

技术与方法

稳定表达小鼠CD40L的NIH3T3细胞系的建立及其在B细胞培养和激活中的应用

郎巧利 何琦琳 黄楠 余琳 杨希*

(重庆市畜牧科学院, 农业部养猪科学重点实验室, 养猪科学重庆市市级重点实验室,
重庆市医用动物资源的开发与利用工程计算研究中心, 重庆 402460)

摘要 该研究构建小鼠CD40L真核表达重组质粒pcDNA3.1-mCD40L, 通过电转法将重组质粒转至NIH3T3细胞中。利用G418对转染后细胞进行压力筛选, 获得稳定转染细胞株。提取稳定转染细胞株RNA, 通过RT-PCR法检测*Neo*基因的mRNA表达情况。分离稳定转染细胞上清, 利用ELISA法检测小鼠CD40L蛋白水平的表达情况。RT-PCR结果显示, *Neo*基因能够在稳定转染细胞中表达, ELISA结果显示, 获得的稳定转染细胞株NIH3T3-mCD40L细胞上清中CD40L的表达量高达1.286 ng/mL。进一步活性研究表明, 该细胞系能够在体外与IL-2和IL-21共同作用培养B细胞至14天, 并刺激B细胞产生特异性抗体。该细胞系的成功构建, 为利用体外B细胞分离培养和活化法分离特异性单克隆抗体奠定了良好的基础。

关键词 鼠CD40L; 稳定转染; NIH3T3细胞; 饲养细胞

Establishment of Mouse CD40L Stably Expressed NIH3T3 Cell Lines and Its Application in the Culture and Activation of B Lymphocytes

LANG Qiaoli, HE Qilin, HUANG Nan, YU Lin, YANG Xi*

(Chongqing Academy of Animal Sciences, Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Chongqing Research Center for the Development and Utilization of Medical Animal Resources, Chongqing 402460, China)

Abstract Recombinant plasmid pcDNA3.1-mCD40L was constructed and transfected into NIH3T3 cells to express mouse CD40L. The transfected cells were selected with G418 to obtain stably transfected cell lines. The RNA of stable transfected cells was isolated and the mRNA expression level of *Neo* gene was detected by RT-PCR. The expression level of CD40L protein in the culture supernatant of transfected cells was detected by ELISA analysis. RT-PCR revealed that *Neo* gene could be expressed in the transfected cells. ELISA results showed that the concentration of CD40L in the supernatant of the stable transfected cell line NIH3T3- mCD40L was 1.286 ng/mL. Further activity studies showed that the addition of NIH3T3- mCD40L cells, IL-2 and IL-21 could successfully culture

收稿日期: 2019-04-23 接受日期: 2019-09-03

重庆市科研院所绩效激励引导专项(批准号: cqjxjl201709)、重庆荣昌农牧高新技术产业研发专项(批准号: 19255)和国家自然科学基金(批准号: 5167070727)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15025383600, E-mail: 406162197@qq.com

Received: April 23, 2019

Accepted: September 3, 2019

This work was supported by Chongqing Special Fund for Performance Incentive Guide (Grant No.cqjxjl201709), the Key Research and Development Project in Agriculture and Animal Husbandry of Rongchang (Grant No.19255) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.5167070727)

*Corresponding author. Tel: +86-15025383600, E-mail: 406162197@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5160>

and stimulate B cells to produce specific antibodies. NIH3T3-mCD40L stable cell lines was successfully obtained. This study lays a good foundation for generation of monoclonal antibody from B lymphocytes.

