

低温对小鼠骨髓源树突状细胞生物特性的影响

邓汝淇, 胡何节, 方征东, 王晓天, 孙小杰, 葛新宝

摘要 取 C57BL/6 小鼠骨髓细胞, 在不同时期进行低温冻存的条件下对其进行诱导和培养, 获得树突状细胞(DCs)。经过冻存的 DCs 复苏后存活率差异无统计学意义; 各组 DCs 均高表达 CD11c, 低表达 CD80、CD86 及主要组织相容性复合体-II(MHC-II)分子; 混合淋巴细胞反应及培养上清液中白介素-10(IL-10)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)水平的差异无统计学意义。表明在不同时期进行低温冻存的 DCs 仍能保持稳定的生物特性。

关键词 低温保存; 树突状细胞; 细胞培养

中图分类号 R 654.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)09-1368-04

自 1973 年首次报道树突状细胞(dendritic cells, DCs)以来, 对其进行了深入研究, 是目前已知的体内功能最强大的专职抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC), 是免疫系统的重要组成部分^[1]。DCs 经常被选择用于研究疾病的进展机制、癌症以及自身免疫性疾病等。目前认为下肢动脉硬化性闭塞症(atherosclerosis occlusion, ASO)是一种慢性炎症的病理过程^[2]。研究^[3]表明, 血管树突状细胞(vascular dendritic cell, VDC)可能参与了 ASO 的炎症性免疫反应。外周血中 DCs 较少, 而利用 DCs 进行免疫治疗的研究中需要大量 DCs, 为获得

生物特性良好的 DCs, 对小鼠骨髓源 DCs 低温保存的研究具有重要意义, 为进一步研究 ASO 的细胞免疫治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周龄 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠和 BALB/c 小鼠, 约 20 g, 购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 全培养液、南美胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Hyclone 公司; 重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant murine granulocyte macrophage colony stimulating factor, rmGM-CSF)、重组小鼠白介素-4(rmIL-4)购自美国 Peprotech 公司; 流式荧光抗体 FITC anti-mouse CD11c、PerCP-CyTM5.5 anti-mouse CD80、APC anti-mouse CD86、PE anti-mouse MHC-II 及其同型对照抗体购自美国 BD 公司; Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自日本同仁化学研究所; 小鼠白介素-10(interleukin-10)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.3 主要仪器 恒温细胞培养箱购自美国 SHEL LAB 公司; 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司; -80℃超低温冰箱购自美国 Advantage 公司; 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 酶标仪购自美国 BioTek 公司。

1.4 小鼠骨髓源 DCs 的培养与分组 颈椎脱臼法处死 C57BL/6 小鼠, 75% 酒精浸泡至少 10 min, 再无菌剥除小鼠股骨、胫骨上肌肉组织, PBS 反复洗涤

2016-04-19 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1408085MH177)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普通外科, 合肥 230001

作者简介: 邓汝淇, 男, 硕士研究生;

胡何节, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huhejie@hotmail.com

plants with peri-implantitis were randomly divided into control group, traditional group, β -TCP group, BIO-GENE group, Bio-Oss group and non scraping group, then to be reconstructed bone. 3 months after surgery, the differences of osteogenesis were compared by direct measurement, X-ray examination, and Micro-CT scan. The results showed that the bone reconstruction effect was Bio-Oss group > BIO-GENE group > β -TCP group (traditional group) > control group (non scraping group) ($P < 0.05$). Among them, there was no statistical difference between β -TCP group and traditional group ($P > 0.05$), and the same between non scraping group and control group ($P > 0.05$). The comparative study finds "flap curettage + Bio-Oss + collagen membrane" can be used for bone reconstruction of peri-implantitis.

