

肝豆状核变性患者离体皮肤成纤维细胞系的建立和生物学鉴定

张影如 梁秀龄 刘焯霖 陈 嵘

(第一附属医院神经内科)

提 要 肝豆状核变性(WD)的离体培养皮肤成纤维细胞模型可用于 WD 铜代谢的进一步研究,并有可能提供 WD 患者早期诊断的有效方法。作者建立了 WD 患者和对照组各 5 例的离体培养皮肤成纤维细胞系,并进行了各细胞系在不同代数培养时胞浆内铜含量的测定,为进一步研究该模型打下基础。

关键词 肝豆状核变性;离体培养皮肤成纤维细胞;铜含量测定

中图分类号 R 742.4

肝豆状核变性又称 Wilson's disease (WD),是一种较为常见的常染色体隐性遗传、铜代谢障碍性疾病。其最突出的病理改变是躯体组织,尤其是肝、脑、肾、角膜中有大量的铜沉积,这种异常铜沉积的原因至今尚未完全明瞭;临床上对早期 WD 患者(包括症状前患者)的诊断尚缺乏有效的检查方法。1980 年 Chan 等^[2]曾提出,WD 离体培养皮肤成纤维细胞因能表达 WD 的遗传缺陷,可以成为 WD 研究的体外模型,并有可能成为 WD 患者诊断的有效方法。开展不同培养代数 WD 患者和正常人皮肤成纤维细胞内铜含量的研究,是进一步开展 WD 患者培养细胞内铜代谢研究的必要前提,但国内外至今尚缺乏这方面的研究报道。鉴于国内尚未见有 WD 患者离体培养皮肤成纤维细胞系建系工作的报道,现报告本实验室建立 WD 患者和对照组各 5 例皮肤成纤维细胞系的情况及其生物学鉴定(包括铜含量测定)的结果。

材 料 和 方 法

实验对象 5 例确诊的 WD 患者,男 3 例,女 2 例,年龄 8~25 岁,均经神经系统和铜生化检查确诊;5 例对照组,男 3 例,女 2 例,年龄 5~55 岁,均为神经科住院病人,经

询问家族史、神经系统和铜生化检查排除 WD 和其他遗传病可能。

细胞培养 皮肤标本取自供皮者上臂内侧或腹部。常规消毒,局麻后切取约 1 cm×1 cm 的皮肤组织。送入超净台后,将组织剪成约 1 mm³ 的碎块,分散贴附于培养瓶内底面,翻转培养瓶,加入培养液(Eagle 培养基加 10%胎牛血清及青、链霉素各 100 U/ml, pH 7.2~7.3),密封,37℃ 培养,6~8 h 后翻转培养瓶。待从组织块边缘长出成纤维细胞融合成片时,用 0.25%胰蛋白酶消化,培养液终止,1:2 比例分装传代。

生长曲线的测定 取已长满细胞的培养瓶,0.25%胰蛋白酶消化,计数,按每个培养瓶 4×10⁵ 个细胞共分装 21 瓶,重新培养,每天随机取出 3 个培养瓶,消化、计数,计算 3 瓶平均值。

活细胞摄影和 HE 染色 (1)选择传代后重新培养不同时间的培养细胞,倒置显微镜下进行活细胞摄影。(2)培养细胞传代时,在培养瓶内放入条状盖玻片,重新培养不同时间后,取出盖玻片,常规 HE 染色,显微摄影。

染色体标本的制备 参见周焕庚等^[3]一文。

培养细胞的收获、粉碎及细胞浆液分离
取已长满细胞的培养瓶,倾去培养液,D-Hank_s液冲洗,加入0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.6) 2 ml,将细胞从瓶壁上刮落,超声粉碎(功率:80 W,60 S),将细胞粉碎液在4℃、108 000 g离心60 min,取上清液进行铜、蛋白含量测定。

