

# 抗体工程

董志伟 王琰 主编

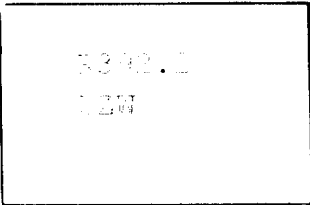
北京医科大学中国协和医科大学联合出版社

DF03/25

# 抗体工程

主 编：董志伟  
王 琰

DF03/25



北医大图书馆

北京医科大学中国协和医科大学联合出版社



## 图书在版编目 (CIP) 数据

抗体工程/董志伟,王琰主编. —北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997  
ISBN 7-81034-693-8

I. 抗… II. ①董… ②王… III. 抗体-免疫工程学 IV. R392.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 01043 号

## 内 容 简 介

近百年来抗体一直是生命科学工作者研究的热点,抗体是机体免疫系统的重要效应分子,同时在疾病诊断及各种检测中发挥巨大的作用。本书作者从事抗体研究已有十余年,采用的技术从免疫动物到细胞工程,直至基因工程;所制备的抗体从培养瓶到动物实验,直至临床应用。全书贯穿详尽的理论和易操作的方法,有较强的实用性。

本书对初学者、本专业和非本专业的大学生、研究生、研究人员以及“抗体”的非免疫学专家是一本不可多得的参考书。

## 抗 体 工 程

董志伟 王 琰 主编

责任编辑:林呈焯

责任校对:李爱萍

\*

北京医科大学 联合出版社出版

中国协和医科大学

北京市昌平精工印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

\*

787×1092 毫米 1/16 印张 16.5 千字 413

1997 年 5 月第一版 1997 年 5 月北京第一次印刷

印数:1—3000

ISBN 7-81034-693-8/R·691

定 价: 28.50 元

## 本书编写人员

(按章节作者先后排序)

- |     |                              |
|-----|------------------------------|
| 董志伟 | 北京医科大学临床肿瘤学院<br>中国医学科学院肿瘤研究所 |
| 王 琰 | 北京医科大学临床肿瘤学院<br>中国人民解放军海军总医院 |
| 许佐良 | 北京医科大学临床肿瘤学院                 |
| 孙素莲 | 北京医科大学临床肿瘤学院                 |
| 陈常庆 | 中国科学院上海生物工程研究中心              |
| 李振甫 | 北京医科大学临床肿瘤学院                 |
| 万文徽 | 北京医科大学临床肿瘤学院                 |
| 魏淑敏 | 北京医科大学临床肿瘤学院                 |
| 张梅颖 | 北京医科大学临床肿瘤学院                 |
| 寿成超 | 北京医科大学临床肿瘤学院                 |

### 执行副主编

- |     |              |
|-----|--------------|
| 凌启柏 | 北京医科大学临床肿瘤学院 |
|-----|--------------|

## 前 言

抗体是机体内最奇妙的分子，它以巨大的多样性识别着外部世界纷繁的抗原结构，而且它们自身之间亦可互相识别，从而使得抗体分子在作为诸多抗原的互补结构的同时，又可作为别样抗原分子的类似结构，构成抗原-抗体及抗体相互间识别的巨大网络。惟其如此，近百年来抗体一直是生命科学家研究的热点，有关抗体认识的巨大进展，使其研究者可以在诺贝尔奖获得者的名单中独自行。

抗体是机体免疫系统的重要效应分子，它的典型结构类似“Y”型，其Fab端具有双价的可与相应抗原契合的结构，Fc端则具有穿透胎盘、固定补体及与Fc受体结合的功能，从而可介导一系列的体液免疫及细胞免疫。事实上，早在本世纪初即已发现抗体中和细菌毒素的功能，之后抗体曾用于多种疾病的防治，但由于难以获得均质的人源抗体而使大规模的抗体应用受阻。

近20年来，抗体生成技术有了飞速发展。70年代中期，细胞工程生成抗体的技术——B淋巴细胞杂交瘤技术问世，导致大量、多种鼠源单克隆抗体的制备，其应用渗透到生命科学的各个领域。80年代中期，为克服鼠源单克隆抗体在人体内应用的异源性，开始采用基因工程技术改造抗体。80年代末至90年代初，基因工程生成抗体的技术——抗体库技术问世，使抗体技术达到前所未有的高度，人们可以不经免疫制备人源抗体。抗体生成技术的两次革命（细胞工程抗体及基因工程抗体）为抗体的生物技术产业奠定了基础，鼠源性单克隆抗体已形成相当规模的产业，在疾病诊断及各种检测中发挥着巨大作用。有理由相信，人源基因工程抗体的出现将大大促进其在人体内治疗疾病的应用，前景诱人。

我和我的同事们从事抗体研究已有十余年，采用的技术，从免疫动物到细胞工程，直至基因工程；所制备的抗体从培养瓶到动物实验，直至临床应用。在从实验室至临床的过程中，边研究边学习，有所心得。现奉献在读者面前的这本书，既是学习心得，又是工作总结。限于水平，难免挂一漏万，希读者不吝赐教。感谢北京市自然科学基金委员会的大力资助，使出版本书的愿望得以实现。

董志伟

95, 12, 22

# 目 录

<b>第一章 抗体研究总论</b> .....	( 1 )
一、抗体研究的历史.....	( 1 )
二、抗体生成的细胞学基础.....	( 5 )
三、抗体生成的调节.....	( 11 )
<b>第二章 抗体的结构与功能</b> .....	( 13 )
一、抗体的分子结构.....	( 13 )
二、抗体分子的基因结构与重排.....	( 21 )
三、抗体的生物学功能.....	( 34 )
<b>第三章 细胞工程抗体</b> .....	( 40 )
一、小鼠体系.....	( 40 )
二、大鼠体系.....	( 56 )
三、人体系.....	( 63 )
<b>第四章 基因工程抗体</b> .....	( 83 )
一、基因工程技术改造的抗体.....	( 83 )
二、抗体库技术.....	( 95 )
三、抗体的体外表达.....	( 102 )
<b>第五章 抗体酶</b> .....	( 108 )
一、抗体酶的设计.....	( 109 )
二、抗体酶的晶体结构.....	( 115 )
三、多克隆催化抗体.....	( 119 )
四、抗体结合位点修饰.....	( 122 )
五、从重组库中筛取抗体酶.....	( 124 )
六、抗体酶的应用.....	( 126 )
七、抗体酶研究前景.....	( 129 )
<b>第六章 抗体的分离纯化及鉴定</b> .....	( 134 )
一、抗体的分离纯化.....	( 134 )
二、抗体的测定.....	( 143 )
三、免疫组化.....	( 154 )
<b>第七章 抗体在肿瘤诊治中的应用</b> .....	( 168 )
一、双特异性抗体及其应用.....	( 168 )
二、独特型抗体及其应用.....	( 175 )
三、放射免疫显像和放射免疫导向手术.....	( 180 )
四、肿瘤的导向治疗.....	( 188 )
<b>附录 I 抗体相关技术</b> .....	( 197 )

