

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01231

• 研究快报 •

脂多糖对 B 细胞的活化作用及机制的初步研究

钱莉^{1*}, 佟大可², 潘兴元¹, 田芳¹, 龚卫娟¹, 季明春¹

1. 扬州大学医学院病原生物学与免疫学教研室, 扬州 225001
2. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察 TLR4 配体脂多糖(LPS)对 B 细胞功能影响及相关的信号转导通路。**方法** 利用免疫磁珠法分选小鼠脾脏 CD19⁺ B 细胞, 体外用 LPS 刺激后, CBA(cytometric bead array)法检测 B 细胞分泌的 Ig (immunoglobulin)亚型; 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测 B 细胞表型; CBA 法检测培养上清中细胞因子 IL-6、IL-10、IL-12p70、TNF 浓度。利用 ERK、JNK、p38 MAPK 和 NF- κ B 信号转导抑制剂检测 B 细胞内细胞因子分泌的信号转导通路。**结果** LPS 可以诱导 B 细胞产生 IgG₁- κ 和 IgM- κ 抗体, 上调 B 细胞表面 CD40、CD80、CD86 和 MHC II 类分子的表达, 促进 IL-6、IL-10 和 TNF 的高分泌。JNK、p38 MAPK 和 NF- κ B 信号转导通路调控 B 细胞 IL-6、IL-10 和 TNF 的分泌。**结论** LPS 可以通过诱导抗体产生、上调共刺激分子表达和促进细胞因子分泌等多方面调节 B 细胞功能。

[关键词] 脂多糖类; B 淋巴细胞; 功能; 信号转导

[中图分类号] R 392.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1231-04

Lipopolysaccharide activates B cells and the underlying mechanisms

QIAN Li^{1*}, TONG Da-ke², PAN Xing-yuan¹, TIAN Fang¹, GONG Wei-juan¹, JI Ming-chun¹

1. Department of Etiology and Immunology, Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China
2. Department of Orthopedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of lipopolysaccharide (LPS) on B cell function and the related signal transduction pathways. **Methods** Freshly purified splenic B cells (CD19⁺ B) of mice were isolated by magnetic activated cell sorting. After stimulation with LPS, the culture supernatants were collected for immunoglobulin isotyping by cytometric bead array (CBA) technology. Flow cytometry was used to analyze costimulatory molecule expression and culture supernatants were also collected for measuring IL-6, IL-10, IL-12p70 and TNF by CBA technology. PD98059 (ERK inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor), SB203580 (p38 MAPK inhibitor) and PDTC (NF- κ B inhibitor) were used to study the signal pathways for the induced secretion of IL-6, IL-10 and TNF in B cells. **Results** LPS induced IgG₁- κ and IgM- κ production, up-regulated the expression of CD40, CD80, CD86 and MHC class II, and promoted IL-6, IL-10 and TNF secretion by B cells. Furthermore, JNK, p38 MAPK, and NF- κ B pathways regulated the secretion of IL-6, IL-10 and TNF in B cells. **Conclusion** LPS can regulate B cell function by inducing Ig production, cytokine secretion, and expression of costimulatory molecules.

[Key words] lipopolysaccharides; B-lymphocytes; function; signal transduction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11):1231-1234]

Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是一类极为重要的免疫识别受体, 可识别病原体及其产物所共有的某些高度保守的特定分子结构, 即病原相关分子模式(pathogen-associated molecule patterns, PAMP)如脂多糖(LPS), 通过 MyD88 依赖途径和非依赖途径激活下游 MAPK 和 NF- κ B 信号途径传递活化信号, 使固有免疫细胞, 如抗原提呈

细胞活化, 从而启动免疫应答^[1]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内功能最强的抗原提呈细胞, 以往的研究多集中在对 DC 的 TLR 信号研究方面。

B 细胞除了作为抗体产生细胞介导体液免疫之外, 也是体内重要的抗原提呈细胞。最近的研究表明, 与其他抗原提呈细胞一样, B 细胞也表达 TLR^[2]。但到目前为止, 对于 B 细胞接受 TLR 信

[收稿日期] 2011-03-17 **[接受日期]** 2011-08-21

[基金项目] 国家自然科学基金(81001308), 江苏省自然科学基金(BK2010315), Supported by National Natural Science Foundation of China (81001308) and Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2010315).

