

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.17.007
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190516.1615.004.html(2019-05-17)

小鼠骨髓巨噬细胞体外培养及增殖情况的探索*

祝文¹,崔凤²,程志坚^{2△},贺西京²

(1.陕西省咸阳市第一人民医院重症医学科 710021;2.西安交通大学医学院第二附属医院骨科 710004)

[摘要] **目的** 建立小鼠骨髓来源巨噬细胞的体外培养方法及其标志物表达、增殖情况,为相关研究提供理论基础。**方法** 从6~8周龄昆明小鼠股骨分离得到骨髓单细胞悬液,在含15% L929上清液的培养液中培养。在1、3、5、7 d不同时间点,利用免疫荧光染色检测其巨噬细胞标志物F4/80表达情况,同时利用Edu标记法检测细胞增殖情况。**结果** 用含L929上清液的培养液诱导培养骨髓细胞1、3、5、7 d后细胞F4/80阳性细胞率分别为(1.52±0.39)%、(17.95±2.36)%、(75.57±6.17)%、(95.49±9.83)%,随着培养时间延长,F4/80阳性细胞率逐渐升高,培养骨髓细胞7 d后吞噬能力明显,不同培养时间点F4/80阳性细胞率比较差异均有统计学意义(1 d vs. 3 d,3 d vs. 5 d,5 d vs. 7 d, $P<0.05$)。随着培养时间延长Edu阳性细胞逐渐增高,培养1、3、5、7 d后细胞EdU阳性细胞率分别为(2.13±0.33)%、(4.61±0.54)%、(18.02±2.19)%、(28.84±3.27)%,不同培养时间点EdU阳性细胞率比较,差异均有统计学意义(1 d vs. 3 d,3 d vs. 5 d,5 d vs. 7 d, $P<0.05$)。**结论** 体外培养可成功获得小鼠骨髓来源巨噬细胞,培养7 d是获得高纯度巨噬细胞的重要条件。

[关键词] 巨噬细胞;细胞培养技术;细胞增殖

[中图法分类号] R392 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)17-2909-04

In-vitro culture method and proliferation of mouse bone marrow-derived macrophage*

ZHU Wen¹, CUI Feng², CHENG Zhijian^{2△}, HE Xijing²

(1. Department of Critical Care Medicine, the First People's Hospital of Xianyang, Xianyang, Shaanxi 710021, China; 2. Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China)

[Abstract] **Objective** To establish a culture method for mouse bone marrow-derived macrophages and to observe the expression of proliferation markers in order to provide theoretical basis for relevant research. **Methods** Bone marrow mono cells were isolated from femur of 6-8 weeks Kunming mice and cultured in the medium containing 15% L929 supernatant. The expression of macrophage marker F4/80 was detected by immunofluorescence staining and the proliferation was tested by EdU labeling at different time points(1, 3, 5 and 7 d). **Results** After 1, 3, 5 and 7 days of in-vitro culture in medium with L929 supernatant, the F4/80 positive rate in bone marrow cells was (1.52±0.39)%, (17.95±2.36)%, (75.57±6.17)%, and (95.49±9.83)%, respectively. With the extension of culture time, the positive rate of F4/80 gradually increased, and the phagocytic capacity of bone marrow cells cultured for 7 d was obvious. The differences of F4/80 positive rate among different time points were statistically significant (1 d vs. 3 d, 3 d vs. 5 d, and 5 d vs. 7 d, $P<0.05$). The rates of EdU positive cells in bone marrow cells were (2.13±0.33)%, (4.61±0.54)%, (18.02±2.19)%, and (28.84±3.27)% after 1, 3, 5, and 7 days of culture, respectively. The difference of EdU positive cell rate among groups were statistically significant (1 d vs. 3 d, 3 d vs. 5 d, and 5 d vs. 7 d, $P<0.05$). **Conclusion** Bone marrow derived macrophages can be successfully cultured in vitro, culture for 7 days is an important condition for obtaining high purity macrophages.

