

网络出版时间:2022-1-25 7:22 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220124.0942.028.html

◇技术与方法◇

B 细胞分化浆母细胞及浆细胞的体外模型建立

刘静¹, 陈惠荣¹, 郭佳琦², 马金海¹

摘要 采用健康人外周血体外诱导 B 淋巴细胞增殖分化为浆母细胞及浆细胞。通过观察细胞形态特征,流式细胞术分析 B 细胞膜表面分子表达水平及细胞活力,发现 CD40L 信号激发、CpG 免疫调节序列联合及优化细胞因子组合运用,能有效促进人 B 淋巴细胞的转化及体外建系。

关键词 B 细胞;浆母细胞;浆细胞;体外

中图分类号 R 392.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0493-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.030

B 淋巴细胞又称骨髓依赖性淋巴细胞,由骨髓中的造血干细胞分化发育而来,在人体内合适环境刺激下增殖分化为浆母细胞及浆细胞,而浆细胞合成和分泌免疫球蛋白,在体液免疫反应中起着至关重要的作用^[1]。近十年,有越来越多的实验研究 B 细胞在体外增殖分化为浆细胞的步骤,但过程繁琐且周期长^[2-3]。该研究用 3 个步骤建立从 B 细胞增殖分化成浆母细胞和浆细胞的体外模型,这种体外模型有助于对浆母细胞及浆细胞的功能进一步研究,也为研究多发性骨髓瘤一类浆细胞发育不良疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 健康捐献者外周血单个核细胞,用 CD19 MicroBeads human Isolation Kit 分离 B 细胞,纯度 > 95%。接种于 24 孔板进行细胞培养,分为 CD40L 对照组及 CD40L + CpG 组,每孔 2 ml 培养液, B 细胞浓度为 1.5×10^3 个/L。标本已获得健康捐赠者知情同意。

1.2 试剂与仪器 CpG、白细胞介素(interleukin)-

2、IL-4、IL-6、IL-21、干扰素 α (interferon- α , IFN- α)、April、抗体 CD19-PerCP-Cy、CD27-PE/Cy7、CD38-APC、CD24-PE、CD138-N421、CD20-FITC、Fc block、培养液均购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;BD LSR II 流式细胞检测仪购自美国 BD 公司;超净工作台购自苏州市洁净技术研究所;台式离心机购自上海安亭科学仪器厂;温水浴锅和恒温箱购自上海精宏实验设备有限公司。

1.3 实验方法 优化 B 细胞的增殖和分化。步骤 1: B 细胞激活,将纯化的 B 细胞以 1.5×10^3 个/L 浓度置于 24 孔板的 RPMI1640 培养液,10% FBS,以 0.002 L/孔培养细胞。加入 CD40L (0.05 μ g/L)、IL-2 (0.05 μ g/L)、IL-4 (0.05 μ g/L) 或 CD40L (0.05 μ g/L)、CpG (0.01 μ g/L)、IL-2 (0.05 μ g/L)、IL-4 (0.05 μ g/L) 培养 4 d。步骤 2: 浆母细胞分化,在培养第 4 天,收集细胞并用培养液清洗,去除 CD40L、CpG,加入细胞因子组合: IL-2 (0.05 μ g/L)、IL-6 (0.05 μ g/L) 或 IL-2 (0.05 μ g/L)、IL-6 (0.05 μ g/L)、IL-21 (0.05 μ g/L)、IFN- α (0.02 μ g/L) 促进浆细胞分化 3 d。步骤 3: 浆细胞分化,在培养第 7 天,洗涤细胞,分别以 IL-2 (0.05 μ g/L)、IL-6 (0.05 μ g/L)、April (0.02 μ g/L)、IFN- α (0.02 μ g/L) 或 IL-2 (0.05 μ g/L)、IL-6 (0.05 μ g/L)、IL-21 (0.05 μ g/L)、IFN- α (0.02 μ g/L) 培养 3 d,整个过程共 10 d。

1.3.1 倒置显微镜下观察不同时期 B 细胞形态学变化 B 细胞激活后体积逐渐增大,在第 7 天及第 10 天观察细胞形态变化。在每一个步骤结束用台盼蓝对细胞生存率进行测定。

