

132-137

第11卷第2期
1996年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 11 No. 2
Jun. 1996

15968(7)

EB 病毒转化 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞的实验研究^{*}左丽^{**} 郭辉玉^{***}

(中山医科大学微生物学教研室, 广州 510089)

张昌御[✓]

(中山医科大学肿瘤医院中心实验室, 广州 510089)

R373.9

R392-33

A

提要 利用 EB 病毒转化可产生较高水平人 IgG 和特异性抗 2 型登革病毒人抗体的 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞, 通过免疫组化、免疫荧光和 PCR 法检测转化细胞的人 B 细胞表面标志、EB 病毒抗原和 EB 病毒基因。结果表明, 被转化的 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞能继续产生抗 2 型登革病毒的特异性人抗体, 并具有人 B 细胞的 CD₂₀⁺、SmIgG 标志及 EB 病毒潜伏膜蛋白-1(LMP-1)基因, 可表达 LMP-1 和 EB 病毒核抗原(EBNA)。

关键词 人化 SCID 小鼠 EB 病毒 转化作用

抗体; 研制

用人淋巴细胞移植给严重联合免疫缺陷小鼠(Severe Combined Immunodeficiency Mice, SCID mice)制备人单克隆抗体(Human Monoclonal Antibody, hmAb)是目前国际上令人瞩目的新技术路线。它可能解决体内免疫限制, 抗原特异性 B 细胞富集的难点^[1]。我们用 2 型登革病毒(Dengue Virus Type 2, DV₂)体外免疫的人扁桃腺淋巴细胞(Human Tonsillar Lymphocytes, hu-TLC)移植给 SCID 小鼠(全文另发), 建立了能产生人 IgG 和特异性抗 DV₂ 人抗体的 Hu-TLC-SCID 小鼠。在此基础上, 利用 EB 病毒(EBV)对 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞进行体外转化, 希望能建立分泌特异性人抗体的永生性细胞株, 对利用 Hu-SCID 小鼠进行 hmAb 研制的可能性作进一步探索。现报道如下:

材料与方 法

1 DV₂ 免疫的 Hu-TLC-SCID 小鼠的建立

SCID 小鼠共 6 只(购自中山医科大学实验动物中心), 饲养在特制的无菌动物实验层流柜中。用 $1.5 \times 10^8/0.5$ ml 经 DV₂ 体外免疫的 Hu-TLC, 经腹腔移植给 SCID 小鼠后次日起, 每 2 周用 DV₂ 抗原经腹腔加强免疫, 可产生较高水平人 IgG 和抗 DV₂ 人抗体(全文另发)。

2 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞的制备

无菌取脾脏置于有 RPMI-1640 的平皿内剪碎, 过 200 目钢筛 2 次, 收集单个细胞悬液, 1500 r/min 离心 7 min, 弃上清; RPMI-1640 重悬细胞, 0.1% 伊文氏兰染色计数活细胞, 细胞活力大于 98%, 调整为 $1.0 \times 10^7/ml$ 。

本文于 1995 年 8 月 8 日收到, 12 月 14 日修回

- * 本课题受美国中华医学基金会资助, 为国内访问学者部份工作。
- ** 国内访问学者, 现在贵阳医学院微生物学教研室, 贵阳 550004。
- *** 导师

3 EBV 转化 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞

EBV(B95-8 标准株)为本室保存。常规培养 B95-8 细胞,待传代 5 d,生长良好时,2000 r/min 10 min,取上清用直径 0.45 μm 微孔膜滤器过滤,滤液保存 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。用 2 ml 滤液与等量 1×10^7 SCID 脾细胞混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h,其间不断轻摇匀;无血清 RPMI-1640 洗 3 次;加入 10 ml 含 15% 小牛血清、1% 三抗(青霉素、链霉素、卡那霉素)的 RPMI-1640 制成悬液,分装 24 孔板,每孔 0.5 ml,共 20 孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养,首次 7 d,以后每 3 天换液 1 次。倒置显微镜下观察细胞形态,待转化细胞生长达一定量时,2~3 孔收集到 1 培养瓶,继续培养。

