

• 基础论著 •

IL-4对小鼠骨髓树突状细胞表面分子CD11c、CD80、CD86表达的影响及其意义

田晋生 邓勇志

【摘要】 目的 探讨IL-4对小鼠骨髓树突状细胞(DC细胞)表面分子CD11c、CD80、CD86表达的影响及其意义。方法 对照组($n=5$ 只, 30孔)应用20 ng/ml GM-CSF, 实验组($n=5$ 只, 30孔)应用20 ng/ml GM-CSF+20 ng/ml IL-4分别刺激小鼠骨髓细胞生长, 隔日进行细胞换液, 观察并对比细胞形态学变化, 流式细胞仪测定DC细胞表面相关分子表达。结果 实验组诱导小鼠骨髓细胞第7日观察可见DC细胞形态, 对照组第7日未发现明显DC细胞形态, 流式细胞仪测定实验组CD11c(0.546 ± 0.289)、CD80(0.506 ± 0.085)、CD86(0.562 ± 0.260)表达分别较对照组CD11c(0.236 ± 0.058)、CD80(0.279 ± 0.096)、CD86(0.237 ± 0.070)表达明显增高($P<0.05$)。结论 IL-4可以促进小鼠骨髓DC细胞表面分子CD11c、CD80、CD86表达, 促进DC细胞分化成熟。

【关键词】 白细胞介素4; 树突细胞; 抗原, CD11c; 抗原, CD80; 抗原, CD86

Influence and significance of IL-4 on the expression of CD11c, CD80, CD86 on mouse bone marrow

DC cells Tian Jinsheng*, Deng Yongzhi. *Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Deng Yongzhi, Email: dengyongzhi@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To explore the efficacy of IL-4 on the expression of phenotype of CD11c, CD80, CD86 and its underlying meaning in cultured dendritic cells (DC). **Methods** On the base of the routine culture, both the control group ($n=5$, 30 holes) and the test group ($n=5$, 30 holes) of mouse bone marrow cells were added with 20 ng/ml GM-CSF. In addition the test group was further treated with 20 ng/ml of IL-4. After 7 days, both groups were observed under microscope and CD11c, CD80, CD86 were measured with flow cytometry. **Results** At the 7 days, the DC cells were found under microcopy in the test group but not in the control group. Flow cytometry demonstrated the cell phenotype of CD11c (0.546 ± 0.289), CD80(0.506 ± 0.085) and CD86(0.562 ± 0.260) expression in test group were higher than that of the control group, which were CD11c (0.236 ± 0.058), CD80 (0.279 ± 0.096) and CD86 (0.237 ± 0.070), respectively ($P<0.05$). **Conclusions** IL-4 could effectively promote the phenotype molecule expression of CD11c, CD80, CD86, and thus stimulate the differentiation and maturation of bone marrow cells to DC cells.

【Key words】 Interleukin-4; Dendritic cells; Antigens, CD11c; Antigens, CD80; Antigens, CD86

树突状细胞(DC细胞)是活化特异性T淋巴细胞最强的抗原递呈细胞,同时DC细胞在器官移植后免疫排斥及免疫耐受中起着关键的调节作用。研究

中一般应用GM-CSF和IL-4联合刺激而获得DC细胞。目前普遍认为GM-CSF对DC细胞的分化、发育、成熟起着至关重要的作用^[1],而IL-4在DC细胞发育过程中的具体作用及重要性仍不明确。本实验研究IL-4对小鼠骨髓细胞形态学变化的作用及其对骨髓细胞CD11c、CD80、CD86表面分子表型转变的影响,探究IL-4对小鼠骨髓DC细胞分化发育的影响及

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.05.021

作者单位: 030001 太原,山西医科大学(田晋生);山西医科大学附属心血管病医院 山西省心血管病医院心血管外科(邓勇志)

通讯作者: 邓勇志, Email: dengyongzhi@hotmail.com

意义。

材料与方 法

一、动物

7~9 周雌性 C57BL/6 小鼠购自山西医科大学动物中心。

二、材料

主要试剂: 重组小鼠 rGM-CSF (5 μg)、IL-4 (5 μg) 购自 Protech 公司, 异硫氰酸荧光素 (FITC)、藻红蛋白 (PE) 购自 eBioscience 公司; RPMI 1640 培养液 (含 2 mmol/L 谷氨酰胺和 100 U/ml 青链霉素)、10% 胎牛血清购自 Hyclone 公司。

