

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0198-05

分泌独特型免疫球蛋白 BALB/c 小鼠 B 细胞淋巴瘤模型的建立

古 涛, 席 泓, 庄羽美, 朱一蓓, 邱玉华, 戚春建, 于葛华, 李 敏, 马泓冰, 张学光 (苏州大学医学生物技术研究所免疫学教研室, 苏州 215007)

[摘 要] 目的: 构建分泌独特型免疫球蛋白(idiotype, Id)的 BALB/c 小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞株, 建立动物模型, 为进一步开展 Id-树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗的免疫治疗提供物质基础。方法: 采用降植烷和不完全弗氏佐剂间隔致敏 6 ~ 8 周龄 BALB/c 小鼠, 继而采用细胞融合技术、ELISA 法、免疫荧光标记和流式细胞术(flow cytometry, FCM) 筛选获得分泌 Id 的阳性克隆; 体内诱生腹水和体外无血清培养法制备 Id, 优球蛋白沉淀法结合凝胶 Suphcray-200 过滤纯化 Id; 建立荷瘤模型, 从荷瘤小鼠骨髓前体细胞诱导 DC。结果: 获得 2 株稳定分泌 Id 的 BALB/c 小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 SB4 和 SB5, Id 均为 IgM/κ; 成瘤率均为 100%, 荷瘤小鼠平均生存期为 (30 ± 4) d。结论: SB4 和 SB5 能持续稳定分泌非自身反应性 Id, 具有良好的成瘤性和高转移率。

[关键词] B 细胞淋巴瘤; 独特型免疫球蛋白; BALB/c 小鼠肿瘤模型; 树突状细胞

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

Establishment of Secreting Idiotype Immunoglobulin BALB/c mouse B Cell Lymphoma Model

GU Tao, XI Hong, ZHUANG Yu-mei, ZHU Yi-bei, QIU Yu-hua, QI Chun-jian, YU Ge-hua, LI Min, MA Hong-bing, ZHANG Xue-guang (Immunology Department of Medical Biotechnology Institute, Soochow University, Suzhou 215007)

[Abstract] Objective: To establish the secreting idiotype immunoglobulin (Id) BALB/c mouse B cell lymphoma animal model for further study of Id-dendritic cells (DC) vaccines. Methods: BALB/c mouse B cell lymphoma cell lines were obtained by fusing SP2/0 cells with BALB/c mouse spleen cells after immunization with pristane and incomplete Freund s adjuvant (IFA) respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry (FCM) were used to screen the secreting Id clones and analysis the phenotypes. Both mice ascites induction and serum-free culture medium X-VIVO 20 were used to produce the Id of SB4 and SB5. By using euglobulin precipitation and gel filtration on Suphcray-200 to purify the Id. To assess the ability of tumorigenicity, (4 ~ 5) × 10⁵ SB4/5 cells were injected subcutaneously in the right axillary or into abdominal cavity of 6 ~ 8 week BALB/c mice. DC were induced from bone marrow progenitor cells of B cell lymphoma bearing mice with recombinant murine GM-CSF and IL-4. Results: Two secreting none auto-reactive Id malignant B cell lymphoma cell lines, named as SB4 and SB5, were screened. Chromosomes study, DNA index, cell cycle proliferative indexes, cell generation time and mitotic index analyses all demonstrated SB4 and SB5 possessing the characteristics of malignant tumor cell lines. Both Id proteins belonged to IgM/κ. SB4 and SB5 cells grew progressively in syngeneic mice. Tumors could be touched in all mice and the average life-span was 30 ± 4 days and typical DC could be induced. Conclusion: BALB/c mouse B cell lymphoma SB4 and SB5 cell lines created by cell fusion techniques could secrete non-auto-reactive Id and had the characteristics of B cell lymphoma cells.

