

- effects of follicle – stimulating hormone and insulin – like growth factor – I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells [J]. Biol Reprod, 2000, 62(5): 1209 – 1217
- 5 Atay V, Muhcu M, Karateke A. Comparison of letrozole and clomiphene citrate in women with polycystic ovaries undergoing ovarian stimulation [J]. Int Med Res, 2006, 34(1): 73 – 76
- 6 Polyzos NP, Tsappi M, Mauri D, *et al.* Aromatase inhibitors for infertility in polycystic ovary syndrome. The beginning or the end of a new era? [J]. Fertil Steril, 2008, 89(2): 278 – 280
- 7 董华, 陈士岭, 刑福祺. 促性腺激素释放激素激动剂在多囊卵巢综合征促排卵高危周期中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 1999, (2): 94
- 8 Tulandi T, Martin T, Al – Fadhli R, *et al.* Congenital malformations among 911 newborns conceived after infertility treatment with Letrozole or clomiphene citrate [J]. Fertil Steril, 2006, 85(6): 1761 – 1765
- 9 Healey S, Tan SL, Biljan MM, *et al.* Letrozole and gonadotropins: what is the ideal patient protocol? [J]. Fertil Steril, 2003, 80(6): 1339
- (收稿: 2011 – 01 – 14)
- (修回: 2011 – 01 – 25)

新疆和田维吾尔族长寿老人永生细胞株的建立

袁晓华 吐尔洪·克维尔 穆斯塔帕 左宏莉 乔艳辉 郭伟鹏

摘要 目的 通过用 EB 病毒转化外周血 B 淋巴细胞使之成为永生细胞株的方法, 建立新疆和田维吾尔族长寿老人永生细胞株, 为永久保存新疆长寿老人的基因遗传资源及后续研究奠定基础。**方法** 常规制备 EB 病毒上清, 用环孢素法和冻存全血法转化外周血 B 淋巴细胞。**结果** 以环孢素法成功建立了 5 株新疆和田维吾尔族长寿老人永生细胞, 其中百岁 2 人, 90 ~ 99 岁 3 人, 建系成功率为 100% (5/5), 以冻存全血法建系成功 1 例 (1/5)。HLA 基因分型结果在建系前后完全一致。**结论** 与冻存全血法相比, 环孢素法能更有效地转化长寿老人永生细胞株, 可为长寿的分子遗传机制研究以及某些细胞生物学性状的检测提供充足的实验材料。

关键词 EB 病毒 永生细胞株 维吾尔族长寿老人 和田

Establishment of Immortalized B Lymphoblast Cell Lines from the Longeovous Uygur People in HeTian XinJiang. Yuan Xiaohua, Tuerhong Keweier, Musitapa, Zuo Hongli, Qiao Yanhun, Guo Weipeng. Blood Center of Urumqi, Xinjiang 830000, China

Abstract Objective To establish immortal cell lines from the longeovous Uygur people in HeTian. **Methods** We used two methods of transforming human B lymphocyte into immortal lymphoblast cell lines: cyclosporine method and frozen whole blood method. **Results** Both of the methods can be used to establish the cell lines successfully. Cyclosporine method (5/5) was more efficient than frozen whole blood method (1/5). Five immortal longevity cell lines were obtained successfully, which included 2 centenarians and 3 nonagenarians. The results of HLA genotyping showed the genetic stability of these immortal cell lines. **Conclusion** These immortal B lymphoblast cell lines would preserve the unique genome of longeovous Uygur people in Hetian. It could provide adequate experimental material for the exploration of the origin and molecular mechanism of human longevity.

Key words Epstein – Barr virus; Immortal B lymphoblastoid cell lines; Longeovous Uygur people; Hetian

新疆是国际自然学会选定的世界四大长寿区之一, 新疆的百岁老人多集中在南疆的阿克苏、喀什及和田地区, 这些地区人口流动性相对较小, 形成了相对隔离的自然长寿人群, 为从分子和细胞水平研究长寿机制提供了典型样本^[1]。长寿是多基因遗传性状, 需对多种候选基因以及基因及环境之间相互作用

