

李玲, 祝博森, 朱婷, 等. 鸭骨髓源树突状细胞的诱导培养及功能分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 61-65.

LI L, ZHU B S, ZHU T, et al. Induced cultivation and functional analysis of duck bone marrow-derived dendritic cells [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 61-65.

鸭骨髓源树突状细胞的诱导培养及功能分析

李玲, 祝博森, 朱婷, 钟睿, 郭子杰, 李睿婷, 洪伟鸣, 徐海

(江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 旨在建立鸭骨髓源树突状细胞 (DC) 体外诱导培养方法, 分析 DC 基本生物学功能。在无菌条件下分离鸭骨髓单核细胞, 优化粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和白细胞介素 4 (IL-4) 工作浓度, 在体外进行诱导培养, 然后通过形态学观察、吞噬活性检测、表面标志物流式鉴定、分泌细胞因子和刺激淋巴细胞增殖能力的测定, 对制备的 DC 进行形态和生物功能评价。结果: 添加 20 ng/mL 的 IL-4 和 40 ng/mL 的 GM-CSF 可以诱导出高吞噬活性的 DC, 诱导培养后 3 d 可见菱形、有纤突的细胞; 经脂多糖 (LPS) 刺激成熟的 DC, 呈现典型的树突状结构, 细胞表面 CD11c、CD80 和 MHC II 分子表达量分别为 80.08%、81.27% 和 91.47%; DC 培养体系中白细胞介素 2 (IL-2)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 分泌量随着培养时间延长而增加, 并在成熟后分泌量显著升高 ($P < 0.05$); CCK-8 法检测结果显示成熟后的 DC 以 1:5 比例与淋巴细胞混合培养, 能够显著刺激淋巴细胞增殖。本试验成功建立鸭骨髓源 DC 体外诱导培养方法, 制备细胞具备了树突状细胞的基本生物学功能。

关键词: 鸭; 树突状细胞; 体外培养; 功能分析

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)04-0061-05

Induced cultivation and functional analysis of duck bone marrow-derived dendritic cells

LI Ling, ZHU Bosen, ZHU Ting, ZHONG Rui, GUO Zijie, LI Ruiting, HONG Weiming, XU Hai

(Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

Abstract: To establish a method for inducing cultivation of duck bone marrow-derived dendritic cells (DC) *in vitro* in order to analyze the basic biological functions of DC, duck bone marrow monocytes were isolated under sterile conditions, and the working concentration of GM-CSF and IL-4 was optimized so that to co-induce cultivation of DC. Then, the prepared DC underwent a series of identification, such as observing the morphology of DC under optical microscope, analyzing their surface markers by flow cytometry, detecting the secretion of cytokines with ELISA kit, and determining the ability to stimulate lymphocyte proliferation with the CCK-8 method. The results showed that the DC with high phagocytic activity could be induced under the condition of 20 ng/mL IL-4 and 40 ng/mL GM-CSF. The rhomboid cells with surface spike could be seen after 3 days of cultivation inducing. Mature DC with a typical dendritic structure was obtained after LPS stimulation; meanwhile, the expression levels of surface marker molecules CD11c, CD80 and MHC II were achieved by 80.08%, 81.27% and 91.47%, respectively. Additionally, the IL-2 and IFN- γ that secreted in the culture system increased significantly ($P < 0.05$). Finally, the CCK-8 assay results showed that mature DC were mixed with lymphocytes at a ratio of 1:5, which could significantly stimulate cell proliferation. To sum up, the inducing cultivation method of duck bone marrow-derived DC was successfully established *in vitro* in this study, and the prepared cells possessed the basic biological functions of dendritic cells.

