

不同方法诱导 THP-1 细胞分化效果比较

彭卓颖,丛喆,李想,薛婧*,魏强*

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 优化不同方法刺激 THP-1 细胞定向分化为 M1、M2 巨噬细胞及 DC 细胞,为 M1、M2 和 DC 三种体外细胞模型研究奠定基础。**方法** 首先用 PMA 和 GM-CSF/M-CSF 两种方法刺激诱导 THP-1 细胞分化,再分别添加不同细胞因子诱导其分化为 M1、M2 和 DC 细胞,观察细胞形态的变化,并用流式细胞术检测细胞表面分子的表达情况。**结果** 两种方法刺激细胞 CD 分子表达的整体趋势基本一致。THP-1-M1 细胞表面 CD80 和 CD86 表达量显著增加;THP-1-M2 细胞高表达 CD163 和 CD209;THP-1-DC 细胞 CD14 表达量显著降低,高表达 CD80、CD86 和 CD11c。PMA 刺激后,M1、M2 和 DC 细胞均贴壁生长;GM-CSF/M-CSF 刺激后,只有 DC 细胞部分贴壁生长,M1 和 M2 细胞仍呈悬浮生长。**结论** 两种方法均能成功地诱导 THP-1 细胞向不同细胞亚型分化,但是诱导出来的细胞在形态上存在一定差异,可根据实验需求选择刺激方法。

【关键词】 THP-1;佛波酯;粒细胞巨噬细胞刺激因子/巨噬细胞集落刺激因子;M1 巨噬细胞;M2 巨噬细胞;树突状细胞;分化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017)09-0001-06
doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 09. 001

Comparison of the effects of different treatments on THP-1 cell differentiation

PENG Zhuo-ying, CONG Zhe, LI Xiang, XUE Jing*, WEI Qiang*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC) & Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Medical; Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Remerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To stimulate a human monocytic cell line THP-1 cells to differentiate into M1, M2 macrophages and dendritic (DC) cells by optimization of different methods, and lay the foundation for the study of M1, M2 and DC cell models *in vitro*. **Methods** THP-1 cells were stimulated by PMA and GM-CSF/M-CSF, respectively. Then, they were induced to differentiate into M1, M2 macrophages and DC cells by adding different cytokines, such as LPS, IL-6 and IFN-γ for M1 macrophages, IL-4, IL-13 and IL-6 for M2 macrophages, and IL-4 for DCs. Subsequently, the morphology of cells was observed and the expression of cell surface (CD) molecules was detected by flow cytometry. **Results** After stimulation with the two methods, the trends of CD molecules expression were basically the same. The expression of CD80 and CD86 on the THP-1-M1 cells were increased significantly, and CD163 and CD209 were highly expressed on the THP-1-M2 cells. For THP-1-DC cells, the expression of CD14 was significantly decreased, while the expression of CD80, CD86

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81301437);科技部重大专项(编号:2014ZX10001001-001-004, 2014ZX10001001-002-006)。
【作者简介】 彭卓颖(1992-),女,硕士研究生,从事实验动物病毒学研究工作。E-mail: 18810963239@163.com
【通讯作者】 薛婧(1983-),女,副研究员,硕士生导师,研究方向:病原生物学和免疫学,E-mail: xuejing@cnilas.org; 魏强(1964-),男,研究员,博士生导师,研究方向:实验动物病毒学, E-mail: weiqiang0430@cnilas.org * 共同通讯

and CD11c increased. M1, M2 macrophages and DC cells were adherent after stimulation with PMA. However, DC cells were partially adherent after GM-CSF/M-CSF treatment. M1 and M2 macrophages were also growing in suspension.

Conclusions Both methods used in this study can successfully induce THP-1 cells to differentiate into different subtypes, but there are some differences in the morphology of the induced cells. Appropriate stimulation method can be selected according to the experimental requirements.