三、小鼠骨髓的提取、骨髓 DC 细胞的培养及分组

1. 骨髓提取及细胞培养: 取 7~9 周雌性 C57BL/6 小鼠, 颈椎脱臼法处死, 无菌条件下取上肢骨, 双侧股骨, 胫骨及腓骨, 泡入 75% 酒精 10 min 后用 1 ml 无菌注射器抽取 RPMI-1640 培养液反复冲洗至培养皿中直至变白, 收集培养皿中冲洗物, 置入离心管中离心, 弃上清后将沉淀物用 RPMI-1640 全培养液配成 2×10^6 /ml 的细胞悬液共 6 ml, 分至 6 孔细胞培养板中各 1 ml, 之后每个培养板均加入 1 ml RPMI-1640 及 20 ng/ml rGM-CSF 至 2 ml。

2. 分组: 应用上述方法实验组及对照组分别处理 5 只小鼠提取骨髓稀释后分到 10 个 6 孔板内。对照组 (共 30 孔) 单纯给予 rGM-CSF 处理, 实验组 (共 30 孔) 在对照组基础上加 20 ng/ml IL-4。两组均于 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养, 2 d 后半量换液, 之后隔日全量换液。

四、细胞形态观察和表型分子的测定

分别于培养第 7 天、第 9 天光镜下观察实验组与对照组细胞形态学变化。培养第 9 天用流式细胞仪测定实验组 CD11c (10 孔)、CD80 (10 孔)、CD86 (10 孔) 与对照组细胞表面 CD11c (10 孔)、CD80 (10 孔)、CD86 (10 孔) 表达。

五、统计学处理

所得数据采用 SPSS 13.0 软件处理, 两组间数据采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

结 果

一、细胞形态学观察

于培养第 7 天、第 9 天光镜下观察实验组可见

伸出突起的 DC 细胞, 而对照组没有明显伸出突起的 DC 细胞 (图 1)。

二、细胞表面 CD11c、CD80、CD86 表达

培养第 9 天实验组较对照组细胞表面 CD11c 分子 (0.546 ± 0.2890 vs. 0.236 ± 0.058)、CD80 分子 (0.506 ± 0.085 vs. 0.279 ± 0.096) 和 CD86 分子 (0.562 ± 0.260 vs. 0.237 ± 0.070) 表达均增高 ($P < 0.05$) (图 2, 表 1~3)。

表 1 骨髓细胞表面 CD11c 表面分子的表达

组别	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	10	0.236 ± 0.058	2.355	0.046
实验组	10	0.546 ± 0.289		

表 2 骨髓细胞表面 CD80 表面分子的表达

组别	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	10	0.279 ± 0.096	3.958	0.004
实验组	10	0.506 ± 0.085		

表 3 骨髓细胞表面 CD86 表面分子的表达

组别	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	10	0.237 ± 0.070	2.694	0.027
实验组	10	0.562 ± 0.260		

讨 论

研究表明 DC 细胞是体内唯一可以促使静息状态 T 淋巴细胞发挥作用的抗原提呈细胞。在肿瘤防治领域, 研究工作者将 DC 细胞与肿瘤相关抗原 (TAA) 相融合, 进而通过激活 T 淋巴细胞来杀灭肿瘤^[2]。在器官移植领域, 已应用未成熟状态的 DC 细胞延长了大鼠肾脏移植后的存活时间^[3], 这为达到永久性免疫耐受提供了理论依据。同样的方法也适用于心、肝等器官的移植。通常情况下人体免疫系统只对外来抗原发生免疫反应, 但由于感染、创伤所导致 DC 细胞成熟状态的变化打破了免疫平衡, 也是导致自身免疫性疾病的重要原因之一^[4]。DC 细胞分化状态与各类疾病有着密切关系, 而其不同的功能状态又与其细胞表面分子表型有关, 其中 CD11c 是成熟 DC 细胞较为特异的表面抗原^[5-6], 而 CD80、CD86 作为激活 T 淋巴细胞重要的协同刺激分子对 DC 细胞发育成熟也有重要的意义。

