

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.20.003

文章编号: 1005-8982(2017)20-0011-05

BAFF 受体在人 B 淋巴瘤细胞中的作用研究*

王永伦, 封忠昕, 葛晓军

(遵义医学院附属医院 检验科, 贵州 遵义 563003)

摘要:目的 测定 B 细胞活化因子(BAFF)受体在人 B 淋巴瘤细胞中的表达水平,探讨 B 细胞活化因子受体(BAFF-R)信号转导在人淋巴瘤细胞中的作用。**方法** 选取 3 种人 B 淋巴瘤细胞系 Raji、Daudi、BALL-1,通过流式细胞术、实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)及 Western blot 检测 BAFF 的表达。**结果** 流式细胞术结果显示,在 3 种人 B 淋巴瘤细胞系中均检出 BAFF-R 阳性表达,qRT-PCR 和 Western blot 检测显示,在 3 种人 B 淋巴瘤细胞系中,BAFF-R 基因与蛋白表达水平上调。**结论** 人 B 淋巴瘤细胞系 Raji、Daudi、BALL-1 呈阳性表达,BAFF-R 与 B 淋巴瘤细胞的生长、增殖关系密切。

关键词: B 细胞活化因子;B 细胞活化因子受体;B 淋巴瘤细胞

中图分类号: R733.7

文献标识码: A

BAFF-R expression in B cell lymphoma*

Yong-lun Wang, Zhong-xin Feng, Xiao-jun Ge

(Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College,
Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To determine the expression of B-cell activating factor receptor (BAFF-R) in B cell lymphoma and to explore the role of BAFF-R signal transduction in B cell lymphoma. **Methods** Human B-cell lymphoma cell lines Raji, Daudi and BALL-1 were selected as the objects of study. BAFF-R expression was detected by flow cytometry, qRT-PCR and Western blot. **Results** Flow cytometry results demonstrated that BAFF-R was up-regulated in all the three cell lines, qRT-PCR and Western-blot indicated the same results. **Conclusions** BAFF-R expression is up-regulated in all the three B-cell lymphoma cell lines, and closely correlated to the growth and proliferation of B-cell lymphoma.

Keywords: B-cell activating factor, B-cell activating factor receptor, B-cell lymphoma

B 细胞活化因子(B cell-activating factor,BAFF)是肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor,TNF)家族成员之一,在 B 淋巴细胞的分化和增殖中发挥关键作用,有 3 个受体分别为 B 细胞成熟抗原、跨膜激活剂及钙调素亲环素配体相互作用分子,以及 BAFF 细胞活化因子受体(B cell-activating factor recipient,BAFF-R)。研究表明,BAFF 受体的特异性较高,不仅只在 B 细胞中表达,而且只专一地结合 BAFF,而不与 TNF 家族中的其他成员结合,是 BAFF 调控 B 细胞分化的主要介导受体^[1-2]。虽然 BAFF 与血液疾病

的关系已进行大量研究,但是 BAFF-R 是否在 B 淋巴瘤细胞中广泛表达,尚未见报道。本研究拟选择 3 种人 B 淋巴瘤细胞系 Raji、Daudi、BALL-1,检测细胞中 BAFF 的表达,为探讨 BAFF-R 在 B 淋巴瘤细胞发生、发展中起到的调控机制奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人 B 淋巴瘤细胞系 Raji、Daudi 与 BALL-1 购自美国 ATCC,由本室保存。无血清细胞冷冻保存培养

收稿日期:2016-05-19

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81560487);贵州省科学技术基金 [No:黔科合 J(2011)2264]

[通信作者] 葛晓军,E-mail:gxj_199421@163.com

基(roswell park memorial institute 1640,RPMI 1640)和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,细胞培养箱(美国 Thermo 公司),RNA 抽提试剂盒(日本 TaKaRa 公司);细胞裂解液 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)试剂盒、SsoAdvanced SYBR Green Supermix 荧光定量试剂盒、qRT-PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司,FITC anti-human CD268(BAFF-R)Antibody(美国 Bio Legend 公司),流式细胞仪(美国 BD Bioscience 公司),细胞蛋白提取试剂选择无线电免疫沉淀(radio-immunoprecipitation assay,RIPA)蛋白裂解液(中性)(北京中山金桥生物科技有限公司),蛋白定量仪(美国 Thermo 公司),抗 BAFF-R 抗体(美国 CST 公司),抗 β -actin 抗体、山羊抗小鼠 IgG HRP 二抗及山羊抗兔 IgG HRP 抗体购自北京中山金桥生物科技有限公司,蛋白电泳仪与转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),放射自显影仪(虎丘影像科技苏州有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 从液氮中取出冻存细胞,37℃迅速融化。1 500 r/min 离心 3 min,弃上清液,用培养液清洗 1 遍,离心后弃上清,重悬于含 10%热灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中 37℃、5%二氧化碳 CO₂ 孵箱常规培养。

