

刘芳, 乔艳艳, 薛洋, 等. 猪外周血单核细胞来源的树突状细胞体外诱导培养[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 588-592.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.016

猪外周血单核细胞来源的树突状细胞体外诱导培养

刘芳^{1,2}, 乔艳艳¹, 薛洋¹, 杜芳芳², 张俊¹, 张红英^{1,2}, 王学兵^{1,2}

(1.河南农业大学牧医工程学院,河南 郑州 450000; 2.河南省动物性食品安全重点实验室,河南 郑州 450000)

摘要: 为建立猪外周血单核细胞来源的树突状细胞(MoDC)体外培养模型,从猪外周新鲜血液中分离外周血单核细胞(PBMC),通过贴壁法获得树突状细胞前体细胞,采用重组猪的集落共刺激因子(rpGM-CSF)和白细胞介素4(rpIL-4)双因子诱导及脂多糖(LPS)刺激成熟法,收集不同时间段的细胞,利用扫描电子显微镜观察其形态,流式细胞分析仪检测表面分子表达率及其对FITC-dextran的吞噬能力,混合淋巴细胞反应检测细胞对同种异体T细胞的刺激能力。结果表明,经体外诱导的细胞具有典型的树突状形态;经脂多糖刺激的树突状细胞表面分子CD1a、CD80、CD86、SLAI、CD172a与未经刺激的树突状细胞有明显增高,其吞噬能力有所下降,刺激同种异体T淋巴细胞的能力增强。本研究成功建立了猪MoDC的体外诱导培养方法,为进一步研究其在机体免疫调节和抗病毒感染中的作用奠定了基础。

关键词: 猪外周血单核细胞; 猪树突状细胞; 表型分子; 诱导培养

中图分类号: S828;S852.4⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0588-05

Porcine peripheral blood monocyte-derived dendritic cells cultured *in vitro*

LIU Fang^{1,2}, QIAO Yan-yan¹, XUE Yang¹, DU Fang-fang², ZHANG Jun¹, ZHANG Hong-ying^{1,2},
WANG Xue-bing^{1,2}

(1.College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China; 2.Key Laboratory for Animal-derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: To develop a method for maturation induction of dendritic cells (DCs) *in vitro*, porcine peripheral blood monocyte-derived DCs (MoDCs) were induced in the presence of rpGM-CSF, rpIL4 and lipopolysaccharide (LPS). The cells were harvested to detect the morphological, phenotypic and functional characteristics. FITC-dextran endocytic activity and the surface molecules of MoDCs were measured with flow cytometer, and T lymphocyte proliferation following MoDCs

stimulation were detected by CCK-8 assay. The induced MoDCs showed typical dendritic morphology, and the expressions of the surface molecules CD1a, CD80, CD86, SLAI, and CD172a were increased by LPS treatment from 53.8%, 42.4%, 23.4%, 54.2%, 48.2% to 55.2%, 53.6%, 43.6%, 65.4%, 61.1%, respectively. The phagocytic ability of non-LPS-treated DC to uptake FITC-dextran was higher than that of LPS-treated DC. The proliferation of allogeneic T lymphocyte was enhanced in LPS-treated

收稿日期:2015-10-09

基金项目:河南省基础与前沿技术研究项目(152300410076);河南省自然科学基金研究项目(132300410114);河南省科技攻关计划(152102110048)

作者简介:刘芳(1979-),女,河南邓州人,博士,主要从事中药免疫调节作用研究。(E-mail) girlliuofang@163.com。乔艳艳为共同第一作者。

通讯作者:王学兵, (E-mail)xbwang74@163.com

DCs. In conclusion, the porcine MoDC was successfully induced and cultured *in vitro*, laying a foundation for further study on the role of porcine MoDC in immune regulation and anti-virus infection.

