



## 论文

# EB 病毒感染对肝脏移植术后并发多发性骨髓瘤的影响

张业伟<sup>①†\*</sup>, 赵何伟<sup>①†</sup>, 何侠<sup>②†</sup>, 郑苏文<sup>①</sup>, 王太洪<sup>①</sup>, 严栋梁<sup>③</sup>, 孙静锋<sup>①</sup>, 鲁翔<sup>④</sup>, 闻鉴非<sup>①</sup>, 刘允怡<sup>⑤</sup>

① 南京医科大学附属江苏省肿瘤医院肝胆胰外科, 南京 210009;

② 南京医科大学附属江苏省肿瘤医院放疗科, 南京 210009;

③ 南通大学第二附属医院普外科, 南通 226001;

④ 南京医科大学附属第二医院老年科, 南京 210011;

⑤ 香港中文大学威尔斯亲王医院, 香港

† 同等贡献

\* 联系人, E-mail: zhangyewei@njmu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-20; 接受日期: 2012-06-27

国家自然科学基金(批准号: 61141013)、江苏省自然科学基金(批准号: SBK201120268)、江苏省医学重点人才计划(批准号: RC2011090)、江苏省“333”工程(批准号: 2011III-2640)资助项目

**摘要** 肝移植术后患者细胞免疫功能低下, 容易引起 EB 病毒等多种病毒感染. EB 病毒是一种 $\gamma$ 亚科疱疹病毒, 它和人类很多恶性疾病有关, 特别是上皮和淋巴起源的肿瘤. 异常的 CD40-CD40L 相互作用或异位的 CD40L 表达被认为与骨髓瘤的发展密切相关. 本研究探讨 EBV 感染对肝移植术后并发多发性骨髓瘤(MM)细胞表型和生物学的影响及机制. 通过流式细胞术检测 10 例肝移植术后有 EBV 感染病史并发多发性骨髓瘤患者的 MM 新鲜标本, 结果显示 5, 8, 9 和 10 号标本有 CD40 和 CD40L 共表达现象, 其中 5 号标本呈 CD40 和 CD40L 高度共表达. 用 EB 病毒体外感染 MM 细胞株 RPMI8226, 通过检测 EB 病毒的病毒抗原 LMP1 和 EBNA-2, 发现 EB 病毒能体外感染 MM 细胞. 感染后细胞在 mRNA 和蛋白水平上调 CD40L 表达, 并且这种上调可能参与感染后细胞抗凋亡效应. 而且, 共聚焦显微镜定位检测表明, CD40, CD40L 和 LMP1 分子能在感染后细胞表面两两共聚集. 此外, EB 病毒感染能上调 RPMI8226 细胞趋化因子受体 CXCR4 表达, 并且在趋化因子 SDF-1a 存在的情况下, 感染后细胞迁移率提高. 细胞的抗凋亡能力和迁移扩散能力是肿瘤恶性特征的重要表现, EB 病毒作为 MM 起源的一种高危因素, 可能通过体内感染生发中心 B 细胞使其转化产生抗凋亡的效应和提高细胞向外周血的迁移能力, 从而参与 MM 的发生和发展.

**关键词**

肝移植  
CD40  
CD40L  
多发性骨髓瘤  
EB 病毒

肝移植术后患者细胞免疫功能低下<sup>[1]</sup>, 特别是应用大剂量的激素冲击治疗后, 易引起多种病毒感染,

如 EB 病毒(epstein-barr virus, EBV)感染. 病毒感染可以是原发的感染或潜在感染的激活, 临床表现可以

从无症状的隐性感染到严重的爆发性感染<sup>[2]</sup>。患者通常可以自行康复,但有些并发症如肝炎,传染性单核细胞增多症,移植后淋巴增生症等往往会进一步发展。由于肝移植术后的免疫抑制,T细胞的功能受限,使B细胞呈单克隆性增生并导致肿瘤发生<sup>[2,3]</sup>。

EBV 是一种 $\gamma$ 亚科疱疹病毒,它和人类很多恶性疾病有关,特别是上皮和淋巴起源的肿瘤。EBV 在体外能感染正常静止的 B 细胞,使它们变成永生化的淋巴细胞系(LCL)。LCLs 表达的病毒抗原中包括 EBV 核抗原(EBNA1~6)、潜伏性膜蛋白(LMP1 和 LMP2)以及 EBV 编码的 RNAs(EBERs)<sup>[4]</sup>。其中,LMP1 被认为在 B 细胞的转化过程中起着关键作用。但是,有研究表明,仅依靠 LMP1 的表达不足以维持 B 细胞的体外增殖,它还需要第二信号的辅助<sup>[5]</sup>。CD40 在下游信号传导方面与 LMP1 有共同通路,被认为可能是主要的 LMP1 信号传导辅助分子。

人 CD40 分子是 I 型跨膜糖蛋白,属于肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员,它可以表达在不同分化阶段的 B 淋巴细胞上<sup>[6]</sup>,也包括一些 B 淋巴细胞起源的恶性肿瘤如多发性骨髓瘤细胞上。它的配体 CD40L 属于 TNF 超家族成员,主要瞬时表达于活化的 CD4<sup>+</sup> T 细胞上。有研究发现,CD40L 也可以表达在正常或肿瘤 B 细胞上<sup>[7,8]</sup>,而异常的 CD40-CD40L 的相互作用或异位的 CD40L 表达能使本应该凋亡和被清除的肿瘤细胞存活下来<sup>[9]</sup>。

多发性骨髓瘤是源于 B 细胞分化终末期的浆细胞的恶性肿瘤<sup>[10]</sup>,肿瘤细胞主要定居于骨髓,与骨髓基质细胞关系密切,在骨髓中大量增生,可占到骨髓内细胞总数的 15%~90%。骨髓瘤的确切致病因素到目前为止不甚清楚,可能与生发中心瞬时疱疹病毒感染有关<sup>[11]</sup>。EB 病毒作为疱疹病毒的一种,近几年备受关注。