[作者简介] 钱莉, 博士, 讲师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0514-87978860, E-mail: liqianxh@163.com

号刺激后的功能变化,尤其是B细胞内TLR介导的信号转导途径还不是十分了解。本研究就TLR4配体LPS对小鼠脾脏CD19⁺B细胞功能的影响及其相关的信号转导通路进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 C57BL/6小鼠购自扬州大学实验动物中心;LPS购自Sigma公司;RPMI 1640培养液购自Gibco公司;抗小鼠CD19磁珠购自Miltenyi Biotec公司;FITC标记的CD19,PE标记的CD40、CD80、CD86、I-A^b购自Biolegend公司;小鼠IL-6、IL-10、IL-12p70和TNF CBA Flex Set和检测小鼠Ig亚型的CBA(cytometric bead array)试剂盒均购自BD公司。ERK抑制剂PD98059、JNK抑制剂SP600125、p38 MAPK抑制剂SB203580和NF-κB抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)均购自碧云天生物技术研究。

1.2 免疫磁珠法分选小鼠CD19⁺B细胞 无菌分离获取C57BL/6小鼠脾脏,用无菌针芯研磨脾脏,经400目钢网过滤并收集单细胞,Tris-NH₄Cl裂解红细胞,PBS洗涤2遍后加入抗小鼠CD19磁珠。在4℃下孵育15 min后用PBS洗1遍,经MACS分选柱收集CD19⁺细胞,置于含10% FCS的RPMI 1640培养液中。经流式细胞仪检测,磁珠分选的CD19⁺B细胞的纯度>95%。

1.3 LPS刺激B细胞 将纯化的B细胞用含10% FCS的RPMI 1640培养液重悬,按1×10⁶/ml的密度铺入96孔平底板中,每孔液体量为200 μl,加入LPS(200 ng/ml),同时设不加LPS的对照孔,置于37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养。24 h后收集培养上清,用CBA试剂盒检测细胞因子浓度。收集细胞用于B细胞功能检测。

1.4 CBA法检测B细胞分泌的Ig亚型 收集被LPS刺激5 d后的细胞培养上清,用CBA试剂盒检测上清中各种Ig亚型,实验按照试剂盒的说明书进行,最后用流式细胞仪检测并分析数据。

1.5 流式细胞仪检测B细胞表型 收集LPS刺激24 h后的B细胞,用预冷的PBS洗1遍后重悬于100 μl PBS中,加入大鼠血清消除非特异性结合,加入各种荧光素标记的流式抗体至终浓度1 μg/ml。所用抗体如下:FITC-CD19、PE-CD40、PE-CD80、PE-CD86、PE-I-A^b,于4℃中标记20 min,加入1 ml PBS洗2遍,重悬于200 μl PBS中,后上机检测并分析。

1.6 CBA法检测细胞因子 收集LPS刺激24 h后的细胞培养上清,用CBA法检测培养上清中

IL-6、IL-10、IL-12p70和TNF的含量。实验按照说明书的操作步骤进行。最后根据标准曲线确定所测细胞因子的浓度。

1.7 信号转导抑制剂对B细胞进行检测及处理 在处理细胞之前,先用信号转导抑制剂来检测细胞的活性及增殖情况。首先将新鲜纯化的B细胞按2×10⁵/孔铺至96孔平底板,200 μl/孔。分别加入10 μmol/L PD98059、50 μmol/L SP600125、20 μg/ml SB203580和100 μmol/L PDTC,同时设不加抑制剂的对照,24 h后收集细胞,用Annexin V-APC和7-AAD标记,检测Annexin V⁻7-AAD⁻的活细胞数。然后,再将羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester,CFSE)标记的B细胞(5 μmol/L CFSE,37℃标记10 min)按2×10⁵/孔铺至96孔平底板,加入上述浓度的抑制剂,同时设不加抑制剂的对照,24 h后收集细胞,检测CFSE的分裂情况。结果发现,应用这些抑制剂后,95%以上的B细胞仍然存活,并且这些抑制剂对B细胞的增殖无明显影响。因此,将新鲜纯化的B细胞按2×10⁵/孔铺至96孔平底板,200 μl/孔。分别加入上述浓度的抑制剂,同时设加DMSO对照组,处理细胞30 min,再用200 ng/ml LPS刺激24 h后收集培养上清,按1.6项下方法检测细胞因子浓度。