一、动物免疫.....	(197)
二、抗体的分离纯化.....	(200)
三、抗体标记.....	(205)
四、抗体检测技术.....	(210)
五、免疫沉淀.....	(218)
六、免疫印迹.....	(220)
七、杂交瘤单克隆抗体技术.....	(223)
八、基因工程抗体技术.....	(234)
<b>附录Ⅱ 常用数据及缓冲液配制.....</b>	<b>(252)</b>

# 第一章 抗体研究总论

## 一、抗体研究的历史

### (一) 抗体一词的由来

抗体的实验研究始于上世纪末。1888年 Emile Roux 及 Alexander Yersin 由白喉杆菌的培养上清中分离到可溶性毒素,后者注入动物体内可引起典型的白喉发病症状。Von Behring 及其同事 Kitasato (北里) 报告,以白喉或破伤风毒素免疫动物后,其血中可产生一种中和毒素的物质,能阻止毒素引发的疾病。来自实验动物的抗毒素血清用于感染的患儿,获得明显的治疗效果,尤其是在发病的早期。于是将能中和毒素的物质称为抗毒素 (antitoxin),随后引入抗体 (antibody) 一词,泛指抗毒素一类的物质,而将引起相应抗体产生的物质称为抗原 (antigen)。1896年 Gruber 和 Durham 发现了凝集细菌的特异性抗体,称为凝集素。1897年 Kraus 发现可与相应抗原形成沉淀反应的抗体,称为沉淀素。于是认识到毒素及细菌之外的众多蛋白质均可诱导相应抗体的生成,是一种广义的免疫现象。

事实上,直至本世纪 30 年代,“抗体”一词才得以通用。1939年 Tiselius 和 Kabat 采用电泳方法证实抗体的活性存在于泳动度最慢的血清组分,称为  $\gamma$  球蛋白 (gammaglobulin, 丙种球蛋白)。免疫后的抗血清的电泳图形中, $\gamma$  球蛋白明显增高,抗血清经相应抗原吸收后再电泳,其  $\gamma$  球蛋白水平又恢复到与正常血清图形相同。在之后相当长的一段时期内,人们曾将抗体与  $\gamma$  球蛋白作为同义词互用。但事实上,具有抗体活性的球蛋白并不都泳动至  $\gamma$  组分;反之在  $\gamma$  组分的球蛋白亦并不都具有抗体活性。在 1968 年和 1972 年世界卫生组织和国际免疫学会联合会所属专门委员会先后决定,将具有抗体活性或化学结构与抗体相似的球蛋白统称为免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig)。由此可见,抗体是一个生物学的和功能的概念,可理解为能与相应抗原特异结合的具有免疫功能的球蛋白;免疫球蛋白则主要是一个结构概念,除抗体外,它尚包括正常个体中天然存在的免疫球蛋白及病理情况下(如骨髓瘤、巨球蛋白血症及冷球蛋白血症等)患者血清中的免疫球蛋白及其亚单位等。因此,抗体是免疫球蛋白,但免疫球蛋白不一定都具有抗体活性,至少目前尚不了解某些天然的或病理的免疫球蛋白的免疫功能。

### (二) 抗体生成的理论

抗毒素中和活性的证实及其在被动免疫治疗中的作用自然提出一个问题:它们是如何形成的?早在 1897 年 Paul Ehrlich 即提出侧链学说,试图回答这一问题。该学说认为,抗体是大分子物质,其与相应抗原的特异反应依赖于互补的化学结构。抗体是天然存在于机体中的物质,它们以侧链的形式位于细胞表面,其功能类似“受体”,当抗体“受体”被适当抗原选择后,抗体即由细胞表面脱落,并大量产生进入血循环。该学说关于抗体是大分子,抗体天然存在以及抗体以受体的形式存在于细胞表面并被相应抗原选择的观点是极具天才的预见,可惜当时的科学技术水平尚不足以证实。之后的 20 年间,相继发现各种动植物组分,甚至化学合成的半抗原与蛋白质偶联后均可刺激机体产生相应抗体。在当时,很难设想机体内天然存在如此众多的抗体,它们甚至可以针对机体从未接触过的人工合成的化学结构。此外,免疫学的发展已由微生物时代逐步进入免疫化学时代,化学的、侧重于结构的思维方式忽略了



抗体生成的生物学机制，终至抗体生成的理论误入歧途。

1930年 Breinl 与 Haurowitz 提出模板学说，认为抗原是抗体合成的模板，前者指导后者特异氨基酸顺序的组合。随后物理化学家 Linu Pauling 对此学说加以发展，认为抗原类似铸模，已经形成的多肽链环绕其卷曲形成适当的三维构形，后者决定抗原抗体间的特异反应。由于这一学说的核心思想是抗体的信息直接来源于抗原，因此称之为直接模板学说。这一学说显然不能够解释当抗原消失后抗体仍可持续生成，此外，同一抗原引起的二次免疫反应快速且增强以及多次免疫后抗体的性质可能发生变化等亦均不能得到满意的解答。为此，1941年病毒学家 Macfarlane Burnet 提出间接模板学说，认为抗原可能诱导合成球蛋白所需酶的适应性修饰，从而导致特异性抗体的生成。随着对核酸在遗传中的重要作用的了解，1949年 Burnet 及 Frank Fenner 进而修改了这一理论，认为抗原可能通过对遗传物质的作用，间接指导抗体的合成。模板学说曾统治抗体生成的理论约 30 年之久，但随着 DNA 双螺旋结构的发表，中心法则的建立及蛋白质生物合成机制的阐明，人们最终认识到遗传信息流动的方向是由核酸到蛋白质，蛋白质的高级结构亦是由这一遗传信息严格控制的，以抗原为模板指导抗体合成的学说显然是错误的。

