Open Access
DOI:10.3724/zdxbyxb-2025-0646

风湿病&自身免疫病

·专题报道·

B细胞内源性拟素化可调控小鼠免疫反应

金　鑫[1]，竺露瑶[2]，章力之[2]，陈天杭[1]，周明倩[1]

1. 浙江中医药大学基础医学院，浙江 杭州 310053
2. 浙江中医药大学生命科学学院，浙江 杭州 310053

［摘　要］ **目的**：探究拟素化在B细胞介导免疫应答中的调控作用。**方法**：利用Cre-LoxP系统构建B细胞特异性*Ube2m*基因敲除的$CD19^{cre/+}Ube2m^{fl/fl}$小鼠，以同窝出生的$Ube2m^{fl/fl}$小鼠作为正常对照。分别采用非胸腺依赖性抗原4-羟基-3-硝基苯乙酰基（NP）-脂多糖（LPS）、2，4-二硝基苯基（DNP）-Ficoll和胸腺依赖性抗原NP-鸡丙种球蛋白（CGG）、DNP-匙孔血蓝蛋白（KLH）免疫接种小鼠，采用酶联免疫吸附试验检测血清中各类特异性抗体水平，并对NP-LPS和NP-CGG免疫接种的小鼠通过流式细胞术检测脾脏生发中心B淋巴细胞、脾脏浆细胞、骨髓浆细胞比例，结合统计学分析评估各组免疫应答差异。**结果**：与对照组比较，*Ube2m*敲除小鼠在接受NP-LPS免疫后，抗NP免疫球蛋白（Ig）G2a、IgG2b、IgG2c、IgG3抗体水平均降低（均$P<0.05$）；DNP-Ficoll免疫后，抗DNP各类IgG抗体水平均降低（均$P<0.05$），IgM水平无显著改变。NP-LPS免疫后脾脏总生发中心B淋巴细胞和骨髓总浆细胞及NP特异性浆细胞比例均减小（均$P<0.01$）。与对照组比较，*Ube2m*敲除小鼠在接受NP-CGG或DNP-KLH免疫后，抗NP或抗DNP IgM和各类IgG抗体水平均降低（均$P<0.05$），且不同抗原诱导下抗体下降时间和幅度存在差异。NP-CGG免疫后脾脏总浆细胞及NP特异性浆细胞、NP特异性生发中心B淋巴细胞比例均减小（均$P<0.01$）。**结论**：B细胞内源性拟素化缺失会广泛损害小鼠对非胸腺依赖性抗原和胸腺依赖性抗原的免疫应答，且其调控作用具有抗原依赖性。

［关键词］ 拟素化；Ube2m；B淋巴细胞；胸腺依赖性抗原；非胸腺依赖性抗原；小鼠
［中图分类号］ R392.12　［文献标志码］ A

Endogenous neddylation in B cells regulates immune responses

收稿日期（Received）：2025-08-20　修改返回日期（Revised）：2025-09-22　接受日期（Accepted）：2025-12-12　网络预发表日期（Online）：2025-12-30
基金项目（Funding）：浙江省自然科学基金（LQ23H270005）；浙江中医药大学校级科研项目（2021RCZXZK12）；浙江中医药大学研究生科学研究基金（2024YKJ13）
第一作者（First author）：金　鑫，硕士研究生，主要从事免疫学研究，E-mail：zyyjinxin@163.com；ORCID：0009-0007-0119-378X
通信作者（Corresponding author）：周明倩，助理研究员，主要从事免疫学研究，E-mail：zhoumingqian@zcmu.edu.cn；ORCID：0000-0002-1232-0912

in mice

JIN Xin[1], ZHU Luyao[2], ZHANG Lizhi[2], CHEN Tianhang[1], ZHOU Mingqian[1] (*1. College of Basic Medical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. School of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China*)
Corresponding author: ZHOU Mingqian, E-mail: zhoumingqian@zcmu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-1232-0912

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the regulatory role of endogenous neddylation in B cell-mediated immune responses. **Methods**: B cell-specific *Ube2m* knockout mice ($CD19^{cre/+}Ube2m^{fl/fl}$) were generated using the Cre-LoxP system, with littermate $Ube2m^{fl/fl}$ mice serving as normal controls. Mice were immunized with thymus-independent antigens 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP)-lipopoly saccharide (LPS) and 2,4-dinitrophenyl (DNP)-Ficoll, as well as thymus-dependent antigens NP-chicken gamma globulin (CGG) and DNP-keyhole limpet hemocyanin (KLH). Serum levels of specific antibodies were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Flow cytometry was used to determine the proportions of splenic germinal center B cells, splenic plasma cells, and bone marrow plasma cells in mice immunized with NP-LPS or NP-CGG. Statistical analyses were performed to assess differences in immune responses among the groups. **Results**: Compared with controls, *Ube2m*-deficient mice showed significantly lower levels of anti-NP immunoglobulin (Ig)G2a, IgG2b, IgG2c, and IgG3 after NP-LPS immunization, and reduced levels of all anti-DNP IgG subclasses after DNP-Ficoll immunization (all $P<0.05$), with no significant change in IgM levels. The proportions of total splenic germinal center B cells, total bone marrow plasma cells, and NP-specific plasma cells were also significantly decreased after NP-LPS immunization (all $P<0.01$). Following immunization with NP-CGG or DNP-KLH, *Ube2m* knockout mice exhibited reduced levels of anti-NP or anti-DNP IgM and all IgG subclasses (all $P<0.05$), with antigen-dependent differences in the timing and extent of antibody reduction. After NP-CGG immunization, the proportions of total splenic plasma cells, NP-specific plasma cells, and NP-specific germinal center B cells were markedly decreased (all $P<0.01$). **Conclusion**: Endogenous neddylation deficiency in B cells broadly impairs immune responses to both thymus-independent and thymus-dependent antigens in mice, and its regulatory effects are antigen-dependent.

[**Key words**] Neddylation; Ube2m; B lymphocyte; Thymus dependent antigen; Thymus independent antigen; Mice

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2026, 55(4): 321-331.]

