



抗人 B 淋巴细胞单克隆抗体清除中国恒河猴体内 B 淋巴细胞效果观察

苏爱华, 丛喆, 王卫, 陈霆, 魏强

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 **目的** 用抗人 B 淋巴细胞单克隆抗体(利妥昔单抗注射液, Rituximab)通过静脉滴注的方法敲除中国恒河猴体内 B 淋巴细胞, 并观察其敲除效果, 为建立 B 淋巴细胞缺失的恒河猴动物模型提供基础的实验数据。**方法** 选取健康的中国恒河猴两只, 静脉滴注抗人 B 淋巴细胞单克隆抗体, 定期采集外周血、腹股沟淋巴结和十二指肠黏膜组织, 制备淋巴细胞悬液, 应用流式细胞术的方法系统性测定 B 淋巴细胞及 T 淋巴细胞亚群的变化。**结果** 静脉滴注利妥昔单抗注射液后 24 h, 中国恒河猴外周血中 B 淋巴细胞的缺失即能达到 100%, 持续约 14 d; 腹股沟淋巴结中 B 淋巴细胞在静注后 7 d 缺失 100%; 十二指肠黏膜组织中 B 淋巴细胞在静脉滴注后 7 d 缺失达到 90%, 维持 28 d。并且在成功敲除 B 淋巴细胞的情况下, CD4⁺ T 及 CD8⁺ T 淋巴细胞无明显波动, 维持在一个稳定的水平。**结论** 利妥昔单抗注射液能有效去除中国恒河猴体内 B 淋巴细胞, 为建立 B 淋巴细胞缺失动物模型奠定基础。

【关键词】 中国恒河猴; B 淋巴细胞; 利妥昔单抗

【中图分类号】 R33; R392 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)10-0006-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2012. 010. 002

B-Lymphocyte Depletion in Chinese Rhesus Macaques with Anti-Human B-Lymphocyte Monoclonal Antibody Rituximab

SU Ai-hua, CONG Zhe, WANG Wei, CHEN Ting, WEI Qiang

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of rituximab injection, an anti-human B-lymphocyte monoclonal antibody, on eliminating the B lymphocytes from Chinese origin rhesus macaques, and to provide some experimental data for establishing B-cell-depleted animals models and better define the role of B cells in the control of pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) replication in future studies. **Methods** Two healthy Chinese origin rhesus monkeys were selected and infused with rituximab via the tail vein by intravenous drip. Peripheral blood, lymph nodes and duodenum biopsy samples were collected at different time points after injection. Lymphocytes were isolated from all the samples, stained and analyzed by FACS. **Results** The B lymphocytes in peripheral blood of rhesus monkeys were completely

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2012ZX10004-501, 2012ZX10001-006-003)。

[作者简介] 苏爱华(1981-), 女, 硕士研究生, 比较医学专业。

[通讯作者] 魏强, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

depleted 24 hours after the rituximab infusion and lasted for 14 days, while 100% depletion in the inguinal lymph nodes and 90% depletion in the duodenal mucosa at 7 days after infusion. At the same time, CD4⁺ T and CD8⁺ T-cells in peripheral blood maintained at a stable level without significant fluctuation. **Conclusions** B lymphocytes can be effectively eliminated from various tissues in Chinese origin rhesus macaques by rituximab injection in vivo.

【Key words】 Chinese origin rhesus macaques; B lymphocytes; Rituximab

B 淋巴细胞是免疫系统的重要组成部分,不仅可以通过合成与分泌抗体介导体液免疫应答,还能分泌细胞因子参与免疫调节^[1]。B 淋巴细胞在抗 SIV/HIV 感染中也有一定的免疫保护作用,但因机体内影响因素众多,导致在研究其具体功能时受到了一定的干扰,所以应用 B 细胞敲除的方法反向研究 B 淋巴细胞在 SIV/HIV 感染中的作用,具有非常重要的意义。鉴于目前缺乏去除恒河猴体内 B 淋巴细胞的试剂,本研究拟通过一次性静脉滴注抗人 B 淋巴细胞单克隆抗体去除恒河猴 B 淋巴细胞,评估并测定中国恒河猴外周血、外周淋巴结及十二指肠肠黏膜组织中 B 淋巴细胞敲除效果及转归情况,为深入探讨 B 淋巴细胞 SIV/HIV 感染中的作用,与病毒的复制以及疾病进程的关系,提供基础实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康中国恒河猴 2 只,购自北京协尔鑫公司 [SCXK(京)2005-2005],体重 3.2 kg~3.5 kg。间接免疫荧光法 (IFA) 检测排除相关慢病毒——猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猴逆转录 D 型病毒 (SRV-1)、猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒 (STLV-1) 的感染。