本实验首先通过流式细胞仪检测 10 例肝脏移植术后感染 EBV 患者并发多发性骨髓瘤新鲜骨髓标本中 CD40 和 CD40L 共表达情况,观察共表达在 B 细胞起源的恶性肿瘤的普遍性。然后着重研究骨髓瘤细胞株 RPMI8226 在 EB 病毒感染后,其表型和细胞生物学行为的改变,尤其是 CD40 和 CD40L 的共表达情况。研究 CD40-CD40L 在肿瘤细胞逃逸 GC 机制所发挥的作用,来探讨浆细胞逃脱凋亡演变成恶性骨髓瘤细胞的可能机制及 EB 病毒感染对肝脏移植术后并发骨髓瘤细胞表型和生物学的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂、细胞株和骨髓标本

鼠抗人 CD40 单克隆抗体(5C11,3G3-FITC)、鼠抗人 CD40L 单克隆抗体(4F1)、LMP1 单克隆抗体、EBNA-2 多克隆抗体、CXCR4 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 生物技术公司; FITC-二抗、Cy-3 二抗、Ig 同型对照均购自法国 Immunotech 公司; RNA 抽提试剂盒、Western blotting 显色试剂盒购自中国上海华顺公司; RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Annexin-FITC 购自德国 Boehringer Mannheim 公司; Transwell 板购自德国 Corning Costar 公司; 趋化因子 SDF-1 $\alpha$  购自美国 BD 公司。10 例肝移植术后有 EBV 感染病史并发骨髓瘤患者的骨髓瘤新鲜标本由中国活体肝脏研究所提供; 多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226, EB 病毒产生细胞株 B95-8 和恶性淋巴瘤细胞株 Raji, Daudi 均购自美国 ATCC 公司; 培养基 RPMI1640 和 FCS 购自美国 GeBico 公司。所有细胞株均用德国 Boehringer Mannheim 公司的酶标试剂盒检测,没有支原体污染。

新鲜骨髓标本取自 10 例肝脏移植术后并发多发性骨髓瘤患者,患者分别于移植后第 9~29 个月内出现骨髓瘤临床表现,经临床诊断(国际骨髓瘤工作组,2003)为多发性骨髓瘤,均经酶联免疫吸附测定法证实 EBV 感染,血清 EBV-IgM 抗体阳性,经抗 EBV 治疗后,均治愈。病例采集符合“赫尔辛基宣言”,并在南京医科大学附属江苏省肿瘤医院伦理委员及每位患者同意的前提下进行。男性 7 例,女性 3 例; 年龄 14~45 岁,平均 27 岁。10 例患者,均为原发性肝癌,肝炎病毒标志物(B/C),  $n=7/3$ ; HBV DNA(+/-),  $n=4/6$ ; 肝功能 Child 分级(A/B/C),  $n=8/2/0$ ; 甲胎蛋白(+/-),  $n=8/2$ 。一位患者术前行动脉栓塞化疗。肿瘤侵犯门静脉主干,  $n=0$ 。侵犯门静脉左右属支,  $n=4$ 。侵犯肝静脉,腔静脉,  $n=0$ 。无瘤侵犯,  $n=6$ 。所有患者术前 EBV-IgM 抗体均为阴性。

7 例应用环孢素 A 联合泼尼松,3 例应用他克莫司联合泼尼松,3 例患者加用霉酚酸酯。10 例患者在诊断为 EBV 感染前均有激素(100~200 mg 甲泼尼龙琥珀酸钠)冲击治疗史。HBSAg 阳性患者口服拉米呋定。7 例患者分别于术后 9, 11, 12, 14, 19 和 28 天出现干咳、发热、呼吸困难,胸部 X 线显示双肺多片状阴影,呈间质性肺炎表现。3 例患者分别于术后 23, 25 和 27 天出现顽固性腹泻伴有肌肉酸痛、关节痛、

恶心、呕吐. 10例患者均有发热; 4例咽分泌物增多; 7例淋巴结(3例颈部淋巴结、4例下颌骨周围淋巴结)肿大; 2例肝脏肿大; 3例脾脏肿大; 4例肝脏和脾脏均肿大; 3例出现皮疹; 3例罹患支气管炎和支气管肺炎.

## 1.2 流式细胞仪检测 CD40 和 CD40L 在骨髓瘤细胞中的表达

按照标准 Ficol-Histopaque 过程从 10 例 EB 病毒感染的肝移植术后患者收集的新鲜的多发性骨髓瘤细胞. 按操作手册, 将 3  $\mu$ L 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD40 单抗以及藻红蛋白标记的 CD40L 或 CD138 单抗分别加入细胞悬液 100  $\mu$ L ( $1 \times 10^6$  个细胞). 在室温中避光培养 30 min 后, 用 1 mL 自制流式细胞仪专用溶血素溶液(溶血素:去离子水=1:9)避光处理染色样品 10 min. 样品用 PBS 液冲洗, 在室温下 450 $\times$ g 离心 5 min. 细胞在避光 300  $\mu$ L 聚甲醛溶液室温下固定 15 min, 或 4 $^{\circ}$ C 过夜, 然后用 FACSFlow 溶液(美国 BD 公司)冲洗. 细胞颗粒悬浮在 FACSFlow 溶液中, 并用流式细胞仪(美国 BD 公司)分析.

## 1.3 EB 病毒子的制备

根据 Oh 等人<sup>[12]</sup>的实验方法, 在指数生长的 B95-8 细胞( $5 \times 10^5$ /mL)中, 用 100 nmol/L 的 12-O-十四烷酰佛波醋酸酯-13(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)刺激 2 h, 然后用 HEPES 缓冲液洗 3 遍以移去溶液中的 TPA, 将细胞培养 48 h 后, 850 $\times$ g 离心 3 min 收获上清. 再将上清通过 0.22  $\mu$ m 滤器过滤, 用离心管分装 1 mL/支, 存储于 4 $^{\circ}$ C 以备用.