1.2.2 流式细胞术 分别选取 5×10^5 个状态良好的对数生长期淋巴瘤细胞,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)洗涤细胞 3 次后,PBS 重悬细胞,按照说明书要求加入 FITC anti-human CD268(BAFF-R)流式抗体,避光孵育 15 min 后,PBS 洗涤细胞 3 次,上流式细胞仪检测 BAFF-R 的表达。阴性对照细胞使用未染色的淋巴瘤细胞。

1.2.3 总 RNA 的提取和 qRT-PCR 提取收集实验所需细胞的 RNA。反应体系:5 \times Prime Script™ Buffer (for real-time)6.0 μ l,Prime Script™ RT Enzyme Mix I 1.5 μ l,Random 6 mers (100 μ mol/L) 1.5 μ l,Oligo Dt Primer(50 μ mol/L)1.5 μ l,总 RNA 19.5 μ l,总反应体积为 30 μ l。

37℃、15 min 逆转录,85℃、5 s 灭活逆转录酶。逆转录产物 cDNA 放置于 -20℃冰箱冷冻保存。按说明书进行 qRT-PCR,取 1 μ l 逆转录产物 cDNA 进行 PCR 扩增。反应总体积为 20 μ l,内含 SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μ l,引物混合液正反向引物各

1 μ l,1% DEPC 水 8 μ l。PCR 反应条件:95℃预变性 30s,95℃变性 5s,60℃退火 30s,共 40 个循环。人 BAFF-R 和内参 β -actin qRT-PCR 引物如下:人 BAFF-R 正向引物(22 bp):5'-AATCTCTGATGCCACAGCTCCT-3',反向引物(19 bp):5'-TATTGTTGCTCAGGGCCGG-3';人 β -actin 正向引物(20 bp):5'-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3',反向引物(20 bp):5'-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3'。实验结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对值来反映基因表达的改变。

1.2.4 细胞总蛋白的制备和 Western blot 检测 收取对数生长期的细胞,并以 0.1 mol/L pH 7.4 的冷 PBS 离心洗涤,并重悬 3 次。加入 300 μ l RIPA 蛋白裂解液(中性),冰上放置 30 min 或冰上超声破碎 10 s,4℃、13 000 r/min 离心 30 min,小心吸取上清液。用 Mini Drop 2000 分光光度计测定提取蛋白浓度,置入 -70℃冰箱冷藏备用。

Western blot 检测:配制分离胶和积层胶,浓缩胶 8%,分离胶分别为 10%和 15%。蛋白样品与 Loading buffer 按 1:4 混和后于沸水中煮沸 3~8 min。取 10~20 μ l 蛋白上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶 80 V,分离胶 120 V。湿转法将蛋白转到聚偏二氟乙烯膜上,恒压 100 V。5%脱脂奶粉于室温封闭 2 h 或 4℃过夜。5%脱脂奶粉稀释一抗(1:500~1:1 500,按抗体说明书要求稀释),37℃摇床孵育 2 h 或 4℃孵育过夜,三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline and tween 20,TBST)洗 3 次,10~15 min/次。稀释辣根过氧化物酶标记二抗(1:10 000),37℃摇床孵育 1 h,TBST 洗 3 次,10~15 min/次。加入显影液,放射自显影检测目的条带。 β -actin 为内参对照。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

