

基础细胞免疫学丛书

人B淋巴细胞的分化和调节

朱立平等著

科学出版社

基础细胞免疫学丛书

人 B 淋巴细胞的 分化和调节

朱立平等著

人民卫生出版社

内 容 简 介

本书是“基础细胞免疫学丛书”之一，较系统地阐述了研究人 B 淋巴细胞分化的实验模型，T 淋巴细胞、单核细胞和非特异 T 淋巴细胞因子对 B 淋巴细胞分化的调节。也介绍了近年来对人 B 淋巴细胞分化表面标志的研究进展。本书既包括正常状态下，也包括疾病状态下人 B 淋巴细胞的分化和调节。附录介绍 B 淋巴细胞分化的某些分子生物学变化和研究 B 淋巴细胞分化的方法。本书可供医学院校和综合性大学生物系师生、免疫工作者及其他医务人员参考。

2176/15

基础细胞免疫学丛书

人 B 淋巴细胞的分化和调节

朱立平等著

责任编辑 马素卿 马超

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1988 年 3 月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1988 年 3 月第一次印刷 印张：6 3/8

印数：0001—2,100 字数：143,000

ISBN 7-03-000159-1/R·5

定价：1.70 元

前 言

近年来免疫学颇受国内生物医学方面学者的重视。近一二年,国内有了不少关于免疫生物学方面的著作,然而从已出版的书刊来看,大致还是停留在一般全面介绍的水平,缺乏对专题进行深入探讨。而在此期间,免疫生物学领域已不断出现新的内容,亟待很好总结,认真分析,以便新知识能在基础与临床研究方面迅速得到应用。况且,免疫细胞间的相互作用,已经是研究中的中心问题,而活性的介质因子在其中的作用更具有重要性。这就需要从分子生物学方面不断深入探讨。

鉴于上述情况,科学出版社拟就免疫生物学及细胞免疫学的若干重要专题,邀请熟悉研究动态的专家们撰写一套丛书,对有关文献加以分析与综合。凡目前已可肯定的资料尽量加以明确;对于尚有争论的问题则分析争论的焦点,并提出作者自己的看法。希望能从错综复杂的现象及结果尚未完全阐明的材料中,整理出有条理的知识,使更多的研究及教学人员进一步了解本学科较深入的、较新的内容,而对工作有所帮助。

由于承担撰写的同志们工作比较繁忙,要很好完成这个艰巨任务,困难是不少的。因此这套丛书将由科学出版社分册陆续出版,以便能及时与读者见面。希望国内同仁重视这项工作,不断提出批评和建议,让我们一同在四化道路上共同前进。

谢少文

1980年12月25日

• i •

目 录

前言

第一章 引言.....	1
第二章 研究人 B 淋巴细胞分化的实验模型	3
一、检测人 B 淋巴细胞激活、增殖和分化的方法 ...	3
二、PWM 诱导人 B 淋巴细胞的分化.....	8
(一) PWM 诱导人 B 淋巴细胞分化的特点.....	8
(二) PWM 诱导人 B 淋巴细胞分化中 T 淋巴细胞的调节	9
(三) PWM 阳性反应的 B 淋巴细胞.....	15
(四) PWM 诱导 B 淋巴细胞分化模型在基础和临床研究中 的应用举例	17
三、葡萄球菌 Cowen I (SAC) 诱导人 B 淋巴细胞分... 化.....	23
(一) SAC 诱导人 B 淋巴细胞增殖和分化的特点.....	24
(二) SAC 刺激阳性反应的 B 淋巴细胞亚型.....	28
(三) SAC 激活人 B 淋巴细胞的可能机制.....	29
四、抗 Ig 抗体诱导人 B 淋巴细胞分化	30
(一) B 淋巴细胞发育分化过程中 sIg 同种型 (isotype) 的转变	30
(二) 用抗 IgD 抗体作促丝裂原研究人 B 淋巴细胞的分化...	32
(三) 用抗 IgM 抗体作促丝裂原研究人 B 淋巴细胞分化 ...	34
五、人肿瘤性 B 淋巴细胞: B 淋巴细胞分化的单克隆 模型.....	37
(一) 人白血病性 B 淋巴细胞在促丝裂原或 T 淋巴细胞诱 导下的分化	37
(二) 抗 Ig 抗体诱导白血病性 B 淋巴细胞分化	39

