

结核分枝杆菌感染对 BALB/c 小鼠 B 细胞发育分化的影响

刘文文¹, 吕 艳¹, 王 聪¹, 赵 微¹, 王 涛¹, 白 丽^{1,2}

摘要:目的 探讨结核分枝杆菌感染对小鼠 B 淋巴细胞分化发育的影响。**方法** 建立 Mtb 感染 BALB/c 小鼠模型, 在感染早期(4周)及晚期(8周)分别取小鼠骨髓细胞及脾脏细胞, 或经培养后, 荧光抗体染色, 用流式细胞术对感染早期及晚期小鼠的 B 细胞表型进行分析, 设生理盐水处理的小鼠作为对照。**结果** Mtb 感染组与对照组比较, pro-B 细胞(CD45R⁺ CD43⁺)(4周: $t=2.886, P<0.05$)、未成熟 B 细胞(CD45R⁺ IgM⁺ IgD⁻)(4周: $t=4.760, P<0.05$)减少, 骨髓成熟 B 细胞(CD45R⁺ IgM⁺⁻ IgD⁺)(4周: $t=-3.485, P<0.05$; 8周: $t=-2.594, P<0.05$)与脾脏成熟 B 细胞(CD45R⁺ IgMlowIgDhi)(4周: $t=-2.275, P<0.05$; 8周: $t=-2.97, P<0.05$)增多; 小鼠脾脏 B 细胞活化分子 CD69 表达升高(4周: $t=-2.271, P<0.05$; 8周: $t=-2.052, P<0.05$); 小鼠脾脏记忆性 B 细胞(CD45R⁺ CD27⁺ IgD⁺⁻)(4周: $t=-4.203, P<0.05$; 8周: $t=-5.280, P<0.05$)。**结论** Mtb 感染能影响 B 细胞的分化发育, 促使 B 细胞向成熟细胞分化, 并能促使 B 细胞活化, 使机体更有利对抗结核的感染。

关键词: 结核分枝杆菌; B 细胞; BALB/c 小鼠; 发育分化

中图分类号: R378.91

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2018)08-0703-05

Influencing on development and differentiation of B cells in *Mycobacterium tuberculosis* infected BALB/c Mice

LIU Wen-wen¹, LYU Yan¹, WANG Cong¹, ZHAO Wei¹, WANG Tao¹, BAI Li^{1,2}

(1. Basic Medical College, Dali 671000, China;

2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D,

Dali University, Dali 671000, China)

Abstract: To explore the impact on development and differentiation of B cell in BALB/c mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), mice infected models were established with Mtb of Dali clinical isolates. After 4 weeks and 8 weeks of infected with Mtb, the bone marrow cells and splenic cells were collected from the mice, separately. The cells or cultured cells were stained by specific antibodies conjugated fluorescein. The phenotype of B cells was analyzed by flow cytometer. At the same time, mice injected with normal saline were set as control. Compared with the control group, pro-B cell(CD45R⁺ CD43⁺)(4 week: $t=2.886, P<0.05$), immature B cell (CD45R⁺ IgM⁺ IgD⁻)(4 week: $t=4.760, P<0.05$) were decreased at both of the early and late stage infected with Mtb, and the mature B cells in bone marrow(CD45R⁺ IgM⁺⁻ IgD⁺)(4 week: $t=-3.485, P<0.05$; 8 week: $t=-2.594, P<0.05$) and spleen (CD45R⁺ IgMlow IgDhi)(4 week: $t=-2.275, P<0.055$; 8 week: $t=-2.97, P<0.05$) increased. Compared with the control group, expression of CD69 on murine splenic B cells increased(4 week: $t=-2.271, P<0.05$; 8 week: $t=-2.052, P<0.05$). In addition, The memory B cell (CD45R⁺ CD27⁺ IgD⁺⁻)(4 week: $t=-4.203, P<0.05$; 8 week: $t=-5.280, P<0.05$) increased in the infection mice. The infection of Mtb can affect the development and differentiation of B cell, inducing differentiation of B cells into mature cells and activation of B cells, so that the body is more conducive to Mtb infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; B cells; BALB/c mice; development and differentiation

