· 实验研究 ·

贵州省水族和仡佬族永生细胞系建立*

黎明[1], 张广超[2], 孙良先[1], 唐莉娜[1], 杨敬源[2], 褚嘉祐[3], 杨昭庆[3]

摘　要: 目的　建立贵州省水族和仡佬族少数民族永生细胞系, 为生命科学研究提供技术支持。**方法**　采用 EB 病毒(EBV)感染和环孢霉素 A(CyA)处理方法, 对来自贵州省三都县的 144 名水族和来自务川县的 124 名仡佬族人群外周静脉血 B 淋巴细胞进行转化, 并对转化的细胞进行细胞形态学观察, 用直接计数法绘制转化细胞的生长曲线并计算细胞倍增时间, 对转化的细胞进行传代、冻存和复苏实验, 采用培养法进行支原体污染检测。**结果**　成功建立了138 个水族和 115 个仡佬族人群的永生化 B 淋巴细胞株, 转化率分别为 95.8% 和 92.7%; 转化的 B 淋巴细胞呈现典型的细胞变形和克隆化生长特点, 能持续传代、冻存复苏后生长良好, 无支原体污染。**结论**　贵州省水族和仡佬族人群 B 淋巴细胞被成功转化为永生化细胞系。

关键词: EB 病毒(EBV); 永生细胞; B 淋巴细胞; 水族; 仡佬族

中图分类号: R 181.2+4　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)03-0306-03　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-03-15

Establishment of immortal cell lines from Shui and Gelao ethnic populations in Guizhou province

LI Ming*, ZHANG Guang-chao, SUN Liang-xian, et al (* *Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang, Guizhou Province* 550004, China)

Abstract: Objective　To establish an immortal cell line from Shui and Gelao ethnic populations in Guizhou province and to provide a permanent research material for life science research. **Methods**　Totally 144 peripheral venous blood samples from Shui ethnic people in Sandu county and 124 from Gelao in Wuchuan county in Guizhou province were collected. B lymphocytes isolated from the blood samples were transformed using Epstein-Barr (EB) virus infection and cyclsoporine A (CyA) treatment. The morphology of the transformed cells was observed and direct counting method was used to make cell growth curve and to calculate cell doubling time of the transformed cells. Passage, frozen storage, and recovery of the transformed cells were performed and culture was conducted to detect mycoplasma contamination. **Results**　Totally 138 immoral B lymphocyte cell lines from Shui ethnic group and 115 from Gelao ethnic group were successfully established with the conversion rates of 95.8% and 92.7%, respectively. The transfored B lymphocytes present typical cell deformation, cloning growth characteristics, and normal growth after recovery, without mycoplasma contimination. **Conclusion**　Peripheral B lymphocytes from Shui and Gelao ethnic populations were transformed into immortal cell lines successfully for further researches.

Key words: EB virus; immortal cell; B lymphocyte; Shui ethnic group; Gelao ethnic group

人类基因组的遗传多样性不仅为研究人类种族和群体的源流、进化和迁移提供生物学依据, 而且可为研究疾病发生发展及临床药物和生物制品的研发提供帮助。通过建立永生细胞系来长期保存不同民族和群体的基因组, 对于保存和利用中国不同民族遗传资源具有重要的战略意义[1]。水族与仡佬族因其起源及所处地理位置的不同, 并且历史上有过疟疾等传染病流行, 形成了与中国其他民族有所不同的基因多态性, 如在 Y 染色体多态性、线粒体遗传多态性和 ABO 血型分布及基因频率上具有自身的特点, 与其他民族有较大的遗传差异[2-4]。目前中华民族永生细胞库中还缺乏水族和仡佬族的永生细胞株[1]。本研究采用人类疱疹病毒(Epstein-Barr virus, EBV)转化结合环孢霉素选择方法, 拟建立贵州省水族和仡佬族人群 B 淋巴细胞永生细胞株, 并使其成为可连续传代的淋巴母细胞(LCLs), 结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　材料　144 份水族和 124 份仡佬族人外周静脉血样分别采自贵州省三都水族自治县和务川仡佬族苗族自治县, 对象均是本民族世居居民, 至少是三代纯系, 健康状况良好, 相互之间无亲缘关系, 年龄为 18 ~ 60 岁, 男女各半; 遵从知情同意和自愿参加原则, 每个个体采集 5 mL 外周静脉血, 4 - 羟乙基哌嗪乙磺酸抗凝, 常温放置及运输, 于 24 ~ 48 h 内

