瘢痕疙瘩家系永生淋巴细胞株的建立及其染色体分析

为了对瘢痕疙瘩的发病机理做进一步的研究和探索，我们收集东北某省一瘢痕疙瘩家系外周血标本，用EB病毒转化 B淋巴细胞的方法建立起永生化细胞系[1]，以便长期保存标本及获得充足的标本来源；同时为了验证转化前后细胞的遗传学特性是否发生变异，对转化前后细胞的染色体进行核型分析，探讨用EB病毒转化建立瘢痕疙瘩永生细胞库的可行性和可靠性。

1 材料和方法

1.1 试剂

产生EB病毒的B95培养基-8细胞株(中国医学科学院遗传与发育生物学研究所徐玖瑾教授馈赠)，RPMI 1640(GIBCO)，特级胎牛血清(HyClone公司)，淋巴细胞分离液(Pharmacia)，环孢霉素A(CyA)，植物凝集素(PHA)，L-谷氨酰胺，Hepes(Promega)。

1.2 标本来源

收集瘢痕疙瘩家系28个成员的外周血标本，每份血样5ml，肝素抗凝，其中4ml用于转化，1ml用于外周血染色体制备。

1.3 实验方法

1.3.1 EBV悬液的制备 参照文献[2]操作。

1.3.2 建立永生化B淋巴母细胞系 常规分离淋巴细胞，用无血清RPMI 1640培养液洗涤淋巴细胞2次后，再用2ml RPMI 1640完全培养基重悬，加入1.3ml EBV悬液和0.4ml CyA(0.2μg/μl)，充分混匀后等量移入2个10ml培养瓶内，置于37℃、5%CO^2培养箱培养。7d左右镜下观察,可见淋巴细胞明显增大,出现聚集现象,并根据培养液pH值的改变情况，进行每周两次半量换液；约2周后可见瓶底大量呈聚集生长的细胞团，即可转瓶，转瓶后镜下可见胞质突出，形态各异，聚集成团的细胞株；至6-8周后开始大量扩增，当细胞数达到(4-6)$\times 10^6$/ml时，可收集大部分细胞进行冻存。

1.3.3 染色体制备 随机抽取5人份外周血原代细胞及其对应的转化后第10、20、30、35代的细胞株，选择细胞分裂旺盛期，用新鲜的培养液调整细胞浓度为(2-4)$\times 10^6$/ml，加入秋水仙素，使其终浓度为0.05mg/ml，置37℃培养箱中处理2-3h。取出细胞，用吸管轻轻吹打混匀，移入10ml离心管中，1200r/min离心10min，弃上清，加入10ml 0.075mol/L KCl，用吸管轻轻吹打混匀后置37℃培养箱中处理30min。加入甲醇和冰醋酸(3∶1)的混合液1ml，用吸管轻轻吹打混匀后1200r/min离心10min，弃上清。加入甲醇和冰醋酸(3∶1)的混合液10ml，室温下固定30min，1200r/min离心10min。连续固定3次后，弃上清，用少量新鲜的固定液制成细胞悬液，常规法制片；70℃烤片2-3h；标本用0.25% 胰酶消化处理，10% Giemsa染色10min，镜下观察中期分裂相。

2 结果

2.1　瘢痕疙瘩家系永生细胞库的建立

建系总系数28株，成功27株，建株一次成功率96.4%，所需时间平均40d。所有建株后的细胞冻存后都能成功复苏，并能生长繁殖。

2.2　转化前后染色体分析结果

分别对转化前和转化后第10、20、30、35代的细胞在显微镜下进行染色体分析，每份标本计数30个中期分裂相，发现转化后第10、20代的细胞染色体与转化前相比无明显差异(图1)；但转化后第30、35代的细胞分别出现了亚二倍体(图2)和超二倍体(图3)，平均占分析核型的13.3%和16.7%；同时染色体发生易位，有衍生染色体产生。

图1　EB病毒转化后染色体正常核型

Fig.1　Normal chromosome karyotype of a lymphoblastoid cell

图2　EB病毒转化后的亚二倍体核型

Fig.2　Hypodiploid karyotype of a lymphoblastoid cell (arrow indicates the derivative chromosome)

图3　EB病毒转化后的超二倍体核型

Fig.3　Hyperdiploid karyotype of a lymphoblastoid cell (arrow indicate the derivative chromosome)

