

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.06.003

• 基础研究 •

末梢血中EB病毒潜伏感染的静息B细胞模型的建立



金在顺^{1,2}, 于建渤², 郭素芬², 李志强², 安锦丹², 王莹¹, 宋华林¹

Establishment of Resting B Cell Model Infected with Latent EB Virus in Peripheral Blood
JIN Zaishun^{1,2}, YU Jianbo², GUO Sufen², LI Zhiqiang², AN Jindan², WANG Ying¹, SONG Hualin¹

1.Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Heilongjiang Province, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China; 2.Department of Pathology, Basic Medical College, Mudanjiang Medical University

Corresponding Author: SONG Hualin, E-mail: zaishun@126.com

Abstract: Objective To establish the ideal model of resting B cell containing Epstein-Barr virus *in vitro* by EBV latent infected CD5⁺B cells of peripheral blood. **Methods** CD5⁺B cells were obtained by mouse IgG magnetic beads. We took advantage of neomycin resistance to reorganize EBV genes (NeoR EBV) on the CD5⁺B cells to transfect G418 as the selection antibiotics, and labeled by BrdU. The immune phenotypes, gene phenotypes and proliferation of CD5⁺B/EBV cells were detected by Western blot, double immunofluorescence and flow cytometry, respectively. **Results** In CD5⁺B/EBV cells, expression of EBNA2 and LMP1 were significantly increased. Also, the expression levels of immune phenotype of CD20, CD80, CD38 and CD86 were significantly increased, however, CD23 was not changed much in CD5⁺B/EBV. BrdU-negative cells were visible in EBNA2-positive cells. After cell factor activated, Ki67-positive cells were visible in BrdU-negative cells. However, Ki67-negative cells were visible in EBNA2-positive cells, resting B cells were exist in CD5⁺B/EBV cells. **Conclusion** CD5⁺B/EBV cell established in this study were characterized with resting B cells latently infected by EBV.

Key words: Epstein-Barr virus; Latent infection; CD5⁺B; Resting B cell

摘要:目的 应用EB病毒(EBV)感染末梢血CD5⁺B细胞,建立体内储存EB病毒的静息B细胞模型。**方法** 应用磁珠技术分离脐胎血中的CD5⁺B细胞;从新酶素耐性的Atada-EBV细胞中提取EB病毒对CD5⁺B细胞进行转染制备CD5⁺B/EBV细胞;流式细胞仪、Western blot法检测CD5⁺B/EBV细胞的病毒免疫表型和基因表型;免疫荧光双重染色BrdU、Ki67和EBNA2检测CD5⁺B/EBV细胞增殖活性。**结果** 流式细胞仪检测显示CD5⁺B/EBV细胞病毒免疫表型CD20、CD80、CD38和CD86表达增强,CD23没有表达;CD5⁺B/EBV细胞EBNA2和LMP1病毒相关潜伏感染基因显著增高;免疫荧光染色检测EBNA2阳性的CD5⁺B/EBV细胞可见BrdU阴性细胞。经因子激活CD5⁺B/EBV后可见BrdU阴性细胞中有Ki67阳性细胞存在,而在EBNA2阳性细胞中可见Ki67阴性细胞,验证CD5⁺B/EBV细胞中静息B细胞的存在。**结论** 本研究建立的CD5⁺B/EBV细胞具有体内EBV潜伏感染的静息B细胞的特征。

关键词: EB病毒;潜伏感染;CD5⁺B细胞;静息B细胞

中图分类号: R730.3 文献标识码: A

0 引言

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是一种广泛存在的疱疹病毒,主要以B淋巴细胞为靶细胞,导致靶细胞异常增殖引起疾病。有研究表明EBV

与各种淋巴和上皮组织恶性肿瘤如伯基特氏淋巴瘤、鼻咽癌、免疫缺陷病导致的淋巴增生性疾病和胃癌等密切相关^[1-3]。EB病毒感染人体后将长期潜伏在B细胞中,多数感染者终身潜伏感染。在体外早期感染EBV后末梢血B细胞可获得在组织培养中维持长期生长和增生的能力,称为永生化增殖细胞(lymphoblastoid cell line, LCL)^[4]。但对于感染EBV后末梢血B细胞是否还存在静息B细胞的形式,目前尚存在争议。