[**缩略语**] 辅助性T细胞(helper T cell,Th细胞);分化抗原(cluster of differentiation,CD);2,4-二硝基苯基(2,4-dinitrophenyl,DNP);卵清蛋白(ovalbumin,OVA);匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin,KLH);4-羟基-3-硝基苯乙酰基(4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl,NP);鸡丙种球蛋白(chicken gamma globulin,CGG);脂多糖(lipopolysaccharide,LPS);牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA);藻红蛋白(phycoerythrin,PE);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP);免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig);酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA）；四甲基联苯胺（tetramethylbenzidine，TMB）；异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）；磷酸盐缓冲液（phosphate buffered solution，PBS）；BCL-2相互作用细胞死亡中介蛋白（BCL-2 interacting mediator of cell death，BIM）

拟素化是由NEDD8激活酶、NEDD8结合酶（Ube2m或Ube2f）和NEDD8连接酶组成的三步酶级联催化的蛋白质翻译后修饰，其特征是将NEDD8蛋白共价连接到底物的赖氨酸残基上，能够增强Cullin-RING泛素连接酶活性，促进其介导泛素转移，从而高效催化目标蛋白的泛素化修饰[1]。拟素化通过调控底物蛋白的稳定性、亚细胞定位及生物学功能广泛参与细胞增殖、细胞自噬、能量代谢、免疫稳态维持等重要生理过程，在肿瘤发生发展、炎症反应、自身免疫病等病理过程中发挥调控作用[2-8]。

B淋巴细胞（以下简称B细胞）是适应性免疫应答的关键组成部分[9]。B细胞通过B细胞受体特异性识别抗原，与抗原结合后启动下游信号通路，进而得到活化；活化的B细胞迁移至淋巴滤泡，在生发中心经历突变和扩增，最终分化为浆细胞，产生特异性抗体，进入体液，发挥免疫效应[10]。目前，拟素化在B细胞介导的免疫应答中的调控作用仍未被阐明。B细胞介导的免疫应答依据抗原的不同可分为对胸腺依赖性抗原的免疫应答和对非胸腺依赖性抗原的免疫应答。其中，胸腺依赖性抗原多为蛋白质类抗原，B细胞需通过B细胞受体结合抗原后提呈给Th细胞，同时依赖Th细胞表面CD40配体与B细胞CD40相互作用及Th细胞分泌的细胞因子（如IL-21），才能驱动B细胞充分活化、发生抗体类别转换和亲和力成熟；而非胸腺依赖性抗原主要包括细菌脂多糖等，可通过交联B细胞表面B细胞受体或结合B细胞Toll样受体直接激活B细胞[11]。本研究利用Cre-LoxP系统构建了B细胞特异性*Ube2m*基因敲除小鼠，通过胸腺依赖性抗原和非胸腺依赖性抗原免疫策略，探究拟素化在B细胞免疫应答中的调控作用。

1　材料与方法

1.1　实验动物

Ube2m$^{fl/fl}$小鼠由浙江大学医学院孙毅教授提供。*CD19*$^{cre/+}$小鼠购自上海南方模式生物科技股份有限公司。将*CD19*$^{cre/+}$小鼠与*Ube2m*$^{fl/fl}$小鼠交配，获得在B细胞中特异性敲除*Ube2m*基因的子代小鼠*CD19*$^{cre/+}$*Ube2m*$^{fl/fl}$（以下称为敲除组），同窝出生的*Ube2m*$^{fl/fl}$小鼠作为对照组。所有动物饲养于浙江中医药大学实验动物中心，使用许可证号SYXK（浙）2013-0184，环境温度20~24 ℃，湿度40%~70%，通风（10~15次/h空气交换率）。

1.2　主要试剂和仪器

DNP-OVA（D-5051-10）、DNP-KLH（D-5060-5）、DNP-Ficoll（F-1200-10）、NP-CGG Ratio 20-29（N-5055C-5）和NP-LPS（N-5065-5）为美国LGC Biosearch Technologies公司产品；NP-BSA（Ratio 1-9）（DAGB493）、NP-BSA（Ratio>20）（DAGB491）和NP-PE（DAGB511，稀释比例1∶200~1∶400）为美国Creative Diagnostics公司产品；铝佐剂（C5084）为中国北京博奥森生物技术有限公司产品；HRP标记抗小鼠IgM抗体（SA00012-6）为中国武汉三鹰生物技术有限公司产品；HRP标记抗小鼠IgG1抗体（ab97240）、HRP标记抗小鼠IgG2a抗体（ab97245）、HRP标记抗小鼠IgG2b抗体（ab97250）、HRP标记抗小鼠IgG2c抗体（ab97255）和HRP标记抗小鼠IgG3抗体（ab97260）为美国Abcam公司产品；ELISA包被液（R40024-500 mL）为中国上海源叶生物科技有限公司产品；TMB显色液（P0209-500ml）为中国上海碧云天生物技术有限公司产品；ELISA终止液（abs9472）为中国上海爱必信生物科技有限公司产品；抗小鼠B220（103236）、抗小鼠CD138（142518）和抗小鼠GL7（144620）为美国Biolegend公司产品；Fixable Viability Dye（65-0865-14）为美国eBioscience公司产品；B220-FITC（103205）、B220-PE/Cyanine5.5（103235）、CD138-BV650（142517）、CD138-BV421（142507）和GL7-PE/Cyanine5.5（144619）为美国BioLegend公司产品。

流式细胞仪（CytoFlex S）为美国Beckman Coulter公司产品；全自动酶标仪（ELX800）为美国BioTek公司产品。

1.3　制备小鼠免疫模型及收集血清

将NP-LPS、DNP-Ficoll、NP-CGG和DNP-KLH分别与铝佐剂按1∶1比例混合，充分振荡乳化后，经腹腔注射免疫小鼠（每只100 μg），每组5只，共

40只。每7天通过小鼠眼眶后血管丛取血法采集血液标本,室温静置30 min,待血液凝结后,于4 ℃ 1000×*g*离心15 min,收集上层血清,于−80 ℃保存备用。至实验规定时间点处死小鼠。

1.4 ELISA法检测小鼠特异性抗体水平

用包被液分别将包被抗原NP-BSA(Ratio 1-9)(NP高亲和力抗原)、NP-BSA(Ratio>20)(NP低亲和力抗原)、DNP-OVA稀释至每孔1 μg/100 μL,4 ℃过夜孵育;用洗涤液将反应板充分洗涤三次后,每孔加入200 μL封闭液,室温孵育2 h;同前洗板;每孔加入100 μL稀释后的待测血清标本(血清稀释比例见表1),室温孵育1 h;每孔加入100 μL HRP标记的抗小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgM酶标抗体工作液(1∶10 000稀释),室温孵育1 h;同前洗板五次;每孔加入100 μL TMB显色液,室温避光反应15 min;每孔加入100 μL终止液,通过酶标仪在波长450 nm下测量各孔的吸光度值。参考文献[12],采用相对吸光度值进行比较。

1.5 流式细胞术检测小鼠B细胞数和浆细胞数

根据小鼠血清学检测结果(血清Ig抗体明显降低时)解剖并分别获取小鼠脾脏和股骨。将腹腔注射NP-LPS和NP-CGG的小鼠脾脏置于含RPMI 1640培养基的培养皿中,使用无菌注射器芯轻轻研磨,经40 μm细胞过滤器过滤,收集滤液。对于股骨,采用无菌注射器吸取5 mL RPMI 1640培养基轻柔冲洗骨髓腔2~3次,收集细胞悬液后同样经40 μm过滤器过滤。将两种滤液分别置于15 mL离心管中,300×*g*离心5 min,弃上清液。每管加入1 mL红细胞裂解液重悬细胞,吹打30 s,再加入3 mL培养基终止裂解,300×*g*离心5 min,弃上清液,该过程重复两次。最后,分别使用PBS重悬细胞并计数。