[Key words] THP-1 cell line; Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; GM-CSF/M-CSF; M1 macrophage; M2 macrophage; Dendritic cell; Differentiation

单核细胞经细胞因子刺激后,细胞的形态和功能会发生不同的变化,可向不同方向分化成若干亚型巨噬细胞 (macrophage, Mφ) 及树突细胞 (dendritic cell, DC)^[1]。国际上多用佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、粒细胞巨噬细胞刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 和巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 协同其他细胞因子刺激人单核细胞系 THP-1 细胞定向分化,作为体外细胞模型对巨噬细胞和树突状细胞开展相应研究^[1, 2]。本文分别用以上方法刺激 THP-1 定向分化为 M1、M2 和 DC 细胞,比较不同细胞因子组合刺激分化出的同种细胞在形态和细胞表面 CD 分子表达方面的差异,以期为开展巨噬细胞和树突细胞的功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人单核细胞系 THP-1 购自中国医学科学院基础所细胞中心;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、胰酶均购自 Gibco 公司;细胞因子 GM-CSF、IL-6 购自 R&D 公司,IFN-γ、M-CSF、IL-13 和 IL-4 购自 Peprotech 公司,LPS、PMA 购自 Sigma 公司;流式抗体 PE Mouse Anti-Human CD14、FITC Mouse Anti-Human CD163 和 PerCP-CyTM5.5 Mouse Anti-Human CD209 购自 BD 公司,APC Mouse Anti-Human CD11c、FITC Mouse Anti-Human CD80 和 PE Mouse Anti-Human CD86 购自 BioLegend 公司;同型对照抗体 PE Mouse IgG2a、FITC Mouse IgG1、PerCP-CyTM5.5 Mouse IgG2b、APC Mouse IgG1 和 PE Mouse IgG2b 分别购自 BD 和 BioLegend 公司;IC Fixation Buffer 和 10 × Permeabilization Buffer 购自 eBioscience 公司。

zation Buffer 购自 eBioscience 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

THP-1 为悬浮细胞,生长速度较快,在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中培养,细胞浓度一般控制在 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2.2 PMA 诱导 THP-1 细胞定向分化为 M1、M2 和 DC^[1, 2]

取 9×10^6 个 THP-1 细胞接种于 T25 培养瓶内,定期向培养瓶内加入不同细胞因子 (表 1),PMA 终浓度为 50 ng/mL,其余细胞因子终浓度均为 20 ng/mL,第 6 天收集细胞进行流式检测。

1.2.3 GM-CSF/M-CSF 诱导 THP-1 细胞定向分化为 M1、M2 和 DC^[1]

取 7×10^6 个 THP-1 细胞接种于 T25 培养瓶内,定期向培养瓶内加入不同细胞因子 (表 2),其中刺激 DC 分化所使用的 GM-CSF 的终浓度为 100 ng/mL,其余细胞因子终浓度均为 20 ng/mL,第 9 天收集细胞进行流式检测。

1.2.4 流式细胞术检测细胞表面 CD 分子表达量的变化

培养瓶内的细胞经胰酶消化后,用 PBS 洗涤 2 次后重悬,调整细胞浓度为 1×10^7 个细胞/mL,轻轻混匀后加入流式管内,每管 100 μL 细胞悬液。

(1) 胞外染色:每管细胞中加入相应抗体,4℃ 避光孵育 30 min,PBS 洗 2 次,细胞筛过滤后上机。

(2) 胞内染色^[3]:向每个流式管内加入 200 μL IC fixation buffer,轻轻混匀后 4℃ 避光孵育 20 min,随后加入 2 mL 1 × permeabilization buffer 洗 2 次,

表 1 PMA 诱导 THP-1 细胞定向分化方案

Tab.1 Procedure of PMA-induced THP-1 cell differentiation into M1, M2 macrophages and DC cells