Keywords mouse CD40L; stable transfection; NIH3T3 cells; feeder cells

在抗体治疗和诊断方面, 如何高效快速分离特异性单克隆抗体越来越被人们所重视^[1]。体外分离B淋巴细胞制备单细胞抗体是制备单克隆抗体的重要手段之一。与传统的杂交瘤、噬菌体抗体库等技术相比, 体外分离B淋巴细胞制备单细胞抗体的方法有更大的优势, 能够在短时间内获得有效的抗体序列^[2]。

B淋巴细胞体外培育与激活离不开饲养层与刺激记忆性B淋巴细胞分化成浆细胞的各种细胞因子, 包括CD40L与IL-4^[3]、IL-21^[4]等, 其中CD40L是促进B淋巴细胞增殖与分化的重要因素。

CD40L属于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族中的II型跨膜蛋白, CD40L主要表达于活化的T细胞、CD4⁺细胞、NK细胞、单核细胞、B淋巴细胞和血小板中^[5]。CD40L由261个氨基酸组成, 分为胞外、跨膜和胞内三个区域, 分别占215、24和22个氨基酸, 其中细胞外的部分为可溶性蛋白^[6]。CD40L可与B淋巴细胞表面CD40结合以活化B淋巴细胞CD40信号通路, 进一步促进B淋巴细胞的存活与增殖^[7]。CD40/CD40L系统在B淋巴细胞生长和分化的许多检查点上都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、长寿命浆细胞和记忆B淋巴细胞的形成^[8]。CD40L对B淋巴细胞的增殖和免疫球蛋白(immunoglobulins, Ig)的分泌发挥重要作用^[9-10]。

NIH3T3为小鼠胚胎成纤维细胞, 具有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。饲养细胞可通过细胞与细胞间的相互作用为干细胞的生长、维持多能与自我更新提供支持^[11]。

目前没有商业化的表达小鼠CD40L的饲养细胞。虽然已有文章报道构建的NIH3T3-mCD40L细胞系用于体外B细胞培养和激活, 但其细胞来源均不相同^[12-13], 并且未对表达达到上清中可溶性CD40L浓度进行测定。筛选获得的不同的NIH3T3-mCD40L细胞系其上清中可溶性CD40L可能存在显著差异。本研究成功构建了一种稳定表达小鼠CD40L的NIH3T3细胞系, 对其上清中可溶性CD40L浓度和活性进行了研究, 为利用体外B细胞分离培养和活化法分离特

异性单克隆抗体奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

NIH3T3小鼠成纤维细胞购自 American Type Culture Collection; DMEM培养基、青-链霉素、IL-2、G418 sulfate购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 胎牛血清购自 Biological Industries Israel Beit-Haemek; Mouse soluble CD40L ELISA Kit购自博士德生物工程有限公司; AmaxaTM Cell Line NucleofectorTM Kit V购自Lonza; 限制性内切酶Sal I、Nur I购自New England Biolabs; 质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; TMB显色液、丝裂霉素C购自北京索莱宝科技有限公司; RT-PCR kit购自宝日医生物技术(北京)有限公司; RNA提取试剂盒购自凯杰企业管理(上海)有限公司公司; DMSO、OVA蛋白、IL-21、anti-mouse IgG购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 真核表达质粒pcDNA3.1-mCD40L的构建及鉴定 根据GenBank中小鼠CD40L基因序列信息, 直接合成CD40L基因, 通过Hind III和EcoR I酶切位点插入质粒pcDNA3.1(+)中获得真核表达质粒pcDNA3.1-mCD40L(由金唯智生物科技有限公司完成)。将获得的质粒通过Sal I和Nur I双酶切进行鉴定。

1.2.2 NIH3T3细胞G418筛选浓度的确定 NIH3T3细胞培养至对数生长期, 收集细胞并计数, 以 5×10^5 个细胞/孔的密度接种至24孔板, 将G418浓度设置如下梯度: 0、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 100 $\mu\text{g/mL}$ 对NIH3T3细胞进行加压筛选, 每2天换1次液, 并观察细胞状态, 选择14天后全部死亡的最低G418浓度为最佳筛选浓度。

1.2.3 NIH3T3细胞转染及稳定表达株的筛选 NIH3T3细胞培养至对数生长期(汇合度达50%~70%), 收集细胞并计数, 以 1×10^6 个细胞/管分装至离心管中, 根据AmaxaTM Cell Line NucleofectorTM Kit V(Lonza)说明加入转染混合液重悬细胞, 加入1.2 μg 质粒混匀后吸入转染瓶中, 放入电转仪中电击10 s, 完毕后立即取出转染瓶, 加入0.5 mL预热的培养基

