

CD₂₃McAb 抑制活化 B 细胞增殖机制的初步探讨*

赵海霞** 徐德胜 王秀梅** 张晓燕 陈新洁 刘娜新

(北京医科大学细胞生物学教研室 北京 100083)

CD₂₃ 是一种 IgE 低亲和力受体, 分子量为 45 KDa 的穿膜糖蛋白, 有 A、B 两型: A 型仅分布于 sIgM⁺/sIgD⁺ 双阳性 B 细胞, 而 B 型 CD₂₃ 可表达于除 B 细胞之外的多种细胞。CD₂₃ 分子只有膜结合型(mCD₂₃), 而无分泌型蛋白, 因而它的生物学功能也应以膜结合形式为主。该分子裂解脱落的片段(sCD₂₃)有多种细胞因子作用, 例如: 调控 IgE 的合成^[1], 单核细胞移动抑制, 促进 B 细胞的增殖和分化^[2], 并与某些疾病有关。膜 CD₂₃ 分子可能具有调节 B 细胞增殖和分化的功能, CD₂₃ 既能够促进也能够抑制 B 细胞从 G₁ 期循环到 S 期, 而且 B 细胞在 G₁ 期高表达 mCD₂₃, 而在 S 期几乎不表达。CD₂₃ 分子介导 B 细胞的这种激活和分化作用可能是通过磷酸肌醇通路实现的^[3]。我们以往的研究也显示 CD₂₃McAb 对 B 细胞的影响, 可依其浓度不同而造成促进(0.0025—0.05 μg/ml)或抑制(>0.16 μg/ml)的双向调节效应。有关促 B 细胞增殖作用浓度 CD₂₃McAb 的机制, 我们已进行过详细的研究^[4]。本文则通过用 SAC(1:10000)和促 B 细胞增殖浓度的 CD₂₃ McAb (0.05 μg/ml)再次刺激呈抑制状态 B 细胞的方法, 对 CD₂₃ 介导的抑制 B 细胞增殖效应的机制进行了初步探讨。本项研究表明, 高浓度 CD₂₃McAb 导致抑制 B 细胞增殖的效应, 在只去除抑制剂后, 抑制效应仍然存在, SAC(1:10000)可以使 B 细胞重新恢复增殖状态, 而促 B 细胞增殖浓度的 CD₂₃McAb 则无此作用。这一发现, 为膜 CD₂₃ 分子介导 B 细胞抑制信号的研究提出了新的课题。

材料与方 法

一、材料

1. 试剂: 淋巴细胞分层液为上海试剂二厂生产。

MTT、AET 均为 Sigma 公司产品。葡萄球菌 A 蛋白(SAC)为上海生物制品研究所生产, 使用前将 SAC 经 100℃水浴煮沸 20 分钟, 用无血清 RPMI-1640 培养基配成 1:100 浓度, -30℃冻存。RPMI-1640 培养基为 J. R. Scientific Int 产品。Percoll 为 Pharmacia 公司产品。

2. 主要仪器: FACS 分析仪(Becton Dickinson 420)。酶标光度计(DG 3022 型, 南京产品)

3. 抗体和细胞: FITC-羊抗鼠 IgG 购自华美生物工程公司, 鼠抗人 CD₂₃ 单克隆抗体(CD₂₃McAb)为中国军事医学科学院产品。儿童扁桃体为北京儿童医院提供。绵羊红细胞(SRBC)为北京医科大学动物部提供。

二、实验方法

1. 儿童扁桃体组织中单个核细胞及 B 淋巴细胞的分离^[4]

将取来的扁桃体剪碎, 用高浓度双抗 RPMI-1640 冲洗, 获得细胞悬液, 用 Ficoll-泛影葡胺淋巴细胞分层液分离获取单个核细胞, 再用贴壁法去除单核细胞。用 AET 活化的 SRBC 作 E 花环, 经过两次 E 花环后分别用 Tris-NH₄Cl 和 Hank's 洗细胞获取 B 淋巴细胞, 经流式细胞仪分析鉴定, B 淋巴细胞纯度达到 87%。