第 0 天 (Day 0)		第 3 天 (Day 3)	第 5 天 (Day 5)
THP-1-M1	PMA	换液并加入 LPS、IFN-γ 和 IL-6 Change medium and add LPS, IFN-γ, IL-6	/
THP-1-M2	PMA	换液并加入 IL-4、IL-13 和 IL-6 Change medium and add IL-4, IL-13, IL-6	/
THP-1-DC	PMA, IL-4	换液并加入 IL-4 Change medium and add IL-4	加入 LPS 和 IL-6 Add LPS, IL-6

100 μ L 1 $\times$ permeabilization buffer 重悬细胞后加入相应抗体,轻轻混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,1 $\times$ permeabilization buffer 洗 2 次,PBS 洗 1 次,细胞筛过滤后上机。

1.3 流式分析与数据统计

应用 BD Accuri C6 流式细胞仪进行样本检测,FlowJo v10 进行数据分析,Graphpad 5 软件作图和统计分析,不同组数据间进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 THP-1 细胞经不同细胞因子诱导分化后的形态学变化

正常 THP-1 细胞形态饱满、折光性好,为单个细胞悬浮生长(图 1A)。

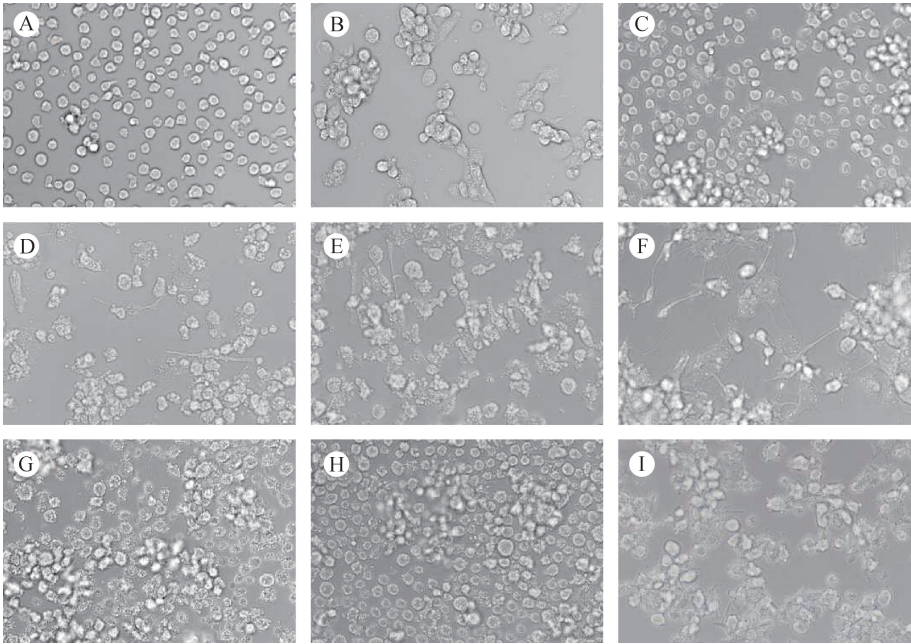
当 THP-1 被 PMA 刺激 48 h 后细胞全部贴壁,且发生明显聚团(图 1B)。随后加入不同细胞因子

诱导细胞定向分化,显微镜下观察发现 THP-1-M1 细胞形态具有多样性,部分细胞呈长梭形(图 1D); THP-1-M2 细胞为多边形,体积有所增加(图 1E); THP-1-DC 细胞贴壁较牢固,体积增大较明显,大多具有细长的树突状结构,LPS 和 IL-6 的加入未对细胞形态产生影响(图 1F)。

当 THP-1 被 GM-CSF/M-CSF 刺激 4 d 后细胞仍呈悬浮生长,部分发生聚团,其中 GM-CSF 所刺激的细胞表面出现非常细小的突起(图 1C),而 M-CSF 所刺激的细胞表面未发生变化。随后加入不同细胞因子诱导细胞定向分化,显微镜下观察发现 THP-1-M1 细胞表面突起增多,胞膜出现褶皱(图 1G); THP-1-M2 细胞表面突起较 THP-1-M1 少,细胞多呈圆形(图 1H);而 THP-1-DC 细胞大部分贴壁生长,形状不规则,伸出许多短小的树突样或伪足样突起,第 8 天加入 LPS 和 IL-6 后细胞形态未发生明显改变(图 1I)。

