DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.004
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)15-1333-03

论著

浆细胞发育基因表达谱的建立及部分基因表达的调控

程小星,蹇 锐 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究浆细胞发育过程中基因表达的改变及其调控。方法 应用基因芯片和RT-PCR的方法研究成熟B淋巴细胞到浆细胞发育过程中基因表达的变化。结果 建立了浆细胞发育的基因表达谱,证实在浆细胞发育阶段一些重要的B细胞抗原受体(BCR)信号转导相关分子,包括Igα、Igβ、Lyn、Syk、BLNK、SWAP-70、SHP-1的表达显著下降。转录因子BSAP可能同这些分子表达的调控相关。结论 在浆细胞发育阶段一些重要的BCR信号转导相关分子的表达显著下降。

关键词:B淋巴细胞;基因表达谱;浆细胞发育
中图法分类号:R329.21;R331.144;R394.2 文献标识码:A

Establishment of gene expression profile and regulation of genes expression during plasma cell differentiation

CHENG Xiao-xing, JIAN Rui (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the genes modulated during plasma cell development and their regulating network. Methods The changes of gene expression during differentiation from mature B cells to plasma cells were studied using cDNA microarray and RT-PCR. Results The gene expression profile during plasma cell differentiation was established. During mature B cell-plasma cell differentiation, numerous genes were modulated, including genes involving immunity, cell growth, survival, and signal transduction. The expressions of several molecules in the B cell antigen receptor (BCR) signaling pathways, such as Igα, Igβ, Lyn, Syk, BLNK, SWAP-70, and SHP-1 were down-regulated. The decreased expression of some of these molecules might be associated with the down-regulation of the transcription factor BSAP. Conclusion During plasma cell differentiation, molecules involving BCR signaling pathways are down-regulated.

Key words: B lymphocyte; gene expression profile; plasma cell development

B淋巴细胞的发育可以分为祖B细胞、前B细胞、不成熟B细胞、成熟B细胞、记忆细胞或浆细胞等不同的发育阶段,每一阶段都有特异的膜标记,可以用特异的抗体染色来区分。近年来的研究,特别是小鼠基因敲除的研究结果证明,B淋巴细胞的每一个发育阶段都受到严格的调控[1]。例如,转录因子E2A、EBF和Pax5在由干细胞向早期B淋巴细胞的发育中起着决定性的作用。研究淋巴细胞的发育及其调控机制对淋巴系统疾病的诊断和治疗有着重要的意义。

浆细胞是B淋巴细胞发育的最终阶段,它能产生特异的抗体,从而发挥体液免疫的功能。到目前为止对浆细胞发育阶段基因调控的了解还很有限。为了研究浆细胞发育过程中整体基因表达的改变及其调控,本研究建立了成熟B淋巴细胞到浆细胞发育的基因表达谱,证实B细胞抗原受体(B cell antigen receptor, BCR)信号转导通路相关分子的表达在浆细胞发育阶段显著下调。

1 材料与方法

1.1 BCL1细胞的培养与处理

BCL1(CW13.20-3B3)成熟B淋巴细胞细胞系由ATCC获得(CRL-1669),在含有10%胎牛血清、2 mmol/L谷酰胺、50 μmol/L 2-巯基乙醇、50 U/ml青霉素和50 μg/ml链霉素的RPMI1640培养液中培养。为了在体外诱导成熟B淋巴细胞向产生抗体的浆细胞的发育,本研究在BCL1细胞的培养液中加入40 ng/ml IL-2和25 ng/ml IL-5(PharMingen),在37 ℃ CO_2孵箱中培养48 h。

1.2 细胞的标记及流式细胞仪计数分析

FITC或PE标记的抗IgM和抗Syndecan-1的抗体由Pharmingen购买。细胞用含3%胎牛血清的无菌PBS洗1次,然后与25 μl荧光标记的抗体(1∶100稀释)在冰上孵育10 min。洗1次后将细胞悬浮于含3%胎牛血清的无菌PBS中,用Becton Dickinson的FACScan流式细胞仪计数分析。

1.3 RNA提取及基因芯片分析

细胞的全RNA用TRIZOL(GIBCO)的方法提取。RNA的完整性由琼脂糖电泳来判断。基因芯片使用Incyte Genomics公司的小鼠GEM2/UniGene1芯片,含有大约8 000个独特的基因。

1.4 半定量RT-PCR

用Superscript preamplification system (GIBCO)将从细胞提取

作者简介:程小星(1963-),男,湖北省天门市人,博士,教授,主要从事微生物学和免疫学方面的研究。电话:(023)68752241
通信作者:程小星,E-mail:xiaoxing@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-07-10;修回日期:2004-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的 RNA 逆转录合成 cDNA，作为 PCR 的模板。本研究用 Tubulin 基因作为内部对照，调整 cDNA 模板的浓度，保证所用 cDNA 模板量基本一致。PCR 通常使用 20 到 30 个循环。

