

一株产生 EB 病毒的狨猴淋巴细胞株的建立

孙晓梅 梁悟生[✓] 代解杰 高家鸿

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所, 昆明 650107)

R 373.9

摘要 用 B95-8 细胞株产生的 EB 病毒, 转化棉顶狨猴外周血淋巴细胞, 获得 KMT₃ 细胞株。该细胞株能产生高滴度的 EB 病毒。含 EB 病毒衣壳抗原的自然阳性细胞率为 3~5%, 激活后达 50~60%, 其培养上清液可直接转化人淋巴细胞得到传代细胞系。KMT₃ 细胞染色体数 2n=46 条。

关键词 淋巴细胞, EB 病毒, 转化, 细胞株, 棉顶狨猴

Epstein-Barr (EB) 病毒在试管内可以转化人或某些灵长类动物的淋巴细胞, 使其成为带 EB 病毒的类淋巴母细胞。1972 年 Miller 等^[1]就曾用 EB 病毒成功地转化棉顶狨猴淋巴细胞, 建立了可产生 EB 病毒的 B95-8 细胞株。这株细胞在国内许多实验室被广泛应用, 但由于该株细胞使用时间甚长, 传代次数高, 或已出现染色体丢失、或有支原体污染, 难免会影响细胞的产毒率, 从而影响实验结果。我们用 EB 病毒转化棉顶狨猴淋巴细胞, 得到了一株能产生有转化活性的 EB 病毒传代细胞株——KMT₃ 细胞株, 并对其生物学特性作了研究。

材料与方 法

1 棉顶狨猴外周血淋巴细胞

来自本实验室人工饲养的棉顶狨猴 (*Saguinus oedipus*), 试验时从股静脉采血 2 mL, 肝素抗凝, 以淋巴细胞分离液分离得到的淋巴细胞悬浮于 1 mL 含常规量青霉素和链霉素的 RPMI-1640 溶液内。

2 EB 病毒制备

B95-8 细胞以 $1 \sim 5 \cdot 10^6$ /mL 接种培养 5d 后, 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.45 μ m 孔径的微孔膜过滤器过滤, 即得到用于转化试验的无细胞 EB 病毒液。

3 狨猴淋巴细胞的转化试验

2 mL EB 病毒感染液加入到 1 mL 所分离的淋巴细胞中, 加入免疫抑制剂环孢菌素 A (SAND 02 PHARMA LTD, Basle, Switzerland) 0.2 μ g/mL, 置 37 $^{\circ}$ C 摇床以 40 次/min 速度摇 1 h, 补加含 20% 小牛血清的完全 RPMI-1640 2 mL, 置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱中培养。培养 14 d 后待细胞长成簇状时换液, 其后继续换液或传代。

4 KMT₃ 细胞 EB 病毒衣壳抗原 (VCA) 的检测

根据曾毅等人的方法^[2], 用间接免疫酶法检测, 第一抗体为 VCA 抗体阳性的鼻咽癌病人血清, 第二抗体为 HRP 标记的羊抗人 IgA 抗体 (中国预防医学科学院病毒学研究所提供)。

5 KMT₃ 的核型分析

取对数生长期的 KMT₃ 细胞经秋水仙素 0.4 μ g/mL 处理 1.5~2 h, 收集细胞, 按常规方法制备染色体。以同样方法制备 B95-8 细胞染色体作比较。

6 KMT₃ 的 EB 病毒电镜观察

KMT₃ 细胞培养至总溶液 30 ml, 后置 30℃ 孵箱饥饿一周, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液至另一离心管, 10 000 r/min 离心 30 min, 2℃, 弃 29 ml 上清液后沉淀物充分混匀, 通过 0.45 μm 孔径过滤器后直接负染, 电镜观察

结 果

1 KMT₃ 细胞株的建立

EB 病毒转化的猕猴淋巴细胞, 经 CO₂ 孵箱培养两周后, 光镜下可见多个淋巴细胞增殖集落, 细胞体积也明显增大。用含 15% 小牛血清完全 RPMI-1640 液传代培养, 建立了一株悬浮生长的细胞株-KMT₃ 株(图 1)。该株细胞每隔 3~5 d 传代一次, 细胞经连续传代 45 代或复苏后连续传代 67 代均生长良好, 细胞多为圆形, 少数呈梭形, 折光性强。