进行深入的研究, 探索基因多态性与新疆维吾尔族自然长寿的关联, 这样的研究常通常需要大量的实验样本。外周血易于取材, 淋巴细胞是细胞和分子遗传学研究最常用的研究材料, 但淋巴细胞离体后生存周期短且不能增殖传代培养, 实际研究中常遇到路途遥远采样困难、一次采血量有限、种种原因导致的无法重复采血等问题, 大大制约了研究工作的进行。EB (Epstein – Barr virus) 病毒是一种从非洲 Burkitt 淋巴瘤中发现的疱疹病毒^[2]。正常人群中 (包括幼儿及成人) 中 90% 以上是血清 EBV 抗体阳性者, EB 病毒基因组可持续、长期地潜伏于唾液腺上皮细胞和腮腺

基金项目: 乌鲁木齐市科技局人才工程项目编号 (P09131005)

作者单位: 830000 乌鲁木齐市血液中心 (袁晓华、吐尔洪·克维尔、左宏莉、乔艳辉、郭伟鹏); 新疆农业科学院微生物研究所 (穆斯塔帕)

通讯作者: 吐尔洪·克维尔, 电子信箱: ynotte2@yahoo. com. cn

导管细胞内^[3]。在体外,EB病毒有选择性地使人类B淋巴细胞和绒猴B淋巴细胞转化并分裂,使之成为永生性类淋巴母细胞。通过这种方法建立长寿老人永生细胞株,不仅可以保存新疆的珍贵长寿基因资源,也为今后长寿遗传分子机制的研究提供了来源稳定的实验材料,以保证研究的不断深入。

材料与方法

1. 试剂:RPMI1640(GIBCO),FBS(Hyclone),EB病毒株(B95-8,购自中科院上海细胞库),淋巴细胞分离液Ficoll(天津川贝),环孢素(上海生工),PHA(上海生工),DNA提取试剂盒(TE),HLA分型检测,SSO荧光微珠流式分型试剂(LAB-Type SSO,One Lambda)。

2. 仪器:超净工作台,CO₂恒温培养箱,-80℃超低温冰箱,24孔细胞培养板(CORNING),25cm²一次性培养瓶(CORNING),冻存管(CORNING),离心机,液氮罐,荧光微珠流式分析(luminex),HLATools结果判读分析软件(one lambda)。

3. 方法:(1)采样:2010年6月20~22日在新疆和田地区于田县采集长寿老人血样共5人份。长寿老人年龄界定按5步法确认,具体方法参照文献[4],采样在知情同意的原则下进行,并签署知情同意书。对所选取的长寿老人进行体格检查,填写调查表,包括身体健康状况、生活现状、饮食习惯、心理健康状况和家系调查等方面的信息。对选定的长寿老人采集3~5ml肝素抗凝血和2ml EDTA抗凝血,常温下48h内送回实验室。(2)EB病毒上清的制备:EB病毒株(B95-8)用含20%胎牛血清的RPMI1640培养基在37℃,5%CO₂条件下饥饿培养1~2周后收集细胞,离心,2000r/min,10min。收集上清,0.22μm滤膜过滤。(3)永生转化实验:分别采用新鲜全血和冻存全血法进行,5人份肝素抗凝血样在采集后常温48h内送回实验室,每人份血样采用两线同时进行:取3ml立即以环孢素法进行永生细胞转化培养^[5,6];剩余血样添加10% DMSO冻存至液氮,1周后再以冻存全血法复苏转化^[7,8]。(4)转化细胞的冻存与复苏:转化细胞传代至3瓶时冻存种子细胞,冻存前1天更换新鲜培养液,将细胞以2000r/min,5min离心收集,加入含8% DMSO的小牛血清中,细胞浓度约(5~10)×10⁶/ml,至-80℃过夜后转至液氮保存^[5]。复苏时以37℃水浴快速解冻,传代培养。(5)细胞的HLA基因分型:转化前EDTA抗凝血的DNA提取方法为酚氯仿抽提法,培养后永生细胞株的DNA提取方法为TE试剂盒法。HLA的基因分型采用PCR-SSO荧光微珠流式杂交分型技术对HLA-A、B、DRB1位点进行分型检测。

结 果

实验共建成新疆和田地区长寿老人永生细胞5株,其中百岁老人2株,90~99岁3株,男性4株,女性1株。环孢菌素法成功5例,建株成功率100%;冻存全血法成功1例。环孢菌素法转化培养7天左右,倒置显微镜下观察可见细胞透明发亮,体积明显

