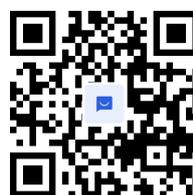
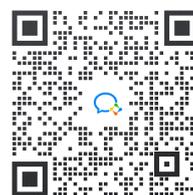




# 免疫细胞系统



加群咨询



微信咨询

# 人树突状细胞

(Human Dendritic Cells , HDC)

树突状细胞 (DCs) 是免疫系统的信使细胞, 通过处理来自病原体的抗原并将抗原呈递给T细胞, 以启动免疫应答。正常人树突状细胞具有一系列特定的表面标记物, 包括CD11c<sup>+</sup>、CD86<sup>+</sup>、CD80<sup>+</sup>、HLADR<sup>+</sup>和CD14<sup>-</sup>。这些细胞在适当的细胞因子 (IL-4和GM-CSF) 的培养条件下可以存活长达7天, 以保持细胞处于未成熟的树突状细胞 (iDCs) 状态。通过添加TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ , 细胞可以进一步分化为成熟的树突状细胞。

## HDC分化培养方式

HDC在培养基中培养4天后, HDC细胞的CD11c和CD86表面抗原阳性率 $\geq 90\%$ 。

操作步骤:

- 1)细胞解冻之前, 将LGM-3™平衡至室温。
- 2)解冻后的细胞 (解冻时间不超过2 min) 转移至50 ml离心管中, 并用LGM-3™缓慢稀释至25 ml, 400 $\times$ g室温离心10 min。
- 3)吸除上清培养基, 用LGM-3™重新悬浮细胞, 使其达到适当的密度, (推荐密度为2~5 $\times 10^4$ cells/cm<sup>2</sup>) 。
- 4)添加细胞因子轻柔混匀后加入至培养容器中 (IL-4 (50 ng/ml) 和GM-CSF (50 ng/ml) )。并放于细胞培养箱中培养4天后便可用于实验。

生长条件: 在CO<sub>2</sub>浓度为5%, 温度为37 $^{\circ}$ C, 相对湿度 (RH) 为95%的细胞培养箱中培养。

## HDC培养材料 (Lonza)

Product name	Size	Catalog Number
Human Dendritic Cells	$\geq 2.5 \times 10^6$ cells	CC-2701
LGM-3™ Lymphocyte Growth Medium-3	500 mL	CC-3211

# 人外周血单核细胞

(PBMC)

外周血单个核细胞 (PBMC) 是一种混合的单核细胞群体。可以进一步纯化以分离出单个细胞类型, 如自然杀伤细胞、T细胞和B细胞。此外, PBMC是单核细胞的丰富来源, 可以通过与各种细胞因子的培养来使其分化为巨噬细胞或树突状细胞。

## 培养方式

操作步骤:

- 1)将LGM-3™培养基平衡至室温。添加DNase I (20 U/ml)。
- 2)解冻后的细胞 (解冻时间不超过2 min) 转移到50 ml离心管中。
- 3)向离心管中加入1 ml培养基后, 将解冻后的细胞转移至离心管中。逐滴加入培养基至离心管中直到总体积达到50 ml, 并每次加入培养基后轻轻旋转离心管。
- 4)室温200×g离心15 min。
- 5)小心地用移液管去除上清 (保留2 ml)。轻轻悬浮细胞沉淀并计数。
- 6)用LGM-3™重新悬浮细胞, 使其达到适当的密度 (推荐密度为 $1\sim 5\times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>) 并加入培养容器中, 置于细胞培养箱中培养 (可根据实验需求添加细胞因子)。

生长条件: 在CO<sub>2</sub>浓度为5%, 温度为37°C, 相对湿度 (RH) 为95%的细胞培养箱中培养。

## hPBMC培养材料 (Lonza)

Product name	Size	Catalog Number
Peripheral Blood Mononuclear Cells (hPBMC)	$\geq 5\times 10^7$ cells	CC-2702
LGM-3™ Lymphocyte Growth Medium-3	500 mL	CC-3211

# 人CD4+ T细胞

(CD4+ T)

CD4+ T细胞也被称为辅助T细胞，因为它们对免疫系统中的其他细胞起着调节作用，促进免疫应答的各个方面，包括免疫球蛋白亚型转换和抗体应答的亲和力成熟，巨噬细胞的激活以及自然杀伤细胞和细胞毒性T细胞的活性增强。

