

小鼠脾脏B淋巴细胞纯化培养方法的建立

李文娟, 邹家琦, 韩欣欣, 田志辉, 刘杰, 李海东(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 天津市 300070)

文章亮点:

从脾脏获取的淋巴细胞难以区分 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞, 作者研究在培养基中加入 CD3 单克隆抗体、白细胞介素 4 可以去除 T 淋巴细胞, 获得较为单一的 B 淋巴细胞并维持 B 淋巴细胞在体外的增殖。

关键词:

组织构建; 组织工程; 小鼠脾脏; B 淋巴细胞; T 淋巴细胞; 培养; CD3 单克隆抗体; 白细胞介素 4; 脂多糖; 流式细胞术; 国家自然科学基金

主题词:

组织工程; B 淋巴细胞; 白细胞介素 4; 脂多糖类

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81070271)

摘要

背景: B 淋巴细胞是机体免疫系统重要的参与者, 目前的研究主要采用磁珠、补体等方法进行 B 淋巴细胞的分离纯化, 但是这些方法费用高或者细胞损伤大、纯度低, 体外分离、培养 B 淋巴细胞的方法还有待进一步改进。

目的: 探讨从小鼠脾脏细胞中对 B 淋巴细胞同时进行分离、培养的方法。采用加入白细胞介素 4、脂多糖或者 CD3 单克隆抗体及其组合, 探讨体外分离、培养小鼠脾脏 B 淋巴细胞的适宜条件。

方法: 体外分离培养小鼠脾脏细胞, 随机分为 7 组, 分别用白细胞介素 4, CD3, 脂多糖, 白细胞介素 4+CD3, 白细胞介素 4+脂多糖, CD3+脂多糖组进行干预、将未给予刺激的脾细胞作为对照组。用流式细胞仪检测在不同培养条件下小鼠脾脏细胞 T、B 淋巴细胞及其亚群的变化。

结果与结论: 与对照组比较, 白细胞介素 4 组淋巴细胞在培养后第 3-5 天数量达到高峰; 脂多糖组在培养初期无明显作用, 第 3 天开始淋巴细胞数量有明显的增加, 第 5 天达到高峰; 培养体系中加入 CD3 单克隆抗体, 可导致 T 淋巴细胞消失, 培养 2 d 后, 可得到较为单一的 B 淋巴细胞, 其细胞数量在第 3 天达到高峰。其中 B220+IgD+成熟 B 淋巴细胞亚群数量显著增加。体外培养 24 h 后, 各组 B220+CD93+Transitional B 淋巴细胞亚群均完全消失。结果说明, 体外培养的小鼠脾脏细胞加入 CD3 单克隆抗体和白细胞介素 4 可以去除 T 淋巴细胞, 并维持成熟 B 淋巴细胞的生存和增殖。

李文娟, 邹家琦, 韩欣欣, 田志辉, 刘杰, 李海东. 小鼠脾脏 B 淋巴细胞纯化培养方法的建立[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(2):207-212.

李文娟, 女, 1988 年生, 内蒙古包头市人, 汉族, 天津医科大学在读硕士, 主要从事分子免疫学研究。

通讯作者: 李海东, 博士, 教授, 天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 天津市 300070

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2015.02.009

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)02-00207-06

稿件接受: 2014-12-16

Purification and culture methods of murine splenic B-lymphocytes

Li Wen-juan, Zou Jia-qj, Han Xin-xin, Tian Zhi-hui, Liu Jie, Li Hai-dong (Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract

BACKGROUND: B-lymphocytes are an important participant in the immunity system. Currently, magnetic beads and complement methods are mainly used to isolate and purify B-lymphocytes. However, these methods are costly or cause large cell damage and low purity, which need further improvement.

OBJECTIVE: To explore the isolation and culture methods of B-lymphocytes from mouse spleen and to study suitable conditions for B-lymphocyte isolation and culture in vitro by using interleukin-4, lipopolysaccharide, CD3 monoclonal antibody or their combination.

METHODS: B-lymphocytes from mouse spleen were isolated and randomly divided into seven groups, respectively treated with interleukin-4, CD3 monoclonal antibody, lipopolysaccharide, interleukin-4+CD3, interleukin-4+lipopolysaccharide, CD3+lipopolysaccharide, and no stimulation (control group). Flow cytometry was used to detect the changes in the number and proportion of T-lymphocytes, B lymphocytes, and their subpopulations under different culture conditions.