国家自然科学基金项目(No. 81241133)

通讯作者: 白丽, Email: lbai@dali.edu.cn

作者单位: 1. 大理大学基础医学院, 大理 671000;

2. 大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 大理

671000

Corresponding author: Bai li, Email: lbai@dali.edu.cn

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81241133)

由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引起的结核病(tuberculosis, TB)是全世界范围内高发、危害大的呼吸道传染病,位居单一病原引起死亡的严重传染病之首^[1-2]。从骨髓的造血干细胞(或胎肝)到能够分泌免疫球蛋白的浆细胞,B细胞经历了复杂的发育分化过程,不同的发育分化阶段呈现出特征性的表面分子^[3-4],虽然目前国外对B细胞分化发育研究较多,但TB感染时,对B细胞分化发育的各个阶段的影响尚不清楚,且B细胞在结核感染中的作用也不清楚。本研究分析了Mtb感染小鼠B细胞发育分化情况,并试图了解B细胞分化发育对抗结核感染的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF(Specific pathogen free)级BALB/c小鼠,许可证编号SCXK京2006-0009(已通过大理大学动物伦理委员会批准),5~6周龄,体重(18±2)g,雌性,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.1.2 菌株 Mtb临床分离株分离自大理肺结核病人,经鉴定为大理地区流行的优势菌株(由吴利先教授提供)。

1.1.3 主要仪器及分析软件 FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司),分析软件使用CellQuest software(美国BD公司)。CO₂培养箱(MCO-18AIC,日本SANYO)。

1.1.4 荧光抗体及其他试剂 全部抗小鼠荧光抗体购自BD公司:CD43-APC(Cat:560663)、CD45R-PE(Cat:553090)、IgD-FITC(Cat:553439)、IgM-PerCP-Cy5.5(Cat:550881)、CD69-FITC(Cat:561929)、CD27-APC(Cat:560691)。新鲜配制的Gey's液(0.15 mol/L NH₄Cl、1 mmol/L KHCO₃和0.1 mmol/L Na₂EDTA)、PK-30L血液稀释液(Cat:G1906,sysmex公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物感染模型的建立 将BALB/c小鼠24只随机分为2组,感染组每只小鼠从尾静脉注射Mtb临床分离株10⁶CFU/0.2 mL、对照组0.2 mL生理盐水(NS)。感染后4周和8周取小鼠的肺、肾及肝组织,经罗氏培养基培养均有Mtb生长,提示成功建立了Mtb鼠感染模型。

1.2.2 小鼠细胞获取与处理 于感染4周及8周后分别处死小鼠,获取下列细胞:

1.2.2.1 骨髓细胞 取小鼠股骨和胫骨,剥离肌肉,

用5 mL注射器吸取含3%FBS-血细胞稀释液冲洗骨髓细胞于无菌离心管中,洗涤并调细胞浓度至10⁷/mL备用。

1.2.2.2 脾细胞 取小鼠脾脏用孔径为70 μm的细胞滤器(Cell Strainer, BD Falcon)研磨并滤过细胞以除去包膜及结缔组织制成单细胞悬液,用Gey's液溶解红细胞,经3%FBS-血细胞稀释液洗涤并调细胞浓度至10⁷/mL备用。

1.2.2.3 脾细胞培养 获取小鼠脾细胞,除去红细胞后被用含10%FBS-RPMI-1640(GIBCO)培养液(含L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素)培养在12孔“U”形底培养板上,培养的细胞浓度为10⁶/mL,按0.1 IU/10⁶/mL加入结核纯蛋白衍生物(TB-Purified protein derivative, TB-PPD,北京祥瑞生物制品有限公司),37℃、5%CO₂培养24 h,收集细胞染色,设不加TB-PPD作对照。