将细胞浓度调整至1×10^7/mL,分别取200 μL单细胞悬液加入流式管中,并加入相应抗体:浆细胞加入B220(0.7 μL/管)、CD138(1 μL/管)、NP-PE(1 μL/管);生发中心B细胞加入B220(0.7 μL/管)、GL7(1 μL/管)、NP-PE(1 μL/管)。涡旋混匀后,于冰上避光孵育30 min;加入2 mL PBS重悬细胞,300×*g*离心5 min,弃上清液,重复两次。用1 mL PBS重悬细胞,使用流式细胞仪检测。

1.6 统计学方法

采用GraphPad Prism软件进行统计分析。正态分布的计量数据采用均数±标准误($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)表示。组间比较采用双因素方差分析;若方差分析结果显著,则采用Tukey事后检验进行组间差异比较,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 B细胞内源性拟素化缺失抑制NP-LPS免疫后IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3抗体分泌

与免疫前比较,对照组和敲除组在免疫后第7天血清抗NP IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3抗体水平升高,并在第14天和第21天达到高峰,表明免疫接种成功。与对照组比较,敲除组高亲和力及低亲和力抗NP IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3抗体从第7天和第14天开始均降低或有降低趋势,应答水平较弱,仅为对照组的10%~20%,其中IgG2a和IgG2c水平与免疫前无显著差异。而抗NP IgG1抗体水平NP高亲和力抗原敲除组降低($P<0.05$),为相应对照组的30%~50%;NP低亲和力抗原敲除组无显著差异。抗NP IgM抗体水平未受明显影响。见图1。结果提示,B细胞内源性拟素化缺失主要损害NP-LPS免疫后IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3抗体分泌。

与对照组比较,敲除组脾脏总生发中心B细胞比例减小($P<0.01$),而NP特异性生发中心B细胞比例差异无统计学意义($P>0.05$);

表1 Ig抗体在多种抗原包被后对应的血清稀释比例

Table 1 Serum dilution ratios for detection of Ig antibodies with different coating antigens

注射药物	包被抗原	Ig抗体检测对应的血清稀释比例					
		IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG2c	IgG3	IgM
NP-LPS	NP-BSA(Ratio 1-9)	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶1000
	NP-BSA(Ratio>20)	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶1000
DNP-Ficoll	DNP-OVA	1∶250	1∶100	1∶500	1∶500	1∶250	1∶100
NP-CGG	NP-BSA(Ratio 1-9)	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶1000
	NP-BSA(Ratio>20)	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶20 000	1∶1000
DNP-KLH	DNP-OVA	1∶1000	1∶1000	1∶1000	1∶1000	1∶1000	1∶100

Ig:免疫球蛋白;NP:4-羟基-3-硝基苯乙酰基;LPS:脂多糖;DNP:2,4-二硝基苯基;CGG:鸡丙种球蛋白;KLH:匙孔血蓝蛋白;BSA:牛血清白蛋白;OVA:卵清蛋白.

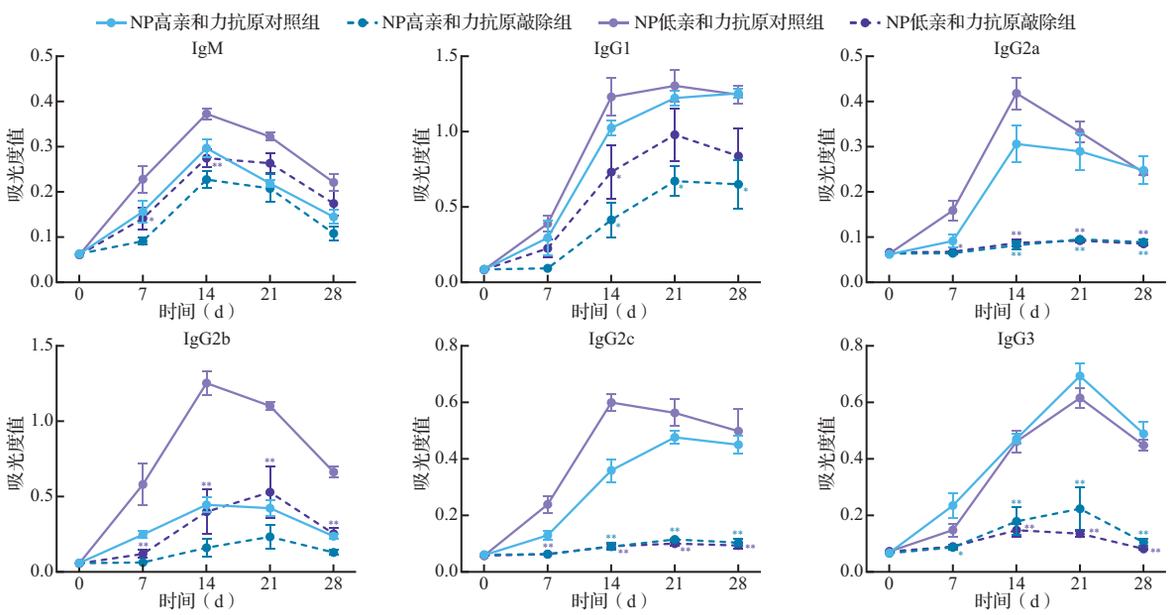
敲除组骨髓总浆细胞、NP特异性浆细胞比例均减小（均P<0.01），而脾脏总浆细胞、NP特异性浆细胞比例差异无统计学意义（均P>0.05），见图2和表2。提示B细胞内源性拟素化缺失可能通过影响B细胞分化损害小鼠对NP-LPS的抗体应答。

2.2　B细胞内源性拟素化缺失抑制DNP-Ficoll免疫后各类IgG抗体分泌

对照组和敲除组在免疫后第7天血清中抗DNP IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3抗体水平均升高，表明免疫接种成功。与对照组比较，敲除组血清中抗DNP IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3抗体水平降低（均P<0.05），仅为对照组的30%~50%；而IgM抗体水平差异无统计学意义（P>0.05）。见图3。提示B细胞内源性拟素化缺失主要损害DNP-Ficoll免疫后各类IgG抗体分泌，但不影响IgM抗体产生。

