

恒河猴外周血单核巨噬细胞体外培养方法的建立

桑明,代明,周立,刘金彪,郭铭,马同翠,肖前浩,霍文哲*

(武汉大学动物实验中心/动物生物安全三级实验室,病毒学国家重点实验室,武汉 430071)

【摘要】 目的 建立一种简单、经济、高效的培养恒河猴外周血单核巨噬细胞(monocyte-derived macrophage, MDM)的方法。方法 用肝素钠抗凝管采集成年恒河猴(*Macaca mulatta*)全血,密度梯度离心法分离外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。同时用无抗凝剂采血管采集同一只猴外周血,自凝后分离血清。将猴 PBMCs 置于 CellBIND Surface 的 96 孔(0.8×10^6 个细胞/孔)或 48 孔培养板(3×10^6 个细胞/孔)中,用含不同百分比的猴自体血清或胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的 RPMI 1640 培养液培养 24 h 后洗弃未贴壁细胞,加入含有猴自体血清或 FCS 的新鲜培养基继续培养 7 d 后观察细胞形态学。分化良好的猴单核巨噬细胞贴壁能力强,占据板底大部分区域。胞体形态多样,多数呈长梭形。用巨噬细胞标记受体(CD14)抗体染色判断细胞纯度。并用细菌内毒素(LPS)刺激分化的巨噬细胞,检测巨噬细胞炎症因子的表达。此外,用猴艾滋病毒(SIV_{mac17E-Br}、SIV_{mac251})和人-猴嵌合体艾滋病毒(SHIV KU-1)感染分化良好的猴巨噬细胞,检测病毒在猴巨噬细胞中的复制。结果 在含 2% 猴自体血清的 RPMI 1640 培养条件下,大多数(>85%)猴单核细胞能在 24 h 内贴壁,体外分化 5~7 d 后,猴巨噬细胞纯度大于 96%。相比而言,含较高浓度(4%, 8% 或 10%)猴自体血清或 FCS 的 RPMI 1640 培养基对猴单核细胞的贴壁和分化作用较差。分化良好的猴巨噬细胞对 LPS 刺激敏感,可产生多种巨噬细胞炎症因子。此外,这些细胞对 SIV 或 SHIV 均易感,产生感染性病毒。结论 含 2% 猴自体血清的 RPMI 1640 培养基适于原代猴单核细胞的贴壁和分化。该方法简单、花费少,无需生长因子,且分化效果好,是培养猴艾滋病毒及开展相关免疫学实验的重要手段。

【关键词】 恒河猴;艾滋病毒;单核细胞;巨噬细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0018-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.004

Establishment of a method for culture in vitro of peripheral blood monocytes from rhesus macaque

SANG Ming, DAI Ming, ZHOU Li, LIU Jin-biao, GUO Ming, MA Tong-cui, XIAO Qian-hao, HO Wen-zhe

(Center for Animal Experiment / ABSL-III Laboratory, State Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

【Abstract】 Objectives To establish a simple, inexpensive and efficient technique for *in vitro* culture of monocyte-derived macrophages (MDM) from rhesus macaques of Chinese origin. **Methods** Peripheral blood of healthy rhesus macaques (*Macaca mulatta*) were obtained in heparinized vacutainer collection tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood by Ficoll gradient centrifugation. Serum was isolated from peripheral blood of the autologous animals. PBMCs were plated in 48-well-plate (3×10^6 cells/well) or 96-well-plate (0.8×10^6 cells/well) for 24 h. After removal of non-adherent cells from the culture, monocytes were cultured in RPMI 1640 supplemented with different proportions (2%, 4%, 8%, 10%) of autologous serum or fetal calf serum (FCS) for 7 days. To examine the biological function of MDM, lipopolysaccharide (LPS) was added to MDM culture to determine inflammatory cytokine production.

【基金项目】 国家自然科学基金(81271334, 81201261, 81301428)和博士后科学基金(2013M531745)资助。

【作者简介】 桑明(1978年-), 博士生, 讲师。主要研究巨噬细胞在天然免疫和艾滋病毒感染中的作用。现工作单位: 湖北医药学院基础医学院。E-mail: sangming@whu.edu.cn。

【通讯作者】 霍文哲, 教授, 博导。主要从事病原微生物和天然免疫的研究工作。E-mail: wenzheho@whu.edu.cn。电话: 027-68759807。

Also, MDM cultures were tested for the susceptibility to simian immunodeficiency virus (SIV) or simian-human immunodeficiency virus (SHIV) infections. **Results** The cell cultures with RPMI1640 containing 2% autologous serum yielded the best results with regard to macrophage morphology, the response to LPS stimulation and susceptibility to SIV or SHIV infection. The purity of adherent macrophages under condition of 2% autologous serum culture was higher than 96%. **Conclusions** RPMI 1640 with 2% autologous serum is suitable for culture *in vitro* of peripheral blood monocytes from rhesus macaques. This technique is simple, inexpensive, no need for growth factor and highly effective to obtain adherent and well differentiated macaque monocytes. Therefore, this method provides an important tool for culture of macaque AIDS viruses and for related immunological research.