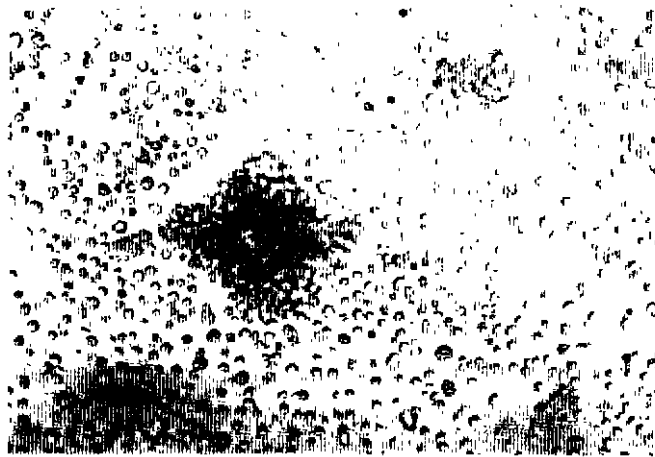


图 1 KMT₃ 细胞株生长情况

Fig 1 KMT₃ cell in culture medium (×200)

2 KMT₃ 细胞 EB 病毒衣壳抗原的表达

分别检查 KMT₃ 细胞在自然状态和激活状态下 EB 病毒衣壳抗原表达情况, 并与 B95-8 细胞作比较。0.04 mol/L 正丁酸和 500 ng/mL 浓度的巴豆油激活剂同时加到 KMT₃ 和 B95-8 细胞培养液中

表 1 KMT₃ 细胞株和 B95-8 细胞株 VCA 阳性率的比较

Table 1 Comparison of VCA-positive cell rate of KMT₃ cell line with B95-8

细胞株 Cell line	自然阳性细胞率(%) Positive cell rate in nature(%)	激活后阳性细胞率(%) Positive cell rate after activation(%)
KMT ₃	3~5	50~60
B95-8	1~2	30~40

激活细胞^[3], 培养 48 h 后收获细胞, 涂片、用间接免疫酶染色法, 染色后观察显色反应。3 次试验结果的阳性细胞范围见表 1。从表中可见 KMT₃ 细胞 VCA 阳性细胞率在激活前后均明显高于 B95-8 细胞。

3 染色体计数及核型分析

光镜下分别观察 100 个 KMT₃ 细胞和 B95-8 细胞的中期分裂相,统计众数细胞所占比例,结果见表 2。KMT₃ 细胞中,二倍体染色体数目为 46 条的占计数细胞的 74%,核型见图 2。KMT₃ 细胞系来自一雄性棉顶狨猴,结果表明,KMT₃ 细胞的核型与同种动物原代外周血淋巴细胞的核型完全相同^[4]。而 B95-8 细胞中,76%的细胞染色体数目已减少为 45 条。



图 2 KMT₃ 细胞染色体组型

Fig 2 Karyotypes of KMT₃ cell line

表 2 KMT₃ 细胞与 B95-8 细胞染色体数目的比较

Table 2 Comparison of chromosomes number of KMT₃ cell line with B95-8

细胞株 Cell line	观察细胞数 No. of cells examined	染色体数目 Chromosome number					
		43	44	45	46	47	48
KMT ₃	100	2	5	13	74	4	2
B95-8	100	7	12	76	5		

4 KMT₃ 的 EB 病毒电镜观察结果

KMT₃ 细胞培养上清经 30 倍浓缩后直接电镜观察(图 3)。可在同一视野下观察到多个 EB 病毒颗粒。

5 KMT₃ 细胞培养上清的转化作用

KMT₃ 细胞以 $1-5 \times 10^6/\text{mL}$ 接种培养 5 d 后收集上清,2 000 r/min 离心 10 min,过 0.45 μm 孔径的微孔滤器,制备的 EB 病毒感染液以同样方法转化成人外周血淋巴细胞,结果 KMT₃ 细胞上清能致类淋巴母细胞生长并无限传代,证明 KMT₃ 细胞释放的 EB 病毒具有转化活性,即具有感染性。