[Key words] macrophages; cell culture techniques; cell proliferation

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞,在多种神经系统疾病中发挥重要作用越来越受到研究者的重视^[1-2],尤其是以炎症反应为主的病理变化,其在抗感染和免疫调节中均起着非常重要作用^[3-5]。巨噬细胞主要来源骨髓,如何分离、原代培养获得高纯化骨髓来源的巨噬细胞,并充分了解其生长特性,是体外研究巨噬细胞功能的首要任务。目前,关于骨髓来源巨噬细胞培养相对成熟,但是关于培养过程中其标志物

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81801237,81571209);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2018JQ8039)。 作者简介:祝文(1984—),主治医师,硕士,主要从事免疫反应相关研究。 △ 通信作者,E-mail:czj0606@126.com。

及增殖能力情况鲜见具体描述。本研究拟以小鼠骨髓来源的巨噬细胞研究对象,重点探索培养不同时间点细胞表达巨噬细胞标志物和增殖动态情况,给以巨噬细胞为靶点的相关后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞 本实验所使用的实验动物是 SPF 级 6~8 周龄成年昆明小鼠,由西安交通大学医学院动物实验中心提供,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。小鼠成纤维细胞株 L929 购自中科研究细胞库。

1.1.2 主要试剂和仪器 培养基高糖达尔伯克改良伊格乐培养基(DMEM)、胰酶购自美国 GIBCO 公司,新生牛血清(NCS)购自美国 Cellgro 公司,大鼠抗小鼠 F4/80 抗体、5'-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine,EdU)增殖检测试剂盒购自美国 Abcam 公司,相应的山羊抗大鼠 Alexa Fluor 488 染料标记的荧光二抗购自美国 Life technologies 公司,红色荧光 beads、Hoechst33342 荧光染料购自美国 Sigma 公司,荧光显微镜日本尼康公司,二氧化碳细胞培养箱购自美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 L929 细胞培养及其上清液的收集 L929 细胞培养于含 10% NCS 的 DMEM(高糖)培养液约 7 d 后,收集培养上清液,3 500 r/min 4 ℃离心 30 min,去除沉淀(即细胞碎片),然后用 0.45 μm 滤器过滤后,所得液体为含集落刺激因子(colony-stimulating factor,CSF)-1 的培养液,用于配制骨髓来源巨噬细胞培养液,分装后保存于-80 ℃备用。

1.2.2 骨髓内细胞的分离及培养 将 6~8 周龄昆明小鼠处死后,无菌条件下取其股骨及胫骨置于预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)中。转移于超净台内,全程于冰袋上操作。剔除周围的肌肉组织,然后将两端干骺端去除,用巨噬细胞条件培养液将骨髓从髓腔中冲洗出,并将其吹打成均匀的单细胞悬液,以(1~3)×10⁷个/皿的密度接种于 10 cm Petri 培养皿中。细胞所用培养基为:DMEM+15% L929 上清液+5% NCS+1%青霉素链霉素(Gibco,15140122)置于 37 ℃孵箱中培养。从接种时开始,每隔 3 d 全量换培养液。

1.2.3 F4/80 细胞免疫荧光染色 按照培养 1、3、5、7 d 不同时间点收集相应细胞爬片并固定,然后用 1%牛血清清蛋白(BSA)+0.3% Triton X-100 封闭 1 h,分别加大鼠抗 F4/80 抗体(1:400),4 ℃孵育过夜,PBS 洗涤 5 min×3 次,二抗 Alexa Fluor® 488 山羊抗大鼠抗体(1:600),室温、避光孵育 1 h 并使用 Hoechst33342(1:1 000)染核 5 min,PBS 洗涤后封闭、荧光显微镜观察并分析结果。