RESULTS AND CONCLUSION: The number of lymphocytes peaked at 3-5 days after addition of interleukin-4. In the lipopolysaccharide group, the number of lymphocytes began to increase at 3 days, and then peaked at 5 days. T-lymphocytes disappeared after addition of CD3 monoclonal antibody, so relatively pure B-lymphocytes could be obtained after 2 days and the number of B-lymphocytes reached the peak at 3 days. The number of mature B-lymphocytes (B220+IgD+) increased significantly after addition of CD3 antibody. In all the conditions we tested, transitional B cell subset (B220+CD93+) disappeared completely after 24 hours of culture. Experimental results

Li Wen-juan, Studying for master's degree, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Li Hai-dong, M.D., Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Accepted: 2014-12-16

indicate that after addition of CD3 monoclonal antibody and interleukin-4, T-lymphocytes can be removed in mouse spleen cells cultured, but mature B-lymphocytes remain to survive and proliferate.

Subject headings: Tissue Engineering; B-Lymphocytes; Interleukin-4; Lipopolysaccharides
Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81070271

Li WJ, Zou JQ, Han XX, Tian ZH, Liu J, Li HD. Purification and culture methods of murine splenic B-lymphocytes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(2):207-212.

0 引言 Introduction

B淋巴细胞是机体特异性免疫系统的重要成员。B淋巴细胞的发育开始于骨髓中, 经历原B(pro-B)、前B(pre-B)和表达表面受体IgM的未成熟B细胞阶段。刚刚离开骨髓的B淋巴细胞为Transitional B细胞。在脾脏等外周淋巴系统中, 它们转变为成熟B细胞^[1-3]。在淋巴细胞发育过程中, 需要去除掉有自身反应性的细胞, 这一过程是通过自身抗原与细胞表面的特异受体结合诱导细胞凋亡来实现的^[4]。

B淋巴细胞的生存、增殖和分化成为浆细胞或者记忆B细胞需要T淋巴细胞的帮助, 特别是白细胞介素等细胞因子的作用^[5-6]。外源性的刺激因子例如细菌脂多糖也可以促进B淋巴细胞增殖^[7]。

对B淋巴细胞功能的研究多需要纯化的细胞, 并且经常需要在体外培养系统中进行研究。因此B淋巴细胞的分离、纯化和培养是研究其功能必不可少的环节。

目前分离B淋巴细胞主要采用以下3类方法^[8-11]: ①利用抗体磁珠和强磁铁的吸引作用或者利用流式细胞仪直接分离标记的B淋巴细胞。②利用多价抗体将不需要的细胞聚集起来去除掉或者利用绵羊红细胞对T淋巴细胞的聚簇作用去除T淋巴细胞来分离B淋巴细胞。③采用补体介导的细胞毒性作用去除不需要的细胞。这些方法或者费用很高, 或者分离繁琐, 或者对需要的细胞有毒性作用。实验报道的方法采用抗体诱导的细胞凋亡作用去除T淋巴细胞, 得到较为纯净的B淋巴细胞, 并能够在一定时间范围内维持其生存和增殖。

实验主要采用小鼠脾脏进行研究。脾脏中的细胞主要是淋巴细胞。B淋巴细胞比例多于T淋巴细胞, 约占55%, 而T淋巴细胞约占35%。其他的细胞在脾脏中所占比例少于5%, 包括巨噬细胞、树突状细胞和中性粒细胞等^[12]。因此, 脾脏是研究淋巴细胞, 特别是B淋巴细胞功能的常用组织。

脾脏细胞的体外培养可以被用来进行特异性免疫反应的研究。在抗原刺激后, 淋巴细胞活化、增殖、分化, 产生细胞因子和抗原特异性抗体, 并通过细胞间和细胞与微环境的相互作用发挥免疫效应^[13-14]。体外培养脾脏细胞并筛选出抗原特异性T或者B淋巴细胞, 进行克隆并建立细胞系, 是研究特异性免疫反应的重要手段。建立适当的基本培养体系是研究特异性免疫, 并进一步研究特定因子作用机制的基础^[15-16]。因此, 利用脾脏进行B淋巴细胞的分离、纯化和体外培养是进行特异性免疫反应研究的重要途径。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外对比观察。

时间及地点: 于2012年10月至2014年7月在天津医科大学生物化学与分子生物学系实验室完成。

材料: 健康的七八周龄雌性Balb/c小鼠, 购自于北京华阜康生物科技公司, 动物质量合格证号: 11401300008413, 许可证号: SCXK(京)2009-0004。

小鼠脾脏B淋巴细胞的分离、纯化相关试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
RMPI1640培养基、青霉素、链霉素	Invitrogen, USA
胎牛血清	上海生工生物
白细胞介素4	Peptrotech, USA
脂多糖	Sigma, USA
FITC-CD19, PE-CD3, PE-Cy5, APC-IgD抗体	BioLegend, USA
CO ₂ 孵育箱	Thermo Fisher, USA
流式细胞仪	BD Biosciences, USA