2.3　B细胞内源性拟素化缺失抑制NP-CGG免疫后IgM及各类IgG抗体分泌

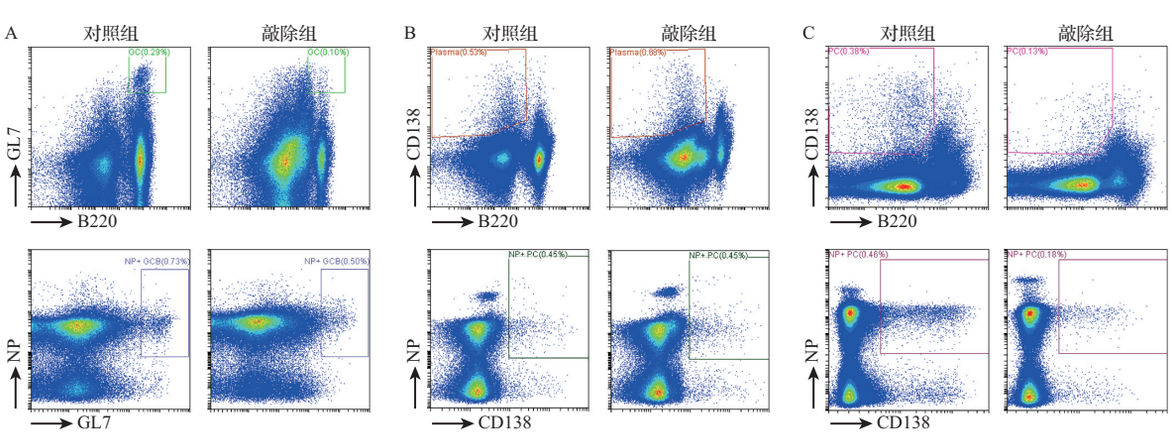
与免疫前比较，对照组和敲除组在免疫后第7天血清抗NP IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3抗体水平开始升高，其中IgM抗体水平在第14天达到高峰，IgG类抗体水平在第21天达到高



与相应对照组比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01. NP：4-羟基-3-硝基苯乙酰基；LPS：脂多糖；Ig：免疫球蛋白.

图1　NP-LPS免疫后各组血清NP特异性抗体水平变化

Figure 1　Serum levels of NP-specific antibodies in NP-LPS immunized mice



A：脾脏生发中心B细胞（GCB）和NP特异性生发中心B细胞比例；B：脾脏浆细胞（PC）和NP特异性浆细胞比例；C：骨髓浆细胞和NP特异性浆细胞比例. NP：4-羟基-3-硝基苯乙酰基；LPS：脂多糖；CD：分化抗原.

图2　NP-LPS免疫后两组B细胞亚群流式细胞术检测结果

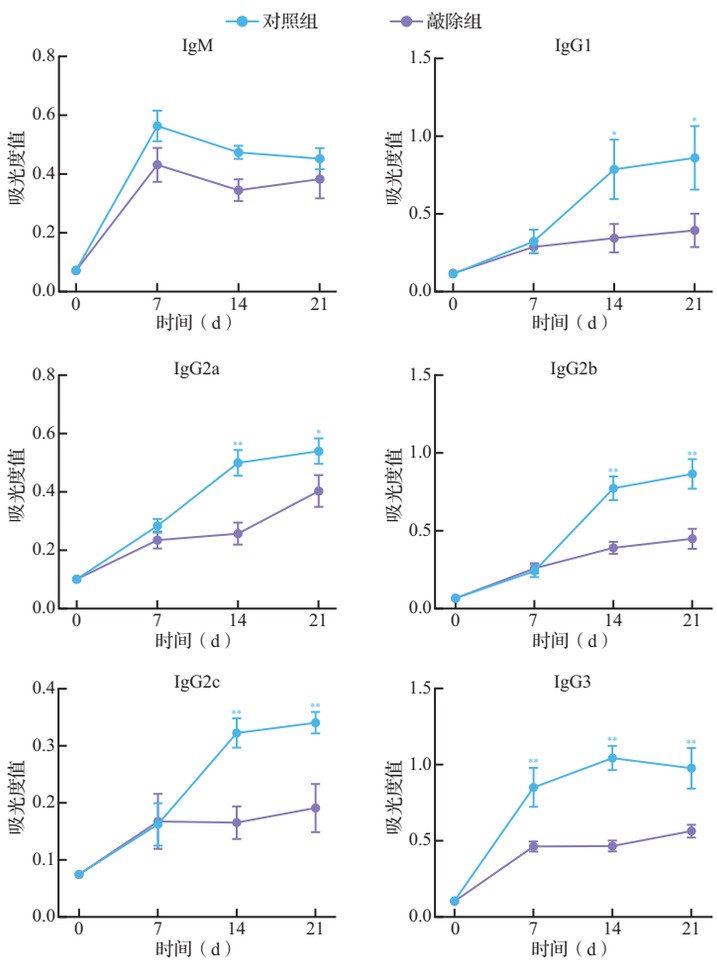
Figure 2　Proportions of B cell subsets in NP-LPS immunized mice

表2　NP-LPS免疫后两组B细胞亚群比例比较
Table 2　Proportions of B cell subsets in NP-LPS immunized mice

($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$, n=5)

组　别	脾　脏				骨　髓	
	GCB	NP^+ GCB	浆细胞	NP^+浆细胞	浆细胞	NP^+浆细胞
对照组	0.327±0.068	0.877±0.460	0.485±0.239	0.665±0.190	0.307±0.127	0.340±0.139
敲除组	0.180±0.056**	1.042±0.386	0.512±0.166	0.657±0.171	0.127±0.045**	0.145±0.033**

与对照组比较，**P<0.01. NP：4-羟基-3-硝基苯乙酰基；LPS：脂多糖；GCB：生发中心B细胞；NP^+：NP特异性.



与对照组比较，*P<0.05，**P<0.01. DNP：2，4-二硝基苯基；Ig：免疫球蛋白.

图3　DNP-Ficoll免疫后两组血清DNP特异性抗体水平变化
Figure 3　Serum levels of DNP-specific antibodies in DNP-Ficoll immunized mice

峰，表明免疫接种成功。与对照组比较，敲除组高亲和力及低亲和力抗NP IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3抗体水平均降低(均P<0.01)，且应答水平较弱，仅为对照组的10%~20%。此外，尽管敲除组高亲和力及低亲和力抗NP IgM和IgG1抗体较免疫前升高，但仍低于对照组相应抗体水平(均P<0.05)，为对照组的50%(图4)。提示B细胞内源性拟素化缺失显著损害NP-CGG免疫后IgM及各类IgG抗体分泌，尤其是IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3。