现在国内外关于EB病毒及相关基因与各种疾病关系的研究较多,但是体内环境下研究EB病毒

收稿日期: 2013-06-27; 修回日期: 2013-10-18
基金项目: 黑龙江省科技厅攻关计划资助项目(LC06C25)
作者单位: 1. 157011 黑龙江牡丹江, 黑龙江省高校肿瘤疾病防治重点实验室; 2. 牡丹江医学院基础医学院病理学教研室
通信作者: 宋华林, E-mail: E-mail: zaishun@126.com
作者简介: 金在顺(1962-), 女, 博士, 教授, 主要从事病理学教学与肿瘤防治工作

的感染、增殖、潜伏、激活及致病的机制较少。体内储存EB病毒的静息B细胞的模型制备，目前尚未见报道。本实验在前期成功建立套细胞淋巴瘤模型研究基础上^[5]，采用EB病毒感染末梢血CD5⁺B细胞建立体内储存EB病毒的静息B细胞模型，观察EBV阳性的CD⁺B/EBV病毒潜伏基因、免疫表型及增殖活性的表达，为预防和治疗EB病毒相关疾病提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

EB 病毒B958细胞株由日本冈山大学提供，人CD5mAb及鼠IgG免疫磁珠购于法国Immunotech公司；免疫荧光染色试剂盒购于美国Sigma公司；各种抗体分别购买于加拿大Becton Dickinson, 丹麦Dako, 英国Novocastra公司，见表1。

表1 本研究使用的抗体

Antibodies	Clone	Isotype	Source
CD20	B-LY1	Mouse IgG1	Dako
CD23	MHM6	Mouse IgG1	Dako
CD38	HIT2	Mouse IgG1	BD
CD80	BB1	Mouse IgM	BD
CD86	FUN-1	Mouse IgG1	Dako
EBNA2	PE2	Mouse IgG1	Dako
LMP-1	CS1-4	Mouse	Novo
BrdU	—	Rabbit	Dako
Ki67	—	Rabbit	Dako

Notes: BD:BectonDickinson,San Jose,Canada; Dako: Dako,Glostrup,Denmark; Novo:Novocastra,London,the United Kingdom;—:not applicable

1.2 方法

1.2.1 磁珠方法分离脐胎血中的CD5⁺B细胞 常规方法脐带血B细胞的分离，取上述所得B细胞1 ml，加入2 mgCD5mAb，加入1 mg鼠IgG免疫磁珠，室温孵育10 min，与磁珠作用10 min，清洗收集吸附的CD5⁺B细胞。

1.2.2 EBV的感染 参照前期研究方法^[5]将NeoR EBV感染的Akata细胞（Akata EBV）上清液作为EBV使用，Akata EBV感染已分离CD5⁺B细胞用

G418筛选，转染后BrdU标记，将细胞分为CD5⁺B对照组和CD5⁺B/EBV组。

1.2.3 Western blot检测 各组细胞提取蛋白后采用BCA定量试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白后转至硝酸纤维素膜；加入一抗（EBNA2和LMP-1），4℃孵育过夜，二抗孵育2 h，TBS洗净后经显色液显示15 min，扫描后图像分析软件对印迹区进行IOD分析。

1.2.4 流式细胞仪分析检测 各组细胞制备单细胞悬液，细胞计数，锥虫蓝染色。在试管中加入一抗（CD20、CD23、CD38、CD80、CD86）孵育1 h，PBS洗涤，加入二抗孵育30 min，PBS洗涤，离心3 min，弃上清液，加300 μl PBS，上机检测。

1.2.5 免疫荧光染色检测 CD5⁺B/EBV组加入BrdU培养4 d，参照说明书行EBNA2和BrdU双重染色，按参考文献^[6]对CD5⁺B/EBV细胞加Sac、IL-2和Thiored因子激活18 h后，行BrdU和Ki67及EBNA2和Ki67抗体双重染色。

1.3 统计学方法

所得数据以采用SPSS 13.0软件进行统计学分析，数据以均值±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用t检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD5⁺B/EBV细胞病毒免疫表型检测