1.3.2 流式细胞仪分析 通过荧光素 FITC 结合抗 CD20 抗原, PE 结合抗 CD38 抗原进行多色荧光激活细胞分选,对第 7 天浆母细胞 (CD20⁺CD38⁺) 进行染色。使用 FITC 结合抗 CD20 和 PE 结合抗 CD138 抗原对第 10 天的浆细胞 (CD20⁺CD138⁺) 进行染色。在 BD LSR II 流式细胞仪上直接免疫荧光染色分析细胞。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件使用非参数 Mann-Whitney 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间

2021-08-24 接收

基金项目:国家留学基金(留金项[2018]10038 号);宁夏自治区自然科学基金(编号:2019AAC03186)

作者单位:¹ 宁夏医科大学总医院儿科,银川 750004

² 宁夏医科大学中心实验室,银川 750004

作者简介:刘静,女,主治医师;

马金海,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: makhen@163.com

比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 优化 B 细胞的增殖和分化 用 CD40L、CpG、IL-2、IL-4 激活 B 细胞 4 d。去除 CD40L 及 CpG, 加入 IL-2、IL-21 促进浆母细胞分化 3 d。加入 IL-2、IL-6、IFN- α 、April 促进浆细胞分化 3 d, 得到浆细胞数量及活性最佳。见表 1。

2.2 倒置显微镜下细胞形态变化 第 7 天及第 10 天倒置显微镜下可见 B 细胞在分化过程中, 形态由球形变为不规则形, 胞质丰富, 表面光滑, 由分散生长逐渐到成簇生长。CD40L 组及 CD40L + CpG 组均可见大量 B 细胞增殖, 在第 7 天细胞存活率均在 80.0% 以上, 而第 10 天大量细胞死亡, 存活率降至 39.0%。

2.3 流式细胞仪对细胞表面分子表达水平检测 步骤 1: 从健康人外周血单个核细胞获得纯化的 B 细胞, 用 CD40L + CpG、IL-2、IL-4 激活 B 细胞获得大量活性 B 细胞。CD40L 和 CpG 同时刺激 B 细胞激活时, 增殖能力会大大增强, 并且诱导浆母细胞分化。第 4 天扩增的细胞中得到 40.2% $CD20^+ CD38^-$ 细胞, 12.6% $CD20^- CD38^{++}$ 细胞, 3.9% $CD20^- CD38^+ CD138^{++}$ 细胞。步骤 2: 在这个阶段

CD40L 及 CpG 可以阻止浆细胞进一步分化, 故首先去除 CD40L 及 CpG, 而 IL-2、IL-21 可促进浆母细胞分化和存活。如果在步骤 1 中用 CD40L 培养细胞, 第 7 天细胞形态无明显差异, 但在第 7 天抗 CD20、CD38、CD138 抗原标记细胞时发现 $CD20^+ CD38^-$ 细胞的百分比从 40.2% 降至 10.6% ($P = 0.0001, t = 0.19$), 此外还检测到 19.8% $CD20^- CD38^+ CD138^{++}$ 细胞。对比使用不同的细胞因子组合, 加用 IL-6 及 IFN- α 组在细胞形态及生长情况无明显差异, 得到 10.6% $CD20^+ CD38^-$ 细胞 ($P = 0.95, t = 0.74$), 57.9% $CD20^- CD38^{++}$ 细胞 ($P = 0.91, t = 0.76$), 19.8% $CD20^- CD138^{++}$ 细胞 ($P = 0.90, t = 0.41$), 差异无统计学意义, 且存活率均在 85.0% 以上。由于 3 d 后浆母细胞将快速死亡, 因此第 2 步骤培养不超过 3 d。步骤 3: 为了避免浆母细胞发生快速死亡, 先洗涤细胞, 并加入 IL-2、IL-6、IFN- α 、April 培养 3 d, 此阶段 60.0% 细胞将死亡。添加细胞生长因子并不能提高细胞存活率。IL-6、IFN- α 促进表达 CD138 的浆细胞生成, 而添加 IL-21 并不能提高浆细胞的生成和存活率 (21.0%), 换用 April 使细胞存活率达 39.0%, 存活的细胞主要由 69.5% $CD20^- CD38^{++}$ 组成, 其中 40.1% $CD20^- CD38^+ CD138^{++}$ 。见表 1, 图 1、2。

表 1 优化体外 B 细胞增殖分化为浆母细胞及浆细胞的步骤 ($n = 9$)