## 培养方式

操作步骤：

- 1)将含有10% FBS或1% BSA的培养基室温平衡。将细胞置于37°C的水浴中解冻（不超过2 min）。用70%乙醇擦拭瓶子外部。
  - 2)向50 ml离心管中加入1 ml培养基后，将解冻后的细胞转移至离心管中，少于100万的个细胞可使用15 ml离心管）。
  - 3)逐滴加入培养基至细胞悬液中，滴加过程中旋转离心管，直到总体积达到5 ml（约3 min）。
  - 4)用巴氏管按1 ml到2 ml量缓慢加入的培养基，直到达到离心管的总体积，并在每次加入培养基的过程中轻轻旋转（约5-10 min）。
  - 5)室温200×g离心15 min。
  - 6)小心地用移液管除去大部分上清液并保存在第二个管子中，留下少量液体以保持细胞沉淀不被干扰。轻轻悬浮细胞沉淀。如果使用50 ml离心管，请将细胞转移到15 ml离心管中，并用5 ml培养基冲洗50 ml离心管并慢慢加入5 ml到细胞悬浮液中并轻轻旋转。
  - 7)用巴氏管按1 ml到2 ml量缓慢加入培养基，直到达到离心管总体积15 ml，并在每次加入培养基的过程中轻轻旋转。
  - 8)室温200×g离心15 min。
  - 9)小心地用移液管除去上清液（保留2 ml）。轻轻悬浮细胞沉淀并计数。
  - 10)用LGM-3™重悬细胞沉淀以达到合适的细胞密度，可根据实验需求添加细胞因子。
- 生长条件：在CO<sub>2</sub>浓度为5%，温度为37°C，相对湿度（RH）为95%的细胞培养箱中培养。

## CD4+T培养材料 (Lonza)

Product name	Size	Catalog Number
Peripheral Blood CD4 <sup>+</sup> T Cells	≥10 <sup>7</sup> cells	2W-200
LGM-3™ Lymphocyte Growth Medium-3	500 mL	CC-3211

# 人淋巴管内皮细胞

(Human Lymphatic Endothelial Cells, HLEC)

淋巴系统是免疫系统的重要组成部分。它有助于维持组织内稳态，包括间质蛋白运输、组织液平衡和细胞免疫的发育。淋巴结分布在整个淋巴系统中，含有大量的淋巴细胞、巨噬细胞和抗原呈递细胞，共同启动初级免疫反应。

人淋巴管内皮细胞分离自淋巴管组织，是衬覆于淋巴管内表面的一种单层扁平上皮，构成淋巴管壁的主要结构，参与维持体液平衡，调节淋巴细胞再循环、机体的免疫反应和组织液及蛋白质的运输。皮质中的特化淋巴管内皮细胞 (LEC) 通过吸引循环中的血管内淋巴细胞，协助进行初级免疫反应。此外，LEC负责促进血管内淋巴细胞的向网状网迁移，使淋巴细胞可以与抗原呈递细胞相互作用。近年研究表明，LEC在伤口愈合、淋巴管水肿和炎症扩散等病理过程中起重要作用，而且与肿瘤转移密切相关。

## 培养方式

培养瓶：纤连蛋白 (Bovine Plasma Fibronectin, 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 包被培养瓶。

培养基：HLEC用提供的ECM完全培养基 (包含基础培养基、5% FBS、1% ECG和1% P/S) 培养。

操作步骤：

1)包被纤连蛋白 (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 培养瓶的准备 (T-75培养瓶)：将5 mL无菌的Dulbecco's磷酸盐缓冲盐 (DPBS) 与150  $\mu\text{L}$ 纤连蛋白原液混匀后加入到T-75培养瓶中，将培养瓶放置在37°C的孵育箱中过夜 (或至少2小时)。在铺细胞前将未凝固纤连蛋白溶液吸出 (可重复使用2次)，加入20 mL ECM完全培养基 (基础培养基、FBS、FGS和P/S按比例混合配制)。

2)将HLEC细胞量为5 x 10<sup>5</sup>cells的冻存管放入37°C水浴中，待细胞融化后用75%酒精进行表面消毒后，转移至细胞操作台。小心地取下冻存管盖子 (不要接触内螺纹)。轻轻地重新悬浮并将小瓶中的内容物放入37°C平衡、纤连蛋白包被的培养瓶中，交叉交叉法轻柔平晃培养瓶，使细胞分散均匀。(注：不建议在解冻后对细胞进行稀释和离心，因为这些与培养物中残留DMSO的作用相比，这些作用对细胞的损伤更大；将HLEC置于纤连蛋白包被的培养瓶中，促进生长同样重要。)

换液：培养开始后16小时内不要干扰培养。次日更换培养液，去除残留的DMSO和未贴壁细胞。之后每三天更换一次培养基，直到培养达到大约70%的密度。一旦培养达到大约70%的密度，每隔一天更换一次培养基，直到培养达到大约90%的密度。

传代：当细胞密度达到90%时进行传代。

1)将T/E、包被培养皿、DPBS、培养基提前置于室温平衡 (不建议37°C加热)。

2)弃除旧培养基，并用DPBS清洗细胞后吸除加入8 mL DPBS和2 mL 0.05% T/E solution 轻柔晃动培养瓶后放入37°C培养箱 (注：原代细胞传代时请勿使用未稀释的胰蛋白酶)，一段时间后镜下观察，待细胞完全变圆、脱落，轻轻拍打底部和侧面，加入1 mL FBS，将细胞悬液转移至15 mL离心管中，1000 rpm离心5 min，用新培养基重悬细胞沉淀后计数，根据5000-7000 cells/cm<sup>2</sup>的密度传代至预先用Bovine Plasma Fibronectin包被的培养皿中。

