维普资讯 http://www.cqvip.com

T淋巴细胞，单克隆抗体，免疫学

重庆医科大学学报 1992年第17卷第2期

(23) 159~164

T淋巴细胞克隆技术

[illegible]研究所 罗云萍 综述 张定凤 审校

R392

T淋巴细胞是一类具有多种功能的细胞群，过去一般认为成熟的T细胞可分为三大亚群，即杀伤性T细胞（T_C），辅助性T细胞（T_H）和抑制性T细胞（T_S），它们分别执行各自的功能。T细胞的功能具有多样性，而每一亚类细胞都在免疫应答中具有特殊的效应，长期以来，对于T细胞在免疫应答中所发挥的作用还不是完全清楚，过去由于缺乏获得纯T细胞功能亚群的方法，从而阻碍了进一步分析各类细胞在免疫应答中的特异功能。

随着免疫学的发展，人们对T细胞的认识逐渐深入，自从1975年Kohler及Milstein的杂交瘤技术建立以来，各种单克隆抗体相继出现，特别是针对人T细胞表面抗原的单克隆抗体的出现[1]，为认识细胞提供了有力工具，虽然不同的表面标志已用于淋巴细胞的分类和T淋巴细胞亚群的区分，如，Lyt Leu、OKT系统等，但用抗体去认识细胞表面标志还不能完全阐明某些T细胞亚群或非T细胞在特异性免疫应答中的功能。现代免疫学的发展越来越表明T淋巴细胞是高度异质性的细胞群，正常人外周血中有3%的T细胞可同时表达T_4及T_8抗原，有人也观察到有T_4表型的细胞毒T细胞不能被OKT_8单克隆抗体阻断[2]。这些现象都提示了T细

133:327
[19] Orrenius S, et al. Trend. Pharma. Sci 1989; 10:281
[20] Alan W, Nature 1982; 296:811
[21] Lemasters JJ, Nature 1987; 325:78
[22] 周金黄. 药理学进展 抗炎免疫药理分册 人民卫生出版社 1983 p44
[23] Farber JL, In: Calcium-dependent Proocesses in the livered by Heilmann c, Great Britain 1988; 213
[24] Faulstich H, et al, ibid 237
[25] Rerr JFR, J. Pathol 1971; 105:13
[26] Wyllie AH, et al, J. Pathol 1984; 142: 87
[27] Smith CA, et al, Nature 1989; 337:181
[28] Trend. Pharma. Sci 1989 10:283
[29] Webb RC, et al Am. J. Physiol 1978; 235:C227
[30] Nayler WG, Eur. Heart. J 1983; 4 (Suppl) :33
[31] Farber JL, et al, Am. Biochem. Biophys 1977; 178:617
[32] Erlinger S, et al, In: Calcium-dependent processes in the liver ed by Heilmann c, Great Britain 1988; 247
[33] Anmer MD, et al Hepatology 1988; 8:887
[34] Pamela E, et al J. Biol. Chem 1986; 261:3006
[35] Rao PS, et al clin chem 1981, 29:221
[36] 付良雄. 国外医学 生理病理与临床分册 1987 1:6
[37] 黄简. 医用自由基生物学导论 人民卫生出版社 1989, p59
[38] 姚光弼. 中华消化杂志 1989; 9:187
[39] Otani H, et al Circ Res 1984; 55:168
[40] 李同早, 等. 临床肝胆病杂志 1989, 5:8
[41] Tee LBG, et al, Toxcol. Appl. pharmacol 1986; 83:294

(收稿日期: 1991-03-27)

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞高度异质性这一事实。为了得到单一功能的T细胞，克服细胞异质性的方法之一是进行细胞克隆，从而得到真正均一的淋巴细胞。

T细胞克隆技术的建立和发展

七十年代以来，国外的专家们都努力寻求一种方法来建立能满足得到真正均一的细胞克隆这一要求的T细胞模型。T细胞克隆技术的建立以及成为一种较为完整的方法，是许多专家长期共同努力的结果。早在1975年Ben-Sasson[3]等就提出T淋巴细胞能在经抗原选择后的巨噬细胞的反复刺激下大量增殖，并存活3个月以上。MacDonald[4]等在1974年也曾用同样的方法在经放射线照射细胞的存在下增殖同种异体T细胞。1975年Rozenszajn[5]等又发明了用软琼脂技术的克隆方法，首先用于对有丝分裂原(PHA)反应的T细胞，随后用于人外周单核细胞或鼠淋巴结细胞的培养。这种方法以后被进一步的改进。1977年Shen[6]等，1978年Fathman和Hengarton[7]发明了在半固体介质中克隆同种异体反应鼠T细胞的方法，1980年Zeevi[8,9,10]等用类似的方法进行人淋巴细胞克隆，并使得克隆细胞能在混合淋巴细胞培养中传代，1980年Lotze[11]等研究细胞毒T细胞克隆获成功。