Key words: porcine peripheral blood monocyte; dendritic cell; phenotypic molecule; induction

树突状细胞(Dendritic cell, DC)是一类不同于巨噬细胞和B淋巴细胞的特殊抗原提呈细胞(Antigen presenting cell, APC),在免疫应答的首要环节中扮演着重要作用,是目前公认的体内最强大、唯一能激活初始型T淋巴细胞的专职APC^[1]。树突状细胞同时参与先天性免疫和获得性免疫,与病原微生物感染和机体免疫预防都有着十分密切的联系,而树突状细胞的状态决定着其所诱导免疫反应的方向^[2]。因树突状细胞在体内分布广泛,亚群复杂,且不同成熟阶段的树突状细胞具有不同的功能,故被认为是联系天然防御功能和获得性障碍免疫的关键^[3]。近年来,树突状细胞作为一种重要的免疫细胞在病毒感染中的作用及意义引起了国内外医学界的广泛关注。鉴于猪外周血单核细胞(PBMC)来源的树突状细胞(MoDC)具有较好的模型意义,且来源方便、操作简单、成本低、数量大,本研究拟探索建立体外猪外周血单核细胞诱导树突状细胞的方法。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

重组猪集落共刺激因子(GM-CSF)和白细胞介素4(IL-4)购自Prospec公司;Ficoll-Hypaque淋巴细胞分离液(相对密度1.077)购自天津血液研究所;RPMI-1640培养液Hyclone、胎牛血清购自Hyclone公司;Mouse Anti Pig CD1-FITC、Mouse Anti Human CD80-FITC、Mouse Anti Human CD86-FITC购自Southern Biotech公司;Mouse Anti Porcine SLAII-DR-FITC、Mouse Anti Pig CD172a-FITC购自Serotec公司;脂多糖购自Sigma公司;FITC-dextran购自北京博奥森生物技术有限公司;Cell Counting Kit-WST-8试剂盒购自Beyotime公司。

1.2 试验动物

6~8周龄杂交猪,实验室常规PCR检测伪狂犬病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸道综合症病毒(PRRSV)、口蹄疫病毒(FMDV)均为阴性。

1.3 猪外周血单核细胞的分离、诱导及培养

参照文献[4]、[5]的方法并略作调整。无菌条

件下于猪前腔静脉采取外周新鲜血液,肝素(100 U/ml)抗凝,以猪淋巴细胞分离液常规密度梯度离心,获取单个核细胞。10% FBS RPMI1640调整PBMCs浓度为1 ml 3×10^6 ,台盼蓝染色测定细胞活力>95%,以每孔3 ml接种于6孔板,5% CO₂、37 °C培养3 h,去除非贴壁细胞,获得贴壁的单核细胞-树突状细胞前体细胞。每孔中加入3 ml含有10% FBS、20 ng/ml GM-CSF、20 ng/ml IL-4的完全培养液,在5% CO₂、37 °C条件下培养,每隔2 d半量换液1次,在培养的第5 d,将细胞分为两组,其中一组完全培养液中加入LPS使其终浓度为100 ng/ml,另外一组继续加完全培养液即LPS未处理组,继续培养48 h。

1.4 细胞形态学观察

在相差显微镜和扫描电镜^[6]下逐日观察细胞的变化。

1.5 流式细胞仪检测细胞表型

参照文献[7]方法,取无LPS处理组和LPS处理组的细胞用4 °C预冷的PBS洗涤2次,PBS调整其浓度为1 ml 1×10^5 ,分别加入流式抗体Mouse Anti Pig CD1-FITC、Mouse Anti human CD80-FITC、Mouse Anti human CD86-FITC、Mouse Anti Porcine SLAII-DR-FITC和Mouse Anti Pig CD172a-FITC,4 °C避光反应30 min,用PBS液洗涤细胞,最后加入100 μl PBS重悬细胞,待测。

1.6 细胞吞噬功能检测

参照文献[7],收集无LPS处理组和LPS处理组的树突状细胞,用4 °C预冷的PBS洗涤2次,PBS调整浓度为1 ml 1×10^5 细胞,加入FITC-dextran,使其终浓度为100 μg/ml,5% CO₂、37 °C培养1 h,冰上预冷10 min,PBS洗涤细胞2次,流式细胞仪检测。

