

rhsBLyS 活性检测方法的比较

王亚辉, 张双全, 刘晓宇

(南京师范大学生命科学学院, 210097, 江苏, 南京)

[摘要] 以 FluroBeads B 荧光磁珠法体外分离并培养人 B 淋巴细胞作为研究材料, 通过 MTT 法、 ^3H -TdR 掺入法测定重组人 B 淋巴细胞刺激因子(rhsBLyS)对人 B 淋巴细胞的促增殖活性并进行相应比较. 结果表明 rhsBLyS 非融合蛋白在引发剂 Anti-IgM 的协同作用下表现出显著刺激 B 淋巴细胞增殖的活性, 且两种方法所得结果一致, 充分验证了 rhsBLyS 样品的活性. MTT 法检测可替代放射性同位素法.

[关键词] B 淋巴细胞, rhsBLyS, MTT, ^3H -TdR 掺入法

[中图分类号] Q24, Q987.2, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)04-0080-05

0 引言

人 B 淋巴细胞刺激因子(human B lymphocyte stimulator, hBLyS)^[1], 又称 TALL-1^[2]、BAFF^[3]、THANK^[4]、 αTNF_4 , 主要由嗜中性粒细胞和巨噬细胞分泌, 活化后 T 细胞和树冠状细胞也有少量表达. 是 1999 年新发现的一种细胞因子, 属肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族, 作为一种 B 淋巴细胞的共刺激因子, hBLyS 在 Anti-IgM 或 IL-4 存在下能专一的刺激 B 细胞增殖和分化, 在体液免疫中有重要的作用; 而其在体内的过量表达又与自身免疫性疾病密切相关^[5]. 体外实验也表明, 正常 B 细胞在用 Anti-IgM 预活化后, hBLyS 能诱导其大量增殖并分泌各型免疫球蛋白, 而对静息 B 细胞效果不明显^[3]. 对于休眠 B 细胞, hBLyS 虽然不能独立激活使之进入细胞周期循环, 但通过上调细胞表面的抗凋亡蛋白 bcl-2、bcl-xl 的大量表达, 延长了休眠 B 细胞的寿命. 由于 hBLyS 在调控机体免疫应答过程中, 特别是对于 T1 期 B 细胞的正常发育、维持脾脏生发中心的形成和抗原特异性 IgM 的分泌至关重要^[6], 受到广泛关注.

目前从外周血中分离 B 淋巴细胞较为经典的方法包括贴壁培养去除单核和巨噬细胞, 绵羊血玫瑰花结法去除 T 细胞等, 但效果往往不很理想, B 细胞得率低、纯度差, 给活性测定带来诸多麻烦. 为了对本实验室自行研制的 rhsBLyS 非融合蛋白进行活性分析, 本文运用 Flurobeads B 荧光磁珠从健康人全血中分离得到 B 淋巴细胞, 进而通过 MTT 法和放射性同位素掺入法对样品活性进行了检测及比较. 本研究旨在建立一种简单、可靠、灵敏的 B 淋巴细胞分离及增殖活性测定方法.

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

rhsBLyS(由本实验室自行研制), RPMI 1640、FCS、青链霉素双抗(购自 Invitrogen 公司), MTT、Trypan-Blue、Anti-IgM(购自 Sigma-Aldrich 公司), rhsBLyS 标准品(购自英国 PeproTech EC 公司), ^3H -TdR(购自中科院上海原子核研究所), PPO、POPOP(购自 Merck 公司), Fluoro-Beads B、Magnetic Separator(购自美国 OneL-ambda 公司), 0.22 μm 无菌滤器(购自 Millipore 公司), 淋巴细胞分离液(购自上海求精生物工程公司), 正常人外周血(购自江苏省血液中心), 各类细胞培养板(购自 Costor 公司), 细胞计数板(上海求精), 载/盖玻片, 其它试剂均为国产分析纯.

1.2 实验仪器

液体闪烁仪(Tri-Carb, 美国 PACKARD 公司), 酶标仪(美国 MJ 公司), Allegra 21R 台式高速冷冻离心机

收稿日期: 2004-06-09.

基金项目: 南京师范大学科技创新基金资助项目(184070H80901).

作者简介: 王亚辉, 女, 1979 - , 南京师范大学生命科学学院硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学学习与研究.

E-mail: awayyh@sina.com

通讯联系人: 张双全, 1952 - , 南京师范大学生命科学学院教授, 博士生导师, 主要从事生物化学的教学与研究.

