

NIH3T3-CD40L稳定细胞系构建及在EBV转化B淋巴细胞中的应用

刘 玺 赵 焱 许崇凤 段子渊*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 遗传资源研究中心, 北京 100101)

摘要 通过脂质体法转染pCMV6-CD40L重组质粒和G418阳性克隆筛选, 构建了稳定表达CD40L的NIH3T3细胞系, 在RNA和蛋白质水平进行了功能鉴定, 对其作为饲养细胞在体外B淋巴瘤细胞系(B lymphoblastoid cell lines, B-LCLs)培养和在EBV转化B细胞中的作用进行了实验验证。结果表明, NIH3T3-CD40L细胞系不仅可以提高体外低密度B-LCLs存活率, 而且可以降低成功建立B-LCLs所需的细胞密度, 促进其增殖。该细胞系的成功构建, 进一步确证了NIH3T3-CD40L作为饲养细胞可以促进体外低密度B-LCLs的增殖及提高EBV转化B淋巴细胞的效率, 优化了体外B细胞培养及EBV转化B淋巴细胞的流程, 也为单克隆抗体的制备奠定了基础。

关键词 NIH3T3-CD40L; 饲养细胞; B-LCLs

Construction of NIH3T3-CD40L Stable Cell Lines and Its Application in EBV Transformation of B Lymphocytes

Liu Xi, Zhao Ye, Xu Chongfeng, Duan Ziyuan*

(Genetic Resource Research Center, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Stably expressing CD40L NIH3T3 cell lines were constructed and its application as feeder cells to culture and establish B lymphoblastoid cell lines (B-LCLs) *in vitro* were evaluated. pCMV6-CD40L was transfected into NIH3T3 cell lines through lipofectamine method, followed NIH3T3 that express CD40L were screened by G418. Positive clones were confirmed at RNA and protein level, the NIH3T3-CD40L cell lines were used as feeder cells in culturing B-LCLs and in the process of EBV transformation. The results showed that NIH3T3-CD40L cell lines increased the survival rate and promote the proliferation of B-LCLs in low density and reduce the cell concentration required to establish B-LCLs. Therefore, NIH3T3-CD40L cell lines have been successfully constructed which would lay a foundation for further studies, such as monoclonal antibody production.

Keywords NIH3T3-CD40L; feeder cells; B-LCLs

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)又称人类疱疹病毒4型, 是人类最常见的病毒之一, 感染了世界上90%以上的成人。EBV主要感染B细胞, 在某些条件下, 也会感染T细胞和上皮细胞。在体外, EBV可以转化静息状态的B细胞为无限增殖的B淋巴瘤母细胞

系(B lymphoblastoid cell lines, B-LCLs)。B-LCLs的体细胞突变率只有0.3%^[1], 基因型和表型的改变几乎可以忽略不计, 同时具有较强的增殖能力, 为很多实验持续提供基因型和表型匹配的原材料, 有利于生物医学研究的开展。B-LCLs在免疫遗传学领域具有广泛的应用, 如作为EBV相关疾病的研究模型^[2]; 作为生物大分子材料如DNA、RNA、蛋白质, 用于病因学及进化起源的研究^[3-4]; 作为抗原呈递细胞刺激特异细胞毒T细胞反应^[5]以及用于制备单克隆抗体^[6-7]

收稿日期: 2017-11-09

接受日期: 2018-01-26

*通讯作者。Tel: 010-64803631, E-mail: zyduan@genetics.ac.cn

Received: November 9, 2017

Accepted: January 26, 2018

*Corresponding author. Tel: +86-10-64803631, E-mail: zyduan@genetics.ac.cn

网络出版时间: 2018-05-21 16:46:07

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180521.1645.014.html>

等。利用B-LCLs生产单克隆抗体与传统的杂交瘤技术、噬菌体抗体库技术等相比,最大的优点在于无需进行特异免疫即可利用人类B细胞生产低亲和力的抗体,可在一定程度上反映免疫应答的特异性和多样性^[8]。

目前,已经建立起很多EBV转化B淋巴细胞的方法。其中,最为常用的方法是使用密度梯度离心从新鲜血液中分离出外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)之后进行EBV转化,即本研究中所使用的Ficoll分离法。在多年使用Ficoll分离法进行EBV永生化的过程中,我们发现影响成功建立B-LCLs的关键因素是细胞和病毒的数目,尤其是细胞密度。国内外很多相关研究也表明,细胞密度是影响转化效率的一个特别重要的参数^[9]。因此,我们尝试在EBV永生化过程中通过使用饲养细胞及添加其他可以促进B细胞存活和增殖的因子如CD40L,优化B淋巴母细胞系的建立条件。