1.8 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验进行统计学分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 LPS对B细胞分泌抗体的影响 结果发现,LPS可以诱导B细胞分泌IgG_{1-κ}和IgM-κ类抗体(图1)。

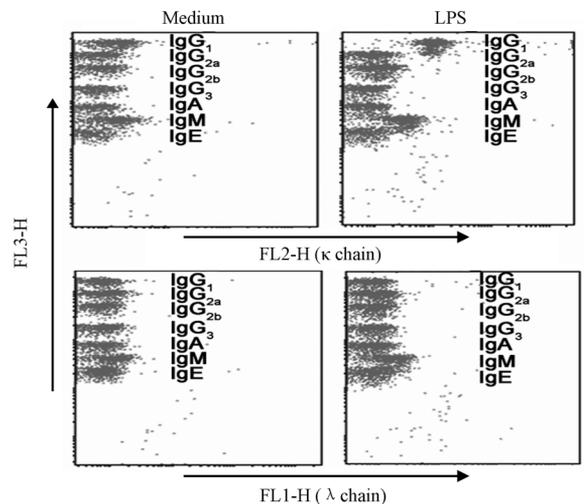


图1 LPS对B细胞分泌抗体的影响

Fig 1 Effect of LPS on antibody secretion in B cells

LPS: Lipopolysaccharide

2.2 LPS 对 B 细胞表型的影响 结果如图 2 所示, LPS 能够上调 B 细胞表面 CD40、CD80、CD86 和 I-A^b 的表达, 对于 CD86 的上调作用最为明显。

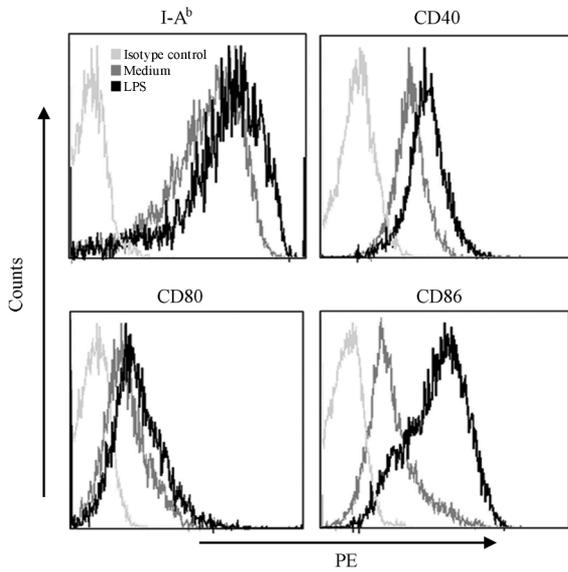


图 2 LPS 上调 B 细胞表面共刺激分子表达

Fig 2 LPS enhanced expression of costimulatory molecules on B cells

LPS: Lipopolysaccharide

2.3 LPS 对 B 细胞分泌细胞因子的影响 结果如图 3 所示, LPS 能够促进 B 细胞高分泌 IL-6、IL-10 和 TNF ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 对 IL-12p70 的分泌没有明显影响。

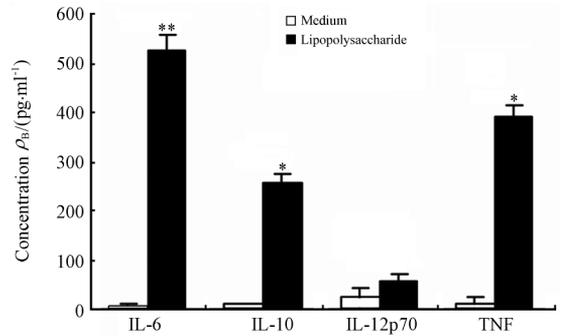


图 3 LPS 诱导 B 细胞分泌的影响

Fig 3 LPS promoted IL-6, IL-10, and TNF secretion in B cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs medium. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 JNK、p38 MAPK 和 NF- κ B 通路对 B 细胞内 LPS 所诱导的细胞因子分泌的影响 结果发现, SP600125、SB203580 和 PDTC 能够完全阻断 B 细胞内 LPS 所诱导的 IL-6、IL-10 和 TNF 的分泌(图 4)。