1.2.4 吞噬实验 检测培养 7 d 后巨噬细胞吞噬功能,加入 Beads 1 h 后洗涤、固定、荧光显微镜拍照并分析结果。

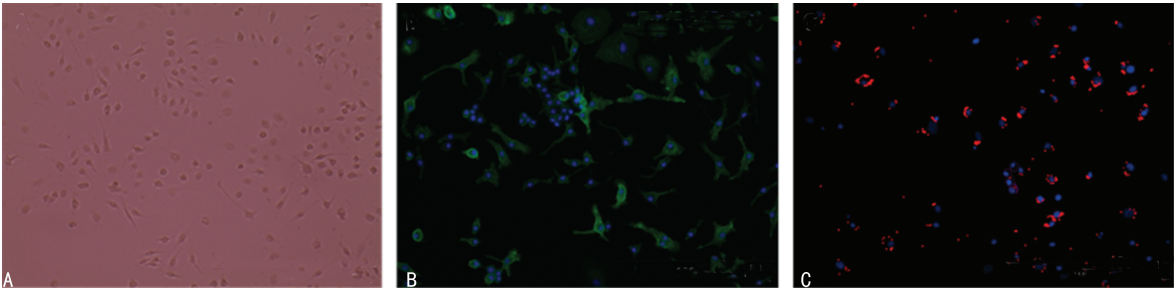
1.2.5 EdU 标志法检测增殖情况 固定标本前 2 h 添加 10 mmol/L EdU 孵育细胞,再固定、破膜 30 min,然后根据说明配制 EdU 反应溶液,避光反应 30 min,染核、洗涤、封片、观察及分析结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察结果 获取的小鼠骨髓细胞在含 15%L929 上清液巨噬细胞培养液中培养 7 d 后,细胞在显微镜下观察,细胞形态不均一,可呈棱形、短杆状或椭圆形等(图 1A),利用免疫荧光染色可观察到所获得细胞的巨噬细胞标志物 F4/80 阳性率高达 95%(图 1B),且具吞噬能力,见图 1C。

2.2 培养过程中细胞 F4/80 及 EdU 阳性细胞表达比较 骨髓细胞在含 15%L929 上清液的培养液中培养 7 d 后可获得高纯度的巨噬细胞(即 F4/80 阳性细胞),培养 1、3、5、7 d 后细胞 F4/80 阳性细胞率分别为(1.52±0.39)%、(17.95±2.36)%、(75.57±6.17)%、(95.49±9.83)%,各时间点 F4/80 阳性细胞率比较差异均有统计学意义((1 d vs. 3 d、3 d vs. 5 d、5 d vs. 7 d),*P*<0.05);培养 1、3、5、7 d 后细胞 EdU 阳性细胞率分别为(2.13±0.33)%、(4.61±0.54)%、(18.02±2.19)%、(28.84±3.15)%,各时间点 EdU 阳性细胞率比较,差异均有统计学意义(1 d vs. 3 d、3 d vs. 5 d、5 d vs. 7 d,*P*<0.05)。随着培养时间延长,F4/80 及 EdU 阳性细胞表达率逐渐升高,见图 2、3。



A:巨噬细胞形态;B:F4/80 阳性表达;C:细胞吞噬能力

图 1 显微镜下观察培养 7 d 的巨噬细胞形态 F4/80 阳性表达及吞噬能力(×100)

