

体外高效诱导人 MDSC 分化和扩增的方法探索

周鑫阳¹, 朱晓露², 祁荆荆^{2#}, 刘畅^{3#}

(1. 大连医科大学 研究生院, 大连 116044; 2. 大连医科大学基础医学院 免疫学教研室, 大连 116044; 3. 大连市中心医院 风湿免疫科, 大连 116089)

摘要: 为探索体外稳定、高效诱导人髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)分化与扩增的实验方法, 为体外研究人 MDSC 功能及作用机制提供新的实验技术支持, 收集健康人全血后采用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC, 贴壁法纯化单核细胞。用人 GM-CSF 和 IL-6 (各 10、20、40 和 80 ng/mL)刺激 PBMC 或单核细胞 4、7、14 和 21 d, 与 PBMC 共培养 3 d; 采用 FACS 检测 CD33⁺ MDSC、T 细胞增殖和 CD3⁺ IFN- γ ⁺ T 细胞比例。结果显示, 常规方法仅诱导 PBMC 或单核细胞分化为较低比例的 CD33⁺ MDSC; 改善培养方法, 用人 GM-CSF 和 IL-6 (各 80 ng/mL)刺激单核细胞 14 d (每 4~5 天换 1 次液), 可诱导出较高比例的 CD33⁺ MDSC, 且 CD33⁺ MDSC 表现出显著抑制 T 细胞增殖及分泌 IFN- γ 的功能。该研究提示, 改良后的培养方法可高效诱导人单核细胞分化成为 CD33⁺ MDSC, CD33⁺ MDSC 具有较强的免疫抑制功能。

关键词: 人髓源抑制性细胞; 体外分化; 实验技术

中图分类号: R392-33

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2024)01-0045-06

髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)是在肿瘤患者中发现的具有免疫抑制功能的髓系异质细胞群, 其可通过产生精氨酸酶 1 (arginase 1, ARG1)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)等抑制 T 细胞增殖及诱导 T 细胞凋亡, 促进肿瘤生长和转移^[1-3]。通常认为, 小鼠 MDSC 标志物为 CD11b⁺ Gr-1⁺, 人 MDSC 标志物为 LIN⁻ HLA-DR⁻ CD11b⁺ CD33⁺^[4]。目前, 用疾病模型可顺利开展体内外动物实验, 但诱导人 MDSC 体外分化并大量扩增的技术尚不成熟, 使研究 MDSC 在临床疾病中的作用及其机制受到限制。因此, 亟待探究出一种人 MDSC 体外高效分化与扩增的新方法, 以满足更深入的临床试验研究的需求。

研究表明, 以 40 ng/mL 的 GM-CSF 和 IL-6 共同刺激小鼠骨髓细胞 4 d, 即可诱导产生大量的 MDSC, 是体外扩增培养小鼠 MDSC 的标准实验方法^[5-6]。本课题组前期也采用此方法成功进行了小

鼠 MDSC 的体外分化与扩增^[7]。但目前文献中诱导人外周血 MDSC 体外分化及扩增的实验方法仍不统一, 且实验结果差异较大^[8-10]。针对此问题, 本研究探索一种体外稳定、高效诱导人外周血 MDSC 分化的新方法, 旨在为体外探究人 MDSC 作用及机制提供新的实验技术支持。

1 材料与方法

1.1 研究对象 随机选取 2021 年 1 月—2022 年 7 月大连医科大学附属第二医院体检健康人共 30 例(男性 10 例, 女性 20 例), 年龄为(40.63 \pm 1.92)岁。本研究所有外周血取样严格遵守医学伦理道德要求, 经捐赠者本人同意并签署知情同意书, 且经大连医科大学附属第二医院医学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器 PBS 购自北京索莱宝科技有限公司; 毛果芸香碱购自德思特生物技术有限公司; 红细胞裂解液购自 eBioscience 公司; 外周血淋巴细胞分离液购自 TBD 公司; 人 CD33 分选试剂盒购自 STEMCELL Technologies 公司; RPMI 1640 培养液和优级 FBS 购自 Gibco 公司; 人 CD3/CD28 功能抗体购自 eBioscience 公司; 人 GM-CSF 和 IL-6 购自 Peprotech 公司; anti-human CD33 Alexa 647 和 anti-human CD3 PerCP 购自 Biolegend 公司; anti-human IFN- γ APC 购自 eBioscience 公司; 佛波酯、离子霉素和高尔基体阻断剂购自南