[Key words] B cell lymphoma; idiotype immunoglobulin; BALB/c mouse tumor model; dendritic cells

* 我国 B 细胞淋巴瘤发病率约占非霍奇金淋巴瘤的 67%, 是一种起源于淋巴造血组织的实体瘤, 近年来新发病例逐年上升, 对人类健康的危害日益严重, 既有淋巴结内又有淋巴结外器官的受侵, 播散方式除沿邻近淋巴引流, 还有“跳跃式”转移, 常规手术联合放化疗

* [基金项目] 国家杰出青年基金项目(39625024)、国家自然科学基金项目(39870825)、江苏省科委自然科学基金项目 (BI98100)资助

[作者简介] 古涛(1974-), 男, 山东省日照人, 博士生, 主要从事免疫学研究。

[通讯作者] 张学光, E-mail: smbxaez@public1.sz.js.cn

疗效不佳,并且放化疗常常抑制了患者的免疫系统,加速了肿瘤发展的进程^[1]。鉴于B细胞淋巴瘤的发生发展与机体抗肿瘤免疫力密切相关,激发机体对B细胞淋巴瘤的特异性免疫应答可能是治疗并控制其复发转移的有效手段。B细胞淋巴瘤为B细胞单克隆起源,具有独特型免疫球蛋白(idiotype immunoglobulin, Id),Id具有个体特异性,抗原决定簇位于V区,涉及识别和结合抗原的氨基酸序列在正常细胞中不存在,在恶性病变时可视为肿瘤相关抗原。树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内已知功能最强的专职性抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC),能摄取、加工及递呈抗原,并能刺激未致敏T细胞的增殖和活化,从而启动机体的特异性免疫应答,是启动、调控、维持免疫应答的中心环节^[2-3]。Id-DC肿瘤疫苗的研究已成为B细胞淋巴瘤免疫生物治疗的一个热点^[4-5]。本研究旨在建立分泌Id的BALB/c小鼠B细胞淋巴瘤动物模型,并从荷瘤小鼠中诱导出成熟DC,为进一步开展B细胞淋巴瘤免疫生物治疗研究提供一个良好的动物模型。

1 材料与方法

1.1 主要材料

RPMI-1640或DMEM基础培养基(Gibco美国),胎牛血清myclone(Sigma美国),小牛血清(杭州四季青公司)。HAT/HT(Sigma美国),降植烷(Pristane)和不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)(Sigma美国)。45%聚乙二醇(polyethylene glycerol, PEG)溶液(Boehringer德国)。Ig亚类快速定性试纸条(Argen法国)。FITC-dextran(4 kD, Sigma美国)。大鼠抗小鼠CD3, CD4, CD8, CD19, B200/CD45R, Ia和FcR单克隆抗体(Immunotech法国)。PE标记的大鼠抗小鼠CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, CD40, CD80, CD86, MHC-II分子以及羊抗小鼠IgM(Immunotech法国)。小鼠重组GM-CSF和IL-4(Immugenex美国)。6~8周龄雌性BALB/c小鼠(H-2^d)(中国科学院上海实验动物中心)。SP2/0为BALB/c小鼠来源的骨髓瘤细胞株,购自美国ATCC,本室常规传代。

1.2 分泌Id的小鼠B细胞淋巴瘤细胞株的建立

采用Pristane和福氏不全佐剂(IFA),各0.5 ml/只,诱导6~8周龄BALB/c小鼠,每间隔14 d致敏1次,共4次;待小鼠腹水出现,按常规方法^[6]取该小鼠脾脏细胞与SP2/0细胞融合,用含1% HAT, 20% FCS的DMEM进行选择培养,10 d后改用HT培养基,2周后转用含20% FCS的DMEM培养基。采用夹心ELISA法对融合细胞的培养上清进行筛选,阳性克隆细胞以

有限稀释法进行克隆化培养,直至抗体分泌阳性率为100%,获得2株稳定分泌Id的BALB/c小鼠B细胞淋巴瘤细胞,分别命名为SB4和SB5。

1.3 SB4和SB5细胞株特性的鉴定

1.3.1 采用常规方法绘制SB4和SB5细胞生长曲线和细胞分裂指数曲线,冻存复苏前后共3次检测其细胞染色体的数量。

1.3.2 胞浆免疫球蛋白分子的表达

3%多聚甲醛固定,0.2% Tween 20处理后,调整细胞浓度至 $(4 \sim 5) \times 10^6/\text{ml}$,10%牛羊混合血清封闭,采用免疫荧光标记和FCM分析。