Keywords: duck; dendritic cell; *in vitro* culture; function analysis

自从上世纪 70 年代 Steinman 等^[1]发现树突状细胞 (dendritic cell, DC) 以来, 研究人员对 DC 及其功能的认知不断深入, 作为机体最重要的专职抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC), DC 在启动获得性免疫和维持免疫耐受方面发挥重要作用, 同时也

是连接先天免疫与获得免疫之间的重要桥梁^[2-3]。根据 DC 的来源、功能及其表面标志物的不同, 可分为经典 DC、浆细胞样 DC 和单核细胞来源 DC^[4-5]。根据抗原的来源和性质, DC 主要通过 MHC I、II 类和交叉提呈途径对抗原进行加工和递呈。内源性抗原被 DC 降解成抗原多肽并装载于 MHC I 类分子, 提呈给 CD8⁺ T 细胞, 以诱导细胞免疫为主; 而外源性抗原通过吞噬、胞饮、受体介导等内吞作用被 DC 摄取, 加工后装载到 MHC II 类分子, 提呈给 CD4⁺ T 细胞,

收稿日期: 2023-04-14; 修回日期: 2024-01-20

基金项目: 江苏农牧科技职业学院院级课题项目 (NSF2023ZR13)

第一作者: 李玲, 女, 硕士, 讲师, 主要从事动物疾病防治方面的工作, E-mail: ll20220215@163.com。

主要激发体液免疫^[3,6]。

虽然 DC 在机体内分布较为广泛，但细胞的实际数量小，且难以与其他类型细胞进行有效地分离纯化^[7]，因此需要建立体外培养方法来获得大量高纯度的 DC，从而便于开展生物学、免疫学以及医学等领域的研究工作。目前，体外培养哺乳动物 DC 的技术已相对成熟，鼠源、猪源和人源 DC 均有成功报道的案例^[8-10]。而家禽 DC 体外培养的报道相对较少，仅见付佳等^[11]、张淑君等^[12]利用白细胞介素 4 (IL-4)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 成功诱导培养出鸡骨髓源 DC。由于缺乏鸭源的诱导因子以及鸭 DC 表面标志物特异性二抗，制约了鸭 DC 诱导培养方法的建立及后续鉴定工作的开展。因此，建立鸭 DC 体外诱导培养方法对进一步研究其生物学功能及鸭其他相关疾病的研究工作均具有重要意义。

本研究尝试利用鼠源的重组 IL-4、GM-CSF 作为诱导因子，诱导鸭骨髓源单核细胞向 DC 定向分化，从而建立鸭骨髓源 DC 的体外培养方法，并结合形态学观察、DC 表面标志物检测以及生物学功能测定对制备的 DC 做进一步分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

SPF 鸭胚购于山东昊泰实验动物繁育有限公司，本实验室自行孵化，并饲养至 7 日龄用于后续试验。

重组鼠 IL-4 (货号 214-14, PeproTech 公司)，重组鼠 GM-CSF (货号 315-03, PeproTech 公司)，PE Anti-CD11c 抗体 (货号 ab210309, Abcam 公司)，FITC Anti-CD86 抗体 (货号 ab2342237, Abcam 公司)，FITC Anti-MHC II 抗体 (货号 ab24882, Abcam 公司)，淋巴细胞分离液和配套分离管 (天津灏洋公司)，CCK-8 溶液 (货号 CA1210, Solarbio 公司)，RPMI 1640 培养液和胎牛血清 (美国 Gibco 公司)，脂多糖 (LPS) (货号 L5293, Sigma 公司)，鸭白细胞介素 2 (IL-2) 和鹅 γ 干扰素 (IFN- γ) (南京森贝伽生物科技有限公司)，mRNA 提取试剂盒及分子生物学 (大连宝生物公司)。其余试剂均为分析纯。

光学倒置显微镜 (日本尼康公司)，流式细胞仪 (美国 BD 公司)，ELISA 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)，台式离心机 (美国 Beck-man 公司)，荧光定量 PCR 仪 (美国 ThermoFisher 公司)。