八十年代初期，克隆技术又有了进一步的发展，专家们发现正常淋巴细胞的生长，不仅取决于抗原或有丝分裂原的刺激，而且也取决于某些生长因子（Gillis和Smith 1977年[12]，Rusceffi等1977年[13]）如白细胞介素2（IL-2），IL-2能使T细胞长期传代，1979年Schrier等[14]已成功地报告了应用IL-2，在抗原和经放射线照射的抗原呈递细胞的存在下，长期维持抗原特异的鼠细胞系，类似的方法也已成功的用于KLH特异性T_H细胞[15]。

自1975年以来，由于T细胞克隆方法的建立开辟了对T细胞研究的新天地，现在T细胞克隆技术已广泛的应用于基础与临床研究的各个领域，不仅是对T细胞本身性质、分类、功能等方面的研究[36,37,38]，而且在临床上对一些与免疫有关的疾病的发病机理的探讨[42,44]，治疗途经和治疗药物的选择等方面都有了很大的进展。目前已建立了各种T细胞克隆；有T_H、T_D、T_C和T_S等[35]。很多抗原特异的细胞克隆也已建立，如对病毒抗原[16,17,18,19,20]，细菌抗原[21,22,23]，其它特异性抗原等[24]，专家们都在自己的方法中不断改进技术，成为较为成熟的细胞克隆方法。近年来，无论是细胞克隆方法本身，还是该技术在细胞免疫基础研究及临床免疫研究方面的应用均有较大的进展。

T细胞克隆的基本方法

自从克隆技术应用以来，在方法学上已经有不断的改进，完善，对可溶性抗原特异的T细胞克隆，一般说来包括两个步骤，第一步，是在特异性抗原以及在经放射性照射的抗原呈递细胞（APC）或非特异饲养细胞以及IL-2存在下，活化T细胞，经过抗原的选择获得对特异性抗原反应的T细胞株，第二步，是通过克隆技术，进一步建立细胞克隆。

1. 重复刺激技术

重复刺激技术即是细胞在被抗原的刺激期与在经放射线照射细胞存在下的无抗原休止期的反复交替。虽然各种报告的方法不尽相同，但基本原则与Kimoto及Fathman1980年报告相似[25]，首先用抗原刺激已经在体内经同种抗原刺激的T细胞，随后在无抗原的条件下与放射性照射的饲养细胞一起培养，培养一段时期后，再用抗原重复刺激，再休止，如此反复，便可在未加外源性IL-2的情况下得到抗原特异性T细胞株，经过几个周期的刺激后，将这些细胞进行克隆，一般认为最困难的是在克隆的方法学上，主要

维普资讯 http://www.cqvip.com

障碍是少量细胞在体外培养中不能很好的存活，除非具有最适生长条件，通常克隆的方法有两种。

(1) 有限稀释法[26]

在混合淋巴细胞培养数天后，将细胞在含有IL-2以及血清中稀释，逐步稀释成每孔10，1以及0.1个细胞水平，转移至微孔组织培养板中，静止一段时间后，在倒置显微镜下检查其稀释的情况，因为每孔的细胞分布是符合统计学中的Poison分布的原理，可以用公式估计其概率P，如果设每孔的平均细胞数为Z，含有K个细胞孔的概率为K，则$P=(X=K)=(zK/KI)\cdot X^{e^{-z}}$，e为自然对数的底，通过公式，就能估计出含1个或0.1个细胞的概率，一般两周后检查克隆的生长情况，孔底被细胞覆盖1/3或以上的为阳性孔，并将其转移至直径大一些的培养板孔中，加入IL-2以及血清培养基，使其扩增。

有限稀释法是应用较广的克隆方法之一，且多用于对克隆细胞的再克隆，但由于稀释后的每孔细胞数是一随机的分布，因而就不能得证生长克隆所有的细胞都是来自单一的淋巴细胞。

(2) 显微操作法

细胞重复刺激后，用微量吸管在显微镜的帮助下，取出单个细胞，并在饲养细胞以及IL-2的存在下进行培养，即得到均一克隆的细胞，也有人将细胞在未经任何刺激以前，就在微量吸管的帮助下，从单个核细胞中分离出单个细胞，分别在倒置显微镜的观察下，将其种植在微孔培养板中，并加入经放射线照射过的淋巴细胞与IL-2，其克隆效率为20—25%[27]，显微操作法的优点是克服了有限稀释生长出的克隆细胞不一定来自单一淋巴细胞的缺点，但该方法在操作上较为困难。

