中国药理学通报, 2000, 16(6): 673-675.
[2] 孟德胜, 汪仕良. 槲皮素及其苷类研究进展[J]. 中国药房, 2000, 11(5): 232-233.
[3] Kalkbrenner F, Wurm G, Bruchhausen F. *In vitro* inhibition and stimulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: structure-activity relationship[J]. Pharmacology, 1992, 44(1): 1-12
[4] Morita I, Smith W L, DeWitt D L, *et al*. Expression-activity profiles of cells transfected with prostaglandin endoperoxide H synthase measured by quantitative fluorescence microscopy[J]. Biochemistry, 1995, 34(21): 7194-7199.
[5] Geraldo J, Ferraz P, Wallace J L, *et al*. Prostaglandins modulate the responsiveness of the gastric microcirculation of sodium nitroprusside in cirrhotic[J]. Hepatology, 1996, 23(10): 123-129.
[6] Hirata T, Ukawa H, Yamakuni H, *et al*. Cyclo-oxygenase isozymes in mucosal ulcerogenic and functional responses following barrier disruption in rat stomachs[J]. Bri J Pharmacol, 1997, 122(3): 447-454.
[7] Swies J, Robak J, Dabrowski L, *et al*. Antiaggregatory effects of flavonoids *in vivo* and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase *in vitro*[J]. Pol J Pharmacol Pharm, 1984, 36(5): 455-463.

(编辑 张 宁)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)15-1348-02

中国海南黎族永生B细胞系的建立与保存

Establishment and preservation of permanent growing B cell line of Li nationality in Hainan province of China

李冬娜[1], 应大君[1], 区采莹[2], 符生苗[3], 褚 嘉[4], 薛雅丽[5], 黄小义[5] ([1] 第三军医大学基础医学部解剖学教研室, 重庆 400038; [2] 海南医学院, 海口 571101; [3] 海南省人民医院遗传研究室, 海口 570311; [4] 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118; [5] 哈尔滨医科大学遗传学教研室, 哈尔滨 150086)

继人类基因组计划之后, 人类基因组多样性计划(Human Genome Diversity Project, HGDP)已成为世界科学研究的热点之一。从世界各地采集不同人群的标本并建立永生细胞系, 是HGDP的重要内容[1~3]。黎族是中华民族的重要成员, 集居海南岛。语言属汉藏语系壮侗语族黎语支。根据方言、文化特征及人种学上的差异, 又分为侗孝黎、杞黎、本地黎、美孚黎和加茂黎五个支系[4]。由海南省特殊地理环境和历史所铸就的黎族基因组, 必将成为我国进行HGDP研究, 构造遗传资源中心的重要信息来源。本研究成功地对中国海南省侗孝黎、杞黎、本地黎的部分个体建立了永生B细胞系。

1 材料和方法

根据国家建库标准规定: 选择具有代表性的民族聚集区, 采集3代无与不同民族通婚史的健康人标本, 建成30~50个细胞株, 男女各1/2, 我们对采样地点和采样对象作了严格选择。

1.1 研究对象

经考察, 分别在侗孝黎、杞黎和本地黎的集居地。海南省乐东黎族自治县千家镇、五指山市毛阳镇、白沙黎族自治县南开乡[5], 对4代无与不同民族和不同支系通婚史的自愿献血黎胞进行身体检查, 筛除异常者。采用健康人静脉血5 ml建株。