1.2 试剂

1.2.1 利妥昔单抗注射液 (rituximab, 50 mg/kg): 商品名美罗华 (MabThera, Cat No. B6094), 是 Roche 公司生产的抗人 B 淋巴细胞单克隆抗体。

1.2.2 流式抗体: Percp anti-human CD3 (BD, Cat No. 552851), FITC anti-human CD4 (Biolegend, Cat No. 317408), PE anti-human CD8 (Biolegend, Cat No. 301008), APC anti-human CD20 (Biolegend, Cat No. 302310)。

1.3 给药方式

中国恒河猴 2 只, G1205 和 G1206, 按 50 mg/kg 剂量下肢静脉滴注利妥昔单抗注射液。静脉滴注过程中注意速度 (约 60 滴/min, 全部过程 (1~2) h 完成), 同时注意预防过敏等不良反应的发生。

1.4 组织细胞取材和预处理

1.4.1 外周血的采集: 静脉滴注前及静脉滴注后

1、4、7、10、14、18、21、25、28、42、56 d 采集实验猴 EDTA 抗凝血进行流式检测。

1.4.2 外周淋巴结采集及细胞分离: 静注前及静注后 7、14、21、28、42、56 d 采集腹股沟淋巴结。在生物安全柜中将淋巴结的包膜以及脂肪组织剔除, 冲洗干净、剪碎, 置于 70 μm 的尼龙细胞筛上轻轻研磨, 用含 5% 胎牛血清及 5% 双抗 (10 000 单位/mL 青霉素和 10 000 μg/mL 链霉素) 的 RPMI 1640 培养基冲洗。离心并收集细胞沉淀, 调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL。

1.4.3 肠道组织采集及细胞分离: 动物在行内窥镜前禁食 8 h~12 h, 给予复方氯胺酮注射液 (生理盐水 1:5 稀释后 0.1 mL/kg) 肌内注射麻醉, 然后使用 Olympus 内窥镜 (型号 GIF-160) 及配套设备, 在十二指肠降段取 4~6 块活检组织^[2]。将新鲜肠道组织置于 70 μm 的尼龙细胞筛上轻轻研磨, 并用含 5% 胎牛血清以及 5% 双抗的 RPMI 1640 培养基冲洗。离心并收集细胞沉淀, 调整浓度至 1×10^6 个/mL。

1.5 流式抗体检测

将 EDTA 抗凝血和新鲜制备的淋巴细胞进行流式抗体检测。分别取 50 μL 的 EDTA 抗凝血或淋巴细胞悬液 (10^6 个/50 μL), 依次加入流式抗体—CD3 (percp)、CD8 (PE)、CD4 (FITC) 和 CD20 (APC)。室温避光作用 15 min 后 (全血检测管需另加入终浓度 10% 的红细胞裂解液, 4℃ 作用 10 min), 重悬于 pH 7.2 PBS 中, FACS 仪上分类计数^[3]。

1.6 统计学方法

使用 Flowjo version 7.6 进行流式数据分析, 作图及统计分析由 Graphpad Prism 5 完成。

2 结果

2.1 静脉滴注利妥昔单抗注射液后外周血中 B 淋巴细胞及 T 淋巴细胞亚群的变化

静脉滴注利妥昔单抗注射液作用 24 h 后, 恒河猴 G1205 和 G1206 外周血中 B 淋巴细胞的百分比即从正常的 50% 左右降低到 0%, 绝对数也从第 0 天的 240 cells/μL 降到了 0, 去除率达到 100%, 去除时间维持约 14 d。28 d 时 B 淋巴细胞的百分比

恢复到 4 ~ 8% 左右,绝对数也逐渐恢复到 10 ~ 30 cells / μ L。到 56 d 时,已接近实验前的水平(图 1A, B)。在 B 淋巴细胞成功去除的同时,CD4⁺ T 及 CD8⁺ T 淋巴细胞波动平稳,CD4⁺ T 淋巴细胞的波动范围在 60 ~ 70% 之间,CD8⁺ T 淋巴细胞的波动范围在 20 ~ 40% 之间(图 1C, D)。