1955年 Niels Jerne 提出了自然选择学说，该学说继承了 Paul Ehrlich 的部分观点，认为机体能够合成少量的众多特异性不同的抗体，它们进入血液循环即成为“天然抗体”。这些抗体的作用在于可选择性地与相应抗原发生反应，进而将抗原转运至机体某处的细胞，从而诱发特异性相同的抗体的大量合成。加强免疫时，由于血循环中存在着较多的抗体“载体”，而且抗原可能优先选择亲和力较高的抗体，这就可以解释二次免疫反应的快速及抗体质量的变化。至于免疫耐受则可能是由于针对自身抗原的天然抗体一旦合成即被自身组织所吸附，从而不能介导自家抗体的形成。这一学说的重要意义在于经过半个世纪的徘徊，抗体生成理论又回归到生物学观点。早在 Burnet 倡导间接模板学说时，即认为增殖的细胞群体在抗体形成过程中有着重要作用。后来 Burnet 与 Fenner 强调，任何抗体生成学说在解释抗体生成现象时还必需解释免疫耐受。1958年 Burnet、David Talmadge 与 Joshua Lederberg 提出了著名的克隆选择学说。其中心思想为，抗体是天然产物，以受体的形式存在于细胞表面，抗原可与之选择性地反应。抗原与相应抗体受体的反应可导致细胞克隆性增殖，该群体具有相同的抗体特异性，其中某些细胞克隆分化为抗体生成细胞，另一些形成免疫记忆细胞以参加之后的二次免疫反应。此外，该学说认为，免疫耐受是由于自身抗原或胚胎成熟过程中引入的抗原所致的“克隆流产”。随后数年间，克隆选择学说逐步被实验所证实，并得到学术界的广泛承认。

关于抗体生成理论争论的焦点是：抗体生成能力是由遗传决定的，还是由于抗原刺激后天获得的。事实上，抗体的生成大体可分为两个阶段，在未受抗原刺激之前，机体所具有的多样性抗体生成细胞群体可看作一个初级库 (repertoire)，其所包含的信息是由亿万年进化及遗传决定的。当受到抗原刺激后，具有相应抗体（受体）的细胞群体被选择并发生克隆性增殖，在抗原的反复刺激下，抗体的 V 区发生高频率的突变，具有高亲和力抗体的细胞群体选择性增殖，抗体进行类别转换 (class switch)，终至抗体成熟。因此，在抗体生成过程中，片面强调遗传的决定性或抗原的关键作用均有失偏颇。

### (三) 抗体的结构及其多样性

由上述可知，30 年代末期人们即已认识到抗体为大分子的免疫球蛋白，通过研究还表明抗体为双功能分子，既能与相应抗原特异地结合，又具有固定补体、穿透胎盘等功能，但有

关其精确的化学结构却所知甚少。1958年牛津大学的Rodney R. Porter以木瓜蛋白酶水解抗体分子,获得两个Fab和一个Fc片段,前者具有与相应抗原结合的功能,后者则具有其他生物学功能。洛克菲勒大学的Gerald M. Edelman采用来自骨髓瘤患者的均质免疫球蛋白,经还原后证实其含有轻链及重链,并指出骨髓瘤患者尿中的本周蛋白类似抗体的轻链。Porter及其同事进一步证实免疫球蛋白含有两条重链及两条轻链。在此基础上Porter、Edelman及众多实验室均致力于免疫球蛋白氨基酸序列的阐明。1969年,Edelman及其同事最终成功地解出了免疫球蛋白的一级序列,并发现免疫球蛋白是由若干功能区(domain)所构成的,与抗原结合的功能区具有较高的变异性,其他功能区则相对保守。

免疫球蛋白化学结构的阐明虽然为抗体的多样性(diversity)提供了物质基础,但并不能解释其形成的机制。根据推算,抗体的多样性可达 $10^8 \sim 10^9$ ,一个结构基因编码一条肽链的经典概念显然与之相悖。70年代末至80年代初,日本学者利根川进(Tonegawa)用核酸分子杂交技术研究了B细胞分化发育过程中抗体基因结构的变化,阐明了免疫球蛋白的V区基因的重排与突变构成其无限组合的可能性,从而解释了抗体多样性的起源。

#### (四) 抗体产生技术

自上世纪末以抗原免疫动物获得抗血清的尝试这一途径一直是获得抗体的经典方法。1975年Köhler及Milstein建立了B淋巴细胞杂交瘤技术,这是抗体产生的重大技术革命。该技术的普及使得众多科学家通过细胞工程可以在体外定向地制备各种单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)。由于McAb特异性强,性质均一,易于大量生产,在生命科学研究及医学实践方面作出了杰出的贡献,并形成产业,成为生物技术的重要支柱之一。然而McAb多为鼠源性,采用类似的原理制备人源McAb迟迟未获进展,极大地限制了McAb作为治疗制剂在人体内的应用。为克服鼠源McAb的异源性反应,80年代中期人们开始尝试以基因工程方法改造鼠源性McAb,亦即所谓McAb的“人源化”(humanized antibody),包括鼠Ig的V区与人Ig的C区拼接而成的嵌合抗体(chimeric antibody),或将鼠Ig V区的CDR区移植到人Ig序列中所形成的改型抗体(reshaping antibody)。同时,考虑到完整抗体的分子过大,不利于发挥“药物”作用,从而采用基因工程方法使之“小型化”,如单链抗体(single chain antibody),为VH与VL以接头相连,分子量仅为完整抗体的1/6。但真正以基因操作的方式制备抗体,却始于1989年底英国剑桥Winter小组与Scripps研究所Lerner小组创造性的工作。他们采用PCR方法克隆机体全部的抗体基因(repertoire)并重组于原核表达载体中,以标记抗原即可筛选到相应抗体,当时称为组合抗体库技术。90年代初期,这一技术有了进一步的发展,即将抗体基因(VH或Fd)与单链噬菌体的外壳蛋白融合并表达于噬菌体表面,以固相化的抗原吸附相对应的噬菌体抗体,经多次“吸附-洗脱-扩增”即可获得所需抗体。这是抗体产生的又一次重大技术革命。首先该技术将抗体的基因型及表型密切连系起来,表达的噬菌体抗体(亦可为分泌型)可供功能检测,扩增噬菌体并抽提DNA即可获得相应抗体基因,便于测序或进一步的基因操作。其次该技术容量大,效率高,一般建库可达 $10^8$ ,基本包容了抗体多样性的信息。第三,“吸附-洗脱-扩增”过程将抗体的选择与再次扩增有机地结合起来,每轮操作可使特异性抗体富集 $10^2 \sim 10^3$ 。噬菌体抗体库技术不仅摆脱了细胞融合等繁杂的操作,而且可不经免疫制备抗体,为制备人源抗体开辟了新途径,这一点已为实验所证实。然而由一个未经免疫的初级抗体库中筛选出理想的抗体肯定不是一件轻松的事情。由于人体不能随意免疫,转人Ig基因小鼠的尝试80年代后期即有进行,免疫后约4%的抗体为人源。新