## 1.4 EB 病毒的感染

通过富集病毒和延长感染时间, 使 RPMI8226 细胞获得有效感染. 取对数生长期的 RPMI8226 细胞(总数  $3 \times 10^6$ )离心 5 min, 弃上清. 再取 3 mL 已制备好的病毒与细胞共培养 16 h, 然后用培养基洗 2 遍移去病毒, 再加入 10% FCS 的 RPMI1640 继续培养. 对照组使用紫外灯(15 W, 60 cm, 60 min)灭活的 EB 病毒感染 RPMI 8226 细胞.

## 1.5 免疫荧光抗体和细胞表型分析

感染后 48 h, 实验分 2 组: 对照组 RPMI8226 细胞未经 EB 病毒感染, 在 10%FCS 的 RPMI1640 生长;

实验组 RPMI8226 细胞先经过 EB 病毒感染, 再恢复到 10%胎牛血清(FCS)的 RPMI1640 继续生长. 将各组细胞调整到  $5 \times 10^6$ /mL, 取 100  $\mu$ L 分别加入 1  $\mu$ g 的 CD40 单抗(5C11)、1  $\mu$ g 的 CD40L 单抗(4F1)、1  $\mu$ g 的 LMP1 单抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗 2 次. 再分别和 FITC 标记的二抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗 2 次, 悬浮于 0.5 mL 的 PBS 中, 流式细胞仪分析. 每组实验重复 3 次, 结果取均值.

## 1.6 反转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)

感染后 24 h, 调整各组细胞总数至  $5 \times 10^6$ . 取经紫外线灭活的 EB 病毒感染 RPMI 8226 细胞作对照组. 按照 RNA 抽提试剂盒说明书, 抽取 RNA. 逆转录成 cDNA 进行 PCR: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 34 个循环. CD40L 胞外段引物序列为, 上游引物: 5'-GCC-GAATTCGAAAACAGCTTT-3', 下游引物: 5'-GCCT-CTAGAAATCAGAGTTTGAGT-3'(法国 Immunotech 公司合成); 1%琼脂糖凝胶电泳.  $\beta$ -actin 引物序列为, 上游引物: 5'-TCATGAAGTGTGACGTGGACATC-3', 下游引物: 5'-TCTAGTTCTAGTAACGAGGAGGAC-3'.  $\beta$ -actin 片段扩增操作如下: 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 孵育 3 min 延伸. 对获得的 PCR 产物行 1%琼脂糖凝胶电泳.

## 1.7 Western blotting

将两组各  $10^6$  个 RPMI8226 细胞用 PBS 洗 2 次. 取经紫外线灭活的 EB 病毒感染 RPMI 8226 细胞作对照组. 将细胞重悬于冷的 RIPA 缓冲液(1 $\times$ PBS, 1%NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1%SDS)中, 再加蛋白酶抑制剂(10 mg/mL PMSF, 30  $\mu$ g/mL 抑肽酶, 100 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). 在冰上放置 30 min, 并用 1 mL 针筒来回抽吸数次, 4 $^{\circ}$ C, 1000 $\times$ g 离心 20 min. 上清用于 SDS-PAGE 电泳, 并转移到硝酸纤维膜上, 用 1%的封闭液封闭 1 h, 加入 LMP1 单抗或 EBNA-2 多抗孵育 1 h, 用 TBST 洗去未结合的抗体, 加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗, 孵育 1 h, 用 TBST 洗 3 次, 再加入底物显色. 具体实验操作可参考试剂盒说明书(美国 BD 公司). 通过细胞膜上的 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)染色, 验证等价的蛋白荷载和传输效率.

## 1.8 细胞周期检测和凋亡分析

周期检测. 将细胞密度调至  $5 \times 10^6$  个/mL, 取出

100  $\mu\text{L}$  与 500  $\mu\text{L}$  碘化丙啶(PI)缓冲液(450  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 mol/L 柠檬酸钠, 50  $\mu\text{g}$  PI, 0.05% Triton100, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase)混合, 避光 4 $^\circ\text{C}$  放置 30 min, 流式细胞仪分析。

凋亡分析. 凋亡细胞用 PI 和 Annexin-V 双标记检测.  $5\times 10^5$  个细胞用 PBS 洗 2 次, 把细胞重悬于 500  $\mu\text{L}$  PI 冷的缓冲液中, 在缓冲液中加入 5  $\mu\text{L}$  FITC-Annexin-V 和 5  $\mu\text{L}$  PI, 避光 4 $^\circ\text{C}$  孵育 10 min, 流式细胞仪分析. 详细的实验操作参阅试剂盒说明书(法国 Immunotech 公司)。

### 1.9 细胞趋化因子 SDF-1 $\alpha$ 迁徙能力检测

选择孔径为 8  $\mu\text{m}$  的 Transwell 板, 分为 4 组, A 组: EBV(-)RPMI8226+SDF-1 $\alpha$ (-) 10% FCS RPMI 1640; B 组: EBV(+)RPMI8226+SDF-1 $\alpha$ (-) 10% FCS RPMI1640; C 组: EBV(-)RPMI 8226+SDF-1 $\alpha$ (+) 10% FCS RPMI 1640; D 组: EBV(+)RPMI 8226+SDF-1 $\alpha$ (+) 10% FCS RPMI 1640. 上室加不同组细胞  $10^5$  个/100  $\mu\text{L}$ , 下室加含有 200 ng/mL 趋化因子 SDF-1 $\alpha$  的 600  $\mu\text{L}$  10% FCS RPMI 1640 培养基. 37 $^\circ\text{C}$  温育 4 h 后, 收集下室细胞上流式细胞仪计数, 观测各组细胞的迁徙能力。

