

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.20.001

· 基础研究 ·

人树突状细胞的大量培养及鉴定 *

彭 霞 李延宁 蔺丽慧 赵金艳 高燕婷 戈伊芹 黄雨霖 李 莉[△]

(上海交通大学医学院附属第一人民医院检验科 上海 200080)

摘要 目的:探讨人树突状细胞体外大量培养及鉴定方法。**方法:**采用免疫磁珠法分离纯化 CD34⁺ 干细胞;采用含有 TPO、SCF、Flt3L 和 IL-3 的扩增培养基培养 1 周,以及含有 SCF、Flt3L、GM-CSF 和 IL-4 的分化培养基培养 2-3 周,获得 CD34⁺ 细胞来源树突状细胞。采用普通光学显微镜观察细胞形态,牛鲍氏血细胞计数板进行细胞计数,荧光抗体标记、流式细胞仪检测细胞纯度和细胞表面共刺激分子的表达情况。**结果:**以含有 TPO、SCF、Flt3L 和 IL-3 的培养基扩展培养一周,及含有 SCF、Flt3L、GM-CSF 和 IL-4 的培养基诱导分化 3 周,可获得大量悬浮细胞;细胞数目扩增倍数约达 50 倍;普通光学显微镜下可见悬浮细胞有明显的树突状凸起;流式细胞术检测结果显示悬浮细胞中 CD141 和 CD11c 双阳性细胞(等同于单核细胞来源树突状细胞)比例达 30%,此群细胞高表达 HLA-DR 和 CD209,低表达共刺激分子 CD80 和 CD86;细胞寿命较短,40 天时培养体系中悬浮细胞和 CD34⁺ 细胞来源树突状细胞数目急剧减少。**结论:**采用多细胞因子联合刺激可获得大量的树突状细胞,为树突状细胞的特性及功能学研究奠定了基础。

关键词:树突状细胞;干细胞;CD209

中图分类号:R-332;R331.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)20-3801-05

Culture and Identification of Human CD34⁺ Stem Cell Derived Dendritic Cells*

PENG Xia, LI Yan-ning, LIN Li-hui, ZHAO Jin-yan, GAO Yan-ting, GE Yi-qin, HUANG Yu-ji, LI Li[△]

(Department of Laboratory Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To explore a method to obtain mass human dendritic cells *in vitro*, and suitable method to identify them. **Methods:** CD34⁺ stem cells were isolated and purified from stem cell collection using immunomagnetic bead method, which was then cultured in the expansion medium containing TPO, SCF, Flt3L and IL-3, for one week, and differentiation medium containing SCF, Flt3L, GM-CSF and IL-4 for two to three weeks, CD34⁺ stem cells were induced to CD34⁺ derived dendritic cells *in vitro*. The morphology of these cells was observed using optical microscopy, and the cell numbers were counted using NiuBao's blood count plate. After multi-color immunofluorescence labeling, purity of dendritic cell and expression of costimulatory molecules on cell membrane were detected by flow cytometry. **Results:** When cultured in the expansion medium containing TPO, SCF, Flt3L and IL-3 for one week, and differentiation medium containing SCF, Flt3L, GM-CSF and IL-4 for three weeks, a large number of suspension cells were obtained. The numbers of cell increased about by 50 times compared with the initial number. The dendritic bumps were observed obviously on cells under optical microscope. Among them, the proportion of CD141 and CD11c double-positive cells, which are similar to monocyte derived dendritic cells, is more than 30% of total cells by flow cytometry. These cells highly express HLA-DR and CD209, and express low levels of co-stimulatory molecules CD80 and CD86. The cell life span of cultured dendritic cells is short. The cell number of suspension cells and dendritic cells (CD141⁺ CD11c⁺ cells) decreases sharply by 40 days. **Conclusions:** A large number of dendritic cells could be obtained by stimulating CD34⁺ stem cells separated from stem cell collection by expansion and differentiation medium with multiple cytokines, which may provide foundation for the characteristics and functional study of dendritic cells.