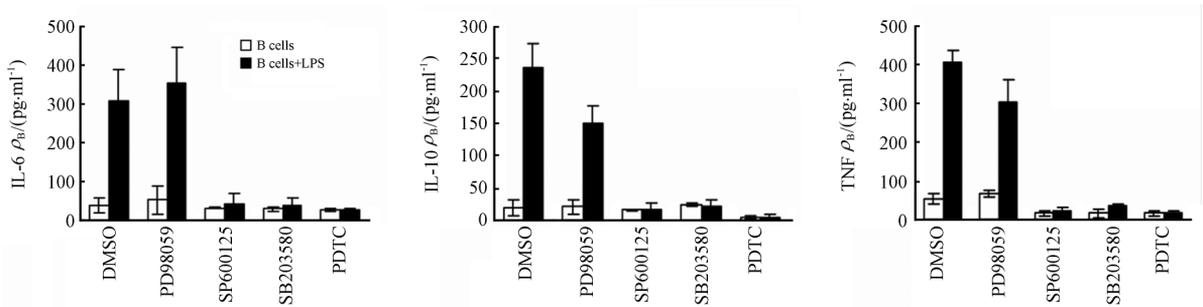


图 4 JNK、p38 MAPK 和 NF- κ B 通路对 B 细胞分泌细胞因子的影响

Fig 4 JNK, p38, and NF- κ B pathways were involved in IL-6, IL-10, and TNF production by B cells

LPS: Lipopolysaccharide. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

TLR4 可识别革兰阴性细菌表面的 LPS, 通过 MyD88 依赖途径和非依赖途径激活下游 MAPK 和 NF- κ B 信号途径传递活化信号, 使免疫细胞活化, 从而启动免疫应答^[3]。机体对 TLR 刺激剂的完全应答可有效清除病原体, 但对 TLR 刺激剂的过度应答会对机体造成损害, 导致慢性炎症和自身免疫病等。如给雌性 MRL/n、BXSB 或 NZW 小鼠反复注射低剂量 LPS 可加速狼疮的进展, 增加自身抗体的产生和加重小鼠肾功能的损害^[4]。因此, 调节

TLR 激发的炎症反应至适度水平, 既有利于机体清除病原体又不致引起组织损伤或自身免疫病的发生。

B 细胞在自身免疫病的发生机制中起着极其重要的作用。研究表明, B 细胞能够促进自身免疫病的发生, 不仅与其产生自身反应性抗体有关, 也与其作为抗原提呈细胞活化自身反应性 T 细胞和产生细胞因子有关^[5]。大多数正常人体内存在一定数量的自身反应性 B 细胞^[6], 提示一定有其他的事件打破了体内的 B 细胞耐受, 从而启动了自身免疫病的发生。而这一始动因素很可能就是 TLR 信号,

因为自身免疫病的发生或者恶化常与感染有关。如 TLR4 的转基因小鼠,在没有外源性刺激条件下,会产生与自发性狼疮类似的症状。虽然自身免疫病发生的精确机制我们还不是十分清楚,但推测可能与受 TLR 刺激后释放的促炎症因子有关,如 IL-6,其在狼疮的发生发展起着重要的作用^[7]。

最近的研究表明,B细胞与其他抗原提呈细胞一样,也表达 TLR4^[8],且 B 细胞受 TLR4 配体刺激后分泌哪些促炎症因子,现有的文献数量有限且结果并不一致,如 Xu 等^[9]用不同浓度的 LPS(从 100 pg/ml~10 μg/ml)刺激 B 细胞 24 h,均能诱导 B 细胞产生 IL-10,但不能诱导 IL-4、IL-6、IL-12 和 IFN-γ 的分泌。而 Barr 等^[2]却发现 1 μg/ml 的 LPS 刺激 B 细胞 5 d 可诱导 B 细胞高分分泌 IL-6 和 IL-10。因此,我们期望通过建立自己的实验体系,明确 LPS 作用于 B 细胞后究竟能否诱导 IL-6 的高分泌。最初我们考虑可能是由于 LPS 刺激时间过短(24 h),导致 Xu 等^[9]未能检测到 IL-6 的分泌。但我们发现,用 200 ng/ml 的 LPS 刺激 B 细胞 24 h,就能明确检测到 IL-6 的分泌。进一步的分析发现,Xu 等^[9]用 LPS 刺激的是 BALB/cArc 小鼠的 B 细胞,而我们和 Barr 等^[2]一样,刺激的是 C57BL/6 小鼠的 B 细胞。可能是由于小鼠背景品系的差异从而导致 IL-6 分泌的差异。因此,我们将在后续实验中利用不同剂量的 LPS 刺激 BALB/cArc 小鼠的 B 细胞进一步验证。