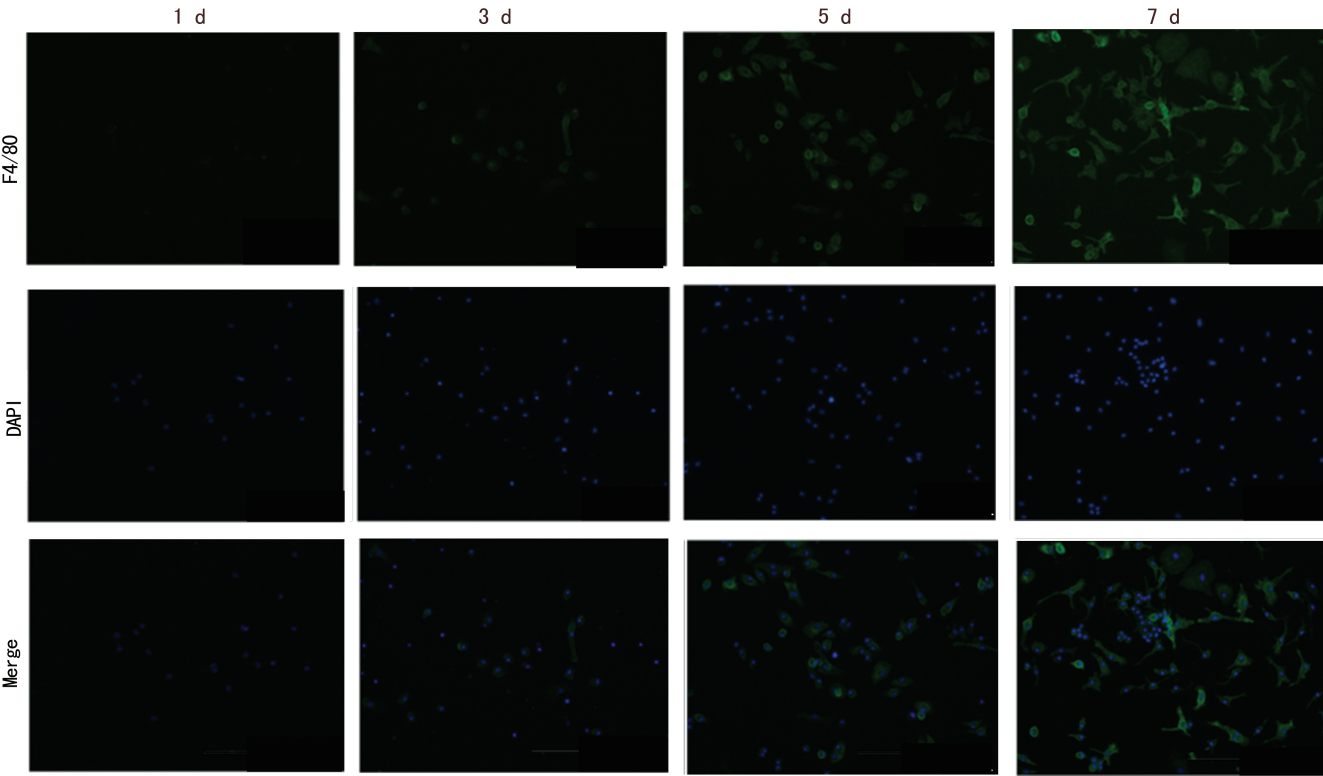


图 2 不同时间点体外培养细胞 F4/80 免疫荧光染色结果(×100)

