

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002518

小鼠骨髓来源树突状细胞体外诱导培养及其不同生长状态差异性探索

刘 钟¹, 胡燕燕¹, 陈金波¹, 董碧麟¹, 马东霞², 段 武², 李东升¹, 陈柳青¹

(1. 武汉市第一医院皮肤科, 武汉 430022; 2. 华中科技大学同济医学院, 武汉 430022)

【摘要】目的:体外诱导扩增获取大量高纯度小鼠骨髓来源树突状细胞(dendritic cells, DC), 并研究 DC 不同生长状态、不同培养时间的生物学特性差异。**方法:**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)体外诱导小鼠骨髓细胞分化为 DC, 在培养接种后 0 h 及 1 d、4 d、7 d、9 d、11 d 用倒置光学显微镜动态观察 DC 的数量、存活率及形态学变化。分别收集 9 d 不加入重组小鼠白细胞介素-4(recombinant mouse interleukin-4, rmIL-4)及加入 rmIL-4 刺激的悬浮细胞和贴壁细胞, 流式细胞术(flow cytometry, FACS)检测悬浮细胞和贴壁细胞表面分子 CD11c、CD80、CD86、MHC-II 的表达水平。收集培养 9 d、11 d 的 DC, 利用 FACS 分析 BMDC 细胞 CD11c 表达水平。采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 两独立样本间的比较采用 *t* 检验。**结果:**培养 0 h 及 1 d、4 d、7 d、9 d、11 d 的 BMDC 成活率均为 90%~95%。培养 4 d, 大量集落细胞团形成并逐渐增多。培养 9 d, 细胞明显变大, 表面可见明显不规则树突或伪足。培养 9 d, 流式细胞术显示悬浮细胞表面标志 CD11c⁺CD80⁺、CD11c⁺CD86、CD11c⁺MHC-II 的表达比例分别为 (88.10 ± 2.41)%、(84.60 ± 3.26)%、(92.90 ± 3.93)%, 高于贴壁细胞的 (79.17 ± 2.32)%、(75.40 ± 4.41)%、(82.77 ± 4.80)%, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。加入 rmIL-4 刺激与不加入 rmIL-4 BMDC 中 CD11c⁺表达差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。培养 11 d, 悬浮细胞及贴壁细胞的 CD11c⁺表达明显高于培养 9 d 的表达 (*P* < 0.05)。**结论:**体外简易诱导培养可以获得高纯度小鼠骨髓来源的各具特性 DC; rmGM-CSF 单独或者联合 rmIL-4 诱导刺激对 DC 特异表面标志物 CD11c⁺无明显影响; 悬浮细胞的成熟度高于贴壁细胞; 延长培养时间可提高 CD11c⁺ DC 的产量及纯度。

【关键词】树突状细胞; 表型; 平均荧光强度; 生长状态; 培养时间; 活性度**【中图分类号】**R756.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-11-05

In vitro induction and amplification of marrow-derived dendritic cells in mice and exploring difference under different growth conditions

Liu Zhong¹, Hu Yanyan¹, Chen Jinbo¹, Dong Bilin¹, Ma Dongxia², Duan Wu², Li Dongsheng¹, Chen Liuqing¹

(1. Department of Dermatology, Wuhan No.1 Hospital; 2. Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology)

【Abstract】Objective: To obtain a large number of high-purity mouse marrow-derived dendritic cells(DC) through *in vitro* induction and amplification, and to explore its biological characteristics with different cultivating time and under different growth conditions.

Methods: Marrow-derived cells of mouse were induced to differentiate into DCs *in vitro* by using recombinant-murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(rmGM-CSF). The cell count, survival rate and morphology changes of DCs were observed under the light inverted Microscope at 0 h, 1 d, 4 d, 7 d, 9 d and 11 d. On day 9, suspended cells and adherent cells without stimulation of mouse interleukin-4(rmIL-4) or with stimulation of rmIL-4 were collected, respectively; expression levels of CD11c, CD80, CD86 and MHC-II on the surface of suspended cells and adherent cells by Flow Cytometry. On day 9 and 11, the DC was collected and the

expression level of CD11c of BMDC was analyzed by FACS. SPSS 17.0 software was used for statistical analysis, and *t*-test was used for comparison between two independent groups.