饲养细胞多应用于体外干细胞的分离和培养,通过细胞与细胞相互作用和提供营养支持促进干细胞的生长,维持其多能和自我更新的能力^[10]。饲养细胞是指处于生长阻滞但代谢活跃、具有生物活性的贴壁细胞。NIH3T3细胞无异体接种致癌性,可以无限繁殖。由于其较强的分泌细胞因子能力及易于培养等特点,常作为饲养细胞用于其他细胞的体外培养,如B细胞和胚胎干细胞。

CD40/CD40配体(CD40/CD40L)系统对维持机体体液免疫平衡和B细胞的正常生命活动具有重要作用^[11]。CD40/CD40L系统在B细胞生长和分化的许多检查点上起着至关重要的作用:促进生发中心形成,免疫球蛋白同种型转换和体细胞突变,长寿浆细胞和记忆B细胞的形成^[12]。此外,CD40/CD40L相互作用还促进B细胞增殖,活性标志物表达以及防止生发中心B细胞凋亡。因此,CD40L或表达CD40L的饲养细胞广泛应用于B细胞研究中。Jourdan等^[13]在体外培养记忆B细胞中添加细胞因子、sCD40L或CpG等以激活B细胞。Ivanov等^[14]使用表达CD40L的3T3和293细胞激活B细胞使其作为诱导T细胞免疫应答的APC。

鉴于目前没有商业化的NIH3T3-CD40L细胞,因此我们需对野生型NIH3T3细胞进行改造。本研究旨在构建稳定表达CD40L的NIH3T3细胞系,并应

用于体外EBV转化B淋巴细胞过程中,以此优化B淋巴母细胞系的建立条件及为B细胞的单克隆化提供实验技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

NIH3T3细胞由中国科学院遗传与发育生物学研究所许执恒老师惠赠。B95.8细胞系为本实验保存。pCMV6-CD40L(Cat No.RC210004)购自北京敖锐东源生物科技有限公司。Lipofectamine 2000(Cat 11668-019)购自Invitrogen公司。G418 sulfate(AMRESCO: 9016-1g)购自北京欣经科生物技术有限公司。Ficoll-Paque Plus(71-7167-00)购自GE Healthcare公司。RNAiso Plus(Code: 9108/9109)、Reverse Transcriptase M-mLV(Code: D2639A)购自TaKaRa公司。环孢霉素A(No.12088)购自Cayman Chemical公司。PHA-M植物血凝素(L8902)购自Sigma公司。丝裂霉素C(AM395)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 NIH3T3-CD40L细胞系的构建 NIH3T3细胞接种于24孔细胞培养板, 1×10^5 个/孔,每孔100 μ L。分别加入G418终浓度为0、400、500、600、700、800、900、1 000 μ g/mL,每个浓度设3个复孔。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养10天。3天后换液,补足G418浓度。逐日观察,选择在10~14天内致细胞全部死亡的最低G418浓度来进行下一步的筛选实验。

参照试剂盒指示,脂质体法转染NIH3T3细胞。Lipofectamine 2000转染pCMV6-CD40L质粒的NIH3T3细胞在培养24 h后更换G418最适浓度的培养基。3天后换液,待出现抗性克隆,采用有限稀释法将细胞置于96孔板中克隆化培养。挑选细胞数为1的孔做标记。相继于24孔板、6孔板、10 cm培养皿扩大培养,获得整合CD40L的NIH3T3细胞克隆。以未转染重组质粒的NIH3T3细胞作为阴性对照,相同方法培养。

1.2.2 NIH3T3-CD40L细胞系的鉴定 提取筛选后的NIH3T3、NIH3T3-CD40L细胞系RNA,参照说明反转录为cDNA。PCR鉴定新建细胞系包含的CD40L全长,所用上游引物: 5'-CCG TCG ACA TGA TCG AAA CAT A-3'; 下游引物: 5'-CCC GCG GCC GCT CAG AGT TTG AGT AA-3'[由生工生物工程(上海)股份有限公司合成]。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min;