4 转化细胞产生抗 DV₂ 人抗体的检测

B95-8 转化 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞后 15 d,取 24 孔板内细胞培养上清作 1:5 稀释后常规间接 ELISA 法检测抗 DV₂ 人 IgG。(DV₂ 抗原为本室自制,HRP-羊抗人 IgG 购于华美公司)。

5 转化细胞人 B 细胞标志细胞的检查

5.1 转化细胞 CD₂₀⁺ 标志细胞检测 将传至第 3 代的转化细胞用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 洗 3 次后制成细胞悬液涂片,室温干燥、冷丙酮固定 10 min,LSAB 免疫组织化学法检查 CD₂₀⁺ 标志细胞(鼠抗人 B 细胞 CD₂₀ LSAB 免疫组化试剂盒为 DAKO 公司产品)。

5.2 转化细胞 SmIgG 的检测 取上述细胞涂片,用抗人 SmIgG 荧光抗体(本校肿瘤医院中心实验室提供)常规直接免疫荧光法检查转化细胞 SmIgG。

6 转化细胞 EBV 抗原的检查

取上述细胞涂片,LSAB 免疫组织化学法检查 EBV LMP₁ 抗原(EBV LMP₁ LSAB 免疫组化试剂盒为 DAKO 公司产品)。

并用鼻咽癌病人血清为第 1 抗体(病人血清 EBV EA-IgA 1:80, VCA-IgA 1:640),新鲜正常人血清为补体,1:30 抗人 C₃ 补体免疫荧光抗体(本校第一附属医院尹培达教授惠赠)为第 2 抗体,常规抗补体免疫荧光试验检查转化细胞 EBV 核抗原(EBNA)。

7 转化细胞 EBV LMP-1 基因片段的检查

7.1 EBV LMP₁ 基因引物 上游引物序列为 5'-GCGGATCCCCCGGGCCT-3',下游引物序列为 5'-AGGGATCCAAGTGGACAG-3',扩增靶基因位置为 169227~169603 之间,扩增片段长度为 367 bp(由本室汤那博士提供)。

7.2 EBV LMP₁ 基因的扩增和检测 取 5×10^5 转化细胞用 pH 7.4 PBS 洗 3 次后置 1.5 ml Eppendorf 管中,加 400 μl 裂解液(0.2 mol/L Tris HCl pH 7.5, 25 mmol/L EDTA, 0.3 mol/L NaCl, 2% SDS 和蛋白酶 K(400 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 56 $^{\circ}\text{C}$ 4 h;饱和酚,酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)各抽提 1 次,取上层水相;加 3 mol/L NaAc 至终浓度 0.3 mol/L,再加 2.5 倍冷无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 3 h 以上;10 000 r/min 10 min,弃乙醇,冷 70% 乙醇洗 1 次(勿冲动沉淀);沉淀置超净工作台风干后 20 μl TE 溶液溶解,制成 DNA 模板, -30 $^{\circ}\text{C}$ 备用。同时用未经转化的 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞制备 DNA 模板作对照。

PCR 反应体积为 50 μl ,依次加入 10 \times Taq DNA 聚合酶 Buffer 5 μl , 10 \times dNTP5 μl , 上、下游引物各 1 μl , DNA 模板 2 μl , 补足三蒸水至 50 μl , 瞬时离心混匀, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 加入 Taq DNA 聚合酶 1.5 u, 50 μl 无菌石蜡油覆盖, 瞬时离心使分层良好。电热三温恒温水槽手工进行 PCR 循环。94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次, 末次循环 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 同时设未经转化的 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞 DNA 模板对照。取 PCR 产物 10 μl 置 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭)电泳, 电压 5 V/cm, 电泳缓冲液 0.5 \times TBE, 40 min, 紫外透射仪观察结果并拍照。电泳时设 PBR³²²/Hinf I DNA 参照标准, 以确定 PCR 产物片段大小。

结 果

1 EBV 转化 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞的生长情况

Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞经 B95-8 细胞培养滤液处理后, 37℃ 5% CO₂ 培养细胞至 10~14 d, 各培养孔陆续出现体积增大, 成堆排列, 折光性增强的转化细胞(图 1), 并逐渐增多。未经 B95-8 转化的 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞未出现此现象。