收稿日期: 2022-08-29

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(82201990); 大连市科技人才, 青年科技之星(2022RQ070); 辽宁省教育厅自然科学青年科技人才“育苗”项目(LZ2020051); 辽宁省博士科研启动计划项目(2020-BS-191)

作者简介: 周鑫阳(1996—), 男, 硕士生, 主要从事自身免疫病发病机制研究

通信作者: 刘畅 (E-mail: drlc0820@163.com); 祁荆荆 (E-mail: jingjingqi_nju@126.com); # 为共同通信作者

京福麦斯生物技术有限公司。流式细胞仪购自安捷伦科技有限公司；实时荧光定量 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司；细胞培养箱购自 ThermoFisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 贴壁法纯化单核细胞 取人新鲜全血, 用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养液重悬细胞 (2×10^6 /mL), 并接种细胞于 12 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中静置 2 h, 去除悬浮细胞。

1.3.2 MDSC 培养条件 用加入人 GM-CSF 和 IL-6 (各 10、20、40 和 80 ng/mL) 的 RPMI 1640 完全培养液, 于恒温培养箱中培养 PBMC 或单核细胞 4 或 7 d (每 3~4 天换 1 次新鲜培养液), 或 14 d (每 4~5 天换 1 次新鲜培养液), 或 21 d (每 4~5 天换 1 次新鲜培养液)。

1.3.3 MDSC 抑制 T 细胞增殖试验 根据说明书, 用磁珠纯化诱导分化的 CD33⁺ 细胞。将羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯 (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) 标记的 PBMC 单独或与纯化的 CD33⁺ 细胞以 2 : 1 比例置于 96 孔培养板中, 用加入 2 μg/mL 人 CD3/CD28 抗体的 RPMI 1640 完全培养液共培养 3 d, 收集细胞以待检测。

1.3.4 FACS 检测 MDSC 在细胞悬液中加入

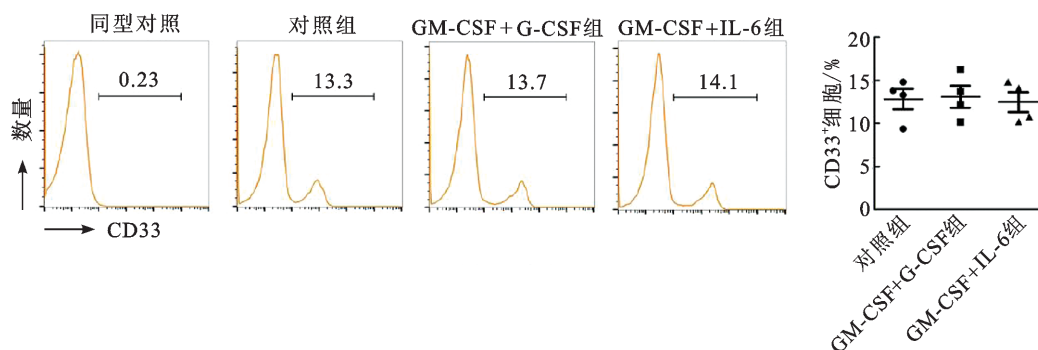
anti-human CD33 Alexa 647, 室温避光孵育 15 min, 洗涤并重悬细胞后置于冰上以待检测。检测 CD3⁺ IFN-γ⁺ T 细胞: 用 20 ng/mL 佛波酯、1 μg/mL 离子霉素及 5 μg/mL 高尔基体阻断剂于 37 °C 培养箱中刺激 4 h。先标记表面标志物 anti-human CD3 PerCP, 破胞膜后标记胞膜内标志物 anti-human IFN-γ APC, 洗涤并重悬细胞, 置于冰上以待检测。

