DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).1985.0046

Epstein-Barr 病毒血清抗体阳性健康人外周血体外培养“自发性”转化的研究

黄玫玲 冯凯涛 姚庆云

（肿瘤研究所）

Epstein-Barr virus(EBV)的感染广泛存在于健康人群中，一旦感染之后可以终生携带该病毒。文献报道：几乎可以从所有血清抗体阳性健康人淋巴组织的体外培养中，建立 EBV 基因阳性的淋巴母细胞株[1]，但外周血培养中“自发性”转化的阳性率则很低。本文作者之一Yao 等[2]通过改进实验方法，使用了免疫抑制剂环胞菌素A（Cyclosporin A），大大提高了外周血培养中“自发性”转化的阳性率。本文是根据这一方法，对一组35名血清 EBV 抗体阳性健康人进行了研究，目的在于深入了解体内EBV的携带状况。鉴于国内尚未见类似报告，特将结果总结于下，以供参考。

材料与方法

实验对象：实验对象为健康输血员35名，男22名，女13名，年龄由20～49岁。

血清中EBV 抗体测定：用间接免疫荧光法，作血清中 EBV 的 VCA—IgG 抗体测定，以 B95-8细胞作为 VCA 抗原。

“自发性”转化实验：取外周血15ml，加肝素20单位/ml 抗凝，以淋巴细胞分离液分离淋巴细胞，计算所得细胞数，按倍比稀释法取 10^6，5×10^6，2.5×10^5，1.25×10^5，6.25×10^4 细胞，分别种植在96孔平底培养板上，每孔 0.25 ml，每一稀释度种6孔，并以脐血淋巴细胞加入到后四个浓度中，将每孔细胞总数补充到 10^6。培养基用 RPMI 1640，加15%新生牛血清，青霉素100单位/ml，链霉素100 μg/ml，并在培养液中加入免疫抑制剂环胞菌素 A 0.1 μgm/ml（该药为英国 Birmingham 大学医学院 Rickinson 教授赠送），置入5 %CO_2 孵箱中培养6～8周，每周更换1/2 的培养液，并观察“自发性”转化的发生情况。本组试验对象除5人因细胞数不足外，其他30人都作了相应对照实验，对照组方法相同，仅仅是培养基中未加环胞菌素 A。上述培养过程中所得到的“自发性”转化的淋巴母细胞系，继代培养，并用抗补体免疫荧光法作 EBV 的核抗原（EBNA）检测。

结 果

在35名试验者中，外周血培养6～8周后，有26人出现了明确的淋巴母细胞增殖集落，其“自发性”转化的阳性率为74.3%。

根据培养板上自发性转化出现的频率，可将35人归纳为四组（表1）。

表1 35例 EBV 抗体阳性健康人外周血自发性转化的分组情况

组别	人数	（%）	外周血培养的自发性转化率 转化孔数/培养孔数	（%）
高转化组	5	(14.3)	96/150	(64.0)
中等转化组	7	(20.0)	53/210	(25.2)
低转化组	14	(40.0)	38/420	(9.1)
无转化组	9	(25.7)	0/270	(0)
合 计	35	(100)	185/1050	(17.8)

1.高转化组：本组5人占14.3%，半数以上的培养孔中出现淋巴母细胞增殖集落，通常

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在培养的第四周开始出现，最初的增殖集落是由数个到数十个体积更大、透明度更高的淋巴母细胞组成，高倍镜下、增殖集落的边缘不整齐，增殖细胞浆常有不规则的突起，似伪足状。继续培养，集落增大，数量增多，甚至可以融合成片。一般而言，转化集落的数量与所种植的细胞浓度有关，在10^6细胞/孔，转化孔的阳性率高达90%，随着种植的细胞浓度降低，“自发性”转化的阳性率亦下降，在6.25×10^4细胞/孔时阳性结果仅占26.7%（表2）。

2.中等转化组：20～50%培养孔中出现淋巴母细胞增殖集落，在10^6细胞/孔中阳性率为50%，在6.25×10^4细胞/孔则阳性率仅为4.8%，属本组者7人占20%。

