

表达 HPA 抗原的细胞株稳定性及应用的研究

申卫东, 黎海燕, 李丽兰, 刘学军, 吴国光

(南宁中心血站 南宁输血研究所, 南宁 530003)

摘要: 建立血小板特异性抗原永生化细胞株, 为血小板免疫学及血小板交叉配型提供永久的研究材料。采用 EB 病毒 (Epstein-Barr virus) 转化技术, 把携带血小板特异性稀有抗原外周血淋巴细胞转化成永生化淋巴母细胞株。结果: 成功地建立了 13 个稀有血小板特异性稀有抗原建立了永久细胞株, 所有的细胞株传代、冻存和复苏的成功率为 100%, 细胞传至 30 代没有发现基因突变。由所建的细胞株抽提的 DNA 样本, 分发给第 14 届国际血小板免疫学研究会做为参比试剂, 34 个国际实验室基因分型鉴定结果的一致率为 97.85%。采用 EB 病毒转化技术, 能成功地血小板特异性抗原外周血淋巴细胞转化成永生化细胞淋巴母细胞株, 细胞株稳定传代, 并可用作参比试剂。

关键词: 血小板特异性抗原; EB 病毒; 永生化淋巴母细胞; 参比试剂

中图分类号: R392.12

文献标识码: A

文章编号: 1001-2478(2010)01-0060-04

血小板表面具有复杂的血型抗原, 一类是 ABO 血型抗原和 HLA 抗原, 另一类是血小板本身特有的抗原, 即人类血小板同种异型抗原 (human platelet-specific alloantigen, HPA), 又称为血小板特异性抗原。HPA 存在于血小板的膜糖蛋白的特异性抗原, 能够经免疫途径刺激机体产生抗体。HPA 产生的同种免疫可导致临床综合征和相关输血症状如新生儿同种异型免疫性血小板减少症 (neonatal alloimmune thrombocytopenia, NAIT), 输血后紫癜 (post-transfusion purpura, PTP), 血小板输注无效 (platelet transfusion refractoriness, PTR) 及同种免疫血小板减少症等^[1, 2]。在血小板免疫异常的诊断工作中, 对患者和献血者进行 HPA 的准确分型非常重要, 实验室必须要有实验对照的血小板特异性抗原参比样本, 才能对患者血清中所含有的血小板抗体特异性的正确鉴定、疾病的诊断以及选择合适的血小板作输注治疗。由于血小板特异性抗原和受控的基因有种族多态性和地区差异, 一些特异性抗原 HPA-1b、2b、4b、6bw-17bw 又十分罕见, 不可能普遍地发现和保持这些抗原的供者, 这为血小板的免疫诊断工作带来很大的困难。我国是多民族国家, 血小板特异性抗原的多态性十分丰

富, 要发展我国的血小板免疫学和遗传学的工作, 更需要将所发现和应用的血小板特异性抗原和基因保存及充分利用, 因此保存血小板特异性抗原和基因有重要意义^[3]。

在本研究工作中, 我们将所发现的携带稀有血小板特异性抗原的外周血淋巴细胞, 使用 EB 病毒, 使其转化成永生化淋巴细胞株, 永久保存建立已知 HPA 型供者库, 使之成为血小板免疫学研究提供永久的实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料 淋巴细胞分离液 (Sigma 公司, 美国), 分装 4 ml/管, 避光保存。RPMI 1640 全培养液内含 73% RPMI 1640 (Hyclone 公司, 美国)、1%青霉素和链霉素 (双抗)、25%胎牛血清 (新西兰 Biointernational 公司)、1%谷氨酰胺, pH 值为 7.0~7.2。洗液含 96% RPMI 1640、4%双抗。环孢霉素 A (Sigma 公司, 美国), 使用终浓度 2 μg/ml。冻存液含 50% RPMI 1640 全培养液、40%胎牛血清和 10%二甲基亚砷。EB 病毒的 B95-8 细胞株 (中国科学院上海生命科学研究院), L-谷氨酰胺, Hepes (Sigma 公司, 美国)。DNA 抽提试剂盒 (Gentra 公司, 美国), HPA 基因分型试剂盒 (G&T Biotech, 美国)。

1.2 血小板特异性抗原外周血的收集 从广西壮族自治区的 1 000 多名无偿献血者中, 应用血小板抗原基因检测技术, 经筛选和鉴定发现 13 例稀有血小板特异性抗原的个体, 经办理严格的知情同意

收稿日期: 2009-06-23; 修回日期: 2009-10-09

基金项目: 南宁市科研资助项目 (200801023C)

作者简介: 申卫东 (1960-), 女, 副主任技师, 医学硕士, 主要从事输血医学研究。

通讯作者: 吴国光 (电话: 0771-3213331; 传真: 0771-3213331;