CD5⁺B在EBV病毒感染后，流式细胞仪检测发现CD5⁺B/EBV诱导CD20、CD80、CD38和CD86表达增强，但CD23没有表达，见图1。

2.2 CD5⁺B/EBV细胞病毒潜伏基因表型检测

用Akada EBV感染CD5⁺B后，经过G418 筛选，Western blot结果与CD5⁺B细胞比较，CD5⁺B/EBV细胞中LMP1和EBNA2蛋白相对表达显著增高（ $P=0.002$ ， $P=0.000$ ），见图2。

2.3 CD5⁺B/EBV细胞中静息B细胞的检测

CD5⁺B/EBV加入BrdU培养了4 d。可见EBNA2

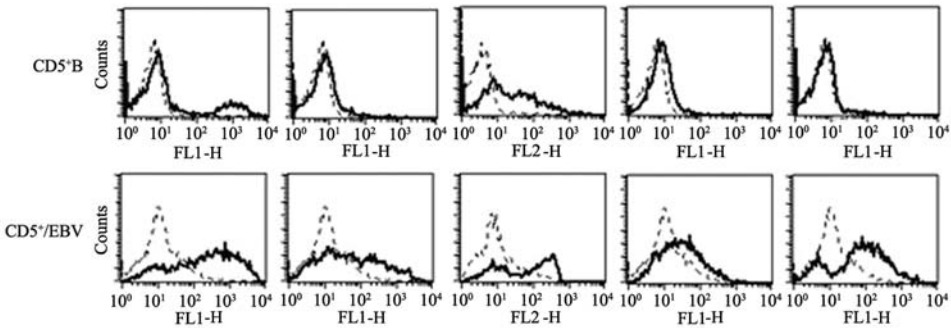
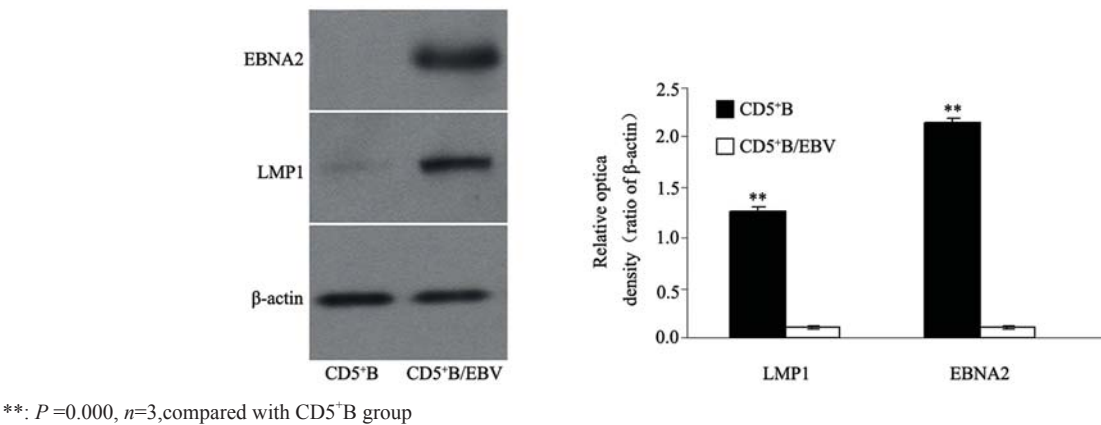


图1 流式细胞仪检测各组细胞免疫表型CD20、CD23、CD80、CD38和CD86表达
Figure1 Cell immune phenotypes of CD20, CD23, CD80, CD38 and CD86 in all groups detected by flow cytometry

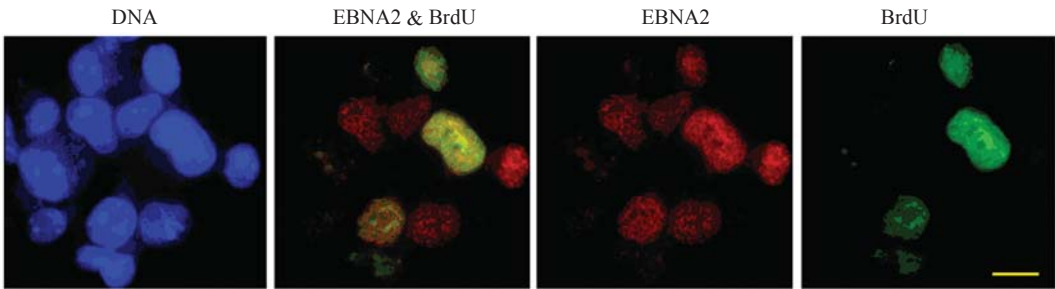
阳性的细胞中含有BrdU阴性细胞，见图3。加Sac、IL-2、Thioered因子激活18 h，观察到Brdu阴性细胞中有Ki67阳性细胞存在。而在EBNA2阳性细胞中观察到Ki67阴性细胞，见图4。