1.2 建立永生细胞株

采用EB病毒(Epstein-barr virus, EBV)转化外周血B淋巴细胞(B-cell, BLC), 并加入环胞霉素A抑制T淋巴细胞(T-cell, TLC)建立永生细胞系[6]。取5 ml肝素抗凝的外周血, 加洗涤液(含1%双抗的RPMI1640)2 ml混匀后, 缓慢注入淋巴细胞分离液中, 3 000 r/min离20 min。移出白细胞层, 加入10 ml洗涤液洗2次, 离心弃上清。然后依次加入2 ml RPMI1640完全培养液(含20%胎牛血清、80% RPMI1640、1.6%1 mol/L Heps、1.2%谷氨酰胺、0.5% PHA); 1.2 ml EBV悬液(取自B958细胞系经1周培养, 并经反复冻融3次的上清液, 经0.22 μm滤器过滤), 打匀后加入0.4 ml 120 μg/ml环胞霉素, 混匀后分别接种于10 ml培养瓶内, 置37 ℃ CO_2培养箱培养。静止培养4 d后, 开始观察, 视细胞转化和聚集状况及培养液pH的改变, 进行半量换液, 并维持环胞霉素的浓度, 待转化的淋巴细胞明显增多、增大, 同时在显微镜下观察可见大量贴壁的呈聚集生长的细胞团, 即可转瓶。转瓶后可观察到胞质突出、形态各异、聚集成团的细胞株。以后3 d观察1次, 视细胞生长状况和pH的改变决定是否换液。一般传代4~5次, 待细胞数量达到3.6×10^6 ml时, 在完成染色体核性分析后, 大部分细胞可进行第1次冻存。细胞株在冻存的前1 d, 必须进行半量换液或补充新的培养液, 换液24 h左右, 将细胞以1 500 r/min离心10 min, 弃上清。根据细胞量加入预冷的冻存液(95%胎牛血清, 5%二甲亚砜), 打匀后分装于1 ml冻存管中并立即放入-70 ℃冰箱, 冻存24 h后, 放入液氮中保存。

1.3 染色体核性分析

从培养的淋巴细胞株中取5 ml细胞培养液, 培养48 h, 加入秋水仙素(0.4 μg/ml), 继续培养2 h后, 按常规方法[7]进行细胞学处理、制片、G显带及核性分析。

(下转1351页)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39960033)
作者简介: 李冬娜(1955-), 女, 吉林省四平市人, 博士研究生, 副教授, 主要从事人类基因组多态性方面的研究。电话: (023)68752225
收稿日期: 2002-07-28; 修回日期: 2002-09-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

程度上可满足神经再生的需要。但是，外源性 sNGF 应用到体内后，受影响因素较多，其生物学效应的维持与给药剂量有一定的关系。尤其是蛇毒 NGF，其剂量与效应的关系还不是很明确。国内郝文学[5]检测了江浙蝮蛇毒 NGF 的生物活性，结果表明不同浓度的蛇毒 NGF 均能刺激鸡胚背根神经节的生长，其浓度仅在 0.2 μg/ml 即可引起最大的生物学效应。尹维田等[6]对 11 例前臂及碗部神经断裂采用了模拟神经再生室的小间静脉桥接法，室内一次性注入 2 000 U 的蝮蛇毒 NGF，外源性提高再生室内 NGF 的浓度，经 1 年的随访观察，表明蝮蛇毒 NGF 一次性给药，可促进神经再生。王子明等[7]采用坐骨神经半切模型，靶器官分别注射 sNGF 300、900、2 700 U，连续注射 10 d，结果表明，各剂量组均能促进神经再生，但各剂量组之间无显著差异。本实验各用药组与对照组均有明显差异，但低剂量组与中、高剂量组亦有明显差异，中、高剂量组间无差异。表明中剂量 900 U 即可满足神经再生的需要，再加大剂量已无必要。这与王子明等的结果不同，可能与所用模型不同有关。总之，由于神经损伤修复是个复杂的过程，体内影响因素较多，因此，具体的最佳用药方式及用药剂量有待更进一步的研究。

参考文献：

[1] 陈恒胜，伍亚民，廖维宏. 蛇毒神经生长因子对大鼠坐骨神经损伤修复作用的实验研究[J]. 创伤外科杂志 2002, 4(2): 97－99.

[2] 王民生，陈中伟，张光键，等. 神经生长因子(NGF)促进挤压伤坐骨神经再生[J]. 中华骨科杂志 1996, 16(3): 166－168.

[3] Pang Q J, Luo Y X, Wu Y G, *et al*. Experimental studies on peripheral nerve regeneration enhanced by nerve growth factor[J]. J Tongji Med Univ, 1993, 13(1): 34－39.