E-mail: zhangshuangquan@263.net

(美国 BECKMAN 公司),台式高速离心机(德国 SORVAL 公司), 320-S pH 计(美国 Mettler Toledo 公司), AR5120 电子天平(美国 AHOUS 公司), Multi Temp III 恒温水浴锅(美国 Pharmacia 公司), CO₂ 培养箱(日本 NAPCO 公司),倒置显微镜(美国 COIC 公司),雪花状制冰机(日本 SANYO 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 正常人外周血 B 淋巴细胞的分离(荧光磁珠分离法)

按照 One Lambda 公司操作手册进行。

1.3.2 rBsBLyS 刺激 B 淋巴细胞增殖达到稳态

(1) 24 孔培养板中每孔加入密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的 B 淋巴细胞 1 mL, 37℃、5% CO₂ 条件下培养 12 h;

(2) 分组依次加入 Anti-IgM 和/或 rBsBLyS 具体情况为:

A 组: 1~3 孔, 阴性对照;

B 组: 4~6 孔, 加入 Anti-IgM 至终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

C 组: 7~9 孔, 加入 rBsBLyS 至终浓度为 500 ng/mL;

D 组: 10~12 孔, rBsBLyS 至终浓度为 100 ng/mL, 并加入 Anti-IgM 至终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

E 组: 13~15 孔, rBsBLyS 至终浓度为 500 ng/mL, 并加入 Anti-IgM 至终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

F 组: 16~18 孔, rBsBLyS 至终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并加入 Anti-IgM 至终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

G 组: 19~21 孔, rBsBLyS 至终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并加入 Anti-IgM 至终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

H 组: 22~24 孔, rBsBLyS 蛋白标准品至终浓度为 100 ng/mL, 并加入 Anti-IgM 至终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(3) 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养, 每日将培养板在微量震荡器上轻轻震荡 1 min, 按组别每孔各取 10 μL 培养液, 混匀后每组取 10 μL , 加入等量的 2% Trypan Blue 染液, 倒置显微镜下血球计数板计数, 共计 7 d。

1.3.3 MTT 法检测 rBsBLyS 刺激 B 淋巴细胞增殖作用

(1) 和(2)同 1.3.2;

(3) 37℃、5% CO₂ 条件下培养 4 d 后, 每孔加入 100 μL MTT(5 mg/mL)继续培养 4 h, 然后每孔加 1 mL 10% SDS-0.01 mol/L HCl 混匀, 放入 CO₂ 培养箱过夜, 微量振荡器上摇匀, MJ 公司酶标仪按照参比波长 630 nm, 测试波长 490 nm 测定各孔 OD 吸收值, 求平均值, 计算刺激指数: $SI = \text{实验组 A (均值)} / \text{对照组 A (均值)}$ 。

(4) 统计学处理: 将各实验组所得数据均以平均值标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 t 检验法判断数值间差别的显著性。

(5) B 淋巴细胞数与光吸收度的关系检测: 将分离得到的细胞悬液从 $1 \times 10^5/100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 开始在 96 孔板中倍比稀释至 $1 \times 10^2/100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 每个稀释度三孔细胞, 培养板置 37℃、5% CO₂ 条件下培养 12h 后, 每孔加 10 μL MTT(5 mg/mL)继续培养 4 h, 然后每孔加 100 μL 10% SDS-0.01 mol/L HCl 混匀, 放入 CO₂ 培养箱过夜, MJ 公司酶标仪按照参比波长 630 nm, 测试波长 490 nm 测定各孔 OD 吸收值, 了解光吸收度与细胞数量之间的关系。

1.3.4 放射性同位素掺入法检测 rBsBLyS 刺激 B 淋巴细胞增殖作用

(1) 和(2)同 1.3.2;

(3) 37℃、5% CO₂ 条件下培养 4 d 后, 每孔加入 1 μL ³H-TdR, 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置 4 h;

(4) 将各孔中样品吸入 1.5 mL 离心管, 800 r/min 离心 5 min, 吸弃上清, 每管用 40 μL PBS 重悬后吸至滤纸片上, 干燥, 3% 醋酸洗涤、干燥 3 次, 放入闪烁瓶中, 每瓶加 5 mL PPO/POPOP/二甲苯闪烁液, 静置过夜后液体闪烁计数仪上进行放射性强度测定, 确定 CPM 值。

(5) 统计学处理: 将各实验组的 ³H-TdR 掺入率 CPM 值换算为相应对照组 CPM 值均数的百分比, 实验所得数据均以平均值标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 t 检验法判断数值间差别的显著性。

2 结果与分析

2.1 B 淋巴细胞分离及培养

2.1.1 正常人外周血 B 淋巴细胞的分离(荧光磁珠分离法)