1.2 鸭骨髓细胞的分离培养

翅静脉注入空气处死 7 日龄雏鸭，然后浸泡于 75% 酒精 2~5 min，转至无菌水中浸泡 1 min 以去除酒精。在洁净工作台内剥离出所有股骨和胫骨，剔除

骨头上粘连的肌肉组织，再浸泡于含 2% 双抗的 PBS 中 5 min。剪去骨头两端，用无菌 PBS 反复冲洗出骨髓至平皿中，直至骨髓腔变白。收集骨髓悬液，经 200 目尼龙网过滤小碎片和肌肉组织。滤过液用 PBS 洗涤 2 次并重悬至 3 mL，按照等体积比将骨髓细胞缓缓加入预先装有淋巴细胞分离液的离心管中，1 500 r/min 离心 25 min，小心吸取中间白雾层细胞至另一离心管中，PBS 洗涤 2 次，用 3 mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬细胞，台酚蓝染色计数并计算细胞活力。

1.3 DC 诱导分化条件的优化

如表 1 所示，选择血清、IL-4 和 GM-CSF 这 3 个因素，每个因素对应 2 个浓度水平，设计正交试验，对比 A、B、C、D 共 4 个培养组中 DC 的吞噬能力。用 RPMI 1640 培养液调整制备的骨髓单核细胞浓度至 2×10^5 个/mL，2 mL 每孔铺细胞至 6 孔板中，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中持续培养。每隔 1 d 更换 50% 的培养液，同时补足工作浓度的 IL-4、GM-CSF，并于诱导培养后的第 5 天加入工作浓度为 1 μ g/mL 的 LPS，刺激 48 h 后收集细胞。诱导培养期间，用光学倒置显微镜观察细胞形态变化并拍照记录。

表 1 细胞培养条件优化

分组	血清/%	IL-4/ (ng · mL ⁻¹)	GM-CSF/ (ng · mL ⁻¹)
A	10	20	30
B	10	30	40
C	15	20	40
D	15	30	30

1.4 DC 吞噬功能的测定

参照文献 [13]，分别在诱导培养后第 1、3、5、7 天从 4 个培养组收集细胞，计数后调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL，转移 500 μ L 细胞至 12 孔细胞板，加入等体积 0.1% 中性红生理盐水溶液，37 °C 孵育 2 h，收集细胞并用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，加入 500 μ L 1% SDS 溶液，室温作用 2 h 裂解细胞，取 100 μ L 至 ELISA 板中，并设置 3 个重复，测定波长 570 nm 处吸光值，以 OD 值表示 DC 的吞噬能力。

1.5 流式检测 DC 表面标志物

采用最佳培养条件，收集培养至第 7 天的 DC，1 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液，用 PBS 缓冲液重悬细胞，并调整细胞浓度至 5×10^5 个/mL；调整未经诱导培养的骨髓单核细胞至相同浓度。分别将 2 种细胞分成 4 等份，取其中 3 份分别加入工作浓度的抗

CD11c、CD80 和 MHC II 荧光二抗，室温避光孵育 30 min，另 1 份不做处理用作空白对照。孵育后的细胞用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次（1 000 r/min 离心 5 min），最后用 200 μ L PBS 重悬细胞，经流式细胞仪检测 DC 表面标志物的表达情况。

1.6 DC 培养上清液中细胞含量测定

选择最佳培养条件，分别在诱导培养第 1、3、5、7 天细胞中收集 200 μ L 培养配液，5 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。根据细胞因子检测试剂盒操作说明书，分别测定 DC 培养上清液中 IL-2 和 IFN- γ 的含量。

1.7 同种异体混合淋巴细胞反应

分离雏鸭外周血淋巴细胞^[14]，调整细胞浓度并以每 100 μ L 1×10^5 个接入 96 孔板作为应答细胞。诱导培养 DC 至第 5 天，将细胞等分成 2 组，其中 1 组添加工作浓度的 LPS 来促进 DC 成熟，另 1 组不做任何处理。48 h 后分别收集 2 组 DC 作为刺激细胞。按照 1:1、1:5 和 1:10 的比例混合刺激细胞和应答细胞，置于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 48~72 h，每个样品设置 3 个重复，并同时设置应答细胞、刺激细胞的对照。培养结束后，每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液，继续孵育