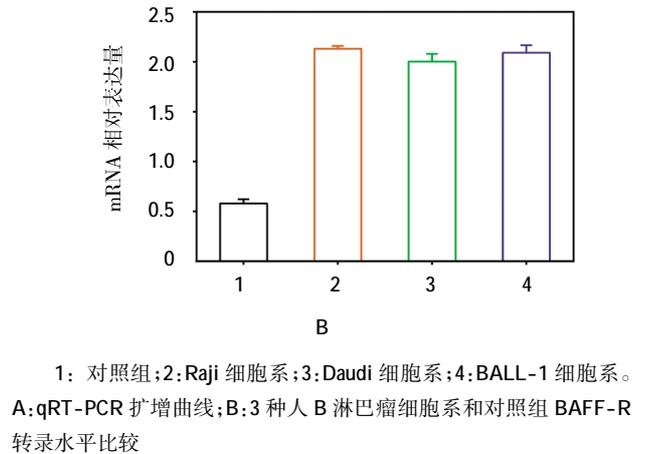
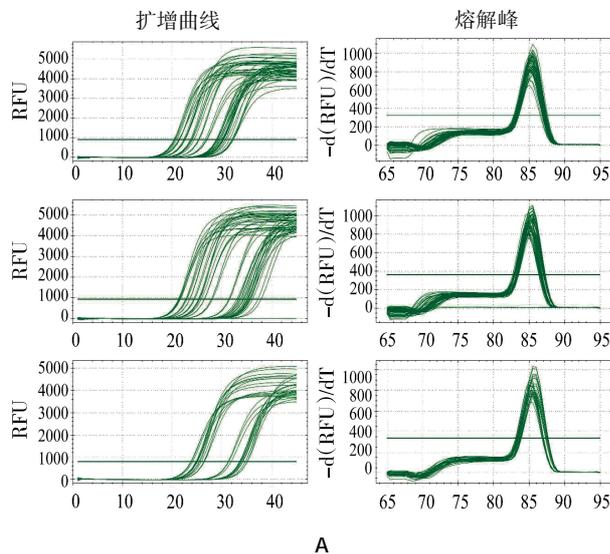
2.1 BAFF-R mRNA在 3 种人 B 淋巴瘤细胞系中的表达

Raji、Daudi 及 BALL-1 3 种人 B 淋巴瘤细胞系 BAFF-R mRNA 水平与对照组比较,差异有统计学意义($F=1.176, 2.150$ 和 1.601 ,均 $P=0.000$),在 Raji、Daudi 及 BALL-1 细胞系中,BAFF-R mRNA 水平

较对照组细胞(293T 细胞系)呈现出高表达状态,各细胞系中 BAFF-R mRNA 相对表达量较对照组细胞提高约 4 倍。在 3 种人淋巴瘤细胞系中,Raji 与 Daudi 的 BAFF-R mRNA 表达水平比较,差异有统计学意义($t=1.829, P=0.002$),而 Raji 与 BALL-1、Daudi 与 BALL-1 的 BAFF-R mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义($F=1.362$ 和 $1.343, P=0.120$ 和 0.330)。见图 1。