获得较高纯度 DC 细胞方法较多, 有单独应用 GM-CSF 以及 GM-CSF 联合 IL-4 和 GM-CSF 联合 IL-10 等方法, 有些研究强调了 IL-13 的重要性^[7]。

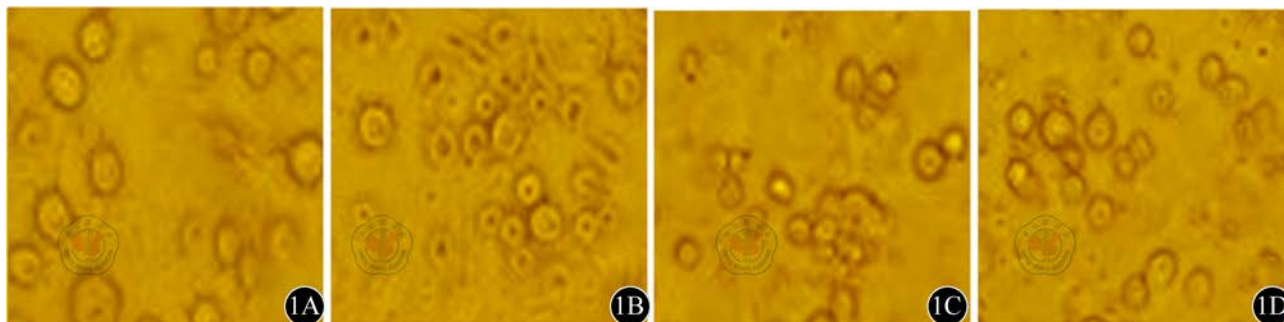


图1 实验组与对照组细胞形态学对比($\times 200$): 1A, 1B为实验组第7、9天细胞形态, 均可见伸出突起的树突状细胞; 1C、1D为对照组第7、9天细胞学形态, 未见明显DC细胞形态

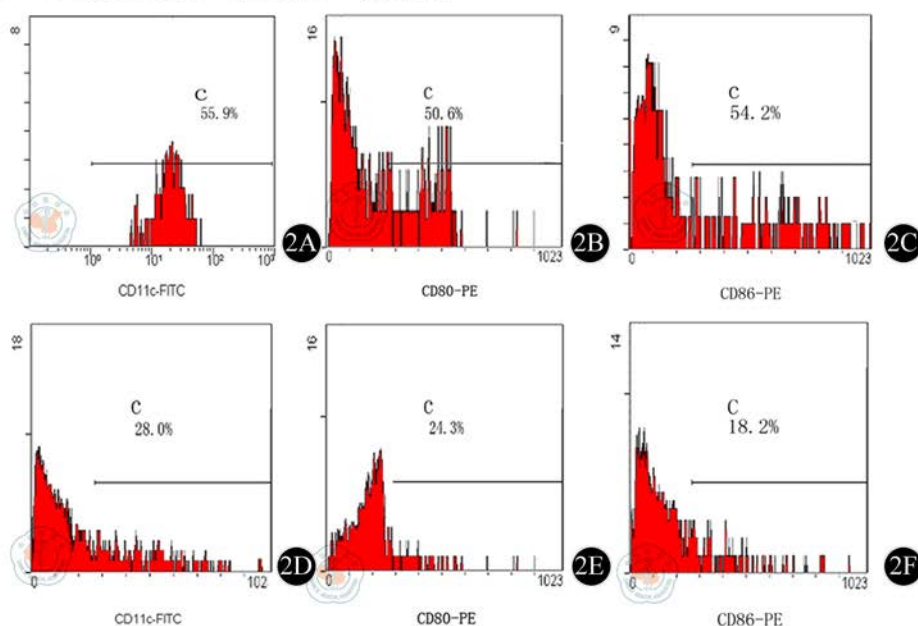


图2 2A~2C分别为培养第9天实验组细胞CD11c、CD80、CD86表面分子表型表达, 2D~2F分别为培养第9天对照组细胞表面CD11c、CD80、CD86表面分子表型表达