### 1.10 激光共聚焦显微镜分析

调整细胞浓度至  $1\times 10^5/\text{mL}$ , PBS 洗涤后, 加 100  $\mu\text{L}$  固定液, 重悬细胞, 室温保持 15~30 min. 加 1 mL PBS/BSA(含 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA 的 PBS), 重悬, 离心, 洗涤 2 遍. 分为 2 组: 一组加 100  $\mu\text{L}$  反应液 I(含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD40 多克隆抗体和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LMP1 单克隆抗体的 PBS/BSA), 重悬细胞, 室温保持 30~60 min. 加 1 mL PBS/BSA, 重悬, 离心, 洗涤 2 遍. 加 100  $\mu\text{L}$  反应液 II(含 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cy5-羊抗兔 IgG 和 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cy-3 羊抗小鼠 IgG 的 PBS/BSA), 重悬细胞, 室温保持 30~45 min, 洗涤; 另一组加 100  $\mu\text{L}$  反应液 I(含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD40L 单克隆抗体 4F1 的 PBS/BSA), 重悬细胞, 室温保持 30~60 min. 加 1 mL PBS/BSA, 重悬, 离心, 洗涤 2 遍. 加 100  $\mu\text{L}$  反应液 II(含 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cy-3 羊抗小鼠 IgG 的 PBS/BSA), 重悬细胞, 室温保持 30~45 min, 洗涤. 再加入 100  $\mu\text{L}$  反应液 III(含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3G3-FITC 的 PBS/BSA), 重悬细胞, 室温保持 30~45 min, 洗涤. 两组细胞 PBS 洗涤 1 遍, 加 20  $\mu\text{L}$  封片液, 重悬细胞. 各取 10  $\mu\text{L}$  上述含有细胞的封片液, 滴加在载玻片上, 加上盖玻片后在共聚焦显微镜

(美国 Bio-Rad 公司)下观察.

### 1.11 细胞增殖

将 Daudi 细胞用 10%FCS RPMI1640 培养基洗一次, 用 10%FCS RPMI1640 调节细胞浓度至  $1\times 10^5$  个/mL. 取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液加到 96 孔板中, 分别加入 IgG 和 CD40mAb 各 0, 5, 10 和 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 放入 37 $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中, 培养 24 h, 每孔掺入  $^3\text{H}$ -TdR3.  $7\times 10^4$  Bq, 继续培养 16 h 终止, 收获细胞, 用闪光仪测定 cpm 值, 每组实验重复 3 次, 结果取均值。

### 1.12 细胞凋亡检测

将 Daudi 或 Raji 细胞分别设置 4 组: (1) 对照组, 加 RPMI1640; (2) 加同型对照 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IgG; (3) 加 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD40mAb; (4) 加 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD40LmAb. 6 孔板中细胞培养 24 h, 凋亡细胞用 PI 和 Annexin-V 双标记检测.  $5\times 10^5$  细胞用 PBS 洗 3 次, 把细胞重悬于 500  $\mu\text{L}$  PI 冷的缓冲液当中, 在缓冲液中加入 5  $\mu\text{L}$  FITC-Annexin-V 和 5  $\mu\text{L}$  PI, 避光 4 $^\circ\text{C}$  孵育 10 min, 流式细胞仪分析。

### 1.13 统计学处理

使用 SPSS11.0 软件进行 *t* 检验分析数据, 实验数据以  $\bar{x}\pm\text{SD}$  表示,  $P<0.05$  为差别有统计学意义。

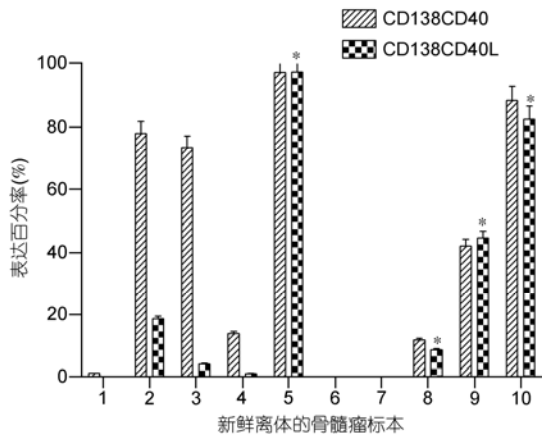
## 2 结果

### 2.1 10 例骨髓瘤新鲜标本 CD40 和 CD40L 共表达情况

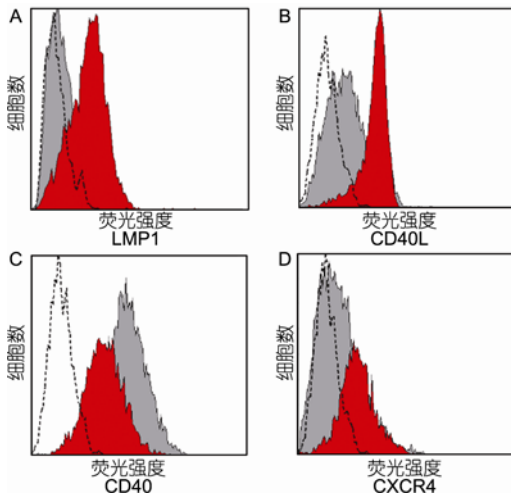
CD138 是骨髓瘤的标记分子, 通过检测 CD138 和 CD40 或 CD138 和 CD40L 双标记, 来检测骨髓瘤细胞 CD40 和 CD40L 的表达情况. 10 例标本中 CD40 和 CD40L 都有不同程度的表达. 其中 5, 8, 9 和 10 号标本 CD40 和 CD40L 都有明显共表达( $P>0.05$ )(图 1), 特别是 5 号标本 CD40 和 CD40L 呈高度共表达。

### 2.2 EB 病毒能感染 RPMI8226 细胞并在 RNA 水平及蛋白水平 CD40L 分子表达

RPMI 8226 细胞在体外与含有 EB 病毒颗粒的上清共培养后, 经免疫荧光抗体标记和流式细胞仪检测表明, 感染细胞表面开始表达 LMP1(图 2A). 结果表明, 约 95% 的 RPMI 8226 细胞感染 EB 病毒。