Key words: Dendritic cell; Stem cell; CD209

Chinese Library Classification (CLC): R-332; R331.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)20-3801-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81971513,81871267);上海市青年扬帆计划项目(16YF1409200);

上海市科委科技创新行动计划项目(19441904300)

作者简介:彭霞(1988-),博士,副主任技师,主要研究方向:过敏性疾病特异性免疫治疗,电话:021-63240090,E-mail: pengxiao@163.com

△ 通讯作者:李莉,博士生导师,主任医师,主要研究方向:肥大细胞与疾病,电话:021-63240090,E-mail: annyli@126.com

(收稿日期:2021-12-30 接受日期:2022-01-27)

前言

树突状细胞(Dendritic Cell, DC)起源于骨髓造血祖细胞或单核细胞,尽管含量少,却广泛分布于机体的所有组织和器官,特别是淋巴器官以及环境接触面,如肠道和皮肤。DC是目前公认的体内功能最强大的专职性抗原提呈细胞,能够捕获和加工处理抗原,并将其呈递给T淋巴细胞,同时提供共刺激信号和细胞因子,诱导免疫应答^[1]。因此,DC是固有和适应性免疫反应的桥梁细胞^[2]。

由于DC在免疫应答和免疫调节中的重要作用,近年来DC成为疾病免疫机制或免疫治疗研究的热点,如感染、肿瘤、自身免疫病、过敏性疾病等^[3-6]。但DC种类多、数量少、寿命短,获得大量表型稳定的DC是其相关疾病和治疗研究的关键。目前常用的体外DC诱导培养方法主要通过诱导单核细胞或脐带血CD34⁺造血干细胞获得^[7-8]。然而单核细胞通常需要从大量的外周血中获得,而大量外周血和脐血标本的来源珍贵,不易广泛开展研究。

本研究将利用已经完成临床检测的健康干细胞供者的干细胞采集物作为标本来源,分离CD34⁺干细胞,建立树突状细胞的体外大量培养方法,为树突状细胞的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 干细胞采集物 干细胞采集物(0.5-1 mL)来自于上海市第一人民医院检验科检测完毕废弃的标本。已获得上海市第一人民医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 牛血清白蛋白(BSA)购自美国Sigma公司;胎牛血清、RPMI1640培养基、丙酮酸钠、青链霉素和L-谷氨酰胺购自美国Gibco公司;Stem span无血清培养基购自stem cell公司;人酪氨酸激酶受体3配体(Flt3L)、人血小板生成素(TPO)、重组人干细胞生长因子(rhSCF)、重组人白细胞介素3(rhIL-3)、重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和重组人白细胞介素4(rhIL-4)购自美国PeproTech公司;小鼠抗人FITC-HLA-DR、PE-CD86、KO-CD45、FITC-CD80和PE-CD34购自Beckman Coulter公司,小鼠抗人PerCP/Cyanine5.5-CD141、APC-CD11c和PE/Cyanine7-CD209购自Biologen公司。CD34 MicroBead Kit和MACS MultiStand/MACS分选架购自Miltenyi Biotec公司。

1.2 方法

1.2.1 CD34⁺干细胞的分离和鉴定 收集临床供干细胞者造血干细胞采集物新鲜标本,用荧光抗体标记、流式细胞术检测CD34⁺细胞和有核细胞数。根据细胞计数,添加抗体。每10⁸细胞添加100 μL FcR封闭试剂、100 μL CD34⁺磁珠,搅拌均匀。4℃孵育30 min。加入清洗缓冲液,300×g离心10 min。弃去上清,加入每10⁸个细胞加入500 μL缓冲液。采用MACS磁式细胞分选器,经磁性细胞分离柱分选,收集CD34⁺细胞,荧光抗体标记、流式细胞术检测CD34⁺干细胞浓度和纯度。

1.2.2 DC的体外诱导培养 将CD34⁺细胞以扩增培养基(StemSpan无血清培养基,10%FBS,100 ng/mL FLT3-L,100 ng/mL SCF,20 ng/mL IL-3和50 ng/mL TPO)培养,第7天更换

培养基,将细胞置于分化培养基(RPMI 1640培养基,10%FCS,1 mM丙酮酸钠,青链霉素,2 mM L-谷氨酰胺,100 ng/mL FLT3-L,20 ng/mL SCF,2.5 ng/mL IL-4,2.5 ng/mL GM-CSF)中培养,每5天换液一次^[9]。