(三) 诱导 B 淋巴细胞分化讯号传递的生物化学和分子生物学研究	39
六、抗原诱导——抗原特异的人 B 淋巴细胞分化	41
(一) 破伤风类毒素 (TT) 免疫志愿者诱导 B 淋巴细胞分化	41
(二) 钥孔贼血蓝素 (KLH) 免疫志愿者诱导 B 淋巴细胞分化	45
(三) 体外抗原诱导 B 淋巴细胞分化	47
第三章 人 B 淋巴细胞分化的表面标志	53
一、B 系列表面标志	53
二、HB 系列表面标志	57
三、L 系列表面标志	58
四、其他标志	60
五、结语	62
第四章 调节 B 淋巴细胞生长和分化的因子	64
一、B 淋巴细胞生长因子 (BCGF)	65
二、B 淋巴细胞分化因子 (BCDF)	70
三、IL-2, γ -IFN 和其他调节 B 淋巴细胞增殖与分化的因子	76
第五章 单核细胞对 B 淋巴细胞分化的调节	82
一、单核吞噬细胞系统	82
二、单核细胞在免疫反应中的调节作用	83
(一) 抗原的处理和提呈	83
(二) 对免疫反应的增强或抑制作用	84
三、单核细胞对 B 淋巴细胞功能的调节	84
四、前列腺素 E(PGE) 和 IL-1 等介质在单核细胞调节 B 淋巴细胞功能中的作用	89
(一) PGE	89
(二) IL-1	93
(三) 小鼠 B 淋巴细胞分化因子 (BDF)	95

五、去除和分离单核细胞的方法.....	96
第六章 某些免疫疾病状态下B淋巴细胞的分化.....	98
一、人B淋巴细胞的异常激活与自身免疫病.....	98
(一) 某些自身免疫病B淋巴细胞功能异常	99
(二) B淋巴细胞的多克隆激活与自身免疫病	103
(三) 自身免疫病B淋巴细胞功能异常与 T_s 功能低下的关系	104
二、免疫缺损症患者的B淋巴细胞分化.....	107
(一) X性联免疫缺损症的B淋巴细胞分化	107
(二) 非X性联免疫缺损症的B淋巴细胞分化	110
(三) 普通变异免疫缺损症(CVID)的B淋巴细胞分化	110
第七章 某些免疫抑制剂对B淋巴细胞分化的影响.....	116
一、糖皮质激素.....	116
(一) 体内给药皮质类固醇对B淋巴细胞功能的影响 ...	117
(二) 体外实验系统中皮质类固醇对B淋巴细胞功能的影响	122
(三) 皮质类固醇对T淋巴细胞和单核细胞功能的影响	126
二、环磷酰胺(CP)	128
(一) CP对B淋巴细胞功能的影响	129
(二) CP对T淋巴细胞功能的影响	135
三、环孢霉素A(CsA)	136
(一) CsA对T淋巴细胞功能的影响	136
(二) CsA对B淋巴细胞功能的影响	139
(三) CsA的可能作用机制	142
附录 I B淋巴细胞分化的某些分子生物学变化.....	146
附录 II ELISA 斑点技术	161
附录 III T 淋巴细胞克隆技术	169
附录 IV 检测杂交瘤细胞支原体污染的方法.....	181
附录 V 人-人B淋巴细胞杂交瘤	184
略语表.....	194

第一章 引言

B淋巴细胞的激活、增殖和分化及其调节是现代免疫学的重要课题之一^[1-3]。这个问题的阐明;不仅有助于对免疫反应某些基本现象的了解,而且有助于对某些疾病发病机制的认识,从而帮助找到防治这些疾病的方法,因为这些疾病与 B 淋巴细胞数或功能异常有直接或间接的关系。例如, B 淋巴细胞性免疫缺损病^[6]和某些自身免疫病^[7]。它们既可以直接因 B 淋巴细胞数或功能异常而发生,也可因调节 B 淋巴细胞的 T 淋巴细胞功能异常而引起。

