

• 论 著 •

带状疱疹患者淋巴母细胞在传代培养过程中染色体的稳定性分析*

莫小辉¹, 杨连娟¹, 潘会君¹, 胡 专², 余 茜¹, 胡婷婷¹, 吴 飞¹, 谭 飞^{1,3△}

(1. 上海市皮肤病医院中心实验室, 上海 200443; 2. 上海市第一妇幼保健院产前诊断中心, 上海 200043; 3. 安徽医科大学上海皮肤性病临床学院, 上海 200443)

摘要:目的 评价 EB 病毒转化的淋巴母细胞在传代培养过程中染色体的稳定性。方法 采用 EB 病毒感染带状疱疹患者外周血中的 B 淋巴细胞, 形成的淋巴母细胞(LCL)经过 6 个月的传代培养, 通过核型分析比较淋巴母细胞染色体在培养前后是否存在差异。结果 4 株染色体正常的 LCL 培养 6 个月后染色体无明显差异, 1 株染色体异常的 LCL 在传代培养过程中退化死亡, 1 株 LCL 培养 6 个月后染色体出现了亚二倍体和超二倍体。结论 核型正常的 LCL 在传代培养过程中染色体具有较高的稳定性, 选择核型正常的 LCL 有助于建立稳定的细胞系。

关键词: EB 病毒; 淋巴母细胞系; 核型分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)19-2798-02

The stability of the chromosomes during culture of lymphoblastoid cell lines from patients with herpes zoster*

Mo Xiaohui¹, Yang Lianjuan¹, Pan Huijun¹, Hu Zhuan², Yu Qian¹, Hu Tingting¹, Wu Fei¹, Tan Fei^{1,3△}

(1. Central Laboratory, Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200443, China; 2. Center of Prenatal Diagnosis, Shanghai First Maternity and Child Care Hospital, Shanghai 200443, China; 3. Shanghai Skin Venereal Clinical College of Anhui Medical University, Shanghai 200443, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the stability of the chromosomes during culture of lymphoblastoid cell lines (LCLs) from patients with herpes zoster. **Methods** Established continuous cultures of LCLs for 6 months and analyzed the cells using conventional karyotyping. **Results** There were four LCLs with normal karyotyping had no change of chromosome structure during culturing, while one LCL with abnormal karyotyping showed chromosome aberrations and one LCL died. **Conclusion** It is feasible to maintain LCLs with a normal genomic structure during the LCL establishment processes.

Key words: epstein barr virus; lymphoblastoid cell lines; karyotype

EB 病毒通过与 B 淋巴细胞表面的 EB 病毒受体 CD21 结合, 感染 B 淋巴细胞, CD21 作为 B 淋巴细胞生长因子的受体, 能传递细胞增殖信号, 促进 B 淋巴细胞增殖, 感染的 B 淋巴细胞可转变为淋巴母细胞(LCL), 并能无限传代培养^[1]。LCL 可作为细胞遗传学、分子生物学和 EB 病毒相关肿瘤免疫治疗等领域研究工具^[2]。而 LCL 是否保存稳定的遗传信息及分子生物学特性还存在争议^[3-4]。为此, 本研究采用 6 株带状疱疹患者外周血来源的 LCL 进行较长时间的传代培养, 通过染色体核型分析来判断 LCL 在传代培养过程中是否发生变化。

1 材料与方法

1.1 材料 PCR 仪为美国 ABI 公司 9902 型扩增仪; 淋巴细胞亚群检测采用美国 Beckman Coulter 公司生产的 EPICS-XL 流式细胞仪。T 淋巴细胞亚群检测试剂(单克隆抗体 CD3-PC5/CD4-PE/CD8-ECD/CD45-FITC)、B 淋巴细胞亚群(CD19-PC5)和 NK 细胞[CD3-FITC/CD(16+56)-PE]检测试剂购自 Beckman Coulter 公司; PCR 试剂购自 Promega 公司; DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; PCR 引物由上海生工合成; RPMI1640 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司, 二甲基亚砷购自 Sigma 公司。