表 2 GM-CSF/M-CSF 诱导 THP-1 细胞定向分化方案

Tab.2 Procedure of GM-CSF/M-CSF-induced THP-1 cell differentiation into M1, M2 macrophages and DC cells		第 0 天 (Day 0)	第 5 天 (Day 5)	第 8 天 (Day 8)
THP-1-M1	GM-CSF		换液并加入 GM-CSF、LPS、IFN- γ 和 IL-6 Change medium and add GM-CSF, LPS, IFN- γ , IL-6	/
THP-1-M2	M-CSF		换液并加入 M-CSF、IL-4、IL-13 和 IL-6 Change medium and add M-CSF, IL-4, IL-13, IL-6	/
THP-1-DC	GM-CSF, IL-4		换液并加入 GM-CSF 和 IL-4 Change medium and add GM-CSF, IL-4	加入 LPS 和 IL-6 Add LPS, IL-6



注:A:正常 THP-1; B:PMA 刺激后的 THP-1; C:GM-CSF 刺激后的 THP-1; D:THP-1-M1 (PMA);E:THP-1-M2 (PMA); F:THP-1-DC (PMA); G:THP-1-M1 (GM-CSF); H: THP-1-M2 (M-CSF); I: THP-1-DC (GM-CSF)。

图 1 不同细胞因子刺激后 THP-1 细胞的形态学改变($\times 40$)

Note. A: Normal THP-1 cells; B: THP-1 cells stimulated by PMA; C: THP-1 cells stimulated by GM-CSF; D: THP-1-M1 (PMA) cells; E: THP-1-M2 (PMA) cells; F: THP-1-DC (PMA) cells; G: THP-1-M1 (GM-CSF) cells; H: THP-1-M2 (M-CSF) cells; I: THP-1-DC (GM-CSF) cells.

Fig.1 Morphological changes of THP-1 cells stimulated by different cytokines

2.2 THP-1 细胞经不同细胞因子诱导分化后的细胞表面 CD 分子表达的差异

2.2.1 THP-1-M1 细胞表面 CD 分子的表达

正常 THP-1 细胞表面低表达 CD80 [(11.27 ± 2.73)%]。当 PMA 或 GM-CSF 刺激 THP-1 为 THP-1-M1 后,细胞表面的 CD80 显著升高,其表达量分别达到 (77.05 ± 7.28)% 和 (93.10 ± 8.20)% ,*P* 值分别为 0.0069 和 0.0055;两种方法所诱导的 CD80 的表达差异无显著性 (*P* = 0.1744)。

正常 THP-1 细胞表面不表达 CD86。而分化后的 THP-1-M1 细胞高表达 CD86,其表达量分别高达 (78.0 ± 6.93)% 和 (49.65 ± 6.72)% ,*P* 值分别为 0.0043 和 0.0103;两种方法所诱导的 CD86 的表达量差异无显著性 (*P* = 0.0534) (图 2)。

2.2.2 THP-1-M2 细胞表面 CD 分子的表达

正常 THP-1 细胞胞内低表达 CD163 [(15.10 ± 5.66)%]。当分化为 THP-1-M2 后,CD163 的表达量显著升高,其表达量分别为 (53.80 ± 9.90)% 和 (67.15 ± 4.60)% ,*P* 值分别为 0.0408 和 0.0097;两种方法所诱导的 CD163 的表达量差异无显著性 (*P* = 0.2258)。

CD209 在正常 THP-1 细胞表面低表达 [(25.30 ± 7.07)%]。而 THP-1-M2 细胞则高表达 CD209,其表达量分别达到 (93.00 ± 3.39)% 和 (72.70 ± 11.88)% ,*P* 值为 0.0066 和 0.0400;两种方法所诱导的 CD209 的表达量差异无显著性 (*P* = 0.1458) (图 3)。