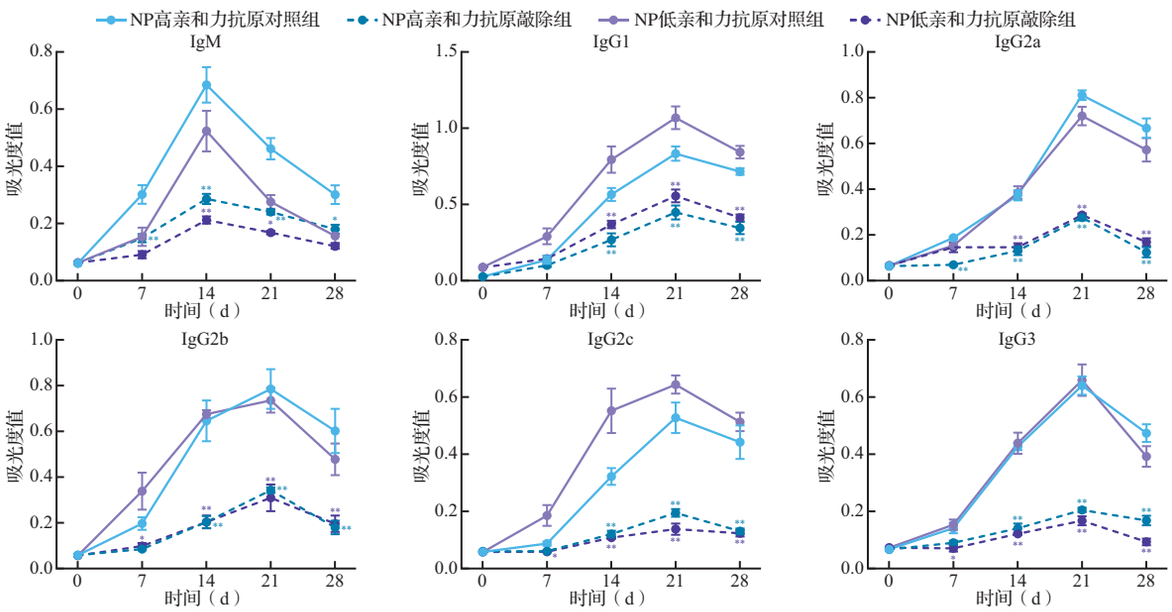
与对照组比较，敲除组脾脏NP特异性生发中心B细胞比例减小(P<0.01)，总生发中心B细胞、非NP特异性生发中心B细胞比例差异均无统计学意义(均P>0.05)；敲除组脾脏总浆细胞、NP特异性浆细胞比例均减小(均P<0.01)，而骨髓总浆细胞、NP特异性浆细胞比例差异均无统计学意义(均P>0.05)，见图5和表3。提示B细胞内源性拟素化缺失可能通过影响B细胞分化损害小鼠对NP-CGG的抗体应答。

2.4　B细胞内源性拟素化缺失抑制DNP-KLH免疫后IgM及各类IgG抗体分泌

对照组和敲除组在免疫后第7天血清中抗DNP抗体水平均升高，表明免疫接种成功。与对照组比较，敲除组血清中抗DNP IgM、IgG1和IgG3抗体水平降低(均P<0.01)，为对照组的50%~80%；抗DNP IgG2b、IgG2c抗体水平在免疫后第14天降低(均P<0.05)，为正常对照的70%~90%；抗DNP IgG2a抗体水平在第28天时才出现显著升高(P<0.01)，为正常对照的90%，见图6。提示B细胞内源性拟素化缺失损害DNP-KLH免疫后IgM及各类IgG抗体分泌，但其损害程度不如其他类型抗原免疫显著。

3　讨　论

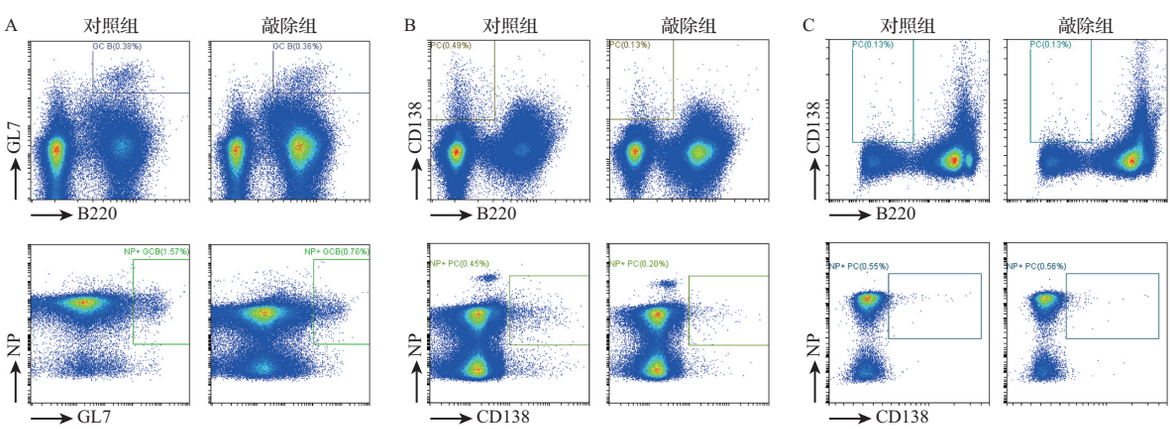
NP和DNP是一种半抗原，通常与载体蛋白结合后作为抗原表位激活B细胞，诱导体液免疫反应，常用于研究免疫应答中B细胞选择和亲和力成熟[13]。Ficoll是一种人工合成的高分子多



与相应对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$. NP：4-羟基-3-硝基苯乙酰基；CGG：鸡丙种球蛋白；Ig：免疫球蛋白.

图4　NP-CGG免疫后各组血清NP特异性抗体水平变化

Figure 4　Serum levels of NP-specific antibodies in NP-CGG immunized mice



A：脾脏生发中心B细胞（GCB）和NP特异性生发中心B细胞比例；B：脾脏浆细胞（PC）和NP特异性浆细胞比例；C：骨髓浆细胞和NP特异性浆细胞比例. NP：4-羟基-3-硝基苯乙酰基；CGG：鸡丙种球蛋白；CD：分化抗原.

