

洛阳地区献血员人类血小板 抗原 1~10 频率分布调查

杨波¹ 吕运来¹ 朱丽莉¹ 吕素梅¹ 陈善华¹

[摘要] 目的:研究洛阳地区献血员人类血小板抗原(HPA)1~10 基因多态性,为患者提供 HPA 相配合的血小板。方法:随机收集 250 例无偿献血员样本,应用聚合酶链式反应-序列特异引物(PCR-SSP)技术检测 HPA-1~10 基因型及等位基因频率。结果:HPA-1aa、-1ab 所占百分比分别为 98.80% 和 1.20%,HPA-2aa、-2ab 所占百分比分别为 90.80% 和 9.20%,HPA-4aa、-4ab 所占百分比分别为 98.00% 和 2.00%,HPA-5aa、-5ab 所占百分比分别为 96.40% 和 3.60%,HPA-aa、-ab、-bb 三种基因型在 HPA-3 和 HPA-6 中的比例分别为 29.20%、46.00%、24.80% 和 91.60%、6.80%、1.60%,在 HPA-7、-8、-9、-10 中仅检测到 HPA-aa 纯合子。结论:洛阳地区 HPA-1~HPA-10 基因分布与文献报道相似,HPA-3 特异性抗体是引起本地区 HPA 同种免疫性疾病的首要原因。

[关键词] 人类血小板抗原;基因;血型;PCR-SSP

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2014.06.008

[中图分类号] Q343.1 **[文献标志码]** A

Investigation of frequency distribution of human platelet antigen -1to -10 in Luoyang

YANG Bo LV Yunlai ZHU Lili LV Sumei CHEN Shanhua

(Blood Center of Luoyang, Luoyang, 471000, China)

Corresponding author: YANG Bo, E-mail: lyxzyb@sina.com

Abstract Objective: To study the gene polymorphism of human platelet antigen(HPA) -1 to 10, in order to provide patients with the HPA compatible platelets. **Method:** A total of 250 samples were collected from the blood donors randomly, and the genotypes and allele frequencies of HPA-1 to 10 were detected by polymerase chain reaction sequence specific primers (PCR-SSP). **Result:** The percentages of HPA-1aa and -1ab were 98.80% and 1.20% respectively. The percentages of HPA-2aa and -2ab were 90.80% and 9.20% respectively. The percentages of HPA-4aa and -4ab were 98.00% and 2.00% respectively. The percentages of HPA-5aa and -5ab were 96.40% and 3.60% respectively. The proportions of HPA-aa, -ab and -bb in HPA-3 and HPA-6 were 29.20%, 46.00%, 24.80% and 91.60%, 6.80%, 1.60% respectively. The HPA-aa homozygous only was detected out in HPA-7, -8, -9, -10. **Conclusion:** The gene distributions of HPA-1 to HPA-10 was similar to those reported in the literature. The HPA-3 specific antibody was the major cause for HPA autoimmune diseases in Luoyang.

Key words human platelet antigen; gene; blood group; PCR-SSP

在临床输血中,血小板制剂已得到广泛应用,特别是对于那些由于各种原因所致严重血小板减少症,输注血小板治疗是最有效的治疗方法之一^[1]。人类血小板抗原(HPA)在血小板的临床输注中有着重要意义,然而,目前国内研究人员大多数只关注红细胞上的 ABO 和 Rh 血型抗原,对血小板抗原的研究却很少。迄今为止,已经鉴定出五类不同糖蛋白上携有 20 多种不同的血小板特异性抗原,国际输血协会和国际血栓与止血协会命名委员会已经对这些 HPA 进行了命名。以被发现的时间先后顺序编号,都由高频基因“a”和低频基因“b”两个等位基因组成^[2]。鉴定人类血小板抗原具有

重要的临床意义,可为患者提供 HPA 相合的血小板,是解决血小板输注无效(PTR)的有效手段之一^[3]。在本研究中,我们应用聚合酶链式反应-序列特异引物(PCR-SSP)技术来检测洛阳地区献血员 HPA 1~10,初步探讨 HPA 系统主要抗原的分布频率。

1 材料与方法

1.1 样本来源

随机收集我站无偿自愿单采血小板献血员 250 例,其中男 167 例,女 83 例;年龄 24~47 岁。经献血员知情同意后,静脉抽取外周血 5 ml,EDTA-K2 抗凝。

1.2 主要仪器与试剂

PCR 仪(ABI 9700)、免疫磁珠核酸提取试剂盒

¹ 洛阳市中心血站(河南洛阳,471000)