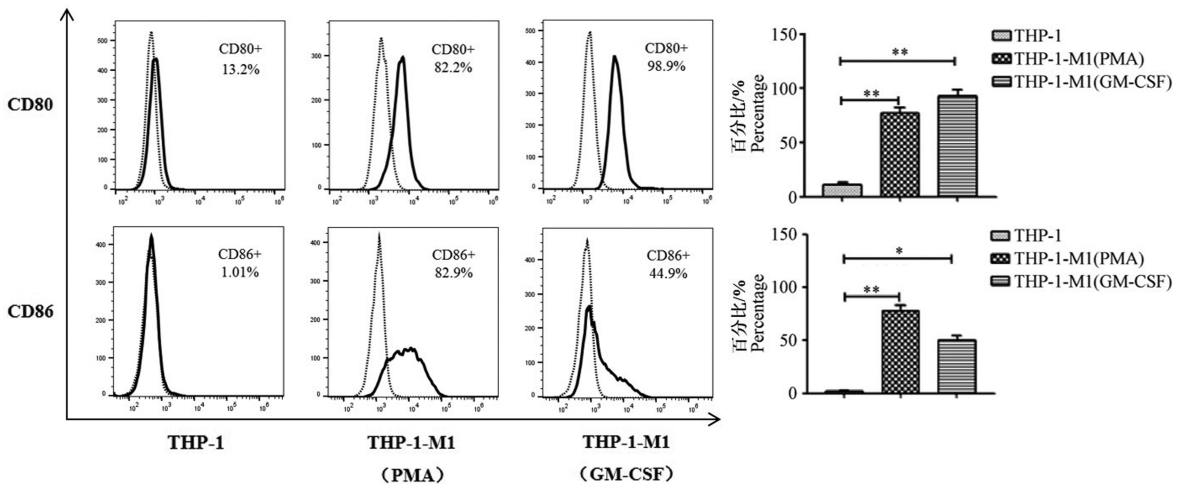
2.2.3 THP-1-DC 细胞表面 CD 分子的表达

正常 THP-1 细胞高表达 CD14 [(89.70 ± 1.41)%]、CD11c [(78.15 ± 11.95)%]、CD80 和

CD86 表达呈阴性。当 PMA 和 GM-CSF 刺激 THP-1 为 THP-1-DC 后,细胞表面的 CD14 显著降低,其表达量分别为 (17.3 ± 2.40)% 和 (20.85 ± 7.28)% (*P* 值分别为 0.0007 和 0.0058)。CD11c 的表达无明显变化,分别为 (58.0 ± 10.04)% 和 (74.95 ± 6.01)% (*P* 值分别为 0.2094 和 0.7673)。CD80 和 CD86 的表达量显著升高,CD80 的表达量分别达到 (39.41 ± 7.48)% 和 (20.56 ± 4.59)% (*P* 值分别为 0.0195 和 0.0302);CD86 表达量分别为 (78.35 ± 4.88)% 和 (73.10 ± 6.79)% (*P* 值分别为 0.0024 和 0.0049)。两种方法所诱导的 CD 分子的表达差异无显著性, *P* > 0.05 (图 4)。

3 讨论

一直以来,单核巨噬细胞和树突状细胞都是固有免疫系统中研究的重点。然而由于其数量少、分离困难^[4,5],使得其研究工作受限。THP-1 是来源于急性单核细胞性白血病患者的一种单核细胞系,高表达 CD14 分子^[6],目前多用来代替原代单核细胞进行相关研究。对于巨噬细胞和树突状细胞,国际上较通用的方法为以 GM-CSF/M-CSF 为主,辅以 IL-4、LPS 等其他相关细胞因子刺激原代单核细胞进行分化,单核细胞系的分化则多用 PMA 进行诱导,然而 GM-CSF/M-CSF 刺激单核细胞系分化的研究比较欠缺。为了明确两种刺激方法诱导单核细胞系分化的差异,本文利用 THP-1 为单核细胞系模型,并在 GM-CSF/M-CSF 和 PMA 两种方法的基础上做了进一步优化^[1],对其诱导 THP-1 细胞的分化效果进行对比。