1.4 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 常规方法诱导 PBMC 分化产生 CD33⁺ MDSC

本研究首先采用常规方法体外诱导人 MDSC 分化。分离健康人 PBMC, 用加入人 GM-CSF 和 G-CSF 或 GM-CSF 和 IL-6 (各 10 ng/mL) 的培养液培养 4 d, 采用 FACS 检测 CD33⁺ MDSC 比例。结果显示, 用人 GM-CSF 和 G-CSF 或 GM-CSF 和 IL-6 刺激培养 PBMC 4 d 后, 与对照组比较, CD33⁺ MDSC 比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1)。



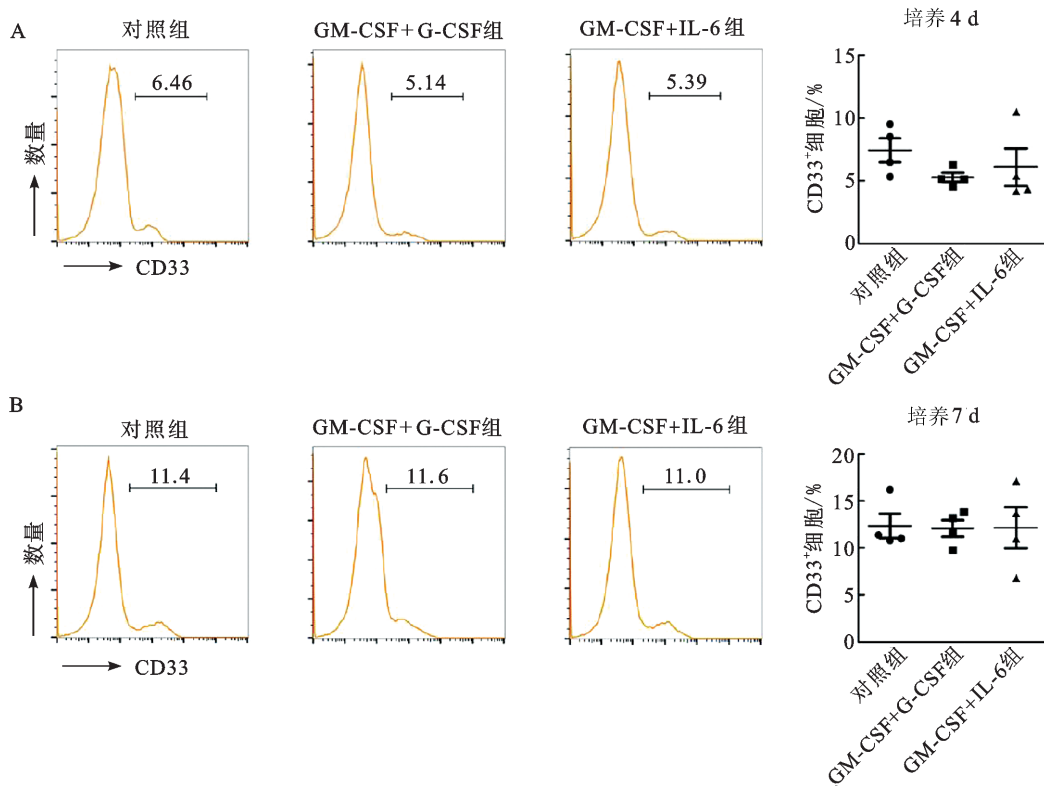
注: 人 GM-CSF 和 G-CSF 或 GM-CSF 和 IL-6 (各 10 ng/mL) 培养 PBMC 4 d, FACS 检测各组 CD33⁺ MDSC 比例。

图 1 常规方法诱导 PBMC 分化产生 CD33⁺ MDSC

2.2 常规方法诱导单核细胞分化产生 CD33⁺ MDSC

为优化实验方案, 本研究用贴壁法从 PBMC 中纯化出单核细胞, 以排除悬浮细胞的干扰。用加入人 GM-CSF 和 G-CSF 或 GM-CSF 和 IL-6 (各 10 ng/mL) 的培养液培养人单核细胞 4 或