生长条件：在CO<sub>2</sub>浓度为5%，温度为37°C，相对湿度 (RH) 为95%的细胞培养箱中培养。

## HLEC培养材料 (Sciencell)

Product name	Size	Catalog Number
Endothelial Cell Medium (ECM)	500 mL	1001
Fetal bovine serum (FBS)	25 mL	25
Endothelial cell growth supplement (ECGS)	5 mL	1052
Penicillin/Streptomycin Solution (P/S)	5 mL	503
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup> free)	500 mL	303
Bovine Plasma Fibronectin	1 mg/mL	8248
Fetal Bovine Serum (FBS)	500 mL	500
Trypsin/EDTA solution, 0.05%(T/E)	100 mL	183

### 参考文献

- [1] Kaldjian EP, Gretz JE, Anderson AO, Shi Y, Shaw S. (2001) "Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix." *Int Immunol.* 13: 1243-53.
- [2] Willard-Mack CL. (2006) "Normal structure, function, and histology of lymph nodes." *Toxicol Pathol.* 34: 409-24.

# 人淋巴成纤维细胞

(Human Lymphatic Fibroblasts, HLF)

成纤维细胞是起源于胚胎中胚层的间充质细胞，广泛用于各种细胞和分子研究，适用于从基因转染到微注射等各种操作。成纤维细胞分泌富含I型和/或III型胶原的非刚性细胞外基质。研究表明，不同器官中的成纤维细胞具有异质性。在淋巴组织中，成纤维细胞构建了一个独特导管系统，其在调节免疫应答和组织液体稳态方面起着基础性的作用。

## 培养方式

培养瓶：PLL（多聚-L-赖氨酸）包被的培养瓶。

培养基：HLF用提供的FM完全培养基（包含基础培养基、2% FBS、1% FGS和1% P/S）培养。

操作步骤：

1)包被PLL (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 培养瓶 (T-75培养瓶) 的准备：将10 mL无菌水加入到T-75培养瓶中，加入15  $\mu\text{L}$  PLL原液，轻轻吹匀后将培养瓶放置在37°C的孵育箱中过夜（或至少1小时）。

2)无菌水清洗包被PLL的T-75 2次，加入20 mL FM完全培养基（基础培养基、FBS、FGS和P/S按比例混合配制），将解冻后的HLF加入至包被的T-75中（推荐细胞密度为5000 cells/ $\text{cm}^2$ ），十字交叉法轻柔摇晃培养瓶使细胞分布均匀，将培养瓶放入细胞培养箱中。（注：不建议在解冻后稀释和离心细胞，因为这些操作对细胞的伤害比培养中残留的二甲基亚砜（DMSO）的影响更大。同时，细胞在PLL包被培养瓶中有助于促进细胞附着。）

换液：为了获得最佳结果，在培养开始后至少16小时内不要干扰培养。第二天更换培养基，以去除残留的二甲基亚砜和未附着的细胞，之后每隔三天更换一次培养基，直到培养达到约70%的密度，一旦培养达到约70%的密度，每隔一天更换一次培养基，直到培养达到约90%的密度。

传代：当细胞密度达到90%时进行传代。

1)将T/E、包被培养瓶、DPBS、培养基提前置于室温平衡（不建议37°C加热）。

2)弃除旧培养基，并用DPBS清洗细胞后吸除加入5 mL DPBS和5 mL 0.05% T/E solution 轻柔晃动培养瓶后放入37°C培养箱（注：原代细胞传代时请勿使用未稀释的胰蛋白酶），一段时间后镜下观察，待细胞完全变圆、脱落，轻轻拍打底部和侧面，加入2 mL FBS终止消化，将细胞悬液转移至15 mL离心管中，1000 rpm离心5 min，用新培养基重悬细胞沉淀后计数，根据5000 cells/ $\text{cm}^2$ 的密度传代至预先用PLL包被的培养瓶中。

生长条件：在CO<sub>2</sub>浓度为5%，温度为37°C，相对湿度（RH）为95%的细胞培养箱中培养。

## HLF培养材料 (Sciencell)

Product name	Size	Catalog Number
Fibroblast Medium (FM)	500 mL	2301
Fetal bovine serum (FBS)	10 mL	10
Fibroblast growth supplement (FGS)	5mL	2352
Penicillin/streptomycin solution (P/S)	5 mL	503
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup> free)	500 mL	303
Fetal Bovine Serum (FBS)	500 mL	500
Trypsin/EDTA solution, 0.05% (T/E)	100 mL	183
Poly-L-lysine (PLL)	10 mg/mL	413

### 参考文献

- [1] Gabbiani G, Rungger-Brandle E. (1981) "The fibroblast." In Glynn LE, Handbook of Inflammation, Vol. 3: Tissue Repair and Regeneration (pp 1-50). Amsterdam: Elsevier.
- [2] Roozendaal R, Mebius RE, Kraal G. (2008) "The conduit system of the lymph node." Int Immunol. 20: 1483-7.