此外,我们还对 B 细胞接受 LPS 刺激后的表型特征和抗体分泌进行了检测,发现 B 细胞接受 LPS 刺激后共刺激分子表达上调,IL-10、IL-6 和 TNF 的分泌增加。我们知道,共刺激分子的上调可增强 B 细胞的抗原提呈能力,促进 T 细胞免疫应答,但是 IL-10 作为一种重要的免疫负向调节因子,可以有效的抑制 T 细胞介导的免疫应答。那么接受 TLR4 刺激后的 B 细胞对 T 细胞应答的影响究竟如何,是我们下一步研究所要明确的。

对 TLR4 活化后的信号转导途径,在巨噬细胞、DC 和培养的细胞系中研究得较为深入。对于 B 细胞内 TLR4 信号通路的研究主要集中在对 B 细胞增殖和存活的影响方面,如有文献报道,B 细胞内 TLR4 活化后可激活 NF-κB 通路,调节 B 细胞的分裂和存活^[10]。而对于 B 细胞内 TLR4 活化后细胞因子的分泌与信号通路的相关性了解不多。本研究中我们通过应用 ERK、JNK、p38 MAPK 和 NF-κB 特异性抑制剂,发现 B 细胞 TLR4 活化后 IL-6、IL-10 和 TNF 的分泌依赖于 JNK、p38 MAPK 和 NF-

κB 通路,并不依赖于 ERK 通路。这一结果与 DC 内 TLR4 活化后细胞因子的分泌依赖于 ERK 不同,我们推测这一差异可能与 DC 和 B 细胞内 TLR4 信号通路分子的表达并不完全相同有关,如 DC 受 LPS 刺激后会下调 Btk 表达,而 B 细胞会上调 Btk 表达^[2]。因此,虽然接受同样的 LPS 刺激后,不同的细胞会利用不同的接头蛋白,通过不同的胞内信号转导通路产生不同的效应。

总之,本研究显示 TLR4 活化可多方面调节 B 细胞的功能,尤其是明确了 B 细胞内 TLR4 活化后可诱导 IL-6、IL-10 和 TNF 的分泌,并且这些细胞因子的分泌依赖于 JNK、p38 MAPK 和 NF-κB 通路。这一结果为我们进一步研究负向调节 B 细胞内 TLR4 信号奠定了实验基础,也为自身免疫性疾病的发生机制研究及免疫治疗的应用提供了线索。

[参考文献]

- [1] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 373-384.
- [2] Barr T A, Brown S, Ryan G, Zhao J, Gray D. TLR-mediated stimulation of APC: distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37: 3040-3053.
- [3] Bekeredjian-Ding I, Jengo G. Toll-like receptors-sentries in the B-cell response[J]. *Immunology*, 2009, 128: 311-323.
- [4] Hang L, Slack J H, Amundson C, Izui S, Theofilopoulos A N, Dixon F J. Induction of murine autoimmune disease by chronic polyclonal B cell activation[J]. *J Exp Med*, 1983, 157: 874-883.
- [5] Meyer-Bahlburg A, Rawlings D J. B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity[J]. *Autoimmun Rev*, 2008, 7: 313-316.
- [6] Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young J W, Meffre E, Nussenzweig M C. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors[J]. *Science*, 2003, 301: 1374-1377.
- [7] Richez C, Blanco P, Rifkin I, Moreau J F, Schaeffer T. Role for toll-like receptors in autoimmune disease: the example of systemic lupus erythematosus[J]. *Joint Bone Spine*, 2011, 78: 124-130.
- [8] Gururajan M, Jacob J, Pulendran B. Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets[J]. *PLoS ONE*, 2007, 2: e863.
- [9] Xu H, Liew L N, Kuo I C, Huang C H, Goh D L, Chua K Y. The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization[J]. *Immunology*, 2008, 125: 218-228.
- [10] Gerondakis S, Grumont R J, Banerjee A. Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals[J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85: 471-475.