图5　NP-CGG免疫后两组B细胞亚群流式细胞术检测结果

Figure 5　Proportions of B cell subsets in NP-CGG immunized mice

表3　NP-CGG免疫后两组B细胞亚群比例比较

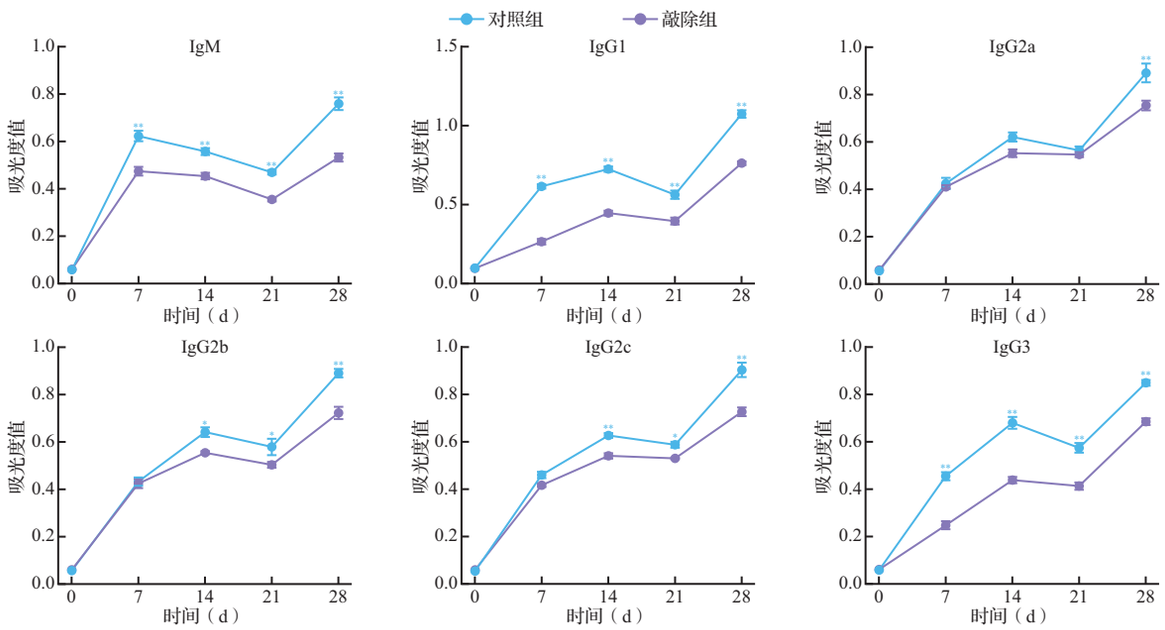
Table 3　Proportions of B cell subsets in NP-CGG immunized mice

（$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$，n=5）

组　别	脾　脏					骨　髓	
	GCB	NP^{+}GCB	NP^{-} GCB	浆细胞	NP^{+}浆细胞	浆细胞	NP^{+}浆细胞
对照组	0.430±0.112	1.368±0.240	0.157±0.038	0.492±0.082	0.475±0.071	0.182±0.053	0.820±0.274
敲除组	0.336±0.032	0.773±0.061**	0.110±0.017	0.200±0.062**	0.273±0.066**	0.112±0.030	0.455±0.148

与对照组比较，$^{**}P<0.01$. NP：4-羟基-3-硝基苯乙酰基；CGG：鸡丙种球蛋白；GCB：生发中心B细胞；NP^{+}：NP特异性；NP^{-}：非NP特异性.

糖，与LPS类似，不需要依赖Th细胞即可激活B细胞，是非胸腺依赖性抗原[14]。CGG和KLH都是典型的胸腺依赖性抗原，必须依赖Th细胞才能诱导B细胞反应[15]。KLH比CGG的相对分子质



与对照组比较，*P<0.05，**P<0.01. DNP：2，4-二硝基苯基；KLH：匙孔血蓝蛋白；Ig：免疫球蛋白.

图6　DNP-KLH免疫后两组血清DNP特异性抗体水平变化

Figure 6　Serum levels of DNP-specific antibodies in DNP-KLH immunized mice

量更大。KLH来源于无脊椎动物，对哺乳动物高度异源，含有大量潜在的T细胞表位，能引起更强烈的Th细胞反应，诱导更强烈、更广泛的B细胞激活和更高滴度抗体[16]。本研究利用NP-LPS、DNP-Ficoll、NP-CGG、DNP-KLH四种不同抗原，免疫接种正常对照和*Ube2m*基因敲除小鼠，以探究B细胞固有拟素化缺失对非胸腺依赖性抗原和胸腺依赖性抗原免疫应答的影响。

小鼠的免疫球蛋白家族包含多种亚型（如IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgA、IgE），每种亚型在免疫反应中扮演不同角色，包括中和作用、调理吞噬、抗体依赖性细胞毒性和补体激活等[17]。本研究主要关注IgM和各类IgG。IgM是在抗原初次刺激后最早产生的抗体，在抗原初次刺激后5~7 d内达到峰值[18]；IgG1是Th2型体液免疫应答的标志，由Th2细胞分泌的细胞因子IL-4驱动，具有中和病原体和调理作用，是小鼠体内最常见的IgG亚型[19]；IgG2a和IgG2c是Th1型细胞免疫应答的标志，由Th1细胞分泌的细胞因子γ干扰素驱动，具有强大的补体活化能力，介导抗体依赖性细胞毒性[20]；IgG2b是介于Th1型和Th2型之间的多面手，由多种细胞因子（包括IL-4、γ干扰素和转化生长因子β）驱动产生，具有中等强度的补体活化能力和良好的调理作用，功能较为全面[21]；IgG3对非胸腺依赖性抗原应答强烈，能够激活补体，但在抗体依赖性细胞毒性方面较弱[22-24]。

抗原免疫结果显示，B细胞内源性拟素化缺失对体液免疫应答的调控具有明确的抗原类型与抗体亚型偏好性。在非胸腺依赖性抗原NP-LPS和DNP-Ficoll免疫后，敲除组IgM应答基本不受影响，但IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3等Th1型相关IgG亚型普遍降低，同时伴随骨髓浆细胞及抗原特异性浆细胞比例显著减小，表明B细胞内源性拟素化缺失对非胸腺依赖性抗原介导的Th1型体液免疫应答损害尤为显著。而在胸腺依赖性抗原NP-CGG和DNP-KLH免疫后，敲除组抗原特异性IgM和IgG各类亚型均广泛降低，其中IgM、IgG1、IgG3下降最为明显且出现较早，IgG2a等亚型改变相对延迟，同时脾脏抗原特异性生发中心B细胞和浆细胞比例显著减小，提示该缺失主要损害胸腺依赖抗原诱导的Th2型体液免疫及早期初次应答，对Th1型应答的调控则呈现明显的抗原依赖性。

不同类型的抗原选择性地刺激不同亚类IgG抗体应答，主要取决于抗原如何被呈递及其激活B细胞的机制。胸腺依赖性抗原需要B细胞和Th细胞协作才能激活B细胞，优先刺激

IgG1;非胸腺依赖性抗原LPS需要同时激活Toll样受体信号和B细胞受体信号才能激活B细胞,优先刺激IgG2b和IgG3;非胸腺依赖性抗原Ficoll则通过重复表位强烈交联B细胞受体激活B细胞,优先刺激IgG3[25]。研究发现,在非胸腺依赖性抗原(NP-LPS、DNP-Ficoll)免疫中,敲除组IgM水平较对照组无显著性改变,或仅出现一过性下降,而胸腺依赖性抗原免疫中敲除组IgM水平较对照组显著降低,提示B细胞内源性拟素化缺失不影响非胸腺依赖性抗原介导的快速体液免疫应答,但损害胸腺依赖性抗原介导的早期IgM反应。此外,NP-LPS免疫中IgG1水平仅在NP高亲和力抗原敲除组下降,而NP低亲和力抗原敲除组IgG1水平较对照组无显著性改变;DNP-KLH免疫中敲除组IgM、IgG1和IgG3水平下降幅度大于IgG2a、IgG2b和IgG2c,且IgG2a抗体下降时序延迟,提示B细胞内源性拟素化缺失并非以统一方式调控抗体应答,其效应取决于抗原刺激的类型,最终导致多样化的抗体产生,具有一定的抗原依赖性。目前尚不清楚B细胞内源性拟素化缺失对抗体形成产生此类差异性影响的原因。值得注意的是,即使在同属胸腺依赖性抗原的NP-CGG和NP-KLH免疫模型中,敲除组的抗体反应也不一致。此外,LPS作为一种强效的B细胞多克隆激活剂,在低剂量时可引发抗原特异性应答,而在高剂量下则倾向于诱导非特异性的多克隆B细胞活化[26],提示B细胞内源性拟素化缺失对抗体应答的调控可能不仅依赖于抗原类型,还受到刺激强度的调节。因此,后续研究可通过应用不同剂量刺激条件建立免疫模型,进一步探究B细胞内源性拟素化缺失对抗体应答的调控作用。

