

《生物工程讲座》(VI)

——细胞工程(二)

淋巴细胞杂交瘤及其应用

丰美福 王海云

(中国科学院动物研究所)

自1970年代中后期首先在美国掀起的生物工程的热浪今天正席卷着全世界。作为生物工程主体之一的细胞工程,由于淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体的产生和发展,也在迅速崛起。细胞工程所涉及的内容很广,包括细胞培养,细胞拼合,细胞融合,染色体导入和基因转移等等,难以下一个确切的定义。一般说来,它是借助于细胞生物学和分子生物学方法,通过现代工程技术设计手段,按着人类意图,有目的地培养,改造或重建细胞,以期获得具有人类所需要的、某些特性或功能的细胞,及其产品的具有工艺性质的一门生物技术科学。所以细胞工程决不限于淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体。但是,由于它们在细胞工程的发展中占有重要的地位,因此下面的篇幅首先集中介绍这一方面。

一、淋巴细胞杂交瘤的发展

早在十九世纪初,对于多核细胞的发现使人们想到在体细胞间可能会发生融合。但是杂交的体细胞一直没有被发现。到二十世纪六十年代,岡田(Okada 1958)首次证实经紫外线灭活的仙台病毒(Sendia Virus)在体外能使细胞发生融合。

1960年,法国巴斯基(Barski 1960)等人报道了在体外自发的细胞融合,并成功地分离出一个杂交细胞株。此后,不少学者进行了一系列细胞融合试验,融合技术开始被研究和发展。

1964年,里脱菲尔德(Littlefield)^[8]利用

酶缺陷型的亲本细胞进行杂交,首创了选择杂交细胞用的HAT培养基(H-Hypoxanthine次黄嘌呤, A-Aminopterin氨基喋呤, T-Thymidine胸腺嘧啶脱氧核苷),从而大大的促进了细胞融合技术的发展。

1973年,密尔斯坦和柯吞(Milstein和Cotton)从大鼠和小鼠骨髓瘤细胞融合得到的杂交细胞中证实:二个亲代的重链和轻链随机地组成杂交免疫球蛋白分子,但没有混合链。即杂交瘤细胞总是只合成从一亲代细胞来的原有的可变区(V区)和恒定区(C区)所构成的重链和轻链。这说明杂交瘤能保持其亲本原有的特异性。

1975年,科勒和密尔斯坦(Köhler和Milstein)^[7]报道他们将小鼠免疫脾细胞(抗羊红细胞)与小鼠骨髓瘤细胞($P_3-X_{63}-Ag_8$)融合,首次成功地获得了一株按照人类意图在试管内定向产生预定特异性——抗羊红细胞单克隆抗体的杂交瘤细胞株,即淋巴细胞杂交瘤,它的诞生宣告了免疫学史上又一场巨大的技术革命,开创了单克隆抗体研究的新纪元。

在此基础上,人们尝试运用细胞融合技术于T淋巴细胞,期望得到具有抗原特异性的不同功能的T淋巴细胞杂交瘤株,也获得成功。1978年坦尼古切和密勒(Taniguchi和Miller)^[10]等人首次进行了成功的报道。从此,T、B淋巴细胞杂交瘤技术犹如雨后春笋般地蓬勃崛起,在生物学、医学的各个领域中日益展现出它的无限生命力。

二、单克隆抗体和抗原特异性

T 细胞克隆

(一) 机体的免疫反应 简单讲机体的免疫反应即是机体对自身和异己(包括异种、异体等)物质所产生的种种识别和反应,包括体液免疫和细胞免疫。若人为的划分, B 淋巴细胞主要与体液免疫有关, T 淋巴细胞主要与细胞免疫有关,同时也参与体液免疫反应。

(二) 单克隆抗体——体液免疫反应的产物 伯纳特(Burnet)关于抗体形成的克隆选择学说认为: B 淋巴细胞在成熟过程的早期便形成数以百万计不同的 B 淋巴细胞,每株 B 细胞系只能产生一种针对它能够识别的特异性抗原决定簇的抗体。这种由一个祖先细胞通过无性繁殖形成的细胞集群称为“克隆”,而从一个克隆系产生的抗体即为单克隆抗体。