1.2.3 形态学观察和计数 培养过程中采用倒置显微镜观察细胞生长情况、形态变化,并拍照记录。并采用牛鲍氏血细胞计数板进行细胞计数。

1.2.4 流式鉴定 收集DC,用含有1%BSA的PBS溶液洗涤,调整细胞浓度为1×10⁶/mL,每管加入100 μL细胞悬液,分别采用FITC-HLA-DR、PE-CD34、PE-CD86、PerCP/Cyanine5.5-CD141、APC-CD11c、PE/Cyanine7-CD209、KO-CD45和FITC-CD80标记,4℃避光孵育30 min。3 mL 1%BSA-PBS洗涤2次,加入0.5 mL 1%BSA-PBS重悬,流式细胞仪检测,Kaluza Analysis软件分析。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0对所得数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 细胞数目和形态变化

1 mL干细胞采集物可获得1-2×10⁶ CD34⁺干细胞,纯度约90.2±5.45%。扩增培养一周,细胞数目可增加43.9±12.1倍。

倒置显微镜下,可见第3-4天开始形成细胞集落。第10天开始集落逐渐减少,悬浮细胞增多;部分细胞贴壁生长,呈梭形,可能为巨噬细胞(图1)。随着DC细胞成熟,可见悬浮细胞表面出现毛刺状凸起。

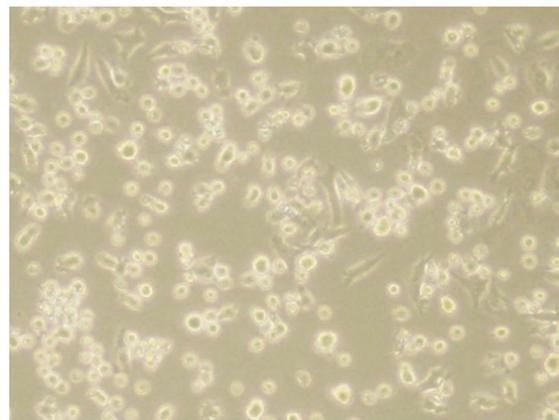
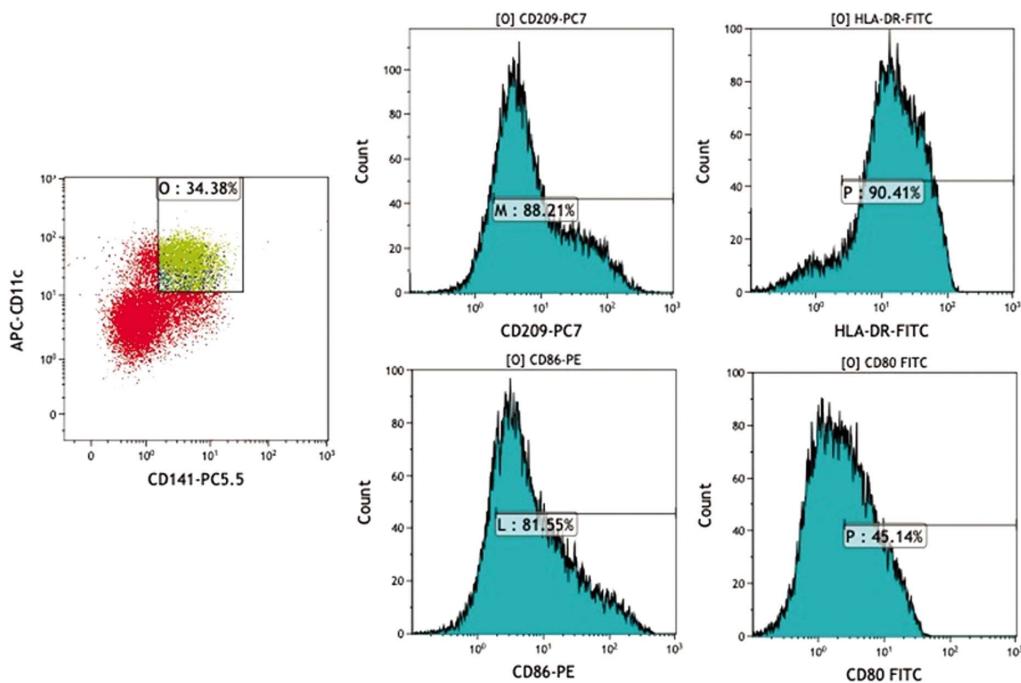