【Key words】 Rhesus macaque; SIV; SHIV; Macrophage; Autologous serum

巨噬细胞分布于机体的多种组织中,是免疫系统的“清道夫”。但巨噬细胞的功能不仅仅限于清除体内垃圾,它在机体的不同组织和器官发挥了监视入侵病原微生物及诱导天然免疫应答等多种生理功能^[1]。在机体与病原微生物密切接触的免疫前沿器官内有大量巨噬细胞,如淋巴系统、肺、肠的固有层等。巨噬细胞“常驻”各组织器官中,通过清除凋亡和坏死细胞及外来入侵微生物,发挥其生理平衡和免疫功能^[1]。巨噬细胞可引起适度的对抗感染的免疫反应,能通过吞噬和识别病原微生物诱导天然免疫,亦可通过发挥抗原递呈功能激活 T 细胞,从而引起获得性免疫应答^[2-5]。

分离培养巨噬细胞对免疫学与病毒学等相关研究十分重要。因此,有必要建立分化培养巨噬细胞的方法。由于组织中的巨噬细胞很难分离和富集,使用外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)体外分化培养巨噬细胞,建立体外培养单核细胞来源的巨噬细胞(monocyte-derived macrophage, MDM)已成为广泛接受的科学手段。尽管已有诸多有关体外分化培养人巨噬细胞的方法学的报道^[6-8],但有关体外培养非人灵长类动物单核巨噬细胞的报道却十分有限。鉴于非人灵长类动物,尤其恒河猴,已被广泛用于作为人类疾病的模型来研究,建立体外培养恒河猴原代单核巨噬细胞的方法十分必要。在有限的文献报道中,体外分化培养猕猴原代巨噬细胞需在培养液中加入 M-CSF 或 GM-CSF 等生长因子,诱导外周血单核细胞分化为巨噬细胞^[9]。但是,这种方法有很大的局限性。由于细胞因子对巨噬细胞有激活作用,加入这些因子会影响实验结果,造成结果分析的复杂性和不准确性。本文报道了一种简单、经济、有效的体外培养分化恒河猴巨噬细胞的方法,分化培养的细胞纯度高,具有典型巨噬细胞形态学和免疫学特性。

1 材料与方 法

1.1 动物及外周血采集

4~5 岁的雌性清洁级恒河猴(Rhesus macaque, *Macaca mulatta*)3 只,体重 5~6 kg,购自湖北天勤猕猴繁育生物科技有限公司【SCXK(鄂)2010-0010】。实验在取得了国际实验动物评估和认可委员会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)认证的武汉大学动物实验中心开展【SYXK(鄂)2014-0013】,所有实验操作程序均经过武汉大学动物实验中心动物使用管理委员会批准。采血前肌肉注射(10 mg/kg)氯胺酮将动物麻醉,采集肝素钠抗凝静脉血 5~10 mL 用于 PBMCs 的分离,同时用无抗凝剂采血管采集全血 5 mL,自凝后用于猴血清的分离。

1.2 密度梯度离心法分离 PBMCs

将抗凝全血(5~10 mL),用 PBS 对倍稀释,然后缓慢加到淋巴细胞分离液(Ficoll)上层,稀释血样与 Ficoll 体积比为 3:1。离心(1800 r/min, 30 min, 22℃)后,吸出介于血浆稀释液与淋巴细胞液之间的 PBMCs 层,用 PBS 洗 2 次(每次 1200 r/min 离心 8 min),最后用培养基洗 1 遍,所得 PBMCs 用于后续实验。若 PBMCs 中血小板较多,可采用低速离心(200 g, 15 min)的方法去除。