并混匀, 将转染瓶中混合液转移至24孔板培养, 设置未转染的NIH3T3细胞作对照。转染48 h后更换含有800 $\mu\text{g/mL}$ G418的培养液进行培养。每隔2天更换1次相同选择性培养液, 孵育15天后, 得到含G418抗性的阳性细胞, 将细胞扩大培养, 扩大培养后均使用含400 $\mu\text{g/mL}$ G418培养液维持筛选。

1.2.4 RT-PCR检测转染后pcDNA3.1-mCD40L的表达 分别提取野生型NIH3T3细胞与转染后阳性细胞的总RNA, 利用反转录试剂盒将总RNA反转录为cDNA, 以0.5 μg cDNA为模板, 利用Neo引物进行PCR(上游引物为5'-CAG AGT CCC GCT CAG AAG A-3', 下游引物为5'-CCT GCC GAG AAA GTA TCC A-3'), 以GAPDH作为内参(上游引物为5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3', 下游引物为5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3')。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min; 继以94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, 共30个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 扩增后经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 ELISA检测转染后小鼠CD40L蛋白的表达 将未转染的NIH3T3细胞与转染后阳性细胞分别以 5×10^4 个/mL密度同时接种至24孔板, 培养7天后, 收集细胞上清, 3 000 r/min离心5 min后, 保存上清液。根据Mouse soluble CD40L ELISA Kit(博士德生物)说明书对阳性细胞上清中mCD40L的表达量进行检测, 以未转染的NIH3T3细胞上清作阴性对照。

1.2.6 NIH3T3-mCD40L细胞作为饲养层细胞在体外B细胞培养与激活中的应用 将NIH3T3-mCD40L细胞分别以 3×10^6 个/mL密度同时接种至T75细胞瓶, 当汇合度达到80%~90%时, 使用10 $\mu\text{g/mL}$ 丝裂霉素C进行37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育细胞2 h后弃去丝裂霉素C并用PBS清洗3~4次, 将两种细胞分别消化为单个细胞并计数, 以 5×10^4 个/孔的方式将两种细胞分别铺至96孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12 h后作为饲养细胞; 将分离好的小鼠B细胞以0个/孔、1个/孔、100个/孔、1 000个/孔、10 000个/孔和 5×10^6 个/孔的密度接种至NIH3T3-mCD40L, 同时加入IL-2(8 ng/mL)和IL-21(50 ng/mL)作为诱导剂^[2], 实现体外培养和激活B细胞的必要条件。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养14天, 收集B细胞培养上清, 3 000 r/min离心5 min, 取上清进行ELISA检测: 包被0.5 $\mu\text{g/mL}$ OVA蛋白, 用2% BSA进行封闭, 将B细胞上清液作为一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h, PBST洗3次, 加入anti-mouse IgG作为二抗(1:10 000稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, PBST洗3次,

TMB显色20 min, Bio-tech酶标仪读取 D_{450} 值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 25.0软件对实验数据进行统计分析 & 图表制作。本文中所有实验都在相同条件下重复3次, 检测数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示, $P < 0.05$ 有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 真核表达质粒pcDNA3.1-mCD40L的构建及鉴定结果

检索GenBank数据库中小鼠CD40L基因的信息, 查找该基因的cDNA序列(Gene ID: 21947), 包括783 bp编码序列。直接合成该基因的CDS区序列, 通过Hind III和EcoR I酶切位点插入到pcDNA3.1(+)中获得真核表达质粒pcDNA3.1-mCD40L。重组质粒由Sal I和Nur I双酶切进行鉴定, 由图1可见, 获得两条大小分别为3 711 bp和2 186 bp的条带, 同时测序结果表明插入序列与预期一致, 因此质粒构建正确。