1.3.3 DNA倍体及细胞周期指数

碘化丙啶(Propidium iodide, PI)(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙啶,0.1% TritonX-100,0.2 mg/ml RNA酶A)染色,FCM分析。

1.3.4 采用常规免疫荧光标记和FCM进行表型分析。

1.3.5 快速定性试纸法测定SB4和SB5分泌Id的Ig类型。

1.3.6 取雌性BALB/c小鼠骨髓、脾脏、胸腺细胞和腹腔细胞,用10%牛羊混合血清封闭,取封闭的混合淋巴细胞,加入生长状态良好的SB4和SB5分泌上清,同型无关IgG和IgM作为阴性对照,同时设置空白对照,经FCM分析以去除分泌对自身组织细胞反应的Ig克隆。

1.4 SB4和SB5分泌的Id的制备及纯化

1.4.1 腹水型Id的制备

按本室建立的常规方法进行^[6]。收集的腹水经离心去除凝块,上清加入CaCl₂(终浓度25 mmol/L),室温静置30 min,离心除去纤维蛋白,-80℃冻存。

1.4.2 体外法制备

采用无血清培养基X-VIVO 20扩增SB4和SB5,经96孔培养板、24孔板及50 ml培养瓶的过渡培养后,将细胞浓度调整为 $3 \times 10^5/\text{ml}$,接种于500 ml的塑料培养瓶中。视生长情况,4~6 d后,待70% SB4或SB5细胞死亡,收获培养上清,3 000 r/min离心8 min,弃沉淀,0.3~0.4 μm 的微孔滤膜过滤。

1.4.3 腹水型和无血清培养的Id纯化

均采用优球蛋白沉淀法,按Garcia-Gonzalez等所述^[7],略作改动:将腹水在4℃蒸馏水中透析18~20 h,12 000 r/min 15 min,收集沉淀蛋白,重新溶解于生理盐水中;0.2 μm 的微孔滤膜过滤,立即进行凝胶过滤或-80℃冻存。凝胶过滤:先用生理盐水平衡Suphcray-200预装柱,收集优球蛋白沉淀复溶的1 ml样品上样,用生理盐水进行洗脱,流速控制在0.5 ml/

min,收集的洗脱峰除菌过滤后分装冻至-80℃保存。

1.5 纯化的SB4和SB5 Id的鉴定和定量

采用夹心ELISA法测定纯化的SB4和SB5 Id的效价,蛋白浓度测定按文献[8]方法;12%还原性SDS-PAGE检测纯化的SB4和SB5 Id纯度^[9]。

1.6 SB4和SB5荷瘤小鼠模型的建立

选择6~8周龄雌性BALB/c小鼠右腋皮下或腹腔分别接种(4~5)×10⁵细胞,每2天观察并测定肿瘤最大直径,记录小鼠生存期。解剖存活3周以上的小鼠,观察腹腔、骨髓和肝脾的转移情况,细胞组织病理鉴定。

1.7 SB4和SB5荷瘤小鼠DC的诱导

无菌取SB4和SB5荷瘤小鼠骨髓前体细胞,经Tris-NH₄Cl低渗溶解红细胞,使用大鼠抗小鼠CD4,CD8,B200/CD45R,Ia和FcR单抗,加补体(来自乳兔血清)孵育;去除T,B,Ia⁺及前体细胞;阴性选择所得的骨髓细胞(1×10⁶/ml)用含rmGM-CSF(20 ng/ml)和rmIL-4(10 ng/ml)的RPMI-1640完全培养基在24孔板培养,2~3 d后,轻轻振荡培养板,吸弃培养液(去除粒细胞),补充新鲜培养基。培养至第5~6天,收集悬浮细胞及疏松贴壁生长的细胞,即为未成熟DC,在含1 μg/ml的LPS培养基中继续培养48 h,收集疏松贴壁细胞为成熟的树突状细胞。