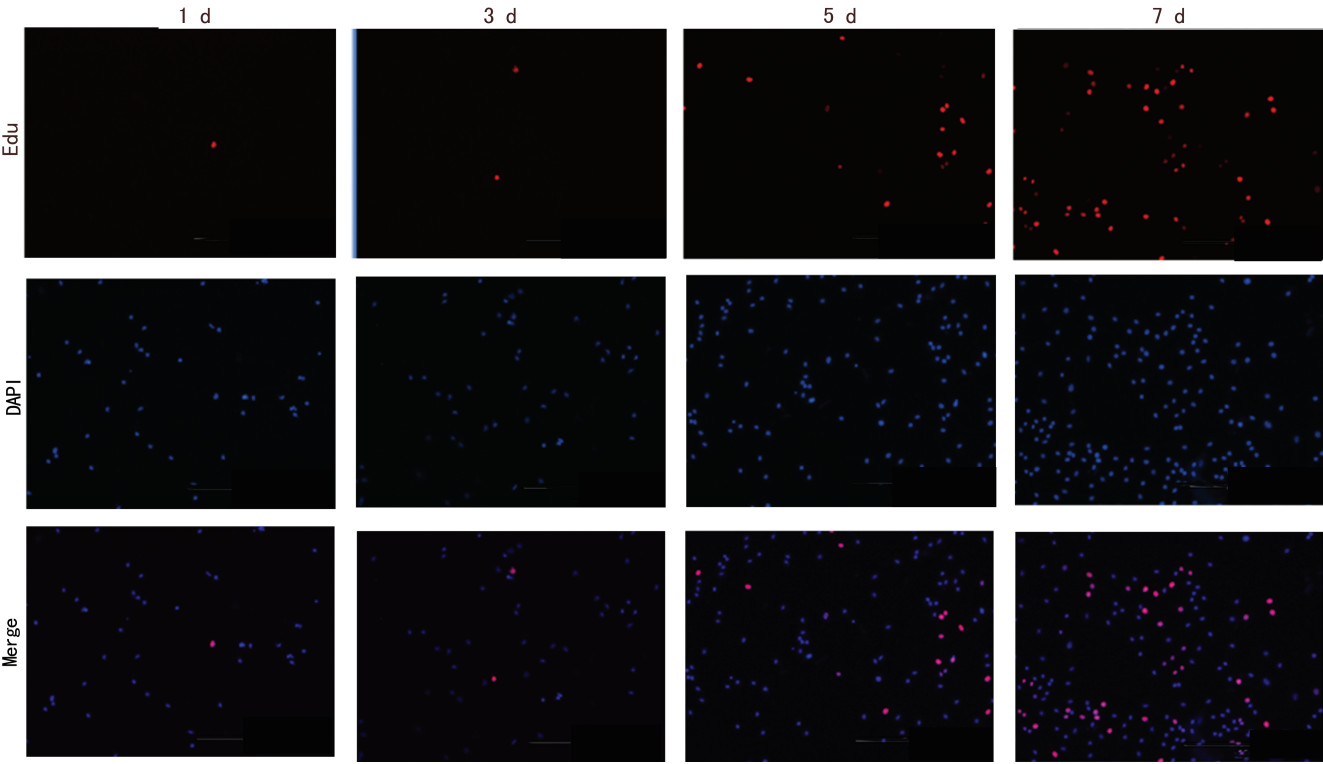


图 3 不同培养时间骨髓细胞 EdU 免疫荧光染色结果(×100)

3 讨 论

巨噬细胞分布在全身,其分为组织内巨噬细胞和外周循环的巨噬细胞。在正常生理状态下,巨噬细胞监视组织内环境,如吞噬病原体维持组织稳态,吞噬死亡细胞,对局部环境的变化会做出迅速的反映。许多疾病如脊髓损伤、肿瘤、动脉粥样硬化、哮喘都与巨噬细胞息息相关,其也是主要治疗靶点^[3,6]。因此,巨

噬细胞是研究细胞免疫、分子免疫学等方面的重要对象。充分了解巨噬细胞生长特性是体外研究巨噬细胞功能的重要任务之一,目前关于骨髓来源的巨噬细胞体外培养过程中其标志物及增殖能力情况鲜见报道。

本研究中关注小鼠骨髓来源的巨噬细胞培养及培养过程中不同时间点巨噬细胞标志物表达和增殖

能力动态变化情况,F4/80 是常用巨噬细胞的标志物,主要表达于细胞膜^[7]。骨髓细胞在 15% L929 上清液的培养液中培养 7 d 后,经鉴定其表达 F4/80,并且具有吞噬能力,说明骨髓来源的巨噬细胞在体外成功培养,并且其纯度高,可满足实验条件,为以后进一步研究巨噬细胞在肿瘤、纤维化等疾病中的作用奠定了良好的基础。培养 1、3、5、7 d 不同时间点 F4/80 阳性细胞率比较差异有统计学意义($P < 0.05$),随着培养时间延长,F4/80 阳性率逐渐升高,并在培养 7 d 达到 $(95.49 \pm 9.83)\%$ 。由此可见体外诱导时间是获得高纯度巨噬细胞的必要条件,一般要至少培养 7 d,不能提前使细胞进行实验,否则会影响实验结论。因此,以巨噬细胞为研究对象时,需要保持培养时间恒定,才能获得相对一致结果。

