

建立人类异常染色体核型的成纤维细胞系及滋养层细胞系

蒋永华 孙筱放* 郑育红 李少英 刘维强 潘倩莹

(广州医学院第三附属医院, 广州市生殖与遗传重点实验室, 广州 510150)

摘要 从自然流产绒毛或者中期妊娠羊水中分离细胞体外培养, 建立人类异常染色体核型成纤维细胞系及滋养层细胞系。中期妊娠羊水染色体诊断或自然流产绒毛染色体诊断过程中, 行G显带细胞核型分型, 对于发现异常核型的细胞, 进行分离、培养、传代、冻存、复苏及鉴定, 建立细胞系, 用PowerPlex 16系统行DNA-STR基因型检测。建立1株来自羊水的21三体成纤维细胞系, 以及7株来自绒毛的滋养层细胞系, 核型分别为47, XX+21; 69, XXX; 69, XXY; 47, XY+12; 47, XX+5; 48, XY+21, 22; 47, XY+18。所有细胞系体外传代均超过10代, 冷冻复苏率大于50%, 核型维持稳定, DNA-STR基因检测能对人细胞系进行个体识别。人异常染色体核型的成纤维细胞系和绒毛膜滋养层细胞系的建立, 可以为探讨异常染色体产生机制及相关的分子遗传学研究提供细胞来源。

关键词 染色体; 成纤维细胞; 滋养层细胞; 短串联重复序列

异常染色体核型是临床妊娠早期流产的主要原因, 常见的染色体异常种类有三体或者三倍体核型, 染色体异常的胎儿75%会在妊娠早期自然流产, 后期以13、18、21号及性别染色体数目异常多见^[1,2]。异常染色体儿有生长迟缓、智力障碍等缺陷。目前对于生殖细胞减数分裂致染色体异常的机制缺乏深入了解, 因此本试验希望通过异常核型成纤维细胞系和绒毛膜细胞滋养层细胞系, 为探讨异常染色体的产生机制研究提供细胞平台, 同时也为分子生物学快速染色体异常诊断方法的建立提供检测的细胞标本。

短串联重复序列(short tandem repeat, STR)又名微卫星序列, 为广泛分布于不同染色体上的一些简单序列(多为3~7 bp)重复排列而成, 广泛存在于人类基因组中, 具有高度多态性杂合性和稳定性, 当把几个STR位点联合分析后, 可以得到相当高的累积个体识别率和父权排除率, 在个体识别, 亲权鉴定中广泛的应用^[3,4]。近年来细胞系的建立成为热点, 涉及知识产权问题、知情同意及相关伦理问题等, 因此STR-DNA序列分析也越来越多的应用在细胞建株的识别上^[5,6]。

1 材料与方法

1.1 对象

2004年1月~2007年7月, 广州医学院第三附属医院, 妊娠16~22周进行羊水染色体诊断的胎儿, 抽

取羊水进行细胞培养, 或妊娠8~11周胚胎停育的胎儿, 经阴道负压吸引流产, 分离绒毛进行滋养层细胞培养, 所有病例标本的获取均对胎儿父母双方进行知情同意口头及书面知情同意说明, 签署知情同意书。

1.2 培养液和仪器

细胞培养液: aminomax-II、PBS、胰蛋白酶、胶原酶I, 非必需氨基酸、青霉素/链霉素购自Gibco公司; 培养瓶为Corning公司产品; CO₂培养箱为Here Cell公司产品; 培养条件37℃、100%湿度、5%CO₂。

1.3 胎儿羊水成纤维细胞培养

经临床诊疗需要进行羊水染色体诊断的胎儿, 经B超介导下进行羊膜腔穿刺, 确认穿入羊膜腔后, 抽取20 ml羊水, 分别注入2个10 ml无菌离心管内离心, 1000 r/min, 5 min, 吸弃上清液, 留0.5 ml制成细胞混悬液, 采用本实验室常规的原瓶传代培养^[7], 分别接种到2个培养瓶, 7天后首次传代换液, 细胞生长满瓶后按1:3传代。