方法:

小鼠脾脏细胞体外培养, 分组及免疫刺激: 小鼠脱臼处死, 在体积分数75%的乙醇中浸泡1 min, 无菌操作取出脾脏制成单细胞悬液^[14], 离心洗涤后培养于24孔板内, 随机分成7组, 依次为白细胞介素4组、CD3组、脂多糖组以及白细胞介素4+CD3组、白细胞介素4+脂多糖组、CD3+脂多糖组、对照组, 每组3个复孔, 细胞以 $6.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度悬浮于RMPI培养基中, 分别加入白细胞介素4 (20 $\mu\text{g/L}$)、CD3单克隆抗体(5 mg/L)、脂多糖(100 $\mu\text{g/L}$)及白细胞介素4+CD3、白细胞介素4+脂多糖、CD3+脂多糖刺激细胞, 将未给予刺激的脾细胞作为对照组, 置于37 °C, 体积分数5%CO₂的培养箱中培养。培养期间, 每隔一两天取细胞进行流式检测, 并加入等体积的培养基和刺激因子继续培养。

流式细胞仪检测淋巴细胞及其亚群: 每组取相同体积的细胞, PBS洗涤, 400 g/min离心5 min, 弃上清, 加入抗CD19抗体(FITC标记)、抗CD3抗体(PE标记)、抗CD4抗体(PE-Cy5标记)和抗IgD抗体(APC标记), 浓度均为10 mg/L , 混合均匀, 4 °C下避光30 min, PBS洗涤2次后, 弃上清, 细胞悬浮于100 μL PBS中上机检测。送检样本次数5次。采用BD C6流式细胞仪获取数据, 并用FlowJo软件分析流式细胞仪数据, 结果利用平均荧光强度划分细胞群, 再计算出各亚群细胞数量和百分比。

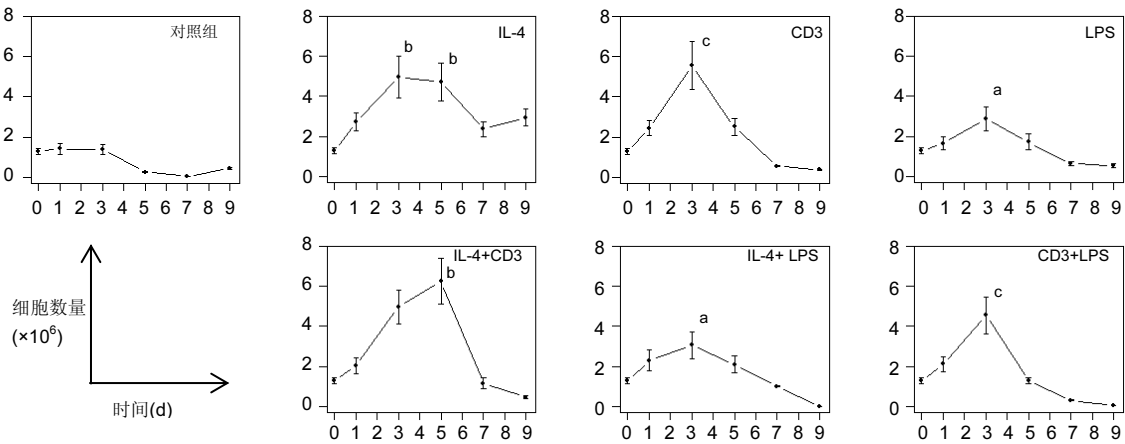


图 1 白细胞介素 4(IL-4)、CD3 单克隆抗体(CD3)、脂多糖(LPS)促进小鼠脾淋巴细胞在体外培养体系中的增殖

Figure 1 Stimulation of lymphocyte proliferation by interleukin-4/CD3 monochemical antibody/lipopolysaccharide *in vitro*

图注: IL-4 和 IL-4+CD3 组在处理第 3-5 天细胞数量与第 0, 1, 7, 9 天比较均有显著增加($P < 0.01$); CD3 和 CD3+LPS 组在处理第 3 天细胞数量与其他时间点比较均有显著增加($P < 0.01$); LPS 和 IL-4+LPS 组在处理第 3 天细胞数量与第 0, 7, 9 天比较有显著增加($P < 0.01$)。LPS: 脂多糖; IL-4: 白细胞介素 4。