2.2 BAFF-R 蛋白在 3 种人 B 淋巴瘤细胞系中的表达

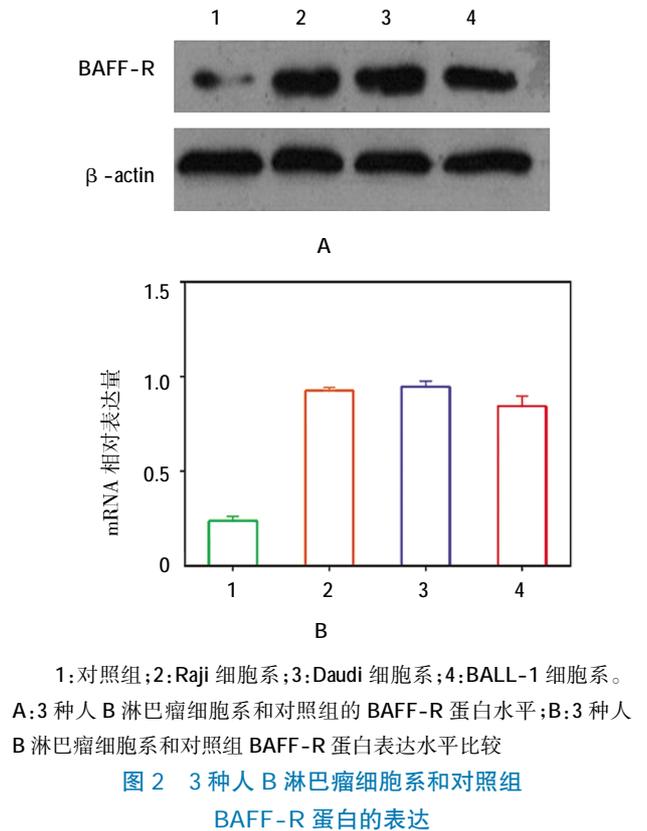
与对照组细胞比较,BAFF-R 蛋白表达水平在 3 种人 B 淋巴瘤细胞系中呈现高表达状态。该结果与 qRT-PCR 结果一致,进一步从蛋白水平确定,BAFF-R 在 Raji、Daudi 与 BALL-1 细胞系中存在高表达现象。本实验使用 Image J 图像处理软件对 Western blot 检测结果进行灰度分析,求出各条带的灰度值。BAFF-R 相对表达量比值 =BAFF-R 灰度值/ β -actin 灰度值,计算得到各组细胞中 BAFF-R 表达量占细胞总蛋白量的比值,并对各组蛋白总量比值进行统计学分析。Raji、Daudi 及 BALL-1 3 种人 B 淋巴瘤细胞系 BAFF-R 蛋白表达水平与对照组比较,差异有统计学意义($F=1.262, 3.208$ 和 2.936 , 均 $P=0.000$),3 种人 B 淋巴瘤细胞系中 BAFF-R 蛋白表达水平高于对照组。3 组人 B 淋巴瘤细胞系间比较,Raji 与 Daudi 细胞系 BAFF-R 蛋白表达比较,差异无统计学意义($t=2.542, P=0.526$),Raji 与 BALL-1、Daudi 与 BALL-1 细胞系 BAFF-R 蛋白表达比较,差异有统计学意义($t=2.326$ 和 1.093 , 均 $P=0.000$)。见图 2。



1: 对照组;2:Raji 细胞系;3:Daudi 细胞系;4:BALL-1 细胞系。
A:qRT-PCR 扩增曲线;B:3 种人 B 淋巴瘤细胞系和对照组 BAFF-R 转录水平比较

2.3 BAFF-R 在 3 种人 B 淋巴瘤细胞系中的阳性表达

为确定 BAFF-R 在 Raji、Daudi 及 BALL-1 细胞系中的表达率,本实验使用流式细胞术检测 3 种细胞系 BAFF-R 的表达情况,以阴性峰为参照,区分出 BAFF-R 阳性细胞。3 种细胞系细胞表面 BAFF-R 均呈现阳性表达,表达率分别为 62.11%、87.84% 和 99.75%($G_1=M_1$)。实验结果显示,Raji、Daudi 及 BALL-1 细胞系中,BAFF-R 均呈阳性表达。见图 3。



1:对照组;2:Raji 细胞系;3:Daudi 细胞系;4:BALL-1 细胞系。
A:3 种人 B 淋巴瘤细胞系和对照组的 BAFF-R 蛋白水平;B:3 种人 B 淋巴瘤细胞系和对照组 BAFF-R 蛋白表达水平比较