图1 普通光学显微镜下第11天CD34⁺细胞来源树突状细胞的形态
(200×)

Fig. 1 Morphology of dendritic cells derived from CD34⁺ cells on day 11 under light microscope (200×)

2.2 细胞免疫表型鉴定

收集培养第27天的细胞,流式细胞术检测DC纯度和共刺激分子表达情况。根据细胞表面标记分子CD141和CD11c的表达情况,细胞主要分成2群,一群为CD141^{low}/CD11c^{low}群;另一群为CD141^{high}/CD11c^{high},这部分细胞与单核细胞来源的树突状细胞性状相似,约占细胞总数的30%。进一步分析CD141^{high}/CD11c^{high}细胞群表面分子表达情况,可见其表达CD209和HLA-DR,低表达CD80和CD86(如表1和图2)。

图 2 流式细胞术检测 CD141⁺CD11c^{high} 细胞群表面分子表达情况Fig. 2 Expression of molecules on the surface of CD141⁺CD11c⁺ cell population using flow cytometry表 1 CD34⁺DC 中 CD141⁺CD11c^{high} 细胞表面分子水平(n=3)Table 1 The level of surface molecules of CD141⁺CD11c^{high} cells in CD34⁺DC(n=3)

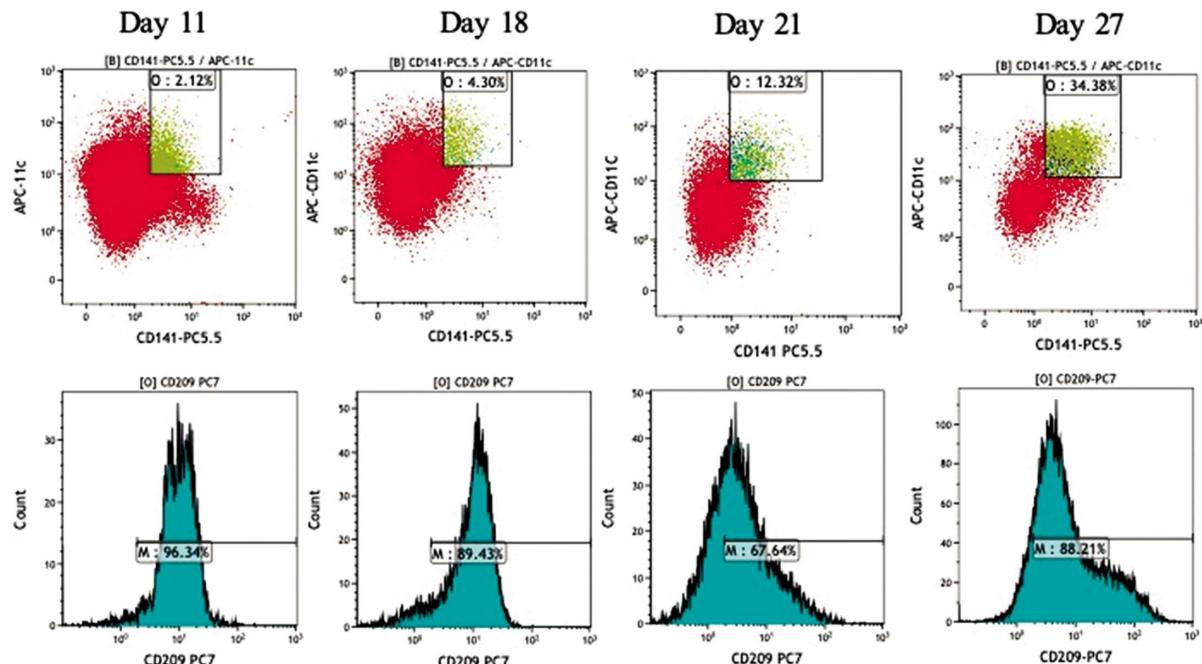
	CD80	CD86	CD209	HLA-DR
% positive cell	31.42±15.14	87.05±2.74	84.44±5.6	85.87±12.15
MFI	4.59±2.34	22.7±10.83	21.71±9.61	25.63±15.64