1.3 猴单核巨噬细胞分化培养

分离出的猴 PBMCs 应立即铺板,不宜放置过长时间(1 h)。将 PBMCs 用含 2%、4%、8% 和 10% 猴自体血清或胎牛血清的 RPMI 1640 培养液置于 CellBIND Surface 的 96 孔(Cat:3300, Corning, USA)或 48 孔培养板(Cat:3338, Corning, USA)中培养,96 孔板每孔 0.8×10^6 个细胞,48 孔板每孔 3×10^6 个细胞。24 h 后将未贴壁细胞用 RPMI 1640 培养液洗弃,加入新鲜培养基继续培养 5~7d 后观察细胞形态,判定细胞分化结果。分化良好的巨噬细胞贴

壁能力强,形态多样,多数呈长梭形,或不规则形。

1.4 流式细胞术检测分化的猴巨噬细胞表型

在含 2% 猴自体血清 RPMI 1640 培养下,分化第 4 天或 7 天的猴单核巨噬细胞用流式细胞术检测 CD14 表达。先用 PBS 将猴单核巨噬细胞洗 3 遍,加 0.25% 的胰酶消化 5 min,显微镜下观察大部分细胞收缩变圆。加含有 5% 血清的培养基终止消化,将细胞吹打悬浮,收集细胞,用 PBS 洗 2 遍后加 50 μ L PBS,制成单个细胞悬液,加入 CD14-Percp-Cy5.5 (BD, USA) 抗体 2 μ L,阴性对照管加 2 μ L 同型 (Isotype) 抗体 IgG2a, k-Percp-Cy5.5 (BD, USA)。4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min 后用 PBS 洗 2 遍,去除多余抗体后加入固定液 (2% 多聚甲醛) 重悬细胞,用流式细胞仪 (BD FACS Verse, USA) 检测细胞表面 CD14 表达水平。

1.5 SIV/SHIV 感染猴巨噬细胞

SIVmac251、SIVmac17E-Br 和 SHIV KU-1 毒株由美国国立卫生研究院提供,在武汉大学动物生物安全三级实验室扩增和滴定。感染前,将分化良好的猴巨噬细胞培养基更换为无血清培养液培养 3 h。使用 10^3 TCID₅₀ 的病毒感染细胞,37 $^{\circ}$ C 感染 2 h,培养液洗 3 遍去除残余病毒后,加入含 2% 猴自体血清的新鲜培养液继续培养。每天收集上清,250 μ L 细胞培养上清加入 750 μ L Tri-reagent LS (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) 充分裂解后,保存

表 1 实时定量 PCR 所用引物

Tab. 1 Primer pairs for the real-time PCR

扩增基因 Target gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
TLR4	5'-GAATTTCTACAAAATCCCCGACAA-3'	5'-TGATATGCCCATCTTCAATTG-3'
IFN- β	5'-GGATGGTTTGAGCCTTTTGG-3'	5'-GCGTCCTCCTTCTGGAACG-3'
TNF- α	5'-GGCTCAGGCAGTCAGATCATC-3'	5'-GCTTGAGGCTTTGCTACAACATG-3'
IL-6	5'-TGGCTGAAAAAGATGGATGCT-3'	5'-TTGCTCCTCACTACTCTCAAACCT-3'
IFN- λ_3	5'-AGGGCCAAAGATGCCTTAGAAGA-3'	5'-TCTCAGATTGGATGACTGGTGGG-3'
MxA	5'-AGGAGTTGCCCTTCCCAGA-3'	5'-TCGTTCAACAAGTTTCTCAGTTTCA-3'
SIV GAG	5'-GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC-3'	5'-CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT-3'
GAPDH	5'-GTCTGGAAAAACCTGCCAAG-3'	5'-ACCTGGTCTCAGTGTAGCC-3'

2 结果

2.1 2% 猴自体血清适于体外培养分化猴巨噬细胞

猴 PBMCs 在含 2%、4%、8% 和 10% 的猴自体血清或胎牛血清的 RPMI 1640 中培养 24 h 后,用

于 -80 $^{\circ}$ C,用于病毒载量测定。

1.6 细菌脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激猴巨噬细胞

LPS 购自 InvivoGen 公司 (San Diego, USA)。将 LPS (10 ng/mL 或 100 ng/mL) 加入到分化 7 d 的猴巨噬细胞培养液,4 h 后用 Tri-reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) 提取细胞总 RNA 用于实时定量 PCR 检测细胞因子 mRNA 的表达。