94 °C变性30 s, 55 °C退火10 s, 72 °C延伸30 s, 30个循环; 72.0 °C反应10 min。阳性扩增产物长度为786 bp。

Western blot鉴定CD40L的表达情况。收集细胞, 加入细胞裂解液, 冰上静置20 min。加入5×缓冲液煮沸10 min。进行SDS-PAGE, 然后转至PVDF膜。封闭1 h。加入anti-myc mouse(一抗, 稀释度为1:1 000)室温孵育2 h后洗膜3次。再用goat-anti-mouse(二抗, 稀释度为1:10 000)室温孵育2 h, 洗膜3次后经暗室显影成像。

1.2.3 EBV的制备 饥饿法制备EBV。复苏B95-8细胞, 培养在6 mL含10%胎牛血清的1640培养基中。隔天补加培养液直至100 mL。进行饥饿, 即连续8天不加培养液然后收集细胞于15 mL离心管中, 12 mL/管。置于-80 °C冰箱冻存1 h, 37 °C快速融化。反复冻融3次, 使病毒粒子释放到细胞外。常温下, 1 200 r/min离心10 min。将上清液用0.2 μm滤膜抽滤, 分装后置于-80 °C保存。

1.2.4 Ficoll分离法建立B淋巴母细胞系 摇匀Ficoll, 取4 mL加入到离心管中。将稀释后的血样(1640基础培养基:全血=1:1)沿管壁小心加在淋巴细胞分离液上, 室温水平离心, 2 000 r/min离心20 min。用吸管小心吸取白色的淋巴细胞层, 加入盛有7 mL 1640基础培养基的离心管中。1 200 r/min离心5 min; 重复1次。将离心沉淀在2 mL转化培养基(1640基础培养基+20% FBS+10 μg/mL PHA)中重悬。在每个样品的细胞悬液中加入20 μg/mL环孢霉素A 0.4 mL, EB病毒1.3 mL; 吹打均匀。将细胞悬液转移到24孔培养板, 1 mL/孔, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。细胞越长越多, 肉眼可见板底许多白色的细胞集落, 此时可将24孔板内的细胞转移到T25培养瓶。3~4周后可用于遗传学实验或按常规冻存细胞。

1.2.5 饲养层细胞的处理 将生长良好的NIH3T3、NIH3T3-CD40L饲养细胞接种到10 cm培养皿中。12 h(可过夜)后待细胞完全贴壁且汇合度达到90%以上, 加入丝裂霉素C处理液(10 μg/mL), 37 °C避光孵育2.5~4 h。用1640基础培养基或者PBS洗3~5次。加入DMEM完全培养基, 37 °C孵育30 min。用胰蛋白酶消化至96孔板, 所用培养基为1640。

2 结果

2.1 建立稳定表达CD40L的NIH3T3细胞系

用G418浓度梯度400、500、600、700、800、

900、1 000 μg/mL培养NIH3T3细胞。观察细胞生长状态, 4天时, 1 000 μg/mL细胞已经将近全部死亡; 8天时, 浓度为800 μg/mL的孔中已经无活细胞, 600、700 μg/mL有少数细胞存活。因此, 确定G418药物浓度800 μg/mL为筛选CD40L阳性克隆的最适致死浓度。

用Lipofectamine 2000转染NIH3T3细胞24 h后, 更换含G418致死剂量的培养基。加入G418 5天后, 对照组细胞已经死去大部分, 11天时对照组已经无活细胞, NIH3T3-CD40L有细胞存活, 且有些已长成单细胞克隆群。将单克隆细胞群自培养孔吸出, 倍比稀释至0.5~1个/mL, 每孔100 μL加入96孔板, 接种两排。3天后, 挑选细胞数为1的孔做标记。相继于24孔板、6孔板、10 cm培养皿扩大培养, 获得整合pCMV6-CD40L的NIH3T3细胞克隆两株。