另外，也有人利用补体杀伤作用进行细胞克隆，如：在抗原刺激以前用抗Lyt 2^+的抗体和补体去除Lyt 2^+细胞从而富集同种异体抗原致敏的Lyt 1^+的淋巴细胞，然后进一步用有限稀释克隆[28]，他们认为用这种方法来选择对抗原反应的特异的细胞较之在体外重复刺激其效率高80%以上。

2. 直接松琼脂技术

1980年Sredi[29]等建立了这种方法，这种用于可溶性抗原的方法，免去了克隆前的重复刺激，而是首先进行短期的液相培养（大约三天），然后转移到琼脂中，在双层松琼脂中，下层5%(W/V)琼脂包含抗原在内总体积2.5ml，上层是0.32%(W/V)琼脂包含1-2×10^5来自经抗原刺激的淋巴细胞以及经放射线照射的同基因脾或外周血白细胞作为APC，总体积0.85ml，在琼脂中生长出细胞集落后，将其转至液相中继续培养扩增，一般在开始的短期液相培养以及在琼脂中的培养都不需IL-2的存在，仅是抗原的刺激，当第二次转至液相培养时就必须加IL-2以及APC，抗原等。这种方法，在细胞转移及扩增的过程中可能被其它细胞污染，而且在轻琼脂中出现的许多集落可能有巨噬细胞—淋巴细胞集落，因此最好的克服办法就是在抗原，APC及IL-2的存在下进行第二次克隆，以提高克隆的纯度。

近年来发展的一种高科技产品流式细胞仪(FCM)[30]，它是生物技术，激光技术，以及计算机等高等科技技术的结晶，它能通过检测细胞的大小，核酸的含量，以及细胞抗原和抗原受体等因素，通过计算机综合处理后，分析出细胞亚群和细胞所执行的不同功能。FCM内具有自动化克隆系统，可将单个细胞直接放入96孔板内，使得T细胞在克隆化的过程中极为方便，FCM能选择性地对各种细胞进行分析，并对其细胞亚群进行纯化和功能鉴定，它能分析的细胞量较大，一般500—4000个/s，得出的结果客观，可靠，但此系统价格昂贵，操作十分复杂，对所制备的单细胞悬液的要求也非常严格，因而不易推广。

维普资讯 http://www.cqvip.com

建立不同功能亚群的T细胞克隆方法的差异

上述的方法仅是体外长期培养T细胞的一般原则，不同亚群的T细胞其克隆方法上也存在一些差异。

细胞毒T细胞(CTL)克隆的方法：由于有了IL-2就变得比较容易一些，因为CTL是依赖IL-2的细胞，当有IL-2存在时它能长期存活。Mauny Rosenstein[29]报告在高IL-2浓度下适合细胞毒T细胞的生长，但也有CTL在抗原存在下，缺乏外源性的任何淋巴因子的条件下增殖的报告[31]。

T_H 细胞的生长，不仅需要IL-2，还需其它的因素，现在还不完全清楚，但大量报告证明，T_H 细胞的长期生长需要抗原，放射线照射的同种淋巴细胞等。

虽然长期生长的抗原特异T_S细胞系曾偶尔有报告，但T_S细胞作为一种功能性的克隆的可靠方法仍未能建立，1986年Nahid[32]等发现CD_4^+的诱导母细胞能在IL-2的存在的培养基中产生增殖CD_8^+抑制性T细胞克隆。张定凤在同期通过以抗原活化细胞为饲养细胞等改进，成功地克隆了抗原特异性的CD_8^+抑制性T细胞克隆。

T细胞克隆的培养条件及影响T细胞克隆生长的因素

1. 培养基中的营养成份及培养条件

目前应用最多的方法之一就是重复刺激后有限稀释克隆，一般绝大多数都是用96孔圆底微孔培养板及RPMI 1640完全培养基，加入热灭活的人或胎牛血清(10—20%)，也有认为不用热灭活的血清，因为血清中有些克隆生长所需因素对热不稳定，在高温下失去活性从而导致克隆生长的不利[33]，也有不用血清的培养介质克隆CTL成功的报告[34]，用血清白旦白，胰岛素，运铁旦白，乙醇胺，混合的饱和与不饱和脂肪酸(亚油酸，油酸和松脂酸)来代替血清，并经实验证明在这种无血清的介质中，混合淋巴细胞培养的增殖和细胞毒应答的诱导与在血清的介质中是一致的。