1.4 人绒毛膜滋养层细胞的培养

取妊娠6~10周自然流产绒毛组织, 在无菌超净台内用无血清的PBS培养液冲洗3次, 挑选绒毛,

收稿日期: 2007-11-26 接受日期: 2008-03-20

广东省科技厅重大攻关课题(No.B30202)和广州市科技局科技攻关计划重大项目(No.2006Z1-E0021)资助

* 通讯作者。Tel: 020-81292202, Fax: 020-81292013, E-mail: xiaofangsun@hotmail.com

0.25% 胰蛋白酶在 37 °C 水浴下消化 10 min, 0.1% 胶原酶 II 37 °C 消化 10 min, 倒置显微镜下见细胞脱落, 冲洗组织后, 去除未消化组织, 将细胞悬液离心, 1 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 培养液混匀, 分别接种到 2 个培养瓶, 3 天后首次传代换液, 细胞生长满瓶后按 1 : 2 传代。

1.5 细胞系冻存和复苏

将接近长满细胞的培养液吸弃, 0.05% 胰蛋白酶消化, 离心收集细胞, 冷冻液为 90% 培养液 + 10% DMSO, 分装入冻存管中, 4 °C 冰箱中 30 min, -80 °C 冰箱中 24 h 后投入液氮中。复苏则将冻存管迅速投入 37 °C 水浴中, 离心收集细胞, 接种至培养皿中。

1.6 染色体核型鉴定

取生长旺盛的细胞, 0.25 μg/ml 秋水仙素作用 4 h, 0.05% 胰蛋白酶消化细胞, 收集入离心管, 1 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 37 °C 水浴低渗 5 min, 固定液(甲醛:冰醋酸=3:1)预固定, 1 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 加固定液 4 ml, 室温固定 40 min, 1 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 加固定液 2 ml, 再固定 20 min, 1 000 r/min, 5 min, 去上清液, 留液体约 0.3 ml, 打匀, 滴片, 将玻片放 65 °C 烤箱过夜, 0.8% 胰蛋白酶消化玻片 15~30 s, 吉姆萨(Giemsa)染色 10 min, 自然风干, 镜下观察计数分散良好的中期分裂相 20 个, 分析 5 个, 显微摄影留档。

1.7 细胞生长曲线

将第 3 代细胞制备单细胞悬液, 接种于 24 孔培养板中, 每孔为 1×10^4 个, 从第 2 天起, 每隔 24 h 取 3 孔用一般消化法消化, 计数 3 孔的细胞数, 取其平均值为当天的细胞数, 绘制细胞生长曲线

1.8 绒毛膜滋养层细胞免疫荧光染色

一抗分别为小鼠抗人角蛋白抗体和小鼠抗人波形蛋白抗体, 二抗 Cy3 羊抗小鼠 IgG (博士德)。取对数生长期细胞, 4% 的多聚甲醛固定, 4% 羊血清 PBS 封闭, 一抗温育 1 h, 加入二抗, 温育 1 h, 加入 H33342 进行细胞核复染, 荧光显微镜观察。

1.9 细胞系的 DNA-STR 序列鉴定

1.9.1 样本处理 取生长旺盛的细胞, 弃培养液, PBS 漂洗一次, 0.05% 胰蛋白酶消化, 收集细胞, 离心 1 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 底部的细胞用于 DNA 提取和 PCR 分析。样本均按 Qiagen 试剂(德国)说明书的方法提取 DNA。所提取的 DNA 均用紫外分光光度仪测 A_{280} 及 A_{260} 值以确定浓度和纯度。

1.9.2 PCR 扩增反应 采用 PowerPlex® 16 系

表 1 16 个 STR 基因座对应的染色体位置

基因座名称	染色体位置
Penta E	15q
D18S51	18q21.3
D21S11	21q11-21q21
TH01	11p15.5
D3S1358	3p
FGA	4q28
TPOX	2p23-2pter
D8S1179	8q
vWA	12p12-pter
Amelogenin	Xp22.1-22.3 和 Y
Penta D	21q
CSF1PO	5q33.3-34
D16S539	16q24-qter
D7S820	7q11.21-22
D13S317	13q22-q31
D5S818	5q23.3-32

统(Promega), STR 基因座 16 个: D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, amelogenin, vWA, D8S1179, TPOX, FGA。基因座对应染色体位置见表 1。其中 Penta E、D18S51、D21S11、TH01 和 D3S1358 的引物用荧光素(FL)标记; FGA、TPOX、D8S1179、vWA、amelogenin 的引物用羧基一四甲基罗丹明(TMR)标记; Penta D、CSF1PO、D16S539、D7S820、D13S317 和 D5S818 的引物用 6-羧基 4,5-双氧-2',7'-双甲基荧光素(JOE)标记。每个反应体系总体积均为 25 μl, 包括 2~40 ngDNA 模板, 5~20 pmol 引物, 2 U Taq DNA 聚合酶, 215 μl 10× 缓冲液, 115 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP。PCR 循环条件如下: 95 °C 预变性 11 min, 94 °C 变性 1 min, 59 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 进行 32 个循环, 最后在 60 °C 下延伸 60 min。