7 d 后, 采用 FACS 检测 CD33⁺ MDSC 比例。结果显示, 用人 GM-CSF 和 G-CSF 或 GM-CSF 和 IL-6 刺激培养单核细胞 4 或 7 d 后, 与对照组比较, CD33⁺ MDSC 比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。

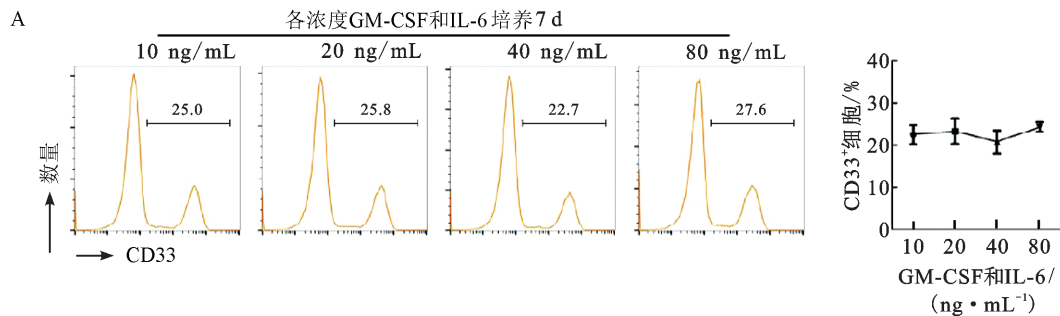


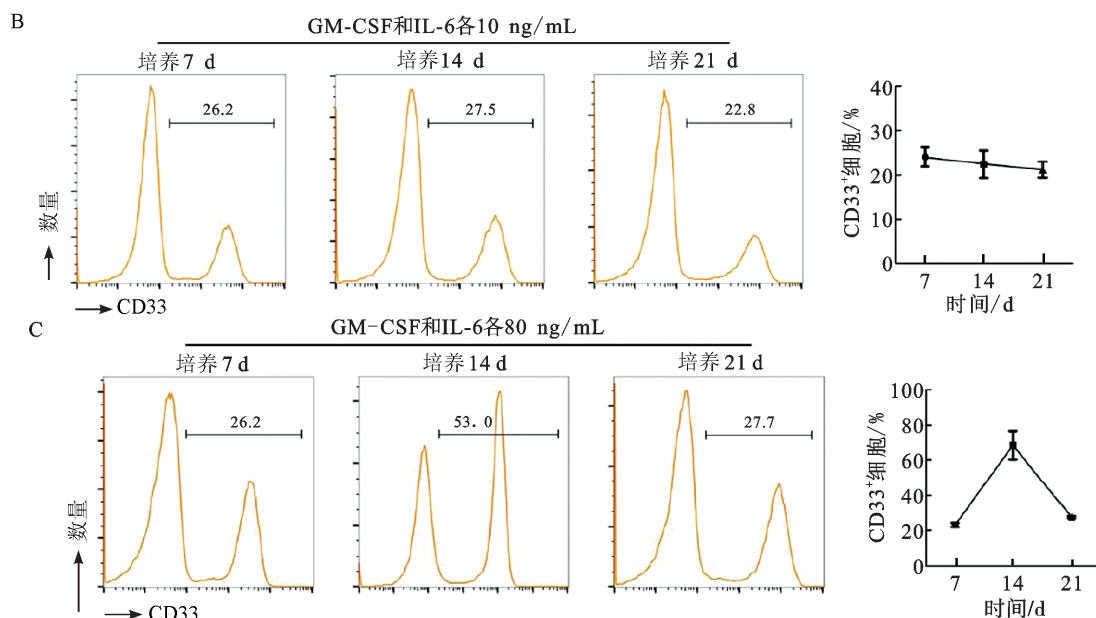
注: A. 人 GM-CSF 和 G-CSF 或 GM-CSF 和 IL-6 (各 10 ng/mL) 培养单核细胞 4 d, FACS 检测各组 CD33⁺ MDSC 比例; B. 人 GM-CSF 和 G-CSF 或 GM-CSF 和 IL-6 (各 10 ng/mL) 培养单核细胞 7 d, FACS 检测各组 CD33⁺ MDSC 比例。