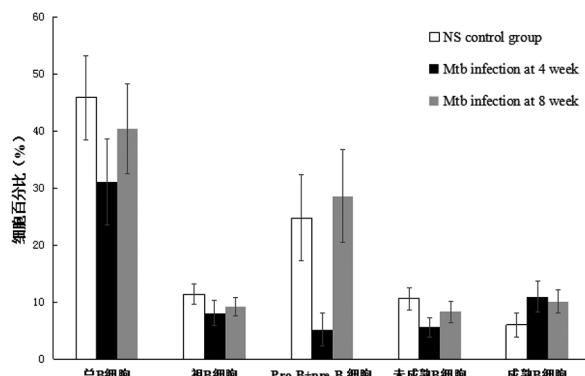
1.2.3 染色及流式细胞仪分析 取骨髓细胞10⁶,用CD45R-PE/IgM-PerCP-Cy5.5/CD43-APC/IgD-FITC染色;取脾细胞或刺激培养的脾细胞10⁶,用CD45R-PE/IgM-PerCP-Cy5.5/IgD-FITC、CD45R-PE/CD69-FITC、CD45R-PE/CD27-APC/IgD-FITC染色。染色按BD公司推荐在细胞中加入上述适量荧光抗体,4℃避光反应30 min,3%FBS-血细胞稀释液洗涤2次,末次离心后加入400 μL 3%FBS-血细胞稀释液,样品经FACSCalibor收集适量细胞,然后用Cell Quest software分析,对于所有样品的分析均需首先通过FSC(Forward light scatter)和SSC(Side light scatter)分析去除死细胞和细胞碎片,只分析活细胞。

1.2.4 数据统计 采用SPSS22.0统计软件建立数据库,对实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两组独立样本的t检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 Mtb感染促进了骨髓B细胞的分化发育 骨髓B细胞的分析参照文献[4-6]进行,骨髓细胞经CD45R-PE/IgM-PerCP-Cy5.5/CD43-APC/IgD-FITC染色。经SSC和FSC分析,“gate”淋巴细胞群分析骨髓总B细胞、祖B细胞(pro-B)、前B细胞(pre-B),然后“gate”CD45R⁺B细胞进行未成熟B细胞(immature B cell)和成熟B细胞(mature B cell)分析。感染4周时,Mtb感染小鼠与NS对照小鼠比较,骨髓总B细胞(CD45R⁺)($t = 3.429, P < 0.05$)、pro-B细胞(CD45R⁺CD43⁺)($t = 2.886, P < 0.05$)、pro-B+pre-B细胞(CD45R⁺IgM⁻)($t =$

5.939, $P < 0.05$)及未成熟B细胞($CD45R^+ IgM^+ IgD^-$)($t = 4.760, P < 0.05$)降低, 成熟B细胞($CD45R^+ IgM^{+-} IgD^+$)增加($t = -3.485, P < 0.05$), 该细胞8周时也有所增加($t = -2.594, P < 0.05$)。与4周相比, 感染8周时, pro-B+pre-B细胞($t = 5.983, P < 0.05$)及未成熟B细胞($t = 3.472, P < 0.05$)升高。感染不同时期, 骨髓各发育阶段B细胞分布基本一致(见图1、图2), Mtb感染促进了骨髓B细胞向成熟B细胞发育。