1.9.3 PCR 产物的检测 1 μl PCR 产物与 10 μl HIDITTM、0.15 μl Internal Lane Standard 600 混合, 95 °C 变性 5 min, 立即冰浴 5 min, 将待测管放入 ABI 3100 遗传分析仪, 自动上样, POP-4TM 凝胶电泳 30 min, Genescan 311 软件进行定量分析。

2 结果

2.1 胎儿羊水成纤维细胞的分离、培养

羊水细胞接种后 5 天观察, 可见贴壁的成纤维细胞, 细胞形态纤长, 也可见少量不规则的多边形上皮样细胞生长, 7 天后换液, 10~14 天细胞满瓶, 传代后

上皮细胞自然死亡。

2.2 人绒毛膜滋养层细胞培养的生长状况及形态学观察

绒毛膜滋养层细胞呈上皮细胞样生长, 细胞体积大, 胞浆丰富, 核大卵圆形, 生长旺盛, 3~5 天左右首次传代, 每 2~3 天按 1:2 传代 1 次。

2.3 细胞生长曲线

羊水细胞 2 天就进入对数增长期, 5~6 天达到平台期。绒毛膜滋养层细胞同样也是 2 天就进入对数增长期, 但是生长速度较快, 4~5 天达到平台期。2 种不同来源的细胞均随着传代的增加, 其增殖能力开始减弱, 生长曲线呈 S 形(图 1)。

2.4 细胞的传代、冷冻、复苏

所有细胞系解冻后均能在 24 h 内即可完全贴壁, 繁殖迅速, 3~4 天传代一次, 细胞系之间在形态无明显差异, 一般可以传代 10~20 后(因细胞系的不同而异), 出现细胞生长速度减慢, 细胞核明显突出, 细胞自然死亡。

2.5 染色体核型分析

建立 1 株来自羊水的 21 三体成纤维细胞系, 建立了 7 株来自绒毛的三倍体或非整倍体绒毛膜滋养层细胞系, 核型分别 47, XX+21; 69, XXX; 69, XXY; 47, XY+12; 47, XX+5; 48, XY+21, 22; 47, XY+18, 细胞系命名, 来源及核型见表 2。

各个细胞系冷冻传代后, 5 代后重复一次核型检查, 核型维持与原代一致, 未发现异常改变。

2.6 绒毛膜滋养层细胞免疫荧光染色

染色成功, 所有细胞核均受 H33342 染色, 着蓝色荧光, 角蛋白染色阳性, 细胞质着红色荧光, 未发现波形蛋白染色(图 2), 表明培养的人绒毛膜滋养层细胞纯度超过 99%。

2.7 细胞系的 DNA-STR 序列鉴定

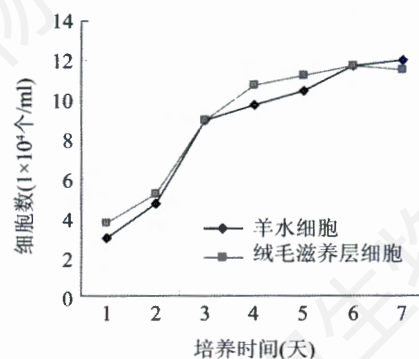


图 1 成纤维细胞及滋养层细胞的生长曲线

8 个细胞系 16 个基因位点均出现峰, 表明试验成功, 每个细胞均具有自己的个体识别序列(表 2)。其中 21 三体细胞系 ane-21-w、fy-ane-21-x 在 21 号染色体 D21S11 和 Penta D 出现了 2:1 或者 1:1:1 的峰, 其余位点正常单峰或者为 1:1 的峰形, STR 提示为 21 三体。三倍体细胞系 fy-tri-ou, 性染色体基因座见 X 峰, 无 Y 峰, TH01, D16S539, FGA 位点峰为 2:1, 其余位点均为 1:1:1, 提示为 XXX 的三倍体, 另一株三倍体细胞系 fy-tri-l, 性染色体基因座, 同时出现 X 和 Y 峰, X 峰为 Y 峰的 2 倍, 在 TH01, FGA, vWA 位点出现 1:1:1 的峰, 其余基因位点峰形为 2:1, 提示为 XXY 核型的三倍体。fy-ane-12-w, 12 号染色体基因座 vWA 出现 1:1:1 的峰, 余位点未发现异常, 提示为 12 三体。fy-ane-5-x 细胞系在 5 号染色体基因座 D5S818 出现 2:1 的峰形, 其余位点正常单峰或者为 1:1 的峰形, 提示该细胞系为 5 三体。fy-ane-21-22-ch, 在 21 号染色体的 D21S11, Penta D 基因座分别出现 1:1:1 及 2:1 的峰形, 提示该细胞系为 21 三体, 由于本实验采用的 16 个 STR 基因座位点无 22 号染色体位点, 所以其 22 染色体三体核型在 STR 图形上无显示。fy-ane-18-d 在 18