2.2 NIH3T3-CD40L细胞系的鉴定

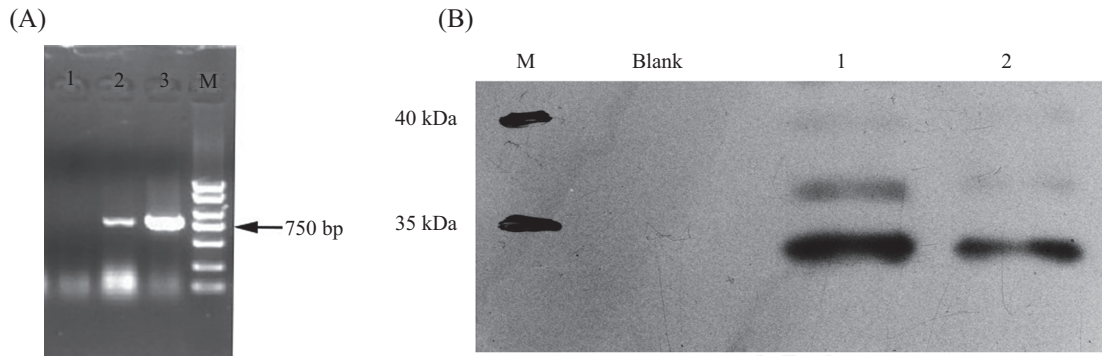
2.2.1 RNA水平的鉴定 提取NIH3T3、NIH3T3-CD40L细胞RNA, 参照试剂盒指示操作反转为cDNA, 进行PCR鉴定。电泳可见扩增出786 bp左右大小的特异性条带(图1A), 与CD40L扩增出的理论条带大小一致, 可推断出目的基因在NIH3T3细胞中成功转录。

2.2.2 蛋白质水平的鉴定 暗室曝光后可见33 kDa处出现特异性条带(图1B), 与CD40L理论条带大小一致, 可推断出所建细胞株为CD40L阳性克隆。

2.3 NIH3T3-CD40L饲养细胞条件下建立B淋巴母细胞系

2.3.1 NIH3T3-CD40L饲养细胞对B-LCLs细胞生长率的影响 计数B-LCLs细胞, 有限稀释法2倍梯度稀释, 取100 μL细胞稀释液、稀释梯度为2 000至3.9个/mL(即200至0.39个/孔)加入至已覆盖饲养细胞的96孔板中, 每个梯度6个重复。每3天半量换液, 第20天统计结果。结果如表1所示。无饲养细胞条件下, B-LCLs在50个/孔时, 细胞生长率已经降低。在NIH3T3饲养细胞下, B-LCLs低至3.25个/孔时, 少数孔中细胞可以存活。在NIH3T3-CD40L饲养细胞条件下, B-LCLs低至1.56个/孔时, 细胞存活孔占33.33%, 效果优于NIH3T3饲养细胞。即不论是否表达CD40L, 饲养细胞确实有利于体外少量B-LCLs的存活, 但在CD40L刺激下, B-LCLs的存活率明显提高。

第20天时, 对不同饲养细胞条件下梯度50个/孔



A: RNA水平鉴定CD40L(786 bp); 泳道1、2、3: 分别是NIH3T3、NIH3T3-CD40L克隆1和NIH3T3-CD40L克隆2; M: BM2000 marker。B: 蛋白质水平鉴定CD40L(33 kDa)。M: marker; Blank、1、2: 分别是NIH3T3、NIH3T3-CD40L克隆1和NIH3T3-CD40L克隆2。

A: detection of CD40L at mRNA level (786 bp). Lane 1,2,3: NIH3T3, NIH3T3-CD40L clone 1 and NIH3T3-CD40L clone 2 respectively; M: BM2000 marker. B: detection of CD40L at protein level (33 kDa). M: marker; Blank, 1, 2: NIH3T3, NIH3T3-CD40L clone 1 and NIH3T3-CD40L clone 2 respectively.

图1 RNA和蛋白质水平对NIH3T3-CD40L细胞系进行鉴定

Fig.1 Identification of NIH3T3-CD40L at RNA and protein level

表1 与NIH3T3、NIH3T3-CD40L共培养时B-LCLs的存活率

Table 1 The survival rate of B-LCLs when cocultured with NIH3T3, NIH3T3-CD40L

细胞数/孔 Cells/well	存活率(%) Survival rate (%)									
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
Blank-B-LCLs	100	83.33	66.67	33.33	0	0	0	0	0	0
NIH3T3-B-LCLs	100	100	100	66.67	83.33	16.67	16.67	0	0	0
NIH3T3-CD40L -B-LCLs	100	100	100	100	83.33	50	50	33.33	0	0

中的B-LCLs进行计数。如图2所示, Blank-BLCLs、NIH3T3-BLCLs和NIH3T3-CD40L-BLCLs活细胞浓度分别为: 5.41×10^4 、 8.73×10^5 和 1.60×10^6 个/mL。可见, 饲养细胞有利于B-LCLs的增殖, CD40L刺激下