增大,细胞外壁有不规则毛刺状突起,即为淋巴母细胞样B细胞;2周后,镜下可见转化细胞克隆明显增多(图1);1个月以后,细胞增殖旺盛,形成生长密集的大克隆,标志转化成功(图2)。冻存1周的5份血样中,仅1份血样转化获得成功,细胞在第2周时出现转化迹象。转化的B淋巴母细胞经扩增传代培养至第3代后冻存至液氮,每株冻存3支。所有建成的细胞株冻存后复苏的成功率为100%,经复苏传代扩增培养的细胞生长旺盛,细胞培养至第10代左右时经染色体G显带分析未见异常。对培养的永生细胞提取DNA,与转化前提取的DNA一同做HLA基因分型,二者结果完全一致,证明了转化的永生细胞保留了原有个体的完整基因组信息。

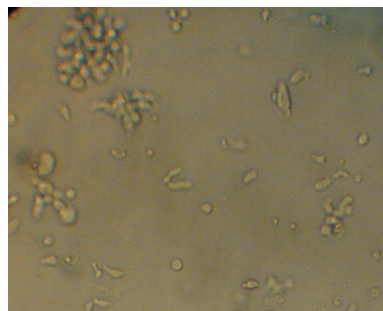


图1 倒置相差显微镜下转化初期的永生细胞(×100)

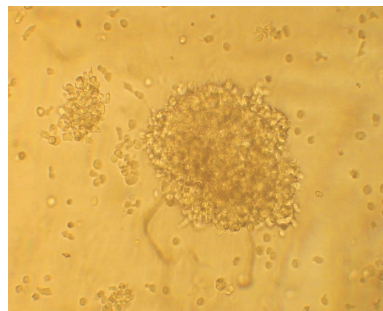


图2 1个月后的细胞团(×100)

讨 论

永生化是通过EB病毒在体外使B淋巴细胞获得无限传代的能力,可作为生物标本库建立的首选方法。成功转化后的B淋巴细胞,其形态学上有两个明显的特征,即淋巴细胞体积增大并永生化,进而增殖的淋巴细胞积聚成团,并且细胞冻存复苏后可培养和传代,其增殖活性不变,这些特点是转化成功的标志^[3]。

通过EB病毒感染转化B淋巴细胞存在个体差异,老年人细胞的永生转化效率要低于青壮年细胞。在对广西巴马长寿老人建立永生细胞株的研究

中,使用环孢素法转化长寿老人的细胞,出现转化迹象的时间要比青壮年晚 1 周,为 15 天左右,有时转化失败需要尝试再次加入 EB 病毒进行二次转化,转化成功率为 66.67% (24/36)^[9,10]。本项研究中,用环孢素法转化新疆长寿老人 B 淋巴细胞出现转化迹象的时间为 7 天左右,成功率为 100% (5/5),无需二次转化,与青壮年 B 淋巴细胞无差别。这可能与转化方法中使用的是未经反复冻融的 B95-8 细胞培养上清液,EB 病毒活性损失小、效价高有关^[11]。

目前我国 90 岁以上的长寿人口平均比例是 2/10 万,而新疆和田长寿比例为 67/10 万^[1]。随着长寿研究的深入,一般认为,遗传决定自然寿限,环境影响自然寿限的实现。近年来关于新疆和田老人长寿分子机制的研究已经取得一定进展。研究表明,和田地区长寿与非长寿家族寿命的长短可能与遗传背景产生的 DNA 损伤不同有一定的关系^[12];线粒体 DNA 5178A 和 10398G 等位基因、UCP2 基因启动子-866G/A 多态性与新疆维吾尔族长寿相关^[13,14]。APOB 等位基因 S 和基因型 SS 可能是维吾尔族自然长寿老人的危险因素,而等位基因 L 和基因型 LL 则是其保护因子^[15]。而未能证实 CETP 基因 D442G、TaqIB 及 I405V 基因多态性与维吾尔族自然长寿之间的关联性^[14,16]。更加深入的研究需要对健康长寿人群及对照组的遗传物质进行深入的实验室筛查和比较分析,此时来源稳定和充足的研究样本是必要条件,而长寿老人的血液样本属于不可再生的珍贵资源,建立永生细胞株可以很好地解决样本来源问题。