表2　各组不同细胞浓度中的自发性转化情况

细胞数/孔	高转化组5人 转化孔/实验孔(%)	中等转化组7人 转化孔/实验孔(%)	低转化组14人 转化孔/实验孔(%)	无转化组9人 转化孔/实验孔(%)
10^6	27/30 (90.0)	21/42 (50.0)	29/84 (34.5)	0/54 (0)
5×10^5	26/30 (86.7)	17/42 (40.4)	9/84 (10.7)	0/54 (0)
2.5×10^5	22/30 (73.3)	9/42 (21.4)	0/84 (0)	0/54 (0)
1.25×10^5	13/30 (43.3)	4/42 (9.5)	0/84 (0)	0/54 (0)
6.25×10^4	8/30 (26.7)	2/42 (4.8)	0/84 (0)	0/54 (0)

3.低转化组：14人，占40%，少于20%培养孔中出现转化的细胞集落，且只见于高浓度细胞的培养孔中，低于2.5×10^5细胞/孔中均为阴性。

4.无转化组：9人，占25.7%，持续6～8周培养均为阴性。

上述26例的阳性结果中，继续培养，转化集落可以持续生长，所有细胞系经EBNA检测均为阳性，从而证实了转化因子是EBV。

在30名未用环胞菌素A的对照实验中，有8人在培养板中出现了淋巴母细胞增殖集落，阳性率为26.7%，其中3人为高转化组，1人为中等转化组，4人属低转化组。其转化孔的分布与加有环胞菌素A者作比较，大致相同（表3）。

表3　8例培养液中含环胞菌素A与对照实验转化情况的比较

细胞数/孔	培养液中含CSA 转化孔/实验孔(%)	培养液中未加CSA 转化孔/实验孔(%)
10^6	29/48 (60.4)	26/48 (54.1)
5×10^5	20/48 (41.7)	18/48 (37.5)
2.5×10^5	15/48 (31.2)	12/48 (25.0)
1.25×10^5	10/48 (20.8)	9/48 (18.8)
6.25×10^4	4/48 (8.3)	4/48 (8.3)

血清中EBV的VCA-IgG抗体检查35人均为阳性，其滴度自1:8到1:512不等，按外周血培养的“自发性”转化发生率，将VCA-IgG抗体检查的结果也分为相同的四个组，可见血清抗体滴度在各组中并无明显不同（图）。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

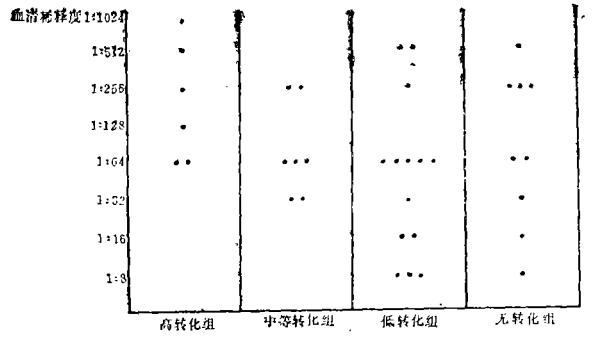


图1 外周血培养按自发性转化情况分组的 EBV VCA-IgG 抗体分布图

讨 论

EBV感染之后，病毒在免疫宿主体内持续存在的重要证据是在血清抗体阳性健康人的外周血培养中可以获得 EBV 基因阳性的淋巴母细胞株。由于实验过程中并未加入任何外源性转化病毒，该病毒必然是来自体内原有的感染，故这一转化现象称之为“自发性”转化。文献中报导这种“自发性”转化的阳性率较低，Rocchi等[3]在21名健康人的41次检查中，13次为阳性，阳性结果为31.7%，经过定量检测，大约每10^7淋巴细胞中才有一个发生转化。在本研究30人的对照观察中，8人阳性，阳性率26.7%，与Rocchi氏的结果比较虽无明显差别，但本组8人在每孔10^6细胞中都出现转化集落，甚至有3人在每孔6.25×10^4细胞中也有转化集落，这就说明本组材料中外周血EBV感染的B细胞的数量远比Rocchi氏的报导为高。当培养基中加入了环胞菌素A之后，“自发性”转化率提高到74.3%。在活体内B淋巴细胞感染了EBV之后，病毒在该细胞内复制、并导致一系列EBV有关的抗原表达，当感染的B细胞表达出淋巴细胞发现的膜抗原（LYDMA），即可被记忆性T细胞识别和消灭，这是机体对抗EBV感染重要的免疫机制之一。环胞菌素A正是抑制了这种T细胞介导的免疫反应，使病毒感染的B细胞得以转化[4]，故“自发性”转化的阳性率得到显著的提高。Yao等[2]在一组21名血清EBV抗体阳性健康人的反复检测中，仅1人为“自发性”转化阴性。本文是单次试验的结果，如果反复检测，阳性率必然会更高。