近这一技术有了重大突破,首先采用同源重组技术将小鼠胚胎干细胞(ES)中的鼠Ig基因敲除(knock out),而后采用融合技术将YAC库中的大片段人Ig基因(200Mb)导入,筛选后代即可获得免疫后仅产生人抗体的转基因小鼠。转人Ig基因小鼠的商品化并与噬菌体抗体库技术相结合,终于使多年徘徊不前的人源性抗体的产生取得了突破。

由多克隆抗体到单克隆抗体,直至噬菌体抗体,由不均质的异源抗体到均质的异源性抗体,直至人源抗体,是抗体产生技术的三个时代,从一个侧面反映了生命科学由整体水平、细胞水平到基因水平的进展,同时也为抗体作为医药生物技术产业的一个重要支柱奠定了基础。

### (五) 抗体研究大事记

参阅表 1-1。

表 1-1 抗体研究进展

年份	作者	进展
1888	E. Roux, A. Yersin	白喉毒素
1890	E Von Behring*, S. Kitasato (北里)	抗毒素
1896	M Von Gruber, HE Durham	凝集素
1897	R Kraus	沉淀素
1900	P Ehrlich*	抗体形成侧链学说
1917	K Landsteiner	半抗原
1923	M Heidelberger, CT Avery	多糖抗原
1926	LD Felton, GH Bailey	提纯抗体
1929	M Heidelberger, FE Kendall	定量化学血清学
1930	F Breinl, F Haurowitz	抗体形成模板学说
1934—1938	JR Marrack	抗原抗体反应格子学说
1939	AW Tiselius, EA Kabat	抗体是丙种球蛋白
1941	AH Coons	免疫荧光技术
1942	JT Freund, K McDermott	佐剂
1945	RRA Coombs, AE Mourant, RR Race	测定不完全抗体的抗球蛋白试验
1946	J Oudin	凝胶中沉淀反应
1948—1949	O Ouchterlony, SD Elek	免疫双扩散技术
1948	AE Fagraeus	浆细胞形成抗体
1952	OC Bruton	无丙种球蛋白血症
1955	P Grabar, CA Williams Jr.	免疫电泳
1955—1959	NK Jerne, DW Talmage, FM Burnet*	自然选择与克隆选择学说
1956	J Oudin, R Grubb	Ig 同种异型
1956	B Glick, TS Chang, RG Jaap	法氏囊参与抗体生成
1957	HH Fudenberg, HG Kundel	类风湿因子
1959—1962	RR Porter*, GM Edelman*	抗体结构
1961—1962	NL Warner, A Szenberg, FM Burnet	细胞免疫与体液免疫
1965	TB Tomasi	IgA
1967	K Ishizaka, T Ishizaka	IgE
1969	P Perlmann, G Holm	ADCC
1970	NA Mitchison, K Rajewsky, RB Taylor	载体效应
1972	H Cosenza, H Köhler	独特型抗体的调节作用
1974	NK Jerne*	独特型抗体独特型网络学说
1975	G Köhler*, C Milstein*	B 淋巴细胞杂交瘤技术
1980	S Tonegawa* (利根川进)	Ig 的基因结构
1984	SL Morrison	基因工程抗体
1989—1991	G. Winter, RA Lerner	抗体库技术

\* 为诺贝尔奖获得者

## 二、抗体生成的细胞学基础

### (一) 免疫系统

机体的免疫系统主要是由淋巴组织及器官构成的,可分为生发淋巴器官及周缘淋巴器官,前者包括骨髓和胸腺,后者包括淋巴结、脾、与粘膜及皮肤相关的淋巴组织。此外,淋巴细胞还散在于除中枢神经系统外的结缔组织中。与哺乳动物不同,鸟类的生发淋巴器官尚包括法氏囊,为B细胞成熟的部位(图1-1)。

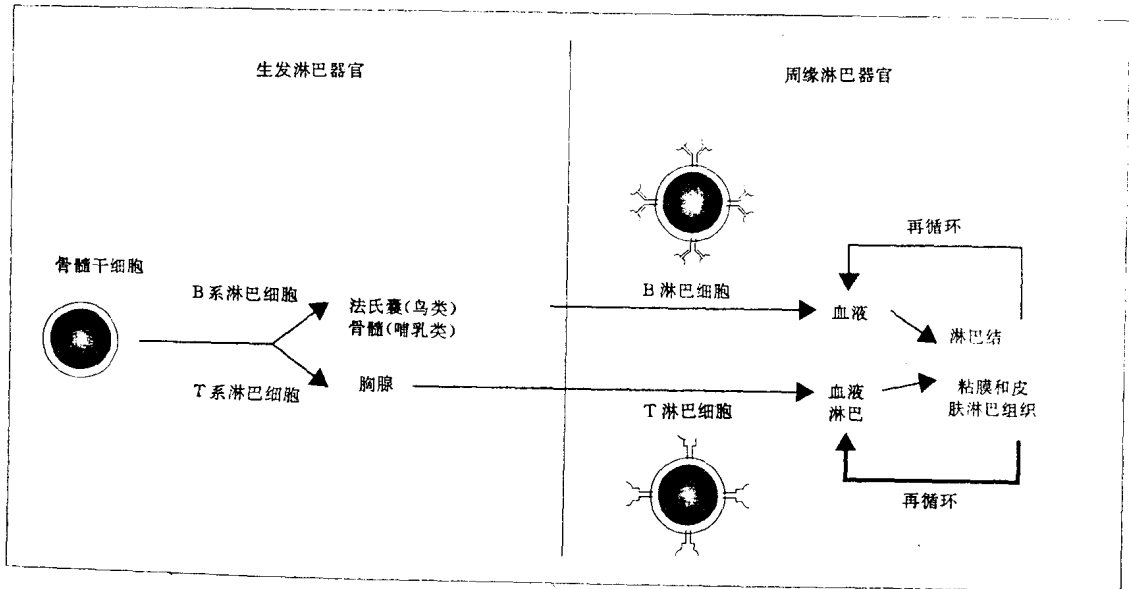


图1-1 淋巴细胞在生发淋巴器官及周缘淋巴器官中的迁移

#### 1. 骨髓

胚胎期造血始于血岛,而后为肝及脾。之后渐为骨髓所替代,主要为扁骨的骨髓。所有的血细胞均来源于共同的干细胞,而后定向分化为红细胞、巨核细胞、粒细胞、单核细胞及淋巴细胞。这一定向分化过程是由骨髓中的基质细胞及巨噬细胞等分泌的细胞因子或集落刺激因子(CSF)所调控的。哺乳动物的B淋巴细胞在骨髓中成熟,而T淋巴细胞在胸腺中成熟。