Results: On days 0 h, 1 d, 4 d, 7 d, 9 d and 11 d, the survival rate of BMDCs ranged from 90% to 95%. On day 4, a large number of colony cells were formed and gradually increased. On day 9, BMDCs became significantly larger and atypical

作者介绍: 刘 钟, Email: doctorliuz@126.com,

研究方向: 真菌感染性皮肤病。

通信作者: 陈柳青, Email: chlq35@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81573062); 湖北省自然科学基金资助项目(编号: 2013CFB366); 武汉市卫计委科研资助项目(编号: WX16D31、WX13A02)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200610.1612.002.html>
(2020-06-11)

protrusions and pseudopodia were able to be obviously found on the surface. On day 9, flow cytometry showed that expression ratio of cell-surface markers including CD11c⁺ CD80⁺, CD11c⁺CD86 and CD11c⁺MHC-II in suspended cell population were significantly higher than those in adherent cell population [(88.10 ± 2.41)% vs. (79.17 ± 2.32)%, (84.60 ± 3.26)% vs. (75.40 ± 4.41)%, (92.90 ± 3.93)% vs. (82.77 ± 4.80)%], with significant differences (all $P < 0.05$). The expression of CD11c⁺ in BMDCs had no significant difference in rmIL-4 groups and non-rmIL-4 groups ($P > 0.05$). After cultivating for 11 days, both the suspended CD11c⁺ cells population and adherent CD11c⁺ cells population were significantly higher than those after cultivating for 9 days ($P < 0.05$). **Conclusion:** A simple induced cultivation *in vitro* can obtain highly purified marrow-derived DC with different characteristics. There is no difference of the CD11c⁺ cells between the differentiation of DCs with rmGM-CSF alone and combination of rmGM-CSF and rmIL-4. The maturity of suspended cells population is higher than that of adherent cells population and prolonged cultivating time can increase the production and purity of CD11c⁺ DC.

[Key words] dendritic cells; phenotype; mean fluorescence intensity; growth conditions; cultivating time; activity

树突状细胞(dendritic cell, DC)被认为是最强的专职抗原提呈细胞,在固有免疫和特异性免疫反应激活机制中起关键作用^[1]。DC 功能的发挥主要依靠其活化和成熟,控制 DC 的活化成熟在很多临床疾病治疗、疫苗生产中有重大意义^[2]。然而 DC 在机体免疫耐受与免疫激活转换过程中的具体机制尚不明确^[3]。由于 DC 在外周血中的数量极少,体外分离难以得到足够多的细胞用于实验研究,如何快速方便地获得大量高纯度 DC 对实验研究具有重要意义。本实验试图采用骨髓诱导分化对小鼠骨髓树突状细胞进行诱导培养,并对其形态学、培养时间、生物学特性等进行深入分析,试图找到一种方便、高效、稳定的获得大量 DC 的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 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)、重组小鼠白细胞介素-4(recombinant mouse interleukin-4, rmIL-4)(R&D 公司); FITC 标记 CD11c、CD80 和 CD86, PE 标记 MHC-II 流式抗体(eBioscience 公司); RPMI1640 完全培养液(SIGMA 公司)、10%胎牛血清(FBS, Gibco 公司); 1%青霉素链霉素、1%2-巯基乙醇、红细胞裂解液(武汉谷歌生物科技有限公司); 胰酶(Biosharp 公司)、100 mm 细胞培养皿(Corning 公司)、锥虫蓝(上海沪宇生物科技有限公司)。

1.1.2 仪器 Thermo 恒温培养箱(HERACELL150i)、流式细胞仪(FACS, BD 公司)、Thermo 冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司)、普通光学显微镜(德国 Leica 公司)、CKX41 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司)、倒置显微镜(NIKON ECLIPSE