**图1 10例骨髓瘤新鲜标本 CD40 和 CD40L 共表达情况**  
5, 8, 9 和 10 号标本 CD40 和 CD40L 都有明显共表达(\*:  $P>0.05$ ), 特别是 5 号标本 CD40 和 CD40L 呈高度共表达



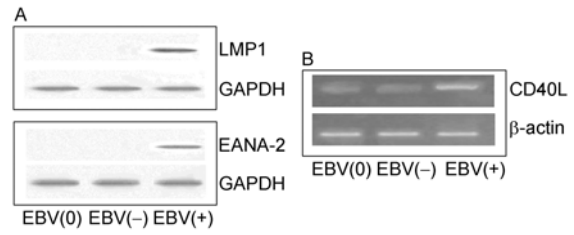
**图2 流式细胞术测定表型**

感染后 48 h, 测定细胞表面标志物的表达情况: 灰色区域示未感染细胞; 红色区域示感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞; 虚线围成区域示同型对照细胞. 细胞膜表面的 LMP1, CD40L 和 CXCR4 表达增多, CD40 表达减少

Western blotting 分析的结果也发现细胞感染后有 LMP1 和 EBNA-2 的表达(图 3A). RT-PCR 分析显示, RPMI 8226 细胞在感染后 24 h 就有 CD40L 上调表达(图 3B), 而在感染后 48 h, 流式细胞仪检测也证实膜表面 CD40L 呈上调表达(图 2B), 然而 CD40 却呈现下调性表达(图 2C).

### 2.3 EB 病毒感染赋予 RPMI8226 细胞感染后抗凋亡的能力

EB 病毒感染 8226 细胞 24 h 后, 细胞周期没有明



**图3 生化检测结果**

A: 感染后 24 h Western blotting 的检测 LMP1 和 EBNA-2 表达. EBV(0): 感染紫外线灭活 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞; EBV(-): 未感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞; EBV(+): 感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞. 上图示 LMP1 表达; 下图示 EBNA-2 表达. B: 感染后 24 h RT-PCR 检测 CD40L mRNA. EBV(0): 感染紫外线灭活 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞; EBV(-): 未感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞 (CD40L mRNA 正常表达); EBV(+): 感染 CD40L mRNA 上调表达

显变化, 但在 G1 期前有小凋亡峰出现(图 4B, 箭头所示); 感染后 48 h, 也是 CD40L 上调表达时, 凋亡峰消失(图 4C). 通过 Annexin-V-PI 双标记检测感染细胞凋亡率发现, 未感染 RPMI 8226 细胞凋亡率为  $2.35\% \pm 0.45\%$ , 感染后 24 h 凋亡率上升到  $12.30\% \pm 2.10\%$ , 然而在感染后 48 h, 也是 CD40L 上调表达时, 凋亡率下调到  $3.92\% \pm 0.42\%$ (图 5).

### 2.4 EB 病毒感染后上调 8226 细胞表达趋化因子受体 CXCR4

流式细胞仪检测表明, RPMI8226 细胞在感染后 48 h 表达趋化因子受体 CXCR4(图 2D). 而且感染细胞在趋化因子 SDF-1 $\alpha$ 趋化作用下, 显著地增强了迁移率(\* $P<0.05$ )(图 6).

### 2.5 CD40, CD40L 和 LMP1 分子在感染细胞的共聚集

用直标抗体 3G3-FITC 标记细胞表面 CD40 分子, 显示为绿荧光; 用间标抗体 4F1 或 anti-LMP1 标记细胞表面 CD40L 分子, 再联合 Cy3 二抗, 显示为红荧光; 如果 2 个分子在细胞表面共聚集, 则显示为黄荧光. 共聚焦显微镜分析显示, 感染后的 RPMI8226 细胞形态变的不规则, 表达的 CD40 和 CD40L 或 EBV 病毒蛋白 LMP1 能在细胞表面共聚集(黄荧光)(图 7). 由此推测, EBV 病毒蛋白 LMP1 的整合可能参与 CD40 信号的传导.

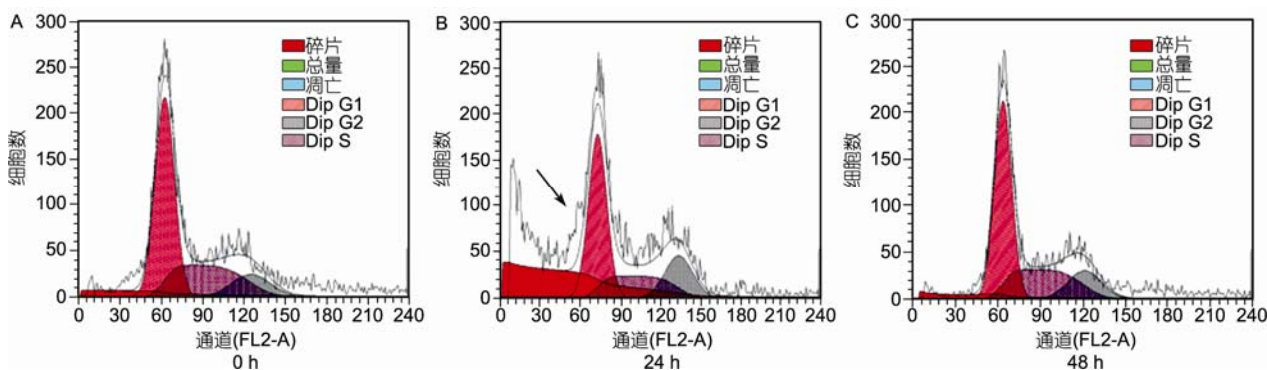


图 4 流式细胞术检测 PI 染色的感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞周期

A: 感染后 0 h; B: 感染后 24 h, 细胞周期没有明显变化, 但在 G1 期前有小凋亡峰出现(箭头所示); C: 感染后 48 h, 即 CD40L 上调表达时, 凋亡峰消失