1.2 LCL 的制备和传代培养 LCL 的制备方法参照文献[5], 选取 EB 病毒感染 6 周后形成的 LCL 6 株, 其中 4 株 LCL 染色体核型分析正常, 2 株染色体异常。使用含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液, 37℃、5% CO₂ 培养箱中连续传代培养 6 个月。

1.3 传代培养前后的 LCL 表面抗原检测 (5~10)×10⁵ 的 LCL 经磷酸盐(PBS)缓冲液洗涤 2 次, 再分别加入 10 μL 四色标记的单克隆抗体 CD3/CD4/CD8/CD45, 10 μL 双标记的单克隆抗 CD3/CD(16+56)和 10 μL 单标记 CD19, 室温避光温育 15 min, 加入 500 μL 生理盐水混匀后上流式细胞仪分析。

1.4 传代培养后 LCL 的 EB 病毒基因检测 目的基因片段来自编码 EB 病毒核抗原 1(EBNA1)的基因, 上游引物 5'-CCT GTA GGG GAA GCC GAT-3' 和下游引物 5'-CAA TGG TGT AAG ACG ACA TT-3', 目的片段长度为 387 bp^[6]。

1.5 传代培养前后 LCL 的核型分析 分别取 EB 病毒感染 6 周后形成的 LCL 及连续培养 6 个月的 LCL, 每管 5 mL, 细胞浓度为 2×10⁶/mL, 加入终浓度为 0.05 mg/mL 的秋水仙素, 置 37℃培养箱中处理 2 h; 取出细胞, 常规法制片, Giemsa 染色后镜下观察。

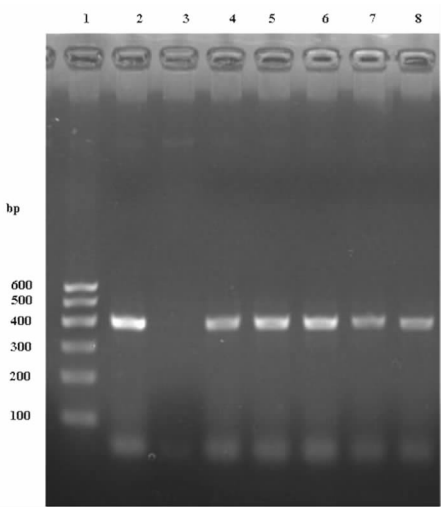
* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81502738); 上海市卫计委课题项目(20124y085); 上海市公共卫生重点学科建设项目(12GWZX0902)。 作者简介: 莫小辉, 男, 主管技师, 主要从事皮肤病实验室诊断研究。 △ 通讯作者, E-Mail: tanfeitrue@126.com。

2 结 果

2.1 LCL 传代培养过程中的生长情况 5 株 LCL 培养 6 个月仍然增殖生长,细胞形态无明显变化,胞质丰富,聚集成团,悬浮生长,经 Giemsa 染色可见 LCL 呈球状,有突起,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。1 株(染色体核型分析异常)在培养 10 周后细胞退化停止生长。

2.2 传代培养前后的 LCL 表面抗原 流式细胞术检测所有培养前后 LCL 表面抗原标记,CD3、CD4、CD8、CD16、CD56 抗原分子为阴性,CD19 和 CD45 抗原分子为阳性,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。表明 LCL 源自 B 淋巴细胞,在传代培养过程中细胞表面抗原分子未发生改变。

2.3 传代培养后的 LCL 的 EB 病毒基因检测结果 培养 6 个月后的 LCL 中 EBNA-1 基因检测 PCR 产物电泳结果显示扩增条带在 300~400 bp 范围内,与目的片段大小(387 bp)一致,见图 3。经测序比对为 EBNA-1 基因,结果显示 LCL 传代培养中 LCL 未丢失 EB 病毒基因。