Key words peri-implantitis; bone defect; bone reconstruction; bone regeneration

后,剪去骨干两端,RPMI 1640 全培养液冲洗骨髓腔直至冲洗液变白,过滤去除组织碎片,收集滤出液获得小鼠骨髓细胞,分成正常培养组和早期冻存后培养组,早期冻存后培养组用于冻存,正常培养组经离心机 1 200 r/min 离心 5 min 后,弃上清液,用含 12% FBS 的 RPMI 1640 全培养液制成单细胞悬液,计数后调整细胞浓度为 0.5×10^6 /ml,加入 rmGM-CSF 和 rmIL-4(其终浓度均为 20 ng/ml),置 37 ℃、5% CO₂ 恒温细胞培养箱中培养 48 h 后以 1 200 r/min 离心 5 min 去除上清液,并补充全培养液和细胞因子继续培养,隔日半量换液,第 5 天继续半量换液后从正常培养组中分出培养后冻存组,培养后冻存组经自然沉降后收集悬浮细胞用于冻存,隔日后收集细胞悬液。

1.5 细胞的冻存与复苏后培养 用于冻存的细胞离心后重悬于自制冻存液(70% RPMI 1640 全培养液,20% FBS,10% DMSO),调整细胞浓度为 5×10^9 个/L,在 -20 ℃ 下保存 1 h 后转移到 -80 ℃ 超低温冰箱,24 h 后转移到液氮罐中。4 周后复苏。早期冻存后培养组复苏后按正常培养组步骤继续培养出 DCs。培养后冻存组则用全培养液制成细胞悬液,并加入 rmGM-CSF 和 rmIL-4,培养 1 d,换液并补充细胞因子,隔日收集细胞。

1.6 观察细胞存活率 取复苏后的 DCs 悬液 0.1 ml,加入 0.8 ml PBS,再加入 0.1 ml 0.4% 台盼蓝染色液混匀(终浓度 0.04%),染色 3 min 后,倒置显微镜下观察分别计数未被染色的成活细胞和染成蓝色的死细胞,计算 DCs 存活率。细胞存活率(%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100%。

1.7 流式细胞仪检测小鼠骨髓源 DCs 分子表型 分别收集各组 DCs 悬液,调整样品细胞浓度为 1×10^6 /ml,按照流式抗体说明书进行抗体及其同型对照标记,在 4 ℃ 下避光孵育 30 min,离心、洗涤并重悬于 500 μl PBS 液中,流式细胞仪检测各组细胞表面 CD11c、CD80、CD86 及主要组织相容性复合体-II (major histocompatibility complex class II, MHC-II) 分子的表达。

1.8 CCK-8 法检测混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 无菌取 BALB/c 小鼠脾脏并剪碎,经研磨、过滤后获得细胞悬液,尼龙毛柱法获得同种异体 T 细胞(调整浓度为 2×10^6 /ml)。在 1.4 和 1.5 步骤中获得的各组 DCs 中,加入丝裂霉素 C(终浓度为 25 μg/ml),37 ℃ 下孵育 45 min, PBS 洗涤 2 遍,按 1:5、1:10、1:20、1:40

的比例分别将 DCs 和 T 细胞加入 96 孔板,每组设置 3 个复孔,同时设 DCs 细胞和 T 细胞作阴性对照,培养液作为空白对照,两者共培养 68 h 后,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,继续培养 4 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处各孔光密度(optical density, OD) 值。

1.9 ELISA 法检测培养上清液中 IL-10、TGF-β1 水平 收集上述各组 DCs 细胞上清液,按 ELISA 试剂盒说明书步骤测定培养上清液 IL-10、TGF-β1 水平。

1.10 统计学处理 每组均检测 5 个样本,各组间比较采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素分析,定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复苏后存活率 冻存 4 周后,早期冻存后培养组细胞复苏后存活率为 $(85 \pm 3.9)\%$,培养后冻存组细胞复苏后成活率为 $(83 \pm 6.1)\%$ 。两组冻存方法所得存活率差异无统计学意义($t = 0.617$, $P > 0.05$)。