项目	B 细胞增殖分化 (步骤 1, 第 0 ~ 4 天)	浆母细胞分化 (步骤 2, 第 4 ~ 7 天)	浆细胞分化 (步骤 3, 第 7 ~ 10 天)
激活因子	CD40L + CpG	—	—
细胞因子	IL-2、IL-4	IL-2、IL-21	IL-2、IL-6、IFN- α 、April
细胞生存率 (%)	96.0	80.0	39.0
$CD20^+ CD38^-$ B 细胞 ($\bar{x} \pm s, \%$)	40.2 ± 10.1	10.6 ± 3.2	10.6 ± 3.2
$CD20^- CD38^{++}$ 浆母细胞 ($\bar{x} \pm s, \%$)	12.6 ± 15.9	57.9 ± 9.9	69.5 ± 5.8
$CD20^- CD38^+ CD138^{++}$ 浆细胞 ($\bar{x} \pm s, \%$)	3.9 ± 3.2	19.8 ± 9.7	40.1 ± 9.1

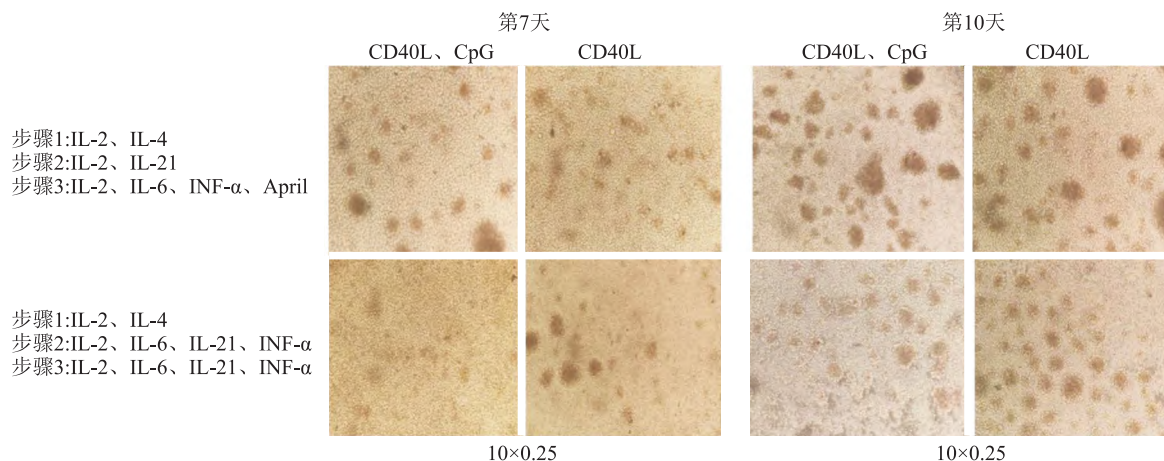


图 1 浆母细胞及浆细胞形态

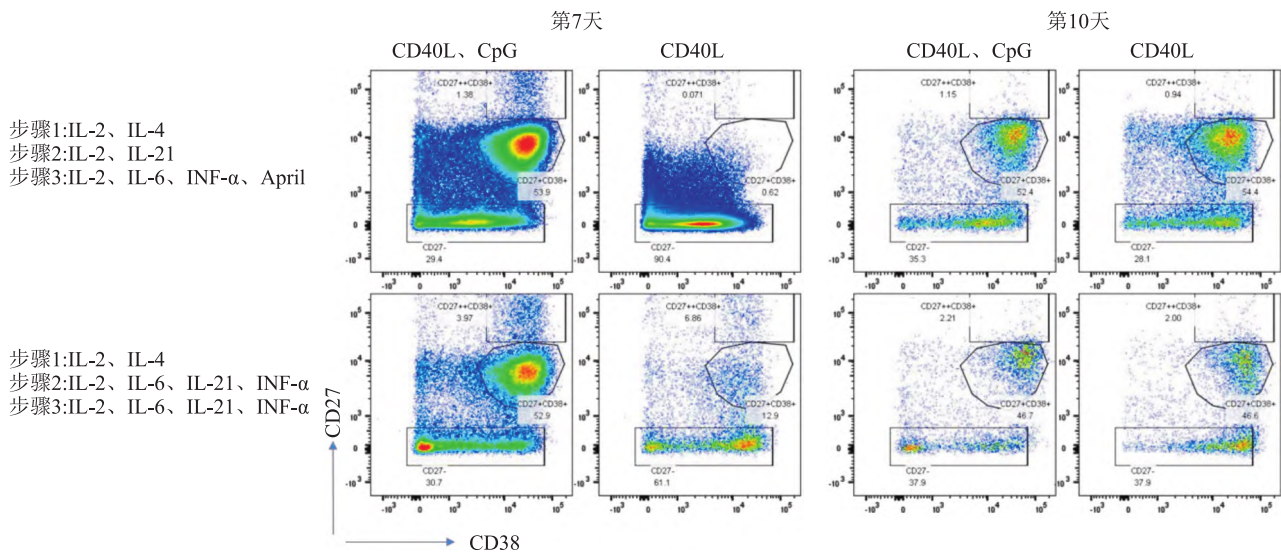


图2 B细胞体外诱导分化表面标记分子

3 讨论

B细胞在外周血、骨髓、次级淋巴组织中循环,接触抗原后增殖分化为浆母细胞,浆母细胞进一步分化为浆细胞,而浆细胞是体液免疫的终末效应物。如果没有合适的条件及环境,B细胞在体外存活时间非常短暂,极大限制对B细胞终端体外分化的轨迹研究^[4]。本课题组通过对B细胞激活信号和细胞因子组合的研究,在以往的实验基础上,用3个步骤建立从B细胞增殖分化成浆母细胞和浆细胞的体外模型。

B细胞向浆母细胞及浆细胞的增殖分化受到提供CD40L的滤泡辅助T细胞的帮助和细胞因子提供的信号整合调节,共刺激分子和细胞因子可以促进B细胞的存活、增殖以及分化。CD40L是辅助T细胞表面配体刺激幼稚B细胞以及记忆B细胞增殖,但不能诱导浆细胞分化^[5]。首先用表达CD40L的饲养细胞,该细胞支持人类骨髓干细胞的长期培养。