B细胞通过B细胞受体识别脾脏或淋巴结中的外来抗原后,被激活并增殖,分化为生发中心B细胞,完成亲和力成熟和类别转换,进而分化为浆细胞。脾脏浆细胞是早期、短效的抗体生产者,提供快速的初期保护,骨髓浆细胞是长效、稳定的抗体生产者,维持长期体液免疫记忆[26]。流式细胞术分析结果显示,非胸腺依赖性抗原免疫模型中敲除组脾脏生发中心B细胞比例较对照组减小,NP特异性生发中心B细胞比例与对照组相似,骨髓中浆细胞及NP特异性浆细胞比例较对照组显著减小,而脾脏浆细胞比例与对照组相近。在胸腺依赖性抗原免疫模型中,尽管敲除组脾脏中NP特异性生发中心B细胞的比例显著减小,但脾脏生发中心B细胞以及非NP特异性生发中心B细胞的比例与对照组均相近,推测NP特异性生发中心B细胞比例减小可能因为总体细胞背景的稀释效应而被掩盖,且脾脏浆细胞及NP特异性浆细胞比例显著减小,而骨髓浆细胞比例则无变化。理论上,非胸腺依赖性抗原多产生髓外短寿命浆细胞,少量迁移至骨髓;胸腺依赖性抗原通常更易引起生发中心反应,产生进入骨髓的长期驻留浆细胞[27]。脾脏浆细胞和骨髓浆细胞的形成不仅受抗原类型的影响,其分化还是一个涉及输出–迁移–归巢–存活动态的、有时序的过程[28]。敲除组浆细胞对非胸腺依赖性抗原和胸腺依赖性抗原的相反表型可能受到检测时间的影响,如果取样时间偏早,骨髓中尚未见差异;取样时间偏晚,则脾脏浆细胞可能已衰减。后续可以通过在免疫后不同时间点(如第7、14、21、28天)检测脾脏和骨髓中的浆细胞动态变化,探究B细胞内源性拟素化的缺失对B细胞分化的调控作用。

已有研究表明,与对照小鼠比较,拟素化缺陷小鼠在感染约氏疟原虫后表现出血清IgG水平降低、花生凝集素阳性(PNA^+)生发中心数减少以及B细胞滤泡结构紊乱[29]。拟素化抑制剂MLN4924在慢性淋巴细胞白血病中可通过抑制Cullin-RING泛素连接酶活性阻断p65和p52的核转位,从而抑制核因子κB信号通路,导致磷酸化核因子κB抑制蛋白α、Noxa和BIM积累,促使在IL-21和CD40配体刺激下增殖的B细胞凋亡,同时增强慢性淋巴细胞白血病B细胞对烷化剂苯达莫司汀和氯胺醌的敏感性[30-31]。这些结果均支持了本文资料结论,即拟素化在促进生发中心形成及抗体产生中具有重要作用,B细胞内源性拟素化缺失会广泛损害小鼠对非胸腺依赖性抗原和胸腺依赖性抗原的抗体产生和B细胞分化应答。除生发中心B细胞和浆细胞外,B细胞还包括其他比例较低但仍具备抗体分泌能力的亚型。本文资料未涉及抗体中和活性、浆细胞分泌功能等功能学指标,后续将通过体外抗体中和实验、浆细胞体外培养分泌功能检测补充验证,同时有必要扩大B细胞亚群的检测范围,并借助Elispot等技术精确鉴定抗原特异性抗体分泌细胞。此外,还可通过添加细胞因子刺激,在体外更精确

地模拟B细胞对非胸腺依赖性抗原和胸腺依赖性抗原信号的应答。

综上,B细胞内源性拟素化缺失会广泛损害小鼠对非胸腺依赖性抗原和胸腺依赖性抗原的抗体产生和B细胞分化,包括早期初次免疫应答、Th1型细胞免疫应答和Th2型体液免疫应答,且具有一定的抗原依赖性。

本文附加文件见电子版。

志谢 研究得到浙江省自然科学基金(LQ23H270005)、浙江中医药大学校级科研项目(2021RCZXZK12)和浙江中医药大学研究生科学研究基金(2024YKJ13)支持

Acknowledgements This study was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LQ23H270005), Scientific Research Project of Zhejiang Chinese Medical University (2021RCZXZK12), and Graduate Research Fund of Zhejiang Chinese Medical University (2024YKJ13)

作者贡献 金鑫、竺露瑶、章力之、陈天杭和周明倩参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容.所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责.具体见电子版

Author Contributions JIN Xin, ZHU Luyao, ZHANG Lizhi, CHEN Tianhang and ZHOU Mingqian participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据可根据合理请求从通信作者(E-mail:zhoumingqian@zcmu.edu.cn)处获得

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study can be accessed upon reasonable request from the corresponding author at zhoumingqian@zcmu.edu.cn

医学伦理 本研究遵循国家和浙江中医药大学有关实验动物管理和使用的规定,通过浙江中医药大学动物管理与伦理委员会审查(IACUC-20241021-02)

Ethical Approval All applicable national guidelines and Zhejiang Chinese Medical University regulations for the care and use of animals were followed, and the research protocol of animal experiments was approved by the Ethics Committee of Zhejiang Chinese Medical University (IACUC-20241021-02)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

参考文献(References)

[1] ZHANG S, YU Q, LI Z, et al. Protein neddylation and its role in health and diseases[J]. **Sig Transduct Target Ther**, 2024, 9(1): 85.

[2] 俞 卿, 熊秀芳, 孙 毅. 靶向Cullin-RING E3泛素连接酶的抗肿瘤策略及相关药物研发进展[J]. **浙江大学学报(医学版)**, 2020, 49(1): 1-19.
YU Qing, XIONG Xiufang, SUN Yi. Targeting Cullin-RING E3 ligases for anti-cancer therapy: efforts on drug discovery[J]. **Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)**, 2020, 49(1): 1-19. (in Chinese)

[3] ZHOU L, JIANG Y, LUO Q, et al. Neddylation: a novel modulator of the tumor microenvironment[J]. **Mol Cancer**, 2019, 18(1): 77.