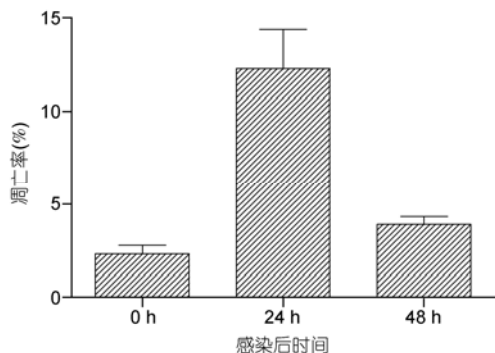


图 5 EB 病毒感染后 RPMI 8226 细胞的凋亡率

未感染 EB 病毒时 RPMI 8226 细胞的凋亡率为  $2.35\% \pm 0.45\%$ ; EB 病毒感染 24 h 后 RPMI 8226 细胞的凋亡率为  $12.30\% \pm 2.10\%$  (与未感染及感染 48 h 后相比,  $P < 0.05$ ); EB 病毒感染 48 h 后, CD40L 上调表达, 此时 RPMI 8226 细胞的凋亡率为  $3.92\% \pm 0.42\%$

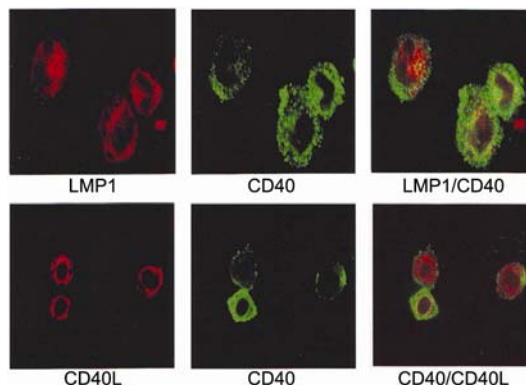


图 7 共聚焦显微镜分析 CD40, CD40L 和 LMP1 分子在感染细胞的共聚集

CD40/CD40L 和 LMP1/CD40 在细胞表面共聚集, 共聚集区域呈现黄色荧光

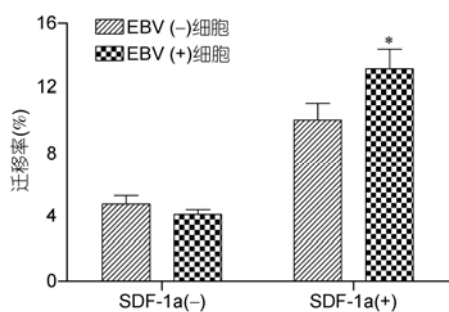


图 6 EB 病毒感染后 RPMI 8226 细胞的迁移率

未加入趋化因子 SDF-1 $\alpha$  时, 未感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞的凋亡率为  $4.79\% \pm 0.52\%$ , 感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞的凋亡率为  $4.14\% \pm 0.31\%$ ; 加入 SDF-1 $\alpha$  后, 未感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞的凋亡率为  $10.04\% \pm 1.03\%$ , 感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞的凋亡率为  $13.18\% \pm 1.21\%$  (与未加入趋化因子 SDF-1 $\alpha$  的感染 EB 病毒的 RPMI 8226 细胞相比,  $*P < 0.05$ )

## 2.6 CD40-CD40L 信号对 Daudi 细胞增殖的影响

用 3 种不同的处理方式: 同型 IgG、CD40 单抗、CD40L 单抗处理 Daudi 细胞, 观察对细胞增殖的影响. 实验结果显示, 相对于同型对照组, CD40 单抗或 CD40L 单抗都能抑制细胞增殖, 而且这种增殖抑制呈剂量依赖性, 实验还发现, CD40L 单抗对 Daudi 的增殖抑制作用强于 CD40 单抗(图 8).

## 2.7 CD40-CD40L 信号对 Raji 细胞凋亡的影响

用 3 种不同的处理方式: 同型 IgG, CD40 单抗及 CD40L 单抗处理 Raji 细胞, 观察对细胞凋亡的影响. 实验结果显示, 第一象限凋亡细胞比例有不同程度的改变. 进一步分析发现, 无论是 CD40 单抗还是 CD40L 单抗都能使 Raji 细胞凋亡率增高, 而只有



CD40L 单抗能使 Daudi 细胞凋亡率明显增高, CD40 单抗则作用不明显(图 8).

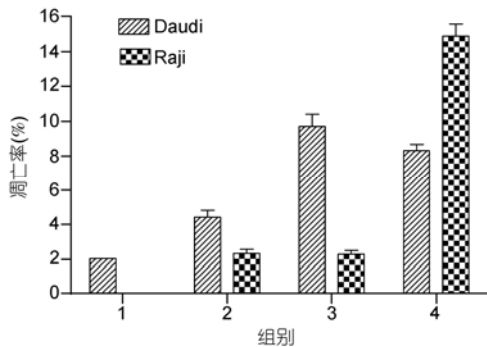


图 8 不同处理下 Daudi 或 Raji 的凋亡率

1: RPMI 1640 培养基; 2: 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gG 作为同型对照; 3: 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD40 单抗; 4: 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CD40L 单抗. 6 孔板中细胞培养 24 h. CD40 单抗和 CD40L 单抗都增加了 Raji 细胞的凋亡率; 只有 CD40L 单抗增加了 Daudi 细胞的凋亡率, CD40 单抗对 Daudi 细胞的凋亡率无明显影响