2.2 NIH3T3细胞G418筛选浓度的确定

将NIH3T3细胞(密度 0.5×10^6 个/mL)接种至24孔板里进行最佳G418筛选浓度的测定。未添加G418组的细胞生长良好, 第14天能全部杀死细胞的最低G418浓度为800 $\mu\text{g/mL}$, 因此NIH3T3细胞的G418最佳筛选浓度为800 $\mu\text{g/mL}$ (图2)。

2.3 NIH3T3细胞转染及筛选

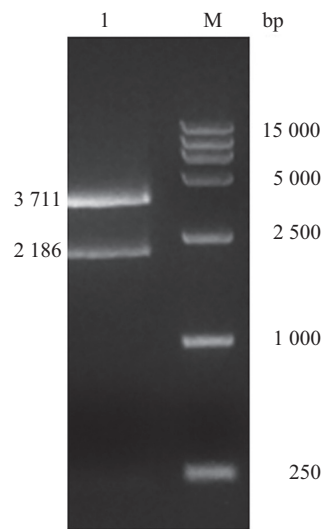
将质粒用电穿孔的方法转染NIH3T3细胞(图3), 同时设置未转染细胞作对照, 在800 $\mu\text{g/mL}$ 的G418抗性压力下, 经过14天的筛选, 获得稳定转染细胞(图3)。

2.4 RT-PCR检测转染后pcDNA3.1-mCD40L的表达

为了检测表达盒插入NIH3T3细胞后是否能够正常表达, 我们提取阳性细胞的RNA, 通过RT-PCR的方法检测抗性基因Neo的mRNA表达。如图4可见, 通过对NIH3T3-mCD40L与野生型NIH3T3进行的反转录PCR, 电泳(图4)可见, Neo基因在稳转后的细胞中有表达, 而野生型的NIH3T3并无表达。

2.5 ELISA检测转染后小鼠CD40L蛋白的表达

为了检测小鼠CD40L蛋白在稳定转染细胞中的表达情况, 本实验利用Mouse soluble CD40L ELISA Kit检测稳定转染细胞株NIH3T3-mCD40L和野生型细胞NIH3T3上清中的CD40L蛋白的表达量。结果显示, 野生型NIH3T3细胞上清中能检测到极为



M: DNA 参照标准; 1: pcDNA3.1-mCD40L。
M: DNA marker; 1: pcDNA3.1-mCD40L.

图1 pcDNA3.1-mCD40L重组质粒酶切鉴定图
Fig.1 Identification of pcDNA3.1-mCD40L digested by *Sal* I and *Nur* I

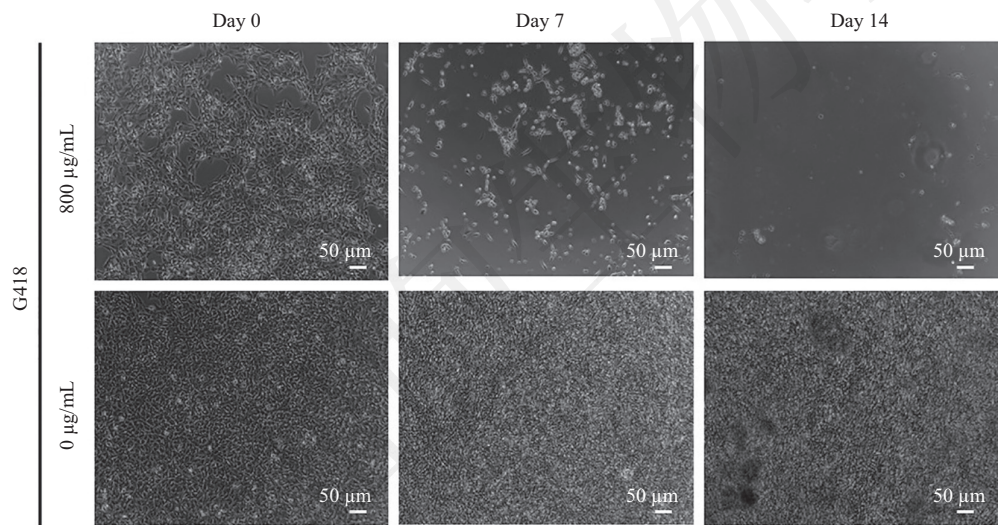


图2 G418筛选浓度确定
Fig.2 Determination of the G418 screening concentration

少量的CD40L蛋白(0.128 ng/mL), 而稳定转染细胞株NIH3T3-mCD40L上清中的CD40L含量显著高于野生型细胞, 为1.286 ng/mL($P<0.01$)(图5)。