1.8 荷瘤小鼠DC表型与功能鉴定

取培养第5~6天与第8~9天的DC,调整细胞浓度至2×10⁵/ml,加入FITC-Dextran 1 mg/ml,分别置于4℃和37℃ 2 h,FCM测定DC抗原摄取能力;同时测定DC MHC-II,CD40,CD80和CD86分子的表达。

1.9 统计学分析方法

采用SPSS10.0软件进行t检验分析

2 结果

表1 BALB/c小鼠B细胞淋巴瘤SB4,SB5和SP2/0表型分析

Tab. 1 Phenotypes of BALB/c mouse B cell lymphoma SB4, SB5 and SP2/0

	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD11b (%)	CD19 (%)	CD40 (%)	CD80 (%)	CD86 (%)	MHC II (%)	mIg (%)
SB4	2.9 ± 1.8	1.3 ± 0.6	2.8 ± 2.7	1.0 ± 0.8	22.8 ± 3.1	54.3 ± 5.8	44 ± 6.0 [△]	57.8 ± 13.2 [△]	24.3 ± 4.0	98.5 ± 1.1 [△]
SB5	3.8 ± 2.7	1.1 ± 0.4	5 ± 4.4	2.9 ± 0.7	29.4 ± 6.2	76.9 ± 2.9	55 ± 3.9 [▲]	60.3 ± 15.7 [▲]	34.4 ± 2.4	96.7 ± 0.8 [▲]
SP2/0	4.1 ± 4.0	5.1 ± 3.4	4.7 ± 2.5	3.1 ± 1.1	9.5 ± 2.1	66.8 ± 10.6	13.3 ± 8.8	16.4 ± 5.4	5.1 ± 3.1	7.3 ± 3.5

△ P < 0.05 compared with SP2/0 group; ▲ P < 0.01 compared with SP2/0 group

2.3 SB4和SB5细胞分泌的Id的性质鉴定

Id均属于小鼠IgM/κ亚类;Id洗脱峰均在110 min出现,12%还原性SDS-PAGE均可见2条蛋白条带,分

2.1 分泌Id的BALB/c小鼠恶性B淋巴瘤细胞株的建立

融合12块96孔板,克隆的平均生长率为30%,检测率100%。采用夹心ELISA对融合B淋巴瘤细胞的培养上清进行筛选,初次筛选共有37孔为分泌抗体阳性孔,经多次的克隆化培养及反复的筛选,获得2株来源于不同融合克隆持续稳定分泌Id的小鼠恶性B细胞淋巴瘤细胞(命名为SB4和SB5)。经体外连续传代培养,液氮冻存半年以上,复苏后生长良好。

2.2 SB4和SB5细胞株特性的鉴定

染色体数量分析(图1)、DNA倍体及细胞生长曲线和细胞周期指数分析均显示SB4和SB5具有恶性肿瘤细胞的特性。SB4和SB5细胞膜CD3,CD4,CD8,CD11b,MHC-II均不/低表达;SB4和SB5 CD19表达率均高于20%,共刺激分子CD40,CD80和CD86中高度表达,如SB4和SB5的CD40分别为(54.3 ± 5.8)%和(76.9 ± 2.9)% (表1)。SB4和SB5胞浆IgM的表达率分别为(97.5 ± 1.3)%和(98.1 ± 1.1)%,胞膜IgM的表达率均高于95% (表1)。