CpG可以刺激非T细胞依赖性B细胞的增殖分化,并在后期提示诱导分泌IgM的增加。有研究^[6]显示,仅用CpG刺激外周血单个核细胞7d后,B细胞明显增殖并分化为浆母细胞和分泌的免疫球蛋白,CpG上调了编码BLIMP-1的PRDM1的表达,而BLIMP-1是浆细胞分化至关重要的转录因子。在步骤1中将实验分为2组,CD40L组及CD40L+CpG组,分别加入IL-2、IL-4,已经有研究^[7]提示,IL-2、IL-4可以通过ERK/ELK1信号通路的BACH2刺激活化的B细胞增殖。增殖4d后从

倒置显微镜上可以看到B细胞体积逐渐增大,大小均匀,由分散生长逐渐趋化成团状,两组细胞形态无明显差别,细胞存活率均>95.0%。

目前报道有各种方法激活信号和细胞因子组合,以获取最大数量的浆细胞^[8]。浆母细胞在外周血中如果没有受到趋化因子受体表达的影响被招募到黏膜或骨髓中,在外周血中存活时间非常短。正因为这些环境为浆母细胞提供生存的必要条件,使其进一步分化成为持久存活成熟的浆细胞。研究表明^[9]表达CD40L和CD4⁺T细胞为B系统提供强大的共刺激信号CD40L和B细胞表面表达的CD40结合可使幼稚B细胞以及记忆B细胞增殖,但不会诱导浆细胞分化,也有研究表明^[5,10]CpG在后期会抑制B细胞分化。在步骤2中,首先去除CD40L及CpG,并清洗细胞。自2000年以来,已经有较多T细胞对B细胞的帮助进行详尽的研究,并发现IL-21被认为是重要的细胞因子,人类B细胞向分泌抗体的浆细胞分化的重要因素。IL-21通过STAT1、STAT3、STAT5以及MAPK/ERK和PI3K/Akt途径,促进B细胞增殖、浆细胞分化以及大多数细胞分泌^[11]。第7天可以观察到CD40L组及CD40L+CpG组细胞形态大小基本相同,表面光滑,可见成簇细胞。在步骤2中加入不同细胞因子组合,已发表的文献提示^[10],IL-6、IFN-α可以促进浆细胞分化,本研究对比后发现在步骤2中加入IL-6、IFN-α对浆细胞的分化没有明显影响。在IL-21存在的情况下,CD40L诱导B细胞增殖,荧光显微镜下可见细胞团块形成,但它既不促进B细胞增殖,也不诱导