2. B 细胞的活化培养及活化 B 细胞的获取

将获得的 B 细胞配成 2×10^6 /ml 加入培养瓶(1×10^7 /瓶), 再加入终浓度为 1:10000 的 SAC, 置 37℃, 5%CO₂ 孵箱培养 48 小时, 此时 B 细胞高表达膜 CD₂₃ 分子。用 Percoll 不连续密度梯度离心法^[3]去除菌体部分, 活化 B 细胞从 Percoll 不连续密度梯度的 50% 和 30% 界面获得。

3. CD₂₃McAb 应用浓度的选择

经 SAC 活化的 B 细胞按 2×10^5 /孔细胞密度加于 96 孔培养板(100 μl/孔), 复式 32 孔, 将 CD₂₃ McAb 作一系列浓度稀释, 以 10 μl/孔分加于上述 96 孔培养板中, 使其终浓度依次为 2.5 μg/ml, 0.64 μg/ml, 0.16 μg/ml, 0.04 μg/ml, 0.01 μg/ml, 0.0025 μg/ml,

* 卫生部基金资助课题

** 内蒙古医学院免疫教研室(呼和浩特, 010059)

0.0006 $\mu\text{g/ml}$, 以 RPMI-1640 作阴性对照, 培养 48 至 56 小时, 然后, 用 MTT 比色分析法^[5]测定细胞增殖效应, 选择检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm, 测定 OD 值, 结果以 $\text{OD}_{570-630} \pm \text{SD}$ 表示。同时做活细胞染色(活细胞率 > 91%)。

4. CD_{23} McAb 抑制 B 细胞增殖实验

将活化 48 小时的 B 细胞分成两组, 一组加入对 B 细胞增殖有抑制作用浓度的 CD_{23} McAb (2.0 $\mu\text{g/ml}$), 该组为活化交联组 (Ba + McAb), 另一组不加入 CD_{23} McAb, 以 RPMI-1640 代替, 作为活化未交联组 (Ba)。另外, 将未活化的 B 细胞只用 RPMI-1640 培养作为对照组 (ctrl), 以上三组细胞同时培养 56 小时, 培养结束, 用同方法测定 OD 值。

5. 结合 B 细胞的 CD_{23} McAb 的去除^[6]

将活化的 B 细胞与终浓度为 2.0 $\mu\text{g/ml}$ CD_{23} McAb 共育 48 至 56 小时, 以 RPMI-1640 作阴性对照 (ctrl.) 培养结束将经 CD_{23} McAb 刺激的 B 细胞分两组, 一组去除交联剂 CD_{23} McAb (washed), 即先用 0.05 mol/L pH 4.6 柠檬酸盐缓冲液洗细胞 1 次, 再用 Hank's 液洗两次, 另一组不去除 CD_{23} McAb (unwashed), 即不用柠檬酸盐缓冲液处理, 活化未交联对照组也只用 Hank's 液洗两次。将上述三组细胞 (1×10^6 个) 分别与 50 μl 应用浓度的 FITC-羊抗鼠 IgG 混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟, 用 Hank's 液洗 3 遍后, 经流式细胞计分析 B 细胞表面结合的 CD_{23} McAb 的去除效率, 计数 10000 个细胞/样品, 结果以阳性细胞百分数表示。

6. 抑制状态的 B 细胞再次活化诱导

将用 CD_{23} McAb (2.0 $\mu\text{g/ml}$) 抑制的 B 细胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) 用上述方法去除细胞表面交联剂 (CD_{23} McAb) 后, 分为两组, 一组加入 1:1000 SAC (Bi + SAC), 另一组加入 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的 CD_{23} McAb (Bi + McAb), 同时置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵箱培养三天, 以 RPMI-1640 作为对照 (Bi), 然后用 MTT 法测定 OD 值结果以 $\text{OD}_{570-630} \pm \text{SD}$ 表示。