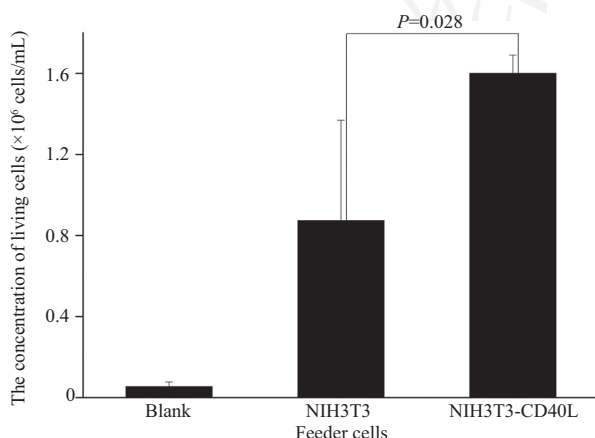


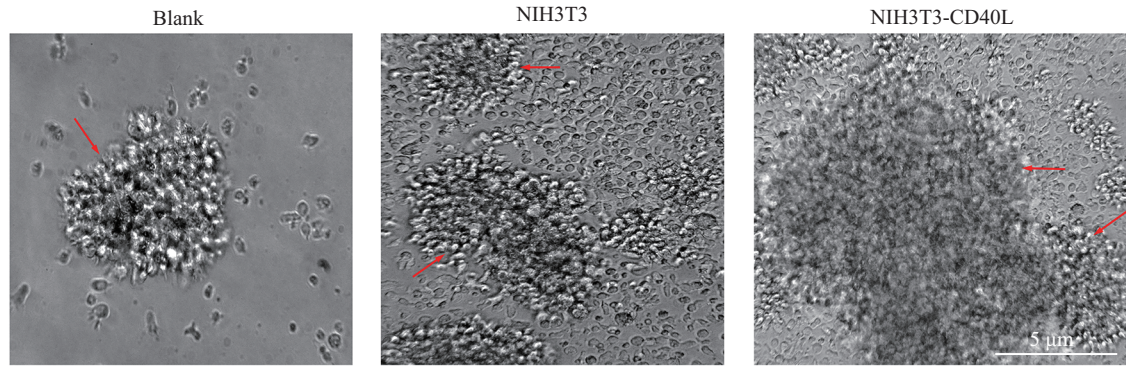
图2 在50个/孔梯度下不同饲养细胞孔中B-LCLs的数目(20天)

Fig.2 The number of B-LCLs in different feeder cells at gradient 50 cells/well (20 d)

增殖效果更为明显($P=0.028$)。显微镜下观察细胞生长状态, 不管是否有饲养细胞, B-LCLs的形态没有区别, 但是饲养细胞条件下B-LCLs大量增殖, 细胞团数目明显多于无饲养细胞的孔(图3)。

2.3.2 NIH3T3-CD40L饲养细胞条件下建立B淋巴细胞系 采集志愿者 EDTA K_2 抗凝全血10 mL, Ficoll密度梯度离心分离出PBMCs, 分为7个不同的细胞密度梯度(0.5×10^4 、 0.1×10^5 、 0.25×10^5 、 0.5×10^5 、 1.0×10^5 、 0.25×10^6 、 0.5×10^6 个/mL) EBV转化后, 接种到已覆盖饲养细胞的96孔板中, 每个样品每个梯度3个重复。结果表明, 在铺孔浓度低至 0.25×10^5 个/mL时, 在饲养细胞的作用下, 依然可以保持100%的建系成功率。可见饲养细胞有利于EBV转化细胞的存活, 且稳定表达CD40L的NIH3T3细胞系效果更好(表2)。

在第20天对梯度为 0.25×10^6 个/mL, 不同饲养细胞中的B-LCLs进行计数。结果显示, Blank-PBMCs、NIH3T3-PBMCs和NIH3T3-CD40L-PBMCs活细胞浓度分别为: 2.85×10^5 、 1.82×10^6 和 2.34×10^6 个/mL(图



红色箭头所指为B-LCLs的细胞团。

The red arrowheads refer to the cell clusters of B-LCLs.