2.6 NIH3T3-mCD40L细胞作为饲养层细胞在体外B细胞培养与激活中的应用

如图6表明, NIH3T3-mCD40L细胞作为饲养层细胞和IL-2、IL-21共同作用成功在体外培养B细胞至14天。检测上清中OVA特异性的抗体, 结果(表1)表明, NIH3T3-mCD40L细胞和IL-2、IL-21能够激活单个B细胞并表达特异性抗体, 但对更多B细胞(100个、1 000个或者10 000个)激活表达抗体的水平与

单个细胞无显著差异。

3 讨论

饲养细胞可以通过分泌营养因子或物理接触来支持靶细胞在体外的存活或者增殖^[14]。在B淋巴细胞低密度接种时, 使用生长阻滞的饲养细胞可以提高靶细胞的存活率, 促进细胞增殖^[15]。MEF、STO和NIH3T3细胞常作为饲养细胞应用于各种实验中。MEF细胞具有材料来源方便、成本低等优点, 但其生命周期有限, 且仅在第3~5代使用时效果最佳^[16], 因而限制了它的应用。在干细胞体外遗传修饰中STO

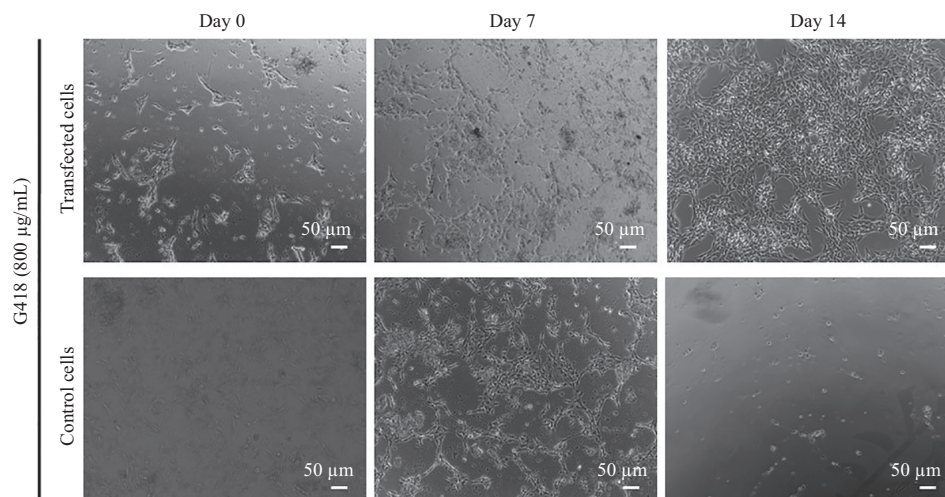


图3 NIH3T3-mCD40L稳定转染细胞的筛选

Fig.3 Screening of stable transfected cells NIH3T3-mCD40L

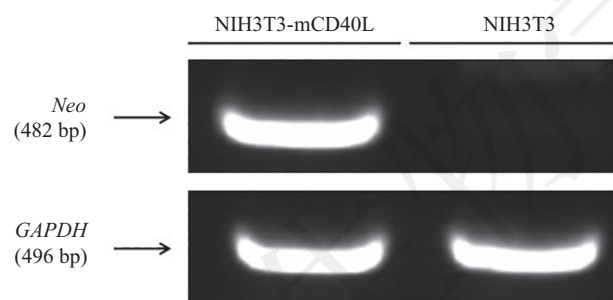


图4 RT-PCR鉴定NIH3T3-mCD40L细胞系

Fig.4 Identification of NIH3T3-mCD40L by RT-PCR

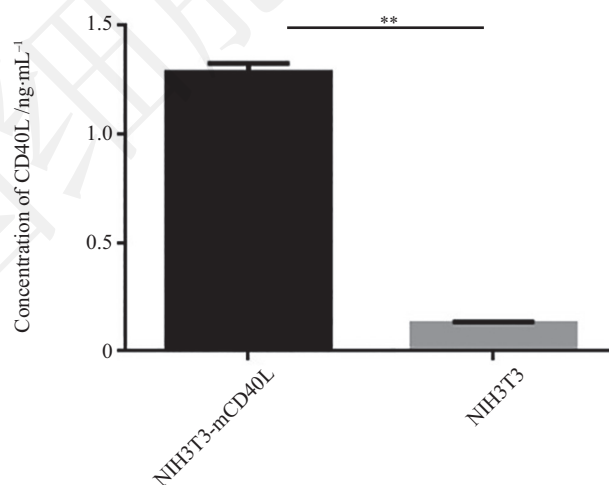