2 结果

2.1 浆细胞发育过程中基因表达的改变

为了了解从成熟 B 淋巴细胞到浆细胞这一发育阶段基因表达的改变及其调控，本研究用基因芯片比较了具有成熟 B 淋巴细胞表型的 BCL1 细胞与经 IL-2 和 IL-5 诱导后具有浆细胞表型的细胞之间基因表达的差异，部分结果见表 1。IgJ 和 μ 链是分泌型 IgM 的成分，它们表达的上升证实 BCL1 细胞在 IL-2 和 IL-5 的诱导下发育为能分泌抗体的浆细胞。

在浆细胞发育过程中基因表达显著增加的包括具有抗凋亡作用的 A1，转录因子 OBF-1、YB-1、IRF-7 和 Cbp/p300 等（表 1）。表达显著下降的包括 B7.2、MHC Ⅱ，以及转录因子 TTG-2、Pbx-1、IRF-5 和 c-myc 等（表 1）。

表 1 IL-2 和 IL-5 诱导 BCL1 细胞发育为浆细胞后的基因表达谱

Tab 1 Gene expression profile of IL2- and IL5-treated BCL1 cells

Up-regulated expression	
Immunity	CD86/B7.2 (−2.2)
Ig J chain (4.5)	CD52 (−1.9)
Cytokine inducible SH2-containing protein (CIS) (4.2)	MHC class II antigens (−1.7)
Mannose receptor, C type 1 (3.0)	Toll-like receptor 1 (−1.7)
IgH chain (2.5)	complement C1q binding protein C1qBP (−1.6)
Igγ 3 chain (1.7)	**Transcription factors**
Fc(RII (1.6)	TTG-2 (−2.0)
Anti-apoptosis	Pbx-1 (−1.9)
A1 (1.8)	Interferon regulatory factor 5 (IRF-5) (−1.9)
	c-Myc (−1.7)
Transcription factors	
OBF-1 (2.8)	**Singal transduction mechanism**
Y box protein 1 (YB-1) (1.8)	MARCKS-like protein (Mlp) (−2.2)
Interferon regulatory factor 7 (IRF7) (1.6)	SWAP-70 (−1.9)
Cbp/p300-interacting transactivator (1.6)	Gbp-2 (−1.9)
	Igβ (−1.8)
Cell growth and maintenance	Grb2 (−1.6)
Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system, Slc7a7) (2.8)	Blk (−1.6)
NIMA-related expressed kinase 2 (Nek2) (2.4)	Lnk (−1.6)
NDRG1 (1.8)	**Cell growth and maintenance**
XRCC1 (1.7)	Lysosomal trafficking regulator (Lyst) (−2.9)
Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase (1.6)	Transferrin receptor (Trfr) (−2.2)
DNA topoisomerase I (1.6)	Cullin 3 (Cul3) (−1.9)
	Phospholipid scramblase 1 (Plscr1) (−1.9)
Proteinase inhibitor	Calcium channel alpha2/delta subunit 1 (Cacna2d1) (−1.8)
Serine protease inhibitor 2-2 (Spi2-2) (2.3)	
	Chemotaxis
Down-regulated expression	Chemokine (C-C) receptor 7 (CCR7) (−1.7)
Immunity	**Others**
CD20 (−2.7)	Cathepsin H (−1.9)

The numerical values in brackets indicate the expression ratio of the gene in cells that are under treated versus untreated conditions

2.2 BCR 信号转导通路相关分子的表达在浆细胞发育阶段显著下降

基因芯片的结果显示，与 BCR 信号转导通路相关的一些蛋白，如 Igβ、SWAP-70、Grb-2、Blk 等的表达都显著下降。该结果提示浆细胞的发育可能伴随着 BCR 信号转导通路相关分子表达的抑制。为了证实这一假设，我们设计了扩增一些重要的 BCR 信号转导通路相关基因的引物。半定量 RT-PCR 的结果显示，同 BCL1 细胞相比，经 IL-2 和 IL-5 诱导后的浆细胞 BCR 信号转导通路一些重要分子的表达，包括 Igα、Igβ、Lyn、Syk、BLNK、SWAP-70、SHP-1 的表达均下降（图 1）。我们应用半定量 RT-PCR 在小鼠原代 B 淋巴细胞也证实浆细胞的发育伴随着 BCR 信号转导相关分子表达的下降。