图 2 常规方法诱导单核细胞分化产生 CD33⁺ MDSC

2.3 细胞因子浓度和培养时间对单核细胞分化为 CD33⁺ MDSC 效率的影响 为探寻有效的诱导单核细胞分化为 CD33⁺ MDSC 的最佳细胞因子浓度和培养时间, 本研究用加入人 GM-CSF 和 IL-6 (各 10、20、40 和 80 ng/mL) 的培养液培养人单核细胞 7 d, 采用 FACS 检测 CD33⁺ MDSC 比例。结果显示, 不同浓度细胞因子刺激单核细胞 7 d 均未诱导出较高比例的 CD33⁺ MDSC, 但浓度为 80 ng/mL 时 CD33⁺ MDSC 比例略有升高(图 3A)。进一步, 本研究用加入人 GM-CSF 和 IL-6 (各 10 ng/mL)

的培养液培养人单核细胞 7、14 和 21 d 后, 采用 FACS 检测 CD33⁺ MDSC 比例。结果显示, 浓度为 10 ng/mL 时, 延长培养时间也未诱导出较高比例的 CD33⁺ MDSC (图 3B)。因此, 本研究用加入人 GM-CSF 和 IL-6 (各 80 ng/mL) 的培养液培养人单核细胞 7、14 和 21 d, 采用 FACS 检测 CD33⁺ MDSC 比例。结果显示, 浓度为 80 ng/mL, 培养时间为 14 d 时, GM-CSF 和 IL-6 可稳定诱导出较高比例的 CD33⁺ MDSC (图 3C)。