当一个外源物质(如细菌、病毒和蛋白质等)进入机体后,由于每一种大分子都具有多个抗原决定簇,从而激发 B 淋巴细胞形成许多不同的浆细胞群,各自分泌针对不同抗原决定簇的抗体进入血液,这种血清即为含有多克隆抗体的混合血清。

(三) 抗原特异性 T 细胞克隆——细胞免疫的效应细胞 T 淋巴细胞可区分为若干不同的亚群。例如:具有细胞毒杀伤作用的 T 细胞(T_c),辅助 B 细胞产生抗体的 T 辅助细胞(T_H),

具有免疫抑制作用的 T 抑制细胞(T_s)等等。它们在功能上各异,但又彼此协同和制约。

T 细胞的功能具有抗原特异性,和 B 细胞一样,单一的 T 淋巴细胞只有有限种类的抗原受体。就 T 细胞总体而言,却又能识别众多不同的抗原结构。T 细胞一般不能直接识别水溶性或颗粒性抗原,须经巨噬细胞的处理和加工。对于 T_H 和 T_c 则还须要同时识别抗原和抗原提呈细胞表面自身的主要组织相容性抗原(在小鼠为 H-2,人为 HLA),也即 T 细胞的双识别功能。

当抗原刺激机体后,不同功能的 T 细胞亚群先后被激活产生免疫应答。其间经历一个特异性 T 细胞克隆的膨胀或扩增阶段,并获得免疫记忆。应用 T 淋巴细胞杂交瘤技术,通过选择,可得到具有某种抗原特异性的不同功能的 T 杂交瘤细胞

三、淋巴细胞杂交瘤的原理、制备及要点

(一) 原理

1. 杂交亲本的选择

杂交的一方取自经特定抗原免疫动物的脾细胞或淋巴结细胞,它们含有能分泌针对特定抗原决定簇的抗体细胞(B 淋巴细胞→浆母细胞→浆细胞→抗体)和对特定抗原具有特异识别作用的各种 T 细胞(例: T_H 、 T_s 、 T_c 等),这

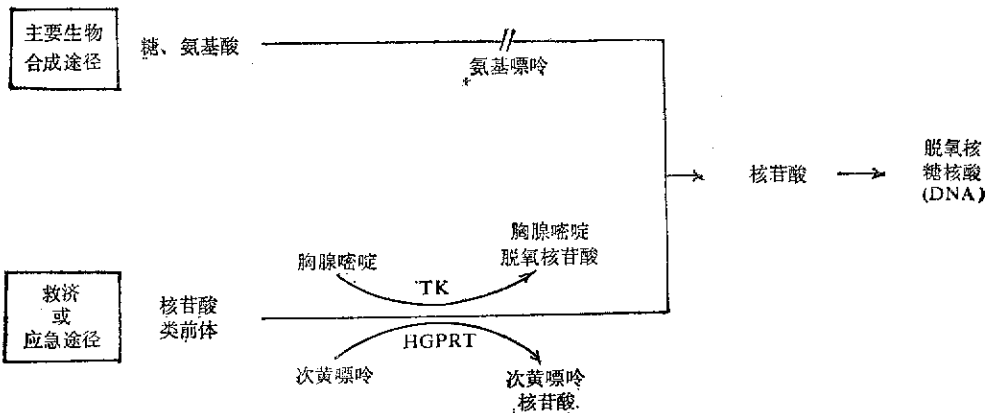


图1 细胞内 DNA 生物合成简图

1. TK 胸腺嘧啶核苷激酶; 2. HGPRT 次黄嘌呤(鸟嘌呤)磷酸核糖转移酶。

些细胞在体外均不能长期成活。

杂交的另一方为骨髓瘤细胞（一种浆细胞瘤，用于B细胞杂交）或胸腺瘤细胞（一种T细胞瘤，用于T细胞杂交）。它们在体外能迅速增殖和传代。

当一个具有特异功能的免疫淋巴细胞与一个癌细胞相融合产生一个杂交瘤细胞，它在遗传上从正常免疫淋巴细胞获得特异功能（分泌抗体或具有特异性识别功能的T细胞，后者又能分泌各种特异性的起免疫调节作用的淋巴因子），从癌细胞获得不断迅速分裂和繁殖的能力。这种结合可以保证几乎“无止境”地供应产生特异抗体的B细胞或抗原特异性的T杂交瘤细胞。