图1 小鼠B细胞淋巴瘤SB4和SB5染色体数量分析

Fig. 1 Chromosomes study of mouse B cell lymphoma SB4

A: SB4; B: SB5

别位于分子量约25 kD和70 kD的位置,来源于腹水的Id纯度 > 95%,无血清培养上清中Id纯度 > 99%。SB4和SB5腹水纯化的Id分别约为2.4 mg/ml和1.0

mg/ml, 无血清培养上清纯化的 Id 均约为 0.12 mg/ml。纯化的 Id 稀释至终浓度 20 ng/ml 时, 仍出现明显颜色反应。

2.4 SB4 和 SB5 荷瘤小鼠模型

接种后 6 ~ 10 d 可触及肿块, 14 d 左右均可形成

明显肿块(见图 2), 成瘤率均为 100% (12/12), 平均寿命为(30 ± 4) d, 存活 3 周以上小鼠中 67% 出现脾脏(见图 3)和骨髓转移肝脏肿大。腹腔接种成瘤组 50% 出现腹水。

图 2 小鼠 B 细胞淋巴瘤 SB4 和 SB5 肿瘤组织 HE 染色(×400)

Fig. 2 HE(hematoxylin-eosin, HE) staining of mouse B cell lymphoma SB4 tumor tissue (×400)

A: SB4 tumor HE staining; B: SB5 tumor HE staining

图 3 小鼠 B 细胞淋巴瘤 SB4 脾脏转移 HE 染色(×400)

Fig. 3 HE staining of mouse B cell lymphoma SB4 metastasis to spleen (×400)

A: SB4 tumor metastasis to spleen; B: SB5 tumor metastasis to spleen

2.5 荷瘤小鼠骨髓树突状细胞的诱导

诱导 5 ~ 6 d 后细胞出现典型的 DC 形态特征, 以树突状突起的形成最为显著, 并呈半悬浮生长; 第 6 天的 DC 加入 1 μg/ml LPS, 刺激 48 h, DC 的表型发生明显变化: CD40, CD80, CD86 和 MHC-II 等的表达显著上调。诱导分化的第 5 ~ 6 天的未成熟 DC, 摄取 FITC-Dextran 的能力显著提高, 为(67.4 ± 4.5)%, 约是其前体细胞的 15 倍; LPS 刺激 DC 成熟后, FITC-Dextran 的摄取能力明显下降, 约为(25 ± 4.8)%(图 4)。

3 讨论

临床上大多数 B 细胞淋巴瘤患者的血清中均能检

测到异常 Id, 尤以浆细胞骨髓瘤(又称为多发性骨髓瘤)典型, 其是分泌免疫球蛋白的单克隆浆细胞恶性增殖性疾病^[10], Id 具有个体特异性, 抗原决定簇位于 V 区, 涉及识别和结合抗原的氨基酸序列在正常细胞中不存在, 可视为肿瘤相关抗原。利用 DC 肿瘤疫苗治疗肿瘤, 首要环节为肿瘤相关抗原的呈递, 因而 Id-DC 肿瘤疫苗的研究已成为 B 细胞淋巴瘤免疫生物治疗的一个热点^[4-5]。为了研究 B 细胞淋巴瘤患者血清中存在的 Id 在 B 细胞淋巴瘤免疫治疗中的作用, 本研究采用细胞融合技术构建了 2 株来源于不同融合克隆的分泌 Id 的 BALB/c 小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞株 SB4 和 SB5, 检测鉴定结果显示均具有典型的 B 细胞淋巴瘤

的特性,另外共刺激分子 CD40, CD80 和 CD86 也为中高度表达。由于融合母本细胞之一为 SP2/0 细胞,其为 P3-X63-Ag8(来源为 BALB/c 小鼠 MOPCZI)与经绵羊细胞免疫的小鼠脾淋巴细胞融合成的杂交瘤细胞,经培养和药物筛选,发生变异,已完全失去表达 Ig 的能力,且缺乏次黄嘌呤尿嘧啶磷酸核糖转化酶;另一为采用降植烷和 IFA 致敏形成腹水的 BALB/c 小鼠的脾脏细胞,虽然具有分泌 Id 的能力,但并不能无限增殖。只有这两种细胞融合为一,才能成为分泌 Id 的 B 细胞淋巴瘤细胞,分泌的 Id 在正常的脾脏 B 细胞和 SP2/0 细胞中均不存在,因而可以作为建立的小鼠 B 细胞淋巴瘤的肿瘤相关抗原进行研究。