然而除 GM-CSF 的作用外, 其他细胞因子究竟在 DC 细胞发育成熟过程中起多大作用尚不清楚。本实验通过对比单纯应用 GM-CSF 以及 GM-CSF 联合应用 IL-4 两组实验来讨论 IL-4 对 DC 细胞的诱导作用及其表面 CD11c、CD80 和 CD86 等表型分子的变化。CD11c 为 DC 细胞表面较为特异的标记物; CD80 又名 B7-1 分子, 广泛表达于 B 细胞、单核细胞、DC 细胞表面, 是活化 T 淋巴细胞重要的协同刺激分子, 其表达率的增高不仅提示免疫反应增强, 也是 DC 细胞发育成熟的指标之一; CD86 又名 B7-2 分子, 其意义与 CD80 相同。

在正常情况下机体内 DC 细胞由单个核细胞分化而来, DC 细胞含量在血细胞中所占比例较少, 此外, 实验过程中提取小鼠骨髓进行细胞培养获得 DC 细胞会使更多 DC 细胞在操作过程中丢失, 因此应用 GM-CSF 可以有效诱导单个核细胞的发育,

提高单个核细胞在骨髓液中的含量, 其作用很可能是诱导产生了较多的 DC 前体细胞。然而, 这类前体细胞在大多数状态下也可能继续分化为单核及其他细胞。从本实验可以看出加入 IL-4 后的骨髓细胞 CD11c 较对照组表达增高 ($P < 0.05$), 说明 IL-4 对骨髓中单个核细胞向 DC 细胞分化有诱导作用。

一般情况下 IL-4、IL-10 均是体内炎症抑制性细胞因子, 主要作用为抑制单核细胞及 T 淋巴细胞的增殖及其产生的炎症反应^[8-9], 对正常情况下调节机体免疫平衡有重要作用, 在机体应激过程中(例如休克、脓毒症、严重的创伤) IL-4 与 IL-10 所介导的代偿性抗炎反应综合征(CARS)能够抑制机体的免疫功能, 导致免疫瘫痪^[10]。然而, 本研究加入 IL-4 后细胞 CD80、CD86 均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 说明单纯对于 DC 细胞而言, IL-4 可以增加激活 T 淋巴细胞的重要协同刺激分子 CD80

及 CD86; 而 IL-4 对于整个机体的免疫抑制作用, 是否与其对单核、NK 细胞的作用有关, 仍值得进一步研究。

参 考 文 献

[1] Scheicher C, Mehlig M, Zecher R, et al. Dendritic cells from mouse bonemarrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor[J]. J Immunol, 1992, 154(2): 253-264.

[2] Koido S, Homma S, Okamoto M, et al. Fusions between dendritic cells and whole tumor cells as anticancer vaccines[J]. Oncoimmunol, 2013, 2(5): e24437.

[3] Wang T, Xu L, Li H, et al. Immature CD4⁺ dendritic cells conditioned with donor kidney antigen prolong renal allograft survival in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(14): 2530-2537.

[4] Agrawal A, Sridharan A, Prakash S, et al. Dendritic cells and aging: consequences for autoimmunity[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2012, 8(1): 73-80.

[5] Kapina MA, Rubakova EI, Majorov KB, et al. Capacity of lung stroma to educate dendritic cells inhibiting mycobacteria-specific T-cell response depends upon genetic susceptibility to tuberculosis[J].

PLoS One, 2013, 8(8): e72773.

[6] Acevedo G, Padala NK, Ni L, et al. Astrocytes inhibit microglial surface expression of dendritic cell-related costimulatory molecules through a contact-mediated process[J]. J Neurochem, 2013, 125(4): 575-587.

[7] Piemonti L, Bernasconi S, Luini W, et al. IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF[J]. Eur Cytokine Netw, 1995, 6(4): 245-252.

[8] Shimada H, Moriwaki Y, Kurosawa H, et al. Inflammatory mediator and organ dysfunction syndrome[J]. Review, 1998, 99(8): 490-496.

[9] Schneider CP, Schwacha MG, Chaudry IH, et al. The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1689(1): 22-32.

[10] Réglie-Poupet H, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA, et al. Absence of regulation of human polymorphonuclear oxidative burst by interleukin-10, interleukin-4, interleukin13 and transforming growth factor-beta in whole blood[J]. Eur Cytokine Netw, 1998, 9(4): 633-638.

(收稿日期: 2014-02-08)
(本文编辑: 戚红丹)

田晋生, 邓勇志. IL-4 对小鼠骨髓树突状细胞表面分子 CD11c、CD80、CD86 表达的影响及其意义 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (5): 905-908.