E-mail: guangwu @szonline.net)

书等手续,在无菌条件下采集这 13 例的血样,常温带回实验室。

1.3 实验方法

1.3.1 EB 病毒悬液的制备 培养 B95-8 细胞,逐步增加培养液至需要的毫升数,将细胞饥饿 4~7 d,吸取上清到另一培养瓶,将上清用 0.22 μm 滤器过滤成为待用病毒液。

1.3.2 细胞转化实验 3 ml 洗液稀释 3 ml 全血。3 ml 稀释血样缓慢地沿管壁注入 3 ml 淋巴细胞分离液(37 预热)管内,2 500 $\times g$ 离心 30 min。吸取中间层的淋巴细胞移至另一装有 8 ml 洗液的试管内,轻轻混匀洗涤,1 000 $\times g$ 离心 10 min。弃上清液,加入 1 ml 1640 全培养液悬浮细胞沉淀,转入装有 4 ml EB 病毒液的培养瓶内。培养瓶置于气浴摇床上摇 1 h,转速为 40 次/min。补加 5 ml 1640 全培养液及终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的环孢霉素 A。37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱内静置培养。显微镜下每日观察细胞生长特性和形态学变化。

1.3.3 细胞冻存复苏 细胞株在冻存的前 1 d 必须进行换液及时补充新的培养基,换液 24 h 左右,将细胞用吸管轻轻吹散,吸到离心管中 1 000 $\times g$ 离心 10 min,吸去上清液,细胞沉淀中加入 1 ml 冻存液,轻轻混匀后吸到冻存管中。冻存过程:4 $^{\circ}\text{C}$ 冻 1 h, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻 1 h, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻 1 h, -180 $^{\circ}\text{C}$ 液氮罐内长期保存。复苏时很快将冻存管放入 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,不停的搅动,1 min 内解冻。立即将细胞吸到装有 8 ml 洗液的试管中,吹打均匀,1 000 $\times g$ 离心 10 min。吸走上清,将细胞转入装有 5 ml 全培养基的培养瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。24 h 后观察细胞密度,看情况分瓶培养。

1.3.4 血小板特异性抗原基因检测 采用以 DNA 为基础的聚合酶链反应序列特异性引物 (polymerase chain reaction-sequence special primers, PCR-SSP) 技术,特异性扩增 HPA 基因片段。凝胶电泳检测 PCR 产物,根据是否产生 PCR 产物以及产物片段的长度来指定相应基因型。

1.3.4 细胞株 DNA 作为第十四届血小板研讨会参比试剂 成功培养的细胞株后抽提的 DNA 作为第十四届血小板研讨会参比试剂送到全球 39 个实验室,考评全球各实验来以提高各个实验室实验方法的灵敏度和特异性,对各国际实验室的技术能力和质量作测评。总共 34 个实验室回复他们的实验结果,包括 HPA1-6 及 HPA9、HPA15 8 个项

目,统称 2b 项目,其中 2b-1、2b-2 细胞株 DNA 由德国吉森大学临床免疫和输血医学研究部血小板和白细胞实验室提供,2b-3 至 2b-10 细胞株 DNA 由我们提供,共 10 个细胞株,80 个实验结果。

2 结果

2.1 稀有血小板特异性抗原永生细胞株的建立 由广西地区无偿献血者中,筛选出 13 名具有稀有血小板 HPA 抗原的献血者,其中稀有的 HPA-1ab 2 人、1bb 1 人、2ab 3 人、2bb 4 人、4ab 1 人、6bb 1 人,同时具有 2ab 和 5ab 抗原的人有 1 人;均成功地应用 EB 病毒转化技术对这些供者的外周血淋巴细胞建立了永生细胞株。

2.2 EVB 转化结果 转化的细胞培养了 7 d 后,在倒置显微镜下观察,可见淋巴细胞体积增大,明显母细胞化,并且凝聚成小细胞团块(图 1),1 mo 左右细胞增殖旺盛,形成密集的大细胞团块,说明转化成功(图 2)。

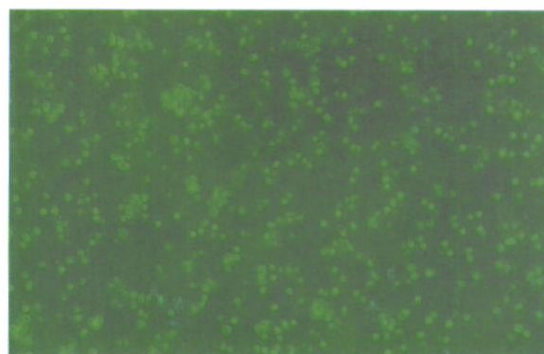


图 1 转化 7 d 后细胞生长情况和形态变化(100 \times)