凝胶过滤纯化 Id,测定结果显示获得高纯度和效价的 Id,这为制备 Id-DC 疫苗和检测免疫治疗小鼠血清中抗 Id 抗体提供了必要的物质基础。关于这两株 Id 之间的性质差别及分泌量与肿瘤恶性程度的相关性,还需我们进一步开展研究。

成瘤性实验结果显示 SB4, SB5 具有成瘤性强、易出现骨髓和脾脏转移的特性,由此可构建 BALB/c 小鼠 B 细胞淋巴瘤荷瘤动物模型;从荷瘤但尚未发生转移的小鼠骨髓细胞可诱导形态和功能典型的 DC,为进一步开展以 Id-DC 肿瘤疫苗为策略的 B 细胞淋巴瘤的免疫生物治疗提供一个良好的模型。

[参 考 文 献]

- [1] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 第 2 版. 上海:上海医科大学出版社, 2000. 1290-1327.
- [2] Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity[J]. Nature, 1998, 392: 245-252.
- [3] Banchereau J, Francine B, Christophe C, *et al.* Immunology of dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 767-811
- [4] Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells [J]. Nat Med, 1996, 2: 52-58.
- [5] Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, *et al.* Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: Clinical and immune responses in 35 patients[J]. Blood, 2002, 99(5): 1517-1526.
- [6] 邱玉华, 张学光, 郭玲, 等. 鼠抗人 sIL-6R 单克隆抗体的制备及 sIL-6R 检测方法的建立[J]. 细胞与分子免疫杂志, 1997, 13(4): 58-62.
- [7] Garcia-Gonzalez M, Bettinger S, Ott S, *et al.* Purification of a murine IgG3 and IgM monoclonal antibodies by euglobulin precipitation[J]. J Immunol Methods, 1988, 111: 17-23.
- [8] Lowry DH, Rosebrough HJ, Rarr AL. Protein measurement with folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [9] Knutson VP, Buck RA, Moreno RM. Purification of a murine monoclonal antibody of the IgM class[J]. J Immunol Methods, 1991, 136: 151-159.
- [10] Lim SH, Bailey-Wood R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma[J]. Int J Cancer, 1999, 83: 215-222

[收稿日期] 2002 - 07 - 08

[修回日期] 2002 - 08 - 20

图 4 SB4 荷瘤小鼠骨髓来源 DC FITC-Dextran 摄取 (120 min)

Fig. 4 FITC-Dextran uptake test of 6th DC from SB4 burdening mouse bone marrow for 120 min

A: 4°C 6 th DC control; B: 37°C 6 th DC test;

C: 4°C 9 th DC control; D: 37°C 9 th DC test

另外结果显示 SB4 和 SB5 不仅高分泌 Id,同时也存在膜型 Id 的高表达。这两种 Id 均属于小鼠 IgM/ κ 亚类,采用优球蛋白沉淀法结合 Suphcray-200 预装柱

欢迎订阅《细胞与分子免疫学杂志》

《细胞与分子免疫学杂志》由中国免疫学会和第四军医大学共同主办,是全国唯一与细胞和分子生物学相关的免疫学专业国家级科技期刊,系全国中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库及美国《CA》等刊源。

本刊的主要栏目有基础研究、临床研究、抗体工程、方法研究、综述和信息等,主要报道我国生物学领域细胞与分子免疫学方面的理论及应用研究成果。欢迎生物学的基础和医学临床工作者投稿并订阅。

本刊为双月刊(逢单月出版),国际标准开本(A4),每期 104 页,105 g 铜版纸印制,彩图随文。单价:15 元,全年 90 元。国内外公开发行,国内邮发代号 52-184。欢迎广大读者到当地邮局或单位收发室订阅,亦欢迎直接与本刊编辑部联系订购。

联系地址:(邮编 710032)陕西省西安市第四军医大学校内《细胞与分子免疫学杂志》编辑部;联系电话:029-3374550 或军线 0901-74550;Email: immuedit@fmmu.edu.cn