1.7 实时定量 PCR 检测病毒载量与炎症因子 mRNA

使用 NanoDrop2000 (Thermo, USA) 测定细胞总 RNA 浓度,取 1 μ g 总 RNA 用于 mRNA 表达水平检测。使用逆转录 PCR 试剂盒 (Promega, USA) 进行逆转录,采用随机引物 37 $^{\circ}$ C 扩增 1 h,然后 95 $^{\circ}$ C 5min 终止反应,反应产物 4 $^{\circ}$ C 保存。实时定量 PCR 用 SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA) 试剂盒。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 1min,95 $^{\circ}$ C 5 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 10 s,40 个循环。实时定量 PCR 引物序列如表 1 所示。Ct 值相对 GAPDH 进行均一化,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 mRNA 的表达水平。

取 200 μ L 细胞培养上清中提取的病毒 RNA 用于病毒载量测定,逆转录和实时定量 PCR 方法同上。SIV GAG 引物序列如表 1 所示。实时定量 PCR 中同时扩增 SIV GAG 标准品建立标准曲线,计算每毫升上清中 SIV GAG 的拷贝数。

RPMI 1640 洗弃未贴壁细胞,显微镜下观察发现,在含 2% 猴自体血清培养条件下,贴壁单核细胞较多。每 2~3d 更换含有相应比例血清的培养液继续培养,7d 后观察细胞形态判定结果。如图 1 所示,猴自体血清优于胎牛血清,低比例血清优于高比例血清。随着血清比例降低,贴壁细胞增多,且分化的巨

噬细胞形态一致性高。含 2% 猴自体血清的 RPMI 1640 培养条件下,大多数 (>85%) 单核细胞能贴壁,并分化为巨噬细胞。相比而言,含 2% ~ 10% 的胎牛血清或高浓度(4% ~ 10%) 猴自体血清的 RPMI 1640 培养基培养下,猴单核细胞的贴壁和分化较差(如图 1)。分化良好的巨噬细胞贴壁能力强,占据板底大部分区域。胞体形态多样,多数呈长梭形,或不规则形,边缘多不整齐,有的可见伪足(图 2. A、B)。细胞核形态呈圆或椭圆,亦有肾形,位于细胞中央或偏一侧。胞质多少不一,有时可见空泡或包涵体。培养 10d 或更长时间,胞体明显增大,有的呈煎蛋状,有较多的多核细胞形成。

2.2 2% 自体血清培养高纯度的猴巨噬细胞

用流式细胞术检测培养(2% 猴自体血清)第 4 天和第 7 天的猴巨噬细胞表面 CD14 的表达(如图 2. C、D 所示),第 4 天和第 7 天的 CD14 细胞的阳性率分别为(91.7 ± 2.33)% 和(96.4 ± 1.93)%,百分比的均数为三次重复实验的结果。表明用该方法培养 7d 的猴巨噬细胞纯度较高(>96%)。

2.3 SIV 与 SHIV 感染猴巨噬细胞

如图 3. A 所示,SIVmac251、SIVmac17E-Br 和 SHIV KU-1 均能在含 2% 猴自体血清培养的猴巨噬细胞中复制,可产生感染性病毒,感染 4d 后,病毒载量(SIV GAG 拷贝数)可达 10^6 /mL 以上(图 3A)。和未感染的细胞相比,感染 10 d 后的猴巨噬细胞变大,形成大量空泡样多核细胞(图 3B)。

2.4 LPS 诱导猴巨噬细胞产生炎症因子

检测 2% 猴自体血清培养的猴巨噬细胞对 LPS 的敏感性。如图 4 所示,LPS 可诱导猴巨噬细胞的 TLR4、干扰素(IFN- β , IFN- λ_3)、炎症因子(TNF- α , IL-6)和干扰素诱导因子(MxA)显著上升。这种 LPS 的诱导作用和剂量大小成正相关(图 4)。