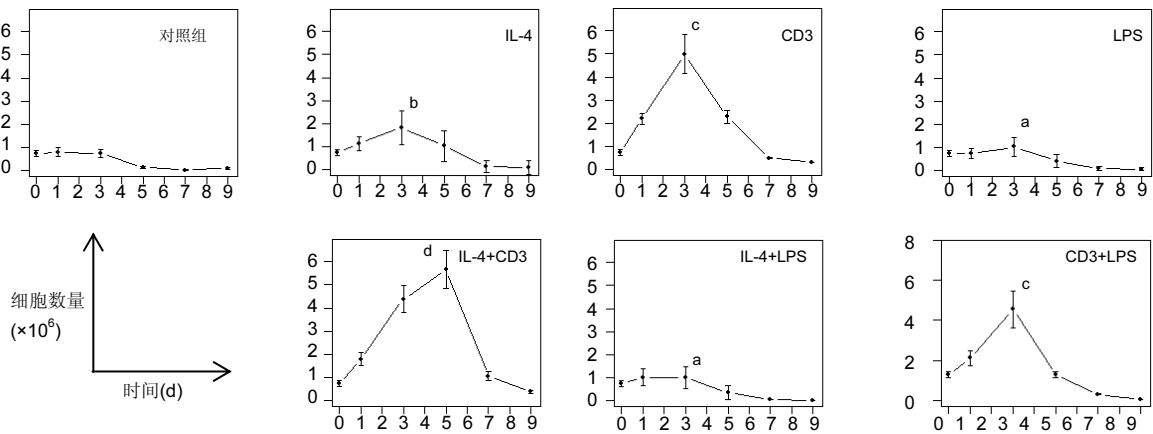


图 2 白细胞介素 4(IL-4)、CD3 单克隆抗体(CD3)促进 B 淋巴细胞在体外培养体系中的增殖

Figure 2 Stimulation of B-lymphocyte proliferation by interleukin-4/CD3 monochemical antibody *in vitro*

图注: IL-4 处理后第 3 天与第 0, 7, 9 天样品比较 B 淋巴细胞的数量差异有显著性意义($P < 0.01$); LPS 和 IL-4+LPS 组处理后第 3 天与第 7, 9 天样品比较 B 淋巴细胞的数量差异有显著性意义($P < 0.01$); CD3 和 CD3+LPS 组处理后第 3 天与其他天样品比较 B 淋巴细胞的数量差异有显著性意义($P < 0.01$); IL-4+CD3 组处理后第 5 天 B 淋巴细胞数量与第 0, 1, 7, 9 天样品比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。LPS: 脂多糖; IL-4: 白细胞介素 4。

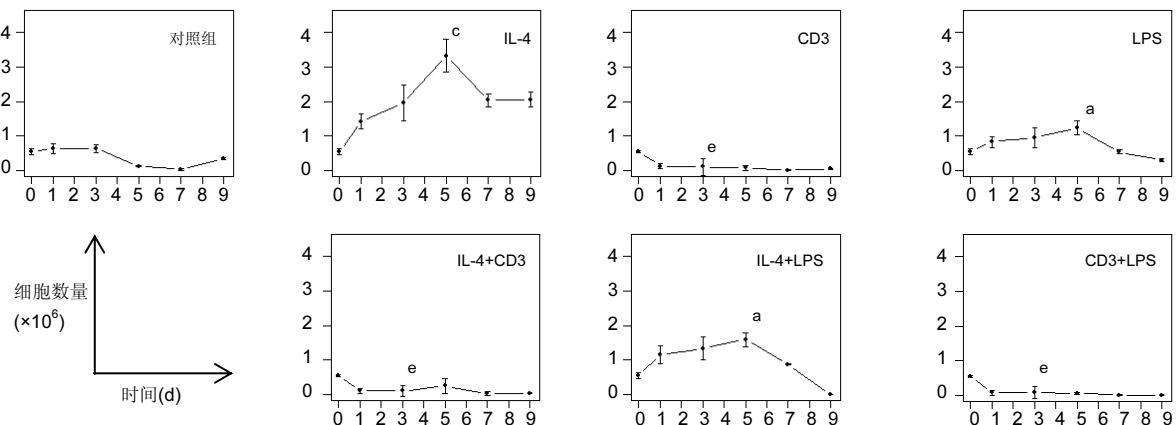


图 3 白细胞介素 4(IL-4)、脂多糖(LPS)促进 T 淋巴细胞在体外培养体系中的增殖

Figure 3 Stimulation of T-lymphocyte proliferation by interleukin-4 /lipopolysaccharide *in vitro*

