发育为造血干/祖细胞方法的初步研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(4) : 443 - 447.
- [8] Xu H, Fan X, Wu X, et al. Neural precursor cells differentiated from mouse embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326 (1) : 115 - 122.
- [9] Fairchild PJ, Brook FA, Gardner RL, et al. Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells [J]. *Current Biology*, 2000, 10(23) : 1515 - 1518.
- [10] Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, et al. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells [J]. *Blood*, 2003, 101(9) : 3501 - 3508.
- [11] Koch F, Ivarsson L, Janke K, et al. Development and maturation of Langerhans cells, spleen and bone marrow-dendritic cells in TNF - alpha/lymphotoxin - alpha double - deficient mice [J]. *Immunol Lett*, 2005, 96(1) : 109 - 120.
- [12] Dakic A, Shao QX, Amico AD, et al. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny [J]. *J Immunol*, 2004, 172(2) : 1018 - 1027.

更 正 启 示

本刊2006年3月刊登了“神经钙粘连素胞外结构域的分离和表达[2006,22(3):520-523]”一文,该文作者许静,李侠,刘俊霞,宋增璇的工作单位应为中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室(天津300020),原刊登的论文单位有误,编辑部特此更正,并向作者与读者表示歉意。

《中国病理生理杂志》编辑部

2006年7月28日