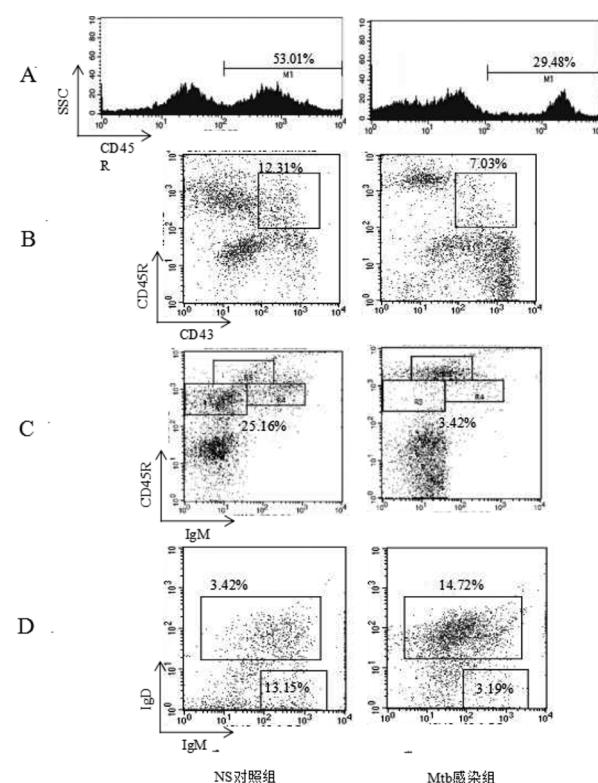
注: *, $P < 0.05$

图1 Mtb感染小鼠与对照小鼠骨髓B细胞分析

Fig.1 Analysis of B cells of mice infected with Mtb and uninfected in bone marrow

2.2 Mtb感染促进了脾B细胞的分化发育 脾脏B细胞的分析参照文献[5-6]进行, 脾细胞经 $CD45R-PE/IgM-PerCP-Cy5.5/IgD-FITC$ 抗体染色, 经FSC、SSC分析, “gate”淋巴细胞群, 分析小鼠脾B淋巴细胞亚群分布情况(见图3、图4)。Mtb感染小鼠与NS对照小鼠比较, 脾脏总B细胞($CD45R^+$) (4周: $t = 2.709, P < 0.05$; 8周: $t = 1.945, P < 0.05$)及T1B细胞(transitional 1 B cell, $CD45R^+ IgMhi IgDlow$) (4周: $t = 2.238, P < 0.05$; 8周: $t = 2.148, P < 0.05$)降低; 脾脏成熟B细胞(mature B cell, $CD45R^+ IgMlowIgDhi$)升高4周: $t = -2.27, P < 0.055$; 8周: $t = -2.97, P < 0.05$); 感染8周与4周时比较, Mtb感染小鼠脾脏T2B细胞(transitional 2 B cell, $CD45R^+ IgMhiIgDhi$) ($t = 2.189, P < 0.05$)及成熟B细胞($t = -2.733, P < 0.05$)升高。

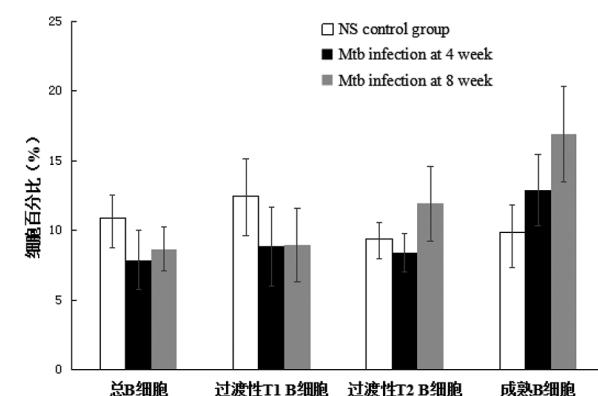
2.3 Mtb感染促进了B细胞的活化 Mtb感染小鼠的脾脏细胞体外培养或与TB-PPD共同培养24 h后, 细胞经 $CD45R-PE/CD69-FITC$ 染色, “gate” $CD45R^+$ 细胞群, 分析B细胞活化分子CD69的表达。感染4周及8周时, Mtb感染小鼠与NS对照小鼠比较, 脾脏B细胞CD69分子的表达升高, 表现