2. HAT 选择系统 已知细胞合成 DNA 的途径有二条（见图 1）。

(1) 主要生物合成途径，即由糖、氨基酸→核苷酸→DNA（由磷酸、脱氧核糖和碱基组成）。这一正常合成途径可因加入叶酸的拮抗物——氨基喋呤（A）或氮丝氨酸而被阻断。因为叶酸衍生物是合成核苷酸类必须的媒介物，它参与嘌呤环的合成。

(2) 救济或应急途径。当上述正常途径被切断时，细胞可通过这一替代途径合成核苷酸。即在次黄嘌呤（鸟嘌呤）磷酸核糖转移酶（HGPRT⁺）和胸腺嘧啶（脱氧核糖）核苷激酶（TK⁺）的作用下，利用培养液中提供的核苷酸前体如：次黄嘌呤（H）和胸腺嘧啶脱氧核苷（T）来合成核苷酸类。但若缺乏其中之一酶（HGPRT⁻或TK⁻）DNA合成即停止。

为了便于融合后的筛选和避免培养物最终被未融合的癌细胞的过度生长而耗尽，骨髓瘤或胸腺瘤细胞采用经筛选后所得的一种突变型株，它们缺乏合成核苷酸所须的某些酶如：HGPRT⁻或TK⁻。

在 HAT 培养基中，作为融合一方的免疫脾细胞其合成DNA的主要途径被氨基喋呤(A)所切断，但因含有 HGPRT⁺和TK⁺仍能合成DNA，然而淋巴细胞在一般组织培养条件下不能存活。而另一方的骨髓或胸腺瘤细胞株，其

合成 DNA 的主要途径也因加入氨基喋呤(A)被切断。同时另一替代途径则因缺乏 HGPRT⁻或TK⁻，不能合成完整的DNA，而死于含氨基喋呤(A)的培养基中。

融合产生的杂交瘤细胞，从亲本骨髓瘤细胞获得不断增殖的能力，而从亲本淋巴细胞获得合成DNA的能力(HGPRT⁺TK⁺)，所以只有杂交瘤细胞能在HAT培养基上存活并繁殖。

对于产生单抗的B细胞杂交而言，其骨髓瘤亲本的另一特点是经筛选而来的一种本身不分泌免疫球蛋白的突变型，如：小鼠的SP2/0

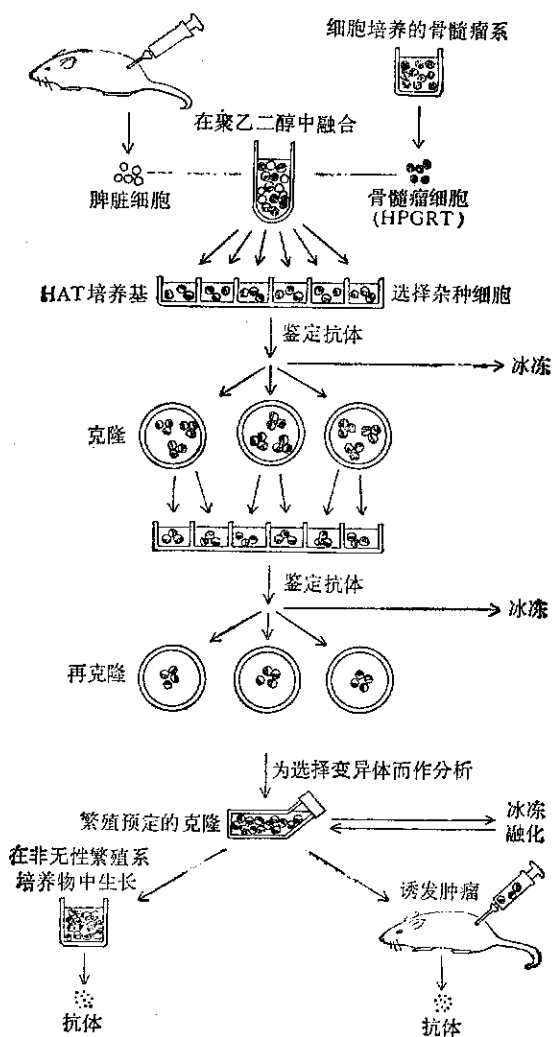


图2 淋巴细胞杂交瘤制备流程图

(引自科学“中译本”，1981年第二期，第27页)