2.2 静脉滴注利妥昔单抗注射液后腹股沟淋巴结中 B 淋巴细胞及 T 淋巴细胞亚群的变化

实验前,G1205 和 G1206 两只恒河猴腹股沟淋

巴结中 B 淋巴细胞比例为 20% ~ 30%,利妥昔单抗注射液静脉滴注后 7 d,B 淋巴细胞比例为 0%,去除率达到 100%,到第 21 天之前,B 淋巴细胞升高幅度很小,恢复到 3% 左右。到第 28 天时,B 淋巴细胞比例较前明显上升,56 d 时,G1206 号猴 B 淋巴细胞恢复接近正常值,G1205 号猴恢复到 15% 左右(图 2A)。

在静注利妥昔单抗注射液之前 G1205 和 G1206 两只恒河猴的腹股沟淋巴结中的 CD4⁺ T 淋巴细

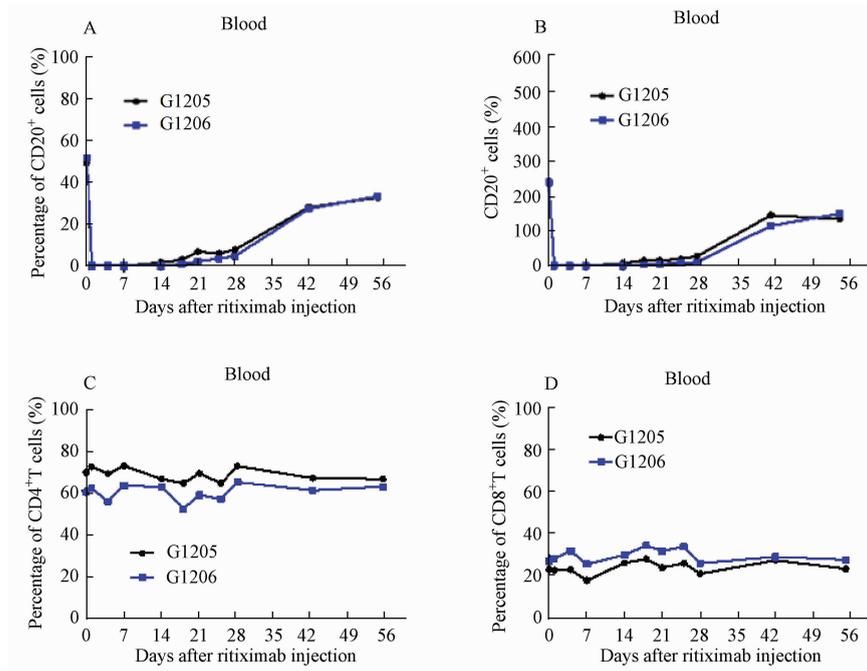


图 1 静脉滴注利妥昔单抗注射液后外周血中 B 淋巴细胞及 T 淋巴细胞亚群的变化
注:A: CD20⁺ 细胞的百分比; B: CD20⁺ 细胞的绝对数; C: CD4⁺ T 细胞的百分比;
D: CD8⁺ T 细胞的百分比

Fig. 1 Changes of the concentrations of B- and T-cell subsets in peripheral blood after intravenous injection of Rituximab

Note: A: The percentage of CD20⁺ cells; B: The absolute numbers of CD20⁺ cells;
C: The percentage of CD4⁺ T-cells; D: The percentage of CD8⁺ T-cells

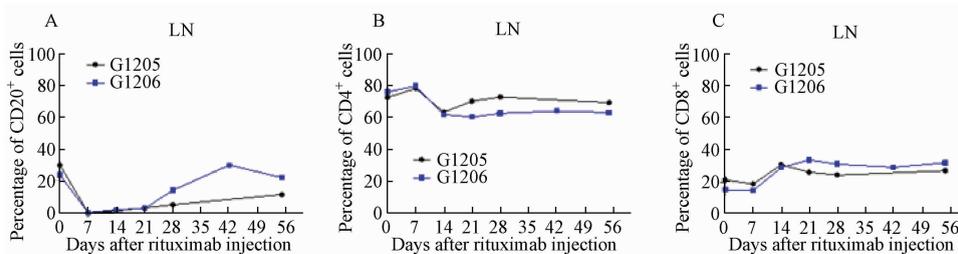


图 2 静脉滴注利妥昔单抗注射液后腹股沟淋巴结中 B 淋巴细胞及 T 淋巴细胞亚群的变化
注: A: CD20⁺ 细胞的百分比; B: CD4⁺ T 细胞的百分比; C: CD8⁺ T 细胞的百分比; LN: 淋巴结

Fig. 2 Percentage of B- and T-cell subsets in the inguinal lymph nodes after intravenous injection of Rituximab

Note: A: The percentage of CD20⁺ cells; B: The percentage of CD4⁺ T-cells; C: The percentage of CD8⁺ T-cells. LN:inguinal lymph nodes