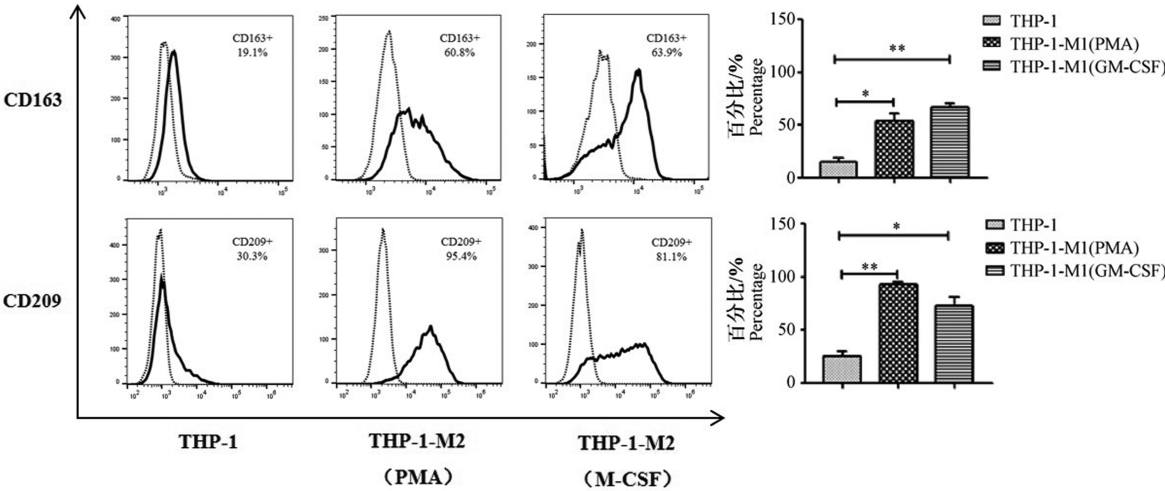


注:“.....”同型对照;“——”CD 分子。与 THP-1 组相比, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01。

图 2 两种方法刺激 THP-1 分化为 THP-1-M1 细胞后 CD 分子的表达情况

Note. “.....” Isotype control; “——” CD molecules. Compared with THP-1 group, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01.

Fig. 2 Expression of CD molecules on THP-1-M1 cells stimulated by different cytokines

