

脑海绵状血管瘤遗传家系永生细胞株的建立 PDF转换可能丢失图片或格式，建议阅读原文

https://www.100test.com/kao_ti2020/491/2021_2022__E8_84_91_E6_B5_B7_E7_BB_B5_E7_c67_491792.htm

【关键词】血管瘤，海绵状中枢神经系统；疱疹病毒4型，人；B淋巴细胞；细胞系

Establishment of immortal lymphoblastoid cell lines in a pedigree of cerebral cavernous malformations LI Min , WANG LiBin , WANG YuJiong , MA AiYing , L ShuTao Key Laboratory of Biotechnology , Ningxia University , Central Laboratory , Affiliated Hospital , Ningxia Medical College , Yinchuan 750021 , China

【Abstract】 AIM : To establish immortal lymphoblastoid cell lines in a pedigree of cerebral cavernous malformations (CCM)。 METHODS : The cell lines were constructed by means of adding EpsteinBarr virus and Cyclosporine A onto peripheral B lymphocytes. RESULTS : We successfully established 7 immortal lymphoblastoid cell lines in the family , and 5 of them suffered from CCM. CONCLUSION : These immortal lymphoblastoid cell lines would preserve the unique genome of CCM.

【Keywords】 hemangioma , cavernous , central nevvous system ; herpesvirus 4 , human ; B lymphocytes ; Cell line

【摘要】目的：建立脑海绵状血管瘤家系永生细胞株。方法：利用EB病毒转化外周血B淋巴细胞，同时加入环孢霉素A的方法。结果：成功建立了该疾病家系7名成员永生细胞株，其中5名为患者。结论：脑海绵状血管瘤家系永生细胞株成功建立。【关键词】血管瘤，海绵状中枢神经系统；疱疹病毒4型，人；B淋巴细胞；细胞系

0引言 脑海绵状血管瘤

(cerebral cavernous malformation, CCM) 是一种常见的脑血管先天性发育异常疾病, 在临床上可分为家族性遗传和散发性遗传两大类。该病发病率高, 病因复杂, 对人危害很大, 是医学和分子遗传学研究领域的热点之一 [1]。利用EB病毒 (EpsteinBarr virus, EBV) 转化外周血B淋巴细胞, 使其成为能连续分裂永久生存的类淋巴母细胞 (lymphoblastoid), 以进一步建立各种疾患者群的永生细胞株 (immortalized cell lines), 可永久保存每种疾病个体的完整基因组, 且基因组的生化和分子生物学特性不会发生变化, 因而是进行细胞遗传学和分子遗传学研究极好的材料。我们以EBV加环孢霉素A (cyclosporine A, CyA) 的转化技术, 对采自内蒙古左旗地区一个遗传性CCM家系外周血淋巴细胞进行了转化, 成功建立了该家系7名成员 (5名为患者) 的永生细胞株, 从而为永久保存该疾病遗传资源以及今后进一步研究该病的发病机制提供了可靠的实验材料。

1材料和方法 1.1材料 RPMI1640 (Gibco), HEPES (Gibco) 用去离子水配成1 mol/L的溶液, 胎牛血清 (FCS, Hyclone, 美国), 淋巴细胞分离液 (天津), 环孢霉素A (Cyclosporine A, CyA, 瑞士) 用RPMI1640液稀释成0.2 g/L的储存液, 植物细胞凝集素 (phaseolus vulgaris, PHA, Gibco) 用去离子水配成0.2 g/L的溶液, 二甲基亚砜 (Sigma), 青、链霉素 (双抗, 宁夏启元药业) 用去离子水配成10g/L的溶液, L谷氨酰胺 (Sigma) 用去离子水配成0.2 mol/L的溶液, 非洲狨猴 B 958细胞株 (购自中国科学院遗传与发育生物学研究所), 37 °C CO₂培养箱 (Shellba, 美国) 等。全培养液按照每1L含762 mL RPMI1640, 200 mL胎牛血清, 16 mL HEPES, 12 mL L谷氨酰胺, 以及10 mL双抗的

比例配制；冻存液按950 mL/L胎牛血清和50 mL/L二甲基亚砷的比例配制，4℃保存备用。EBV液来自B958细胞株，提取时先复苏并培养B958细胞，当细胞处于指数生长期时，收集全部细胞悬液，反复冻融3次，再转移至离心管中，3000 r/min离心15 min，将上清液用0.22 μm滤膜过滤后分装，-80℃保存。血液样本7份，均来自内蒙古左旗地区一个CCM遗传病家系，家系背景清楚。其中5人经核磁共振检查确诊为脑海绵状血管瘤患者。在征得患者及其家属知情同意的情况下，无菌采集其新鲜外周血4 mL至含0.5 mL肝素的抗凝试管中，轻摇防止血液凝固，室温静置24 h（CCM家系见图1）。本实验所采集7份样本分别为 1, 3, 5, 7, 2, 3, 4等；其中 1, 3, 5, 7, 3为该疾病确诊患者。图1遗传性脑海绵状血管瘤家系图（略）