TE2000)。

1.1.3 实验动物 BALB/c 雄性小鼠, 7~9 周龄, 体质量 17~23 g, 购于武汉大学动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 BMDC 的诱导和培养 BALB/c 小鼠颈椎脱臼处死, 75%酒精浸泡 10 min。无菌取股骨与胫骨, 浸泡在盛有 RPMI1640 的平皿中。剪去骨两端, 用 1 mL 注射器吸取 RPMI1640 反复冲洗骨髓腔至骨变白, 骨髓细胞悬液经 200 目滤网过滤去除组织碎片。收集细胞悬液至 15 mL 离心管中, 400g 离心 5 min, 弃上清; 加入 1 mL 红细胞裂解液, 轻轻吹打均匀后室温放置 1 min 加入 10 mL PBS 终止反应, 400g 离心 5 min, 弃上清。10 mL PBS 重悬, 再次 400g 离心 5 min, 清洗 1 次, 细胞计数板计数, 用 RPMI1640 完全培养液配成 3.0×10^6 个/mL 的细胞悬液。各取 3 mL 细胞悬液加入盛有 7 mL RPMI1640 完全培养液的 100 mm 细胞培养皿中, 然后将培养皿随机分成 2 组。一组加入 rmGM-CSF 及 rmIL-4 (终质量体积浓度均为 20 ng/mL), 另一组只加入相同浓度的 rmGM-CSF, 摇匀后置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱培养。48 h 后弃去培养液, 一组中加入 10 mL 含有与原来相同浓度的 rmGM-CSF 及 rmIL-4 的 RPMI1640 完全培养液, 另一组只加入相同浓度的 rmGM-CSF。培养 7 d 时, 吸出每皿中培养液分别至 15 mL 离心管中, 400g 离心 5 min, 弃上清, 一组加入 10 mL 含有与原来相同浓度的 rmGM-CSF 及 rmIL-4 的 RPMI1640 完全培养液, 另一组只加入相同浓度的 rmGM-CSF, 继续培养。培养 7 d、11 d 时, 取一个培养皿, 吸出培养液至 15 mL 离心管, 向培养皿中加入 2 mL 胰酶 37 °C、5%CO₂ 培养箱中孵育 5 min, 7 mL RPMI1640 完全培养液终止消化, 吹打均匀后, 移至另一个 15 mL 离心管中, 即分别得到悬浮细胞和贴壁细胞。

1.2.2 BMDC 成活率检查 取培养 0 h、1 d、4 d、7 d、9 d、11 d 待测细胞悬液 BMDC 0.1 mL, 加 0.8 mL PBS 液及 1 g/L 锥虫蓝 0.1 mL, 吸取混悬液沿盖玻片边缘滴入, 保证盖玻片下充

满混悬液。低倍镜下数出四角的 4 个大格细胞数,被染成蓝色的为死细胞,未被染色的为成活细胞。成活率按细胞活度($\%$)=活细胞数/(死细胞数+活细胞数) $\times 100\%$ 计算,每组细胞重复计数 3 次。

1.2.3 BMDc 形态学的观察 分别在培养接种后 0 h、1 d、4 d、7 d、9 d、11 d 用倒置光学显微镜观察 BMDc 的形态及数量并拍照。

1.2.4 BMDc 流式鉴定 分别收集培养 9 d 不加入 rmIL-4 的 BMDc、9 d 加入 rmIL-4 的 BMDc 及培养 11 d 加入 rmIL-4 的 BMDc,将收集到的细胞取 BMDc($5\sim 7$) $\times 10^6$ 个流式管。加入 2 mL PBS 吹打均匀后,400g 离心 5 min,弃上清,加入 100 μ L 含有 CD11c、CD80、CD86、MHC-II 的 PBS,避光,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,加入 2 mL PBS 离心去上清液,加入 200 μ L PBS 重悬细胞,4 h 内 FACS 检测细胞表面分子表达情况。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行所有数据的统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间均数比较采用两独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 BMDc 活性度检查

培养 0 h、1 d、4 d、7 d、9 d、11 d 的 BMDc 成活率约为 $(92.60\pm 2.35)\%$ 。

2.2 BMDc 数量及形态

每只小鼠能分离出骨髓细胞 $(4.0\sim 7.5)\times 10^7$ 个,0 h 的活性度为 90%~95%,倒置显微镜下可见形态规则、体积较小、胞膜清晰、圆形或椭圆形细胞悬浮于培养液中(图 1)。培养 1 d,倒置显微镜下可见部分细胞聚集并开始贴壁生长。培养 4 d,贴壁细胞增多,圆形细胞表面“树突状”“伪足”开始出现,细胞成团生长,集落细胞团形成并逐渐增多(图 2)。培养 7 d,大量细胞集落形成,细胞体积较前增大,大量细胞悬浮生长,细胞表面有较多突起(图 3)。培养 9 d,细胞形态不规则,呈星形、多边形,可见明显树突或伪足(图 4)。经 9 d 培养可获得 $(8\sim 12)\times 10^6$ 个 DC,悬浮细胞少于贴壁细胞。