4 h，读取 450 nm 处吸光值 (OD_{450})。按照公式计算刺激指数 (SI)， $SI = (\text{试验组 } OD_{450} \text{ 值} - \text{刺激细胞对照 } OD_{450} \text{ 值}) / \text{应答细胞 } OD_{450} \text{ 值}$ 。

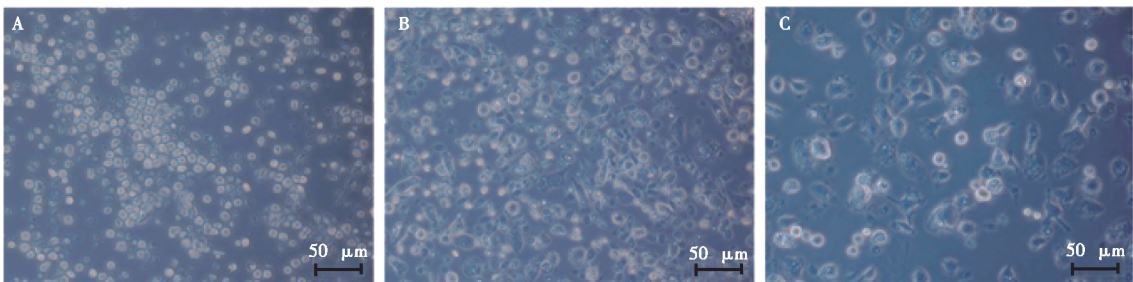
1.8 数据统计和分析

采用 SPSS 19.0 软件包对数据进行分析，One-way ANOVA 法检验差异显著性，试验结果以“平均数 \pm 标准差”表示， $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 体外培养鸭骨髓源 DC 形态观察

从鸭骨髓中分离的单核细胞经 GM-CSF 和 IL-4 诱导后逐渐向 DC 定向分化。每天于倒置显微镜下观察细胞形态变化，结果显示：刚分离的骨髓单核细胞呈球状，直径较小自然沉降于细胞板底部，轻轻晃动即重新悬浮。诱导培养至第 3 天，部分细胞贴壁、拉伸，可见短小刺突（图 1A）；继续培养至第 5 天，大部分细胞贴壁生长，且以菱形结构为主，刺突增多（图 1B）；经 LPS 刺激后，DC 趋于成熟且呈多形性，刺突明显增多且粗壮（图 1C）。经诱导分化，体外培养的细胞形态上呈现出典型的 DC 特性，初步说明已成功培养出目的细胞。



A、B、C. 分别为诱导培养第 3、5 和 7 天的细胞形态。

图 1 鸭骨髓源 DC 培养过程中形态变化

2.2 不同培养体系中 DC 吞噬能力的比较

如图 2 所示，用 15% 胎牛血清、20 ng/mL IL-4 和 40 ng/mL GM-CSF 的 C 组所诱导的 DC 吞噬能力最强。此外，随着诱导培养天数的增加，其 DC 吞噬能力亦相应增强，并在培养后第 5 天达到高峰；而 LPS 刺激熟化 48 h 后的 DC，其吞噬能力有所下降。上述吞噬能力的差异，间接说明通过优化诱导培养条件可以提高单位时间内 DC 的活力和数量，且成熟后的 DC 吞噬能力较成熟前略有下降。

2.3 DC 表面标志物检测

分别用抗鸡源、鼠源 DC 表面标志物的荧光抗体标记制备的鸭骨髓源 DC，经过流式细胞仪检测发现，诱导分化至第 7 天的 DC 表面标志物的表达量（图

3D、E、F）较起始的骨髓单核细胞（图 3A、B、C）有显著上调，DC 表面标志物 CD11c、CD80、MHC II 的表达量分别为 80.08%、81.27% 和 91.47%。该结果表明成功诱导培养出 DC，且具有较高的纯度。