1.2方法将RPMI1640液2 mL加入到所采集的抗凝血液中，充分混匀，然后将其缓慢地沿管壁移入预装有4 mL已预热（37℃）淋巴细胞分离液的离心管中，室温3000 r/min离心25 min。用吸管小心吸取中间的淋巴细胞层，将其移入另一支15 mL离心管中，并加入不完全培养基10 mL，将淋巴细胞团吹散，使其在液体中均匀分布。继而依次2500，2000 r/min和1500 r/min分别离心15 min，并于每次离心后弃上清，再以不完全培养液10 mL吹散淋巴细胞。每份全血分离出的细胞用2 mL完全培养液重悬，然后依次加入EBV 1.2 mL，CyA 0.4 mL和PHA 30 μL，轻轻摇匀。将细胞悬液等份转入2个25 cm²一次性培养瓶中，置37℃，含50 mL/L CO₂的培养箱中培养，72 h后，观察细胞转化情况，根据细胞转化和聚集情况进行加液或半量换液，当细胞数达到3~6 × 10⁹/L时即可对其进行冻存。利用本实验室人员建立的

染色体G显带技术条件，比较转化后B淋巴细胞与来自同一个体的新鲜外周血淋巴细胞的染色体的G带，从而判断转化后的B淋巴细胞的染色体是否发生变异。

2结果

2.1转化结果

按照EBV加CyA的方法对7份血液样本进行转化，于转化后第10天观察细胞转化情况：在显微镜下可看到散在的成团细胞（图2A），该细胞透明发亮，体积明显增大，外壁有不规则的毛刺状突起，即为淋巴母细胞样B细胞；同时可以看到一些皱缩退化的细胞，此为被CyA抑制死亡的T淋巴细胞。约3 wk后，转化细胞明显增多，显微镜下可看到大量的永生细胞团（图2B），表明转化成功。

A：转化初期的B淋巴细胞（ $\times 200$ ）；B：转化成功 $\times 200$ 。图2转化细胞形态（略）

2.2转化结果鉴定

采用我室建立的永生细胞染色体G显带技术条件和常规染色体G显带技术，比较永生B淋巴细胞与来自同一个体新鲜外周血中淋巴细胞的染色体的G带（图3A，B），未发现有任何变异，表明转化后的B淋巴细胞保留了正常的染色体核型，未发生畸变。

A：外周血淋巴细胞的染色体G显带（ $\times 100$ ）；B转化后（ $\times 100$ ）。图3染色体核型分析结果（略）

2.3细胞株稳定性的验证

当已经转化成功的细胞培养至密度达到 $3 \times 10^9/L$ 以上时，即可对其进行冻存，并分别于冻存后1/3 mo，1 mo和6 mo后进行了复苏、培养和鉴定，该细胞株依然保持旺盛的增殖特性，且染色体核型未发生变异，表明建株成功，即成功获得了CCM遗传家系的永生细胞株。

3讨论

以EBV加CyA感染并转化人外周血淋巴细胞的方法所建立的永生细胞株具有永久生存和增殖的特性，而且该细胞株还可以稳定保持供血者原有细胞核型及各种遗传信息和遗传特性，并且冻存后的细胞可以随时复苏以作相关研究[2]。

因此，利用该技术建立疾病细胞株可避免因患者死亡或其他原因造成的实验材料丢失以及反复采血所带来的不便，从而为广泛、深入研究疾病的病因、发病机制及防治等提供永久的实验材料 [3]。EBV主要是通过结合B淋巴细胞表面上的EBV受体（补体受体）CR2而感染B淋巴细胞。被感染B细胞在EBV核抗原EBNA的刺激下转化为淋巴母细胞样细胞，其端粒酶活性提高，维护了细胞染色体端粒长度的稳定，并能够不断分裂增殖，从而促使B淋巴细胞的永生性生长 [4]。对EBV基因组序列及其表达的研究主要是用B958株进行的，B958细胞株是用从患传染性单核细胞增多症患者B细胞内提取的EBV感染非洲绒猴B淋巴细胞建立的 [5]。我们培养购自中国科学院遗传与发育生物学研究所的B958细胞株并提取EBV进行转化，得到了具有高效价的EBV，转化一次成功率达到100%。由于绝大部分人都曾受到过EBV的感染，人体内会产生出对EBV的免疫反应，尤其是细胞免疫反应。血清中抗EBV阳性个体的淋巴细胞中含有对EBV特异的记忆T细胞。当用EBV感染B细胞的同时，EBV特异的记忆T细胞也被激活，这导致对EBV转化的自体B细胞产生特异的细胞毒作用 [6]。为了避免这种现象的产生，我们采用具有明显选择性抑制T细胞的CyA。CyA是一种由11个氨基酸组成的高脂溶性多肽，它是一种新型的强效免疫抑制剂，在EBV转化中可以有效地阻抑T细胞对B细胞的细胞毒性作用，防止转化B细胞的退化，从而保证B细胞的增殖 [7]。通常在细胞株的建立时，每4 mL全血分离的淋巴细胞中，CyA的终浓度以2 mg/L为宜。CyA加入的时间以在EBV感染后24 h内效果较好，若在72 h后再加入则由于T淋巴细胞已经增殖生长，使得CyA不能起到明

显的抑制作用 [8]。 PHA是从豆科植物种子中提取的凝集素，该凝集素能够刺激淋巴细胞幼稚化和分裂增殖。为了提高EBV转化效率，在EBV感染之前常用PHA处理淋巴细胞，它能起到辅助细胞增殖的作用，从而可以明显提高B淋巴细胞的转化率 [9]。 本研究中，我们采用转化同时加入CyA和PHA的办法，达到了满意的转化结果，全部标本均一次转化成功。为今后进一步研究CCM的遗传机理提供了宝贵的实验材料。 100Test 下载频道开通，各类考试题目直接下载。详细请访问 www.100test.com