

瘢痕疙瘩家系永生淋巴细胞株的建立及其染色体分析

宋 玫, 高建华, 严 欣, 刘晓军, 陈 阳 (南方医科大学南方医院整形科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 建立瘢痕疙瘩家系永生淋巴细胞株, 并对该细胞株进行染色体核型分析, 探讨用这种方法建立瘢痕疙瘩永生细胞库的可行性和可靠性。方法 采用 EB 病毒转化技术, 把瘢痕疙瘩家系外周血 B 淋巴细胞转化成永生淋巴母细胞系 (LCL)。分别对建株前和建株后 10、20、30、35 代的细胞株进行染色体核型分析。结果 成功地对瘢痕疙瘩家系 27 个个体建立了永生细胞株, 建株后 10 代、20 代的细胞株染色体未发现明显异常; 而培养 30 代、35 代的细胞株染色体发生数目和结构的异常。结论 瘢痕疙瘩家系永生淋巴细胞株可以为以后的研究提供随时可取的实验材料, 在用做遗传学分析时宜在转化早期进行。

关键词: 瘢痕疙瘩; 家系; EB 病毒; 永生淋巴母细胞系; 染色体

中图分类号: R619.6 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)12-1760-03

Establishment of immortalized B-lymphoblastoid cell lines of keloid pedigree and its karyotype analysis

SONG Mei, GAO Jian-hua, YAN Xin, LIU Xiao-jun, CHEN Yang

Department of Plastic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To establish immortalized B-lymphoblastoid cell lines of keloid pedigree transformed with Epstein-Barr (EB) virus and conduct karyotype analysis of the cells. **Methods** Immortalized B-lymphoblastoid cell lines were established by EB virus transformation of the peripheral blood B lymphocytes from the members of keloid pedigree. Karyotype analysis was performed for the cultured cells of passages 10, 20, 30, and 35 to evaluate their genetic stability. **Results** Altogether 27 immortalized lymphoblastoid cell lines with stable chromosome were obtained successfully from the keloid pedigree. No chromosomal abnormalities were found in the cultured cells until passages 30 and 35, in which variation in chromosome number and structure are detected. **Conclusion** The cell lines of the keloid pedigree established in this study can be useful in future studies, and genetic analysis is conducted preferably with cells of early passages.

Key words: keloids; pedigrees; Epstein-Barr virus; B-lymphoblastoid cell lines; chromosomes

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淋巴母细胞系^[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), RPM I1640 (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 5 mL, 肝素抗凝, 其中 4 mL 用于转化, 1 mL 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 B 淋巴母细胞系 常规分离淋巴细胞, 用无血清 RPM I1640 培养液洗涤淋巴细胞 2 次后, 再用 2 mL RPM I1640 完全培养基重悬, 加入 1.3 mL EBV 悬液和 0.4 mL CyA (0.2 μg/μL), 充分混匀后等量移入 2 个 10 mL 培养瓶内, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。7 d 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) × 10⁶/mL 时, 可收集大部分细胞

收稿日期: 2006-04-13

基金项目: 广东省名医工程 (2004)

Supported by Foundation for Prestigious Doctors of Guangdong Province (2004)

作者简介: 宋玫 (1974-), 女, 医学硕士, 主治医师, 电话: 020-61641861, E-mail: esm109@sina.com

通讯作者: 高建华, 教授, 主任医师, 博士生导师 电话: 020-61641861, E-mail: tanzi@fimmu.com

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 $(2-4) \times 10^6 / \text{mL}$,加入秋水仙素,使其终浓度为 0.05 mg/mL ,置 37°C 培养箱中处理 2-3 h。取出细胞,用吸管轻轻吹打混匀,移入 10 mL 离心管中, 1200 r/min 离心 10 min ,弃上清,加入 $10 \text{ mL } 0.075 \text{ mol/L KCl}$,用吸管轻轻吹打混匀后置 37°C 培养箱中处理 30 min 。加入甲醇和冰醋酸(3:1)的混合液 1 mL ,用吸管轻轻吹打混匀后 1200 r/min 离心 10 min ,弃上清。加入甲醇和冰醋酸(3:1)的混合液 10 mL ,室温下固定 30 min , 1200 r/min 离心 10 min 。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°C 烤片 2-3 h;标本用 0.25% 胰酶消化处理,10% Giemsa