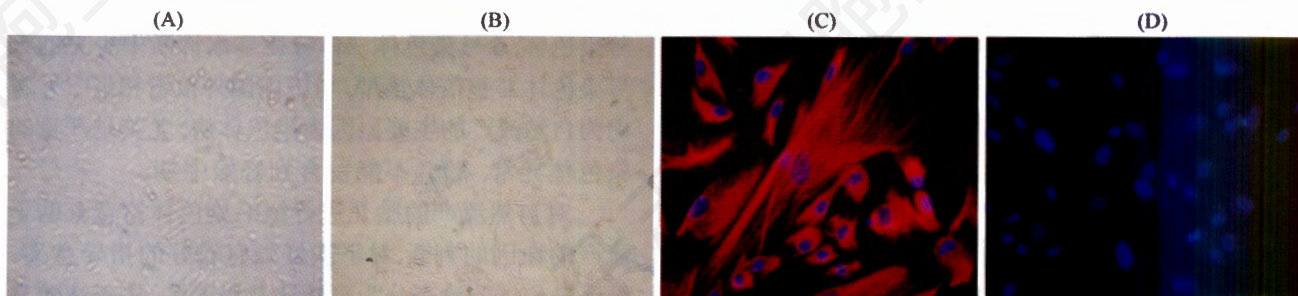


图 2 羊水细胞及绒毛膜滋养层细胞显微镜下形态学观察及免疫荧光染色

A: 羊水细胞(10 \times), 培养 7 天; B: 绒毛膜滋养层细胞(20 \times); C: 滋养层细胞角, 蛋白质染色阳性, 细胞质红色荧光, 细胞核蓝色荧光(20 \times); D: 滋养层细胞, 波形蛋白染色阴性, 细胞质不着色, 仅见细胞核着蓝色荧光(20 \times)。

表2 非整倍体及三倍体细胞系概况

细胞系	核型	来源	STR 异常位点及其染色体位置	STR 图像
ane-21-w	47, XY+21	羊水	21 号, D21S11 (2:1), Penta D (1:1:1)	
fy-ane-21-x	47, XX+21	绒毛	21 号, D21S11 (1:1:1), Penta D(1:1:1)	
fy-tri-ou	69, XXX	绒毛	Amelogenin, X 峰, 其余所有位点均为 1:1:1 或 2:1 的峰	
fy-tri-l	69, XXY	绒毛	Amelogenin, X:Y (2:1)峰, 其余所有位点均为 1:1:1 或 2:1 的峰	
fy-ane-12-w	47, XY+12	绒毛	12 号, vWA (1:1:1)	
fy-ane-5-x	47, XX+5	绒毛	5 号, D5S818 (2:1)	
fy-ane-21-22-ch	48, XY+21, 22	绒毛	21 号, D21S11 (1:1:1), Penta D (2:1)	
fy-ane-18-d	47, XY+18	绒毛	18 号, D18S51 (2:1)	

号染色体基因座 D18S51 上显示为 2:1 的峰形, 其余位点未发现, 提示为 18 三体。

3 讨论

3.1 胚胎细胞非整倍体及三倍体发生的比例

2002 年~2004 年, 本院 638 例中期羊水染色体检查, 发现 28 例异常染色体, 其中 21 三体 2 例, 18 三体 3 例, 部分 21 三体 1 例, 异位 5 例, 倒位 8 例, 嵌合 4 例^[8]。在 2007 年我院开展了的绒毛染色体培养核型分析, 在 6~7 月 2 个月共行 35 例自然流产及胚胎停育的绒毛染色体检查, 2 例因标本污染培养失败,