注: 上图所示为各对照组(6例)及感染组(6例)中的一个典型个体。图A显示骨髓总B细胞分布;图B显示pro-B细胞的分布;图C显示pro-B+pre-B的分布;图D显示未成熟B细胞和成熟B细胞的分布。

图2 感染4周时骨髓B细胞的分布图

Fig.2 Distribution of B cells in bone marrow at infection 4 week

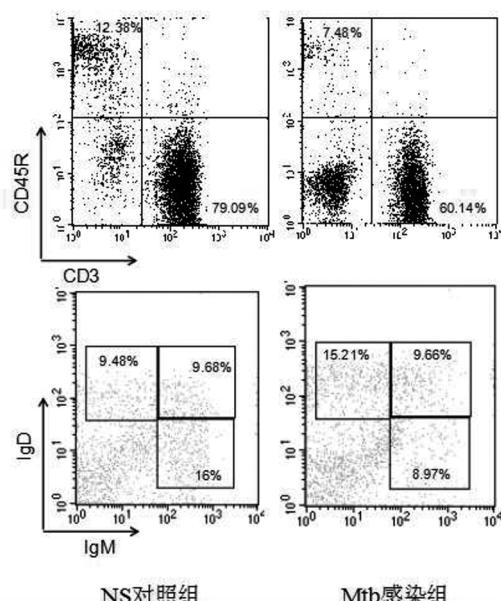


注: *, $P < 0.05$

图3 Mtb感染小鼠与对照小鼠脾脏B细胞分析

Fig.3 Analysis of splenic B cells of mice infected with Mtb and uninfected

为只加培养液(4周: $t = -2.271, P < 0.05$; 8周: $t = -2.052, P < 0.05$); 加入TB-PPD(4周: $t = -2.265, P < 0.05$; 8周: $t = -4.062, P < 0.05$), 即Mtb感染促进了B细胞的活化, 且感染4周时, B细胞已得到充分活化, 表现为感染4周和8周的活化

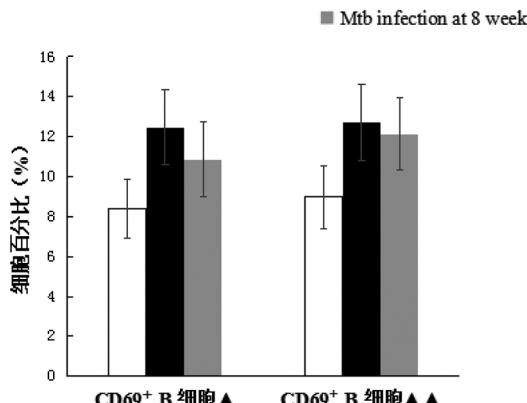


注:上图所示为各对照组(6例)及感染组(6例)中的一个典型个体

图4 感染4周时脾脏B细胞的分布

Fig.4 Distribution of B cells in spleen at 4 week of Mtb infection

B细胞比例相似,且感染4周体外培养加入特异性抗原TB-PPD再刺激时活化B细胞比例未见明显增加。

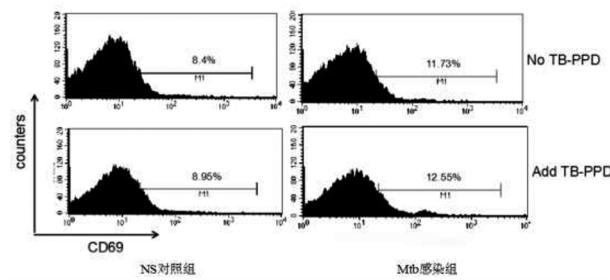


注:▲体外培养时只加培养液,无TB-PPD;▲▲体外培养时加入TB-PPD

图5 Mtb感染小鼠与对照小鼠脾脏活化B细胞分析

Fig.5 Analysis of splenic activated B cells of mice infected with Mtb and uninfected