染色 10 min ,镜下观察中期分裂相。

2 结果

2.1 癩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 40 d。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^[3-5],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 400 DPLs 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]对一个永生细胞系 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 LM P1 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^[6-8]。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 淋巴瘤细胞系的建立[J]. 北京医学, 1998, 4: 17-8.
- [3] Schlemm K, King T, Gires O, et al. Identification of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 (EBNA2) target proteins by proteomic 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 characterization 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 susceptibility of normal human B populations [J]. J Exp Med, 1984, 159 (1): 208-20.
- [6] Matsu S, Yang L, Takada K. Roles of Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells [J]. J Gen Virol, 2001, 82 (Pt 10): 2373-83.
- [7] Martin DR, Mardwell RL, Ahearn JM. Determination of the role for CD 21 during Epstein-Barr virus infection of B-lymphoblastoid cells [J]. J Virol, 1994, 68 (8): 4716-26.
- [8] Kurth J, Spiekler T, Wustrow J, et al. EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: vital strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency [J]. Immunology, 2000, 13 (4): 485-95.
- [9] Okubo M, Tsunokubo 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 Biophys Acta, 2004, 1670 (1): 81-3.

胎膜早破孕妇 C 反应蛋白测定

郭智勇,郭新宇,李文玲,于秋江,孙静(广州军区广州总医院妇产科,广东 广州 510010)

摘要:目的 通过动态观察胎膜早破孕妇血清 C 反应蛋白、白细胞计数的变化,分析其在胎膜早破的观察及治疗中的指导作用。**方法** 观察无胎膜早破产妇 60 例,其中妊娠不足 37 周、37 周以上各 30 例做为对照组,胎膜早破孕妇 35 例,其中妊娠不足 37 周 13 例,37 周以上 22 例,分别在患者破膜后第 1、2、3 天抽取静脉血,留取血清,在检测 C 反应蛋白的同时检测外周血白细胞计数。**结果** 本研究观察到足月胎膜早破孕妇 22 例,患者破膜 3 d 内血清白细胞计数、C-反应蛋白水平与对照组相比均无统计学差异 ($P>0.05$)。未足月胎膜早破患者破膜第 1 天血清白细胞计数为 $(14.55 \pm 4.05) \times 10^9/L$, C-反应蛋白为 6.82 ± 3.52 ,与对照组相比无统计学差异 ($P>0.05$)。12 例患者破膜第 2 天血清白细胞计数为 $(15.02 \pm 4.84) \times 10^9/L$, C-反应蛋白为 6.66 ± 2.08 ,与第 1 天相比无统计学差异 ($P>0.05$)。10 例患者破膜第 3 天血清白细胞计数为 $(15.31 \pm 4.36) \times 10^9/L$, C 反应蛋白为 8.31 ± 2.48 ,与第 2 天相比有统计学差异 ($P<0.05$)。**结论** C 反应蛋白的快速、准确测定,对预测胎膜早破孕妇有无感染,指导临床用药有很高的临床价值,临床可作用常规测定项目。

关键词:胎膜早破; C 反应蛋白; 感染

中图分类号: R 714.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4254(2006)12-1762-02

胎膜早破指临产前胎膜破裂,包括足月前胎膜早

破和足月后胎膜早破,其发生率约占分娩总数的 3.03% - 21.9%^[1],胎膜破裂后,由于屏障作用消失,将可能会引起羊膜腔感染,围产期感染,败血症新生儿窒息等危及母儿安全的严重并发症,因此早期采取恰

收稿日期: 2006-04-10

作者简介: 郭智勇(1969-),女,护士长,主管护师,电话: 13798025679, 020-36653526, E-mail: fckgzzyong@163.com