图3 在50个/孔梯度下不同饲养细胞孔中B-LCLs的细胞形态(20天)

Fig.3 The cell morphology of B-LCLs in different feeder cells at gradient 50 cells/well (20 d)

表2 NIH3T3、NIH3T3-CD40L与PBMC共培养的建系成功率(20 d)

Table 2 The success rate of establishing B-LCLs when NIH3T3, NIH3T3-CD40L and PBMCs coculture (20 d)

细胞密度(cells/mL) Cell density (cells/mL)	成功率(%) Success rate (%)						
	0.5×10^4	0.1×10^5	0.25×10^5	0.5×10^5	1.0×10^5	0.25×10^6	0.5×10^6
PBMCs-Blank	0	0	0	33.33	100	100	100
PBMCs-NIH3T3	0	0	66.67	100	100	100	100
PBMCs-NIH3T3-CD40L	0	33.33	100	100	100	100	100

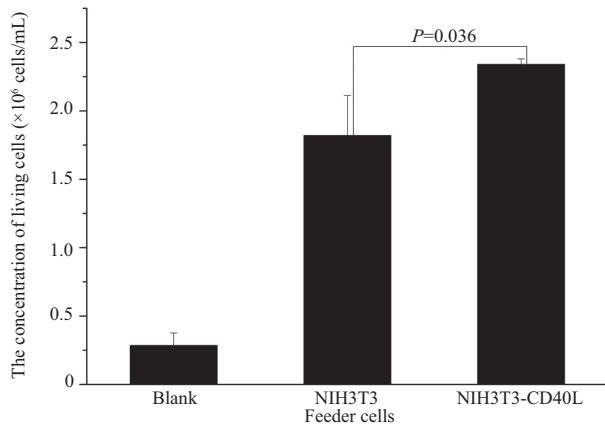


图4 在 0.25×10^6 个/mL梯度下不同饲养细胞孔中B-LCLs的数目(20天)

Fig.4 The number of B-LCLs in different feeder cells at gradient 0.25×10^6 cells/mL (20 d)

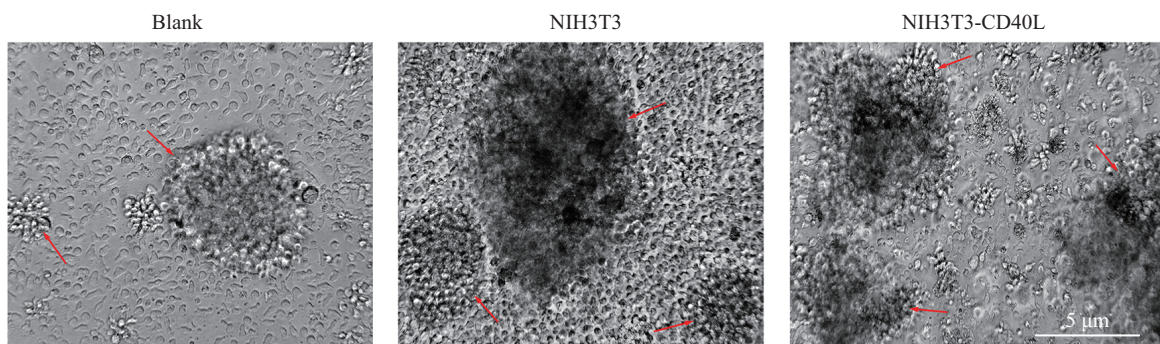
4)。可见, 饲养细胞有利于EBV转化B细胞, NIH3T3-CD40L显著优于对照组($P=0.036$)。显微镜下观察细胞生长状态, 饲养细胞已经完全死亡(图5), 可见孔中已经形成EBV转化的细胞团。

3 讨论

饲养细胞通过分泌营养因子, 或者通过物理接触支持靶细胞在体外的存活和增殖^[15]。常用的饲养

细胞有MEF、STO和NIH3T3细胞。MEF细胞尽管具有材料来源方便、成本低等优点, 但是其生命周期有限, 且仅在第3~5代使用时效果最佳^[16], 因而限制了它的应用。STO细胞在干细胞体外遗传修饰中使用较多, 但由于其在体外长期传代过程中可能发生变异, 在用做胚胎干细胞饲养层时, 可造成胚胎干细胞一定比例的核型异常^[17]。此外, 在EBV转化B淋巴细胞的过程中, 经射线处理的PBMCs也常作为体外B细胞培养的饲养细胞^[7,18]。PBMCs来源一般为新鲜血液, 代价昂贵, 其使用还涉及伦理问题, 并且不能与病人特异的B细胞来源同步。因此, 我们选用更为便利、有效且体外可以长期培养的NIH3T3细胞作为B细胞的饲养细胞。