3 讨论

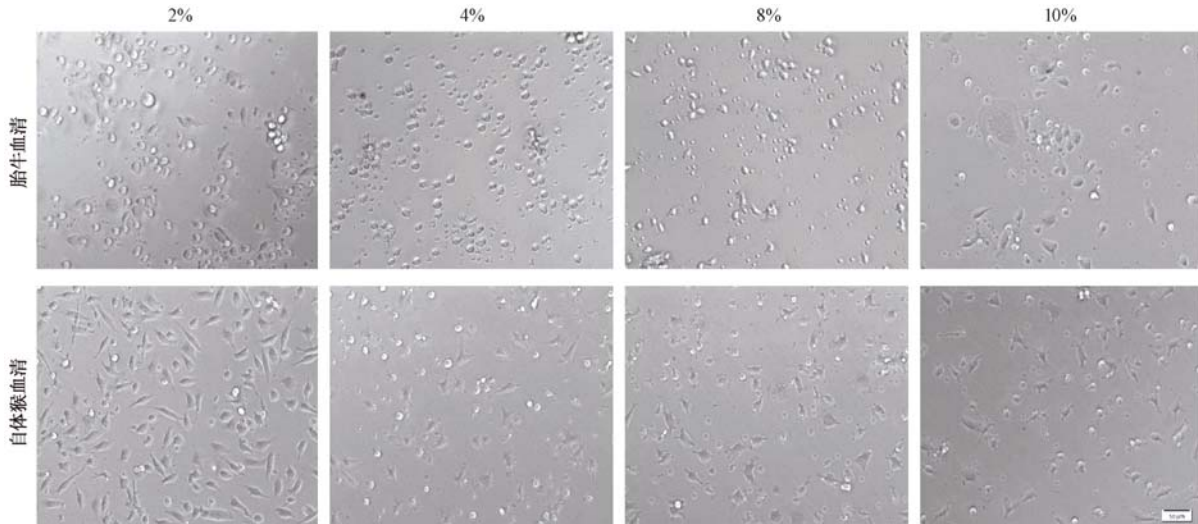
循环于外周血的单核细胞不断补充各组织中的巨噬细胞群。由于人组织来源以及分离其巨噬细胞困难,使得研究人组织器官内巨噬细胞的工作受限。幸运的是,周围血分离出的单核细胞有很强的贴壁能力,易于在体外分化培养成巨噬细胞。这种通过周围血单核细胞分化的巨噬细胞(MDM)已被广泛用于生物医学研究工作中,是一种合适的、被科研工作者接受的原代巨噬细胞模型。体外分化的巨噬细胞可存活 2 个月或更长时间。因此,该模型可用于

观察时间较长的研究项目。我们已利用体外人单核细胞分化的巨噬细胞开展了和 HIV/SIV 病毒学和免疫学有关的科研工作^[10-15]。

体外分选外周血单核细胞的方法较多,如,粘附于培养板、磁珠正选或负选、逆流离心淘洗(counter-flow centrifugation elutriation, CCE)。利用单核细胞粘附性强的特点,使单核细胞粘附于培养器皿底部是一种简易且经济的实验方法。CCE 不需要使用抗体,所得细胞是未标记和非激活的细胞,但该方法操作步骤多,增加细胞被污染的机会。常用的磁珠负选单核细胞富集法需使用多种针对其他细胞的抗体,实验十分昂贵,且细胞纯度不高。磁珠正选单核细胞富集法只需用针对单核巨噬细胞表面标记 CD14 的抗体。该法的优点是得到的细胞纯度较高,实验均一性高,缺点是 CD14 抗体能激活单核巨噬细胞,影响实验结果。总之,抗体包被磁珠法费用高,操作步骤多,容易损失细胞和造成细胞污染。

本文报道了一种优化的体外培养猴单核巨噬细胞的方法。我们的结果显示含有 2% 猴自体血清的 RPMI 1640 培养基适于原代猴单核细胞的贴壁和分化,培养 7d 的猴巨噬细胞具有典型的巨噬细胞特征:其胞体形态多样,多数呈长梭形,贴壁能力强,纯度高,对 LPS 敏感,且对 SIV/SHIV 易感。和已报道的猴巨噬细胞培养方法相比,我们的方法更有优势。如 Sick 等^[16]使用含细胞因子 M-CSF 和 20% 自体血清的培养液培养豚尾猕猴的 PBMCs,7 d 后洗去未贴壁细胞,将培养液更换为 10% 猴自体血清。Rozner 等^[9]报道,含 1% 人血清以及 M-CSF 和 IL-1 β 的 RPMI 1640 可在体外培养分化恒河猴巨噬细胞。尽管这些方法的确能在体外分化培养猴巨噬细胞,但需在培养基中加入细胞生长因子是这些方法的缺点。除了大大增加实验的费用外,这些细胞生长因子(M-CSF 和 IL-1 β 等)能激活巨噬细胞,干扰实验结果。此外,由于人血清中的多种抗原成分可激活或抑制猴巨噬细胞,在培养基中加入人血清会直接或间接地影响实验数据。因此,我们的方法能避免细胞被活化,步骤少,减少污染的机会。由于猴血量有限,每次仅能获得 10 ~ 15 mL 血,我们采用 96 孔或 48 孔板培养,不仅经济实用,而且利于单核细胞贴壁分化,适于开展需要多孔的实验工作。