[4] Heumann R, Miller M S. Changes of nerve transection[J]. J Cell Biol, 1987, 104(6): 1623－1631.

[5] 郝文学. 血栓与抗栓酶[M]. 沈阳: 沈阳出版社, 1992. 635－640.

[6] 尹维田，潘　清，崔树森，等. 神经生长因子促进周围神经再生临床应用初步报告[J]. 中华手外科杂志, 1997, 13(1): 6－8.

[7] 王子明，杨恒文，李　芳，等. 神经生长因子对大鼠坐骨神经半切损伤后的作用观察[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(2): 150－152.

（编辑　郭建秀）

（上接 1348 页）

1.4　永生细胞株的复苏

迅速将冻存管放入 37 ℃水浴，不停振荡，见 1/2～1/3 融化时，在无菌超净台将细胞吸入已经放有 5 ml 全培养液的 10 ml 培养瓶中，37 ℃培养，24 h 后观察，视具体情况加液或换液或分瓶。

2　结果与讨论

采用上述方法，我们成功的建立了含 3 个黎族主要支系的永生细胞库。其中仔孝黎永生细胞系 66 株，男性占 56%，女性占 44%；杞黎永生细胞系 76 株，男性占 55.26%，女性占 44.74%；本地黎 54 株，男性占 56%，女性占 44%。应用 EB 病毒转化外周血 B 淋巴细胞加环胞霉素 A 法建立永生细胞系，可以永久的保存有重要研究价值的个体基因组。该方法与其它方法相比，所需时间短，成功率高，环胞霉素 A 的作用是特异性的抑制 TLC 中的 RNA 聚合酶Ⅱ，因而使 TCL 失去对 EB 病毒的免疫监视作用，从而阻止了 TLC 对 BLC 的杀伤作用。国内外报道用该方法建立永生细胞系的成功率可达 70%～100%[6-8]。我们在 3 个黎族亚系永生细胞库的建立过程中，建株成功率分别达到 97%(仔孝黎)、95%(杞黎)和 85%(本地黎)，取得满意可靠的结果。已成功建立的永生细胞株经冻存后复苏的成功率均达到 100%，同时经染色体 G 显带分析未见异常。我们还对所有细胞株的提供者及细胞转化程序建立了系统的档案。

永生细胞株可以随时用于对人类基因组多样性的研究[3]，是认识人类进化、种族血缘、衍变以及生老病死等生命活动的先决条件，是战胜疾病克服生存障碍的永恒财富。3 个黎族主要支系(占黎族总人口 88%)的永生细胞库，是在海南经济迅速发展，各民族与隔离群由于基因漂移，融合加速，遗传多样性逐步消失的边缘获得的。它使黎族独特的基因组得到系统地、永久地保存。为今后深入研究黎族的基因结构，全面了解致病基因和易感基因在黎族人群中的分布以及揭示黎族的源与流和各支系之间的关系提供了永久性的资料。

关键词：永生细胞系；少数民族；EB 病毒

中图法分类号：R329.2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Schull W J. Genetic Diversity survey[J]. Science, 1998, 279(5347): 14.

[2] Pennisi E. NRC OKs Long-delayed survey of human genome diversity[J]. Science, 1997, 278(5338): 568.

[3] 许丽萍，杜若甫. 人类基因组多样性计划的新动态[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(2): 108－110.

[4] 杜若甫. 中国的少数民族[M]. 北京：科学出版社, 1994. 29.

[5] Neitzel H A. A routine method of establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines[J]. Hum Genet, 1986, 73(4): 320－326.

[6] 王建中，刘耀荃. 海南岛黎族社会调查(上卷)[M]. 广西：广西民族出版社, 1992. 11－12.

[7] 夏家辉，李麓芸. 染色体病[M]. 北京：科学出版社, 1989. 15.

[8] Pelloquin F, Lamelin J P, Lenoir G M. Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A[J]. *In Vitro* Cell Dve Biol, 1986, 22(12): 689－694.

（编辑　张　宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net