图注: IL-4 处理后第 5 天与其他天样品比较 T 淋巴细胞的数量差异有显著性意义($P < 0.01$); LPS 和 IL-4+LPS 组处理后第 5 天与第 0, 7, 9 天样品比较 T 淋巴细胞的数量差异有显著性意义($P < 0.01$); CD3, IL-4+CD3 和 CD3+LPS 组处理后第 3 天 T 淋巴细胞的数量与 0 值比较差异无显著性意义($P < 0.05$)。LPS: 脂多糖; IL-4: 白细胞介素 4。

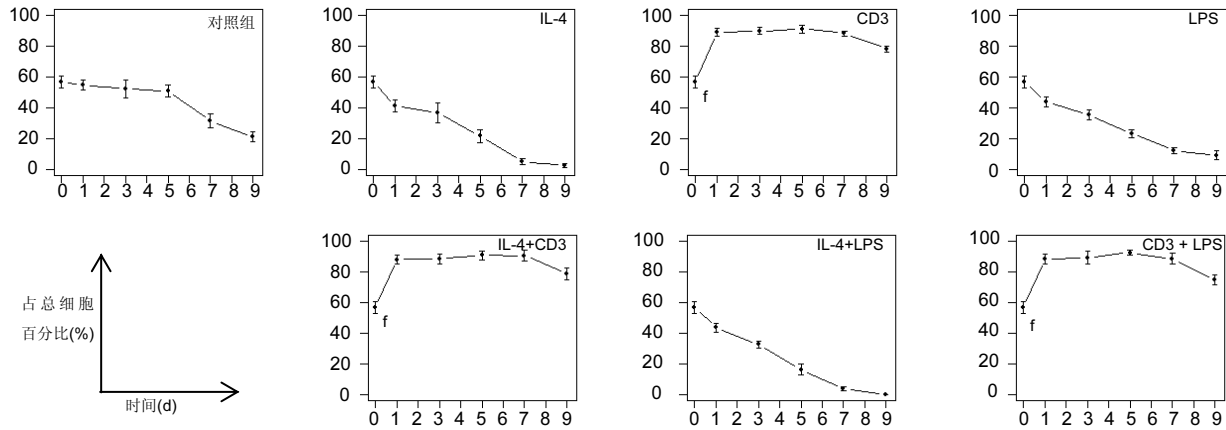


图 4 CD3 抗体处理增加了 B 淋巴细胞的比例

Figure 4 The proportion of B-lymphocytes was increased by addition of CD3 monoclonal antibody

图注: CD3 抗体处理后的样品中 B 淋巴细胞的比例与处理前(第 0 天)比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。LPS: 脂多糖; IL-4: 白细胞介素 4。

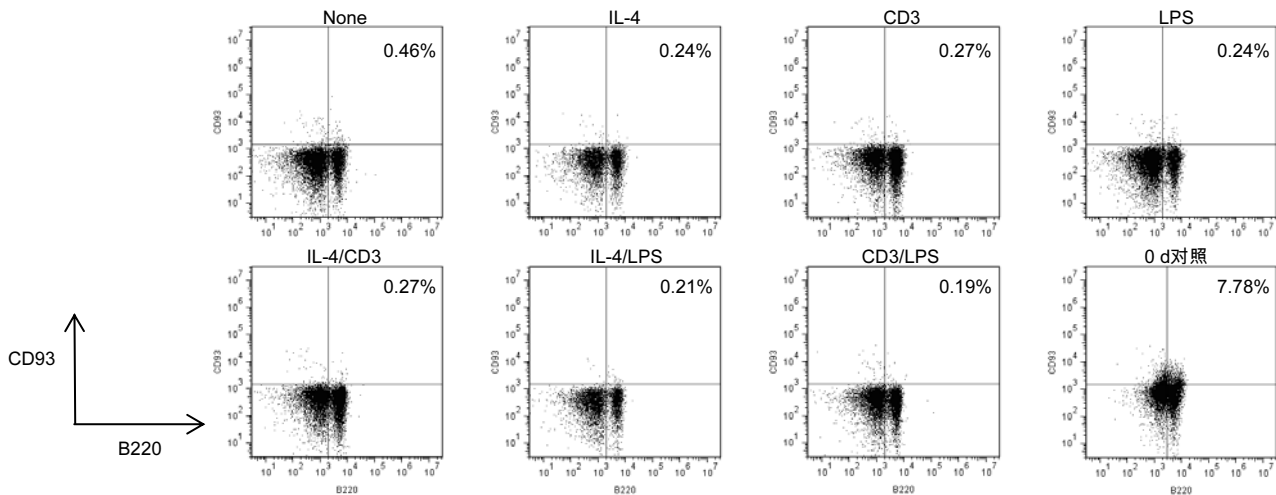


图 5 未成熟 B 淋巴细胞在体外培养体系中消失

Figure 5 Disappearance of immature B-lymphocytes in the *in vitro* culture system