B 淋巴细胞的激活、增殖和分化是一个十分复杂的过程。“分化”一词,既用于干细胞→前 B 淋巴细胞→不成熟 B 淋巴细胞→成熟 B 淋巴细胞的过程,也用于成熟休止期 B 淋巴细胞→浆细胞的过程;而“激活”则意味着休止期 B 淋巴细胞受某种因素刺激而活化,进而增殖,向浆细胞分化。确实,在很多实验系统中很难把激活、增殖和分化截然分开,这也正是研究 B 淋巴细胞的困难之处。幸运的是,近年来免疫学研究的进展为探讨这个问题提供了一些良好的模型,可以在激活、增殖和分化的各个阶段对 B 淋巴细胞的特点和调节分别作研究。

在本书正文后面有五个附录,它们对了解和研究 B 淋巴细胞的分化和调节有一定关系。附录 I 是关于 B 淋巴细胞分化的某些分子生物学变化。由于本书是细胞免疫学丛书之一,故把它置于附录中。ELISA 斑点技术是近年来发展起来的用于测定免疫球蛋白分泌细胞 (ISC) 的一个新方法,在附录

II 作了较详细介绍。T 淋巴细胞是调节 B 淋巴细胞功能的一种主要细胞,用 T 淋巴细胞克隆法可把有兴趣的细胞克隆出来,以研究其对 B 淋巴细胞功能的调节。T 淋巴细胞克隆法见附录 III。至于支原体污染,它是细胞培养常遇到的问题之一,其检测方法见附录 IV。在附录 V 介绍了人-人 B 淋巴细胞杂交瘤技术,除制备人单克隆抗体外,它也是研究 B 淋巴细胞分化的一种手段。

参 考 文 献

- [1] 朱立平, (1985) 中国免疫学杂志, 1(1): 55.
- [2] Fauci, AS & RE Ballieux (1982) "Human B lymphocyte function: Activation and immunoregulation", Raven Press, New York.
- [3] Möller, G (1979) *Immunological Review* 45.
- [4] Fauci, AS (1980) *J. Allergy Clin. Immunol.* 66: 5.
- [5] Fauci, AS (1983) *Monogr. Allergy* 18: 96.
- [6] Filipovich, AH & JH Kersey (1983) *Immunol. Today* 4: 50.
- [7] 朱立平、房芳, (1985) 中国免疫学杂志, 1(6): 56.

第二章 研究人 B 淋巴细胞分化的 实验模型

一、检测人 B 淋巴细胞激活、 增殖和分化的方法

狭义的 B 淋巴细胞激活，是一个较难研究的课题。因为在很多实验系统中，B 淋巴细胞的激活、增殖和分化往往是一个连续的过程。1982 年 DeFranco 等^[1]用小剂量羊抗小鼠 IgM 重链抗体 IgG 的 F(ab')₂ 片段诱导小鼠 B 淋巴细胞从 G₀ 期进入 G₁ 期，观察指标之一是细胞大小的变化。从实验

表 2-1 抗 IgM 抗体与单克隆 BCGF 对 B 淋巴细胞
增殖的协同刺激作用^[2]

实验组	刺 激*		³ H-TdR 掺入**(cpm)
	抗体 (μg/ml)	BCGF***	
A	—	—	259±21
B	—	+	2,342±652
C	F(ab') ₂ 羊抗 IgM 抗体, 15	—	2,627±219
D	F(ab') ₂ 羊抗 IgM 抗体, 15	+	22,560±558
E	F(ab') ₂ 羊抗 IgG 抗体, 15	—	385±127
F	F(ab') ₂ 羊抗 IgG 抗体, 15	+	936±142
G	F(ab') ₂ 羊抗 IgG 抗体, 150	+	958±122