2.2 DCs 表型 分别收集各组诱导出的 DCs,用流式细胞术测定其细胞表型。结果显示 3 组细胞均高表达 CD11c,低表达 CD80、CD86 及 MHC-II 分子,均表现为未成熟状态(图 1),其表达率差异无统计学意义($F = 2.754, 0.873, 1.113, 1.149$, $P > 0.05$)。

2.3 DCs 刺激增殖能力 刺激指数(stimulation index, SI) = (待测孔 OD 值 - 培养液对照组 OD 值) / (阴性对照组 OD 值 - 培养液对照组 OD 值)。结果显示同比例下早期冻存后培养组、培养后冻存组 DCs 刺激同种异基因 T 细胞增殖的能力有所下降,但与正常培养组比较差异无统计学意义,各组内不同比例间随着 DCs 浓度的下降,其增殖能力逐步下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.4 DCs 培养上清液中细胞因子水平 用 ELISA 法分别测定 3 组 DCs 培养上清液中 IL-10、TGF-β1 细胞因子水平,3 组比较差异无统计学意义($F = 1.890, 1.583$, $P > 0.05$)。见图 3。

3 讨论

DCs 是一种特殊的白细胞,能够时刻向免疫系统传达抗原、感染和炎症介质的出现,在先天性和获得性免疫中起着核心作用。成熟的树突状细胞(mature dendritic cells, mDCs)在效应 T 细胞导致的动脉粥样硬化性损伤炎症过程中扮演着关键角色,可导致斑块不稳定,严重病变处的 DCs 数量明显多