值得注意的是：在本组30名受试者的对照观察中，仍有8人为“自发性”转化阳性，这一结果是否提示：在这一部份人中，很可能体内免疫反应较弱，尤其是记忆性T细胞的功能较弱，以致不需要使用免疫抑制剂，就可以得到阳性结果。此外，在Yao等24名健康人的101次试验中，未加环胞菌素A的对照试验却全部为阴性，该文试验对象除1人外均为白种人。两文试验对象的自发转化结果呈明显的不同，这是否意味着EBV感染和转化淋巴细胞的效果，存在着种族间的差异？值得进一步探讨。

本研究的结果显示，外周血EBV感染的水平与血清中VCA-IgG抗体滴度似无直接关系。抗体阳性只能说明曾经有过EBV的感染，并不能反映体内病毒携带的状况。因此要了解体内EBV感染的现状，外周血培养“自发性”转化试验较之血清抗体测定更为重要。

关于EBV在免疫宿主体内终生持续的机理目前尚无定论，由于部分血清抗体阳性健康人口腔中不定期排出病毒，以及外周血和淋巴组织体外培养所得到的阳性结果，有人认为EBV是以潜伏感染的方式存在于淋巴组织内，由于某些因素的影响，潜伏感染可以重新激活[5,6]。另一观点认为：EBV可以在口咽部某些容许性细胞内低度慢性复制，复制出的病毒一方面可随唾液排出体外，成为感染传播的来源。另一方面通过咽部上皮组织与淋巴组织的密切关系，病毒可以感染B淋巴细胞，并可随着循环将病毒带到身体其它部位的淋巴组织，当这些B细胞表达出LYDMA抗原时，就会被记忆性T细胞所消灭。这样，体内既有EBV不断地复制，又有感染了病毒的B细胞不断地被消灭，从而维持了病毒与宿主间的平衡关系[7]。本研究在大多数血清抗体阳性健康人外周血培养中得到的阳性结果与这一看法一致，而不支持EBV感染的持续存在是由于淋巴组织

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中潜伏感染的病毒偶然激活的观点。

参 考 文 献

[1] Nilsson K, et al. The establ shment of lymphoblastoid cell lines from adult and from foetal human lymphoid tissue and its dependence on EBV. Int J Cancer 1971; 8:443.

[2] Yao QY, et al. A re-examinnation of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. Int J Cancer 1985; 35:35.

[3] Rocchi G, et al. Quantitative evaluations of Epstein-Barr virus infected peripheral blood leucocytes in infectious mononucleosis. New Eng J Med 1977; 296:132.

[4] Rickinson AB, et al. Tcell-mediated regression of "spontaneous" and of Epstein-Barr virus-induced B cell transformation in vitro: studies with cyclosporin A. Cell Immunol 1984; 87:646.

[5] Epstein MA and Achong BG. Introduction: Discovery and general biology of the virus. In MA Epstein and BG Achong, eds. The Epstein-Barr Virus pl, Springer-verlag 1979.

[6] Klein G. Immune and non-immune control of neoplastic development: contrasting effect of host and tumor evolution. Cancer 1980; 45:2486

[7] Rickinson AB, et al. The Epstein-Barr virus as a model of virus-host interactions. British Med. Belletin 1985; 41:75.

Study of "Spontaneous Transformation" in Peripheral Blood of Healthy Epstein-Barr Virus Seropositive Individuals

Huang Meiling Feng Kaitao Yao Qingyun

(Cancer Institute, Sun yat-sen University of Medical Sciences)

Abstract

A panel of 35 healthy seropositive donors have been studied for detection of Epstein-Barr virus (EBV) infected B cells in peripheral blood. It was most important that these cultures were set up and maintained in medium containing the immunosuppressive drug cyclosporin A (CSA) at a concentration of 0.1μg/ml. In the majority of cases, parallel cultures were also et up in medium without the addition of CSA. The cells were cultured for 6-8 weeks to observe the incidence of EBV-induced "spontaneous transformation" into lymphoblastoid cell lines. with incorporation of CSA, the positive results have increased from 26.7% to 74.3%. This work indicates that the EBV infected B cells in blood of healthy seropositive individuals were detected more often than the previous reports, and that the test for "sportaneous transformation" is more important for studying EBV carrier state than the test for seroantibody titres.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net