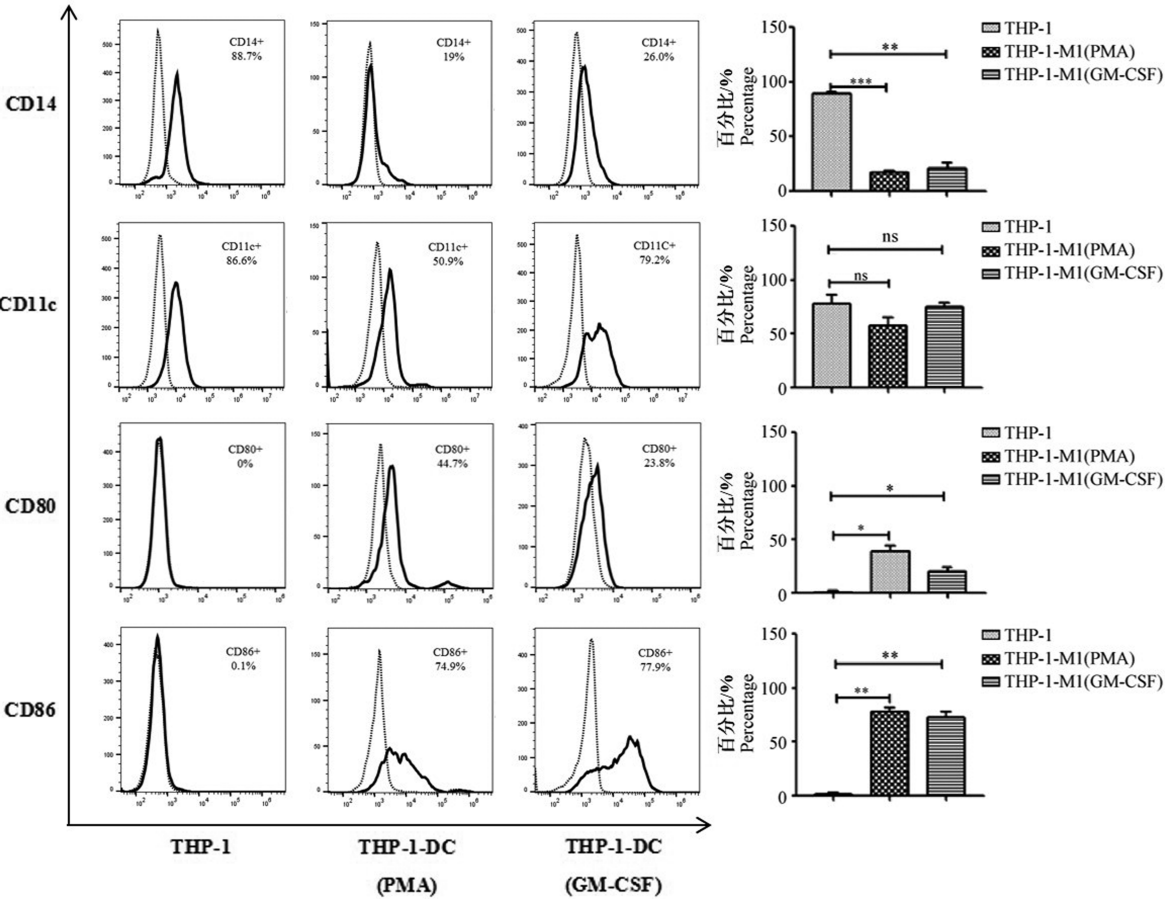


注：“……”同型对照；“——”CD 分子。与 THP-1 组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 3 两种方法刺激 THP-1 分化为 THP-1-M2 细胞后 CD 分子的表达情况

Note: “……”Isotype control; “——”CD molecules. Compared with THP-1 group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 3 Expression of CD molecules in THP-1-M2 cells stimulated by different cytokines



注：“……”同型对照；“——”CD 分子。与 THP-1 组相比，ns: 差异无显著性；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

图 4 两种方法刺激 THP-1 分化为 THP-1-DC 细胞后 CD 分子的表达情况

ote. “……”Isotype control; “——”CD molecules. Compared with THP-1 group, ns: not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig. 4 Expression of CD molecules on THP-1-DC cells stimulated by different cytokines

M1 巨噬细胞表面较典型的分子为 CD80 和 CD86^[1]。当单核细胞分化为 M1 后,细胞表面的协同刺激因子 CD80 和 CD86 的表达量都会增加,此时细胞在免疫反应中对抗原的提呈能力增强^[7]。研究结果发现,THP-1 细胞经 PMA 与 GM-CSF 刺激诱导出的 THP-1-M1 均可高表达这两种 CD 分子,但是 M1 细胞的形态差异较大。PMA 刺激后的细胞贴壁明显,可清晰观察到细胞表面的突起,形态上接近巨噬细胞,但是后期消化极度困难,易破碎,细胞不好再利用;GM-CSF 刺激后的 THP-1-M1 细胞一直为悬浮生长,表面突起不明显,但细胞表面标志性的 CD 分子表达量正常,与 PMA 刺激的 THP-1-M1 细胞没有明显差异。