在B细胞低密度接种时, 使用生长阻滞的饲养细胞可以增加细胞存活率, 促进细胞增殖, 饲养细胞和CD40L的联合使用促进B细胞增殖和存活的效果更为明显^[14], 本研究也证实了这一现象。在饲养细胞条件下, B-LCLs的存活率明显升高, 与NIH3T3细胞相比, 稳定表达CD40L的NIH3T3细胞系显著提高了B-LCLs的存活率且促进其增殖。表达CD40L的NIH3T3细胞一方面可分泌有利于B细胞存活增殖



红色箭头所指为B-LCLs的细胞团。

The red arrowhead refer to the cell clusters of B-LCLs.

图5 在 0.25×10^6 个/mL梯度下不同饲养细胞孔中B-LCLs的细胞形态(20天)

Fig.5 The cell morphology of B-LCLs in different feeder cells at gradient 0.25×10^6 cells/mL (20 d)

的细胞因子^[19],另一方面能为B细胞提供CD40L,其与CD40结合后可活化B细胞CD40信号通路,进一步促进B细胞的存活和增殖^[20]。CD40L与CD40相互作用促进CD40聚类,募集肿瘤坏死因子受体相关因子(TNFR-associated factors, TRAFs)至CD40L的胞内结构域。TRAFs激活不同的信号转导通路,包括典型和非典型的核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)以及 γ 磷脂酶C(phospholipase C γ , PLC γ)通路^[21]。而PI3K及其下游的Ca²⁺通道与B细胞的分化、存活和增殖相关,MAPK通路与B细胞增殖相关,NF- κ B导致分化和存活^[22]。

近年来,利用B-LCLs是制备单克隆抗体的方法之一。生产单克隆抗体的方法可以分为杂交瘤法、抗体展示文库法、B细胞克隆增殖法和单细胞PCR法^[6,23-25]。B-LCLs在不同方法中均有应用,可作为杂交瘤方法中的细胞来源,也可以用于直接生产单克隆抗体,或利用单细胞RT-PCR方法从B-LCLs中克隆抗体基因^[26]。建成B-LCLs及实现B-LCLs的单克隆化培养是利用B-LCLs生产单克隆抗体的最基本条件。NIH3T3-CD40L饲养细胞多用于体外B细胞的培养,本研究探索了其在EBV转化B细胞过程中的作用,发现NIH3T3-CD40L饲养细胞,可降低EBV转化所需B淋巴细胞密度,从而减少建立B-LCLs所需血量的同时提高其成功率,也为后续的单克隆化提供实验技术支撑,为利用B-LCLs制备单克隆抗体奠定了基础。Ali等^[27]在EBV永生B细胞过程添加了不同的ILs以提高B-LCLs的永生效率 and 抗体产

生能力。这提示,在EBV转化过程中饲养细胞和细胞因子联用或许可以得到更好的结果。

本研究构建了稳定表达CD40L的NIH3T3细胞系,并且证明该饲养细胞有利于体外B细胞的存活和增殖,有利于降低EBV转化所需的细胞数目,为优化B-LCLs的建立条件及B细胞的单克隆化奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Mohyuddin A, Ayub Q, Siddiqi S, Carvalho-Silva DR, Mazhar K, Rehman S, *et al.* Genetic instability in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1670(1): 81-3.
- 2 Klinker MW, Lizzio V, Reed TJ, Fox DA, Lundy SK. Human B cell-derived lymphoblastoid cell lines constitutively produce Fas ligand and secrete MHCII⁺FasL⁺ killer exosomes. *Front Immunol* 2014; 5: 144.
- 3 Hu Y, Xiong Q, Yang Y, Wang H, Shu C, Xu W, *et al.* Integrated analysis of gene expression and microRNA regulation in three leukemia-related lymphoblastic cell lines. *Gene* 2015; 564(1): 39-52.
- 4 Chu JY, Huang W, Kuang SQ, Wang JM, Xu JJ, Chu ZT, *et al.* Genetic relationship of populations in China. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(20): 11763-8.
- 5 Livingston PG, Kurane I, Ennis FA. Use of Epstein-Barr virus-transformed, autologous B-lymphoblastoid cells as antigen-presenting cells for establishment and maintenance of dengue virus-specific, human cytotoxic T lymphocyte clones. *J Virol Methods* 1997; 67(1): 77-84.
- 6 Smith SA, de Alwis AR, Kose N, Jadi RS, de Silva AM, Crowe JE Jr. Isolation of dengue virus-specific memory B cells with live virus antigen from human subjects following natural infection reveals the presence of diverse novel functional groups of antibody clones. *J Virol* 2014; 88(21): 12233-41.
- 7 Wang H, Ma C, Lu Y, Ji X, Pang Y, Hua F, *et al.* Generation of human neutralizing monoclonal antibodies against the 2009 pandemic H1N1 virus from peripheral blood memory B lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2013; 10(5): 403-12.