2.3 树突状细胞数目变化

分析了不同时间 CD141⁺CD11c^{high} 细胞群数目的变化, 随

着培养时间延长, CD141⁺CD11c^{high} 细胞比例增加; 到第 27 天

时, 比例最高; 随后比例出现下降, 到 day40, 2.3%。

图 3 不同时间点 CD141⁺CD11c^{high} 细胞群比例变化Fig. 3 Changes in the proportion of CD141⁺CD11c^{high} cell populations at different time points

3 讨论

树突状细胞是连接固有免疫和适应性免疫的重要细胞。未成熟的树突状细胞可接受外界刺激被激活,从而发挥重要的免疫调控作用。不仅如此,未成熟 DC 还可通过负载抗原制备成 DC 疫苗,用于肿瘤、自身免疫病等疾病的治疗^[10-12]。目前 DC 常见培养方法是通过诱导外周血中分离纯化的单核细胞形成^[13,14]。然而,单核细胞在诱导分化过程中不扩增,导致 DC 得率低、数目少,严重阻碍了 DC 相关免疫机制和疫苗研究的进展。

研究已经证实,新鲜 CD34⁺ 造血干细胞可分化为 DC^[15]。本研究从临床废弃的干细胞采集标本着手,分离纯化 CD34⁺ 造血干细胞,建立大量未成熟 DC 的培养方法,以满足 DC 相关的基础与临床研究。根据文献报道,研究者主要采用多种细胞因子联合刺激 CD34⁺ 干细胞扩增并分化为 DC。但不同研究使用的细胞因子种类尚不统一,扩增效果叙述也不明确。总结下来,CD34⁺ 干细胞诱导 DC 的培养体系主要分为一步培养法和两步培养法。一步法采用 Flt3L、SCF、GM-CSF、IL-4、肿瘤坏死因子(TNF)等直接诱导干细胞形成 DC。但该方法诱导培养的 DC 存在较大异质性,不能满足临床需求^[16,17]。而在两步法中,CD34⁺ 干细胞通过 SCF、TPO、Flt3L、IL-3、IL-6 和 GM-CSF 等细胞因子的联合作用扩增培养,获得大量的 DC 前体细胞;后者在 GM-CSF、IL-4、Flt3L、SCF 和 TNF-α 等细胞因子的诱导作用下分化成 DC^[18]。

不仅如此,DCs 细胞在定位、表型和免疫功能上存在高度异质性^[19]。按其来源和分化途径不同,可分为浆细胞样 DC (plasmacytoid DC, pDC)、髓样 / 常规 DC (myeloid/conventional DC, cDC)1 和 cDC2^[20]。按照发育阶段,又可分为前体细胞、未成熟 DC (immature DC, imDC)、迁移期 DC 和成熟 DC (mature DC, mDC)。如此,导致 DC 扩增分化培养方法的更是千差万别。在本研究中我们主要聚焦未成熟髓样 DC 的诱导培养。

大量的研究已经证实 SCF 和 Flt3L 有助于维持造血干细胞的干性并刺激造血干细胞的扩增^[15]。TPO 也是体外扩增造血干 / 祖细胞最有效的细胞因子之一^[21]。研究者采用 Flt3L、SCF 和 TPO 联合刺激造血干细胞,DC 前体细胞扩增达 453 倍^[22]。据报道,在含有 IL-3 和 IL-6 的培养基中,DC 前体细胞的增长速度快,经培养获得大量 CD1a⁺CD11c⁺CD40⁺HLA-DR⁺CD14CD123⁻ 髓样 DC^[23]。此外,GM-CSF/IL-4 无法直接诱导 CD34⁺ 形成 imDC,但是诱导 DC 前体细胞形成 imDC 最重要的细胞因子组合^[24]。