#### 2. 胸腺

为双叶器官,位于前纵隔。每一叶又可分为若干小叶,小叶由致密的皮质及髓质组成。T淋巴细胞密集分布于皮质,而散在于髓质中。上皮细胞、树突样细胞及巨噬细胞散在于整个胸腺。此外,髓质中尚有上皮细胞密集排列而成的轮状结构,称为胸腺小体(Hassall's corpuscles)。胸腺中的淋巴细胞亦称胸腺细胞。骨髓中生发并定向分化的T细胞通过血循环进入胸腺皮质,此时T细胞并不成熟,不表达抗原受体及CD4或CD8等表面标志。非成熟的T淋巴细胞由皮质进入髓质,与上皮细胞、巨噬细胞及树突样细胞紧密接触,而后成熟,表达抗原受体及表面标志,并进入血循环及周缘淋巴组织。识别自身抗原的T细胞在胸腺中凋亡,从而使免疫系统能够区别“自己”与“非己”。

#### 3. 淋巴结

淋巴结沿淋巴管分布于全身,其内部可分为外层的皮质及中心的髓质区以及二者之间的

副皮质区（图 1-2）。皮质区含有许多淋巴滤泡，具有浅染的生发中心的称为次级滤泡，否则称为初级滤泡。髓质的细胞成分散在，除淋巴细胞外尚有巨噬细胞等。不同类别的淋巴细胞及非淋巴性附属细胞存在于淋巴结的不同区域。淋巴滤泡富含 B 淋巴细胞，初级淋巴滤泡主要含有成熟的、静止的 B 淋巴细胞，它们尚未接受抗原的刺激。次级滤泡的生发中心含有众多大淋巴细胞，是 B 淋巴细胞接受抗原刺激后增殖、分化为抗体形成细胞前身的所在。位于生发中心的树突样细胞可呈递抗原（antigen presentation），选择性地活化具有高亲和性的 B 细胞。T 细胞则位于副皮质区，主要为 CD4 阳性 T 辅助细胞。通常未经抗原刺激的 T 淋巴细胞通过高内皮小静脉（high endothelial venules）进入淋巴结，在副皮质区处受到抗原刺激，位于副皮质区的树突样细胞可呈递抗原。

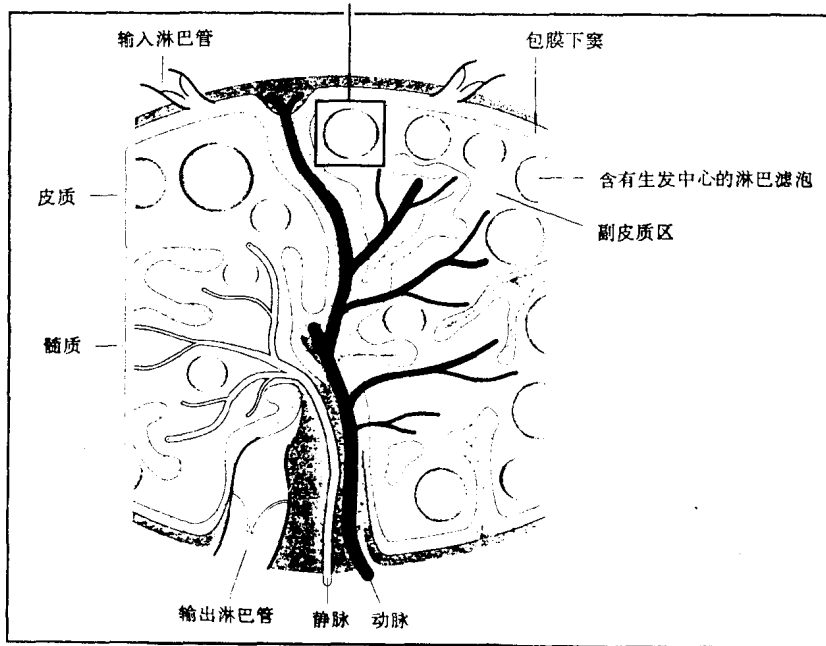


图 1-2 淋巴结结构示意图

#### 4. 脾

位于左上腹，重约 150g。其内部结构如图 1-3 所示。分支的小动脉周围为淋巴细胞包绕形成小动脉周淋巴鞘，并与淋巴滤泡相连，某些淋巴滤泡可含有生发中心。鞘与滤泡的周缘为淋巴细胞及巨噬细胞形成的边缘带。这些致密的淋巴组织构成脾的白髓。小动脉的末端为血窦，其中富含红血球、巨噬细胞、树突样细胞、淋巴细胞及浆细胞，形成脾的红髓。各种细胞在脾脏中的分布类似淋巴结。小动脉周淋巴鞘主要含 T 淋巴细胞，2/3 为 CD4<sup>+</sup>，1/3 为 CD8<sup>+</sup>。滤泡及生发中心主要为 B 细胞。周缘带含有 B 淋巴细胞及 CD4<sup>+</sup>T 细胞。抗原和淋巴细胞通过血管窦进入脾，B 细胞的活化始于边缘带，而后进入淋巴滤泡的生发中心或红髓。脾和淋巴结主要的不同点在于，前者为经血抗原的主要免疫反应场所，后者为经淋巴抗原的主要免疫反应场所。此外脾尚有“过滤”功能，可清除异物及衰老的红细胞。

#### 5. 其他周缘淋巴组织

除淋巴结和脾外，淋巴细胞尚集结或散在于多种组织。集结于胃肠道及呼吸道粘膜下的淋巴组织，其结构类似淋巴结，如小肠粘膜固有层中的 Peyer's 斑，鼻咽部的扁桃体，阑尾及