[4] ZHENG B, QIAN F, WANG X, et al. Neddylation activated TRIM25 desensitizes triple-negative breast cancer to paclitaxel via TFEB-mediated autophagy[J]. **J Exp Clin Cancer Res**, 2024, 43(1): 177.

[5] GONZALEZ-RELLAN M J, FERNÁNDEZ U, PARRACHO T, et al. Neddylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 controls glucose metabolism[J]. **Cell Metab**, 2023, 35(9): 1630-1645.e5.

[6] LU X, KONG X, WU H, et al. UBE2M-mediated neddylation of TRIM21 regulates obesity-induced inflammation and metabolic disorders[J]. **Cell Metab**, 2023, 35(8): 1390-1405.e8.

[7] MATHEWSON N, TOUBAI T, KAPELES S, et al. Neddylation plays an important role in the regulation of murine and human dendritic cell function[J]. **Blood**, 2013, 122(12): 2062-2073.

[8] WU D, LI H, LIU M, et al. The Ube2m-Rbx1 neddylation-Cullin-RING-ligase proteins are essential for the maintenance of regulatory T cell fitness[J]. **Nat Commun**, 2022, 13(1): 3021.

[9] CHI H, PEPPER M, THOMAS P G. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity[J]. **Cell**, 2024, 187(9): 2052-2078.

[10] ELSNER R A, SHLOMCHIK M J. Germinal center and extrafollicular B cell responses in vaccination, immunity, and autoimmunity[J]. **Immunity**, 2020, 53(6): 1136-1150.

[11] TANGYE S G, NGUYEN T, DEENICK E K, et al.

Inborn errors of human B cell development, differentiation, and function[J/OL]. **J Exp Med**, 2023, 220(7): e20221105.

[12] ENZLER T, BONIZZI G, SILVERMAN G J, et al. Alternative and classical NF-κB signaling retain autoreactive B cells in the splenic marginal zone and result in lupus-like disease[J]. **Immunity**, 2006, 25(3): 403-415.

[13] SHE Z, XIE T, ZHU Y, et al. Study on the aerobic biodegradability and degradation kinetics of 3-NP; 2, 4-DNP and 2, 6-DNP[J]. **J Hazard Mater**, 2012, 241-242: 478-485.

[14] MATTA B, BATTAGLIA J, LAPAN M, et al. IRF5 controls plasma cell generation and antibody production via distinct mechanisms depending on the antigenic trigger[J]. **Immunology**, 2025, 174(2): 226-238.

[15] ZHAO Z, XU B, WANG S, et al. Tfh cells with NLRP3 inflammasome activation are essential for high-affinity antibody generation, germinal centre formation and autoimmunity[J]. **Ann Rheum Dis**, 2022, 81(7): 1006-1012.

[16] YIN Y, LIU Y, DU L, et al. Compromised B-cell homeostasis: unraveling the link between major depression, infection and autoimmune disorders[J]. **J Affect Disord**, 2025, 374: 565-578.

[17] SHANMUGAM A, SHI M J, YAUCH L, et al. Evidence for class-specific factors in immunoglobulin isotype switching[J]. **J Exp Med**, 2000, 191(8): 1365-1380.

[18] CHEN M, QIN R, JIANG M, et al. Clinical applications of detecting IgG, IgM or IgA antibody for the diagnosis of COVID-19: a meta-analysis and systematic review [J]. **Int J Infect Dis**, 2021, 104: 415-422.

[19] GOLAY J, ANDREA A E, CATTANEO I. Role of fc core fucosylation in the effector function of IgG1 antibodies[J]. **Front Immunol**, 2022, 13: 929895.

[20] ZHANG Z, GOLDSCHMIDT T, SALTER H. Possible allelic structure of IgG2a and IgG2c in mice[J]. **Mol Immunol**, 2012, 50(3): 169-171.

[21] JAGNARINE S, QIU A, KYRITSIS E, et al. IgG2b enhances alloantibodies to stored red blood cells[J]. **Transfusion**, 2025, 65(8): 1408-1417.

[22] NAPODANO C, MARINO M, STEFANILE A, et al. Immunological role of IgG subclasses[J]. **Immunol Invest**, 2021, 50(4): 427-444.

[23] YU J, SONG Y, TIAN W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies[J]. **J Hematol Oncol**, 2020, 13(1): 45.

[24] DAMELANG T, ROGERSON S J, KENT S J, et al. Role of IgG3 in infectious diseases[J]. **Trends Immunol**, 2019, 40(3): 197-211.

[25] WELLER S, STERLIN D, FADEEV T, et al. T-independent responses to polysaccharides in humans mobilize marginal zone B cells prediversified against gut bacterial antigens[J]. **Sci Immunol**, 2023, 8(79): eade1413.

[26] 周　澜, 唐舒沛, 吴玉章 . 2024年免疫学研究重要进展[J]. **免疫学杂志**, 2025, 41(1): 1-15.
ZHOU Lan, TANG Shupei, WU Yuzhang. Advances in immunology research in 2024[J]. **Immunological Journal**, 2025, 41(1): 1-15. (in Chinese)

[27] 马璀艳 . TNP-LPS和TNP-KLH诱导的虹鳟(Oncorhynchus mykiss)抗体分泌细胞的分化研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
MA Cuiyan. Study on antibody secreting cell differentiation of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) immunized with TNP-LPS and TNP-KLH[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011. (in Chinese)

[28] CYSTER J G, ALLEN C D C. B cell responses: cell interaction dynamics and decisions[J]. **Cell**, 2019, 177 (3): 524-540.

[29] CHENG Q, LIU J, PEI Y, et al. Neddylation contributes to $CD4^+$ T cell-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium* infection[J/OL]. **PLoS Pathog**, 2018, 14(11): e1007440.

[30] GODBERSEN J C, HUMPHRIES L A, DANILOVA O V, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 thwarts microenvironment-driven NF-κB activation and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells[J]. **Clin Cancer Res**, 2014, 20(6): 1576-1589.

[31] PAIVA C, GODBERSEN J C, BERGER A, et al. Targeting neddylation induces DNA damage and checkpoint activation and sensitizes chronic lymphocytic leukemia B cells to alkylating agents[J/OL]. **Cell Death Dis**, 2015, 6(7): e1807.

［本文编辑　余　方　刘丽娜］

·读者·作者·编者·

本刊2026年刊期变更为月刊

《浙江大学学报(医学版)》自2026年1月起由双月刊变更为月刊出版,每月25日出刊。改刊期后继续采用开放获取政策,录用论文即可在线免费获取,作者保留发表文章的版权。录用论文按照500元/页标准收取文章处理费,赠送作者3~5册印刷版期刊。