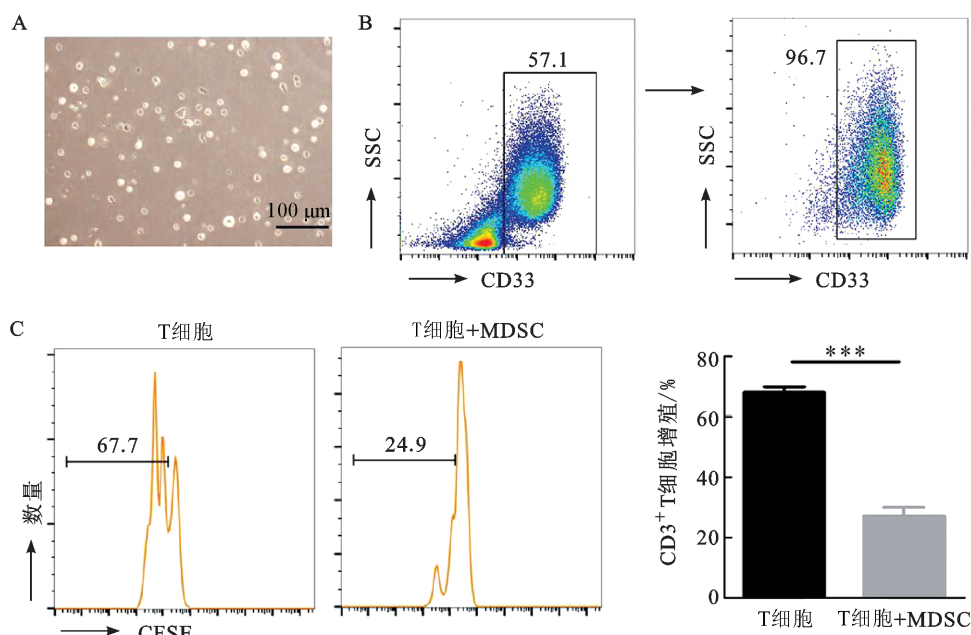


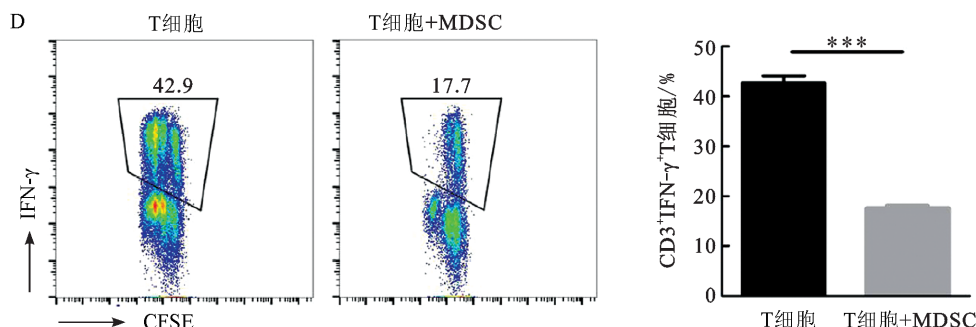
注: A. 人 GM-CSF 和 IL-6 (各 10、20、40 和 80 ng/mL) 培养单核细胞 7 d, FACS 检测 CD33⁺ MDSC 比例; B. 人 GM-CSF 和 IL-6 (各 10 ng/mL) 培养单核细胞 7、14 和 21 d, FACS 检测 CD33⁺ MDSC 比例; C. 人 GM-CSF 和 IL-6 (各 80 ng/mL) 培养单核细胞 7、14 和 21 d, FACS 检测 CD33⁺ MDSC 比例。

图 3 改良方法诱导单核细胞分化产生 CD33⁺ MDSC

2.4 改良法诱导的 CD33⁺ MDSC 对 T 细胞增殖的影响 目前, 仅用表面标志物仍无法将 MDSC 与单核细胞及中性粒细胞明确区分开, 因此免疫抑制功能检测对于体外鉴定 MDSC 不可或缺^[4]。为确证采用改良法诱导的 CD33⁺ MDSC 具有免疫抑制功能, 本研究用人 GM-CSF 和 IL-6 (各 80 ng/mL)

刺激培养单核细胞 14 d 后, 对诱导产生的 CD33⁺ MDSC 进行形态观察(图 4A)和分离纯化(图 4B), 并与 CFSE 标记的 PBMC 共培养, 采用 FACS 检测 CD3⁺ T 细胞增殖及 IFN- γ 产生情况。结果显示, 与单独培养的 T 细胞比较, CD33⁺ MDSC 可显著抑制 CD3⁺ T 细胞增殖(图 4C)及 IFN- γ 分泌(图 4D)。





注: A. 显微镜下观察 CD33⁺MDSC 的形态($\times 100$); B. FACS 检测 CD33⁺MDSC 比例; C. FACS 检测 CFSE^{low}CD3⁺T 细胞比例; D. FACS 检测 CFSE⁺CD3⁺IFN- γ ⁺T 细胞比例。*** $P < 0.001$ 。

图4 改良法诱导的 MDSC 对 T 细胞增殖的影响

3 讨论

CD33 是一种唾液酸结合免疫球蛋白样糖蛋白,主要表达于髓系细胞表面,是鉴定人 MDSC 的重要表面标志物,且靶向 CD33 可以清除人 MDSC^[11-12]。研究显示,用加入人 GM-CSF 和 G-CSF(各 40 ng/mL)且含 10% FBS 的 IMDM 完全培养液培养人骨髓细胞 4 d,可诱导出较高比例的 CD11b^{low/-}MDSC^[5];用加入人 GM-CSF 和 IL-6(各 10 ng/mL)且含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养液培养 PBMC 7 d,可诱导出具有免疫抑制特性的 CD33⁺MDSC,但未说明诱导出 CD33⁺MDSC 的比例和功能^[8,13];用加入人 GM-CSF 和 IL-6(各 10 ng/mL)且含 10% 人 AB 血清的 RPMI 1640 完全培养液培养 CD14⁺单核细胞 6 d,可诱导出较高比例的 CD33⁺MDSC (>99%)^[10],但人 AB 血清价格较高,是同等体积 FBS 价格的 10 余倍。也有研究表明,用 100 ng/mL 人 GM-CSF 和 50 ng/mL 干细胞生长因子刺激脐带血来源的 CD34⁺细胞 6 周,可诱导出较高比例的 CD33⁺MDSC (>90%)^[9],但脐带血来源有限,且细胞培养时间过长。因此,目前人 MDSC 体外大量扩增技术仍不成熟,使研究 MDSC 在临床疾病中的作用及其机制受到限制,亟待探究出一种人 MDSC 体外高效分化与扩增的新方法,以满足更深入的临床试验研究的需要。

