

转染技术的应用——建立免疫细胞传代株

丁桂凤

(北京医科大学免疫教研室, 北京)

巨噬细胞是参加免疫应答的重要细胞成分,它具有传递抗原、启动免疫反应,产生多种可溶性因子以增强或抑制淋巴细胞的反应,因而在免疫反应中起着调节的作用。据此,称巨噬细胞为免疫反应的起始细胞(Initiator)或效应细胞(Effector)、调节细胞(Regulator)。免疫学研究在本世纪60—70年代,在免疫球蛋白的结构与功能和淋巴细胞亚类的研究取得很大进展。在现有的新方法和新技术的基础上人们预言,80年代将是巨噬细胞研究的黄金时代。无论在人类或实验动物的依赖胸腺的免疫反应中,巨噬细胞和其他免疫细胞之间有着紧密的相互关联的作用。这种相互作用可概括为下述四个方面:

1. 单纯的 T 淋巴细胞不能对抗原或非特异刺激物起反应。只有在与携带有抗原或其他刺激物的巨噬细胞相接触才能活化、增殖。

2. 免疫反应基因(Immune Response genes; Ir genes)控制机体免疫反应发生,主要是通过巨噬细胞表面存在的,由免疫反应基因编码产生的抗原物质而发挥作用。

3. 巨噬细胞表面存在有多种细胞膜表面受体。例如对 IgG 的 Fc 受体,该细胞膜受体可增强对感染因子的杀伤或吞噬作用。

4. 巨噬细胞能分泌多种生物活性复杂的可溶性因子。它们可影响免疫反应的强弱,并直接与慢性过敏或炎症反应的临

床和病理变化有密切关系。

用传代细胞株研究巨噬细胞功能特性的历史

多年来影响开展巨噬细胞功能研究的主要障碍是细胞来源困难。特别是人类的单核细胞,在循环血中数量极少。应用初代细胞进行研究常因细胞成分不均一,结果不理想。在此以前还没有可利用的、保有完整生理功能的细胞株。人们曾用多种方法试图建立体外培养的巨噬细胞传代株,作为巨噬细胞研究的稳定的细胞供应库,但迄今尚没有满意的结果。

1970年Stone和Mauel等^[1,2]用 SV₄₀ 病毒转化小鼠腹腔巨噬细胞,建立传代细胞株,经功能鉴定,证明该细胞有吞噬作用,能产生溶菌酶和酸性磷酸酶,具有 C₃ 受体,故确认其为巨噬细胞传代株。例如常用的 IC-21 株,就是用 SV₄₀ 病毒转化建立的传代株。1975年 Koren 从甲基胆蒎人工诱发的淋巴肉瘤中培养出一株巨噬细胞样的传代株,具有明显的 ADCC 作用,能产生 IL-1,命名为 P388D1 株^[3]。同年 Ralph 从 BALB/c 小鼠的网织细胞肉瘤中获得巨噬细胞株(J₇₇₄),后被多人引用于遗传学研究。同年获得来自人类淋巴肉瘤的巨噬细胞传代株 U₉₃₇。1978年 B. Diamond^[6] 用小鼠骨髓瘤细胞与初代脾

本文于1987年7月9日收到。

巨噬细胞经杂交融合方法建成小鼠巨噬细胞传代株 FC-1 株。总之, 在此以前人们获得巨噬细胞传代株的方法是经病毒感染、从天然或人工诱发的肿瘤细胞中培养, 用杂交融合技术获得。上述三种方法建立的传代株虽已报告做了多方面的工作, 但是这些细胞因癌变或因融合有骨髓瘤细胞成分, 虽然保有某些巨噬细胞的特性, 但与正常巨噬细胞相比功能多有不同, 特别是在有关抗原传递功能研究上多不理想。因此, 其后 B. Diamond 等人综合了近年来发展起来的杂交和遗传工程的方法, 建立了应用 DNA 片段转染的技术 (Transfection technique) 建立传代细胞株, 其后又连续应用 SV40 DNA 转染成功人类血液单核细胞和人类骨髓的单核细胞^[8-10]。建株后的细胞在体外繁殖很快, 24—48h 细胞即可增加一倍, 经形态、染色体、细胞表面受体与表面抗原鉴定, 证明是具有巨噬细胞特性的细胞株。

转染技术简介

转染技术是继应用杂交瘤技术制备单克隆抗体广泛开展以来衍生出的新方法。它综合了杂交瘤与遗传工程的特点, 用杂交技术使细胞膜融合, 人工地将病毒基因片段 (如 SV₄₀ DNA) 或肿瘤基因 (如 C-myc gene) 驱使进入细胞, 使培养的细胞获得外来的基因片段后, 改变原有的分裂繁殖特性, 而能长期、快速地在体外分裂生长。转染技术的基本步骤有下述四方面:

1. 获得单核细胞: 实验动物的脾细胞、血液、骨髓或人类的血液单核细胞或骨髓细胞均可用常规方法用分层液 (泛影葡胺和聚蔗糖混合, 比重为 1.077) 经离心取得单个核细胞。为获得足够量的单核细

胞, 用分层液分离时, 离心转速不宜太高, 时间不宜太长 (以 1500rpm, 15min 为宜)。

2. 制备 DNA 的磷酸钙沉淀: SV₄₀ DNA、C-myc 基因片段、胰岛素基因或从 U₉₃₇ 传代细胞中用酚提取的 DNA, 均经超声断裂成小片段, 应用时使之与磷酸钙结合成沉淀物, 这样有利于透入细胞膜。

3. 将 DNA 磷酸钙沉淀物加入到要转染的细胞悬液中, 充分混合后, 离心去除上清。在细胞沉积物中加入细胞融和剂 (50% PEG 和 0.5% DMSO) 促使细胞膜融合, 从而使 DNA 进入细胞内。此两种物质对细胞毒性较大, 应严格掌握作用时间, 一般不超过 90 秒, 其后迅速加入缓冲盐水, 以终止聚乙二醇 (PEG) 的作用。

4. 将上述细胞放入含有 5% 单核细胞生长因子的培养基内培养。人类单核细胞生长因子系用 GCT 培养基 (GIBCO, Grand Island, NY) 此系来自一株人类肺巨大细胞瘤传代株的培养上清液。小鼠的单核细胞生长因子 CSF-1 (colony Stimulating Factor) 系来自 L- 细胞培养上清液。在这些生长因子的刺激下, 培养的细胞至少经过一个分裂周期, 即能将外来的 DNA 整合到细胞的 DNA 中去。

从我们自己的实践经验来看, 应用不同来源的 DNA (来自病毒的或是细胞的) 可转染不同类型的细胞。如用 SV₄₀ DNA 已转染成功小鼠的巨噬细胞, 人类血液或骨髓的单核细胞, 和有单核细胞功能缺损的病人的血液单核细胞。用 C-myc 基因和胰岛素基因也已转染成功人类血液和骨髓的单核细胞。这些转染成功而建株的细胞, 由于在培养基中均加入了 GCT (人类单核细胞生长因子) 所以上述各种来源的细胞经鉴定均具有巨噬细胞的特性。但是其中有两株从人类骨髓细胞经转染后得到

的单核细胞传代株尚含有 2—5 % 能与绵羊红细胞形成玫瑰花环的 T 淋巴细胞, 此两株细胞与单克隆抗体 OKT11 结合, 用兔抗鼠荧光抗体染色亦为阳性。说明此两株细胞具有 T 淋巴细胞的成分。这一结果说明用 DNA 片段转染不仅可获得单核细胞传代株, 也可获得淋巴细胞传代株。因此说明转染技术可用于获得各种类型的免疫细胞传代株, 甚至可用于培养其他组织细胞 (如神经组织和内分泌腺), 建成长期体外培养的传代株也不是不可能的。

用转染技术建立的人类单核细胞传株的生物学特性鉴定

细胞经转染处理, 接受了外源的 DNA 后, 经体外培养约 7—8 周后即开始迅速增殖。而没转染的细胞约在 1—1.5 个月即死亡。经转染建株的细胞经大量扩增, 一部分放液氮中冻存, 另一部分即可进行生物学特性的鉴定。鉴定的步骤和指标也很重要, 因为转染建株的目的是为了获得有某种重要功能特性的细胞株。而细胞株的功能特性需要依赖稳定可靠的鉴定指标来证实。我们应用转染技术建成的传代株应用了下述各种鉴定指标。

(一) 应用 SV₄₀ DNA 片段转染了一名单核细胞功能缺损患者血液的单核细胞成功建株 (LR 株)。该株细胞系来自一名慢性肉芽肿患儿。据文献报告该患者的单核细胞因产生 H₂O₂ 功能缺损, 故患者抗感染功能大大降低。患儿多因反复感染而丧生。该病多发现于儿童, 我们用 SV₄₀ DNA 转染而建立的 LR 株经用萤光法测定, 即莨菪亭 (Scopoletin) 经过氧化物酶催化下, 被 H₂O₂ 氧化产生的萤光大小变化而证实这株细胞缺乏产生 H₂O₂ 的能力。该传代细胞株的建立, 为该病病