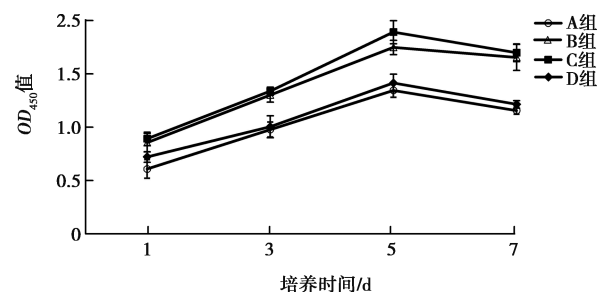
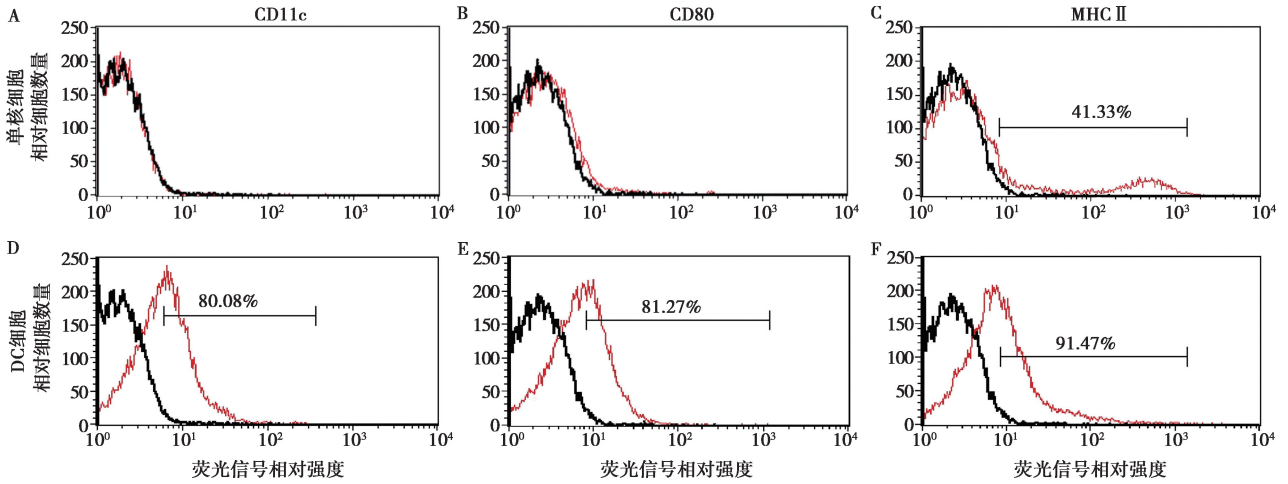


图 2 不同培养条件的 DC 吞噬能力比较



注：黑色线为空白对照检测曲线，红色线为检测曲线。

图3 培养5 d后鸭骨髓源DC表面标志的表达量

2.4 DC分泌细胞因子的含量

根据细胞因子检测试剂操作说明书，测定不同时间点细胞培养上清液中IL-2和IFN- γ 的含量变化。从表2可以看出，随着培养天数的增加，2种细胞因子的分泌量整体呈上升趋势，IL-2的含量在第3、5

天差异不显著。培养至第5天的DC经LPS刺激后，在第7天DC分泌细胞因子量显著上升，IL-2和IFN- γ 的含量分别达到(51.28 \pm 2.16)和(113.36 \pm 8.64) pg/mL，比刺激前提高约2倍。

表2 树突状细胞培养上清液中细胞因子含量测定

细胞因子	第1天	第3天	第5天	第7天
IL-2	16.48 \pm 1.78 ^c	24.89 \pm 2.90 ^b	28.11 \pm 3.92 ^b	51.28 \pm 2.16 ^a
IFN- γ	24.72 \pm 2.38 ^d	53.95 \pm 3.26 ^c	67.66 \pm 4.15 ^b	113.36 \pm 8.64 ^a

注：字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$)，不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