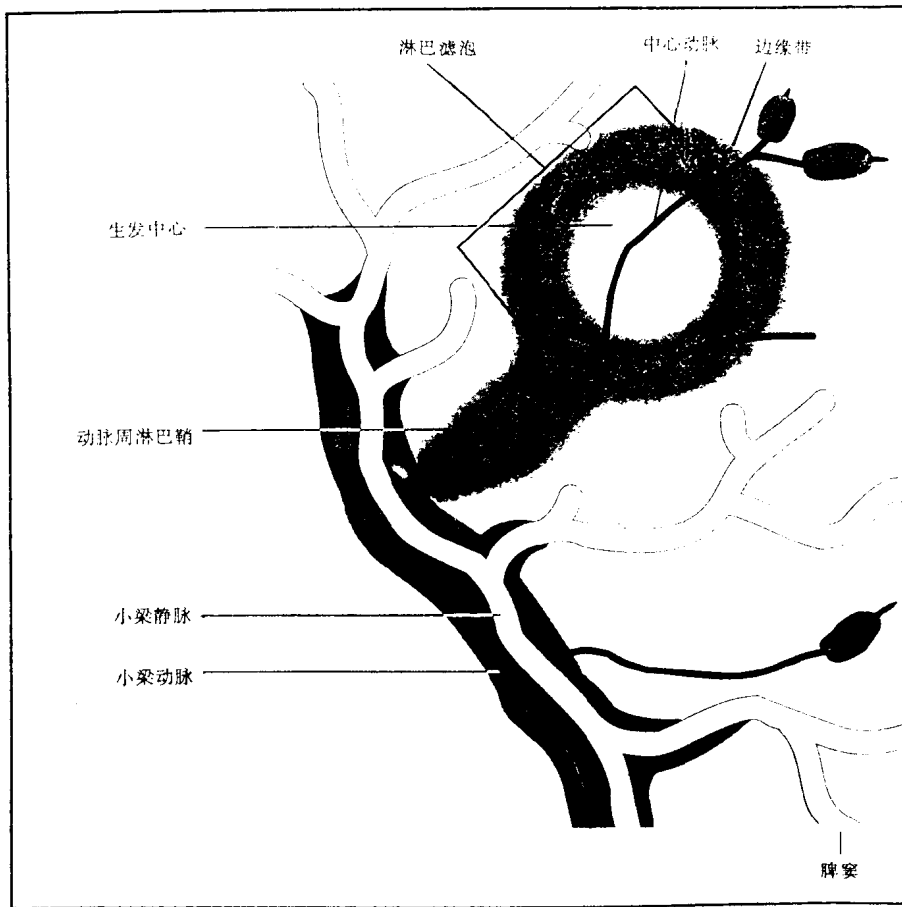


图 1-3 脾脏结构示意图

上呼吸道粘膜下的淋巴滤泡等，共同形成粘膜免疫系统。皮肤免疫系统则包括表皮及真皮中的淋巴细胞及附属细胞。

## (二) B 淋巴细胞的成熟

所有的 B 淋巴细胞均来自骨髓的干细胞，如图 1-4 所示，B 淋巴细胞的成熟大体经历下述几个阶段：干细胞→前 B 细胞→非成熟 B 细胞→成熟 B 细胞→活化的 B 细胞→浆细胞。前 B 细胞仅存在于骨髓或胚肝等造血组织中，可合成胞浆内的  $\mu$  链，但不表达功能性的膜型 IgM，因此对抗原不具有识别及反应的功能。前 B 细胞中的某些  $\mu$  链与“替代性轻链”相结合，后者结构上与  $\kappa$  及  $\lambda$  轻链同源，但不含有 V 区，在所有 B 细胞中均是相同的。该蛋白与前 B 细胞的进一步成熟有关，因该基因被同源重组“敲除”后，可明显减少成熟的 B 细胞。

在非成熟 B 淋巴细胞阶段，可合成  $\kappa$  及  $\lambda$  轻链，它们与  $\mu$  链组装形成 IgM 并表达于细胞表面，成为特异的抗原受体。该阶段抗原的刺激并不诱导细胞增殖及分化，相反可引起免疫无反应或耐受。这对免疫系统区别“自己”与“非己”是很重要的。细胞获得完整的 Ig 及特异性后即可逸出骨髓，进入血循及周缘淋巴组织，即使无抗原刺激，亦可继续分化为成熟的 B 淋巴细胞。它共表达膜型 IgM 及 IgD，二者具有共同的 V 区及抗原特异性。此阶段的细胞可对抗原作出反应。