细胞浆液中铜离子和蛋白质含量测定 分别采用原子吸收分光光度法和Bradford氏法^[4]。

结果和讨论

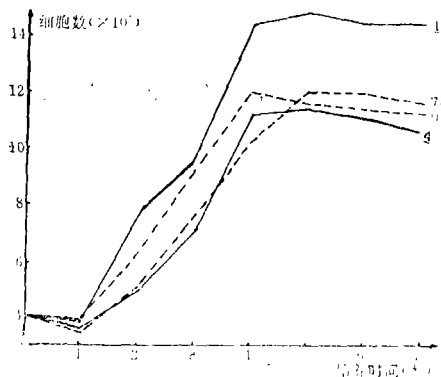
培养细胞生长的活细胞观察和生长曲线

原代培养3~7 d 即可见组织块周围形成细胞生长晕,以后从生长晕边缘出现成纤维细胞。细胞呈梭形,胞质向外伸出2~3个长短不同的突起,中央有单个圆形或椭圆形的细胞核,细胞生长时可呈放射状,漩涡状或条状走行。一般至2~3周时成纤维细胞已铺满瓶底,偶见少许成纤维细胞呈重叠交叉,即可传代。传代时经胰蛋白酶消化,成纤维细胞突起收缩,细胞变圆。再培养12 h后绝大部分细胞重新粘附贴壁,逐渐恢复梭形,继续生长繁殖,一般3~4 d 后细胞融合,可再传代培养。WD患者与对照组培养细胞的生长特性及活细胞形态观察无明显区别。

培养细胞的生长曲线如图1。由图中可见,WD患者与对照组培养细胞的生长曲线无明显差异。培养细胞传代培养后第1天细胞总数略有下降,可能是由于细胞受到物理、化学因素的刺激及生存环境改变所致。随后细胞进入对数生长期,按Patterson公式^[5]计算,3组培养细胞的群体倍增时间均在30~40 h之间,无明显区别。以后细胞分裂逐渐减少,从第3~4天开始细胞因密度抑制(Density Inhibition)而基本停止生长,符合非恶性细胞的生长特性。

培养细胞HE染色后形态

H.E染色后光镜下观察,培养细胞的长梭形更为清晰,两端各有一个长突起,内含一个椭圆形或圆形的细胞核,着蓝色,界限清



附图 WD患者及对照组离体培养细胞的生长曲线
(①④患者,⑦⑩对照组)

楚,核仁1~3个,清晰可见,胞浆呈淡红色,高倍镜下可见有空泡存在,细胞呈规则放射状生长。WD患者与对照组细胞HE染色后观察无明显区别。

培养细胞的染色体分析结果

由于不同传代水平培养细胞的染色体分析结果可有不同^[6],因此,我们选择传至6~10代的培养细胞进行常规染色体标本制备,随机选择50个中期分裂相分析,结果见表1。

从表中可以看出,对照组例6、例7的染色体数目异常率(分别为14%、28%)和结构异常率(分别为4%、0)均低于国际上限标准^[6,7],仅例7的亚二倍体数(22%)略超过国际上限标准;与对照组相比,患者组例3的染色体裂隙增多(为6%),但仍在国际标准范围之内,只有多倍体数(分别为10%和6%)略高于国际标准。

不同代数培养细胞胞浆内铜含量的测定

本实验分别测定了WD患者和对照组(各5例)培养细胞在第1~5代、6~10代、11~15代、16~20代四组代数时细胞浆内的铜/蛋白比值(Cu/P),发现对照组第1~5代细胞浆内的Cu/P明显比后3组代数高,差别均有极其显著性(P 均 <0.01),而后3组代数两两之间比较均无显著性差异(P 均 >0.05);在患者组内也有类似情况,即第1~5代细胞浆内的Cu/P显著高于后3组代数,后3组间无显著差别,见表2。

表1 各细胞系染色体畸变分析结果(%)

		重二倍体	超二倍体	多倍体	裂隙	断裂	其他结构异常	数目异常 (7)=(1) + (2) + (3)	结构异常 (8)=(4) + (5) + (6)	总异常率 (9)=(7) + (8)
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)			
患者组	例2	20	6	10	0	0	0	36	0	36
	例3	3	6	6	6	0	0	20	6	26
对照组	例6	10	2	2	4	0	0	14	4	18
	例7	22	6	0	0	0	0	28	0	28

表2 WD 患者和对照组不同代数培养细胞胞浆内的 Cu/P 测定 (ng/mg)