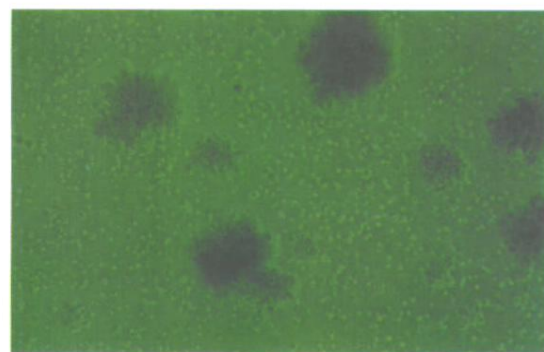


图 2 转化 20 d 后细胞生长情况和形态变化(100 \times)

2.3 冻存细胞复苏生长情况 所有冻存的细胞复苏成功率都为 100%,复苏后第 3 天即可传代。细胞建系前后并经传 30 代以及冻存 3~6 mo 复苏后,镜下观察细胞形态正常。

2.4 细胞株抽提 DNA 进行血小板特异性抗原基因检测结果 外周血和转化成功培养第 30 代时, 分别抽提 DNA, 进行血小板特异性抗原基因 SSP-PCR 的检测, HPA 1-16 分型的结果(图 3、图 4)没有差别, 证明细胞株稳定传代, 没有产生突变。

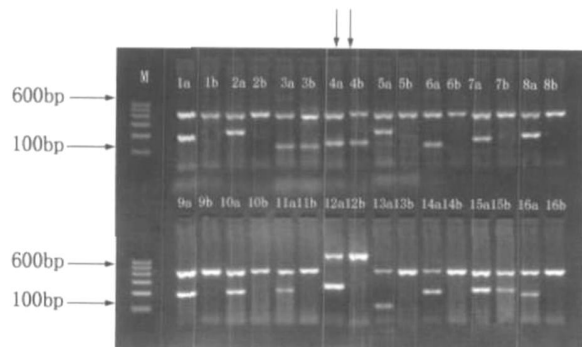


图 3 全血 PCR 的 HPA 1-16 分型

(a, b 示两个相邻的条带是一对等位基因, 箭头处显示该血样 HPA 基因分型是稀有的 4ab)

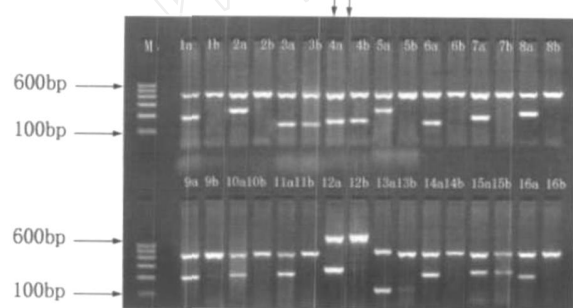


图 4 细胞株 PCR 的 HPA 1-16 分型

(a, b 示两个相邻的条带是一对等位基因, 箭头处显示该细胞株 HPA 基因分型是稀有的 4ab)

2.5 细胞株 DNA 作为参比试剂结果如下 由我们所建的细胞株抽提的 DNA 样本, 分发给第 14 届国际血小板免疫学研究会做为参比试剂, 由 34 个国际实验室进行基因分型鉴定, 鉴定结果的一致率为 97.85%, 其中 33 个实验室的 HPA-1、-3 基因分型结果与预期结果无差异, 31 个实验室的 HPA-2、-4、-5 和-15 基因分型结果与预期结果无差异, 我们成功地应用所提供的 DNA 对国际实验室的基因分型质量进行了鉴定。

3 讨论

血小板特异性稀有抗原非常罕见, 来之不易, 血小板抗原永生细胞株的建立, 为罕见的人类血小板特异性抗原细胞和基因的收集、永久的保存和建库创造了条件, 这对发展血小板免疫学检测技术,

开展相关的临床诊断和治疗建立了基础。同时, 也为实施血小板抗原和基因的结构和功能的研究创造了条件提供了随时可取的可贵实验材料, 具有显著的科研和应用价值。

外周血淋巴细胞作为最常用的人类遗传学研究材料, 具有寿命短的缺陷, 而多次取材又存在着诸多不便。B95-8 细胞株富含 EB 病毒, 应用广泛, 如陶怡等人用其培养上清中的 EB 病毒体外感染人多发性骨髓瘤细胞株 PRMI8226, 研究 EB 病毒感染对骨髓瘤细胞生物学特性的影响^[4]。EB 病毒转化人类外周淋巴细胞以建立淋巴母细胞株的技术, 由于只需要少量的外周血, 即可建成永久性淋巴母细胞株, 目前已在免疫学、遗传学、细胞生物学及分子生物学研究中得到了日益广泛的应用^[5]。王明权等人建立的福建省畲族人群永久性淋巴母细胞株^[5], 南方医科大学宋玫、高建华等人建立瘢痕疙瘩系永生淋巴细胞株的建立^[6]为该系基因组的保存提供一种行之有效的手段。