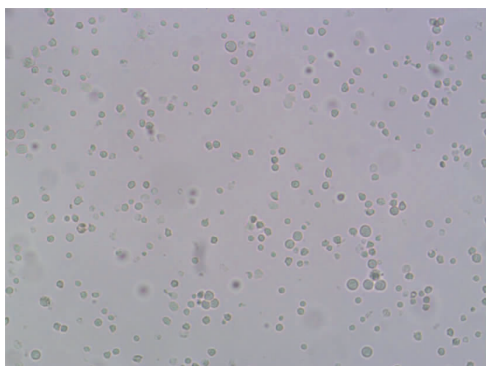


图 1 0 h 接种时 BMDc (100 $\times$)

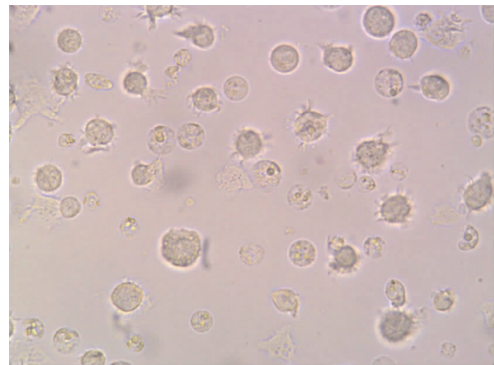


图 2 培养 4 d 的 BMDc (200 $\times$)

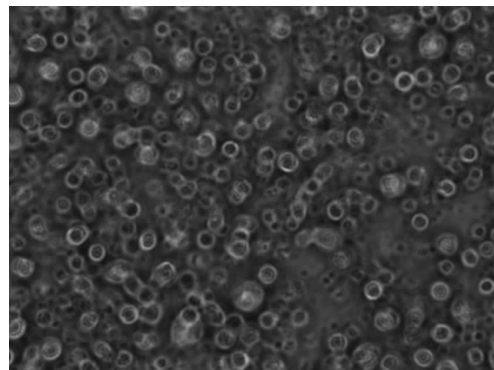


图 3 培养 7 d 的 BMDc (400 $\times$)

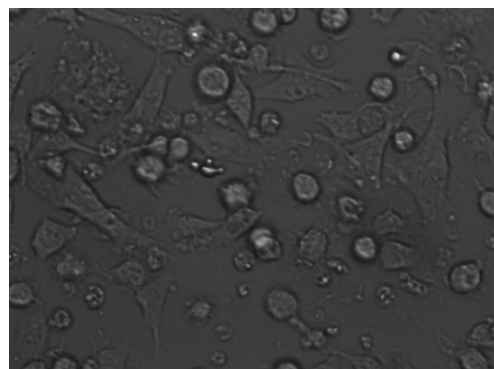
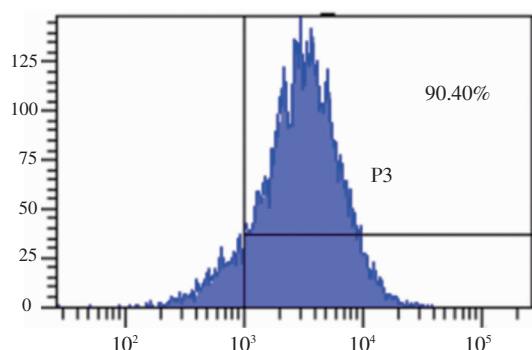


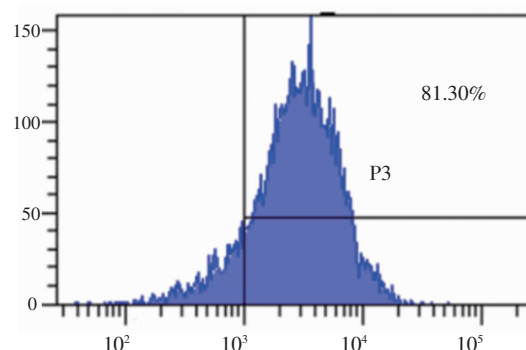
图 4 培养 9 d 的 BMDc (400 $\times$)