为了获得髓样 DC,结合前期文献报道,本研究利用 SCF、Flt-3L、TPO 和 IL-3 扩展培养 CD34⁺ 干细胞一周获得 DC 前体细胞;再利用 GM-CSF、IL-4、Flt-3L 和 SCF 培养 2-3 周,诱导 DC 前体细胞分化形成 DC。本研究成功地获得了大量的 imDC,细胞扩增量达到 50 倍左右。光镜下可见细胞出现毛刺状凸起,显示出 imDC 的形态特征。imDC 表面缺乏较特异的标记分子,本研究通过多色标记、流式细胞术检测尽可能准确地鉴定 imDC。培养 27 天时,我们以 CD141 和 CD11c 射门,圈定 CD141⁺CD11c⁺ 群细胞,约占细胞总数的 34%,此群细胞被认为与 MoDC 特征类似^[9]。进一步地,我们通过分析细胞表面的 CD209 和 HLA-DR 表达水平对 DC 进行鉴定。CD209(也称为

DC-SIGN),是一种 II 型跨膜蛋白,属于 C- 型外源性凝集素家族成员,是 DC 表面较为特异的识别受体与粘附受体^[25]。在 Lin-(CD3、CD14、CD19 和 CD56)HLA-DR⁺ 树突状细胞中,只有单核细胞来源的 DC (MoDC) CD209 阳性,使 CD209 成为 MoDC 的良好生物标志物^[26]。HLA-DR 是 MHC-II 类分子,在抗原递呈细胞表面呈现高表达。结果显示,CD141⁺CD11c⁺ 细胞群 CD209 和 HLA-DR 均呈阳性(阳性率分别为 88.21% 和 90.41%),而其他细胞群体不表达 CD209;这一结果进一步证实了本研究成功地诱导了 imDC,特征类似于 MoDC。此外,还分析了 imDC 表面共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达情况,发现两者呈弱表达。为了提高 CD141⁺CD11c⁺DC 的纯度,本研究采用人 CD209 (DC-SIGN) 分选试剂盒对细胞进行分选(结果未显示),获得的 CD209⁺ 细胞即为 CD141⁺CD11c⁺DC, 纯度达 95% 以上,可满足不同实验对 DC 纯度的需求。

有研究表明,在脐带血 CD34⁺ 干细胞的诱导过程中,当干细胞与基质细胞和 Flt3-L、SCF 和 GM-CSF 共培养时,细胞可能朝单核细胞、粒细胞、B 细胞、pDC、CD1c⁺ 和 CD141⁺ cDC 细胞诱导^[27]。在实验过程中也发现随着培养时间延长,细胞在 CD45 和 SS 的散点图中,SS 变大,CD45 变强,与巨噬细胞所处的位置较为接近。对于其免疫表型,有待进一步检测细胞表面分子进行确定。

DC 具有寿命短的特点,这也是 DC 研究的难点之一^[28]。本研究连续监测了所诱导的 imDC 的比例变化情况。结果显示,随着培养时间延长,DC 细胞的比例逐渐增加,大概 27 天左右达到高峰。随后 DC 细胞比例下降,到第 40 天,其比例降为 3% 以下。因此,若以该方法诱导的 DC 进行实验,应尽量在培养的第 21 天到 35 天左右使用,此时间段的 DC 状态最佳。

综上,本研究成功地建立了人 DC 的培养方法,可获得大量 imDC,方法简便可靠,为 DC 相关的研究奠定了坚实的基础。

参考文献(References)

- Hilligan KL, Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4⁺ T helper cell responses[J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(6): 587-599
- Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2019, 348: 1-68
- Bieber K, Autenrieth SE. Dendritic cell development in infection[J]. Mol Immunol, 2020, 121: 111-117
- Gerhard GM, Bill R, Messemaier M, et al. Tumor-infiltrating dendritic cell states are conserved across solid human cancers[J]. J Exp Med, 2021, 218(1): e20200264
- Sozzani S, Del Prete A, Bosisio D. Dendritic cell recruitment and activation in autoimmunity[J]. J Autoimmun, 2017, 85: 126-140
- Chow TG, Gill MA. Regulation of allergic inflammation by dendritic cells[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2020, 20(1): 56-63
- Mohammadi A, Mehrzad J, Mahmoudi M, et al. Effect of culture and maturation on human monocyte-derived dendritic cell surface markers, necrosis and antigen binding[J]. Biotech Histochem, 2015, 90(6): 445-452
- Fadilah SA, Vuckovic S, Khalil D, et al. Cord blood CD34⁺ cells cultured with FLT3L, stem cell factor, interleukin-6, and IL-3 produce CD11c⁺CD1a⁺/c- myeloid dendritic cells[J]. Stem Cells Dev, 2007, 16