- 8 Fraussen J, Vrolix K, Martinez-Martinez P, Losen M, Meulemans E, De Baets MH, *et al.* A novel method for making human monoclonal antibodies. *J Autoimmun* 2010; 35(2): 130-4.
- 9 Chang IC, Wu JY, Lu HI, Ko HW, Kuo JL, Wang CY, *et al.* High-potentiality preliminary selection criteria and transformation time-dependent factors analysis for establishing Epstein-Barr virus transformed human lymphoblastoid cell lines. *Cell Prolif* 2006; 39(6): 457-69.
- 10 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 11 杜振兰. CD40-CD40L共刺激途径在体液免疫和细胞免疫中的作用. *细胞与分子免疫学杂志*(Du Zhenlan. The role of CD40-CD40L costimulatory pathway in humoral and cellular immunity. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*) 2013; 28(12): 1341-3.
- 12 Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 152-72.
- 13 Jourdan M, Robert N, Cren M, Thibaut C, Duperray C, Kassambara A, *et al.* Characterization of human FCRL4-positive B cells. *PLoS One* 2017; 12(6): e0179793.
- 14 Ivanov R, Aarts T, Hagenbeek A, Hol S, Ebeling S. B-cell expansion in the presence of the novel 293-CD40L-sCD40L cell line allows the generation of large numbers of efficient xenoantigen-free APC. *Cytotherapy* 2005; 7(1): 62-73.
- 15 Llamas S, Garcia-Perez E, Meana A, Larcher F, del Rio M. Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2015; 21(4): 345-53.
- 16 章静波. *组织和细胞培养技术*, 第二版. 北京: 人民卫生出版社 (Zhang Jingbo. *Tissue and cell culture technology*, 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House) 2002, 184-6.
- 17 Sukoyan MA, Vatolin SY, Golubitsa AN, Zhelezova AI, Semenova LA, Serov OL. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev* 1993; 36(2): 148-58.
- 18 Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, *et al.* An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med* 2004; 10(8): 871-5.
- 19 Hooper. AGSaML. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol* 1987; 121(1): 1-9.
- 20 Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 152-72.
- 21 Bishop GA, Moore CR, Xie P, Stunz LL, Kraus ZJ. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol* 2007; 597: 131-51.
- 22 Hobeika E, Nielsen PJ, Medgyesi D. Signaling mechanisms regulating B-lymphocyte activation and tolerance. *J Mol Med* 2015; 93(2): 143-58.
- 23 Hoogenboom HR. Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol* 2002; 178: 1-37.
- 24 Harada G, Matsumoto SE, Yamashita M, Fujii K, Shirahata S, Katakura Y. *In vitro* immunization of Epstein-Barr virus-immortalized B cells augments antigen-specific antibody production. *Cytotechnology* 2013; 65(6): 979-83.
- 25 Maskus DJ, Bethke S, Seidel M, Kapelski S, Addai-Mensah O, Boes A, *et al.* Isolation, production and characterization of fully human monoclonal antibodies directed to Plasmodium falciparum MSP10. *Malar J* 2015; 14: 276.
- 26 刘玺, 陈新文, 段子渊. B-LCLs及其在单克隆抗体生产中的应用. *生命科学* (Liu Xi, Chen Xinwen, Duan Ziyuan. B-LCLs and its application in the production of monoclonal antibody. *Chinese Bulletin of Life Sciences*) 2017; 29(4): 349-55.
- 27 Ali AI, Badran YR, Hassuneh MR, Sanber KS, Ismail SI. Effect of interleukins on antibody production by Epstein-Barr virus transformed B cells. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2015; 34(3): 162-8.