我们在国内首次将应用分子生物学等技术发现的中国人群中的携带稀有血小板特异性抗原的外周血淋巴细胞, 经 EB 病毒转化, 成功地建立了 13 株中国人稀有血小板特异性抗原淋巴母细胞株, 将细胞建株前和传 30 代以及冻存 3~6 mo 复苏后分别进行 DNA 血小板特异性抗原基因检测分析, 显示经传代和复苏后, 细胞稳定, 未见异常, 证明了我们的建株技术是成功的。

环孢霉素 A 是一个影响永生细胞株建立的重要因素, 本研究在细胞的转化过程中严格遵守环孢霉素 A 在 2 h 内加入的原则, 用量为 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ^[7]。

我们建立的淋巴母细胞株作为人类血小板特异性抗原的参比试剂, 来源稳定, 保存了原来个体完整的基因组, 传 20 代经抽提 DNA 作检测, 没有发现基因突变, 作为质量控制试剂成功提供给参加第 14 届国际血小板免疫学研讨会合作研究项目的各实验室, 得到了成功, 我国自主建立的经 EB 病毒转化的血小板特异性抗原淋巴母细胞株首次获得国际承认, 实施了将珍稀的遗传资源获得共享的目标^[8]。

参考文献

- [1] Santoso S, Kiefel V. Human platelet alloantigens[J]. Wien Klin Wochenschr, 2001, 113:806-813.
- [2] Dan ME, Schiffer CA. Strategies for managing refractoriness to platelet transfusions[J]. Curr Hematol Rep, 2003, 2:158-

- 164.
- [3] Carl B, Kroll H, Bux J, *et al.* B-lymphoblastoid cell lines as a source of reference DNA for human platelet and neutrophil antigen genotyping [J]. *Transfusion*, 2000, 40:62-68.
- [4] 陶怡, 戚春建, 张学光, 等. EB 病毒感染对骨髓瘤细胞生物学特性的影响[J]. *现代免疫学*, 2005, 25: 476-480.
- [5] 王明权, 蒋龙富, 林炜, 等. 福建省畲族群永久性淋巴母细胞株的建立[J]. *福建医科大学学报*, 1999, 33:34-37.
- [6] 宋玫, 高建华, 严欣, 等. 瘢痕疙瘩系永生淋巴细胞株的建立及其染色体分析[J]. *中华整形外科杂志*, 2006, 22: 445-447.
- [7] 黄小琴, 褚嘉佑, 林克勤, 等. 建立不同民族永生细胞株质量控制方法的探讨[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2005, 13: 10-13.
- [8] Kaplan C. Platelet Immunology Working Party (PIWP), 14th International Platelet Workshop organized by Pr Guo-Guang WU, Nan-Ning, China[J]. *Transfusion Today*, 2008, 76:19.

Study on the stability of cell lines delivered from human platelet-specific alloantigen and their applications

SHEN Wei-dong, LI Hai-yan, LI Li-lan, LIU Xue-jun, WU Guo-guang (*Nanning Institute of Transfusion Medicine, Nanning Blood Center, Nanning 530003, China*)

Abstract: To establish an immortal lymphoblastoid cell line of human platelet-specific alloantigen (HPA) and to use this cell line to provide perpetual research materials for long term studies, the immortal lymphoblastoid cell lines of human platelet specific alloantigen were established by Epstein-Barr virus (EBV) transformation of peripheral blood lymphocytes, in which 13 immortal lymphoblastoid cell lines of human platelet specific alloantigen were obtained successfully in the present study. All of the immortal lymphoblastoid cell lines obtained were revived after being frozen in liquid nitrogen, and no gene-mutation was found after the cell lines were passed for 30 generations. The DNA samples derived from HPA typed B-lymphoblastoid cell lines were used as the reference materials in the 14th ISBT platelet immunology workshop, and the consensus of genotyping with 34 international laboratories submitted their results was 97.85%. It is evident that by using the EBV-transformation of peripheral blood lymphocytes the immortal lymphoblastoid cell lines were successfully obtained, and these cell lines can pass stably and can be used as the available reference materials in the future workshop.

Key words: human platelet specific alloantigen; Epstein-Barr virus; immortal lymphoblastoid cell lines; reference materials