1:DNA 标记物;2:阳性质控;3:阴性质控;4~8:LCLs。

图 3 淋巴瘤细胞 EB 病毒 EBNA-1 基因检测

2.4 LCL 培养前后染色体分析 EB 病毒感染 6 周后形成的 LCL 和培养 6 个月的 LCL 进行核型分析。感染 6 周后的 LCL 中 4 株 LCL 染色体正常,2 株 LCL 染色体异常,均存在亚二倍体;4 株染色体正常的 LCL 培养 6 个月后染色体未发生改变,1 株染色体异常的 LCL 在传代培养过程中退化死亡,1 株染色体异常的 LCL 培养 6 个月后染色体出现了亚二倍体和超二倍体,见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

EB 病毒转化的 LCL 细胞遗传学特征是否与原来的 B 淋巴细胞一致,在传代培养过程中 LCL 染色体是否发生改变,一直是人们关注的问题^[7-8]。本研究中 4 株染色体核型正常的 LCL 经传代培养后未发现有染色体易位,细胞表面 CD 抗原未发生变化,而 2 株染色体核型异常的 LCL 中,1 株在培养过程中细胞退化死亡,另 1 株 LCL 经传代培养后染色体出现亚二倍体、超二倍体等改变。结果表明核型正常的 LCL 在传代培

养过程中染色体具有较高的稳定性,不易发生改变;而核型异常的 LCL 染色体结构不稳定,细胞在有丝分裂过程中染色体不能精确地平均分配到两个子细胞中,从而使亲代和子代之间缺乏遗传信息的稳定性。

本研究结果说明,EB 病毒转化形成 LCL 不仅在建株早期出现染色体的改变,在传代培养过程中也存在染色体的改变。在培养过程中 LCL 的染色改变可能存在 2 种情况:(1)LCL 基因突变并在培养过程中累积;(2)由于突变后的 LCL 增殖速度快,从而取代了正常核型的 LCL。LCL 的基因突变无法避免,而第 2 种情况可以预防,通过减少 LCL 的传代次数和培养时间,以及定期对 LCL 的染色体进行检测,筛选核型正常的 LCL。此外,在建株早期对 LCL 进行核型分析,筛选核型正常的 LCL 将有助于获得稳定生长的细胞株。

综上所述,为了保证获得的 LCL 具有稳定的遗传信息,获得稳定的细胞株,应对 LCL 进行核型分析,尽量选择核型正常的细胞来建立稳定生长的 LCL。

参考文献

[1] Klein G, Klein E, Kashuba E. Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(1): 67-73.

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

[3] Danjoh I, Sone H, Shirota R, et al. Development of a robust method for establishing B cell lines using Epstein-Barr Virus[J]. In Vitro Cell Dev Biol Animal, 2012, 48(7): 393-402.

[4] Lee JE, Hong EJ, Kim JH, et al. Instability at Short Tandem Repeats in Lymphoblastoid Cell Lines[J]. Osong Public Health Res Perspect, 2013, 4(4): 194-196.

[5] 莫小辉,宋宁静,陈佳,等. EBV 转化带状疱疹患者外周血 B 淋巴细胞系的建立[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(7): 615-618.

[6] Ambinder RF, Lambe BC, Mann RB, et al. Oligonucleotides for polymerase chain reaction amplification and hybridization detection of Epstein-Barr virus DNA in clinical specimens[J]. Mol Cell Probes, 1990, 4(5): 397-407.

[7] Danjoh I, Shirota R, Hiroyama T, et al. Dominant expansion of a cryptic subclone with an abnormal karyotype in B lymphoblastoid cell lines during culture[J]. Cytogenet Genome Res, 2013, 139(2): 88-96.

[8] Houldcroft CJ, Petrova V, Liu JZ, et al. Host genetic variants and gene expression patterns associated with Epstein-Barr virus copy number in lymphoblastoid cell lines[J]. PLoS One, 2014, 9(10): 108384.

(收稿日期:2015-06-12)