通信作者:杨波, E-mail: lyxzyb@sina.com

(河南惠尔纳米科技有限公司)、TaKaRa Ex Taq (大连宝生物工程有限公司)、TaKaRa LA Taq(大连宝生物工程有限公司)、DNA marker(上海生工生物工程有限公司)。

1.3 DNA 提取

取 200 μl 抗凝全血于 EP 管中,加 500 μl 裂解液于 65℃ 裂解 20 min。加入 300 μl 磁珠结合液,混匀,磁吸,弃废液。分别用 700 μl 洗涤液 I、II、III 洗涤 3 次,室温干燥 5 min。加入 100 μl 洗脱液,65℃ 孵育 10 min,磁分离,DNA 于 -20℃ 保存备用。

1.4 PCR 反应

1.4.1 引物合成 参考文献[4-5]合成 HPA-1~HPA-10 引物,引物序列见表 1,将人类生长激素(HGH)基因(NM_022560.2)一段长为 629 bp 的序列作为实验的内对照,引物序列为:HGHR-GCCTTCCCAACCATTCCTTA,HGHF-TAGACGTTGCTGTCAGAGGC。所有引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成,用 TE Buffer 稀释为 5 $\mu\text{mol/L}$ 应用液,于 -20℃ 保存备用。

1.4.2 PCR 反应 ① HPA-2、3、4、6、7、8、9、10: 50 μl 反应体系:2 $\times$ GC Buffer I 25 μl ,dNTP Mixture 8 μl ,正、反向引物各 4 μl ,内参引物各 1 μl ,模板 DNA 100~200 ng,TaKaRa LA Taq(5 U/ μl) 0.5 μl ,灭菌去离子水补充至 50 μl 。扩增条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,58℃ 40 s,72℃ 30 s,35 cycles;72℃ 5 min,降温至 4℃ 保存。HPA-1、5、8: 50 μl 反应体系:10 $\times$ Ex Taq Buffer (含 Mg^{2+}) 5 μl ,dNTP Mixture 4 μl ,正、反向引物各 4 μl ,内参引物各 1 μl ,模板 100~200 ng, TaKaRa Ex Taq(5 U/ μl) 0.25 μl ,灭菌去离子水补充至 50 μl 。扩增条件:95℃ 5 min;95℃ 45 s,56℃ 40 s,72℃ 30 s,35 cycles;72℃ 5 min,降温至 4℃ 保存。

1.4.3 产物分析 取扩增产物 1.5 μl ,灭菌去离子水 8.5 μl ,6 $\times$ Loading Buffer 2 μl ,混匀,上样,在 1 $\times$ TAE 缓冲液中用 100 V 电压电泳 20 min,紫外灯下观察结果并拍照保存。

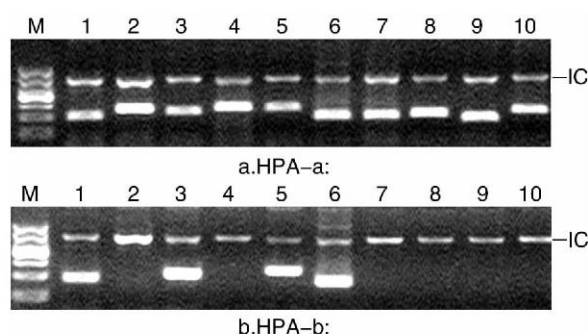
2 结果

HPA-1~HPA-10 基因分型(PCR-SSP)结果见图 1。

洛阳地区 HPA 基因检测及等位基因(a 和 b)分布见表 2。

3 讨论

血小板输注是临床输血的重要组成部分,血小板特异性抗体可引起多种同种免疫性疾病,如新生儿免疫性血小板减少症(NAIT)、输血后紫癜(PTP),以及血小板输注无效(PTR)^[6]。在 HPA 系统中,不同抗原之间分子水平上的差异在于单个核苷酸的改变,而引起蛋白质水平的某个氨基酸



M:DL1000,分别为 1 000 bp、700 bp、500 bp、400 bp、300 bp、200 bp 和 100 bp 条带;IC 为内对照条带,产物长度为 629 bp;1~10 为 HPA-1~HPA-10 分型结果:1ab、2aa、3ab、4aa、5ab、6ab、7aa、8aa、9aa 和 10aa。