* 10⁵ 纯化 B 淋巴细胞、抗体和(或) BCGF 一起培养；** ³H-TdR 掺入在第 3 天测定；*** BCGF 的浓度为 25% (V/V)。

中他们还发现,使 G_0 期进入 G_1 期需要其他的刺激(或讯号)。B 淋巴细胞生长因子 (BCGF) 可能就是这类讯号中重要的一种。Muraguchi 等^[2]用人 B 淋巴细胞进行研究也观察到了同样的现象。小剂量 ($15\mu\text{g/ml}$) 羊抗人 IgM 重链抗体 IgG 的 F(ab')_2 片段单独不能诱导 $^3\text{H-TdR}$ 掺入 B 淋巴细胞,若在细胞培养中加入 PHA 诱导的 T 淋巴细胞上清液或由人-人 T 淋巴细胞杂交瘤产生的单克隆 BCGF, $^3\text{H-TdR}$ 就能掺入 B 淋巴细胞。但 BCGF 单独不能诱导休止期小 B 淋巴细胞增殖(表 2-1)。他们在实验中还发现,在人外周血 B 淋巴细胞和扁桃体 B 淋巴细胞中,有小部分细胞能直接对

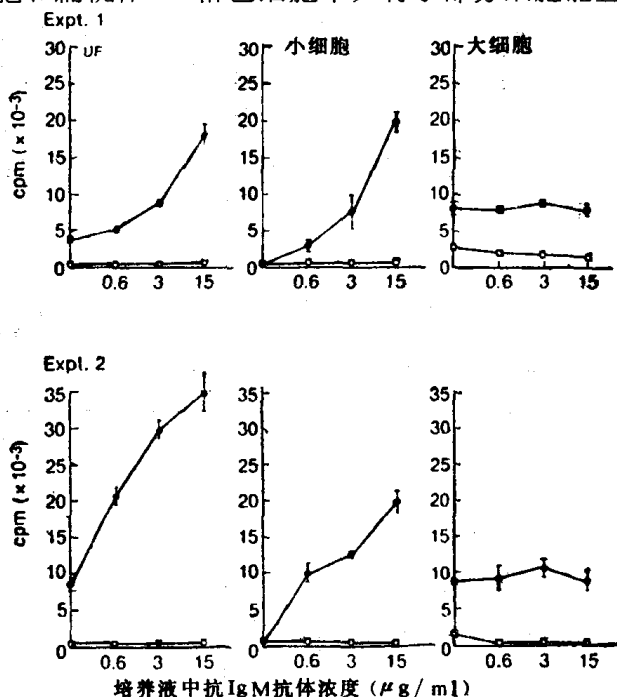


图 2-1 抗 IgM 抗体和 BCGF 对不同大小 B 淋巴细胞的影响^[23]。每培养孔细胞数量为 1×10^5 。BCGF 浓度为 25%(V/V)。—•— 加 BCGF; - - - 不加 BCGF。

BCGF 刺激发生增殖反应。把 B 淋巴细胞用对流离心淘洗法分成平均细胞体积为 $185\mu\text{m}^3$ 和 $235\mu\text{m}^3$ 两个组分(混合 B 淋巴细胞平均体积为 $215\mu\text{m}^3$),发现小 B 淋巴细胞对单独 BCGF 刺激没有反应,但 BCGF 与小剂量 ($15\mu\text{g}/\text{ml}$) 抗 IgM 抗体对小 B 淋巴细胞有协同诱导增殖的作用。而对大 B 淋巴细胞,BCGF 单独能诱导增殖,BCGF 与抗 IgM 抗体不表现协同作用(图 2-1)。他们认为这些大的细胞是在体内已被激活的细胞。鉴于小的休止期 B 淋巴细胞受小剂量抗 IgM 抗体刺激后,体积也增大(图 2-2),他们把细胞增大和对 BCGF 刺激发生反应作为细胞激活的指标。不少学者研究发现, B 淋巴细胞激活后,表面还出现多种标志。有关情况将在第三章作详细描述。

激活的 B 淋巴细胞在适当条件下就进入增殖期,亦即细胞周期的 S 期、G₂ 期和 M 期。像 T 淋巴细胞一样^[3],增殖中 B 淋巴细胞的特点是细胞转化成母细胞、合成 DNA 和细胞