通过这种目前最新的荧光磁珠细胞分选方法, 我们将分离得到的 B 淋巴细胞经 2% Trypan Blue 染色, 万方数据

倒置显微镜下血球计数板计数,发现 10 mL 全血中可分离得到约 10^9 、纯度达 95% 的 B 淋巴细胞。

2.1.2 rhsBLyS 刺激 B 淋巴细胞增殖达到稳态

每日对各孔细胞进行 2% Trypan Blue 染色后倒置显微镜下血球计数板计数,共计 7 d.在加样 4 d 后增殖达到峰值,其后细胞数逐渐减少。

2.2 rhsBLyS 表达产物的活性测定

2.2.1 MTT 法检测 hsBLyS 刺激 B 淋巴细胞增殖作用

(1) B 淋巴细胞数与光吸收度的关系 :B 淋巴细胞数量与 OD 值在一定范围内几乎成正比的线性相关关系($\gamma = 0.994, P < 0.01$),如图 1 示。

(2) rhsBLyS 刺激 B 淋巴细胞增殖的作用 :采用 MTT 比色法,检测各组刺激方法对培养的细胞增殖的影响。人 B 淋巴细胞经不同浓度的 rhsBLyS 及/或 Anti-IgM 处理后,测得的各组 A 值各不相同,经 t 检验(Origin6.1 分析),同阴性对照组相比差异显著($P < 0.05$),表明表达的重组蛋白对正常人 B 淋巴细胞具有明显的促增殖作用(表 1),且在相同浓度下与标准品活性接近。

我们发现在引发剂 Anti-IgM $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ (图 2)协同作用下, rhsBLyS 蛋白样品(500 ng/ml)对 B 淋巴细胞有较强的促增殖作用。

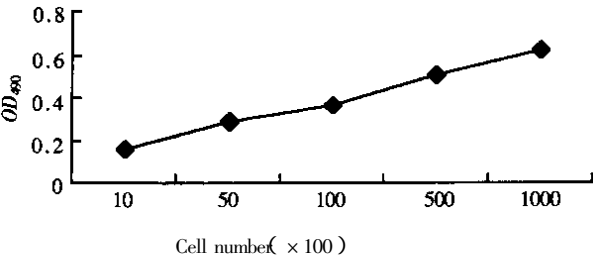


图 1 B 细胞数与光吸收度之间的关系

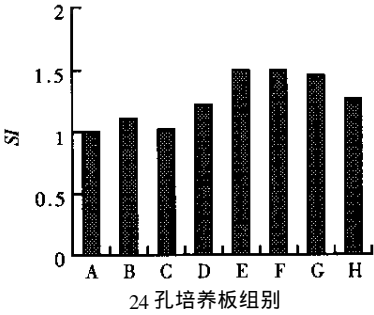


图 2 rhsBLyS 对 B 细胞的增殖作用

2.2.2 放射性同位素掺入法检测 rhsBLyS 刺激 B 淋巴细胞增殖作用

rhsBLyS 刺激 B 淋巴细胞增殖的作用放射性同位素法的检测结果表明,经 t 检验(Origin6.1 分析),在 $\alpha = 0.05$ 水平,表达的重组蛋白对正常人 B 淋巴细胞具有明显的促增殖作用(表 2),且在相同浓度下与标准品活性接近。

表 1 rhsBLyS 对 B 细胞的增殖作用

Group	A490($\bar{x} \pm s, n = 3$)
阴性对照	0.622 \pm 0.001
Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	0.692 \pm 0.002
rhsBLyS 500 ng/ml	0.637 \pm 0.001
rhsBLyS 100 ng/ml + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	0.756 \pm 0.002
rhsBLyS 500 ng/ml + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	0.931 \pm 0.002
rhsBLyS 1 $\mu\text{g/ml}$ + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	0.924 \pm 0.002
rhsBLyS 10 $\mu\text{g/ml}$ + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	0.904 \pm 0.002
rhsBLyS 标准品 100 ng/ml + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	0.782 \pm 0.001

表 2 rhsBLyS 对 B 细胞的增殖作用

Group	cpn($\bar{x} \pm s, n = 3$)
阴性对照	11 593.67 \pm 347.96
Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	18 724.33 \pm 215.50
rhsBLyS 500 ng/ml	13290.16 \pm 233.86
rhsBLyS 100 ng/ml + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	21 559.35 \pm 390.20
rhsBLyS 500 ng/ml + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	28 955.33 \pm 160.94
rhsBLyS 1 $\mu\text{g/ml}$ + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	26 911.33 \pm 261.12
rhsBLyS 10 $\mu\text{g/ml}$ + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	25 080.26 \pm 259.02
rhsBLyS 标准品 100 ng/ml + Anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$	22 910.33 \pm 193.71