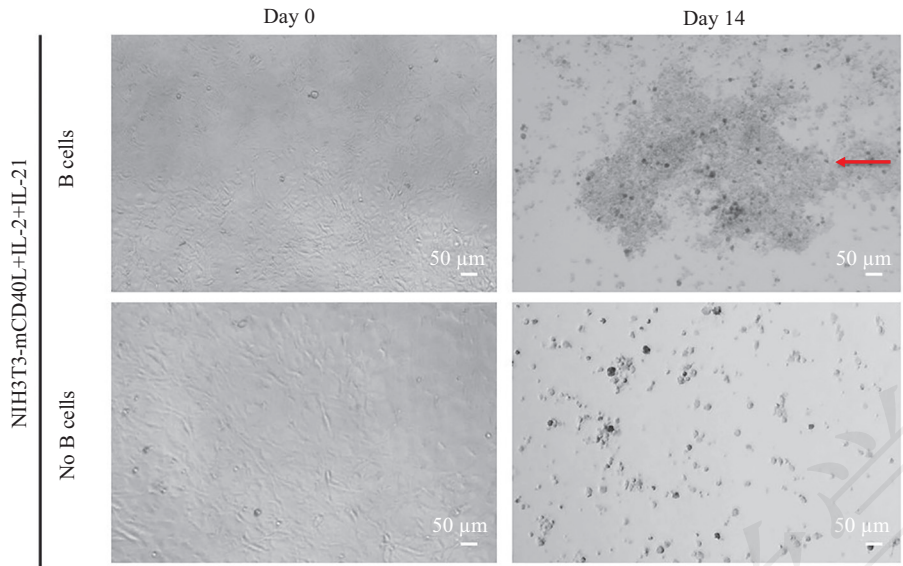
** $P < 0.01$.

图5 ELISA法检测细胞上清中CD40L表达量

Fig.5 ELISA analysis of CD40L expression level in the cell culture supernatant

细胞得到了广泛的应用, 但该细胞在体外长期传代过程中可能发生变异, 在其作为胚胎干细胞饲养层使用时, 胚胎干细胞会出现一定比例的核型异常^[17]。

NIH3T3细胞无异体接种致癌性, 具有较强的分泌细胞因子能力且可以无限繁殖, 易于培养。因此, 我们选用更为便利、有效且体外可以长期培养的NIH3T3



图中红色箭头所指示的为B细胞团。
The red arrows indicate clusters of B cells.

图6 NIH3T3-mCD40L、IL-2和IL-21共同培养下B细胞的存活的情况(14天)
Fig.6 The B cells morphology after cultured for 14 days with addition of NIH3T3-mCD40L, IL-2 and IL-21

表1 利用NIH3T3-mCD40L、IL-2和IL-21刺激B细胞产生OVA特异性抗体(14天)
Table 1 The addition of mCD40L feeder cells, IL-2 and IL-21 can successfully stimulate B cells to produce OVA specific antibodies (14 d)