2.3 BMDc 表面标志物检测

培养 9 d、11 d 悬浮细胞及贴壁细胞的 CD11c、CD80、CD86 及 MHC-II 均有阳性表达。为使结果更准确,采用双标法对细胞表型进行检测,即分别检测悬浮细胞及贴壁细胞 CD11c,以及在 CD11c 阳性中 CD80、CD86、MHC-II 的阳性表达比例,每组实验重复 3 次。结果显示悬浮细胞 CD11c 阳性中 CD80、CD86、MHC-II 的表达比例及平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)均高于贴壁细胞($P<0.05$),流式细胞学分析结果如图 5 至图 7 所示,平均荧光强度如图 8 至图 10 所示,统计结果见表 1。培养 9 d 加入 rmIL-4 刺激与不加入 rmIL-4 BMDc 中 CD11c $^{+}$ 表达比例比较,差异无统计学意义($P>0.05$)(表 2)。培养 11 d 的悬浮细胞及贴壁细胞 CD11c $^{+}$ 表达比例明显高于培养 9 d 的($P<0.05$)(表 3)。

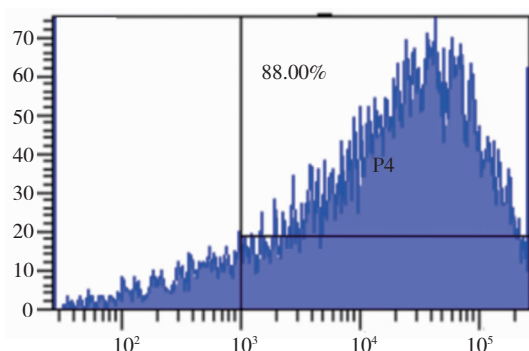


A. CD11c 阳性 BMDC 悬浮细胞中 CD80 阳性表达

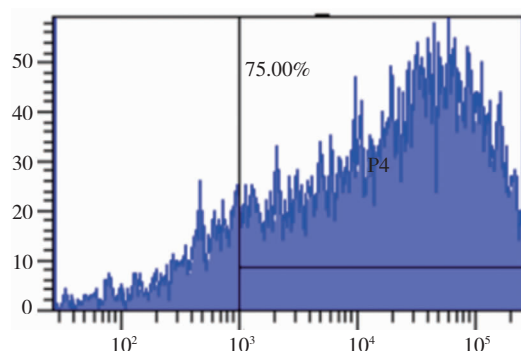


B. CD11c 阳性 BMDC 贴壁细胞中 CD80 阳性表达

图 5 悬浮细胞与贴壁细胞 CD11c、CD80 双阳性流式细胞学分析

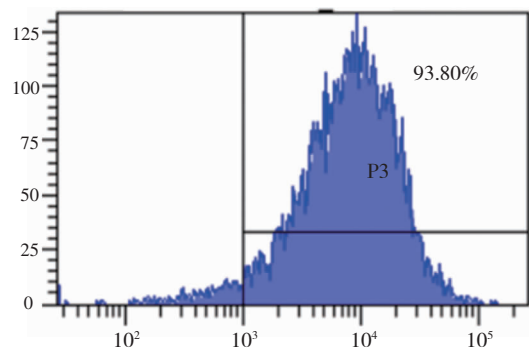


A. CD11c 阳性 BMDC 悬浮细胞中 CD86 阳性表达

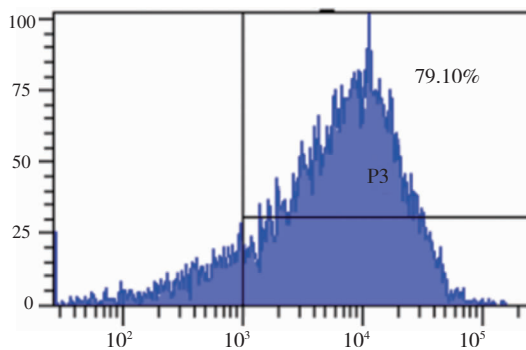


B. CD11c 阳性 BMDC 贴壁细胞中 CD86 阳性表达

图 6 悬浮细胞与贴壁细胞 CD11c、CD86 双阳性流式细胞学分析

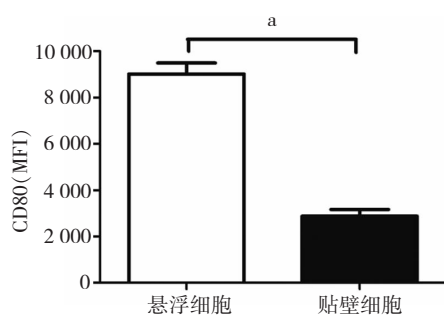


A. CD11c 阳性 BMDC 悬浮细胞中 MHC-II 阳性表达



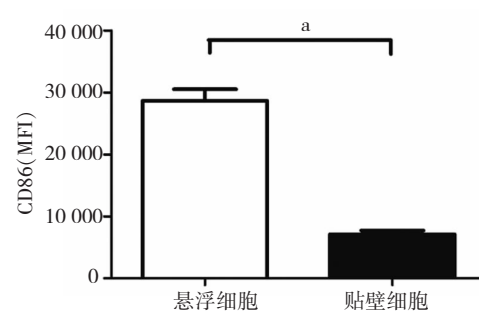
B. CD11c 阳性 BMDC 贴壁细胞中 MHC-II 阳性表达

图 7 悬浮细胞与贴壁细胞 CD11c、MHC-II 双阳性流式细胞学分析



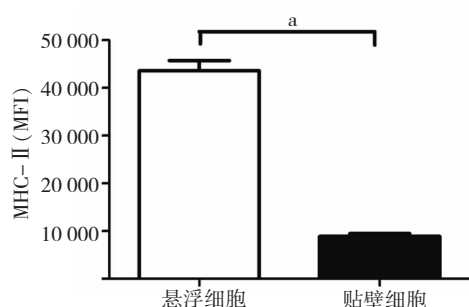
注:a, CD11c、CD80 双阳性的悬浮细胞与贴壁细胞 MFI 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)

图 8 悬浮细胞与贴壁细胞 CD11c、CD80 双阳性 MFI 比较