结 果

1. CD_{23} McAb 对活化 B 细胞的影响

根据活的增殖细胞能代谢 MTT 的原理, 我们用 MTT 比色分析法观察到 CD_{23} McAb 对活化的 B 细胞有双向调节效应, 即在高浓度区 (> 0.16 $\mu\text{g/ml}$) 抑制 B 细胞增殖, 在低浓度区

(0.0025 $\mu\text{g/ml}$ —0.05 $\mu\text{g/ml}$) 促进 B 细胞增殖 (如图 1 所示)。

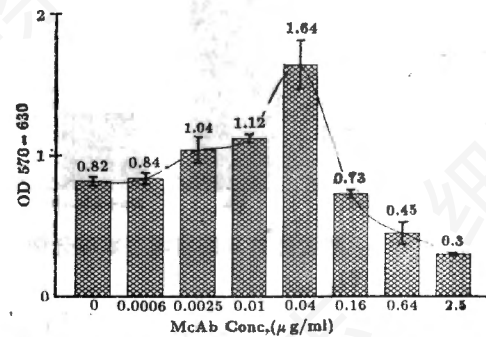


图 1 CD_{23} 单抗对 B 细胞增殖的影响

2. 膜结合的 CD_{23} McAb 解离试验

将抑制状态的 B 细胞分为去除和未去除 CD_{23} McAb 交联抑制剂两组, 分别标记 FITC-羊抗鼠 IgG。用 FACS 分析, 结果显示: 去除交联剂 (washed) 组和未去除交联剂 (unwashed) 组分别为 11.9% 和 31.67%, 阴性对照 (ctrl.) 组为 10.8%, 表明阴性对照组阳性细胞百分率为 10.8%, 其他两组的阳性百分率分别减去阴性对照组 (ctrl.) 后即为所对应的阳性细胞百分率, washed 组和 unwashed 组分别为 1.1% 和 20.87%, 可见经 0.05 mol/L pH 4.6 柠檬酸盐缓冲液处理后的细胞非共价结合的 CD_{23} McAb 可以被去除 (图 2 所示)。

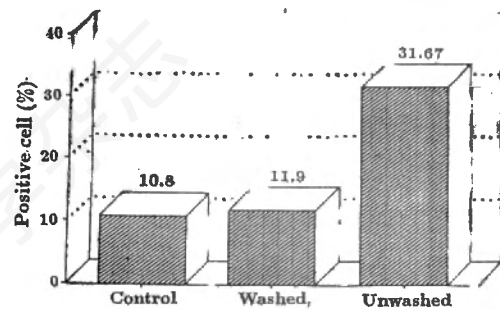


图 2 低 pH 值柠檬酸缓冲液去除 B 细胞表面 CD_{23} 单抗作用分析

3. CD_{23} McAb 特异性抑制 B 细胞增殖

如图 3 所示, 活化未交联对照组 (Ba) OD 值 = 0.82 ± 0.03 , 未活化未交联组 (ctrl.) OD 值 = 0.27 ± 0.04 , 经 CD_{23} McAb (2.0 $\mu\text{g/ml}$) 交

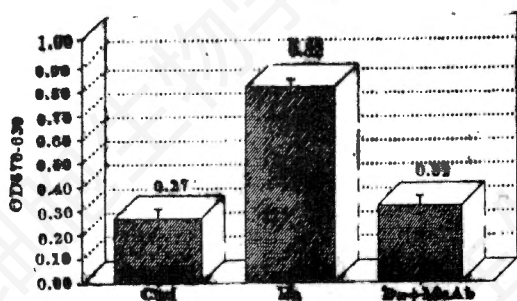


图3 CD₂₃单抗抑制B细胞增殖效应分析 (n=6)

联的活化B细胞(Ba + McAb)OD值 = 0.32 ± 0.04 (与Ba组比较, $P < 0.01$), 表明 2.0 μg/ml 的 CD₂₃McAb 明显抑制活化B细胞的增殖。