和大鼠的 YB2, 这样又可进一步减轻杂交后筛选工作量。

(二) 淋巴细胞杂交瘤的制备 (见图 2)

免疫淋巴细胞和骨髓瘤或胸腺瘤细胞一般按 5—10:1 的比例在聚乙二醇 (PEG) 作用下进行融合。融合后细胞在 HAT 培养基中置于 CO₂ 培养箱内培养。几天后未融合的亲本细胞均死于 HAT 中, 只留下融合后的杂交瘤细胞。迅速鉴定出其中感兴趣的杂交瘤细胞, 进行克隆和再克隆, 并部分冻存于液氮中。最后把经全面鉴定所得到的克隆进一步扩大培养或批量生产, 用于体内外的各种试验或临床实践。

一般用于融合的骨髓瘤细胞系小鼠源的有: P3NS1-Ag4.1 (简称 NS1) x63/Ag8.653, SP2/0-Ag14 (SP2/0) 等。大鼠源的有 Y132/3.0/Ag20 等。胸腺瘤细胞系在小鼠源的有 BW 5.47 (来自 AKR/J 小鼠的胸腺瘤)。

(三) 要点

1. 设计正确的免疫方法, 使产生数量最多, 特异性强, 处于活跃分裂期, 适于融合的免疫淋巴细胞。并选用在新鲜培养液中处于活跃对数生长期的瘤细胞为融合对象。

2. PEG 选择, 须注意各厂商各批号产品间的差别。选择对细胞毒性低, 融合率又高的产品。

3. 严格控制支原体污染, 一旦发现细胞株污染有支原体, 就应弃去重新引入新细胞系。特别对血清, 使用前必须检查有否支原体污染。对国产血清, 特别是小牛血清还须注意选择无细胞毒性, 生长率高的批号。

四、抗原特异性 T、B 淋巴细胞杂交瘤的筛选

(一) 单克隆抗体的鉴定——B 淋巴细胞杂交瘤 单克隆抗体的测定方法有多种, 可根据所研究的抗原特性 (如细胞表面抗原, 可溶性抗原等) 及各实验室已有的技术设备, 选用不同的方法。重要的应注意方法的有效、快速和简便。常用的方法有血球凝集法, 放射免疫测定法, 放射性结合及酶联免疫吸附法, 荧光法等。下面介

绍一种酶联免疫吸附测定法 (即 ELISA 法)。

把已知特异性的抗原吸附或包被在固相载体上 (聚氯乙烯或聚苯乙烯板等) 然后加上待测抗体, 再加上酶标记的第二抗体 (一般选用辣根过氧化物酶作标记), 最后加上酶的底物, 如: 邻苯二胺等使产生显色反应。中止反应后, 用目测或分光光度计测光密度值。此法适用于可溶性抗原, 而且抗原来源较丰富。若抗原来源紧张的抗体测定, 可用放射免疫测定法。

(二) T 淋巴细胞杂交瘤 各种抗原特异性 T 淋巴细胞杂交瘤的筛选, 是通过对杂交瘤细胞的功能或所分泌产物 (各种淋巴因子) 的测定来完成的。

1. 抗原特异性细胞毒 T 细胞杂交瘤的鉴定——⁵¹Cr 释放试验。

具有不同抗原特异性和不同 H-2 (或 HLA) 单型的靶细胞经 Na²⁵¹CrO₄ 标记后, 按一定比例与杂交瘤细胞混合培养 4—6 小时。在此期间靶细胞被具有细胞毒作用的杂交瘤细胞所杀伤而释放出 ⁵¹Cr。测定上清液中 ⁵¹Cr 的释放量 (cpm), 杀伤百分率按下列公式计算:

特异性杀伤% = $\frac{(\text{实验组靶细胞 } ^{51}\text{Cr 释放量} - \text{对照组 } ^{51}\text{Cr 释放量})}{(\text{靶细胞 } ^{51}\text{Cr 标记总量} - \text{对照组 } ^{51}\text{Cr 释放量})} \times 100$
一般 ≥ 10% 特异性杀伤者为阳性孔。

2. 抗原特异性 T 辅助细胞的鉴定——微量白细胞介素 2 (IL-2) 测定法 杂交瘤细胞与抗原, 以及 X 射线照射过的具有相应 H-2 单型的脾细胞单层一起培育。24 小时后收集培养物上清与依赖于 IL-2 才能生长的细胞株 (如 CTLL 株) 一起培育 18—24 小时然后加入 ³H-TdR, 培养 4—6 小时, 测定 CTLL 细胞的 ³H 掺入量, 凡 cpm 值高于对照 2 倍以上者为阳性孔。

(三) 抗原特异性 T 抑制细胞的鉴定 第一步基本同上, 24 小时后收获培养物上清, 测定其对体外第二次免疫刺激脾细胞系统中, 细胞毒 T 细胞对靶细胞特异性杀伤的抑制作用。抑制作用 ≥ 50% 对照组者为阳性孔。

五 淋巴细胞杂交瘤在生物医学中的应用

淋巴细胞杂交瘤技术原则上可选择针对某一特定抗原上某一特定抗原决定簇,以及针对某一细胞系特异性的单克隆抗体。或者选择具有某一特定抗原和/或 H-2 (或 HLA) 单型特异性的不同功能的 T 细胞克隆,及其所分泌的各种淋巴因子。这些细胞及其产物是高度特异和均一的,并能重复地大量生产。由于这些独特之处,使它们在很多方面有重要的应用价值,并成为许多应用研究和基础研究的有力工具,大大促进当代免疫学、生物医学等科学的发展。下面仅举几个主要方面作一介绍。

(一) 用于细胞表面抗原的鉴别 用未经提纯的具有多种表面抗原的完整细胞,以杂交瘤方法能制备出抗单一膜抗原的单克隆抗体,已成功地用于确定人淋巴细胞亚群及其分化抗原的研究。这对于细胞分化机制、类别与功能关系等研究具有深远的意义。并且各种特异性极强的单抗对于血液病和血细胞等不但有诊断上的意义,还有治疗上的意义。

(二) 用于组织相容性抗原的分型和血型的鉴别 用特异性强的单抗替代或配合使用以前的多克隆标准抗血清,建立一个完整的 HLA 分型和血型鉴别的单抗库,对于器官移植、输血、法医学上判定,以及有关免疫遗传学的基础研究等均有重要意义。

(三) 用于肿瘤的诊断和治疗 应用单抗将恶性淋巴瘤划分亚型在肿瘤的诊断和分类上是有价值的,并对确定预后和治疗具有重要意义。

放射性同位素标记的单抗对于各种恶性肿瘤的诊断与治疗亦十分有用,并且利用专一性强的单抗做导弹,携带各种毒素弹头,可达到更有效杀伤肿瘤细胞,减轻药物对病人副作用的目的。

(四) 作为诊断试剂 用于对各种寄生虫、病毒、细菌特异抗原的检测。这将大大有助于对各种传染病,寄生虫感染的诊断及发病机理

和流行病学的研究。并且可帮助确定和纯化用作疫苗的寄生虫保护性抗原。

(五) 用于抗原物质及工业纯化 单抗的免疫吸附亲和层析法可用于对抗原的纯化,特别对那些含量微,难和其它物质分离的抗原,对一些未知抗原的纯化将有利于进一步弄清其结构与功能。单抗也可用于工业上的纯化。如用于提纯干扰素和甲胎蛋白 (AFP 等)。

(六) 替代或配合使用 在一些重要的生物活性物质 (如激素、酶) 的各种测定方法中原来所使用的多克隆抗血清制剂,由于单抗的高度特异性,结果可靠,来源充足和易于标准化。使用酶联免疫吸附测定法简便、灵敏,且可避免使用放射性同位素。很多单抗制备的测定药盒已在国际市场上有商品出售。