在大多数 EB 病毒转化的永生细胞系中,EBV 基因组似质粒一样以 500~800 拷贝存在于每个细胞中,形成的类淋巴母细胞株能在体外长期传代生长,且能保持较稳定的遗传学性状。目前的研究认为至少 20 代以前的类淋巴母细胞株能够保持供体原先的遗传性状,在染色体水平,细胞能保持二倍体核型且遵循正常细胞周期的激活程序,细胞因子白介素 6 可将其逆转生成终末分化的 B 细胞,与基因畸变导致的细胞异常增殖不同,此阶段的细胞无致癌性^[17]。若将一瓶细胞进行连续传代培养,在一定传代次数内维持细胞生长,一个培养物所提供的 DNA 资源可提供相当长的时间。

本实验建立的永生细胞株 HLA 基因 A、B、DRB1 位点分型结果与转化前完全一致,染色体核型分析未见异常,表明长寿老人永生细胞株保留了原有个体基因组的完整信息,可以为长寿分子机制研究提供大量

实验材料。接下来的工作是要完善永生细胞转化的实验方法,提高转化效率;收集大样本,包括当地非长寿家族人群样本,进一步补充和完善长寿老人的永生细胞库,建立新疆长寿老人永生细胞株与 DNA 样品库,为长寿遗传机制的研究提供永久的珍贵资料。

参考文献

- 1 刘汴生,沈凯,刘浩,等.中国百岁老人人口及地区动态分布[J].老年医学与保健,2003,9(1):525-532
- 2 Neitzel H. A routine method of the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines[J]. Hum Genet,1986,73:320-326
- 3 Tsuge I, Morishima T, Kimura H, *et al*. Impaired cytotoxic T lymphocyte response to Epstein-Barr virus infected NK cells in patients with severe chronic active EBV infection[J]. J Med Virol,2001,64(2):141-148
- 4 姜文锡,邱长春,程祖亨,等. APOB 基因 3 端短串联重复序列多态性与新疆维吾尔族自然长寿的关系[J]. 中华医学遗传学杂志,2006,23(5):523-527
- 5 孙凌,许群,程祖亨,等. CETP 基因 TaqIB 及 I405V 多态性与新疆维吾尔族自然长寿的关联[J]. 医学研究杂志,2007,36(11):27-30
- 6 孙玉萍,地力夏提·亚和甫,艾德儿,艾力阿有普,等. 和田地区维吾尔族长寿与非长寿家族 DNA 断裂水平研究[J]. 新疆医科大学学报,2005,28(1):33-37
- 7 穆叶赛·尼加提,邱长春,程祖亨,等. 线粒体 DNA 5178A/C、10398G/A 多态性与新疆长寿老人的关联研究[J]. 医学研究杂志,2008,37(6):18-22
- 8 孙凌,乌甫尔·玛依拉,方鸣武,等. 解偶联蛋白 2 基因多态性与维吾尔族自然长寿的关联研究[J]. 医学研究杂志,2010,39(3):22-25
- 9 孙凌,许群,程祖亨,等. 胆固醇酯转运蛋白基因 D442G 多态性与维吾尔族自然长寿的关联[J]. 医学研究杂志,2007,36(10):14-16
- 10 郑陈光,龙桂芳,杨泽,等. 广西巴马长寿乡壮族长寿老人永生细胞库的建立[J]. 广西医科大学学报,2003,20(1):5-6
- 11 史晓红,杨泽,孙玉茹,等. 长寿老人永生细胞库的建立与保存[J]. 中国老年学杂志,2003,23(2):74-76
- 12 赵苏瑛. 遗传非综合征耳聋大家系永生细胞系的建立及几种 EB 病毒转化外周血淋巴细胞建系方法的探讨[J]. 遗传,2005,27(3):447-450
- 13 赵迪诚,黄芬,吴国佩. 人类淋巴母细胞建株方法的改进[J]. 中国医师杂志,2007,9(5):704
- 14 郝友华,叶笛,吴雄文,等. EB 病毒转化 B 淋巴细胞影响因素的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2007,9(5):80
- 15 黄小义,刘岸,于吻,等. 中国 10 个民族永生细胞系的建立与保存[J]. 遗传,2002,24(6):643-645
- 16 杨宝珍,魏军,王利新,等. 脑海绵状血管瘤家系永生细胞株的建立[J]. 中华医学遗传学杂志,2007,24(1):107-108
- 17 张彦,冯哲玲,熊建军,等. EB 病毒相关淋巴母细胞样细胞系的建立及鉴定[J]. 分子诊断与治疗杂志,2010,2(1):31-34

(收稿:2011-01-12)

(修回:2011-01-24)