2. IL—2的应用

自从发现IL-2以来，为克隆方法的建立提供了有力的工具，一般公认，IL-2是克隆及扩增T细胞必不可少的淋巴因子，目前人和鼠来源的IL-2都已经纯化，而且有标准生物制品，基因工程产生重组IL-2也已经成功。在IL-2的用量问题上一般认为克隆不同亚群T细胞亚群需不同浓度IL-2。CTL为IL-2依赖细胞所需IL-2量大，而其它则用量较小[31]。也有报告在缺乏外源性IL-2的情况下长期培养同种特异性鼠T细胞系，这种T细胞系经过数年的培养后仍具有正常鼠细胞同样的核型。

3. 饲养细胞

目前饲养细胞也被认为是克隆成功的一个重要因素，虽然饲养细胞的作用基理还不完全明确，一般较为常用的饲养细胞是经放射线照射或有丝分裂原处理的自体或同种异体周围血单核细胞及脾细胞，由于发现B细胞株在克隆扩增过程中的作用，有报导用EBV转化B细胞结合同种异体淋巴细胞作为饲养细胞，其结果是得到比单用其中之一作为饲养细胞的克隆产率高出10倍以上[33]。饲养胞细的作用机理还不清楚，可能为克隆提供营养或呈递特异性抗原，或产生IL-2等淋巴因子。

4. 有丝分裂原

有人观察有丝分裂原PHA—P能使克隆产率大约增高3倍，有丝分裂刺激活化的细胞分裂，表达IL-2受体，产生IL-2供细胞生长所需，一般用PHA来刺激人淋巴细胞产生人IL-2用ConA诱导鼠脾细胞产生鼠IL-2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

T克隆细胞株的鉴定

对T细胞克隆株的鉴定，一般包括如下几个方面

1. 对特异性抗原的应答

克隆成功后，应检测细胞株对刺激克隆生长的特异性抗原的应答能力，一般是将克隆细胞同特异性抗原以及一种或两种非特异性抗原分别培养，观察克隆细胞对各种抗原的应答能力，如果克隆成功，克隆细胞株对其特异性抗原有非常强的增殖反应，并且呈一剂量依移性，而对非特异性抗原则相反[22,44]。

2. 细胞表面标志的鉴定

对克隆细胞株的表面标志的检测，一般方法是采用间接免疫荧光法检测细胞表面CD系统的抗原，如为T_H克隆应为CD_3^+、CD_4^+、CD^-，而Ts/e克隆为CD_3^+、CD_4^-、CD_8^+。用FCM系统进行克隆，就可在克隆同时完成这一步骤[22,44]。同时进行HLA抗原或MHC限制性的鉴定

3. 克隆细胞株的功能鉴定

(1) 辅助功能[22,44]

观察T克隆细胞株辅助自体B细胞的增殖以及产生特异性抗体能力，一般是将克隆细胞与自体B细胞以及饲养细胞，特异性抗原一起共同培养，然后观察B细胞的^{3}H-TdR的渗入而反应B细胞增殖，并同时检测培养上清中特异性抗体的产量。

(2) 细胞毒试验[22]

观察T克隆的杀伤能力，一般都采用^{51}Cr释放试验，即将^{51}Cr标记的靶细胞与克隆细胞共同培养后用r射线记录仪测定上清中^{51}Cr的稀放量，从而反应T克隆细胞的杀伤能力，靶细胞应根据克隆细胞对抗原的特异性而选择。

4. 克隆细胞株产生的淋巴因子的检测

用不同的诱导剂诱导克隆细胞，测定上清中所产生的淋巴因子，如用PHA诱导，在培养24、48、72小时收集上清分别测定IL-2、IL-4、IL-6。[16,18,42]