### 3 讨论

CD40 是分子量 45~50 kD 的膜分子, 属于 TNFR 超家族成员. CD40 与 EBV 转化后的 B 细胞所表达的病毒抗原 LMP1 在信号传导方面有很多的相似性. 并且当 CD40 配基化时, 细胞表面 CD40 和 LMP1 分子可被募集到脂筏组成信号传导复合体传递信号. CD40 的配体 CD40L, 又称 CD154, 是分子量为 39 kD 的膜分子, 属于 TNF 超家族成员. CD40L 主要以三聚体的形式瞬时表达在抗原活化的  $\text{CD4}^+$  T 细胞表面, 也可以瞬时表达在生发中心的 B 细胞和异位表达在一些 B 细胞系来源的肿瘤细胞上. B 细胞的成熟需要通过在生发中心与抗原活化的瞬时表达的  $\text{CD4}^+$  T 细胞结合, 促使 B 细胞表面的 CD40 配基化, 才能使高抗原亲和力的、非自身免疫性的 B 细胞存活、增殖、分化. 生发中心 B-T 细胞间 CD40-CD40L 的相互作用能够使 B 细胞免于凋亡. 但是, 生发中心中 T 细胞数量很少, 自身正常 B 细胞表达 CD40L 也是暂时的, 这种严格的筛选机制只能使一部分功能性 B 细胞存活, 而未能和 T 细胞结合发生配基化的恶性细胞和或自身免疫细胞则被清除. 然而, 许多肿瘤细胞能逃脱生发中心的筛选机制, 最终存活下来得到扩增. 近来有研究发现, 受体和配体可以在相同的细胞共表达, 尤其是在恶性细胞<sup>[13]</sup>. 一些致癌因素, 如病毒感染可

以导致异位表达或表达上调, 并最终使恶性细胞逃避凋亡或免疫细胞的攻击. 恶性细胞中受体和配体共表达的具体机制, 值得进一步研究.

很多 B 细胞起源的恶性肿瘤都出现了 CD40 和 CD40L 的异位表达. 而且, 很多致癌因素如病毒感染在转化细胞的过程中, 也利用了 CD40-CD40L 这条途径<sup>[14]</sup>. 肿瘤 B 细胞在什么方面不同于正常 B 细胞, 从而在生发中心中能够逃脱严格的筛选机制, 存活下来并得到无限扩增? 是否通过自身提供 CD40L, 或上调 CD40L, 使得在生发中心无法通过 T 细胞依赖途径存活的肿瘤细胞存活下来? 因为 CD40-CD40L 与细胞生长增殖密切相关, 研究肿瘤细胞上这对分子, 或在特定条件下如病毒感染, 观察这对分子表达的前后变化及相应的生物学行为改变, 为临床探索肿瘤的发生发展提供重要信息.

本研究应用有效制备 EB 病毒的方法, 发现 EB 病毒作为一种  $\gamma$ -亚科疱疹病毒, 能在体外感染 B 细胞来源的恶性浆细胞, 即多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 细胞. 通过流式细胞仪和 Western blotting 的检测, 证明感染后细胞在蛋白水平有 LMP1 和 EBNA-2 这两个 EB 病毒感染后标记分子的表达. 通过流式细胞仪和 RT-PCR, 分别从蛋白水平和 RNA 水平显示了 CD40L 表达在 EBV 感染后呈上调. 有文献报道<sup>[15,16]</sup>, LMP1 在 EB 病毒转化 B 细胞中起着关键作用. 它在下游信号传导途径和募集下游信号分子 TRAFs 上与 CD40 非常相似, 但是 LMP1 也不能完全取代 CD40<sup>[17]</sup>. 由此提示, 两者在某些方面还有差异. 而且业已证实, 当细胞受到 CD40L 配基化后, LMP1 和 CD40 会汇聚到一起, 形成脂筏形式的信号传导复合体, 向细胞内传递信号<sup>[18]</sup>. 仅仅只有 LMP1 不足以维持 B 细胞在体外增殖. 因此, CD40 和 CD40L 在转化过程中很可能都是必需的.

通过流式细胞仪、RT-PCR 和 Western blotting 的检测, 还显示 RPMI8226 细胞本身存在少量的 CD40L 的组成性表达, 这与某些 B 淋巴瘤上有 CD40 和 CD40L 共表达的文献报道是一致的<sup>[19]</sup>.

已有文献报道<sup>[20,21]</sup>, EB 病毒体外感染正常 B 淋巴细胞可以上调表达 CD40L, 而正是这些 CD40L 分子在 B 细胞转化成永生淋巴瘤细胞系(LCL)过程中起了重要作用. RPMI8226 细胞中上调表达的 CD40L 也可能与感染细胞抗凋亡有关<sup>[22]</sup>. 细胞周期分析中发现, 感染后 24 h 细胞出现了凋亡峰, 可能由于细胞短

时间内受到病毒大剂量冲击有关. 而在感染后 48 h, 也就是蛋白水平 CD40L 上调时, 凋亡峰消失(图 4C). 类似的结果在 Annexin-V 和 PI 双标记的凋亡检测中也进一步得到证实(图 5). 然而, 感染后细胞 CD40 表达下调(图 2C). 有研究发现<sup>[23]</sup>, 低剂量 CD40 抗体可以诱导白细胞介素-10 生成, 而高剂量时诱导白细胞介素-12 生成. 我们前期研究也发现<sup>[24,25]</sup>, 低剂量 CD40 抗体可以激发多发性骨髓瘤细胞增殖, 而高剂量时诱导骨髓瘤细胞凋亡.

通过恶性转化可以使一些细胞的正常的生理机制发生改变, 从而有利于肿瘤细胞的存活、生长和增殖<sup>[26]</sup>. 本研究发现, B 淋巴瘤细胞株 Daudi 和 Raji 可以通过 CD40L 异位表达, 使 CD40 和 CD40L 在细胞表面共表达, 并且共聚集, 有可能组成一个信号转导复合体, 而利用阻断性 CD40mAb 或 CD40LmAb, 可能通过以下两个方式阻断 CD40-CD40L 信号转导: (1) 破坏单个细胞表面信号传导复合体结构; (2) 阻断了肿瘤细胞与细胞间 CD40-CD40L 的信号作用, 使肿瘤细胞生长、增殖受到抑制, 并使细胞凋亡率增加. 而且由于不同的抗体阻断的分子不同, 可以产生不同程度的阻断效应. 如果阻断信号是以第一种方式占优势, 那么阻断信号传导复合体中的任何一分子,

都有可能破坏复合体的完整性结构, 起到阻断信号传导的作用. 因此临床上选用 CD40 作为靶分子进行肿瘤治疗时, 可以尝试考虑以 CD40 信号传导复合体作为靶目标.