我们发现同 MTT 法检测一样,在 Anti-IgM $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ (图 3)协同作用下, rhsBLyS 蛋白样品(500 ng/ml)对 B 淋巴细胞有较强的促增殖作用。

2.3 两种实验方法的比较

将引发剂 Anti-IgM 浓度一定的条件下($10\text{ }\mu\text{g/ml}$),MTT 法及放射性同位素掺入法对 rhsBLyS 在不同浓度下对 B 淋巴细胞增殖的影响如图 4 表示(纵坐标中对应 SI 换算为百分数),两种方法表现出高度一致性,充分验证了样品活性。

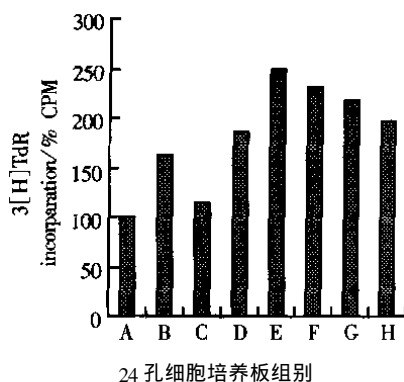


图3 rhBLyS 对 B 细胞的增殖作用

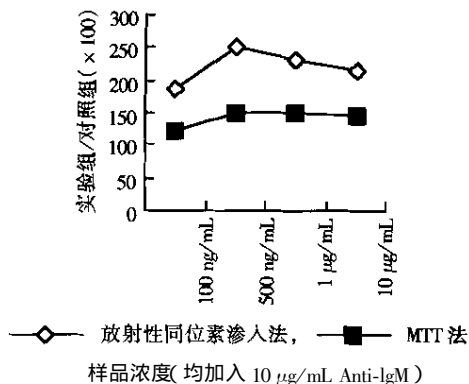


图4 两种方法检测不同浓度 rhBLyS 对 B 细胞增殖作用的比较

3 讨论

人体免疫是当今生命科学研究的热点领域之一,而有关细胞因子的研究又是免疫学领域的研究前沿。hBLyS 是此领域中一种较新发现的细胞因子,属 II 型三节式跨膜蛋白,具有 B 细胞趋性。作为一种 B 淋巴细胞的共刺激因子,它在 Anti-IgM 或 IL-4 存在下能专一的刺激 B 细胞增殖、分化和分泌抗体,在体液免疫中有重要的作用。接受 BLyS 注射的小鼠血液中 IgM 和 IgA 增加了 2~5 倍,BLyS 转基因小鼠能显著增加成熟 B 淋巴细胞的数量,诱导 B 淋巴细胞增殖并分泌免疫球蛋白,而其在体内的过量表达又与自身免疫性疾病密切相关。BLyS 对于机体免疫应答,特别是体液免疫起着重要的平衡作用,其缺陷或过量表达均能引起机体的免疫失衡,从而诱发多种疾病。鉴于其重要作用,美国 FDA 已先后批准了三项与其有关的产品针对四类疾病进入人体 I 期临床试验。

本实验室先前已克隆表达了 rhBLyS 非融合蛋白,并已利用其进行了一些基础理论研究[7-10];为了进一步研究 hBLyS 在人类免疫系统疾病中的作用,我们将分离纯化后的非融合蛋白进行活性检测。rhBLyS 表达产物的生物学活性检测一般是通过在体外与引发剂 Anti-IgM 协同刺激 B 淋巴细胞增殖来进行的。在本实验中,我们通过目前最新的荧光磁珠细胞分选方法,快速简便。其原理为:人外周血 B 淋巴细胞表面均有白细胞分化抗原 CD19 分子的表达,而荧光磁珠上带有 Anti-CD19 单抗,能特异性的结合在 B 细胞表面,通过磁场作用将磁珠沉淀下来,10 mL 全血中可分离得到约 1×10^9 、纯度达 95% 的 B 淋巴细胞。荧光磁珠的体积非常小,约为 B 细胞的 1%,因而并不会影响分离的 B 淋巴细胞的生物学功能。

我们将分离好的 B 淋巴细胞用适宜浓度 Anti-IgM 活化,并添加不同浓度的样品进行刺激,共培养 7 d。每日 Trypan Blue 染色后倒置显微镜下血球计数板计数,发现在第 4 d 细胞增殖达到峰值。