因及发病机理研究和治疗的可能性开辟了一条新的途径。

用 C-myc 基因转染人类血液单核细胞成功建株 (JG 株)。这是迄今第一次应用 C-myc 基因转染人类血液单核细胞成功。经功能及表面标志鉴定, 它具有人类单核细胞的功能特性。

(二) 应用三种不同的 DNA 片段 (包括 SV₄₀ DNA、C-myc 基因、胰岛素基因) 转染人类骨髓细胞建立了四株单核细胞传代株。骨髓内的多能干细胞是各种免疫细胞的发源地。骨髓细胞成分复杂。且处于不同的分化阶段, 用外源性 DNA 片段转染, 可获得有不同功能特性的单核细胞传代株。在我们已建立的四株传代细胞中, BM6 是用病毒基因 (SV₄₀ DNA) 转染的, BM₇ 是肿瘤基因 (C-myc) 转染的, 另外两株 BM₁₂ (C-myc) 和 BM₁₂ (Insulin) 是来自一个供体的骨髓细胞, 同时用两种基因转染的。这四株骨髓来源的细胞株均用单核细胞生长因子 (GCT) 刺激增殖。故大部分细胞成分是单核细胞。如果在转染时, 用不同的生长因子如 TCGF 或 BCGF, 也许能从转染的细胞中选出某种淋巴细胞传代株来。从目前的实验结果来看, 在转染的骨髓细胞中有玫瑰花阳性的细胞, 上述经转染获得淋巴细胞传代株的可能性是存在的。

(三) 经转染后建株的细胞功能特性的鉴定。转染成功建株的细胞, 一般在转染处理后 7—8 周的培养即可看出结果, 在此期间, 未经转染的细胞逐渐死亡, 而经转染后的细胞突然增殖加快, 此时可由 24 孔板转移至小平皿或细胞培养瓶内扩增。细胞大量繁殖后, 冻结保存即可开始鉴定, 人类单核细胞传代株的鉴定项目如下:

1. 形态学鉴定: 用细胞离心机将细胞固定在载玻片上, 经姬姆萨染色观察,

可见有单核细胞的形态学特点。经扫描电镜或透射电镜观察可看到单核细胞的胞浆内含物、线粒体、溶酶体、吞噬小体等。细胞表面皱褶很多。丰富的绒毛状突起使单核细胞膜具有易于扩展和粘附的特性。另两株骨髓来源的细胞株 BM₆、BM₁₂ (C-myc) 与绵羊红细胞作用可形成玫瑰花环。观察花环中心细胞形态具有淋巴细胞的特点。且具有人类细胞染色体的数目或形态学特点。

2. 酶产生能力: 巨噬细胞能产生多种酶类, 经非特异酯酶染色后单核细胞呈棕黄色为阳性, 而淋巴细胞应为阴性。胶原酶分析是将细胞制成 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 的悬液, 在干冰酒精及 37°C 水溶中反复冻融, 然后用胶原酶测定药盒 (New England Nuclear, Boston, MA), 以提纯的蝌蚪胶原酶活性的标准曲线为准计数出细胞冻融液中胶原酶的含量。过氧化物酶染色法是将固定于载玻片上的细胞用 2:1 丙酮比甲醇液固定 12min (在 -20°C), 然后用 0.01M 的磷酸盐缓冲盐水溶解二氨基联苯胺 ($0.5\text{mg}/\text{ml}$) 混有 $0.1\%\text{H}_2\text{O}_2$, 滴于玻片上 30min, 以人类末梢血涂片中的嗜中性粒细胞做为阳性对照。溶菌酶测定是将各株细胞培养上清液, 滴加于混有溶壁细胞菌的琼脂孔中, 以鸡卵蛋白溶菌酶为阳性对照, 测定琼脂孔周围溶菌环大小, 决定溶菌酶活性的高低。

3. 细胞表面抗原测定: 应用荧光活化细胞检出器 (FACS) 检查各株细胞表面抗原。先用单克隆抗体 OKM1, 和抗 DR 染色后, 检查各株细胞均为阳性, 而部分细胞与绵羊红细胞形成玫瑰花环的, 其细胞表面 OKT11 抗原亦为阳性。