1.7 同种异体混合淋巴细胞试验

参照文献[8]方法,将同种异体猪外周血淋巴细胞作为反应细胞,无LPS处理组和LPS处理组的细胞为刺激细胞。将刺激细胞与T淋巴细胞按1:5、1:25、1:125比例分别加入96孔板中混合培养。每个比例设置3个复孔,同时设T细胞对照组、刺激细胞对照组及培养基对照组。每孔终体积

为 200 μ l, 5% CO₂, 37 °C 培养 96 h, 结束前 2 h 加入 CCK-8, 酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。

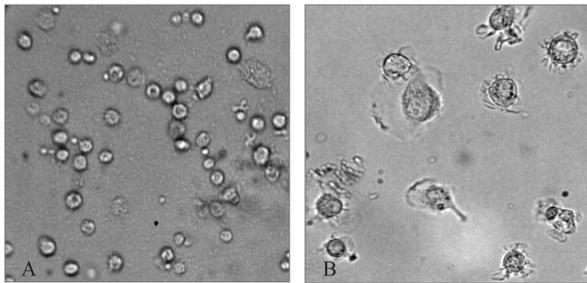
1.8 数据处理

采用 SPSS18.0 统计分析软件处理, 数据以均数 (\bar{x}) \pm 标准差 (s) 表示, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 细胞形态鉴定

分离 PBMC 培养 2 h 后贴壁的单核细胞经含细胞因子的诱导液培养, 用相差显微镜观察培养不同时间所诱导的细胞变化 (图 1)。培养 1~2 d 的细胞体积小, 多为单个圆形细胞, 表面光滑无突起, 后期有部分聚集生长; 第 3 d 细胞体积变大, 细胞疏松地附着在培养板上; 第 5 d 未经 LPS 处理的细胞大部分呈悬浮生长, 体积变大, 表面突起, 形态不规则 (图 1A); 第 7 d 经 LPS 刺激的细胞树突状形态更为典型, 细胞变大, 表面粗糙, 突起更加明显 (图 1B)。



A: 未经 LPS 处理的猪 MoDCs; B: 经 LPS 处理的猪 MoDCs。

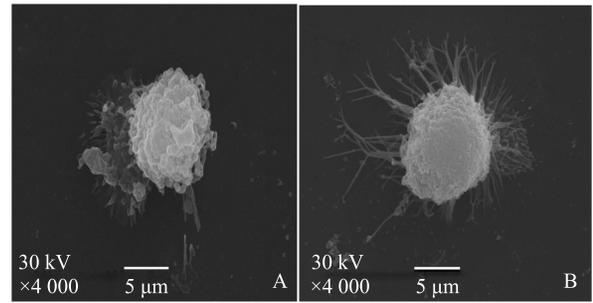
图 1 相差显微镜下猪 MoDCs 的形态特点

Fig.1 Porcine MoDCs morphological characteristics under an phase contrast microscope

扫描电镜下, 未经 LPS 处理的细胞表面粗糙, 有大量皱褶, 毛刺样突起较少, 且短小 (图 2A); 经 LPS 处理后的细胞表面大量树枝样突起, 部分树枝长度甚至超过细胞体 (图 2B)。

2.2 猪外周血 MoDCs 表面分子的表达

通过流式细胞仪检测, 不同培养阶段的树突状细胞均表达 CD172a、CD1、CD80、CD86 和 SLA-II-DR, 且表达水平随树突状细胞成熟而不同, 表 1 显示 LPS 处理组树突状细胞各表型较未经 LPS 处理的各表型表达率明显增高, 其中 CD1、CD80、CD86



A: 未经 LPS 处理的猪 MoDCs 形态; B: 经 LPS 处理的猪 MoDCs 形态。

图 2 扫描电镜下猪 MoDCs 形态特点 ($\times 4\ 000$)

Fig.2 Porcine MoDCs morphological characteristics under an scanning electron microscope ($\times 4\ 000$)