本研究结合前期研究工作基础,并参考现有文献报道,尝试采用人 GM-CSF 和 G-CSF 或 GM-CSF 和 IL-6(各 10 ng/mL)刺激培养 PBMC 或单核细胞 4 和 7 d,人 GM-CSF 和 IL-6(各 10、20、40 和 80 ng/mL)刺激培养单核细胞 7 d,人 GM-CSF 和 IL-6(各 10 ng/mL)刺激培养单核细胞 7、14 和 21 d,均未能诱导出较高比例的 CD33⁺

MDSC。本研究改良实验方法,采用人 GM-CSF 和 IL-6(各 80 ng/mL)刺激培养单核细胞 7、14 和 21 d,结果显示,与培养时间为 7 和 21 d 时比较,培养时间为 14 d 时,CD33⁺MDSC 比例显著升高($P < 0.001$),且 CD33⁺MDSC 具有明显的免疫抑制功能。

综上所述,经过不断改良实验方法,本研究探索出一种人 MDSC 体外高效分化与扩增的新方法,这将为临床开展 MDSC 作用及机制研究提供新的实验技术支持。

参考文献

- [1] 张磊,谢劲松,张永臣. 缺氧对髓源性抑制细胞来源外泌体免疫抑制能力的影响[J]. 现代免疫学, 2022, 42(3): 207-212; 230.
- [2] Hegde S, Leader AM, merad M. MDSC: markers, development, states, and unaddressed complexity[J]. Immunity, 2021, 54(5): 875-884.
- [3] Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: critical cells driving immune suppression in the tumor microenvironment[J]. Adv Cancer Res, 2015, 128: 95-139.
- [4] Yaseen MM, Abuharfeil NM, Darmani H, et al. Recent advances in myeloid-derived suppressor cell biology[J]. Front Med, 2021, 15(2): 232-251.
- [5] Solito S, Pinton L, De Sanctis F, et al. Methods to measure MDSC immune suppressive activity *in vitro* and *in vivo*[J]. Curr Protoc Immunol, 2019, 124(1): e61.
- [6] 许秋桂,王文红,朱波,等. 小鼠髓样抑制细胞体外扩增体系的建立[J]. 现代免疫学, 2015, 35(2): 140-144.
- [7] Qi J, Tang X, Li W, et al. Mesenchymal stem cells inhibited the differentiation of MDSCs via COX2/PGE2 in experimental sialadenitis[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 325.
- [8] Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells[J]. J Immunol, 2010, 185(4): 2273-2284.
- [9] Lim JY, Ryu DB, Park MY, et al. Ex vivo generated human cord blood myeloid-derived suppressor cells attenuate murine

- chronic graft-versus-host diseases [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24(12): 2381-2396.
- [10] Stiff A, Trikha P, Wesolowski R, *et al*. Myeloid-derived suppressor cells express bruton's tyrosine kinase and can be depleted in tumor-bearing hosts by ibrutinib treatment[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(8): 2125-2136.
- [11] Lutz MB, Eckert IN. Comments on the ambiguity of selected surface markers, signaling pathways and omics profiles hampering the identification of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Cell Immunol*, 2021, 364: 104347.
- [12] Fultang L, Panetti S, Ng M, *et al*. MDSC targeting with Gemtuzumab ozogamicin restores T cell immunity and immunotherapy against cancers[J]. *EBioMedicine*, 2019, 47: 235-246.
- [13] Tian J, Rui K, Hong Y, *et al*. Increased GITRL impairs the function of myeloid-derived suppressor cells and exacerbates primary Sjögren syndrome[J]. *J Immunol*, 2019, 202(6): 1693-1703.