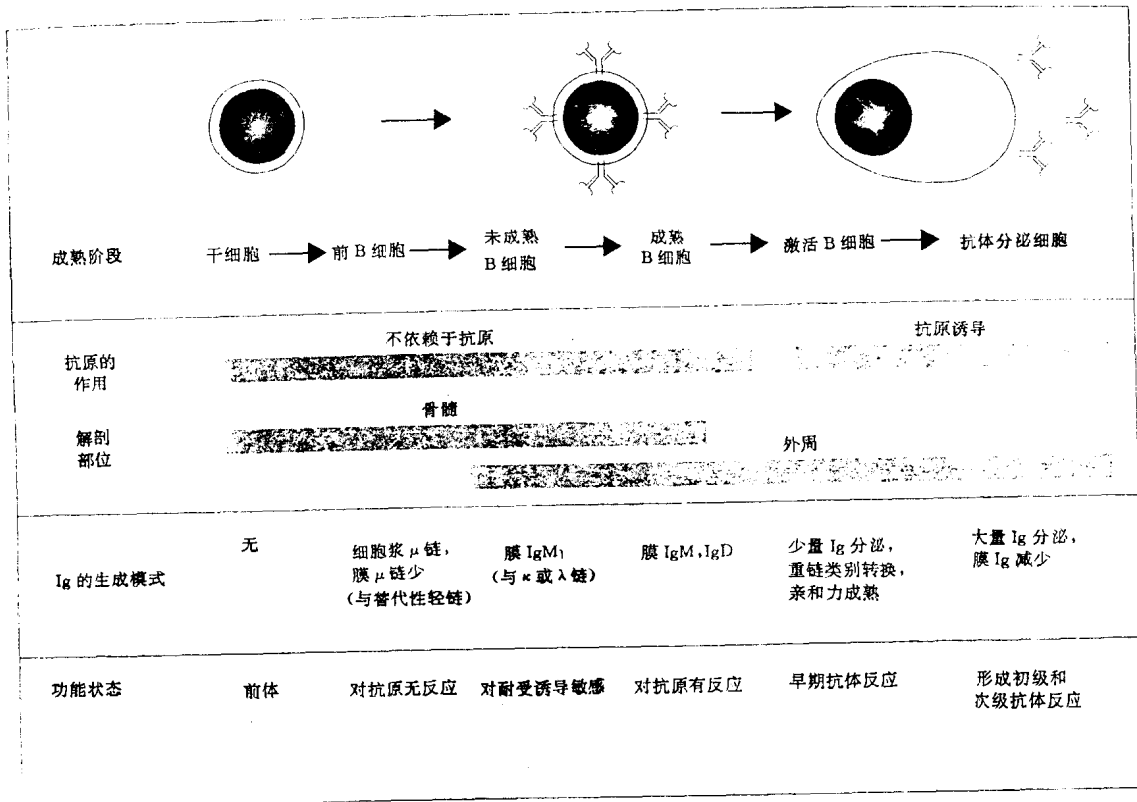


图 1-4 B 淋巴细胞的成熟及分化阶段

一旦成熟 B 细胞受到抗原刺激即可成为活化的 B 细胞, 后者增殖并分化, 其分泌型 Ig 渐增多而膜型 Ig 逐渐减少。某些活化的 B 淋巴细胞可进行类别转换 (class switching), 即不再表达  $\mu$  和  $\delta$ , 而表达  $\gamma$ ,  $\alpha$  或  $\epsilon$ 。另一些活化的 B 淋巴细胞可成为记忆细胞, 可生存数周至数月, 循环于血液、淋巴及各种淋巴器官中间。活化的淋巴细胞最终分化为分泌抗体细胞, 其中某些因其典型的形态特征而称之为浆细胞。通常正常人体血液及淋巴组织中的多数 B 细胞为 IgM<sup>+</sup> 或 IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>。成熟的 B 淋巴细胞在接受抗原刺激而活化的过程中, 其所表达的 Ig V 区可有轻微变化, 使其与抗原具有更高的亲和力, 这一过程称之为亲和力成熟 (affinity maturation)。此外, 每一 B 淋巴细胞克隆仅表达对某一抗原决定基专一的 Ig, 尽管 B 淋巴细胞是杂合子, 但仅能表达来自亲代双方的一套 Ig 的重链及轻链, 称为等位基因排斥 (allelic exclusion)。而且, 所表达的轻链只能是  $\kappa$  及  $\lambda$  中的一型, 称为轻链型排斥 (light chain isotype exclusion)。

### (三) B 淋巴细胞的活化

抗原经血或淋巴进入周缘淋巴组织, 与成熟的 B 淋巴细胞相遇, 后者表达 IgM 及 IgD, 可视为特异抗原的受体, 抗原与膜型 IgM 及 IgD 的结合即可启动 B 淋巴细胞的活化, 导致后者增殖及分化, 最终分泌抗体。通常蛋白性抗原在缺乏 T 淋巴细胞的情况下, 不能引起抗体产生反应, 故称为 T 依赖性抗原; 而多糖、脂类及核酸等非蛋白抗原在无 T 淋巴细胞辅助的情况下亦可诱导抗体产生, 故称为 T 非依赖性抗原 (TI)。此外, 机体首次接触抗原的初次抗体反应及多次接触抗原后的二次抗体反应亦有很多不同 (表 1-2)。

表 1-2 初次及二次抗体反应的特性

	初次反应	二次反应
免疫后潜伏期	5~10 天	1~3 天
峰值高度	小	大
抗体类别	通常 IgM>IgG,	IgG 相对增加, 某种情况下为 IgA 或 IgE
抗体亲和力	低	高
抗原类别	所有免疫原	仅蛋白性抗原
免疫条件	高剂量抗原加佐剂	低剂量抗原, 可不需佐剂

### 1. 抗原对 B 淋巴细胞的作用

T 依赖性抗原与 B 淋巴细胞表面的膜型 Ig 结合后, 可引起双重反应。首先, 抗原刺激 B 细胞内的第二信使, 使 B 细胞由静止状态进入细胞增殖周期; 其次, 内化并处理抗原, 由 B 细胞呈递抗原并活化相应的 T 辅助细胞, 后者与 B 细胞的接触及所分泌的因子在抗体生成中至关重要。

抗原与其相应受体, B 淋巴细胞膜型 IgM 及 IgD 结合后可引起后者的交联, 从而介导一系列信号传递。但膜型 IgM 及 IgD 的膜内区过短, 仅含赖氨酸、缬氨酸及赖氨酸组成的三肽, 难以传递信号。Ig $\alpha$  及 Ig $\beta$  为与 IgM 及 IgD 共表达的蛋白, 通过非共价键与后者相连, 其膜内区与若干酪氨酸蛋白激酶相连, 可介导一系列磷酸化作用。类似的情况亦见于 T 淋巴细胞, T 淋巴细胞受体 (TCR) 的膜内区亦很短, 需经 CD3 分子辅助, 方可有效的传导信号。蛋白激