采用我们的方法时需注意以下事项:(1) 使用 Ficoll 密度梯度法分离 PBMCs,离心时需室温下

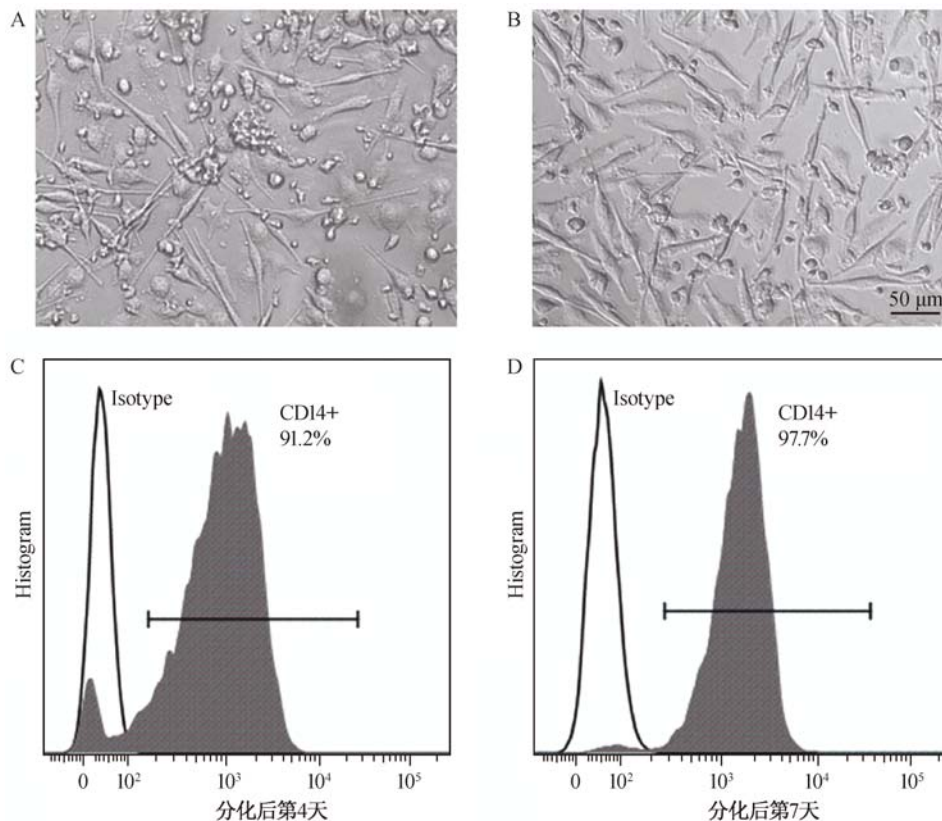


注:用含 2%、4%、8% 和 10% 猴自体血清或胎牛血清的 RPMI 1640 培养基置于 96 孔 (0.8×10^6 个细胞/孔) 或 48 孔 (3×10^6 个细胞/孔) 培养板中的猴 PBMCs, 24 h 后将未贴壁细胞洗弃, 继续培养 7 d 后拍照 (图片比例尺一致, $\times 200$)。

图 1 不同浓度血清对猴单核巨噬细胞分化的作用

Note. PBMCs were plated in 48-well-plate (3×10^6 cells/well) or 96-well-plate (0.8×10^6 cells/well) for 24 h. After the removal of non-adherent cells from the culture, monocytes were cultured in RPMI 1640 supplemented with different proportions (2%, 4%, 8%, 10%) of autologous serum or fetal calf serum (FCS) for 7 days. Image scale is uniform.

Fig. 1 The effect of serum in different concentrations on the differentiation of macaque monocyte-derived macrophages.