Development of a method to efficiently induce human MDSCs differentiation and expansion *in vitro*

ZHOU Xin-yang¹, ZHU Xiao-lu², QI Jing-jing^{2#}, LIU Chang^{3#} (1. *Graduate School, Dalian Medical University, Dalian 116044, China*; 2. *Department of Immunology, College of Basic Medical Science, Dalian Medical University, Dalian 116044, China*; 3. *Department of Rheumatology and Immunology, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116089, China*)

Abstract: This study aims to develop a method to efficiently and stably induce the differentiation and expansion of human myeloid-derived suppressor cells (MDSC) *in vitro* and provide new experimental technology for the study of the function and mechanism of human MDSC. For this purpose, PBMC of healthy volunteers were isolated with Ficoll density gradient centrifugation. Next, monocytes were separated by anchoring technique. PBMC or monocytes were stimulated with GM-CSF and IL-6 (10, 20, 40, 80 ng/mL each) for 4, 7, 14, and 21 days before co-culturing with PBMC for 3 days. The proliferation of CD33⁺ MDSC and T cells and the proportion of CD33⁺ IFN- γ ⁺ T cells were detected by FACS. The results showed that the PBMC or monocytes were induced to differentiate to less CD33⁺ MDSC by conventional methods. However, by improved methods, the monocytes cultured with GM-CSF and IL-6 (each 80 ng/mL) for 14 days (refreshing the culture solution every 4-5 days) were induced to differentiate more efficiently into a higher proportion of CD33⁺ MDSC, which showed significant inhibition of T cell proliferation and IFN- γ secretion. This study suggests that with the improved method, the monocytes are efficiently induced to differentiate into CD33⁺ MDSC, which has significant suppressive function.

Key words: human myeloid-derived suppressor cell; differentiation *in vitro*; experimental technology

(上接第 44 页)

myocardial infarction (AMI)-induced myocardial fibrosis in rat model. To this end, SD rats were randomly divided into control group (Ct), model group (Model), low-dose PD treatment group (PD-L, 40 mg/kg), high-dose PD treatment group (PD-H, 100 mg/kg), captopril treatment group (CTP, 20 mg/kg), and PD-H+TGF- β agonist group (100 mg/kg+30 mg/kg). AMI was induced by left anterior descending coronary artery ligation in all rats except those in the Ct group. Myocardial function and tissue structure were evaluated by animal ultrasound system and Masson staining of the heart. The collagen sedimentation in the myocardial tissue was evaluated by immunohistochemistry and the levels of IL-6 and TNF- α were measured by ELISA kits. The protein expressions of TGF- β 1, p-Smad2/3, and p-ERK1/2 were assessed by Western blotting. Compared to those in the Ct group, rats in the model group exhibited worse myocardial function with severe myocardial fibrosis and systematic inflammatory responses (all $P<0.05$). Notably, PD treatment significantly ameliorated AMI-induced myocardial injury in a dose-dependent manner, evidenced by improved myocardial function, less fibrotic collagen deposition, less inflammatory factors secretion along with the inhibition of the TGF- β /Smad/ERK signaling pathway (all $P<0.05$). Moreover, the therapeutic effect of high-dose PD was comparable to that of positive control captopril whereas SRI-011381 (a type of TGF- β agonist) remarkably abrogated the rescue effect of PD on the AMI-induced myocardial fibrosis. In conclusion, our study demonstrates that PD may relieve the degree of myocardial inflammatory infiltration and improve AMI-induced myocardial fibrosis in rats by inhibiting the TGF- β /Smad/ERK signaling pathway, which may promote damaged myocardium repairs.

Key words: polydatin; acute myocardial infarction; myocardial fibrosis; transforming growth factor β ; extracellular regulated protein kinase