和 SLA-II-DR 增高达显著水平 ($P < 0.05$), 表明 LPS 刺激可诱导树突状细胞表型成熟。

表 1 LPS 刺激前后树突状细胞表型分子的表达率

Table 1 Phenotypic molecules of DC before and after LPS stimulation

表型分子	未经 LPS 处理组 表达率 (%)	LPS 处理组 表达率 (%)
CD1a	43.10 \pm 1.04	53.47 \pm 0.71 *
CD172a	54.77 \pm 0.85	56.03 \pm 0.74
CD80	24.73 \pm 1.19	44.23 \pm 0.65 *
CD86	55.07 \pm 0.78	60.17 \pm 0.93 *
SLA-II-DR	49.20 \pm 0.95	60.33 \pm 0.78 *

* 代表 LPS 处理组与未经 LPS 处理组比较差异达 0.05 显著水平。

从图 3 可见, 培养第 5 d 的树突状细胞表型分子 CD1a、CD172a、CD80、CD86 和 SLA-II-DR 表达率分别为 42.40%、53.80%、23.40%、54.20% 和 48.20%; 经 LPS 处理的树突状细胞各表型分子表达率分别为 53.60%、55.20%、43.60%、63.40% 和 61.10%, 较未经 LPS 处理的树突状细胞表达率均增高。

2.3 树突状细胞吞噬功能

体外诱导培养的 LPS 处理组树突状细胞的吞噬能力较未经 LPS 处理的树突状细胞组有所下降 (表 2)。

2.4 对同种异体 T 细胞的刺激能力

如图 4 所示, LPS 处理组树突状细胞与 LPS 未处理组树突状细胞相比, 具有很强的刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的能力, 其刺激能力随着刺激细胞与反应细胞比例 (DC/T) 的升高而增强 (图 4)。