2.4 Mtb感染促进了记忆性B细胞的产生 Mtb感染小鼠的脾脏细胞经CD45R-PE/CD27-APC/IgD-FITC染色,“gate”CD45R⁺细胞群,分析记忆性B细胞的分布。感染4周与8周时,Mtb感染小鼠与NS对照小鼠比较,脾脏记忆性B细胞(CD45R⁺



注:上图所示为各对照组(6例)及感染组(6例)中的一个典型个体

图6 感染4周时脾脏B细胞CD69分子的表达

Fig.6 Expression of CD69 molecule on splenic B cells at 4 week of Mtb infection

CD27⁺ IgD⁺⁻)(4周: $t = -4.203, P < 0.05$;8周: $t = -5.280, P < 0.05$)、类别转换记忆B细胞(CD45R⁺ CD27⁺ IgD⁻)升高(4周: $t = -4.217, P < 0.05$;8周: $t = -4.661, P < 0.05$);Mtb感染8周与4周比较,脾脏记忆性B细胞($t = -4.312, P < 0.05$)及类别转换记忆B细胞升高($t = -3.821, P < 0.05$)(见图7、图8)。

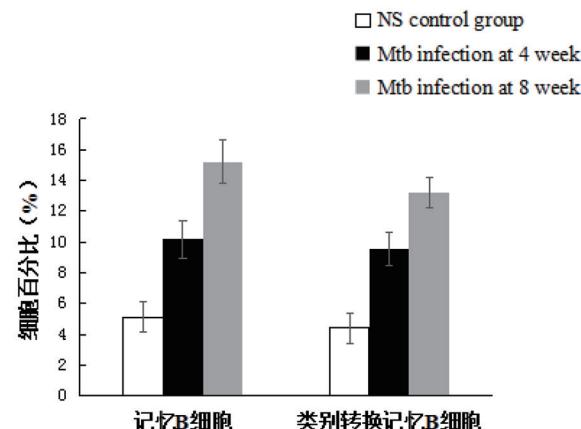
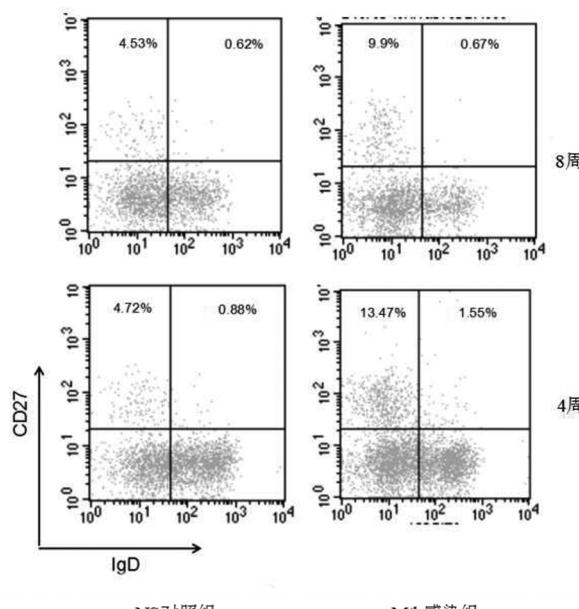


图7 Mtb感染小鼠与对照小鼠脾脏记忆性B细胞分析

Fig.7 Analysis of memory B cells of mice infected with Mtb and uninfected

3 讨论

在B细胞的分化发育进程中,一些表面分子的表达呈现规律性改变,据此可以将整个过程分为5个阶段^[7],即pro-B、pre-B、未成熟B细胞、过渡B细胞(包括过渡型T1和过渡型T2细胞)和成熟B细胞,前3个阶段在骨髓进行,后2个阶段在脾脏中进行^[8-9]。未成熟B细胞被从骨髓运送到脾脏,在脾脏内,BCR信号促使未成熟B细胞继续发育,先形成过渡型T1和过渡型T2细胞,最后成熟主要定居于淋巴滤泡。成熟B细胞在受到抗原刺激后分