测定淋巴细胞增殖反应,常规方法为形态学检测、 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法、MTT 法等。前者受主观因素影响,误差较大,于是我们在此时分别使用 MTT 法和 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法,实验结果表现出高度的一致性,重复性好。用 rhBLyS 与 Anti-IgM 协同刺激分离得到的 B 淋巴细胞,能显著的促进培养的 B 细胞增殖,而 rhBLyS 单独作用则几乎没有影响,作为引发剂,Anti-IgM 刺激所有静息 B 淋巴细胞从 G_0 期进入 G_1 期并可诱导其表达功能上活跃的各种细胞因子受体,如 IL-4、IL-5、hBLyS 受体等,因而 Anti-IgM 单独作用也能使 B 细胞增殖,但效果明显不如两者的协同作用。这与国外研究小组报道的实验结果一致。

MTT 法基本原理是活细胞的琥珀酸脱氢酶能还原 MTT,形成不溶于水的蓝紫色结晶(Formazan),由于结晶物形成量与细胞数量及代谢活性成比例,而死细胞不能转化 MTT,该结晶加入有机溶剂溶解后呈蓝紫色,用酶标仪可测定其吸光度值,其大小可反应细胞的数量及活性。实验中使用酸化 10% SDS,克服了酸化异丙醇会引发血清蛋白沉淀及培养液中酚红因 pH 值变化而干扰结果的影响,使用状况良好。由于其简便、快速、安全,且结果与 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法相比平行性好,完全可替代同位素。

[参考文献]

- [1] Moore P A , Belvedere O , Orr A , *et al.* BLyS : Member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator[J]. Science ,1999 ,285(5425) :260—263 .
- [2] Shu H B , Hu W , Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens[J]. Leukoc Biol , 1999 ,65(5) :680—683 .
- [3] Schneider P , Mackay F , Steiner V , *et al.* BAFF , a novel ligand of the tumor necrosis factor family , stimulates B cell growth[J]. Exp Med ,1999 ,189(11) :1747—1756 .
- [4] Mukhopadhyay A , Ni J , Zhai Y , *et al.* Identification and characterization of a novel cytokine , THANK , a TNF homologue that activates apoptosis , nuclear factor- κ B , and c-Jun NH₂-terminal kinase[J]. Biol Chem ,1999 ,274(23) :15978—15981 .
- [5] Labbi Y , Strasser A. Lymphocyte survival-Ignorance is BLyS[J]. Science 2000 ,289(5481) :883—884 .
- [6] Bernardetta N , Ornella B , Viktor R , *et al.* Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells[J]. Blood ,2001 ,97(1) :198—204 .
- [7] 刘平 张双全 闫晓梅 ,等 . 重组人可溶性 B 淋巴细胞刺激因子细菌表达、纯化及其对 B 淋巴细胞的增殖作用[J]. 生物化学与生物物理学报 ,2001 ,33(2) :210—214 .
- [8] 刘平 张双全 李东霞 ,等 . 一种新细胞因子基因真核表达载体的构建和鉴定[J]. 南京师大学报(自然科学版) ,2001 ,24(1) :67—70 .
- [9] 吴一凡 张双全 高秀玉 ,等 . 乳糖诱导 pET 载体表达重组蛋白的研究[J]. 南京师大学报(自然科学版) ,2002 ,25(2) :89—93 .
- [10] 杜秋丽 张双全 刘晓宇 . 重组人 B 淋巴细胞刺激因子原核表达条件的优化[J]. 南京师大学报(自然科学版) ,2003 ,26(2) :69—73 .

Comparative Studies Between the MTT and ³H-TdR Incorporation Methods for the Biological Activity of rhsBLyS

Wang Yahui , Zhang Shuangquan , Liu Xiaoyu

(School of Life Science , Nanjing Normal University , 210097 , Nanjing , China)

Abstract :The B lymphocyte stimulator(BLyS) , is the most recent addition to the tumor necrosis factor family(TNF) ligands and costimulates B lymphocyte proliferation and differentiation. It has a unique role in B cell immunity. To investigate the biological activity of the recombinant hBLyS , we separate B lymphocyte from whole blood of healthy people by FluroBeads-B , culture them with rhsBLyS and compare the results of MTT , ³H-TdR incorporation methods. Both of the methods show that our protein have good effect on B cells proliferation when cooperated with Anti-IgM , the numbers of B cells treated by the samples was obviously increased in compared with that of normal control group. So MTT can replace the ³H-TdR incorporation.

The elucidation of the mechanism of BLyS has proven to be challenging and the unique role of hsrBLyS in B cell development and differentiation and the pathogenesis of autoimmune diseases makes the study of BLyS and its downstream targets attractive in the development of novel therapies.

Key words :B lymphocyte , rhsBLyS , MTT , ³H-TdR incorporation

[责任编辑 孙德泉]