3 讨论

外周血淋巴细胞是分子与细胞遗传学研究中常用的材料,但由于离体后生存周期短，不能增殖传代，故常需反复抽取患者血样；如果由于患者处在不同地地域，或者由于患者死亡，这些宝贵的材料将永远丢失，给临床诊断和进一步的深入研究带来很大困难。由EBV转化外周血淋巴细胞建立的永生化淋巴母细胞系(LCL),可以永远传代，并且保存了原来个体的完整的基因组，而且其生化和分子生物学特性不发生变化[3][4][5]，为一些不易反复采血而又难得的病例和珍贵的家系资源提供了充足的标本来源，为以后的深入研究提供了保障。

国内目前普遍采用EB病毒转化的方法来保存研究材料，但对转化前后的染色体分析方面的研究报道甚少。被EB病毒转化的B淋巴细胞，其细胞遗传学特征是否与原来的B淋巴细胞一致是人们一直关注的问题。Okubo[9]等人研究了8个EBV-LCLs在培养过程中染色体核型的变化，发现在400DPLs以上异常核型显著增多，包括染色体易位及四倍体形成等，但以染色体易位最为常见；且不同的细胞系会形成不同的异常核型。Aisha[10]对一永生细胞系35个个体进行了染色体STRs连锁分析，扫描了Y染色体上20个位点，同时以其外周血DNA样本做对比，细胞在培养30代后即发现有两个位点发生突变；培养90代后突变率明显上升，计算总突变率为0.3%。我们在对随机抽取的5份转化后细胞做染色体核型分析的结果证实：细胞传代20代以前的染色体核型未发现异常，而在30代之后染色体开始出现数目和结构的改变，35代后染色体异常更加明显。病毒是致染色体畸变的一种生物因素，它对染色体的损伤多半是随机的。有关EBV转化B淋巴细胞的机制研究认为，在大多数细胞系中，EBV基因组以质粒的形式在每个细胞中以500-800个拷贝持续存在，而且被整合于宿主细胞DNA上，这样就使被感染的B淋巴细胞染色体产生不稳定性。在这个过程中，至少有EBNA-1、2、3A、3C、LP和LMP1等6个病毒基因参与，他们利用特殊的细胞信号通路和某些细胞转录因子在细胞培养过程中干扰B淋巴细胞的正常分化[6][7][8]。本实验研究结果说明EB病毒转化在建株早期并不引起染色体的损伤，至培养到一定代数时，细胞染色体即开始发生畸变，并且随着培养代数的增加，畸变率也逐渐增加。因此，EB病毒转化的方法虽然可以用来保存研究材料，但在用做遗传学研究时，细胞培养代数不宜过长，尽量在建株早期进行。

本研究成功建立了瘢痕疙瘩家系的永生细胞系，有典型的转化细胞集落，并且能成功冻存、复苏及传代；建系后20代的染色体核型分析与建株前比较无明显差异。说明此永生细胞系永久地保存了瘢痕疙瘩家系珍贵的遗传资源，在早期可以用于分子生物学和细胞遗传学方面的研究。

参考文献：

[1]Neitzel H.A routine method of the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines[J].Hum Genet,1986,73(4):320-6.

[2]刘君,刘爱兵.EBV转化永久B淋巴母细胞系的建立[J].北京医学,1998,4:17-8.

[3]Schlee M,Krug T,Gires O,et al.Identification of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 (EBNA2) target proteins by proteome analysis:activation of EBNA2 in conditionally immortalized B cells reflects early events after infection of primary B cells by EBV[J].J Virol,2004,78(8):3941-52.

[4]Aman P,Gordon J,Nordstrom M,et al.Surface marker charac-terization of EBV target cells in normal blood and tonsil B lymphocyte populations[J].J Immunol,1985,135(4):2362-7.

[5]Aman P,Ehlin-Henriksson B,Klein G.Epstein-Barr virus suscepti- bility of normal human B populations[J].J Exp Med,1984,159(1):208-20.

[6]Maruo S,Yang L,Takada K.Roles of Epstein-Barr virus glycopro- teins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells[J].J Gen Virol,2001,82(Pt10):2373-83.

[7]Martin DR,Marlowe RL,Ahearn JM.Determination of the role for CD21 during Epstein-

Barr virus infection of B-lymphoblastoid cells[J].J Virol,1994,68(8):4716-26.
[8]Kurth J,Spieker T,Wustrow J,et al.EBV-infected B cells in infec- tious mononucleosis:viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency[J].Immumity,2000,13(4):485-95.
[9]Okubo M,Tsurukubo Y,Higaki T,et al.Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus[J].Cancer Genet Cytogenet,2001,129:30-4.
[10]Mohyuddina A,Ayuba Q,Siddiqia S,et al.Genetic instability in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines[J].Biochim Biophy Acta,2004,1670(1):81-3.

回结果列表