* **基金项目**: 国家高技术研究发展计划(863)(2012AA021802); 贵州省科学技术基金[(2012)2211 号]
作者单位: 1. 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院; 3. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所
作者简介: 黎明(1956 -), 男, 仡佬族, 贵州正安人, 主任医师, 硕士, 主要从事传染病预防与控制工作。
通讯作者: 张广超, E-mail: chao6881@126.com; 杨昭庆, E-mail: zyang@imbcams.com.cn
数字出版日期: 2015 - 2 - 15 10:28
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150215.1028.037.html

到达实验室进行细胞转化。

1.2　主要试剂与仪器　1640 培养基、100 mmol/L 丙酮酸钠和 4 - 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)(上海 Hyclone 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);淋巴细胞分离液 Ficoll(美国 PerkinElmer 公司);环孢素 A(美国 Switerzland 公司);200 mol/L 谷氨酰胺(昆明医学生物所),EB 病毒株 B-958 细胞(中国科学院昆明动物研究所)。倒置光学显微镜(日本 Nikon 公司),CO_2 培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.3　永生细胞系建立

1.3.1　EBV 转化淋巴细胞　参考文献[5]方法进行,EBV 悬液来自 B-958 细胞培养上清液,B-958 细胞饥饿培养 4 ~ 6 d,离心收集上清液,经 0.22 μm 过滤,获得 EBV 液,取新鲜外周血 5 mL,与 5 mL 1640 细胞洗液(含有 200 U/mL 青霉素和 200 μg/mL 链霉素)混匀后,2500 r/min 离心 30 min,吸取中间白色细胞层,悬浮于 1640 洗液中,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 1640 全营养细胞培养液(含 20% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、2 mmol/L 谷氨酰胺、10 μmol/L丙酮酸钠、20 mmol/L HEPES)悬浮细胞,转移到细胞培养瓶中,加入 4 mL EBV 悬液,置摇床,37 ℃,120 r/min 1 h,加入 1640 全营养液至终体积 10 mL,并加入环孢素 A 达终浓度 2 μg/mL,置 37 ℃,CO_2 培养箱培养,并逐日观察细胞的转化及生长状况。

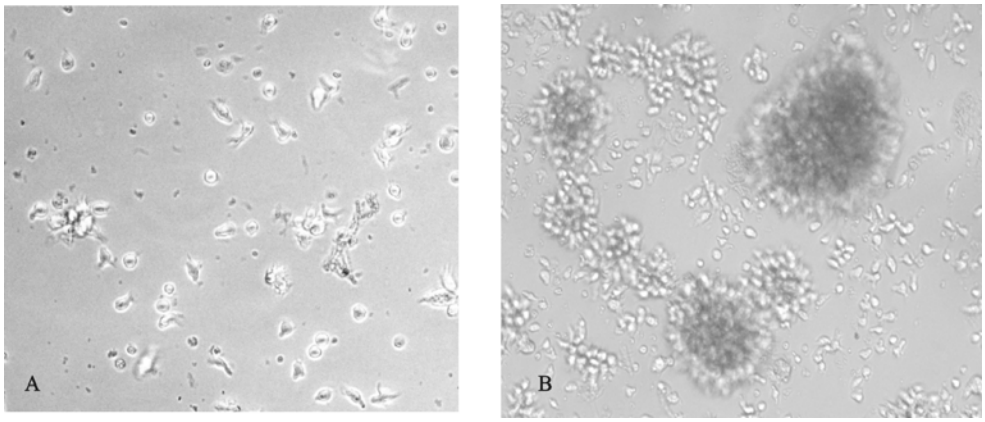
1.3.2　细胞群体倍增时间测定　收集细胞,调整细胞密度,每瓶 1×10^5 个细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中,连续培养 7 d,每 24 h 取 3 瓶细胞计数,取平均数;以培养时间(d)为横坐标,细胞浓度为纵坐标,绘制细胞生长曲线,根据公式计算细胞的群体倍增时间,$t = \triangle t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$,其中 Nt 为 t 时间的细胞数,N_0 为理论初始细胞数。