图 2 3 种人 B 淋巴瘤细胞系和对照组 BAFF-R 蛋白的表达

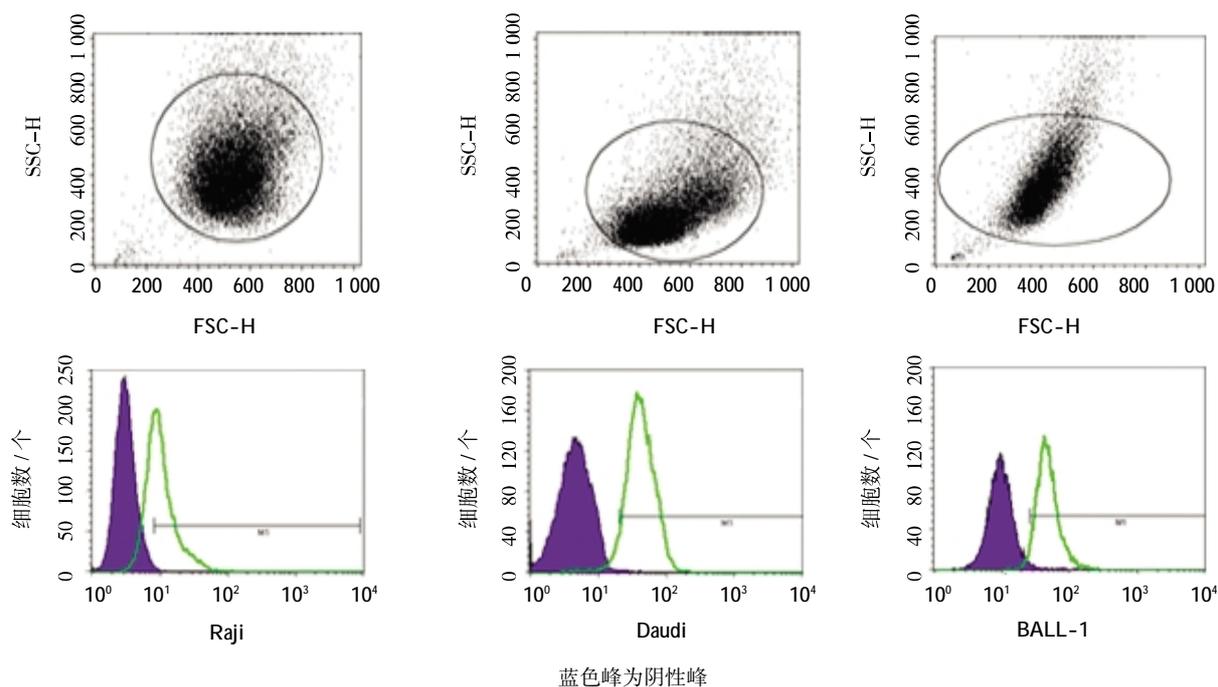


图 3 人 B 淋巴瘤细胞系 Raji、Daudi 及 BALL-1 细胞中 BAFF-R 表达阳性

3 讨论

BAFF 又称 BLys、THANK、TALL-1、TNFsF13B 及 zTNF4, 是 1999 年发现的 TNF 家族的 B 细胞激活因子, 作用于外周 B 淋巴细胞, 具有调节 B 淋巴细胞池的大小和功能, 促进 B 淋巴细胞的分化、增殖、抗原呈递及 Ig 转换和基因重组, 增强 B 细胞、CD4⁺T 淋巴细胞及 NK 细胞的功能的功能, 从而使机体的免疫应答增强^[3-4]。BAFF 胞外段存在长约 150 个氨基酸的保守结构域, 以 β 片层形式形成三聚体, 与受体结合, 通过结合 BAFF-R 发挥其生物学作用^[5-6]。

BAFF-R 作为 BAFF 受体之一, 表达于过度 T2 型 B 淋巴细胞及边缘区、滤泡成熟 B2 细胞群上的 I 型跨膜蛋白受体, 属于 TNF 受体超家族成员^[7]。B 淋巴瘤细胞的增殖转移受 BAFF 信号通路的调节, 而 BAFF-R 作为 BAFF 信号通路的上游关键信号分子, 在 B 淋巴瘤细胞的增殖中起重要的作用^[8-9]。研究显示, BAFF-R 不仅表达于成熟的 B 淋巴细胞, 而且见于 B 淋巴瘤细胞表面, 在刺激 B 淋巴瘤细胞增殖、避免 B 淋巴细胞凋亡等方面, 发挥极其重要的作用^[10-11]。

有实验表明, 特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 患儿血清中 BAFF 的表达和外周血单个核细胞中 BAFF mRNA 表达高于正常对照组, BAFF 可能参与 ITP 发病机制^[12]。B 细胞性非霍奇金淋巴瘤患者 BAFF 的基因和

蛋白表达水平高于健康对照组, 且与组织亚型有关, 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、小 B 细胞恶性淋巴瘤及滤泡性淋巴瘤中表达较高, 推测 BAFF 与 B 细胞非霍奇金淋巴瘤发生、发展密切相关^[13]。在儿童初发急性淋巴细胞白血病血浆中, BAFF 及其受体的基因和蛋白表达水平比健康对照组增高, 缓解期患儿比初发组下降, 推测 BAFF 及其受体与儿童急性淋巴细胞白血病发生、发展相关^[14]。陈娟等^[15]研究发现, BAFF-R 基因和蛋白表达于 MM 细胞中, BAFF-R 干预多发性骨髓瘤 KM3 细胞株后, 可促进 KM3 细胞增殖, 抑制凋亡, 推测 BAFF-R 对多发性骨髓瘤的发生、发展发挥一定作用。帅小博等^[16]研究结果证实以上观点, 且进一步发现 BAFF-R 定位在 KM3 细胞的细胞膜上; 重组人 BAFF 能够促进 BAFF-R 基因和蛋白的表达, 认为重组人 BAFF 对 BAFF-R 表达有重要的影响。