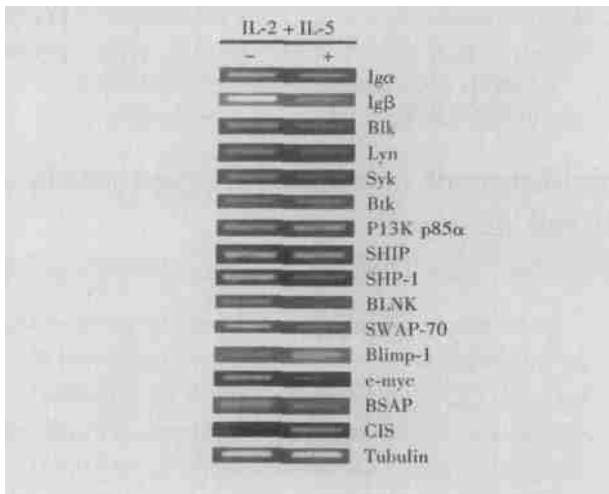


图 1 半定量 RT-PCR 显示浆细胞发育后一些 BCR 信号转导相关分子和转录因子表达的改变

Fig 1 Changes of expression levels of various B cell signaling molecules and transcription factors in IL-2- and IL-5 treated BCL1 cells by semi-quantitative RT-PCR

转录因子是具有识别特异 DNA 顺序的蛋白，能促进或抑制某些特定基因的转录及表达。为了研究转录因子对 BCR 信号转导通路相关基因表达的调控，我们选择了与浆细胞发育相关的转录因子 Blimp-1、BSAP 和 BCL6（图 2）。半定量 RT-PCR 证实 Blimp-1 的表达明显增加，BSAP 和 BCL6 的表达则明显下降（图 1）。

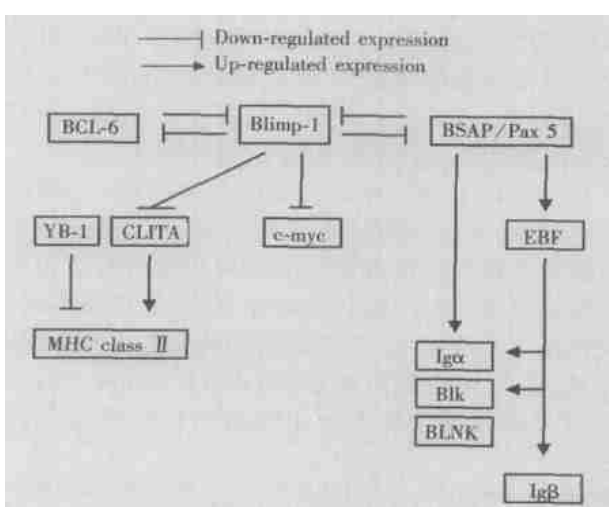


图 2 浆细胞发育阶段部分基因表达的调控网

Fig 2 A genetic network regulating plasma cell differentiation

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

BCR 是 B 淋巴细胞的一个多功能的受体, 在 B 淋巴细胞的发育、选择和激活上起了关键的作用[2]。在前 B 细胞阶段, 该受体以不成熟的形式出现, 称之为 pre-BCR, 主要是 Igμ 重链与 VpreB 和 λ5 轻链配合形成。在不成熟 B 细胞阶段, 成熟的 BCR 开始在细胞表面表达, 以穿膜 IgM 的形式存在。到成熟 B 细胞阶段, BCR 为 IgM 和 IgD 共存, 但 IgD 的表达明显高于 IgM。在穿膜 μ 链以及 λ5 基因敲除的小鼠, B 淋巴细胞的发育被阻断在前 B 细胞的阶段, 证明 pre-BCR 的表达在前 B 淋巴细胞的进一步发育中有不可取代的作用。即使是在成熟 B 淋巴细胞, BCR 的表达也是必不可少的。用基因条件敲除技术在成年小鼠敲除 BCR 导致成熟 B 淋巴细胞的快速死亡, 说明 BCR 的信号在维持成熟 B 淋巴细胞的存活上起了关键的作用。在 B 淋巴细胞的发育过程中, BCR 在区分自身抗原与外来抗原, 以及在选择产生高亲和力抗体等方面都起了重要的作用。