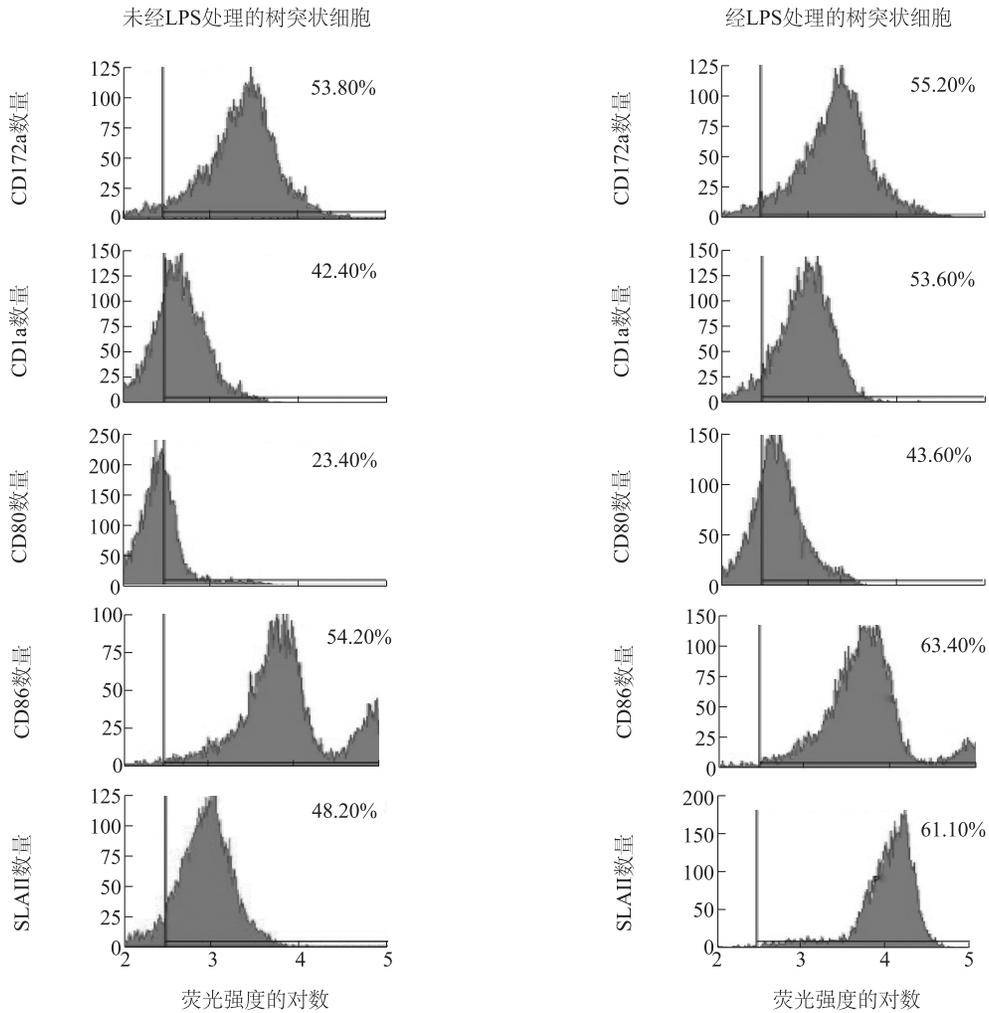


图 3 猪 MoDCs 细胞表型的流式细胞仪检测

Fig.3 Flow cytometric phenotyping of the porcine dendritic-type cell

表 2 LPS 处理前后树突状细胞对 FIFC-dextran 的吞噬能力

Table 2 Phagocytosis of DC before and after LPS stimulation

项目	未经 LPS 处理	LPS 处理
吞噬率 (%)	74.63±2.49	51.67±1.53 *

*表示 LPS 处理组与未经 LPS 处理组比较差异达 0.05 显著水平。

3 讨论

虽然 DCs 在猪体内分布广泛,但数量少且比较分散,很难直接分离得到足够数量的细胞用于研究。而骨髓和血液中都存在一定数量的 DCs 前体细胞,在体外可以经过一些细胞因子的刺激后分化产生 DCs。但骨髓前体细胞的获取比较困难,且数量较少,而外周血中含有丰富的单核细胞可以作为 DCs

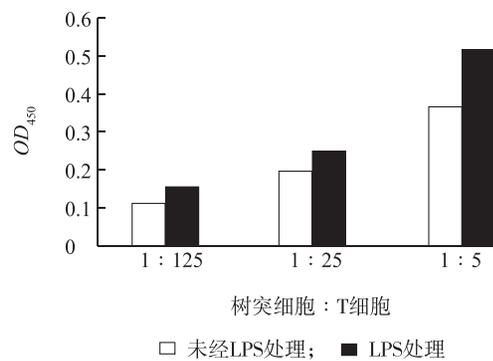


图 4 猪 MoDC 对同种异体 T 细胞的刺激增殖

Fig.4 MoDC's stimulatory capacity to allogeneic T cell before and after LPS stimulation

的前体细胞,因此从外周血中获得 DCs 逐渐成为一

种主要途径。因此,本研究采用猪外周血单核细胞作为体外诱导分化 MoDCs 的前体细胞。再结合国内外文献报道^[4-5,9-13],并经前期试验表明 GM-CSF (20 ng/ml) 和 IL-4 (20 ng/ml) 共同作用可刺激诱导分化成大量的 MoDCs,在此基础上用 LPS (100 ng/ml) 刺激 48 h,促使 MoDCs 成熟。本研究采用 GM-CSF、IL-4 双因子结合 LPS 体外诱导分离猪外周血单核细胞,建立了一套稳定的体外诱导培养猪 MoDCs 的方法。

不同发育阶段的 MoDCs,其形态、功能有很大差异,本研究结果表明未经 LPS 处理的树突状细胞表面粗糙,有大量皱褶,毛刺样突起较少,且较短小,具有较强的吞噬功能,但刺激同种异体淋巴细胞增殖能力较弱;而 LPS 刺激的 MoDCs 具有明显的树突形态学特征,体积增大,表面大量树枝样突起。