3 讨论
EB病毒为一种嗜人类B淋巴细胞的γ疱疹病毒，与宿主细胞关系的特点是潜伏感染。EBV 感染的主要靶向是人类B淋巴细胞，但病毒还可以感



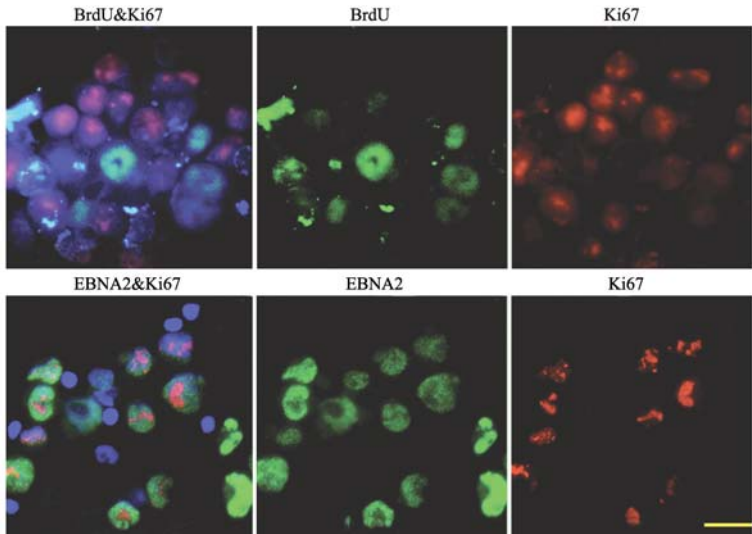
**: $P=0.000$, $n=3$, compared with CD5⁺B group

图2 Western blot检测各组LMP1和EBNA2蛋白的相对表达
Figure2 LMP1 and EBNA2 protein expression detected by Western blot in all groups



Double labeling of DNA (blue) with EBNA2(red), BrdU (green) in CD5⁺B/EBV cells were incubated with BrdU for 4d, BrdU-negative cells were visible in EBNA2-positive cells(Bars = 20μm)

图3 免疫荧光染色观察BrdU标记4天后的CD5⁺B/EBV细胞情况
Figure3 CD5⁺B/EBV cell labeled by BrdU for 4 days detected by immunofluorescent staining



Double labeling of DNA (blue) with Ki67(red), EBNA2 and BrdU (green) in the CD5⁺B/EBV cells were activated by reactivator for 18h. Ki67-positive cells were visible in Brdu-negative. However, Ki67-negative cells were visible in EBNA2-positive cells(Bars = 20μm)

图4 免疫荧光染色观察经激活因子激活18 小时后的CD5⁺B/EBV细胞情况
Figure4 CD5⁺B/EBV cell activated by reactivator for 18h detected by immunofluorescent staining

染其他淋巴细胞和上皮细胞^[2]。EB病毒感染人体后，多数终身潜伏感染。所以，研究EB病毒相关疾病的发病机制及各种因子的影响，首先要研究储存EB病毒的静息B细胞及EB病毒相关基因在“感染-潜伏-激活-致病”等一系列步骤上的作用机制。