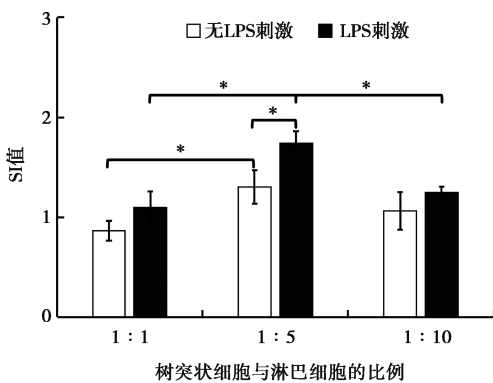
2.5 DC激活淋巴细胞的能力

DCs作为刺激细胞与淋巴细胞按照不同比例混合培养，从图4可以看出，DC作为刺激细胞可以刺激淋巴细胞增殖，但LPS刺激成熟后的DC激活淋巴细胞的能力更强。成熟前后的DC与淋巴细胞以1:5比例混合培养时，其刺激能力较强，SI值分别达到1.3和1.7。

3 讨论

现在普遍认为绝大多数的DC发育起源于骨髓造血干细胞，然后在多种细胞因子(GM-CSF、FLT3L)和转录因子(PU.1、E2-2、Id2、Batf3、IRF4、IRF8)的共同作用下，骨髓造血干细胞定向分化成髓系和淋巴系DC前体细胞，这些前体细胞进入血液循环，最后在淋巴组织和非淋巴组织中进一步分化成熟^[15-16]。在体内，GM-CSF对DC的分化是非必需的，但在体外，该因子可以促进骨髓造血干细胞或单核细胞向DC定向分化，是维持DC发育和分化的最根本的细胞因子^[17]。此外，IL-4能够协同GM-CSF增强细胞集落的生产，刺激细胞增殖并维持DC的成熟状态，TNF- α 可以刺激DC趋于成熟^[18]。目前，已经建立的DC体外诱导培养方法都必需有细胞因子的参与。

本试验中首次采用鼠源GM-CSF和IL-4联合刺激培养鸭骨髓单核细胞向DC的定向分化。刘迪^[19]利用重组人源GM-CSF、IL-4体外诱导培养出鸡骨



注：*表示 $P<0.05$ 。

图4 DC对同种异体淋巴细胞的刺激增殖

髓源 DC, 说明异源细胞因子也可以用于 DC 的诱导培养。为了确保 DC 体外诱导培养的成功, 本试验针对培养体系中的血清、GM-CSF 和 IL-4 这 3 个关键因素进行正交试验优化, 通过评价不同时间点 DC 的吞噬能力最终确定最佳培养条件, 发现在培养基中添加 15% 胎牛血清、20 ng/mL 的 IL-4 和 40 ng/mL 的 GM-CSF 诱导培养的 DC 吞噬能力最强。在培养后 3 d, 可以在显微下观察到细胞从球形向菱形的转变, 继续培养至第 7 天可以明显看到典型的树突状细胞形态。细胞表面特异性标志物是鉴定细胞的关键, 本试验中由于缺乏鸭 DC 表面标志物的荧光二抗, 故选择抗鸡 MHC II、抗鼠 CD11c 和 CD80 的抗体进行替代, 用于流式检测鸭 DC 的纯度, 从结果可以看出, 3 个抗体均能与鸭表面标志物结合, 其 CD11c、CD80 和 MHC II 的表达量分别达到 80.08%、81.27% 和 91.47%, 显现出较高的纯度。综合 DC 形态学变化和表面标志物的检测结果, 表明已经在体外成功培养出高品质的鸭骨髓源树突状细胞。

有研究表明, 未成熟的 DC 能够高效地摄取病原体、死亡细胞和其他抗原物质, 并对其加工处理^[20], 此时 DC 表面的 MHC I、II 类分子, T 细胞共刺激因子以及黏附分子的表达量较低^[21]; 而成熟的 DC 的抗原摄取能力下降, 但 MHC I、II 类分子, 共刺激分子和黏附分子等表达量上调, 此外还会分泌和表达一些细胞因子和趋化因子来调控 T 细胞分化^[22]。本试验中用 LPS 刺激培养至第 5 天的 DC 以促进其成熟, 成熟后的 DC 吞噬能力下降, 而培养上清液中分泌的 IL-2、IFN- γ 量显著增加, 并且成熟的 DC 更能刺激淋巴细胞的增殖。这些试验结果与上述报道相符, 说明制备的细胞具备了树突状细胞的基本生物学功能, 进一步证明了体外诱导培养鸭骨髓源 DC 取得成功。