本研究选取 3 种人 B 淋巴瘤细胞系 Raji、Daudi 及 BALL-1, 通过 qRT-PCR、Western blot 检测及流式细胞术, 从基因到蛋白水平, 着重探讨 BAFF-R 在人 B 淋巴瘤细胞系 Raji、Daudi 及 BALL-1 中的表达水平。实验结果显示, Raji、Daudi 及 BALL-1 细胞系中 BAFF-R 均呈高表达, 提示 BAFF-R 与人 B 淋巴瘤细胞的生长、增殖关系密切, 为今后进一步研究 BAFF 信号通路在人 B 淋巴瘤细胞中具体机制做基础铺垫。

参 考 文 献:

- [1] LEVIT-ZERDOUN E, BECKER M, POHLMAYER R, et al. Survival of Iga-deficient mature B Cells requires BAFF-R function[J]. *Journal of Immunol*, 2016, 195(5): 2348-2360.
- [2] LIN W, SESHASAYEE D, LEE W P, et al. Dual B cell immunotherapy is superior to individual anti-CD20 depletion or BAFF blockade in murine models of spontaneous or accelerated lupus[J]. *Arthritis Rheumatology*, 2015, 67(1): 215-224.
- [3] ASSI L K, WONG S H, LUDWING A, et al. Tumor necrosis factor alpha activatas release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint[J]. *Arthritis Rheumatology*, 2007, 56(6): 1776-1786.
- [4] SUN J, LIN Z, FENG J, et al. BAFF-targeting therapy, a promising strategy for treating autoimmune diseases[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 597(1): 1-5.
- [5] XIAO Y, MOTOMURA S, PODACK E R. APRIL (TNFSF13) regulates collagen-induced arthritis, IL-17 production and Th2 response[J]. *European Journal of Immunology*, 2008, 38(12): 3450-3458.
- [6] SHAN X, CHEN L, CAO M, et al. Effects of human soluble BAFF synthesized in escherichia coli on CD4 (+) and CD8 (+) T lymphocytes as well as NK cells in mice[J]. *Physiological Research*, 2006, 55(3): 301-307.
- [7] ZHANG X, PARK C S, YOON S O, et al. BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors[J]. *International Immunology*, 2005, 17(6): 779-788.
- [8] LAI G N, SUTHERLAND A P R, NEWTON R, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells [J]. *The Journal of Immunology*, 2004, 173(2): 807-817.
- [9] SCHNEIDER P, MACKAY F, STEINER V, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1999, 189(11): 1747-1756.
- [10] RODIG S J, SHAHSAFAEI A, LI B, et al. BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders[J]. *Human Pathology*, 2005, 36(10): 1113-1119.
- [11] HE B, CHADBURN A, JOU E, et al. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL[J]. *The Journal of Immunology*, 2004, 173(5): 297-311.
- [12] 张军红, 徐西华. 特发性血小板减少性紫癜患儿血清 B 细胞激活因子变化的意义[J]. *实用儿科临床杂志*, 2010, 25(3): 195-197.
- [13] 浦江, 褚少朋, 王梅, 等. B 细胞活化因子及其特异性受体 BAFF-R 在 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤中的表达及其意义[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015, 35(11): 821-826.
- [14] 吴利辉, 孙宝兰, 徐美玉, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病中 BAFF、APRIL 及其受体的表达研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(7): 950-955.
- [15] 陈娟, 郭悦华, 鞠少卿, 等. 多发性骨髓瘤中 BAFF-R 表达及其对细胞存活影响的研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(3): 12-15.
- [16] 帅小博, 鞠少卿, 申娟娟, 等. 重组人 BAFF 对多发性骨髓瘤细胞 BAFF-R 表达调控的初步研究[J]. *南通大学学报(医学版)*, 2015, 35(1): 24-26.

(童颖丹 编辑)