注:a, CD11c、CD86 双阳性的悬浮细胞与贴壁细胞 MFI 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)

图 9 悬浮细胞与贴壁细胞 CD11c、CD86 双阳性 MFI 比较



注:a, CD11c、MHC-II 双阳性的悬浮细胞与贴壁细胞 MFI 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)

图 10 悬浮细胞与贴壁细胞 CD11c、MHC-II 双阳性 MFI 比较

表 1 BMDC 培养 9 d 悬浮细胞及贴壁细胞表面标志物表达比例比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD11c	CD11c ⁺ CD80 ⁺	CD11c ⁺ CD86 ⁺	CD11c ⁺ MHC-II ⁺
悬浮细胞组	84.800±3.148	88.100±2.406	84.600±3.260	92.900±3.928
贴壁细胞组	85.033±1.498	79.167±2.318	75.400±4.414	82.767±4.800
t 值	0.116	4.631	2.904	2.830
P 值	0.913	0.010	0.044	0.047

表 2 培养 9 d 加入 rmIL-4 与不加入 rmIL-4 BMDC 中 CD11c 阳性表达比例比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	悬浮细胞	贴壁细胞
加 rmIL-4 组	84.800 ± 3.148	85.033 ± 1.498
不加 rmIL-4 组	83.633 ± 1.365	83.133 ± 2.894
t 值	0.589	1.010
P 值	0.588	0.370

表 3 培养 9 d 与 11 d BMDC 中 CD11c 阳性表达比例比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	悬浮细胞	贴壁细胞
培养 9 d 组	84.800 ± 3.148	85.033 ± 1.498
培养 11 d 组	95.833 ± 2.214	94.167 ± 1.858
t 值	4.965	6.628
P 值	0.008	0.003

3 讨论

作为专职 APC, DC 是免疫应答的中心环节, 在感染免疫、肿瘤疫苗研制及排斥反应中均发挥重要作用^[4], 因此大量的 DC 体外培养被用于医学研究^[5]。然而, DC 在体内分布广泛但数量极少, 如何获得大量的纯化 DC 成为进一步研究 DC 特性及功能的前提。DC 特异性表面标志物有 CD11c 及共刺激分子 CD80、CD86、MHC-II、CD83 等^[6-7], BMDC 的培养可单独应用 GM-CSF 或联合 IL-4、IL-3、Flt3-L 等诱