有学者认为,CD172a+CD1+CD80/CD86+MHC-II 能够代表猪的 MoDCs 表型特征^[4-5,11,13]。本研究结果亦表明不同培养阶段猪 MoDCs 均表达 CD172a、CD1、CD80、CD86 和 MHC-II,能够代表猪的 MoDCs 表型特征。未经 LPS 处理的 MoDCs 表面各表型分子表达率均低于 LPS 处理的 MoDCs,说明 LPS 可以刺激 MoDCs 成熟,且 MoDCs 表面分子的表达率随其刺激成熟而有所升高。

在本研究中我们还发现在培养树突状细胞第 5 d 时添加 LPS 持续刺激至第 7 d,其吞噬功能与未经 LPS 处理的树突状细胞相比有所降低,但其刺激淋巴细胞增殖的能力增强,表明树突状细胞随着培养日龄的延长逐渐分化为成熟的树突状细胞,这与国内外文献^[5,12-14]研究结果一致。本研究选用了一种新型的检测方法 CCK-8 (cell counting kit-8) 检测 MoDCs 刺激淋巴细胞增殖,该方法不需要裂解细胞,可直接进行比色,灵敏度高,数据可靠,重现性好,操作简便,省时省力且对细胞毒性较低。

体外诱导培养猪 MoDCs 模型的成功建立,有助于进一步了解 DCs 在免疫调节和微生物感染中发挥的作用,为深入研究 DCs 在机体抗感染免疫中发挥的重要作用打下基础。

参考文献:

- [1] 金伯泉, 细胞和免疫分子学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003:506.
- [2] BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, et al. Immunobiology of dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2000,18: 767-811.
- [3] 冯钟煦. 树突状细胞的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(20): 3347-3350.
- [4] JOHANSSON E, DOMEIKA K, BERG M, et al. Characterisation of porcine monocyte-derived dendritic cells according to their cytokine profile [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2003, 91:183-197.
- [5] CARRASCO C P, RIGDEN R C, SCHAFFNER R, et al. Porcine dendritic cells generated *in vitro*: morphological, phenotypic and functional properties[J]. Immunology, 2001, 104(2): 175-184.
- [6] 陶忠芬, 可金星, 黄文琪, 等. 树突状细胞的培养与扫描电镜样品制备[J]. 电子显微镜学报, 2005, 24(4): 439-439.
- [7] LI D Y, GU C, MIN J, et al. Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cell[J]. Experimental and Therapeutic medicine, 2012, 4: 131-134.
- [8] 王婧娉, 李璐, 曾麒燕, 等. 红桂木凝集素对树突状细胞生长的影响[J]. 广西医学, 2012, 34(6): 670-672.
- [9] FACCI M R, AURAY G, BUCHANAN R, et al. A comparison between isolated blood dendritic cells and monocytederived dendritic cells in pigs[J]. Immunology, 2003, 129: 396-405.
- [10] FACCI M R, AURAY G, MEURENS F, et al. Stability of expression of reference genes in porcine peripheral blood mononuclear and dendritic cells[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011, 141(1-2): 11-15.
- [11] LIN C M, JENG C R, HSIAO S H, et al. Monocyte-derived dendritic cells enhance cell proliferation and porcine circovirus type 2 replication in concanavalin A-stimulated swine peripheral blood lymphocytes *in vitro* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2012, 145(1-2): 368-378.
- [12] 聂晓华, 遇奇, 李建东, 等. 猪血源树突状细胞诱导培养与鉴定[J]. 中国农学通报, 2011, 27(1): 407-411.
- [13] 沈海燕, 赵明秋, 琚春梅, 等. 猪树突状细胞的体外培养及其主要免疫生物学特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(5): 388-393.
- [14] 周谦君, 范慧敏, 刘中民, 等. IL-4, GM-CSF 体外诱导猪单核来源树突状细胞和功能鉴定[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(3): 174-179.

(责任编辑: 孙 宁)