培养条件 Culture conditions	每孔B细胞数 Number of B cells per well	OVA特异性抗体 D_{450} 值 ($\bar{x} \pm s$) OVA specific antibody D_{450} value ($\bar{x} \pm s$)	
		Negative well	Positive well
DMEM+10% FBS	1	0.09±0.01	—
	100	0.08±0.01	—
DMEM+10% FBS+ NIH3T3-mCD40L+IL- 2+IL-21	1	0.10±0.03	0.23±0.05
	100	0.12±0.02	0.23±0.05
	1 000	0.15±0.01	0.28±0.07
	10 000	—	0.31±0.09

阳性孔判定标准为 $D_{450} > 2.1 \times D_{450}$ (阴性对照); —表示未检测到阳性孔或阴性孔。
The criteria of positive well is $D_{450} > 2.1 \times D_{450}$ (negative); — indicates that no positive or negative well has been detected.

细胞作为体外培养B淋巴细胞的饲养细胞。

人类的BCR受体库在研究治疗性抗体药物中有着无与伦比的价值。分离B淋巴细胞并在体外激活B淋巴细胞是获得抗体序列的手段之一^[18]。在类生发中心B淋巴细胞的人B淋巴细胞系中,在其培养体系中加入CD40L, B淋巴细胞分泌的IgG、IgM水平显著升高,说明CD40L能加强IL-21介导的B细胞向浆细胞的分化^[19]。不仅如此, CD40L系统对维持机体体液免疫平衡和B淋巴细胞的正常生命活动具有重要作用, CD40L对活性氧在信号转导方面的具有调控作用^[20],能够影响B淋巴细胞的存活、增殖和分化等生理过程^[21-22]。但是, CD40L蛋白具有多种

形式: 膜结合型和可溶型。全长CD40L基因表达膜结合型CD40L, 是一种II型跨膜糖蛋白, 定位于细胞膜上。膜结合型CD40L可以被蛋白酶从膜上剪切下来形成可溶性的分子(即可溶性CD40L)。研究发现, 膜结合型CD40L与可溶性CD40L存在各自不同的生物学功能^[23]。因此, 本研究选择在NIH3T3中表达全长的CD40L基因即膜结合型CD40L。实验结果表明, 真核表达质粒pcDNA3.1-mCD40L转染入NIH3T3细胞中能够表达, 并且在稳定转染细胞NIH3T3-mCD40L的细胞上清中检测到了可溶性CD40L, 其表达量为1.286 ng/mL。

为了进一步研究构建的NIH3T3-mCD40L细胞

系的生物活性, 我们参考HUANG等^[2]发表的文章, 利用NIH3T3-mCD40L细胞系、IL-2(8 ng/mL)和IL-21(50 ng/mL)共同在体外进行B细胞的培养和激活。尽管我们的研究表明, 本研究构建的NIH3T3-mCD40L细胞系和商业购买的IL-2(8 ng/mL)和IL-21(50 ng/mL)能够在体外培养B细胞到第14天(图6), 并且能够激活单个B细胞产生特异性抗体(表1)。但是该组合对于更多的B细胞(100个、1 000个或者10 000个)激活表达特异性抗体水平与单个细胞无显著差异, 这可能是由于本研究构建的NIH3T3-mCD40L细胞系在上清中表达的可溶性CD40L较低(1.286 ng/mL), 不能支持更多B细胞产生抗体造成的。然而, 在B细胞体外培养与激活研究中, 越来越多的研究期望能够直接从单个B细胞分离获得抗体, 从而避免后续大量的重链轻链适配研究工作。因此, 本研究所构建的NIH3T3-mCD40L细胞系仍然具有较强的实用性。该细胞系的成功构建为利用体外B细胞分离培养和活化法来分离特异性单克隆抗体奠定了良好的基础。

参考文献 (References)