培养成功率 94.2%, 其中染色体异常率为 56%, 染色体异常以三倍体, 染色体数目异常为主, 并且出现 2 号染色体, 5 号染色体三体等在羊水诊断中少见的大号染色体非整倍体核型, 与国内国外报道相近^[9,10], 考虑为自然流产的主要原因为染色体病, 尤其是严重的染色体异常, 胎儿不能发育到妊娠中期。

对自然流产的胎儿进行绒毛染色体检查有助于流产的原因的判断, 对下次妊娠有较好的指导意义。绒毛染色体的检查分为直接法及培养法, 培养法较直接法更容易获得分裂像, 染色体形态好, 利于观察及诊断^[11]。本试验采用原瓶传代法进行培养(待

发表), 不仅可以完成染色体分析, 还可以利用原代滋养层细胞进行传代、冷冻复苏等操作, 建立细胞系, 为以后进一步实验提供充足的细胞来源。

3.2 细胞系进行 STR-DNA 序列鉴定的意义

STR 广泛存在于人类基因组中, 具有高度多态性、杂合性和稳定性。当把几个 STR 位点联合分析后, 可以得到相当高的累积个体识别率和父权排除率, 可以作为不同个体的遗传身份识别, 美国 FBI 推荐的 13 个 STR 基因位点联合检测^[12], 它的 13 个位点为 D3S1358、TH01、D21S11、D18S51、D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、CSF1PO、vWA、D8S1179、TPOX、FGA, 两个无关人群的偶合几率 (PM) 达到 10^{-15} , 本试验除了使用其推荐的 13 个位点以外, 还增加了 Penta E 和 Penta D 及性别位点 amelogenin。因此可以作为人类细胞的有效个体识别手段, 区分不同实验室, 不同时期所建立的细胞。

又由于 STR 的其多态性来源于串联片段重复数量的变化, 因此可以用来是定量检测染色体数目异常^[13,14], 正常的二倍体样本应该出现比率近 1:1 的两个峰或单个纯合峰, 三倍体样本再相应的基因位点的会出现了比率近 2:1 或 1:1:1 的峰^[15,16], 因此我们可以从 STR 采用的基因座不同的染色体位置, 初步判断染色体有无异常, 例如 21 三体细胞系 ane-21-w、fy-ane-21-x 在 21 号染色体 D21S11 和 Penta D 出现了 2:1 或者 1:1:1 的峰, 其余位点正常单峰或者为 1:1 的峰形, 而三倍体的细胞系 fy-tri-ou、fy-tri-l 16 个基因位点几乎都出现了比率近 2:1 或 1:1:1 的峰(表 2)。因此从细胞系的 STR 序列上, 不仅进行个体识别, 还可以初步了解细胞的非整倍体或者三倍体信息。

3.3 建立胎儿非整倍体及三倍体细胞库的意义

3.3.1 非整倍体的起源、细胞分子生物学机制的研究

生殖细胞非整倍体的发生机制目前还不是十分清楚, 可能是同源重组减少^[17,18], 或周期异常导致减数分裂染色体不分离^[19,20], 利用染色体异常的成纤维细胞系及滋养层细胞系进行染色体数目异常细胞的起源、命运决定及其生物学机制和发生发展机制研究, 探讨异常染色体产生机制, 有利于人类优生遗传的建设。

3.3.2 快速诊断的分子遗传学技术妊娠染色体病的诊断的研究 传统的细胞遗传学核型分析以其可靠性和检测范围广, 被誉为染色体产前诊断“金标准”, 但长达 2 周的培养时间、技术和样本水平上

的高要求等缺陷限制了其在产前诊断上的广泛应用, 因此, 发展与普及快速、准确、便宜、简单的产前诊断方法十分必要, 近年来发展了许多快速诊断的分子遗传学技术应用于妊娠染色体病的诊断, 包括: 荧光原位杂交技术 (FISH)^[21]、引物原位标记技术 (PRINS)^[22]、同源基因定量 PCR (HGQ2PCR)^[23]、实时定量 PCR (real time PCR)^[24,25] 等, 但是目前这些技术尚未能替代传统的细胞遗传学核型分析, 还需要进一步研究探索。本实验室在进行 STR-PCR 在常见三体及性别快速产前诊断中的应用研究中出现染色体已知样本获取困难, 因为除 21 三体患儿可以生存外, 一般出生后死亡, 所有不容易获得除 21 三体以外的其他染色体病的已知样本, 但是人类除 1 号染色体三体未被发现外, 其余三体均有发现, 早期妊娠流产染色体异常原因占 50%~60%, 中期妊娠常见的染色体异常有 13, 18, 21 三体, 因此我们感觉非常珍惜和保护我们在产前诊断中有染色体病的细胞资源, 对有异常的非整倍体或三体等细胞进行培养、传代等, 建立细胞库, 完善细胞档案, 以方便对建立相关的分子生物学快速诊断方法的试验的建立提供检测标本, 或者可以利用已建立细胞系对新建立的该诊断方法的准确性进行测试或者质量控制。