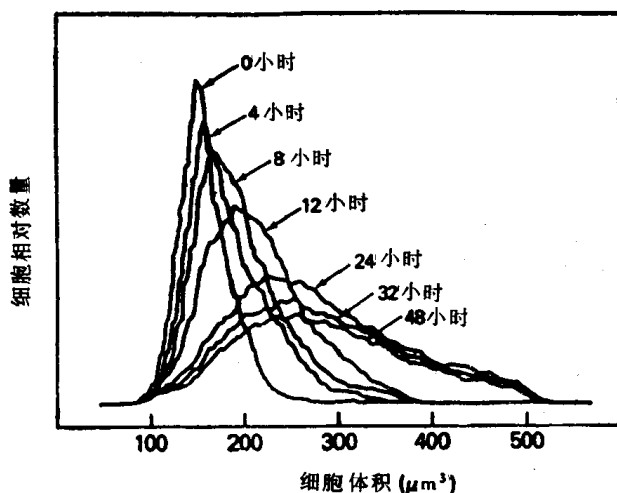


图 2-2 抗 IgM 抗体刺激下小 B 淋巴细胞体积增大的动态观察^[1]。

分裂。测定淋巴细胞增殖的经典方法是显微镜下计算母细胞数和测定 ^3H -TdR 掺入新合成的 DNA 的量^[4]。但是,母细胞的标准很难掌握,计算中人为因素很大,因此比较可靠的还是 ^3H -TdR 掺入测定。此外,淋巴细胞增殖过程中 RNA 和蛋白质合成继续增加,这也可以用 ^3H -尿嘧啶核苷掺入和同位素标记某种氨基酸(如 ^3H -亮氨酸)掺入测定^[4]。

淋巴细胞的增殖是在促丝裂原和抗原刺激下发生的。从外周血或淋巴器官分离出来的单核类细胞与某种促丝裂原或抗原一起培养一定时间后,测定 ^3H -TdR 掺入数,以无促丝裂原或抗原刺激下 ^3H -TdR 掺入数作对照。 ^3H -TdR 是一种同位素标记的核酸前生物,很容易掺入新合成的 DNA。 ^3H -TdR 掺入程度很容易用 β 射线自动计数仪测定^[4]。

促丝裂原可非特异诱导淋巴细胞增殖,这种增殖在本质上是多克隆性质的。这与抗原诱导的增殖不一样,后者在一定浓度下主要诱导抗原特异的(即有识别该抗原受体的)淋巴细胞增殖。另外,抗原诱导的增殖需要该抗原对淋巴细胞的预先致敏,而促丝裂原则不需要先致敏淋巴细胞,只要淋巴细胞表面有该促丝裂原的受体就行。最常用的人淋巴细胞促丝裂原为植物血凝素、某些细菌或细菌产物、抗免疫球蛋白制剂等。最常用的人 B 淋巴细胞促丝裂原有葡萄球菌 Cowen I (SAC)^[5,6]、各种抗 Ig 制剂(多克隆或单克隆)^[2,7]、商陆促丝裂原 PWM^[9,10]、抗 β_2 微球蛋白^[11]、诺卡氏菌的水溶性提取物^[12,13]、EB 病毒^[14]和佛啉三肉豆蔻酰甘油酯醋酸盐 (PMA)^[15]等。脂多糖 (LPS) 是经典的小鼠 B 淋巴细胞促丝裂原,在相同培养条件下对人 B 淋巴细胞的刺激作用很弱^[16],但适当改变条件仍可观察到诱导人 B 淋巴细胞有丝分裂的现象^[17,18]。此外,也有报道说,如 PHA, Con A 等某些 T 淋巴细胞促丝裂原刺激 T 淋巴细胞产生因子,从而间接诱导 B 淋巴细胞增殖^[9,19,20]。

B 淋巴细胞增殖后就进入分化期, 分化成免疫球蛋白分泌细胞 (ISC)。表 2-2 列举了常用的体外测定人 B 淋巴细胞分化功能的方法。

表 2-2 体外测定人 B 淋巴细胞 Ig 合成的方法

胞浆 Ig 荧光染色测定 (ICP Ig) ^[21, 22]
细胞培养上清液中 Ig 测定
放射免疫沉淀法 ^[23]
竞争放射免疫测定 ^[24, 25]
固相免疫吸附 Ig 定量测定 ^[26]
酶联免疫吸附测定 (ELISA) ^[27, 28]
单细胞抗体分泌测定(自发性和多克隆诱导)
抗羊红细胞空斑形成细胞测定 (PFC) ^[29, 30, 31]
抗原特异直接 PFC 测定 ^[32, 33, 34]
及间溶血 PFC 测定 ^[35-37]
葡萄球菌蛋白 A PFC 测定 ^[38]
酶标斑点法(见附录 IV)