本实验中经过 7 d 诱导培养后细胞形态多样,有着突起和伪足,符合体内巨噬细胞的特征,结合 F4/80 染色结果显示,体外经过含 15% L929 上清液诱导培养 7 d 能够成功获成熟的巨噬细胞。目前,用于巨噬细胞体外诱导大多是直接使用重组的巨噬细胞 CSF,但对于需要大量培养巨噬细胞的课题如外泌体的分离等,则花费较大。而 L929 可以分泌大量 CSF-1,使用 L929 上清液进行巨噬细胞培养具有获取简单、花费少、方便保存等优点。

过去认为组织中的巨噬细胞是已经分化成熟的终末细胞,不再具备增殖能力^[8]。最新研究表明,巨噬细胞的原位增殖现象不仅仅在 Th2 型炎症反应发生过程中^[9-11],在其他巨噬细胞极化过程也可观察到巨噬细胞原位增殖现象,如肥胖造成的慢性炎症过程中^[12],以及动脉粥样硬化的发生过程中^[13],均观察到原位增殖巨噬细胞的存在。EdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,能够在 DNA 复制时期代替胸腺嘧啶(T)渗入正在合成的 DNA 分子中,通过基于 Apollo® 荧光染料与 EdU 的特异性反应即可直接并准确地检测出 DNA 复制活性。有研究发现,通过检测 EdU 标记便能准确地反映细胞增殖情况^[14-15]。本课题组的研究结果表明,培养 7 d 后获得骨髓来源的巨噬细胞部分表现 EdU 阳性,具有增殖能力。可见体外培养巨噬细胞可能存在两种来源:骨髓细胞诱导成熟和巨噬细胞自身增殖,本研究将给后续研究工作提供新的方向,下一步将对具有增殖能力的巨噬细胞进行分选和功能研究。

综上所述,利用含 L929 上清液的培养液经 7 d 诱导培养后,可从骨髓中获得高纯度的巨噬细胞,并且具有较强的增殖能力。

参考文献

[1] MOSSER D M, EDWARDS J P. Exploring the full spec-

- trum of macrophage activation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008,8(12):958-969.
- [2] KONG X, GAO J. Macrophage polarization; a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2017,21(5):941-954.
- [3] GENSEL J C, ZHANG B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury[J]. *Brain Res*, 2015,1619(14):1-11.
- [4] DAVID S, KRONER A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011,12(7):388-399.
- [5] LEE C H, CHOI E Y. Macrophages and Inflammation[J]. *J Rheum Dis*, 2018,25(1):11-18.
- [6] VAN DYKE J M, SMIT-OISTAD I M, MACRANDER C, et al. Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)[J]. *Exp Neurol*, 2016,277:275-282.
- [7] AUSTYN J M, GORDON S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage [J]. *Eur J Immunol*, 2005,11(10):805-815.
- [8] SOEHNLEIN O, LINDBOM L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010,10(6):427-439.
- [9] JENKINS S J, RUCKERL D, COOK P C, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation [J]. *Science*, 2011, 332 (6035):1284-1288.
- [10] YANG N, ISBEL N M, NIKOLIC-PATERSON D J, et al. Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis[J]. *Kidney International*, 1998,54(1):143-151.
- [11] O'DONNELL S L, FREDERICK T J, KRADY J K, et al. IGF- I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain[J]. *Glia*, 2010,39(1):85-97.
- [12] AMANO S, COHEN J, VANGALA P, et al. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation[J]. *Cell Metabolism*, 2013,19 (1):162-171.
- [13] ROBBINS C S, HILGENDORF I, WEBER G F, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis[J]. *Nat Med*, 2013,19(9):1166-1172.
- [14] BUCK S B, BRADFORD J, GEE K R, et al. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies[J]. *Bio-techniques*, 2008,44(7):927-929.
- [15] MEAD T J, LEFEBVRE V. Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections[J]. *Methods Mol Biol*, 2014,1130:233-243.

(收稿日期:2018-10-22 修回日期:2019-04-03)