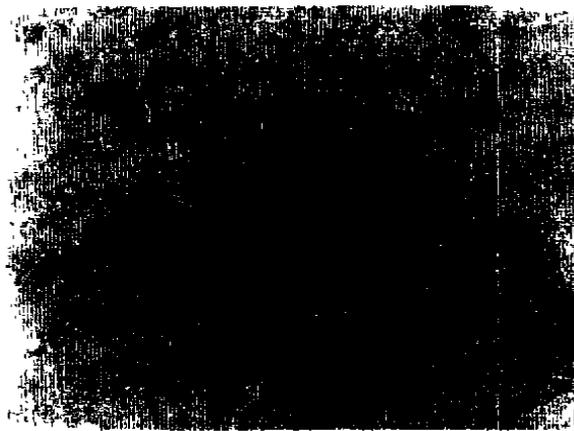


图 1 体外培养经 EBV 转化 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞 100×

Figure 1 *In vitro* EBV-transformed spleen cells from Hu-TLC-SCID mice 100×

2 转化细胞分泌抗 DV₂ 人 IgG 的检测

B95-8 转化 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞第 15 天, 取各培养孔上清 1:5 稀释后间接 ELISA 法检测抗 DV₂ 人 IgG, 其中 5 孔有抗 DV₂ 人 IgG 产生, 阳性率 25% (5/20), 见表 1。

3 转化细胞人 B 细胞标志细胞的检查

应用 LSAB 免疫组化法和免疫荧光法分别检查第 3 代转化细胞 CD₂₀⁺ 和 SmIgG 标志阳性细胞。图 2 可见, 转化细胞涂片中, 有较多细胞的细胞膜呈棕黄色阳性反应; 图 3 观察到大多数细胞的细胞膜呈绿色荧光信号, 证实用 B95-8 转化 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞形成的转化细胞为具有 CD₂₀ 和 SmIgG 的人 B 细胞。

4 转化细胞 EBV 抗原的检查

用 LSAB 免疫组化法和抗补体免疫荧光试验检查第 3 代转化细胞有 EBV LMP₁ 和 EBNA。图 4 显示, 部份转化细胞膜有 LMP₁ 阳性信号; 则图 5 观察到转化细胞核有绿色荧

表 1 转化细胞产生抗 DV₂ 人 IgG 的 ELISA 法检测

Table 1 Identification of anti-DV₂ human IgG production of B95-8 transformed spleen cell isolated from Hu-TLC-SCID mice

细胞培养孔编号 Serial No. of cell culture well	OD 值	
	OD value (490nm) [△]	
	DV ₂ Ag	C6/36 Ag
1	0.26	0.04
2	0.09	0.02
3	0.16	0.02
4	0.13	0.03
5	0.28	0.03

△: 实测 OD 值。OD value original.



图 2,3 转化细胞显示人 B 淋巴细胞标志 (100×)

Figure 2,3 Identification of human B lymphocytes markers on the EBV transformed cells (100×)

Figure 2 CD₂₀⁺(IPS) Figure 3 SmIgG(IFT)

图 4,5 转化细胞显示 EBV 抗原阳性 (100×)

Figure 4,5 Appearance of EBV antigens positive in the transformed cells (100×)

Figure 4 LMP₁(IPS) Figure 5 EBNA(IFT)

光。而未经转化的 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞无相应阳性信号显示, B95-8 标准株细胞对照亦呈现阳性信号。证实转化细胞确已被 EBV 转化, 并可表达 EBV 膜抗原和核抗原。

5 转化细胞 EBV LMP₁ 基因片段的检测

转化细胞 DNA 经 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳, 可见 396 与 344 bp 之间有 1 条特异性电泳条带, 大小约 370 bp, 与原引物设计大小一致; 未转化的对照细胞 DNA 经 PCR 扩增无条带出现(图 6)。

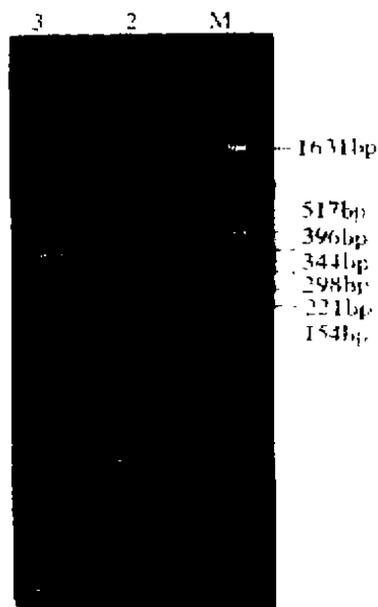


图6 转化细胞 DNA PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Figure 6 Agarose gel electrophoresis of PCR products in the transformed cells.