ICP Ig 是用各种荧光标记抗人 Ig 抗体对固定的细胞涂片进行染色后测定的。细胞在体外培养中经促丝裂原刺激 6 天, 然后荧光染色, 计算胞浆荧光阳性细胞数, 此法的优点是简单、快速, 相对说价格较低廉。它测定的是胞浆内的 Ig, 反应了细胞合成 Ig 的能力, 但不反映 Ig 的分泌。

细胞培养上清液中 Ig 测定既可测定总 Ig 或各种 Ig 同种型 (IgM 或 IgG 等), 也可测定抗原特异的 Ig。放射免疫法虽敏感, 但需特殊仪器设备。酶标测定的敏感性与放射免疫法相同, 且安全、稳定和价格低廉, 不需要复杂的仪器设备。但培养上清液中 Ig 测定不能表明有多少个 B 淋巴细胞已分化至 ISC。

PFC 法则可测定有多少个 B 淋巴细胞在促丝裂原或抗原诱导下已分化至 ISC (分泌总 Ig 或抗原特异 Ig), 但不能检测产生多少 Ig。因此, 根据具体情况把这几种方法结

合起来应用, 就可以对 B 淋巴细胞分化功能有一个较全面的了解。

二、PWM 诱导人 B 淋巴细胞的分化

(一) PWM 诱导人 B 淋巴细胞分化的特点

PWM 是从北美洲植物商陆中提取出来的。它既能诱导 T 淋巴细胞增殖, 又能诱导 B 淋巴细胞增殖和分化。但是, 它诱导 B 淋巴细胞增殖和分化必须有 T 淋巴细胞参与 (表 2-3 和图 2-3)^[9, 39-41]。设开始实验时为第 0 天, 则 B 淋巴细胞增殖最高峰一般在第 3 天左右 (图 2-4), 分化最高峰在第 6—7 天左右 (图 2-5)。如前所述, PWM 诱导人外周血 B 淋巴细胞分化产生的 Ig 可由胞浆 Ig 荧光染色测定^[21], 也可由细胞培养上清液中 Ig 测定^[2, 4], 还可由 PFC 法测定^[31]。

表 2-3 PWM 诱导 B 淋巴细胞增殖对 T 淋巴细胞的依赖^[40]

细 胞	³ H-TdR 掺入 (cpm)	
	PWM	
	+	-
1×10 ⁶ B*	494±80	243±16
1×10 ⁶ MMC** 处理 T	<10	ND
1×10 ⁶ B+1×10 ⁶ MMC 处理 T	3884±308	217±18
2×10 ⁶ B	708±97	326±8
2×10 ⁶ T	3817±108	289±34
1×10 ⁶ B+1×10 ⁶ T	17153±858	472±86

* T 和 B 淋巴细胞取自同一供血者; ** 丝裂霉素 C。

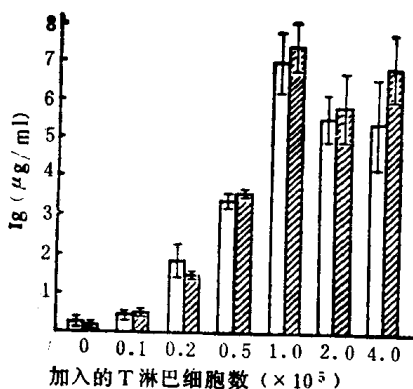


图 2-3 PWM 诱导 B 淋巴细胞分化对 T 淋巴细胞的依赖^[40]。 1×10^5 B 淋巴细胞与不同数量 T 淋巴细胞在 PWM 存在下一起培养, 在第 7 天测上清液中 IgG (□) 和 IgM (▨) 量。