T细胞克隆的应用

由于T细胞克隆技术日趋成熟、稳定、应用克隆技术进行的各方面的研究也进展迅速。在基础研究方面，克隆技术应用十分的广泛，例如，在基础免疫的研究中，过去一直发现同一表型的T_H细胞，仍然存在着异质性，通过将T_H细胞进行克隆后分析发现，T_H细胞存在着功能与分泌因子不同的两个亚型即T_{H1}和T_{H2}[36,37]，T_{H1}可辅助B细胞产生特异性抗体，分泌IL-2，r-IFN，而T_{H2}则分泌IL-4、IL-5、IL-6，而不产生IL-2[38]。用于克隆技术的应用，对T细胞的结构，功能，以及表面标志等问题的深入研究成为了可能。通过对肿瘤患者的自体T细胞进行克隆后发现了不同种类的T细胞在肿瘤患者的机体中对癌细胞的不同的反应[39,40,41]。从而对肿瘤患者的自我防御的免疫机能的深入了解以及治疗途径提供了一个线索。在临床研究方面，特别是对一些与免疫有关疾病的发病机理以及治疗药物的选择方面也有广泛的应用，在乙型肝炎的免疫发病的机理研究中，通过CD_4^+T细胞克隆的建立，提示了慢性乙肝患者T_{H1}功能障碍，T_{H2}功能尚属正常，所以乙肝患者产生抗HBS能力低下，可能与T_H细胞功能无关[42]。从而对乙肝病毒感染时机体的免疫状态有了进一步的了解。Maggi等[43]将AIDS病人的T细胞克隆后发现感染HIV病毒后，大多数T细胞产生IL-2与IFN-r的能力减低，而产生BCDF与BCGF的能力正常，为AIDS病人B细胞的高反应性提供依据。

总之近年来克隆技术已经成为免疫学，血液学以及临床机关学科的应用广泛的新兴技术。

(收稿日期1991-05-28)

维普资讯 http://www.cqvip.com

参考文献

[1] Kung P K, et al. Science 1979; 206:347

[2] Krensky A M, et al. J Immunol 1982; 129:2001

[3] Ben-Sasson S Z, et al. J Immunol 1975; 115:1723

[4] MacDonald B R, et al. J Exp Med 1974; 140:718

[5] Rozensajn L A, et al. Immunology 1975; 29:1041

[6] Shen J, et al. J Immunol 1977; 119:1299

[7] Fathman C G, et al. Nature 1978; 272:617

[8] Zeevi A, et al. J Immunol 1980,125:1130

[9] Kormbluth, et al. J Exp Med 1980, 152:164

[10] Bach F H, et al. Nature 1979; 281:307

[11] Lotae w T, et al. J I mmunol 1980; 124:2972

[12] Gillis S, et al. Nature 1977, 268:154

[13] Ruscetti F W, et al. J Immunol 1977; 119:131

[14] Schrier R D, et al J Immunol 1979, 123:2525

[15] Augustin A A, et al. Eur J Immunol 1979; 9:665

[16] Esteban C, et al. J Immunol 1986, 136:692

[17] Esteban C, et al. J Immunol 1984; 132:1511

[18] Joyce M Z, et al. J Immunol 1986; 136:4669

[19] Lamb J R, et al. J Immunol 1982: 1465

[20] Slovin S F, et al. J Immunol 1983, 130:2127

[21] Haanen J B A G, et al. Scand J Immunol 1986; 23:101

[22] Francesco S, et al. Eur J Immunol 1987; 17:187

[23] Micha el J P, et al. J Immunol 1986; 137:988

[24] Francesco S,et al. J Immunol 1985; 135:3929

[25] Kimoto M, et al. J Exp Med 1980, 152:759

[26] 李子海等 中国免疫学杂志 1987; 3:114

[27] Zagury D A M,et al. J Immunological Meth 1981, 43:67

[28] Maury R, et a. J Immunological Meth 1983; 61:183

[29] Sredni B, et al. Nature 1980; 287:855

[30] 张鲁裕，等.上海免疫学杂志 1988; 8:236

[31] Boehmer H, er al. T Cell Clones 1980

[32] Mohagheghpour N,rt al. J Exp Med 1986; 164:950

[33] R J Van de Griend,et al. J Immunol Meth; 1984; 66:285

[34] Hans Y, et al. J Immunol Meth 1984; 72:219

[35] Moller G, et al. Immun Rev 1980; 51:1

[36] Mosmann T R, et al. J Immunol 1986; 136:2348

[37] Mosmann T R, et al. Ann Rer Immunol 1989; 7:145

[38] Kim, Immunol Today 1988; 9:268

[39] Anichini A, et al. Immunol Today 1987; 8:385

[40] Mukherji B,et al. J Exp Med 1989, 169:1961

[41] Mukherji B,et al. Immun Rev 1990, 116:34

[42] 罗云萍，等. 中华传染病杂志 1990; 8:65

[43] Maggi E, et al. Eur J Immunol; 1987; 17:1685

[44] Carlo F, et al. J Immunol 1987,139:539