- (5): 849-55
- [9] Segura E, Onai N. Dendritic Cell Protocols [M]. Third Edition. Human Press, 2016
- [10] Perez CR, De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5408
- [11] Cifuentes-Rius A, Desai A, Yuen D, et al. Inducing immune tolerance with dendritic cell-targeting nanomedicines[J]. Nat Nanotechnol, 2021, 16(1): 37-46
- [12] Liu X, Wang Y, Chen D, et al. Dust-mite-derived protein disulfide isomerase suppresses airway allergy by inducing tolerogenic dendritic cells[J]. J Biol Chem, 2021, 296: 100585
- [13] Chow KV, Sutherland RM, Zhan Y, et al. Heterogeneity, functional specialization and differentiation of monocyte-derived dendritic cells [J]. Immunol Cell Biol, 2017, 95(3): 244-251
- [14] Kim SJ, Kim G, Kim N, et al. Human CD141⁺ dendritic cells generated from adult peripheral blood monocytes [J]. Cytotherapy, 2019, 21(10): 1049-1063
- [15] Hsu SC, Lu LC, Chan KY, et al. Large-scale production and directed induction of functional dendritic cells ex vivo from serum-free expanded human hematopoietic stem cells [J]. Cytotherapy, 2019, 21(7): 755-768
- [16] Encabo A, Solves P, Mateu E, et al. Selective Generation of Different Dendritic Cell Precursors from CD34⁺ Cells by Interleukin-6 and Interleukin-3[J]. Stem Cells, 2004, 22(5): 725-740
- [17] Balan S, Kale VP, Limaye LS. A simple two-step culture system for the large-scale generation of mature and functional dendritic cells from umbilical cord blood CD34⁺ cells[J]. Transfusion, 2009, 49(10): 2109-2121
- [18] Bedke N, Swindle EJ, Molnar C, et al. A method for the generation of large numbers of dendritic cells from CD34⁺ hematopoietic stem cells from cord blood[J]. J Immunol Methods, 2020, 477: 112703
- [19] Segura E. Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1423: 3-15
- [20] Macri C, Pang ES, Patton T, et al. Dendritic cell subsets [J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 84: 11-21
- [21] van der Garde M, Brand A, Slot MC, et al. No Synergistic Effect of Cotransplantation of MSC and Ex Vivo TPO-Expanded CD34 (+) Cord Blood Cells on Platelet Recovery and Bone Marrow Engraftment in NOD SCID Mice[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(12): 1448-1456
- [22] Bontkes HJ, De Gruijl TD, Schuurhuis GJ, et al. Expansion of dendritic cell precursors from human CD34⁺ progenitor cells isolated from healthy donor blood; growth factor combination determines proliferation rate and functional outcome [J]. J Leukoc Biol, 2002, 72(2): 321-329
- [23] Baharom F, Rankin G, Blomberg A, et al. Human lung mononuclear phagocytes in health and disease[J]. Front Immunol, 2017, 8: 499
- [24] Harada Y, Okada-Nakanishi Y, Ueda Y, et al. Cytokine-based high log-scale expansion of functional human dendritic cells from cord-blood CD34-positive cells[J]. Sci Rep, 2011, 1: 174
- [25] Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men[J]. Trends Immunol, 2013, 34(10): 482-486
- [26] Ni X, Austin M, Langridge T, et al. CD209⁺ monocyte-derived myeloid dendritic cells were increased in patients with leukemic cutaneous T-cell lymphoma undergoing extracorporeal photopheresis via the CELLEXTM system [J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2020, 36(4): 290-298
- [27] Breton G, Lee J, Zhou YJ, et al. Circulating precursors of human CD1c⁺ and CD141⁺ dendritic cells[J]. Exp Med, 2015, 212(3): 401-413
- [28] Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update [J]. Immunology, 2018, 154(1): 3-20