1.3.3　细胞冻存与复苏　细胞冻存:收集细胞,悬浮于冻存液里,吹打均匀,每支冻存管分装 1 mL 悬浮细胞,冻存管依次在 4 ℃、-20 ℃、-80 ℃冰箱各放置 1 h,最后放入液氮罐中,最终放入液氮冰箱永久保存。细胞复苏:取液氮中冻存细胞,迅速在 37 ℃ ~ 38 ℃水中快速融化,用洗液洗涤 1 次,1 000 r/min离心 10 min,弃上清,细胞悬浮于 1640 全营养培养液中。置 CO_2 培养箱培养。

1.3.4　支原体检测　将细胞悬液 1 mL 及 2 mL 无支原体灭活小牛血清,加入 8 mL 预冷至 56 ℃左右的半流体支原体培养基中,充分混匀后,置于 36 ℃温箱中培养,设置阳性及阴性对照,每隔 3 d 观察 1 次,持续观察 21 d,支原体阳性判定参考文献[1]。

2　结　果

2.1　EBV 转化细胞及细胞形态学变化(图 1)　光学显微镜下可见淋巴细胞在 EBV 感染后第 2 ~ 3 天起开始透亮,部分细胞由原来的圆形变为不规则形态,少部分细胞变形变大;约 7 ~ 10 d 后,形态不规则的细胞变大,即淋巴母细胞化,可观察到有更多形态各异的细胞(图 1A);细胞逐渐聚集生长,并出现转化而形成的细胞聚集(B 淋巴细胞克隆),随后细胞克隆逐渐增多增大,继续培养 2 周后,肉眼可见到白色细胞团块(图 1B)。



注:A:转化初期(7 ~ 10 d);B:转化后 2 周。

图 1　EB 病毒转化后淋巴细胞(×100)

2.2　转化后细胞冻存复苏及支原体污染状况　细胞株约 5 ~ 7 d 可进行传代;所有细胞株均能持续传代、冻存复苏后,细胞均生长良好,随机支原体检测结果为阴性。建成水族人永生细胞株 138 株,仡佬族人 115 株,细胞转化阳性率分别为 95.8% 和 92.7%。

2.3　细胞生长曲线和倍增时间　细胞生长曲线显示,细胞培养的延迟期较短,很快进入细胞对数期,

群体中快速增殖的细胞占优势;经过 5 d 时间,进入平台期;通过公式计算,细胞群体的倍增时间是 48 h,表明细胞具有旺盛的生长能力。

3 讨　论

由于在民族源流、自然选择因素等方面的不同,水族和仡佬族人群呈现出与中国其他民族既有相似又有不同的遗传多样性特点。研究表明,贵州仡佬族等百越族群民族在单倍型上具有相似性,并可能与氐羌等其他民族发生过较大的基因融合,表现出百越与外族之间基因成分的互相交流[2]。贵州少数民族线粒体多态性的研究表明,水族是一个古老的南方民族群体,总体表现出与壮族接近但又具有不同的特点[5];居于南方的仡佬族与具有北方起源的彝族有过广泛的基因交流[4]。调查表明,贵州水族群体在睫毛、拇指类型、中指毛 3 对遗传性状基因频率与同地区的苗族有显著性差异[6]。水族和仡佬族人群在地中海贫血、6 - 磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)缺乏症等单基因遗传性疾病及高血压和糖尿病等复杂疾病的发病和流行等方面具有自己的特点。

EBV 可以使外周血 B 淋巴细胞转化和分裂,成为永生性类淋巴母细胞,这一方法已被国内外广泛用于各民族和群体的基因组保存[7]。近年来多个采用全基因组测序方法的研究表明,EBV 转化的淋巴细胞(LCLs)基因组与供体外周血细胞的基因组之间的差异非常微小,尤其是使用低代次的永生细胞将不会在遗传多样性和临床疾病关联基因等分析研究中产生有影响的偏差[7]。永生化的细胞株不仅可以提供取之不竭的 DNA,还能提供 RNA 和蛋白质,并且由于具有活细胞的特性,还可以用于研究基因的功能、micoRNA 及基因表达调控及代谢途径[8],同时还是研究病毒 - 宿主相互作用、药物及其敏感/耐药基因筛选、抗体和疫苗研究及干细胞研究等领域的重要材料[9-10]。