导刺激, BMDC 的活性及成熟度受小鼠个体差异、培养介质、培养时间等多种因素的影响, 因此 BMDC 培养标准化的建立仍在探索中^[8-9]。本文旨在国内外研究基础上, 对 BMDC 的形态、细胞表面标志和生物学特性、成熟度及最优化培养方法等方面进行进一步探索。

DC 诱导培养过程中在光学显微镜下动态观察 DC 形态、数量及分布变化时发现, 初时细胞直径小、呈圆形悬浮生长, 以后逐渐形成细胞集落, 贴壁细胞增多, 出现形状不规则的细胞; 4 d 以后悬浮细胞开始增多, 细胞体积明显增大; 培养 9 d, 细胞形态不规则, 呈星形、多边形, 可见明显树突或伪足; 培养 11 d 可获得大量形状不规则的细胞悬浮于培养液中, 符合典型的树突状细胞形态^[10]。经过 11~12 d 的培养, CD11c⁺ DC 高达 90%~95%, 与 Schutt CR 等^[11]研究相近, 而且悬浮细胞和贴壁细胞的 CD11c 阳性表达无明显差异。在研究中发现 BMDC 悬浮细胞 CD11c⁺CD80⁺、CD11c⁺CD86⁺、CD11c⁺MHC-II⁺双阳性表达比例均高于贴壁细胞, 证实悬浮细胞成熟度明显高于贴壁细胞, DC 细胞的成熟度与其免疫功能密切相关。在机体内, 大部分 DC 细胞处于未成熟状态, 不成熟的 DC 通过对 CD4⁺CD25⁺调节性 T 淋巴细胞 (Treg) 激活, 诱导抗原特异性免疫耐受, 成熟的 DC 能够与幼稚的 T 细胞发生动态的物理性接触并发挥抗原呈递功能, 诱导幼稚 T 细胞特异性增殖, 从而激活适应性免疫应答^[12]。通过对 BMDC 成熟度的研究, 可为研究不同状态 DC 的免疫功能研究作好实验准备。

Dong Y 等^[13]研究显示, 非贴壁 BMDC 应用 GM-CSF 单独刺激诱导或者 GM-CSF 联合白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) 联合刺激诱导等方法经过 7~10 d 的培养均会产生相似的 DC 细胞。李宏远等^[14]报道显示 IL-4 在骨髓来源 DC 培养中的主要作用是抑制骨髓中单个核细胞向中性粒细胞及巨噬细胞分化, 进而提高 BMDC 纯度。至于 IL-4 对骨髓来源 DC 特异性标记的表达有无影响, 尚未见报道。本研究发现, 在 BMDC 培养过程中单独应用 rmGM-CSF 或 rmGM-CSF 联合 rmIL-4 刺激诱导, 对骨髓来源 DC 特异性标记 CD11c 的表达并无明显差异。

在 BMDC 培养过程中, 研究发现混杂的其他细胞主要是中性粒细胞及巨噬细胞, 而绝大部分中性

粒细胞及巨噬细胞存留时间不会超过 10 d, 培养 11~12 d 的 BMDC 中很少再有中性粒细胞及巨噬细胞, 这和 Gosavi RA 等^[9]的研究一致。本研究发现, 培养 11 d 的 CD11c⁺ DC 的表达比例明显高于培养 9 d, 差异有统计学意义, 而两者活性度均高达 95% 左右。因此适当延长培养时间, 可提高 BMDC 表达比例, 并有效去除中性粒细胞、巨噬细胞等混杂细胞。

BMDC 的获得除了“经典培养法”, 还有 Easy-Sep 试剂盒免疫磁珠细胞分选技术。应用“经典培养法”无论悬浮细胞还是贴壁细胞, 通过延长培养时间均可获得 CD11c⁺ 高表达的 DC 细胞。“经典培养法”的缺点在于需要 11~12 d 相对较长的培养时间。免疫磁珠细胞分选技术只对悬浮细胞短时间内可获得 CD11c⁺ 高表达的 DC 细胞, 但免疫磁珠细胞分选具有单抗消耗大、花费高的缺点; 以及单抗选用不当, 很容易丢失部分 DC 的缺点。免疫磁珠细胞分选的优点是可在 5~6 d 相对较短的时间内获得高纯度 CD11c⁺ DC 的悬浮细胞, 但对于贴壁细胞并不适用^[9]。对于以上 2 种方法, 实验者可根据实验时间、实验经费等实际情况合理选择。