肝移植术后并发 MM 细胞被 EB 病毒感染后导致的 CD40L 上调表达可能参与了浆细胞转变成恶性骨髓瘤细胞的过程和感染后细胞抗凋亡效应. 而且, 趋化因子受体 CXCR4 也在感染后明显上调表达(图 2D), 细胞迁徙率也显著提高, 使得感染细胞迁徙能力增加, 这也是肿瘤恶性程度的一个重要特征. CD40 和 CD40L 或 EBV 抗原 LMP1 可以在感染后的细胞表面共聚集, 无论是骨髓瘤新鲜标本, 还是 B 淋巴瘤细胞株 Daudi 或 Raji, 都有 CD40 和 CD40L 共表达现象, 并且两者可以在细胞表面共聚集. CD40 和 CD40L 共表达是有意义的, 用阻断性 CD40mAb 或 CD40LmAb 阻断 CD40-CD40L 信号, 能显著抑制 Daudi 或 Raji 细胞生长、增殖, 并诱导细胞凋亡; 不同抗体由于结合分子不同, 对信号阻断的强度是不同的, 并且呈抗体剂量依赖性.

有关 EB 病毒导致的疾病与 CD40-CD40L 的关系, 还有待进一步研究, 其意义在于将为今后的肿瘤预防和免疫治疗提供新途径.

## 参考文献

- Berenson J R, Vescio R A. HHV-8 Is present in multiple myeloma patients. *Blood*, 1999, 93: 3157-3159
- Bishop G A, Hostager B S. The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14: 297-309
- Busch L K, Bishop G A. The EBV transforming protein, LMP1, mimics and cooperates with CD40 signaling in B lymphocyte. *J Immunol*, 1999, 162: 2555-2561
- Cacciarelli T V, Green M, Jaffe R, et al. Management of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients receiving primary tacrolimus (FK506) therapy. *Transplantation*, 1998, 66: 1047-1052
- Challa A, Eulopulos A G, Holder M J, et al. Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsy-like Burkitt's lymphoma cells. *Blood*, 2002, 99: 3411-3418
- Clodi K, Asgary Z, Zhao S, et al. Coexpression of CD40 and CD40 ligand in B-cell lymphoma cells. *Br J Haematol*, 1998, 103: 270-275
- Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, et al. Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J Clin Invest*, 1994, 93: 1315-1320
- Hallek M, Bergsagel P L, Anderson K C. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*, 1998, 91: 3-21
- Hanissian S H, Geha R S. Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity*, 1997, 6: 379-387
- Imadome K, Shirakata M, Shimizu N, et al. CD40 ligand is a critical effector of Epstein-Barr virus in host cell survival and transformantion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 7836-7840
- Kaykas A, Worringer K, Sugden B. CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. *EMBO J*, 2001, 20: 2641-2654
- Oh H M, Oh J M, Choi S C, et al. An efficient method for the rapid establishment of Epstein-Barr virus immortalization of human B



- lymphocytes. *Cell Prolif*, 2003, 36: 191–197
- 13 Larsen C P, Elwood E T, Alexander D Z, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*, 1996, 381: 434–438
  - 14 Arcipowski K M, Stunz L L, Graham J P, et al. Molecular mechanisms of TNFR-associated factor 6 (TRAF6) utilization by the oncogenic viral mimic of CD40, latent membrane protein 1 (LMP1). *J Biol Chem*, 2011, 286: 9948–9955
  - 15 Wang Z, Yang S, Zhou L, et al. Specific cellular immune responses in mice immunized with DNA, adeno-associated virus and adenoviral vaccines of Epstein-Barr virus-LMP2 alone or in combination. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 263–266
  - 16 Mathur R K, Awasthi A, Wadhone P, et al. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat Med*, 2004, 10: 540–544
  - 17 Mutimer D, Kaur N, Tang H, et al. Quantification of Epstein-Barr virus DNA in the blood after adult liver transplantation. *Transplantation*, 2000, 69: 954–959
  - 18 Nalesnik M A, Rao A S, Furukawa H, et al. Autologous lymphokine-activated killer cell therapy of Epstein-Barr virus-positive and -negative lymphoproliferative disorders arising in organ transplant recipients. *Transplantation*, 1997, 63: 1200–1205
  - 19 Xu H, Zhao G, Huang X, et al. CD40-expressing plasmid induces anti-CD40 antibody and enhances immune responses to DNA vaccination. *J Gene Med*, 2010, 12: 97–106
  - 20 Qi C J, Zheng L, Zhou X, et al. Cross-linking of CD40 using anti-CD40 antibody, 5C11, has different effects on XG2 multiple myeloma cells. *Immunol Lett*, 2004, 93: 151–158
  - 21 The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Hematology*, 2003, 121: 749–757
  - 22 Tong A W, Seamour B, Chen J, et al. CD40 Ligand-induced apoptosis is fas-independent in human multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma*, 2000, 36: 543–558
  - 23 Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, et al. Mimicry of C40 signals by EBV LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*, 1999, 286: 300–303
  - 24 Young L S, Rickinson A B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 757–768
  - 25 Zimmer-Strobl U, Kempkes B, Marschall G, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *EMBO J*, 1996, 15: 7070–7078
  - 26 Cao J, Shen C, Zhang J, et al. Comparison of alternative extraction methods for secretome profiling in human hepatocellular carcinoma cells. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 34–38