4. 细胞表面受体检查: 经 IgG 致敏的绵羊红细胞与单核细胞表面的 IgG-Fc 受体结合形成玫瑰花 (EA-rossette)。用此

法计数各细胞株表面带有 IgG-Fc 受体的细胞百分数。然后用 3:1 的 Hanks 液加蒸馏水低渗法溶解细胞表面的绵羊红细胞, 再计数细胞内吞噬的绵羊红细胞即可检查 Fc 受体介导的吞噬作用。如果在致敏的绵羊红细胞内入小鼠补体, 制成 EAC 玫瑰花细胞, 则可测定单核细胞表面的补体受体。同上法可测定补体受体介导的吞噬作用。BM₆ 和 BM₁₂ (myc) 两株细胞均用常规的 E 玫瑰花试验方法检查细胞表面绵羊红细胞受体情况。

5. 淋巴因子和单核因子检查: 各株细胞在 $10^6/\text{ml}$ 浓度时, 培养 72h, 离心取上清液, 可测定各株细胞培养上清液中含 IL-1 和 IL-2 的情况。此外, 单核细胞在有 大肠杆菌脂多糖 (LPS) 等刺激物作用下, 分泌 IL-1 的量将大大增加。IL-1 活性的测定是应用经 conA 活化的小鼠 (C₃H/HeJ) 胸腺细胞增殖反应的方法, IL-2 活性是应用 CTL 细胞株 (IL-2 依赖细胞株), 两种因子活性的高低均根据 ^3H -TdR 掺入多少来决定。测定时均设有标准的 IL-1 和 IL-2 的对照。

6. 检查细胞株表面携带 Ia 抗原的方法: 用抗 Ia 的单克隆抗体和补体介导的细胞毒方法观察细胞株表面携带 Ia 抗原的情况。细胞表面 Ia 抗原阳性者可被抗体和补体杀死。此外, 也可用混合淋巴细胞培养法测定, 细胞株表面 Ia 抗原可刺激 T 淋巴细胞发生转化反应, 且此反应可被抗 Ia 血清所阻断。

用转染技术建立巨噬细胞传代株的意义

获得处于不同分化阶段而具有不同生理功能的巨噬细胞株对于细胞免疫研究有重要意义。这些细胞可提供源源不断的,

成分均一的细胞供研究应用。传代细胞株经克隆化后,可以获得生物学功能不同的变异细胞株,并可进一步了解与此变异有关的基因型和生化特性的改变。另外由于传代细胞株可大量地,无限制地体外繁殖使人们获得足够数量的生物活性因子,因而可进一步从事生物鉴定和功能的研究。从我们的上述实验结果看,获得来自人类血液或骨髓的巨噬细胞株经克隆化后,有可能进一步分离纯化而获得淋巴细胞和巨噬细胞株,以便进一步进行各类免疫细胞间的相互协作和抗原传递功能及对抗原刺激的反应性等的研究。

转染技术综合了杂交瘤和遗传工程的特点,经转染的细胞仍保留原来的特性。且繁殖速度很快。从目前已得到的细胞株来看,利用这些细胞作巨噬细胞功能研究及其亚类的鉴定较之用经其他途径得到的

细胞株实验结果更理想。当然,经转染方法建立细胞株应用的时间还只有2—3年,目前结果还只是初步的。

转染技术推广应用于其他生物医学领域的可能性也是令人乐观的。例如用转染方法建立内分泌腺细胞株,甚至神经细胞的传代株也是可能的,这样建立的体外研究模型为相关疾病的研究开辟了新的途径

转染的方法系人工引进带有LTR启动子的外来基因,使正常细胞分裂繁殖特性改变,这对于细胞癌变机理研究也是一条新的途径,即探讨究竟细胞癌变是因外来致癌基因掺入,还是外来的启动子活化细胞本身的基因而使其功能改变。在这一思路下,进一步应用单纯的LTR启动子经转染的方法作用于正常细胞,观察其变化,不能不说明是研究细胞癌变机理的新途径。

参 考 文 献

- [1] Stone, L. B. et al., *J. Virol.*, 6:621, 1970.
- [2] Mauel, J. et al., *J. Exp. Med.*, 134:335, 1971.
- [3] Klebenoff, S. J. et al., *Mononuclear Phagocytes*, edited by R. Van Furth Oxford:Blackwell, 1975 p.507, 1975.
- [4] Ralph, P. J. et al., *J. Immunol.*, 114:989, 1975.
- [5] Ralph, P. J. et al., *J. Exp. Med.*, 143:1528, 1976.
- [6] Diamond, B. et al., *J. Immunol.*, 121:1329, 1978.
- [7] Schwarzbaum, S. et al., *J. Immunol.*, 132:1158, 1984.
- [8] Nagata, Y. et al., *Nature*, 306:597, 1983.
- [9] Nagata, Y. et al., In "Macrophage Biology" Preceeding of tenth international congress of the IURES, p.665, 1985.
- [10] 丁桂凤, 北京医科大学学报, 18(4):281, 1986.