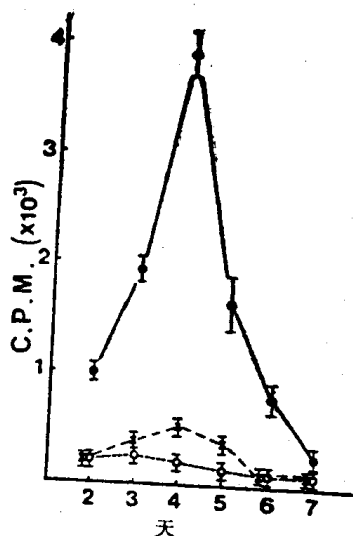


图 2-4 PWM 诱导人 B 淋巴细胞增殖反应的时间动态变化^[40]。 1×10^5 B 淋巴细胞 + 1×10^5 MMC 处理 T 淋巴细胞。●—● 加 PWM; ○---○ 无 PWM; X---X 加 PWM、无 MMC 处理的 T 淋巴细胞。

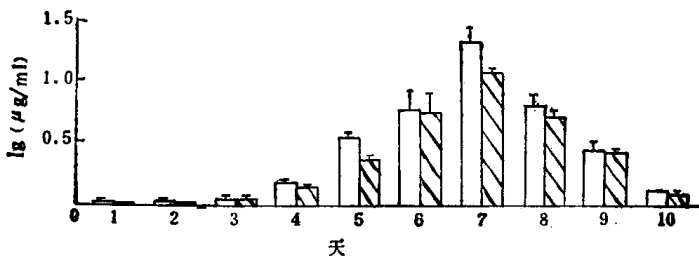


图 2-5 PWM 诱导人 B 淋巴细胞分化的时间动态变化。 2×10^5 外周血单核类细胞与 PWM 一起培养, □ IgG; ▨ IgM。

(二) PWM 诱导人 B 淋巴细胞分化中 T 淋巴细胞的调节

B 淋巴细胞的分化是受 T 淋巴细胞调节的, 起调节作用的 T 淋巴细胞有辅助 T 淋巴细胞 (Th) 和抑制 T 淋巴细胞

(Ts)。实验证明, PWM 既能诱导 Th^[42], 也能诱导 Ts^[43] 功能化。因此, T 淋巴细胞对 PWM 诱导 B 淋巴细胞分化的调节取决于 Th 和 Ts 之间的平衡。这可从选择性抑制其中一类 T 淋巴细胞的实验得到证实。

人 Ts 对 X 射线照射比较敏感, 而 Th 相对不敏感^[44,45]。实验证明, 200—300rad X 射线照射即能杀死或抑制 B 淋巴细胞功能, 1500—2000rad X 射线照射能抑制 T_H 功能, 而 Th 对高达 5000rad 的照射仍有抵抗力^[46]。借助一定剂量 X 射线照射, 就能把只具有辅助功能的 T 淋巴细胞加入 B 淋巴细胞中, 从而观察 B 淋巴细胞对 PWM 刺激的反应(图 2-6)。药理浓度的肾上腺皮质类固醇 (10^{-5} mol/L) 对 Ts 功能也有选择性抑制作用^[47], 因此皮质类固醇可使 PWM 诱导的 PFC 数明显增加(图 2-7)。与 X 射线照射一样, B

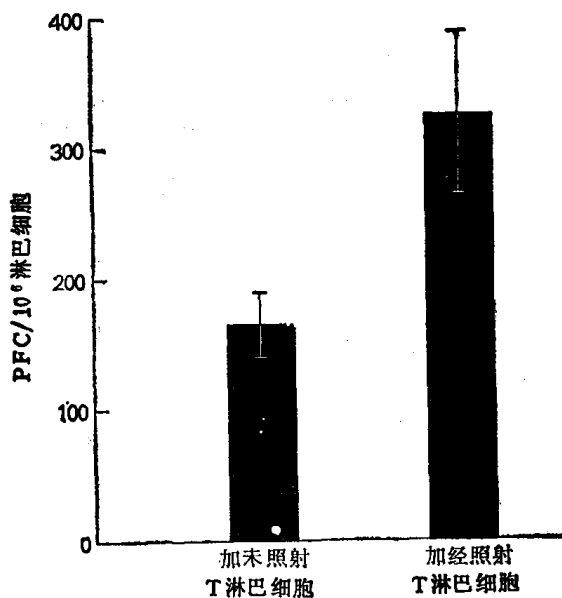


图 2-6 加入 X 射线照射 (2000 rad) 的 T 淋巴细胞对 PWM 诱导 B 淋巴细胞分化的影响^[48]。