浆细胞形成人浆细胞及其前体在体液免疫反应中起着至关重要的作用。流式细胞仪分析可见 CD20⁻CD38⁺⁺CD138⁻浆母细胞阶段。

在步骤3中,CD40L组和CD40L+CpG组细胞形态基本相同,细胞存活率均>30%。有研究^[12]表明,表达CD40L和分泌IL-21的CD4⁺T细胞为B系统提供强大的共刺激信号CD40L和B细胞表面表达的CD40结合可使幼稚B细胞以及记忆B细胞增殖,但不会诱导浆细胞分化,Apri1是肿瘤坏死因子家族成员,作为增殖诱导配体,在浆细胞的分化及抗体类别转换的作用越来越受到重视^[13]。用Apri1培养3d,在建模第10天CD20⁻CD38⁺⁺CD138⁺⁺浆细胞表达增加。通过检测提示获得的浆细胞优先来源于记忆B细胞,并具有类似于人骨髓浆细胞的CD138⁺⁺表型通过模仿T细胞的辅助功能提供CD40L,树突细胞产生的细胞因子,来模仿B细胞增殖和分化过程。除了研究B细胞体外增殖分化外,该体外模型同样对进一步了解多发性骨髓瘤中浆细胞发育不良的分子学具有重要意义,而寻找多发性骨髓瘤骨髓环境是否可以在体外触发这些浆细胞存活^[14],也将带给研究人员新的思路。

参考文献

- [1] Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(6): 2208–19.
- [2] Stephenson S, Care M A, Fan I, et al. Growth factor-like gene regulation is separable from survival and maturation in antibody-secreting cells[J]. J Immunol, 2019, 202(4): 1287–300.
- [3] Cocco M, Stephenson S, Care M A, et al. In vitro generation of long-lived human plasma cells[J]. J Immunol, 2012, 189(12): 5773–85.
- [4] Haniuda K, Nojima T, Kitamura D. In vitro-induced germinal center B cell culture system[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1623(1): 125–33.
- [5] Marasco E, Farroni C, Cascioli S, et al. B-cell activation with CD40L or CpG measures the function of B-cell subsets and identifies specific defects in immunodeficient patients[J]. Eur J Immunol, 2017, 47(1): 131–43.
- [6] Ionescu L, Urschel S. Memory B cells and long-lived plasma cells[J]. Transplantation, 2019, 103(5): 890–8.
- [7] Lemke A, Kraft M, Roth K, et al. Long-lived plasma cells are generated in mucosal immune responses and contribute to the bone marrow plasma cell pool in mice[J]. Mucosal Immunol, 2016, 9(1): 83–97.
- [8] Schoenhals M, Jourdan M, Seckinger A, et al. Forced KLF4 expression increases the generation of mature plasma cells and uncovers a network linked with plasma cell stage[J]. Cell Cycle, 2016, 15(14): 1919–28.
- [9] Gardell J L, Parker D C. CD40L is transferred to antigen-presenting B cells during delivery of T-cell help[J]. Eur J Immunol, 2017, 47(1): 41–50.
- [10] Hipp N, Symington H, Pastoret C, et al. IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1443.
- [11] Arumugakani G, Stephenson S J, Newton D J, et al. Early emergence of CD19-negative human antibody-secreting cells at the plasmablast to plasma cell transition[J]. J Immunol, 2017, 198(12): 4618–28.
- [12] Mei H E, Wirries I, Frölich D, et al. A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow[J]. Blood, 2015, 125(11): 1739–48.
- [13] 江 丽, 黄李娜, 王盛付. MRL/lpr小鼠B淋巴细胞活化的免疫病理特征[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(4): 487–91.
- [14] Shah U A, Smith E L. Multiple myeloma, targeting B-cell maturation antigen with chimeric antigen receptor T-cells[J]. Cancer J, 2019, 25(3): 208–16.

An *in vitro* model of differentiation of B cells into plasmablasts and plasma cells

Liu Jing¹, Chen Huirong¹, Guo Jiaqi², Ma Jinhai¹

(¹Dept of Pediatrics, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004;

²Laboratory of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

Abstract Peripheral blood of healthy people was used to induce the proliferation and differentiation of B lymphocytes into plasmablasts and plasma cells in vitro. Cells characteristics were observed under microscope. Molecules expression level of B cells surface was analyzed under flow cytometry. Cell viability was observed by Trypan blue. The result showed CD40L signal stimulation, CpG immunoregulatory sequence combination and optimized cytokine combination could effectively promote the transformation of human B lymphocytes and the establishment of vitro model.

Key words B cells; plasmablasts; plasma cells; *in vitro*