4. SAC和促增殖浓度CD₂₃McAb对抑制状态B细胞恢复增殖的影响

用 2.0 μg/ml 的 CD₂₃McAb 作为交联浓度, 将 CD₂₃McAb 加入活化的B细胞中, 共同培养 48 至 56 小时后, 去除B细胞表面结合的 CD₂₃McAb, 用 RPMI-1640 继续培养 48 小时 (作为 Bi 组) 测 OD₅₇₀₋₆₃₀ = 0.30 ± 0.04, 说明单独去除B细胞表面交联剂不能使受抑制的B细胞恢复正常的细胞增殖周期。另外, 将已被 CD₂₃McAb 抑制的 Bc(Bi) 分为两组, 一组加入 SAC(1:10000) 再次刺激处于抑制状态的B细胞 (Bi + SAC), 培养 48 小时后, OD 值明显升高 OD₅₇₀₋₆₃₀ = 1.21 ± 0.03, (经 t 显著性检验, $P < 0.01$); 而用促增殖浓度的 CD₂₃McAb (0.05 μg/ml) 刺激的抑制状态的B细胞 (Bi + McAb), 同样培养 48 小时后, 其 OD 值 = 0.49 ± 0.04

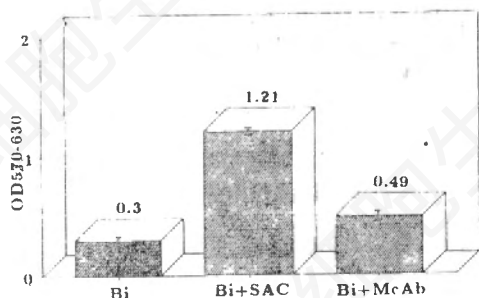


图4 受CD₂₃单抗抑制的B细胞恢复条件分析 (n=6)

($P > 0.05$), 表明B细胞仍呈抑制状态。可见, SAC可以诱导处于G₀期的B细胞恢复正常细胞分化时间, 将抑制信号转化为促B细胞增殖的信号。使B细胞从G₀期进入S期。而促增殖浓度的 CD₂₃McAb 不能改变这种抑制效应, 不能使已经被 CD₂₃McAb 抑制的B细胞恢复增殖状态, B细胞仍停止在G₀期 (见图4)。

讨论

CD₂₃分子的配体有: IgE、CD₂₃McAb 和 CD₂₁。Aubry^[7]等发现, CD₂₁(CR²EBV受体)是 CD₂₃的一个新配体, 主要表达于活化的B细胞上, 可促进外周血B细胞增殖, CD₂₁是一个具有传导生长信号的受体。CD₂₃-CD₂₁相互作用, 可以促进EBV转染的B细胞或活化的B细胞分泌自促生长因子。膜CD₂₃分子 (mCD₂₃) 主要表达于成熟B细胞 (IgM + /IgD +), 它能够将信号传递给B细胞从而改变细胞周期中G₁期进入S期的倾向。目前还不清楚, 为什么mCD₂₃分子介导的信号有时促进, 有时却抑制B细胞的增殖和分化。B细胞对 CD₂₃McAb 的应答方式主要取决于膜CD₂₃分子的交联程度, 有关促B细胞增殖浓度的 CD₂₃McAb 的作用机制及途径的研究我们已有报道^[8], 而关于抑制浓度 CD₂₃McAb 的作用机制在该文中我们进行了初步探讨。

我们用 CD₂₃分子的天然配体 CD₂₃McAb 交联 mCD₂₃分子, 发现 CD₂₃McAb 在高浓度区域 (>0.16 μg/ml) 通过广泛交联 mCD₂₃分子抑制了B细胞的增殖, 而在有效浓度 (0.04—0.05 μg/ml) 范围内则有促增殖效应。这一结果与我室以往试验完全相符。我们进一步用抑制浓度 (2.0 μg/ml) CD₂₃McAb 交联活化的B细胞膜 CD₂₃分子产生的抑制效应机制进行了初步探讨。发现: SAC活化B细胞的增殖被高浓度 CD₂₃McAb 抑制后B细胞并未死亡 (活细胞率 > 91%), 但在去除 CD₂₃McAb 后, B细胞不能自发恢复增殖状态。我们认为, 抑制浓度的 CD₂₃McAb 与 mCD₂₃分子广泛结合,