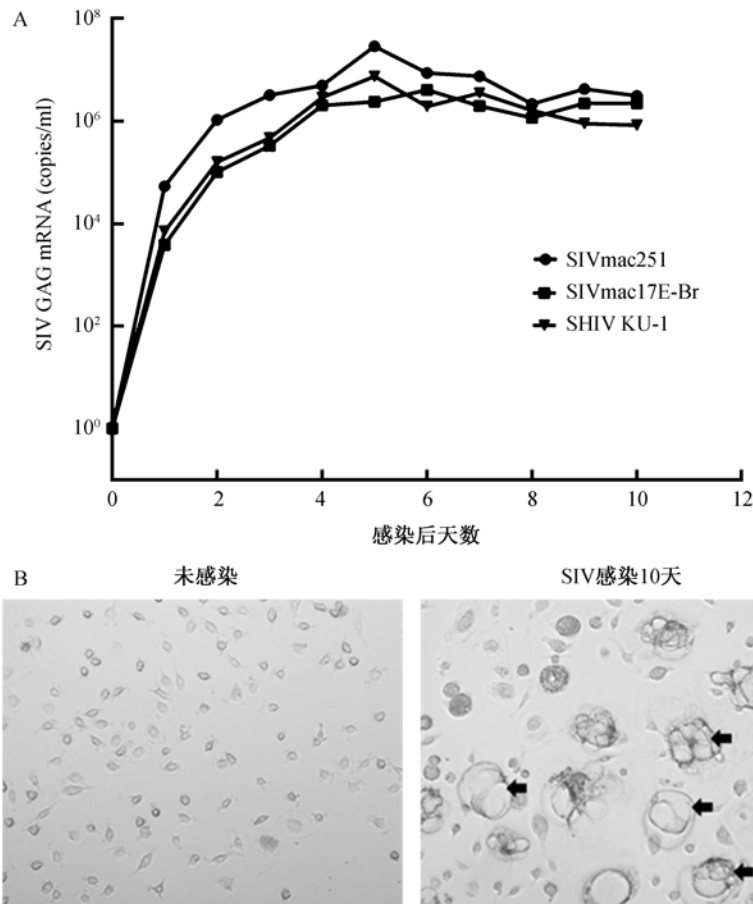


注:含 2% 猴自体血清培养基培养的猴巨噬细胞第 4 天 (A) 和第 7 天 (B) 形态学观察 (图片比例尺一致)。流式细胞术检测第 4 天 (C) 和第 7 天 (D) 的细胞表面 CD14 的表达 ($\times 200$)。

图 2 分化后猴巨噬细胞的形态学观察和 CD14 表达

Note. Macaque monocyte-derived macrophages were cultured in RPMI 1640 supplemented with 2% autologous serum for four (A) or seven (B) days (Image scale is uniform). Flow cytometric analysis of cell surface marker CD14 expression of 4- (C) or 7- (D) day-cultured macaque macrophages. $\times 200$

Fig. 2 Morphology and CD14 expression of differentiated macaque macrophages.

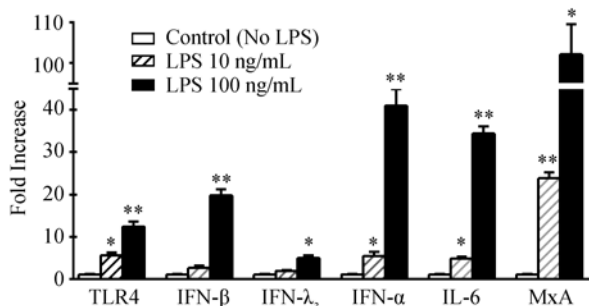


注: (A) SIVmac251, SIVmac17E-Br 和 SHIV KU-1 感染体外分化 7d 的猴巨噬细胞。提取细胞培养上清中的病毒 RNA, 实时定量 RT-PCR 方法检测 SIV GAG 拷贝数。 (B) 未感染和感染 SIVmac17E-Br 第 10 天的猴巨噬细胞的形态学特征 (图片比例尺一致)。SIVmac17E-Br 感染 10d 的猴巨噬细胞可见典型的空泡样多核巨细胞 (黑色箭头所示) ($\times 200$)。

图 3 SIV 或 SHIV 在猴原代巨噬细胞中复制

Note. (A) 7-day-cultured macrophages were infected with SIV strains (SIVmac239, SIVmac17E-Br) or SHIV strain (SHIV KU-1). Viral RNA was extracted from cultured supernatants collected each day post infection, which were subjected to detect SIV gag copies with quantitative RT-PCR. (B) The morphology of uninfected and SIVmac17E-Br infected macaque macrophages was observed and photographed under a light microscope at day 10 post-infection (Image scale is uniform). The black arrows indicate distinct giant syncytium formation.

Fig. 3 SIV or SHIV replication in the primary macaque macrophages.



注: 用 LPS (10 ng/mL 或 100 ng/mL) 处理培养 7 d 的猴巨噬细胞 4h 后收集细胞总 RNA, 实时定量 RT-PCR 检测 TLR4, IFN- β , IFN- λ_3 , TNF- α , IL-6, MxA 和 GAPDH 的 mRNA 表达水平。

图 4 LPS 诱导炎症因子产生

Note. 7-day-cultured macaque macrophages were treated with LPS at indicated doses for 4 h. Total RNA extracted from the cells was then subjected to the quantitative RT-PCR for mRNA levels of TLR4, IFN- β , IFN- λ_3 , TNF- α , IL-6, MxA and GAPDH. The data are expressed as mRNA levels relative (fold) to the control (without LPS treatment, which is defined as 1).