采用 EB 病毒转化 B 淋巴细胞的方法已经建立多年,方法得到不断优化和完善,关键技术环节包括从采集血液到实施细胞转化的间隔时间、所需外周血体积、抗凝剂使用、T 淋巴细胞消除等[11-13]。本研究主要参照中国不同民族永生细胞库建立的技术步骤[1],成功建立了 253 个水族和仡佬族人永生细胞株,转化成功率分别为 95.8% 和 92.7%,未转化成功的样本多与所获血液量少、血液样本抗凝不充分而出现细胞凝集等因素有关。提示获得足够、新鲜血液样本以保证足够的淋巴细胞活性和数目是转化实验成功的关键因素之一。永生细胞株的建立还只是细胞库的初期工作,还需对所建立细胞株进行进一步、持续性的质量检测和细胞生物学特性分析,如染色体稳定性、端粒酶活性、B 淋巴细胞表面特异性分子标记及 B 细胞亚群分析等,以提供更多基础科学数据和确保后续使用的可靠性。

参考文献

[1] 褚嘉祐,徐玖瑾,傅松滨,等. 中华民族永生细胞库的建立[J]. 国际遗传学杂志,2008,31(4):8 - 25.

[2] 刘烟,单可人,齐晓岚,等. 贵州布依族、仡佬族、么佬族、毛南族、壮族 y-snp 的初步研究[J]. 遗传,2006,28(11):1350 - 1354.

[3] 任光祥,段书刚,余跃生,等. 黔南布依族、苗族和水族人群 ABO 血型分布及基因频率[J]. 人类学学报,2007,(4):325 - 328.

[4] Li B,Zhong F,Yi H,et al. Genetic polymorphism of mitochondrial DNA in Dong, Gelao, Tujia, and Yi ethnic populations from Guizhou,China[J]. J Genet Genomics,2007,34(9):800 - 810.

[5] 余跃生,姚永刚,孔庆鹏,等. 贵州水族人群线粒体 DNA 序列多态分析[J]. 遗传学报,2001(8):691 - 698.

[6] 张庆忠,陆玉炯,宋国琴,等. 贵州苗族、水族 10 对遗传性状的基因频率[J]. 人类学学报,2010(02):182 - 188.

[7] Sie L,Loong S,Tan EK. Utility of lymphoblastoid cell lines[J]. J Neurosci Res,2009,87(9):1953 - 1959.

[8] Nickles D,Madireddy L,Yang S,et al. In depth comparison of an individual's DNA and its lymphoblastoid cell line using whole genome sequencing[J]. BMC Genomics,2012,13:477.

[9] 李晓坤,王欢,杨妍,等. 食管癌 EC-1 细胞株 polβ 启动子突变性转录活性分析[J]. 中国公共卫生,2011,27(2):177 - 179.

[10] Shukla SJ,Dolan ME. Use of ceph and non-ceph lymphoblast cell lines in pharmacogenetic studies[J]. Pharmacogenomics,2005,6(3):303 - 310.

[11] Bass H,Walters R,Darke C. Provision of Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines in a routine tissue typing laboratory: practicalities and applications[J]. Eur J Immunogenet,2004,31(2):87 - 92.

[12] Chang IC,Wu JY,Lu HI,et al. High-potentiality preliminary selection criteria and transformation time-dependent factors analysis for establishing Epstein-barr virus transformed human lymphoblastoid cell lines[J]. Cell Proliferation,2006,39(6):457 - 469.

[13] Hui-Yuen J,McAllister S,Koganti S,et al. Establishment of Epstein-barr virus growth-transformed lymphoblastoid cell lines[J]. Journal of Visualized Experiments,2011,57:e3321.

收稿日期: 2013-11-14　　(解学魁编辑　郑新校对)

中国公共卫生 CPH