向活化的B细胞内传递一种抑制信号,即使在去除抑制剂情况下,B细胞仍然不能恢复增殖状态,说明广泛交联膜CD₂₃分子后,可能一方面耗尽了B细胞表面的膜CD₂₃分子;另一方面这种交联所产生的抑制信号可使得B细胞走出细胞分裂周期,而进入G₀期。继而,当我们分别用SAC(1:10000)和CD₂₃McAb(0.05 μg/ml)作用于抑制状态的B细胞时,发现:本具有活化B细胞作用浓度的CD₂₃McAb(0.05 μg/ml)不能解除这种抑制状态,而SAC却可以使B细胞重新恢复增殖状态,这一结果与新分离的休止状态B细胞的反应性基本一致。进一步提示:膜CD₂₃分子的广泛交联确使得增殖状态的B细胞进入了G₀期。有关活化的B细胞增殖受CD₂₃McAb抑制的细胞内过程以及CD₂₃介导的抑制信号的传递途径正在研究之中。

摘 要

本研究用CD₂₃单克隆抗体(CD₂₃McAb)交联活化的人扁桃体B细胞,证明CD₂₃McAb对B细胞呈双向调节效应,即:高浓度区抑制B细胞增殖,低浓度区促进B细胞增殖。继而,用对B细胞有抑制效应浓度的CD₂₃McAb交联B细胞膜CD₂₃分子,通过研究抑制效应恢复

条件,探讨了CD₂₃McAb产生抑制效应的作用机制。结果显示,去除CD₂₃McAb后,抑制作用不能恢复,用SAC再次活化,使B细胞恢复增殖状态,用促B细胞增殖浓度的CD₂₃McAb却无此作用。提示:过量CD₂₃McAb过度交联B细胞膜CD₂₃分子后,所产生的抑制B细胞增殖现象,可能是由于促使B细胞从细胞增殖周期进入非增殖状态的G₀期所致。

关键词: CD₂₃ B细胞 增殖

参 考 文 献

- [1] Delespesse, G., et al., 1989, *Immunol Today*, 10: 159—164.
- [2] Armitage K. J. and Goff L. K., 1988, *Eur J Immunol.*, 18: 1753—1760.
- [3] Kolb J. P. et al., 1990, *J Immunol.*, 145: 429—437.
- [4] 徐德胜等,中国科协首届青年学术年会论文汇编,上海,1992年。
- [5] 周道洪等,1986,中国免疫学杂志,2: 39—44.
- [6] Ishizaka k. et al. 1970, *J Immunol.* 105: 1459—1467.
- [7] Aubry J. P. et al. 1992, *Nature*, 358: 505—507.
- [8] 喻学忠等,1992,中国免疫学杂志,8: 263—267.

MECHANISMS OF INHIBITING B CELL PROLIFERATION OF CD 23 MCAB

Haixia Zhao, Dsheng Xu & Xiumia Wang et al.

(Dept. of Cellular Biology, Beijing Medical University 100083)

ABSTRACT

Effects of CD 23 McAb on B cells activated with SAC were studied by MTT method. We found that CD 23 McAb could influence significantly the proliferation of CD 23⁺ B cells at a figure of two-way phenomenon, that high concentration of ligands inhibited the proliferation of B cells, whereas a suitable concentration of CD 23 McAb improved the proliferation. Further, the mechanisms of proliferation inhibition by CD 23 McAb (2.0 mg/ml) of B cells activated with SAC were also tested. The result indicated that proliferation of B cells could not be restored by simply removing CD 23 McAb or adding CD 23 McAb at stimulating concentration(0.05 μg/ml). However, SAC could eliminate the inhibition effect of high concentration of CD 23 McAb on B cells. We proposed that overdose CD 23 McAb could cross-link extensively the CD 23 molecules and produces negative signals that induce B cells into G₀.

Key words: CD 23 B Cell Proliferation