图注: 横坐标与纵坐标单位均为相对荧光强度。培养 1 d 后各组的未成熟 Transitional B 淋巴细胞比例均 $< 0.6\%$, 与对照组相比有显著下降($P < 0.01$)。LPS: 脂多糖; IL-4: 白细胞介素 4。

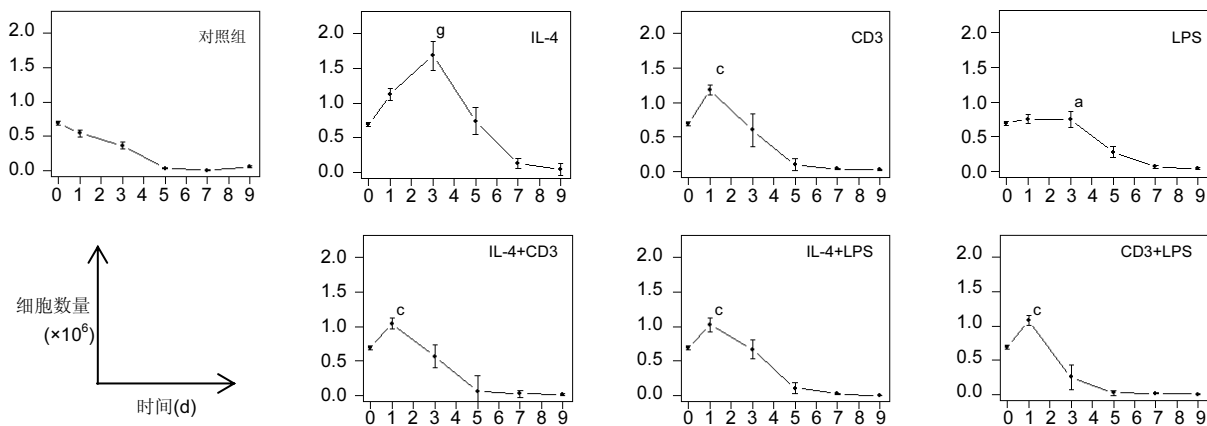


图 6 成熟 B 淋巴细胞数量在体外培养体系中的变化

Figure 6 Mature B-lymphocytes changes in the *in vitro* culture system

图注: 白细胞介素 4 处理后第 3 天与其他天数样品和其他处理组的样品比较, 成熟 B 淋巴细胞的数量均差异有显著性意义($^g P < 0.01$); 处理后各组成熟 B 淋巴细胞数量均在第 1-3 天达到峰值。峰值显著高于其他天样品细胞数量($^c P < 0.01$)或随后时间点样品的细胞数量($^a P < 0.01$)。CT 为没有加入任何因子的对照组。LPS: 脂多糖; IL-4: 白细胞介素 4。

主要观察指标: 小鼠脾细胞表面分子的表达和细胞数量的变化。

统计学分析: 计量结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 使用GraphPad Prism 5统计学软件处理数据。组间均数差异的比较采用单因素方差分析法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 小鼠脾细胞淋巴细胞数量变化 小鼠脾细胞体外培养, 每隔一两天取细胞做染色和流式分析, 检测淋巴细胞数目的变化。

与对照组相比较, 用白细胞介素4和/或脂多糖刺激脾细胞3-5 d, 明显增加了淋巴细胞数量, 在第3-5天达到高峰, 与第0天比较有五六倍的增加(图1)。加入白细胞介素4和脂多糖组的B淋巴细胞(B220+)数量随着培养时间延长在第3天有一短暂峰值($P < 0.01$), 随后逐渐下降(图2)。

用CD3抗体处理脾细胞, 导致T细胞数量显著下降: 处理后第3天T淋巴细胞数量与0值比较差异无显著性意义($P > 0.05$, 图3)。此时, 培养体系约90%细胞均为B淋巴细胞(图4); 同时, CD3抗体对B淋巴细胞增殖有显著促进作用。峰值B淋巴细胞的数量超过培养开始时的5倍(图2)。

2.2 小鼠脾B淋巴细胞亚群的变化 Transitional B细胞是从骨髓新迁移至外周的未成熟B细胞, 特征为表达CD93表面抗原, 在正常小鼠脾脏淋巴细胞中占有7-8%。体外培养1天后, Transitional B细胞基本消失($< 0.6\%$, 图5)。加入白细胞介素4、脂多糖、CD3抗体及其组合并不能维持Transitional B细胞的存在, 相反这些因子可能有促进细胞成熟的作用(图2)。