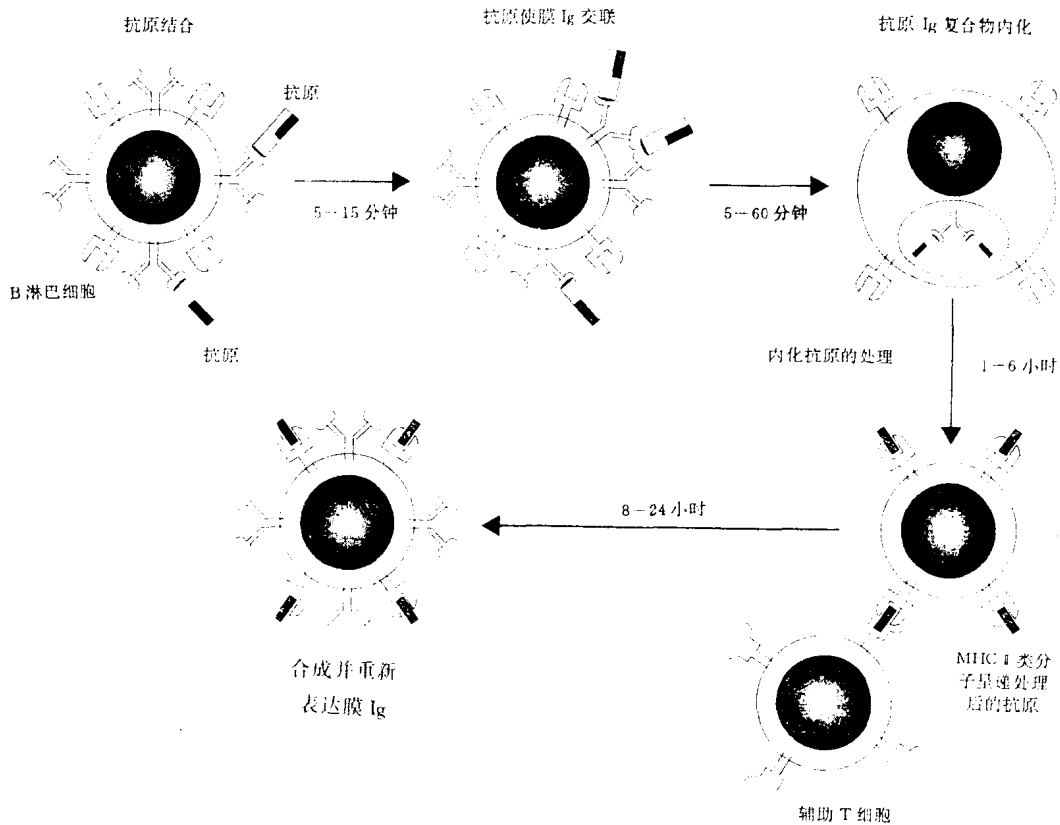


图 1-5 蛋白性抗原与 B 淋巴细胞结合后的转归



酶的活化导致胞浆内众多蛋白质的磷酸化，其中之一为磷脂酰肌醇特异的磷脂酶  $CY1$  (PI-PLC- $\gamma 1$ )，该酶的活化使膜内的磷脂酰肌醇二磷酸盐 (PIP<sub>2</sub>) 分解产生三磷酸肌醇 (IP<sub>3</sub>) 及双酰基甘油 (DAG)，IP<sub>3</sub> 可使胞浆内的  $Ca^{2+}$  快速升高。DAG 可活化蛋白激酶 C，从而进一步使其他蛋白质磷酸化。磷酸化的某些蛋白质可作为转录因子，导致某些特殊基因的表达。需要说明的是，T 非依赖性抗原，如多糖等含有同一抗原决定基的重复结构，具有较强的交联 B 淋巴细胞膜型 Ig 的作用，而蛋白性抗原，其所含抗原决定基彼此不同，对 B 淋巴细胞的膜型 Ig 较少交联作用，因此 B 淋巴细胞的活化可能更多地依赖于 T-B 细胞之间的相互作用。抗原与 B 淋巴细胞表面的相应受体结合后，可被内化并处理为小肽，后者与 MHC II 类分子结合，为相应 T 辅助细胞识别并使后者受到活化 (图 1-5)。

### 2. T 辅助细胞在抗体生成中的作用

除抗原作为第一信号外，B 细胞的活化尚需第二信号，即 T 细胞 (CD4<sup>+</sup>) 的辅助作用。如前所述，B 细胞表面的 Ig，作为受体识别蛋白性抗原天然构型中的某些决定基，这种特异的结合可使抗原内化，经处理后，以小肽的形式与 B 细胞的 MHC II 类分子形成复合物，这一抗原的提呈使特异性 T 辅助细胞活化并反过来促进与 B 细胞的特异性的物理接触 (cognate)，在活化 B 细胞分泌抗体中具有重要作用。T 辅助细胞接受 B 细胞抗原呈递的刺激后活化并表达 gp39，后者与抗原提呈 B 淋巴细胞表面的 CD40 分子 (TNF 受体及 Fas 蛋白的同源物) 结合，gp39 与 CD40 之间的反应可刺激 B 淋巴细胞增殖，并使其处于接受细胞因子作用进一步分化的状态。其次，活化的 T 辅助细胞可分泌多种细胞因子，促进 B 细胞的进一步增殖及分化，终至分泌各种抗体 (图 1-6)。

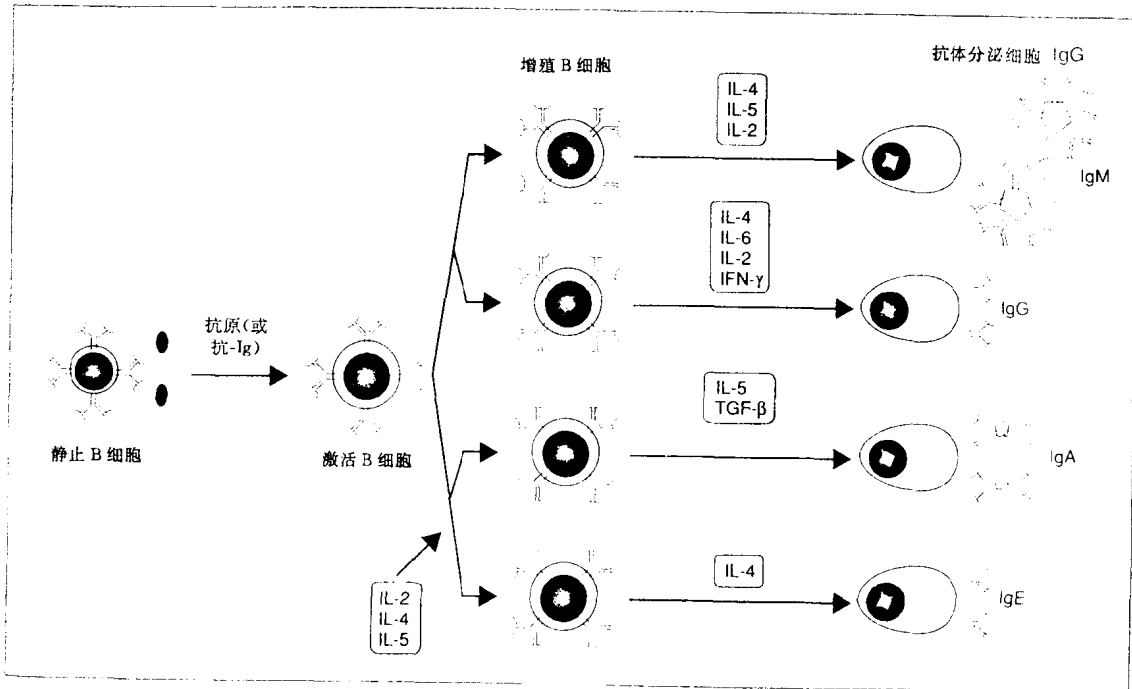


图 1-6 细胞因子对 B 淋巴细胞增殖及分化的作用

### 3. 其他附属细胞在抗体生成中的作用