约 75% 左右,静脉滴注后第 14 天时稍有下降,约降低到 60% 左右,随后的两个月内都较平稳,并一直维持在 60% ~ 70% 之间;其 CD8⁺ T 淋巴细胞在静脉滴注利妥昔单抗注射液之后的第 14 天时由第 0 天的 15 ~ 20% 上升到了 30% 左右,之后的两个月内 CD8⁺ T 淋巴细胞的水平维持在 25% ~ 35% 之间(图 2B, C)。

2.3 静脉滴注利妥昔单抗注射液后十二指肠黏膜固有层中 B 淋巴细胞及 T 淋巴细胞亚群的变化

两只实验猴在实验前十二指肠黏膜固有层中 B 淋巴细胞比例约为 5% ~ 10%。静脉滴注利妥昔单抗注射液后 7 d,降低到 1.0% ~ 1.5%,去除率约 80% ~ 90%。恒河猴 G1205 一直维持这种状态至观察结束的 56 d,G1206 维持到 28 d,随后升高,42 d 时达到 30%,56 d 时下降到 20%(图 3A)。

十二指肠黏膜固有层中的 CD4⁺ T 细胞只在第 14 天时由第 7 天的 15% 上升到 29% ~ 36% 之间,其余时间点的 CD4⁺ T 细胞的水平未见明显波动,均维持在 10% ~ 20% 之间,其 CD8⁺ T 细胞的水平与 CD4⁺ T 细胞相反,在第 14 天时,两只恒河猴的 CD8⁺ T 细胞均有所下降,到第 21 天时,其 CD8⁺ T 细胞上升到 60% ~ 70% 之间(图 3B, C)。

3 讨论

B 淋巴细胞是免疫系统的重要组成部分,不仅可以通过合成与分泌抗体介导体液免疫应答,还能通过分泌细胞因子参与免疫调节^[1]。以往研究表明,与正常 HIV-1 感染者相比,B 淋巴细胞缺失患者的病毒载量要高 2 个数量级 (1.7 log₁₀)^[5]。Miller 等人也在实验中发现,敲除了 B 淋巴细胞的恒河猴

与正常感染 SIV 的恒河猴相比较,不仅能使病毒载量升高,而且发展成为 AIDS 的时间也会缩短^[6]。这些都充分说明,B 淋巴细胞在控制 SIV/HIV 病毒感染中发挥着重要的作用。但因机体内影响因素众多,导致在研究其具体功能时受到了一定的干扰。国外近几年已经开始利用利妥昔单抗开展 AIDS 的研究工作,目的在于利用 B 淋巴细胞缺失的动物模型,反向研究在 B 淋巴细胞缺失的情况下,SIV/HIV 感染时机体免疫水平和病毒水平的变化,从而间接地了解 B 淋巴细胞的功能。目前这项工作在国内基础研究领域还是空白。

本研究使用抗人 B 淋巴细胞单克隆抗体(利妥昔单抗注射液),通过静脉滴注的方式,观察一次性给药后中国恒河猴外周血及淋巴组织 B 淋巴细胞敲除情况。在长达两个月的观察期内,系统测定了外周血、外周淋巴结及肠黏膜固有层中 B 淋巴细胞的比例变化情况。结果表明,利妥昔单抗能够降低甚至完全去除恒河猴血液、腹股沟淋巴结中的 B 淋巴细胞,其外周血和淋巴结中的 B 淋巴细胞的去除率达到 100%。十二指肠肠黏膜固有层中 B 细胞的去除率也能达到 80% 以上,且能持续 28 d 甚至更长时间,这个结果显示 B 细胞在十二指肠黏膜中的清除时间比外周血和淋巴结中的清除时间都更持久。这一结果与 Gaufin 等人的研究基本相同^[7]。不同的是,近几年国外在开展此项研究时,基本上是采取连续给药的方式。Gaufin 在对非洲绿猴进行 B 淋巴细胞敲除时,就采取每 21 d 静注 Rituximab 一次的方案,直到 SIV_{agm} 感染后的第 184 天^[7]。本研究没有使用上述方法,只是进行了单次滴注,主要是为了了解中国恒河猴在静脉滴注妥昔单抗注射液