CD3抗体处理后CD3⁺T细胞比例显著下降, 培养体系中B细胞可以达到90%。其中, IgD+成熟B细胞数量在第1-3天达到峰值。白细胞介素4处理组可以得到 $> 1.5 \times 10^6$ 成熟B淋巴细胞, 显著高于其他组的数量($P < 0.01$, 图6)。

3 讨论 Discussion

实验利用机体内淋巴细胞凋亡和增殖的机制实现体外B淋巴细胞的纯化和培养。淋巴细胞的发育需要去除掉有自身反应性的细胞, 这一过程是通过未成熟淋巴细胞表面受体与自身抗原的结合来激发的^[17-18]。淋巴细胞的活化和之后的增殖也需要抗原及其他刺激分子和细胞因子与表面受体的结合^[19-22]。表达特异性受体的淋巴细胞比例很低, 因此通常采用抗体联合其他辅助因子来激活细胞。但是, 在体外单独使用抗体激活淋巴细胞会引起细胞的死亡^[23]。因此, 采用单克隆抗体可以选择性的去除特定细胞。

本次实验方法与其他方法比较有其优点。目前最常用的分离纯化B淋巴细胞的方法是采用抗体磁珠, 通过强磁铁的吸引可以有效进行细胞分离, 但是分离费用昂贵。采用补体依赖的细胞毒性作用可以去除其他细胞, 或者采用尼龙纤维吸附的方法也可以进行选择性的吸附特定细胞

^[24], 但是均对细胞有毒性作用^[25]。本次实验方法的优点是流程简单、成本低、方便, 并且在分离的同时进行B淋巴细胞的培养。

方法中也探索了保持B淋巴细胞生存和增殖的时间。采用CD3抗体处理脾细胞, 在培养后第3-5天, B淋巴细胞数量达到峰值。CD3抗体刺激T细胞表达CD40L, 并分泌多种细胞因子包括白细胞介素4^[26-27], 从而促进B细胞的增殖, 因此CD3抗体处理过的培养体系中B淋巴细胞数量有显著增加。如果需要继续保持B淋巴细胞的存活和增殖, 有可能需要加入其他因子, 例如BAFF^[28-29]。

相比体内微环境, 体外细胞培养体系有其独特优势。体外培养可以维持稳定的微环境, 有利于相对长时间保持淋巴细胞亚群的状态, 并可以重新输回体内进行功能的研究。但是研究也发现一些细胞, 例如辅助T细胞亚群在被注射回体内后发生了亚群间的转化^[30], 说明了体内环境的复杂性和难于控制。

实验的体外培养条件可以进一步调整和优化, 从而得到不同亚群B淋巴细胞, 为进一步的功能研究打下基础。目前的条件可以维持成熟B淋巴细胞的生存和增殖, 但是未成熟Transitional B细胞却很快消失(< 24 h), 它们可能转变成成为成熟B细胞或者经历了细胞凋亡而被去除掉^[31]。Transitional B细胞在脾细胞中所占比例低, 约为B细胞总数的15%, 但是它们却处于免疫耐受性形成的重要调节阶段: 有自身反应性的B细胞在此阶段中通过细胞凋亡途径被去除掉^[32]。因此, 进一步研究维持Transitional B细胞在体外生存, 并进行增殖的方法有重要意义。

作者贡献: 李文娟是实验的主要执行者, 邹家琦、韩欣欣、刘杰参与了细胞培养, 田志辉在小鼠脾脏细胞的获取上给予了帮助, 李海东教授指导了脾脏细胞培养、纯化等所有实验。论文的写作和修改由李文娟和李海东教授完成。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》规定。

学术术语: 淋巴细胞-是白细胞的一种, 由淋巴器官产生, 机体免疫应答功能的重要细胞成分。包括T细胞、B细胞和NK细胞等亚类, 分别介导机体的细胞免疫、体液免疫和对肿瘤细胞和病毒感染细胞的杀伤作用等免疫学功能。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. J Allergy Clin Immunol. 2013;131(4):959-971.
- [2] Tobon GJ, Izquierdo JH, Canas, CA. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. Autoimmune Dis. 2013; 2013: 827254 .