M2 巨噬细胞高表达 CD163 和 DC-SIGN^[8]。CD163 分子为清道夫受体蛋白,可参与机体多种免疫活动,对正常生理功能有非常重要的作用^[9];DC-SIGN 又被称作 CD209,巨噬细胞表面的 CD209 可识别并结合病毒或细菌表面的病原相关分子模式受体^[10]。本研究中 PMA 与 M-CSF 均可成功诱导出 M2 细胞,高表达 CD163 与 CD209,但与 M1 细胞相同,两种方法刺激分化出的 THP-1-M2 细胞在形态上同样有很大差别。

DC 细胞没有特征性的标志分子,一般会通过细胞表面 CD14、CD80、CD86 和 CD11c 等分子的表达来判断细胞的分化情况。研究结果显示,PMA 与 GM-CSF 所刺激分化出的细胞表面分子的变化与文献中报道一致^[11, 12],CD14 明显下降,高表达 CD80、CD86 和 CD11c。细胞贴壁生长,体积明显增大,大多具有细长的树突状结构。PMA 刺激出的 DC 细胞整体形态及树突均偏细长,而 GM-CSF 刺激出的 DC 细胞偏多边形,树突短粗。

综上所述,GM-CSF/M-CSF 和 PMA 两种方法均可诱导单核细胞系 THP-1 向 M1、M2 型巨噬细胞和 DC 细胞方向分化,所诱导的细胞表面分子的变化趋势较一致,但是在形态学方面差异较大。GM-CSF/M-CSF 诱导出的 M1 和 M2 型巨噬细胞均为悬浮生长,DC 细胞处于半贴壁状态,有利于细胞的获取再利用方面的研究,如流式细胞术检测;PMA 所诱导出的 M1、M2 和 DC 细胞贴壁较牢固,消化困难,但其形态上更接近原代细胞,有利于细胞形态

学方面的研究,如间接免疫荧光染色、激光共聚焦等。因此可以根据实验目的,针对性选择刺激方法,这将有助于我们更好地开展巨噬细胞和树突状细胞的功能研究。

参考文献:

- [1] Zarif JC, Hernandez JR, Verdone JE, et al. A phased strategy to differentiate human CD14⁺ monocytes into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells[J]. *Biotechniques*, 2016, 61(1): 33–41.
- [2] Genin M, Clement F, Fattaccioni A, et al. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 577.
- [3] 吴芳新, 王卫, 丛喆, 等. 艾滋病猴特异性细胞免疫的胞内细胞因子检测方法优化与应用[J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(1): 18–23.
- [4] 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(6): 424–427.
- [5] 桑明, 代明, 周立, 等. 恒河猴外周血单核巨噬细胞体外培养方法的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(1): 18–24.
- [6] Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood[J]. *Blood*, 2010, 116(16): 74–80.
- [7] Kontinen Y T, Pajarinen J, Takakubo Y, et al. Macrophage polarization and activation in response to implant debris: influence by “particle disease” and “ion disease”[J]. *J Long Term Eff Med Implants*, 2014, 24(4): 267–281.
- [8] Zhao M. Macrophage polarization and HIV infection[J]. *Infect Dis Inf*, 2011, 87(4): 599–608.
- [9] 尚艳楠, 薛江东, 马德慧. CD163 分子的研究进展[J]. *中国动物保健*, 2015, 17(4): 68–70.
- [10] McGreal EP, Miller JL, Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors[J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17(1): 18–24.
- [11] Vogelsang P, Karlsen M, Brun JG, et al. Altered phenotype and Stat1 expression in Toll-like receptor 7/8 stimulated monocyte-derived dendritic cells from patients with primary Sjögren’s syndrome[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(4): R166.
- [12] Yang AX, Chong N, Jiang Y, et al. Molecular characterization of antigen-peptide pulsed dendritic cells: immature dendritic cells develop a distinct molecular profile when pulsed with antigen peptide[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86306.

[收稿日期]2016–12–28