EB病毒与宿主细胞关系的特点是潜伏感染。在体外末梢血B细胞被EBV感染后永生化,表现EBNAs、EBNA2、LMP-1等潜伏基因变为永生化增殖细胞株（LCL）^[3]。在EBV健康携带者上EBV储藏细胞为静息期B细胞，就连免疫缺陷宿主也是储藏EBV的细胞为静息期B细胞^[7]。因此我们认为在体外早期感染EBV后末梢血B细胞表现除了永生化增殖细胞外，还存在成为静息期细胞的形式。为证实此细胞的存在，我们利用新霉素耐性的重组遗传基因EBV（NeoR EBV）对CD5⁺B进行感染，加入BrdU培养了4天。然后对此细胞用EBNA2和BrdU双重染色进行观察。可见，EBNA2阳性的细胞中包含有BrdU阴性细胞。因BrdU和Ki67常用于细胞增殖的标记，也就是说，虽有EB病毒的感染，也有不能增殖的B细胞存在。我们对此细胞加Sac、IL-2、Thioired等因子激活18 h，用BrdU和Ki67双重染色，观察到Brdu阴性细胞中，有Ki67阳性细胞存在。另外用EBNA2和Ki67抗体双重染色，在EBNA2阳性细胞中，观察到Ki67阴性细胞。这说明，感染EB病毒后不进行增殖的B细胞，经激活可再次增生。以上结果证实了体外早期感染EBV后末梢血B细胞后有静息B细胞存在。

现在国内外关于EB病毒及相关基因与各种疾病关系的研究较多^[8]，但是体内环境下研究EB病毒的感染、增殖、潜伏、激活及致病的机制较少。关于体内储存EB病毒的静息B细胞的模型制备，目前尚未见报道。本实验利用NeoR EBV对CD5⁺B细胞进行感染，成功构建EBV阳性的CD5⁺B/EBV细胞模型。此细胞EBV潜伏感染的基因表型EBER1、EBNA2、LMP1表达为阳性，免疫表型CD20、CD80、CD38和CD86表达增强，表现出LCL型的EBV潜伏感染的基因表型和免疫表型，但是LCL诱导的活性指标CD23等却没有

表达。因此，本实验建立的CD5⁺B/EBV细胞具有LCL表型，但没有诱导出活性指标等特点，具有机体内EBV潜伏感染静息期B细胞的一般特征^[9]，所以期待此细胞可成为体内EBV潜伏感染研究上的良好材料。

参考文献：

[1] Price AM,Tourigny JPForte E,*et al.* Analysis of Epstein-Barr virus-regulated host gene expression changes through primary B-cell outgrowth reveals delayed kinetics of latent membrane protein 1-mediated NF-κB activation[J]. *J Virol*,2012,86(20):11096-106.

[2] Rasul AE, Nagy N, Sohlberg E, *et al.* Simultaneous detection of the two main proliferation driving EBV encoded proteins, EBNA-2 and LMP-1 in single B cells[J]. *J Immunol Methods*, 2012,385(1-2):60-70.

[3] Leonard S, Wei W, Anderton J, *et al.* Epigenetic and transcriptional changes which follow Epstein-Barr virus infection of germinal center B cells and their relevance to the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma[J]. *J Virol*, 2011,85(18):9568-77.

[4] Kalla M, Hammerschmidt W. Human B cells on their route to latent infection—early but transient expression of lytic genes of Epstein-Barr virus[J]. *Eur J Cell Biol*, 2012 ,91(1):65-9.

[5] Jin ZS,An JD,Song HL,*et al.* EB virus latent infection of mantle cell lymphoma model[J]. *Zhongguo Zhong Liu Lin Chuang*,2012,39 (1):1-4. [金在顺,安锦丹,宋华林,等. EB 病毒潜伏感染的套细胞淋巴瘤模型研究[J]. 中国肿瘤临床, 2012,39 (1):1-4.]

[6] Gregorovic G, Bosshard R, Karstegl CE, *et al.* Cellular gene expression that correlates with EBER expression in Epstein-Barr Virus-infected lymphoblastoid cell lines[J]. *J Virol*, 2011,85(7):3535-45.

[7] Hayashi K, Jin Z, Onoda S, *et al.* Rabbit model for human EBV-associated hemophagocytic syndrome (HPS): sequential autopsy analysis and characterization of IL-2 dependent cell lines established from herpesvirus papio-induced fatal rabbit lymphoproliferative diseases with HPS[J]. *Am J Pathol*, 2003,162 (5):1721-36.

[8] Iwakiri D, Takada K. Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection [J]. *Adv Cancer Res*, 2010,107:119-36.

[9] Halder S, Murakami M, Verma SC, *et al.* Early events associated with infection of Epstein-Barr virus infection of primary B-cells[J]. *PLoS One*,2009, 4(9):e7214.

[编辑：周永红；校对：刘红武]