M: DNA marker (PBR³²²/Hinf I)

2: Hu-TLC-SCID mice spleen cells control

3: EBV-transformed Hu-TLC-SCID mice spleen cells

讨 论

鼠单抗在医学研究中的广泛应用已显示出其重要作用,同时也表现出其固有的局限性。故近年来,hmAb 的研制越来越受到重视。自 1983 年 SCID 小鼠问世以来^[2],已陆续有移植人淋巴细胞给 SCID 小鼠,使其产生抗破伤风类毒素^[3],抗 HBcAg^[4],抗卵白蛋白抗原^[5]等抗体的报道。然而,利用 SCID 小鼠研制 hmAb 的主要目的是设想通过 Hu-SCID 小鼠来解决 hmAb 制备中不易获取任意抗原激活的人 B 细胞的困难,只有获取足够量的能产生特异性抗体的人 B 细胞,将其用于 hmAb 的研制才具有实用意义^[6]。

体外试验已证实,EBV 可转化人 B 细胞,使之获得永生性^[7]。LMP₁ 基因是 EBV 的重要转化基因^[8],本实验通过检测 EBV LMP₁ 基因和 LMP₁,EBNA,证实 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞已被 EBV 转化。

利用 EBV 转化能产生特异性抗体的 Hu-TLC-SCID 小鼠脾细胞,并使之永生,可解决 hmAb 研制中产生特异性抗体人 B 细胞富集的困难。利用此技术路线,进行 hmAb 的研制,也许是我们今后的工作目标。

参 考 文 献

- 1 Greg W, Willian JH. Humanized antibodies. *Immunology Today*, 1993;14(6):243
- 2 Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 1983;301:527
- 3 Carlsson R, Martensson C, Kallioniaki S, *et al*. Human peripheral blood lymphocytes transplanted in to SCID mice constitute an *in vitro* culture system exhibiting several parameters found in a normal humoral immune response and are a source of immunocytes for the production of human monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1992;148:1065

- 4 Croy BA, Percy DH. Diagnostic exercise: viral hepatitis in SCID mice. *Lab Anim Sci*, 1993;43(2):193
- 5 Walker W, Gallagher G. The *in vivo* production of specific human antibodies by vaccination of human-PBL-SCID mice. *Immunology*, 1994;83:163
- 6 Martino G, Anastasi J, Feng J, *et al.* The fate of human peripheral blood lymphocytes after transplantation into SCID mice. *Eur J Immunol*, 1993;23:1023
- 7 Aman P. EBV susceptibility of normal B lymphocyte populations. *J Exp Med*, 1984;159:208
- 8 Christopher J, Ring A. The B cell-immortalizing function of Epstein-Barr virus. *Gen Virol*. 1994;75:1

Transformation of Spleen Cells Prepared from Dengue Virus-2 Immunized Hu-TLC-SCID Mice

Zuo Li* Guo Huiyu *et al.*

(Department of Microbiology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

The spleen cells isolated from SCID mice transplanted with human tonsillar lymphocytes (Hu-TLC-SCID) immunized with dengue virus 2 type (DV₂) *in vitro* and *in vivo* were transformed by Epstein-Barr virus (EBV). Specific human anti-DV₂ antibodies were detectable in the supernatant of the transformed spleen cells. The presence of human B lymphocyte markers (CD₂₀⁺ and SmIgG) as well as EBV antigens (LMP₁ and BENA) and LMP₁ gene fragment in the transformed spleen cells determined by immunoperoxidase staining immunofluorescence technique and PCR technique, indicated that the Hu-TLC-SCID mouse spleen cell has been successfully transformed by EBV. The EBV-transformed Hu-TLC-SCID mouse spleen cell could be utilized for continuous production of specific human anti-DV₂ antibodies *in vitro*.

Key words Hu-SCID mouse, Epstein-Barr virus, Transformation

* Present address; Dept. of Microbiol, Guiyang Medical College, Guiyang 550004