(七) 是重要的基础研究工具 具有抗原特异性的各种功能的 T 杂交瘤细胞株的建立,使得人们有可能在体外针对某一个 T 细胞亚群的单个克隆进行研究,或去鉴定它们的表型、功能及释放的各种淋巴因子,确定其表面受体的性质及各种微细特异性等等。这对于从细胞和分子水平来了解和探明各类免疫活性细胞间的相互作用,细胞间信息的传递,各种淋巴因子的调控作用等等,具有极其重要的意义。

各类特异性的淋巴因子是一类调节性或效应性物质,它们不但具有理论研究的价值,而且具有巨大的临床应用的潜在价值,各种淋巴因子及针对它们制备的一系列特异性单抗,可作为体外细胞免疫反应测定的有用指标。这对于在临床上建立一套快速、简便的体外细胞免疫检测方法、免疫病诊断、治疗、预后等等具有重要的实践意义。

各种抗 T 细胞的单抗,对于骨髓移植、器官移植的成功,减少输血反应,拯救具有免疫缺陷病人生命等方面亦有重要的实际意义。

六 淋巴细胞杂交瘤的现状和展望

自 1975 年淋巴细胞杂交瘤诞生到今,经历了大约 10 年的时间,由于它的独特之处,已充分显示了无限的生命力和巨大的应用价值,为

学科的研究提供了有力的武器,大大促进了这些学科的发展,并使许多疾病的诊断和治疗闪现了新的希望。它和遗传工程一起被誉为当今生物科学技术上的两颗明星,具有广阔的发展前景。目前每年在这方面发表的文献浩瀚如海,几乎以几何级数般的速度递增。各国政府和财团竞相投资,各种生物技术公司在美、英、西德、日本等国迅速林立。1985年在人类医学上关于单抗的投资约为5.55亿,预计1990年的投资将会高得令人难以置信。

我国在这方面起步较晚,从总体而言,大约始于八十年代初,条件较差,工作中困难较多。但目前已有一支可喜的队伍,不少实验室已开展和掌握了这项技术并用于生产实际和科学研究中,成功的报道也频见于国内科学杂志上及国外一些杂志。

但到目前为止,纵观国内外,大多数淋巴细胞杂交瘤及单抗均为小鼠源性,其次为大鼠源性。但研究的主要目标之一是用于诊断治疗人类的疾病,为人类造福,所以人的淋巴细胞杂交瘤及单抗的开展将是今后努力的方向。另外鉴于目前淋巴细胞杂交瘤融合的机遇性仍很大,周期长费时间,特别对T淋巴细胞杂交瘤而言,这又与它的不稳定性(染色体丢失)相矛盾,所

以各国在杂交瘤技术本身仍在作改进的研究,如:电融合技术的设计与制作,DNA转染技术等等,以及发展用无血清培养的研究和使用等。

以今日世界各国发展预测,大约在今后10年内该方面将会以更快的速度发展,估计不会被其它相应的技术所替代。展望未来,作为细胞工程重要方面的淋巴细胞杂交瘤,必将会给人类带来更大的社会价值和经济效益。

参 考 文 献

- [1] 胡健 1984 国外医学免疫学分册 1: 7.
- [2] Fathman C. G., and F. W. Fitch (ed) 1982 Isolation, Characterization, and Utilization of T Lymphocytes Clones.
- [3] Galfre G and C. Milstein 1981 in: *Methods in Enzymology* 73: 1—46.
- [4] Handley HH et al. 1982 *J. Immunol Methods*. 54: 291.
- [5] Kalz DH (ed) 1982 *Monoclonal Antibodies and T Cell products*.
- [6] Köhler G et al. 1980 *Hybridomas Techniques*, EMBO (中译本,史良如译)
- [7] Köhler G and C. Milstein 1975 *Nature* 256: 495.
- [8] Littlefield JW. 1964 *Science*. 145: 709.
- [9] Pauli G et al. 1984 *J. Immunol. Methods* 74: 337.
- [10] Taniguchi. M., and J. F. A. P. Miller 1978 *J. Exp. Med.* 148: 373.