配体与受体的相互作用导致受体信号转导通路的激活, 引起基因表达的改变和细胞功能的变化。BCR 的功能也依赖信号转导通路的激活来实现。现在的研究显示, 抗原与 BCR 的结合可以导致 PLCγ、Ras、Rho、PI3K 信号转导通路的激活, 最终激活 NF-κB、NF-AT、p38、Jnk、ERK 等转录因子, 调控基因的转录与表达[2]。由于 BCR 的胞浆部分太短, 不能直接转导信号, 需要通过 Igα 和 Igβ 才能征集和激活信号转导通路。BCR 信号转导通路相关基因的敲除可以导致 B 淋巴细胞发育、选择或激活方面的缺陷, 证明它们在 BCR 功能中的重要性。BCR 信号转导通路相关分子在浆细胞发育中的作用还没有系统的研究。本研究结果显示, 在浆细胞发育阶段, 一些重要的 BCR 信号转导相关分子的表达明显降低, 这说明 BCR 及其信号转导通路在浆细胞中的作用已处于次要地位。

本研究所用 BCL1 B 淋巴细胞系具有成熟 B 淋巴细胞的表型, 可以在体外经 IL-2 和 IL-5 诱导发育为产生抗体的浆细胞, 因此是研究浆细胞发育的理想的体外模型。流式细胞仪的结果也显示, 被 IL-2 和 IL-5 处理 48 h 后 BCL1 细胞表面 Syndecan-1 的表达明显增加, MHC Ⅱ的表达则下降, 说明 BCL1 细胞经诱导后具有浆细胞的表型, 同文献[3]报道的一致。

基因转录的改变通常受到转录因子的调控。被称为"浆细胞终极分化主调控子"的转录因子 Blimp-1 已经证明在浆细胞的发育中起了关键的作用。在本研究中, BCL1 细胞被诱导发育为浆细胞的过程中 Blimp-1 的表达显著增加。综合基因芯片、RT-PCR 和已知转录因子调控的基因, 我们建立了浆细胞发育阶段相关基因转录的调控网络(图 2)。

在浆细胞阶段, MHC Ⅱ的表达明显下降, 这可能同转录因子 CIITA 和 YB-1 的调控有关。Blimp-1 抑制 CIITA 的表达, 而 CIITA 促进 MHC Ⅱ的表达[3]。所以在浆细胞, Blimp-1 表达的显著增加抑制了 MHC Ⅱ的表达。YB-1 也能直接抑制 MHC Ⅱ的表达, 因此在浆细胞阶段 YB-1 表达的增加导致 MHC Ⅱ表达的抑制。

Igα、Blk 和 BLNK 的表达受到转录因子 BSAP 的调控, 因此 BSAP 在浆细胞阶段表达的显著下降可能同它们表达的降低相关[4~6]。至于其它 BCR 信号相关分子是否受到 BSAP 的直接调控还有待进一步证实。在 BSAP 基因条件敲除的小鼠, 成熟 B 淋巴细胞 Igα、Igβ、Syk、BLNK、CIITA、EBF 的表达显著下降, 说明它们受到 BSAP 的调控[4]。而转录因子 EBF 已经证明可以调控 Igα、Igβ 和 Blk 的表达[5,7]。

浆细胞发育主调控子 Blimp-1 受到转录因子 BCL-6 和 BSAP 的调控[8]。在浆细胞发育阶段, Blimp-1 的表达显著增加, 而 BCL-6 和 BSAP 的表达显著降低。这些变化可能同浆细胞发育过程中所观察到的基因表达的改变密切相关。

参考文献:

[1] Rolink A G, Schaniel C, Andersson J, *et al*. Selection events operating at various stages in B cell development[J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13(2): 202－207.

[2] Kurosaki T. Regulation of B cell fates by BCR signaling components[J]. Curr Opin Immunol, 2002, 14(3): 341－347.

[3] Piskurich J F, Lin K I, Lin Y *et al*. Blimp-1 mediates extinction of major histocompatibility class Ⅱ transactivator expression in plasma cells[J]. Nat Immunol, 2000, 1(6): 526－532.

[4] Horcher M, Souabni A, Busslinger M. Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis[J]. Immunity, 2001, 14(6): 779－790.

[5] Libermann T A, Pan Z, Akbarali Y, *et al*. AML1(CBFalpha2) cooperates with B-cell specific activating protein (BSAP/PAX5) in activation of the B cell-specific BLK gene promoter[J]. J Biol Chem, 1999, 274(35): 24671－24676.

[6] Nutt S L, Morrison A M, Dorfler P, *et al*. Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B cell development by loss- and gain-of-function experiments[J]. EMBO J, 1998, 17(8): 2319－2333.

[7] Gisler R, Jacobsen S E, Sigvardsson M. Cloning of human early B-cell factor and identification of target genes suggest a conserved role in B cell development in man and mouse[J]. Blood, 2000, 96(4): 1457－1464.

[8] Reljic R, Wagner S D, Peakman L J, *et al*. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6[J]. J Exp Med, 2000, 192(12): 1841－1848.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net