参考文献 (References)

- [1] Newberger DS. *Am Fam Physician*, 2000, **62**: 825
- [2] Connor M. *BMJ*, 1993, **306**: 1705
- [3] Edwards A et al. *Am J Hum Genet*, 1991, **49**: 746
- [4] Rerkamnuaychoke B et al. *Forensic Sci Int*, 2006, **158**: 234
- [5] Mandal A et al. *Differentiation*, 2006, **74**: 81
- [6] Josephson R et al. *BMC Biol*, 2006, **4**: 28
- [7] The Utah Marker Development Group. *Am J Hum Genet*, 1995, **57**: 619
- [8] Hulten MA et al. *Reproduction*, 2003, **126**: 279
- [9] 郑育红等. *中国优生与遗传杂志*, 2002, **10**: 58
- [10] 郑育红等. *中国妇幼保健*, 2007, **22**: 215
- [11] 易翠兴等. *中国优生与遗传杂志*, 2007, **15**: 41
- [12] Greenwold N et al. *Hum Reprod*, 2002, **17**: 452
- [13] Yusuf RZ et al. *Early Pregnancy*, 2001, **5**: 121
- [14] Hoyle R. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 987
- [15] Wang S et al. *Chin Med J (Engl)*, 2003, **116**: 1773
- [16] Mann K et al. *Lancet*, 2001, **358**: 1057
- [17] Shi Q et al. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, **90**: 219
- [18] Shi Q et al. *Am J Hum Genet*, 2002, **71**: 254
- [19] Schnippenkoetter WH et al. *J Gen Virol*, 2001, **82**: 3081
- [20] Shi Q et al. *Mutagenesis*, 1998, **13**: 409
- [21] Kuo WL et al. *Am J Hum Genet*, 1991, **49**: 112
- [22] Li F et al. *Chin Med J (Engl)*, 1999, **112**: 840
- [23] Lee HH et al. *Hum Genet*, 1997, **99**: 364
- [24] Yang YH et al. *Yonsei Med J*, 2005, **46**: 193
- [25] Zimmermann B et al. *Clin Chem*, 2002, **48**: 362

Establishment of Human Fibroblast and Trophoblast Cell Lines with Abnormal Karyotypes

Yong-Hua Jiang, Xiao-Fang Sun*, Yu-Hong Zheng, Shao-Yin Li, Wei-Qiang Liu, Qian-Yin Pan

(The Key Laboratory of Reproduction and Genetics of Guangzhou, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China)

Abstract To establish human fibroblast and trophoblast cell lines by using abnormal karyotypes of cells isolated from the fetus amniotic fluid and chorionic villus. Fibroblast and trophoblast cells were obtained from fetus amniotic fluid or chorionic villus that was used for chromosome analysis. Only cells with abnormal karyotypes identified by G band were further cultured. Cell types in each cell line were identified by immunocytochemistry, PowerPlex 16 System Kit and DNA-STR. As results, a 21 trisome cell line from amniotic fluid and 7 trophoblast cell lines from chorionic villus were established. The karyotypes of these cell lines were 47, XX+21; 69, XXX; 69, XXY; 47, XY+12; 47, XX+5; 48, XY+21, 22 and 47, XY+18, respectively. All cell lines have undergone more than 10 passages and more than 50% of the cells were survival after freezing/thawing. The karyotypes remained stable during the culture. These results indicate that fibroblast and trophoblast cell lines with abnormal karyotypes can be established in human and these cell lines are important cell sources for studying of the basic mechanism of chromosome abnormalities and spontaneous abortion.

Key words karyotypes; fibroblast; trophoblast cell; cell lines

Received: November 26, 2007 Accepted: March 20, 2008

This work was supported by the Key Program of Guangdong Science and Technology Department (No.B30202) and the Key Project of Guangzhou Science and Technology Administration (No.2006Z1-E0021)

*Corresponding author. Tel: 86-20-81292202, Fax: 86-20-81292013, E-mail: xiaofangsun@hotmail.com