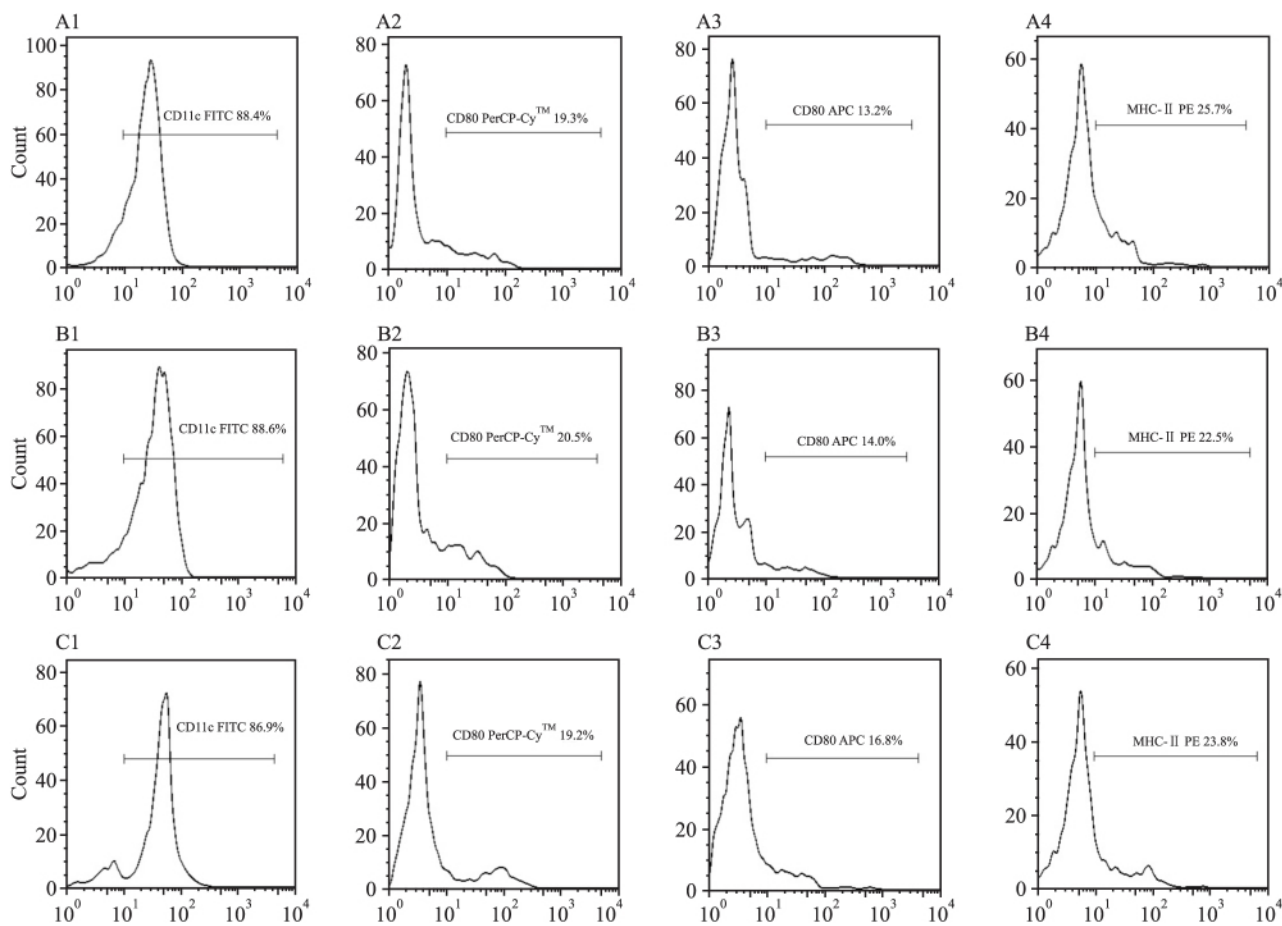


图1 流式细胞术分析DCs表面分子

A: 正常培养组; B: 早期冻存后培养组; C: 培养后冻存组; 1: CD11c; 2: CD80; 3: CD86; 4: MHC-II

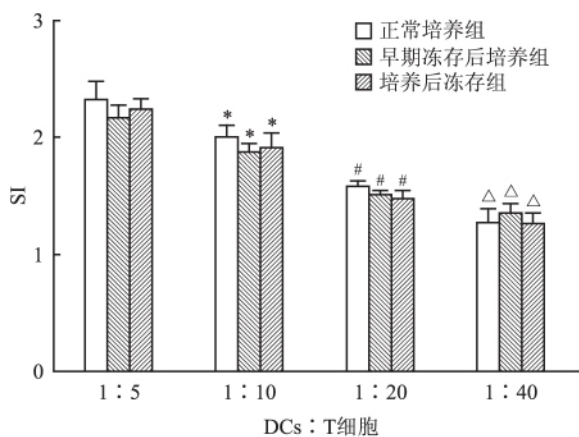


图2 DCs分别与同种异基因T细胞的MLR

与1:5比较: * $P < 0.05$; 与1:10比较: # $P < 0.05$; 与1:20比较: $\Delta P < 0.05$

于早期病变^[4]。研究^[5]显示动脉粥样硬化血管病变的加重与DCs的成熟有关,斑块内转移的mDCs数量与吸收的耐受性树突状细胞(tolerogenic dendritic cells, tolDCs)数量成负相关。mDCs与tolDCs的产生直接与病变的进程有关,因此抑制DCs的成

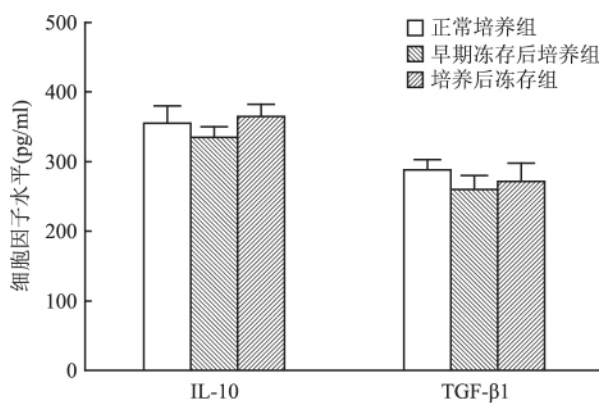


图3 DCs培养上清液中细胞因子水平

熟和增加 tolDCs 的数量可能成为治疗动脉粥样硬化的一个有效手段。

分析未成熟树突状细胞 (immature dendritic cells, imDCs) 表型中 CD80、CD86 和 MHC-II 低表达,具有 tolDCs 表型,通过分泌 IL-10、TGF-β1,诱导调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 的生成,