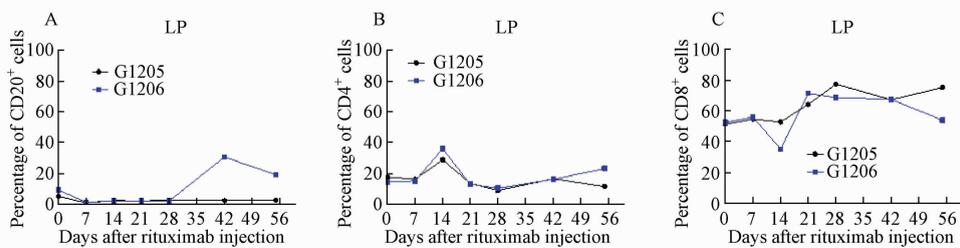


图 3 静脉滴注利妥昔单抗注射液后十二指肠黏膜固有层中 B 淋巴细胞及 T 淋巴细胞亚群的变化
注: A: CD20⁺ 细胞的百分比; B: CD4⁺ T 细胞的百分比; C: CD8⁺ T 细胞的百分比; LP: 指肠黏膜固有层

Fig. 3 Changes of the percentages of B- and T-cell subsets in the duodenal biopsy specimens after intravenous injection of rituximab

Note: A: The percentage of CD20⁺ cells; B: The percentage of CD4⁺ T cells; C: The percentage of CD8⁺ T cells; LP: Duodenal biopsy specimens

后各个组织中 B 淋巴细胞的去除效果及转归规律,得到第一手的基础数据,为今后深入开展 B 淋巴细胞功能研究提供依据,以便根据具体的研究目的制订相应的实验方案。

在静脉注射利妥昔单抗注射液之前,我们分别检测了血液,腹股沟淋巴结以及十二指肠黏膜组织中的 B 细胞和 T 细胞亚群的变化,各组织中 CD20⁺ B 淋巴细胞的百分比均与之前文献报道的一致^[7]。血液和淋巴结中,CD4⁺T 淋巴细胞在 60% ~ 80% 之间,CD8⁺T 淋巴细胞在 20 ~ 40% 之间;而在十二指肠黏膜固有层中 CD4⁺T 淋巴细胞的比例却只有 15% ~ 40%,CD8⁺T 淋巴细胞比例的波动范围较大,在 35% ~ 70% 之间。肠黏膜固有层中 CD4⁺T 淋巴细胞的比例与血液和淋巴结相比较含量最低,这一结果与本实验室长期研究的结果相符合^[3]。但总的来说,在成功去除 B 淋巴细胞的情况下,T 淋巴细胞变化较平稳,保持了体内的基本稳定状态,在比例上没有过多受 B 淋巴细胞去除的影响。也有研究表明,在小鼠体内敲除 B 淋巴细胞后,经逆转录病毒感染后并未出现表型和功能异常的 T 细胞,这就保证了在 B 淋巴细胞去除的情况下,CD4⁺T 及 CD8⁺T 淋巴细胞能维持相对稳定的功能。这一结果对我们研究 B 淋巴细胞的功能方面是有益处的。

总之,无论是血液,淋巴结还是十二指肠黏膜固有层,抗人 B 淋巴细胞单克隆抗体(利妥昔单抗注射液)均能有效去除恒河猴体内 B 淋巴细胞,并

且在成功敲除 B 淋巴细胞的情况下,CD4⁺T 及 CD8⁺T 淋巴细胞无明显波动,维持在一个稳定的水平。

参考文献:

- [1] 何维. 医学免疫学(第 2 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社. 2010: 322 - 327.
- [2] 刘颖, 朱华, 丛喆, 等. SHIV 感染恒河猴十二指肠黏膜活组织病理学观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(3): 18 - 31.
- [3] 熊竞, 刘克剑, 吴芳新, 等. 健康中国恒河猴各淋巴组织中 T 淋巴细胞表型及分布 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(2): 86 - 91.
- [4] Tasca S, Zhuang K, Gettie A, et al. Effect of B-cell depletion on coreceptor switching in R5 simian-human immunodeficiency virus infection of rhesus macaques [J]. J Virol, 2011, 85(7): 3086 - 3094.
- [5] Huang KH, Bonsall D, Katzourakis A, et al. B-cell depletion reveals a role for antibodies in the control of chronic HIV-1 infection [J]. Nat Commun. 2010, 1: 102. doi: 10.1038/ncomms1143.
- [6] Miller CJ, Genescà M, Abel K, et al. Antiviral antibodies are necessary for control of simian immunodeficiency virus replication [J]. J Virol, 2007, 81(10): 5024 - 5035.
- [7] Gaufin T, Pattison M, Gautam R, et al. Effect of B-cell depletion on viral replication and clinical outcome of simian immunodeficiency virus infection in a natural host. J Virol, 2009, 83(20): 10347 - 10357.

[修回日期]2012-09-25