		I 1~5代	II 6~10代	III 11~15代	IV 16~20代	P值(两两比较)**				
						I与II	I与III	I与IV	II与III	II与IV
患者组		439.9 ±141.1*	151.0 ±65.5	161.3 ±81.2	167.1 ±34.3	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05
对照组		489.6 ±73.6	222.5 ±66.4	173.3 ±82.4	176.8 ±73.5	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05
P 值**		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05					

*: $\bar{x} \pm S$ **: t 检验

在作者的检索范围内, 研究培养代数对皮肤成纤维细胞内铜含量影响的报道仅 Goka 等^[8]一篇。Goka 等发现, 对照组(部分为非铜代谢障碍性遗传病患者)培养细胞内的 Cu/P 到第 15 代时仍在 95% 的可信限之内, 而 Menkes' 卷发综合症(MKHD, 另一种铜代谢障碍性遗传病)患者培养细胞内的 Cu/P 随代谢增加可有轻微的增高, 故以后人们在进行 MKHD 和 WD 培养细胞内铜代谢研究时, 一般采用 6~13 代培养。本实验结果提示, WD 患者和对照组第 1~5 代皮肤成纤维细胞内 Cu/P 较以后代数高, 且变异较大, 而第 6~20 代培养细胞的铜代谢均较为稳定, 适合于铜代谢的进一步研究, 而且由于代数范围较大, 可以为实验提供大量的材料。

另外, 本实验还发现在每一组代数内, WD 患者培养皮肤成纤维细胞胞浆内的 Cu/P 与对照组相比, 差别均无显著性 ($P>0.05$), 见表 2, 提示一般培养条件下离体培养皮肤成纤维细胞内铜含量测定不能成为 WD 患者诊断的有效方法, 支持 Van Den Berg 等^[9]的观点,

不同于 Chan 等^[2]的结果。但是佐藤充^[10]曾发现, 经高浓度铜离子孵育后, WD 患者培养细胞内的铜含量比正常人明显增高, 我们目前正在进行 WD 患者离体培养皮肤成纤维细胞经不同时间、不同浓度铜孵育后细胞浆内铜含量的研究, 希望从中寻找出能有效进行 WD 患者诊断的方法。

参 考 文 献

1. 刘焯霖, 梁秀龄. 神经遗传病学. 北京: 人民卫生出版社, 1988:81~96
2. Chan WY, et al. Genetic expression of Wilson's disease in cell culture: A diagnostic marker. Science 1980;208(4441):299
3. 周焕庚, 等. 人类染色体. 北京: 科学出版社, 1987:85~96
4. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72(1~2):248
5. Patterson MK. Measurement of growth and viability of cells in culture. In: edited by

- Jakoby WB et al. *Methods In Enzymology*. Vol LVII. London: Academic Press 1979;141~152
6. 郭仁,等. 人二倍体细胞株 KMB-17 的特性. 中国医学科学院学报 1981;3(4):226
7. 李质怀,等. 人二倍体细胞株 GHC 的建立. 癌症 1982;1(4):248
8. Goka JJ, et al. Menkes' disease: A biochemical abnormality in cultured human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73(2):604
9. Van Den Berg GJ, et al. Cultured skin fibroblasts: Useful for diagnosis of Wilson's disease. *J Inher Metab Dis* 1989;12(1):64
10. 佐藤充. 肝豆状核变性患者组织和培养细胞内的铜沉积与铜结合蛋白. 东邦医学会杂志 1986;33(1):20
- (1992-06-15收稿 1992-10-29修回)

ESTABLISHMENT OF CULTURED SKIN FIBROBLAST LINES FROM PATIENTS WITH WILSON'S DISEASE AND CONTROLS

Zhang Yingru Liang Xiuling Liu Zuolin Chen Rong

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital)

Cultured skin fibroblast from patients with Wilson's disease (WD) has been suggested to be used in the study of copper metabolism in WD and in the diagnosis of WD patients. Now five cultured skin fibroblast lines from WD patients and five from controls have been established in our laboratory, and their copper contents in cytosols of each lines in various passage groups were also determined. The growth and morphology (living and H.E. staining) of fibroblasts from WD patients are distinguishable from controls. The copper content in cytosols of cultured fibroblasts are stable for 6~20 passages in two groups, which can supply enough materials for further study of copper metabolism in either WD or normals.

Key words Wilson's disease (hepatolenticular degeneration); cultured skin fibroblasts; copper/protein ratio