- [3] Vossenkamper A, Spencer J. Transitional B cells: how well are the checkpoints for specificity understood? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011;59(5):379-384.
- [4] Khan WN, Wright JA, Kleiman E, et al. B-lymphocyte tolerance and effector function in immunity and autoimmunity. *Immunol Res*. 2013;57(1-3):335-353.
- [5] Roth K, Oehme L, Zehentmeier S, et al. Tracking plasma cell differentiation and survival. *Cytometry A*. 2014;85(1):15-24.
- [6] Good-Jacobson KL, Tarlinton DM. Multiple routes to B-cell memory. *Int Immunol*. 2012;24(7):403-408.
- [7] Pone EJ, Xu Z, White CA, et al. B cell TLRs and induction of immunoglobulin class-switch DNA recombination, *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:2594-2615.
- [8] Heine G, Sims GP, Worm M, et al. Isolation of human B cell populations. *Curr Protoc Immunol*. 2011;Chapter 7:Unit7.
- [9] Ibrahim SF, van den Engh G. High-speed cell sorting: fundamentals and recent advances. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14(1):5-12.
- [10] Zuccolo J, Unruh TL, Deans JP. Efficient isolation of highly purified tonsil B lymphocytes using RosetteSep with allogeneic human red blood cells. *BMC Immunol*. 2009;10:30.
- [11] Grutzkau A, Radbruch A. Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry A*. 2010;77(7):643-647.
- [12] Scholz Jean L, William JQ, Michael PC. B-Cell Repertoire Changes in Mouse Models of Aging. In *Handbook on Immunosenescence*. Springer Netherlands. 2009.
- [13] Bao Y, Cao X. The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review. *J Autoimmun*. 2014;55C:10-23.
- [14] Chokeshai-u-saha K, Lepoivre C, Grieco L, et al. Comparison of immunological characteristics of peripheral, splenic and tonsillar naive B cells by differential gene expression meta-analyses. *Asian Pac. J Allergy Immunol*. 2012;30(4): 326-330.
- [15] Pi CC, Chu CL, Lu CY, et al. Polysaccharides from *Ganoderma formosanum* function as a Th1 adjuvant and stimulate cytotoxic T cell response in vivo. *Vaccine*. 2014; 32(3):401-408.
- [16] Pritchard AJ, Mir AK, Dev KK. Fingolimod attenuates splenocyte-induced demyelination in cerebellar slice cultures. *PLoS One*. 2014;9(6):e99444.
- [17] Rowland SL, Tuttle K, Torres RM, et al. Antigen and cytokine receptor signals guide the development of the naive mature B cell repertoire. *Immunol Res*. 2013;55(1-3):231-240.
- [18] Giltiay NV, Chappell CP, Clark EA. B-cell selection and the development of autoantibodies. *Arthritis Res. Ther*. 2012;14 Suppl 4:S1.
- [19] Zhong Y, Byrd JC, Dubovsky JA. The B-cell receptor pathway: a critical component of healthy and malignant immune biology. *Semin. Hematol*. 2014;51(3):206-218.
- [20] Browne EP. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology*. 2012;136(4):370-379.
- [21] Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, et al. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):282-294.
- [22] Yu X, Lin J, Yu Q, et al. Activation of Toll-like receptor 9 inhibits lipopolysaccharide-induced receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand expression in rat B lymphocytes. *Microbiol Immunol*. 2014;58(1):51-60.
- [23] Snow AL, Pandiyan P, Zheng L, et al. The power and the promise of restimulation-induced cell death in human immune diseases. *Immunol Rev*. 2010;236:68-82.
- [24] Wong DW, Mittal KK. HLA-DR typing: a comparison between nylon wool adherence and T cell rosetting in the isolation of B cells. *J Immunol Methods*. 1981;46(2):177-186.
- [25] Wohler JE, Barnum SR. Nylon wool purification alters the activation of T cells. *Mol. Immunol*. 2009;46(5):1007-1010.
- [26] Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, et al. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol*. 2010;11(8):681-688.
- [27] Ranasinghe C, Trivedi S, Wijesundara DK, et al. IL-4 and IL-13 receptors: Roles in immunity and powerful vaccine adjuvants. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(4): 437-442.
- [28] Granato A, Hayashi EA, Baptista BJ, et al. IL-4 regulates Bim expression and promotes B cell maturation in synergy with BAFF conferring resistance to cell death at negative selection checkpoints. *J Immunol*. 2014;192(12):5761-5775.
- [29] Schweighoffer E, Vanes L, Nys J, et al. The BAFF receptor transduces survival signals by co-opting the B cell receptor signaling pathway. *Immunity*. 2013;38(3):475-488.
- [30] Tan C, Wei L, Vistica BP, et al. Phenotypes of Th lineages generated by the commonly used activation with anti-CD3/CD28 antibodies differ from those generated by the physiological activation with the specific antigen. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(3):305-313.
- [31] Vossenkamper A, Spencer J. Transitional B cells: how well are the checkpoints for specificity understood? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011;59(5):379-384.
- [32] Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol*. 2003;24(6):342-348.