注:上图所示为各对照组(6例)及感染组(6例)中的一个典型个体

图8 感染早期及晚期脾脏记忆性B细胞的分布

Fig.8 Distribution of memory splenic B cells at different infected stage in the BALB/c mice

化为记忆性B细胞和效应性B细胞(浆细胞)^[9-10]。近年来,随着免疫学的发展,新的细胞亚群的不断发现,B细胞在结核中的研究越来越受到重视,B细胞不仅是结核结节中数量最多的细胞,而且其在参与结核的保护性免疫中也发挥重要作用。在本实验中,在感染早期,骨髓B细胞与脾脏B细胞总量呈减少趋势。Mtb感染时,pro-B细胞、未成熟B细胞、T1 B细胞减少,而骨髓成熟B细胞与脾脏成熟B细胞增多,且感染晚期与早期相比,pro-B+ pre-B细胞、未成熟B细胞、T2 B细胞及成熟B细胞均有所增加,提示Mtb感染促使B细胞向成熟细胞方向发育;另外,感染小鼠脾脏B细胞CD69分子的表达升高,经抗原(TB-PPD)刺激后CD69增加显著,即感染能促使活化B细胞增多,且在感染4周时,B细胞已得到充分活化,表现为感染4周和8周的活化B细胞比例相似;另外,小鼠的记忆性B细胞、类别转换记忆B细胞也增多,且晚期较早期增多得更为明显。上述结果提示,结核感染能影响B细胞的分

化发育,促使B细胞向成熟细胞分化,并使B细胞活化增强,产生更多的记忆性B细胞,有利于抗Mtb作用。

参考文献:

- [1] Wong D, Chao JD, Av-Gay Y. *Mycobacterium tuberculosis*-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development[J]. Trends Microbiol, 2013, 21(2): 100-109. DOI: 10.1016/j.tim.2012.09.002
- [2] Sivakolundu S, Mannela UD, Jain S, et al. Serum iron profile and ELISA-based detection of antibodies against the iron-regulated protein HupB of *Mycobacterium tuberculosis* in TB patients and household contacts in Hyderabad (Andhra Pradesh), India [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2013, 107(1): 43-50. DOI: 10.1093/trstmh/trs005. Epub 2012 Oct 19
- [3] Gwin K, Dolence JJ, Shapiro MB, et al. Differential requirement for Hoxa9 in the development and differentiation of B, NK, and DC-lineage cells from Flt3⁺ multipotential progenitors [J]. BMC Immunol, 2013, 14: 5-13. DOI: 10.1186/1471-2172-14-5
- [4] Wen R, Chen Y, Schuman J, et al. An important role of phospholipase Cγ1 in pre-B-cell development and allelic exclusion[J]. EMBO J, 2004, 23(20): 4007-4017. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600405
- [5] Loder F, Mutschler B, Ray RJ, et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals[J]. J Exp Med, 1999, 190(1): 75-89. PMID: 10429672
- [6] Wen R, Chen Y, Bai L, et al. Essential role of phospholipase Cγ2 in early B-Cell development and Myc-mediated lymphomagenesis[J]. Mol Cellular Biol, 2006, 26(24): 9364-9376. DOI: 10.1128/MCB.00839-06
- [7] Welner RS, Pelayo R, Kincade PW. Evolving views on the genealogy of B cells[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(2): 95-106. DOI: 10.1038/nri2234
- [8] Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems[J]. Cell, 2006, 124(4): 815-822. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.001
- [9] 白丽. B淋巴细胞发育与BCR基因重排[J]. 大理学院学报, 2010, 9(6): 28-32. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2345.2010.06.011
- [10] Perez-Andros M, Paiva B, Nieto WG, et al. Human peripheral blood B cell compartments: a crossroad in B-cell traffic[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2010, 78(1): S47-60. DOI: 10.1002/cyto.b.20547