本研究通过对 BMDC 形态学观察及不同培养时间、不同生长状态、IL-4 是否应用等条件下 DC 表面特异性标记 CD11c、共刺激分子的表达情况等进行了深入研究, 以期能够对 BMDC 培养标准化、高效化的建立提供帮助。另外, 本研究通过收集不同生长状态、不同培养时间的细胞, 分别得到成熟 DC 和未成熟 DC, 这为以后 DC 的相关研究提供了高质量且各具特性的细胞来源, 也为进一步探索白色念珠菌孢子及菌丝作用下, BMDC 培养上清液中炎性细胞因子的含量, 以及 BMDC 中各因子的转录表达水平测定等后续实验研究奠定了坚实基础。

参 考 文 献

- [1] Guindi C, Cloutier A, Gaudreau S, et al. Role of the p38 MAPK/C/EBP β pathway in the regulation of phenotype and IL-10 and IL-12 production by tolerogenic bone marrow-derived dendritic cells[J]. Cells, 2018, 7(12):256.
- [2] Xu Y, Tang X, Yang M, et al. Interleukin 10 gene-modified bone marrow-derived dendritic cells attenuate liver fibrosis in mice by inducing regulatory T cells and inhibiting the TGF- β /Smad signaling pathway[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019:4652596.
- [3] Figliuolo da Paz V, Jamwal DR, Gurney M, et al. Rapid downregulation of DAB2 by Toll-like receptor activation contributes to a pro-inflammatory switch in activated dendritic cells[J]. Front Immunol, 2019, 10:304.
- [4] Mookerjee A, Graciotti M, Kandalaft LE. IL-15 and a two-step maturation process improve bone marrow-derived dendritic cell cancer vaccine[J]. Cancers(Basel), 2019, 11(1):40.
- [5] Kawai H, Tsujigiwa H, Siar CH, et al. Characterization and potential roles of bone marrow-derived stromal cells in cancer development and metastasis[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(12):1406-1414.
- [6] Zheng H, Liu L, Zhang H, et al. Dendritic cells pulsed with placental gp96 promote tumor-reactive immune responses[J]. PLoS One, 2019, 14(1):e211490.
- [7] Jimenez RV, Wright TT, Jones NR, et al. C-reactive protein impairs dendritic cell development, maturation, and function; implications for peripheral tolerance[J]. Front Immunol, 2018, 9:372.
- [8] Jones GS, Smith VC, D'Orazio SEF. Listeria monocytogenes replicate in bone marrow-derived CD11c⁺ cells, but not in dendritic cells isolated from the murine gastrointestinal tract[J]. J Immunol, 2017, 199(11):3789-3797.
- [9] Gosavi RA, Salve S, Mukherjee S, et al. Optimization of ex vivo murine bone marrow derived immature dendritic cells; a comparative analysis of flask culture method and mouse CD11c positive selection Kit method[J]. Bone Marrow Res, 2018, 2018:3495086.
- [10] Na YR, Jung D, Gu GJ, et al. GM-CSF grown bone marrow derived cells are composed of phenotypically different dendritic cells and macrophages[J]. Mol Cells, 2016, 39(10):734-741.
- [11] Schutt CR, Gendelman HE, Mosley RL. Tolerogenic bone marrow-derived dendritic cells induce neuroprotective regulatory T cells in a model of Parkinson's disease[J]. Mol Neurodegener, 2018, 13(1):26.
- [12] 蒙富雪, 董 蓉, 吴翠芳, 等. 未成熟树突状细胞与成熟树突状细胞的细胞骨架调控相关基因表达的差异分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7):3252-3261.
- [13] Dong Y, Arif AA, Poon GF, et al. Generation and identification of GM-CSF derived alveolar-like macrophages and dendritic cells from mouse bone marrow[J]. J Vis Exp, 2016(112):54194.
- [14] 李宏远, 韩金秀, 撒亚莲, 等. 大鼠外周血及骨髓来源树突状细胞的培养及鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(6):801-804.

(责任编辑:张学颖)