Fig. 4 The induction of inflammatory cytokine expression by lipopolysaccharide.

(22 ~ 25 $^{\circ}$ C) 进行。由于采猴血量有限, 应尽量多收集离心后白膜层细胞, 并采用低速离心 (200 g, 15min) 去除血小板; (2) 由于细胞粘附于容器或细胞结块会导致细胞数减少, 应在细胞培养相关的溶液 (如 PBS) 中加入 EDTA, 减少单核细胞的粘附与结团。 (3) 铺板的细胞密度要适中, 96 孔板每孔 0.8×10^6 个细胞, 48 孔板每孔 3×10^6 个细胞。铺板细胞密度对保证良好的分化结果很重要, 细胞过多, 空间不够, 造成细胞成团块, 不宜贴壁。细胞过少, 细胞分化慢, 不宜成片导致细胞凋亡。此外, 细胞计数应准确, 铺板过程中充分混匀使细胞分散。 (4) 推荐使用 CellBIND Surface 的 96 孔 (Cat: 3300, Corning, USA) 和 48 孔培养板 (Cat: 3338, Corning, USA), 细胞更易粘附。

综上所述, 2% 猴自体血清和无细胞生长因子

的培养条件下,恒河猴外周血单核细胞在体外能分化成具有生物学和免疫学功能的巨噬细胞。由于不使用人或牛异种血清,也不使用细胞生长因子,最大限度地减少了对实验结果的干扰和不利因素。该方法培养的细胞具有典型的巨噬细胞形态学及免疫学特性,适合于需使用恒河猴单核巨噬细胞的科研工作。

参 考 文 献

- [1] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity [J]. *Nature Rev Immunol*, 2005, 5: 953 - 964.
- [2] Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation [J]. *Microb Infect*, 2001, 3: 149 - 159.
- [3] Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14: 123 - 128.
- [4] Aderem A. Phagocytosis and the inflammatory response [J]. *J Infect Dis*, 2003, 187: S340 - S345.
- [5] 孙晓梅, 曹春渝, 高家红, 等. 血细胞分离机大量采集实验猕猴外周血单核细胞方法探讨 [J]. *中国实验动物学报* 2008, 16: 424 - 427.
- [6] Plesner A. Increasing the yield of human mononuclear cells and low serum conditions for in vitro generation of macrophages with m-csf [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 279: 287 - 295.
- [7] Plesner A, Greenbaum CJ, Lernmark Å. Low serum conditions for in vitro generation of human macrophages with macrophage colony stimulating factor [J]. *J Immunol Methods*, 2001, 249: 53 - 61.
- [8] Gersuk G, Hiraoka A, Marr KA. Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human kpb-m15 conditioned medium [J]. *J Immunol Methods*, 2005, 299: 99 - 106.
- [9] Rozner AE, Dambaeva SV, Drenzek JG, et al. Generation of macrophages from peripheral blood monocytes in the rhesus monkey [J]. *J Immunol Methods*, 2009, 351: 36 - 40.
- [10] Wang X, Ye L, Hou W, et al. Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection [J]. *Blood*, 2009, 113: 671 - 674.
- [11] Hou W, Wang X, Ye L, et al. Lambda interferon inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages [J]. *J Virol*, 2009, 83: 3834 - 3842.
- [12] Zhou Y, Wang X, Liu MQ, et al. A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages [J]. *Immunology*, 2010, 131: 40 - 49.
- [13] Ho WZ, Liou J, Song L, et al. Infection of cord blood monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 1992, 66: 573 - 579.
- [14] Bao R, Zhuang K, Liu J, et al. Lipopolysaccharide induces immune activation and SIV replication in rhesus macaques of Chinese origin [J]. *PloS ONE*, 2014, 9: e98636.
- [15] Zhou Y, Bao R, Haigwood NL, et al. SIV infection of rhesus macaques of Chinese origin: a suitable model for HIV infection in humans [J]. *Retrovirology*, 2013, 10: 89.
- [16] Sisk JM, Witwer KW, Tarwater PM, et al. SIV replication is directly downregulated by four antiviral mimas [J]. *Retrovirology*, 2013;10:95.

[收稿日期] 2014-08-08