综上, 本研究诱导培养的鸭骨髓源 DC 具备较高的纯度, 能够满足后续科学研究的需求, 为鸭 DC 相关研究奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] STEINMAN R M, COHN Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1973, 137: 1142-1162.
- [2] GARDNER A, DE MINGO PULIDO Á, RUFFELL B. Dendritic cells and their role in immunotherapy [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 924.
- [3] HILLIGAN K L, RONCHESE F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4⁺ T helper cell responses [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, 17: 587-599.
- [4] MACRI C, PANG E S, PATTON T, et al. Dendritic cell subsets [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2018, 84: 11-21.
- [5] SHORTMAN K, LIU Y. Mouse and human dendritic cell subtypes [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2: 151-161.
- [6] LIN M L, ZHAN Y, VILLADANGOS J A, et al. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets [J]. *Immunology and Cell Biology*, 2008, 86: 353-362.
- [7] ZANNA M Y, YASMIN A R, OMAR A R, et al. Review of dendritic cells, their role in clinical immunology, and distribution in various animal species [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (15): 8044.
- [8] CHOMETON T Q, SIQUEIRA M D S, SANT ANNA J C, et al. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells [J]. *PLoS One*, 2020, 15: e0231132.
- [9] WAN H, DUPASQUIER M. Dendritic cells *in vivo* and *in vitro* [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2005, 2 (1): 28-35.
- [10] LI Y, PUEBLA-CLARK L, HERNÁNDEZ J, et al. Development of pig conventional dendritic cells from bone marrow hematopoietic cells *in vitro* [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 553859.
- [11] 付佳, 梁金逢, 阴银燕. 鸡骨髓源树突状细胞体外诱导培养及鉴定 [J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36: 110-114.
- [12] 张淑君, 周放, 吴乐, 等. 鸡骨髓源树突状细胞体外诱导 [J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50 (12): 2571-2577.
- [13] 倪博, 张珍珍, 袁厅, 等. 猪骨髓源树突状细胞与单核细胞源树突状细胞体外培养和功能鉴别 [J]. *中国动物传染病学报*, 2022, 30 (6): 147-152.
- [14] 侯艳华, 张凯, 王磊, 等. 小鼠骨髓源 CD103⁺ DC 分离培养及 LPS 对其形态与功能特征的影响 [J]. *浙江农业学报*, 2018, 30 (7): 1122.
- [15] ARDAVÍN C, DEL HOYO G M N, MARTÍN P, et al. Origin and differentiation of dendritic cells [J]. *Trends in Immunology*, 2001, 22: 691-700.
- [16] LIU K, NUSSENZWEIG M C. Origin and development of dendritic cells [J]. *Immunological Reviews*, 2010, 234: 45-54.
- [17] CONTI L, GESSANI S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances [J]. *Immunobiology*, 2008, 213: 859-870.
- [18] LELLAHI S M, AZEEM W, HUA Y, et al. GM-CSF, Flt3-L and IL-4 affect viability and function of conventional dendritic cell types 1 and 2 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1058963.
- [19] 刘迪. ALV-J 对鸡骨髓源树突状细胞生物学功能影响的研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2015.
- [20] LEBLANC-HOTTE A, AUDIGER C, CHABOT-ROY G, et al. Immature and mature bone marrow-derived dendritic cells exhibit distinct intracellular mechanical properties [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 1967.
- [21] PANG X L, WANG Z G, LIU L, et al. Immature dendritic cells derived exosomes promotes immune tolerance by regulating T cell differentiation in renal transplantation [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 8911.
- [22] KIM M K, KIM J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration [J]. *RSC Advances*, 2019, 9: 11230-11238.