讨 论

EB 病毒在体外转化人 B 细胞系的方法,目前已广泛应用于单克隆抗体分泌细胞系的建

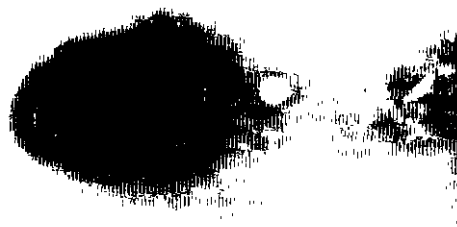


图3 KMT₃细胞释放的EB病毒的电镜照片(5600·)

Fig 3 Electron micrograph of EB virus from KMT₃ cell (5600·)

立和研究^[5]以及人类永生细胞系的建立等诸方面。我们用一只血清EB病毒IgA/VCA阴性的雄性棉顶猴淋巴细胞建立了一株活性好、产毒率高的细胞株——KMT₃细胞株,在国内属首次报道。建株方法也有所改进:第一,EB病毒感染液加入到淋巴细胞中孵育1h后不弃除上清液,直接补加含20%小牛血清的RPMI-1640液继续培养;第二,从外周血分离的淋巴细胞不需用E花环等方法除去T细胞,而是加入免疫抑制剂环孢菌素A,它具有抑制T淋巴细胞的功能^[6],因而提高了细胞的转化效率。

建立的KMT₃细胞株经细胞遗传学分析表明,KMT₃细胞核型与同种动物原代外周血淋巴细胞的核型完全相同。而B95-8细胞株多数细胞的染色体数目减少为45条,可能是由于B95-8细胞在长期传代培养过程中染色体丢失所致,这种丢失是否影响了它的EB病毒衣壳抗原的表达,还有待进一步研究。

KMT₃细胞所释放的EB病毒与B95-8株一样,可在体外直接转化人B淋巴细胞,而其衣壳抗原(VCA)阳性细胞率激活前为3~5%,激活后为50~60%,均比B95-8细胞高出一倍,因此,在临床检验中用间接免疫酶法检测Burkitt淋巴瘤、鼻咽癌及传染性单核细胞增多症病人血清相关抗体时用KMT₃细胞作为靶细胞,比用B95-8细胞更为灵敏。其次,KMT₃细胞作为EB病毒的生产株,也适用于B细胞系的转化试验。

致谢 本研究得到中国预防医学科学院病毒学研究所曾毅教授、叶树清老师的大力帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Miller G, Shope T, Lisco H *et al*. Epstein-Barr Virus: Transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1972, 69:383
- 2 曾毅. 应用免疫酶法和免疫放射自影法普查鼻咽癌. *中华肿瘤杂志*, 1979, 1:1
- 3 曾毅, 苗学谦, 焦伟等. 土壤中含 EB 病毒的检测. *病毒学报*, 1985, 1:122
- 4 陈宜峰, 郭健民. 哺乳动物染色体. 北京: 科学出版社, 1986, 56
- 5 Crawford DH. Production of Human Monoclonal Antibodies Using Epstein-Barr Virus. In: Engleman E G *et al* eds. *Human hybridomas and monoclonal antibodies*. New York: Plenum Press, 1985, 37
- 6 Rickinson A B, Rowe M, Hart I J *et al*. T-cell-mediated regression of "spontaneous" and of Epstein-Barr Virus-induced B-cell transformation *in vitro*: Studies with cyclosporin A. *Cell Immunol*, 1984, 87:646

Establishment of a Marmoset Lymphoblastoid Cell Line Releasing Transforming Epstein Barr Virus

Sun Xiaomei Liang Wusheng Dai Jiejie Gao Jiahong

(*Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College,
Institute of Medical Biology, Kunming 650107*)

Abstract A lymphoblastoid cell line (KMT₃) was established by EBV-induced B-cell transformation in the cotton-top tamarin. The viruses were prepared from the culture fluid of B_{95.8} cells by passing through a 0.45 μm filter. KMT₃ can produce high titer infections EB viruses. Its VCA-positive cell rate was 3~5% in natural and 50~60% after activation. Human B lymphocytes could be immortalized directly from KMT₃ supernatant. The number of chromosomes was 46.

Key words Lymphoblastoid, Epstein Barr Virus, Transformation, Cell line, Cotton-top tamarin