- 1 SARA C, OLIVER B G, JOLENE G, et al Soluble HIV-1 envelope immunogens derived from an elite neutralizer elicit cross-reactive V1V2 antibodies and low potency neutralizing antibodies [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86905.
- 2 HUANG J H, DORIA-ROSE N A, LONGO N S, et al. Isolation of human monoclonal antibodies from peripheral blood B cells [J]. Nature Protocol, 2013, 8(10): 1907-15.
- 3 BANCHEREAU J, DE PAOLI P, VALLE A, et al . Long-term human B cell lines dependent on interleukin and antibody to CD40 [J]. Science, 1991, 251(4989): 70-2.
- 4 COX K S, TANG A, CHEN Z F, et al. Rapid isolation of dengue-neutralizing antibodies from single cell-sorted human antigen-specific memory B-cell cultures [J]. mAbs, 2016, 8(1): 129-40.
- 5 VAN KC, BANCHEREAU J. CD40-CD40 ligand [J]. J Leukocyte Biol, 2000, 67(1): 2.
- 6 MAZZEI G J, EDGERTON M D, LOSBERGER C, et al. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active [J]. J Biol Chem, 1995, 270(13): 7025-8.
- 7 CHAIZIGEORGIOU A, SEIJKENS T, ZARZYCKA B, et al. Blocking CD40-TR AF6 signaling is a therapeutic target in obesity-associated insulin resistance [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(7): 2686-91.
- 8 EIGUETA R, BENSON MJ, DE VRIES VC, et al. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system [J]. Immunol Rev, 2009, 229(1): 152-172.
- 9 ARMITAGE R J, MACDUFF B M, SPRIQQS M K, et al . Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines [J]. J Immunol, 1993, 150 (9): 3671-80.
- 10 ANGELOU A, ANTONIOU E, GARMPI S N, et al. The role of soluble CD40L ligand in human carcinogenesis [J]. Anticancer Res, 2018, 38(5): 3199-201.
- 11 TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. Cell, 2007, 131(5): 861-72.
- 12 KERSHAW M H, HSU C, MONDESIRE W, et al. Immunization against endogenous retroviral tumor-associated antigens [J]. Cancer Res, 2001, 61(21): 7920-24.
- 13 JIAN Y F, MA J, HE Y, et al . Cationic liposome-mediated transfection of CD40 ligand gene inhibits hepatic tumor growth of hepatocellular carcinoma in mice [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2009, 10(1): 7-13.
- 14 LLAMES S, GARCIAPEREZ E, MEANA A, et al Feeder layer cell actions and applications [J]. Tissue Engineering, 2015, 21(4): 345-53.
- 15 IVANOV R, AARTS T, HAGENBEEK A, et al . 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 [J]. Cytotherapy, 2005, 7(1): 62-73.
- 16 TOMISHIMA M. Conditioning pluripotent stem cell media with mouse embryonic fibroblasts (MEF-CM) [J]. StemBook, 2012, 20: 2.
- 17 PARK S P, LEE Y J, LEE K S, et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers [J]. Human Reproduction, 2004, 19(3): 676-84.
- 18 WANG B, DEKOSKY B J, TIMM M R, et al. Functional interrogation and mining of natively paired human VH:VL antibody repertoires [J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(2): 152-5.
- 19 DING B B, BI E, CHEN H, et al. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells [J]. J Immunol, 2013, 190(4): 1827-36.
- 20 SEIJKENS T, KUSTERS P, ENGEL D, et al. CD40-CD40L: linking pancreatic, adipose tissue and vascular inflammation in type 2 diabetes and its complications [J]. Diab Vasc Dis Res, 2013, 10(2): 115-122.
- 21 杜振兰. CD40-CD40L共刺激途径在体液免疫和细胞免疫中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志(DU Z L The role of CD40-CD40L co-stimulation pathway in humoral and cellular immunity [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology), 2013, 28(12): 1341-43.
- 22 LEE R L, WESTENDORF E J, GOLD M R. Differential role of reactive oxygen species in the activation of mitogen-activated protein kinases and Akt by key receptors on B-lymphocytes: CD40, the B cell antigen receptor, and CXCR4 [J]. J Cell Commun Signal, 2007, 1(1): 33-43.
- 23 HENN V, STEINBACH S, BÜCHNER K, et al . The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40 [J]. Blood, 2001, 98(4): 1047-54.