Tregs 则能对 DCs 的功能及成熟、活化进行调节^[6]。笔者推测对 tolDCs 进行研究及使用 tolDCs 进行细胞免疫治疗动脉粥样硬化具有可行性。进行细胞免疫治疗研究过程相对较长,需要大量生物特性相对稳定的 tolDCs。低温保存是长期保存细胞重要的手段,本实验采用 C57BL/6 小鼠骨髓培养方法可获得大量较高纯度 DCs^[7],通过两种不同的冻存方式刺激分化成 DCs,并分析其生物特性。CD11c 是 DCs 的特征性标记分子,3 组 DCs 均表现为高表达,流式细胞术进一步检测发现 3 组均低表达 CD80、CD86 和 MHC-II,表现为耐受性,各组间差异无统计学意义。MLR 实验显示两组冻存 DCs 对同种异基因 T 细胞的刺激指数较正常组降低,但差异无统计学意义,可认为经过冻存后获得的 imDCs 对 T 细胞的刺激增殖能力无明显变化。用 ELISA 法测定 3 组 DCs 培养上清液中细胞因子水平表明冻存后 DCs 对 IL-10、TGF- β 1 的分泌功能无明显变化。MLR 和 ELISA 实验表明经过低温保存的 DCs 和小鼠骨髓经低温保存后分化成的 DCs 能够诱导 Tregs 的生成,可以用于小鼠动脉粥样硬化的细胞免疫治疗。

综上所述,经过低温保存的 DCs 和小鼠骨髓经低温保存后分化成的 DCs 其生物特性与未经过低温保存的 DCs 之间差异无统计学意义,进行 DCs 的冻存后,可大量储存生物特性稳定的 DCs,避免了因不同培养批次间 DCs 生物特性之间的差异,节约了

实验资源,为后续实验提供了基础。

参考文献

- [1] 付静静,张玲玲,魏伟. 树突细胞在类风湿性关节炎病理机制中的免疫原性和耐受性双重作用[J]. 中国药理学通报, 2012, 30(9): 1185-8.
- [2] Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. *J Exp Med*, 1992, 176(6): 1693-702.
- [3] 邓琼,胡何节,方征东,等. 免疫原性和耐受性树突状细胞在粥样硬化动脉壁内的分布及意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(6): 567-73.
- [4] Ketelhuth D F, Hansson G K. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(5): 779-86.
- [5] Fang Z, Deng Q, Hu H, et al. Characteristics of immunogenic and tolerogenic dendritic cells within the arterial wall in atherosclerosis and *in vitro*[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(12): 4846-56.
- [6] Liu Z D, Wang L, Lu F H, et al. Increased Th17 cell frequency concomitant with decreased Foxp3+ Treg cell frequency in the peripheral circulation of patients with carotid artery plaques[J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(10): 1155-65.
- [7] 刘振明,胡何节,方征东,等. 小鼠骨髓源性树突状细胞体外诱导培养体系的构建[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(8): 1177-80.

Influence of cryopreservation on biological characteristics of mouse bone marrow-derived dendritic cells

Deng Ruqi, Hu Hejie, Fang Zhengdong, et al

(Dept of General Surgery Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract The C57BL/6 mice bone marrow cells were induced and cultivated and cryostored at different stages to obtain dendritic cells(DCs) for two groups respectively. The DCs without cryopreservation was control group. We found that no statistical significance of survival rate in anabiotic DCs was between the two groups. There were a higher expression of CD11c and lower expression of CD80, CD86 and major histocompatibility complex class-II (MHC-II) in three group cells. The mixed lymphocyte reaction and the levels of interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) were not statistically significant. We concluded that biological characteristics can be conserved stability in DCs with cryopreservation at different stages.

Key words cryopreservation; dendritic cells; cell culture