图 1 HPA 基因分型结果示意图

的替换。HPA 的分布具有明显的种族和地区差异,因此,研究本地区人群中 HPA 各种表型的基因频率,有着重要的临床意义。不但可以用于推断人群的基因组成和基因流,还可用于预测不同人群中发生 HPA 同种免疫的风险。同时还可以用于辅助诊断 NAIT,PTP 和 PTR,为由于血小板抗体引起的 PTR 患者提供 HPA 相合的血小板,从而提高血小板的输注效果。

在本研究中,我们随机选择 250 例无偿献血员样本,根据不同抗原以及同一抗原不同等位基因在分子水平上的差异,设计特异性引物,运用 PCR-SSP 方法来检测 HPA 各种抗原的基因型,并推算出各种等位基因的基因频率。通过实验我们发现,在 HPA 系统的基因分型中,纯合子“aa”在 HPA-1~HPA-10 各种抗原中所占比例最高,其中在 HPA-7~HPA-10 全部为“aa”纯合子;杂合子“ab”出现的频率较低,在 HPA-1、2、4、5、6 中所占的比例均小于 10%,但在 HPA-3 中所占比例却很高,达 46.00%(115/250);纯合子“bb”则很罕见,仅在 HPA-3 和 HPA-6 中出现,所占比例分别为 24.80%(62/250)和 1.60%(4/250),这与文献所报道的结果相似^[4-8]。在等位基因频率中,高频基因“a”的比例最多,而低频基因“b”只占少部分。此外,在 HPA-7~HPA-10 中还未发现“ab”型杂合子与“bb”纯合子,而 HPA-1a/1b、-4a/4b、-5a/5b 这 3 种杂合子在洛阳地区的无偿献血员中也是很少见的,提示因这些 HPA 同种免疫而发生 NAIT、PTP 及 PTR 的可能性是很小的。有趣的是,在 HPA-3 中,等位基因 a 与 b 的基因频率相差不大(分别为 52.20%和 47.80%),而 HPA-3a/a、-3a/b、-3b/b 3 种类型分布较为均衡(29.20%、46.00%和 24.80%)。所以,我们推测 HPA-3 特异性抗体很可能是引起本地区 NAIT、PTP 及 PTR 的首要血小板抗体。

表 1 HPA-1~HPA-10 引物序列表

名称	正向引物(5'→3')	共用引物(5'→3')	产物/bp
1a	ACTTACAGGCCCTGCCTCT	GTGCAATCCTCTGGGGACT	188
1b	ACTTACAGGCCCTGCCTCC		
2a	CCCCCAGGGCTCCTGAC	GCAGCCAGCGACGAAAATA	244
2b	CCCCCAGGGCTCCTGAT		
3a	TGGACTGGGGGCTGCCCAT	CCGGGTGTCGTGTGGGCCT	220
3b	TGGACTGGGGGCTGCCCAA		
4a	GCTGGCCACCCAGATGCG	GGTAGAAAGGAGCTATAGTTT- GGC	254
4b	GCTGGCCACCCAGATGCA		
5a	AGTCTACCTGTTTACTATCAAAG	CTCTCATGGAAAATGGCAGTA	249
5b	AGTCTACCTGTTTACTATCAAAA		
6a	GACGAGTGCAGCCCCCG	TAGCGGACACAGGAGAAGTC	163
6b	GACGAGTGCAGCCCCCA		
7a	CCAAGGTGCGAGGCTGTC	CGGCATACCCCACTCAA	181
7b	CCAAGGTGCGAGGCTGTG		
8a	ACTGACTCAATCTCGTCACG	GGTGGAGCAGCTTTCTGAATG	190
8b	ACTGACTCAATCTCGCTACA		
9a	CTCCTTTGCCCCCCCAGG	GAGAGCCTGCTCACTACGAG	157
9b	CTCCTTTGCCCCCCCAGA		
10a	TCCCAGTGAGTGAGGCCCG	CTGAGCTACTTCCCCAAGAC	213
10b	TCCCAGTGAGTGAGGCCCA		

表 2 250 例样本 HPA 基因检测结果及等位基因频率

例(%)

血小板抗原	基因分型			等位基因	
	bb	aa	ab	a	b
HPA-1	247(98.80)	3(1.20)	0(0.00)	497(99.40)	3(0.60)
HPA-2	227(90.80)	23(9.20)	0(0.00)	477(95.40)	23(4.60)
HPA-3	73(29.20)	115(46.00)	62(24.80)	261(52.20)	239(47.80)
HPA-4	245(98.00)	5(2.00)	0(0.00)	495(99.00)	5(1.00)
HPA-5	241(96.40)	9(3.60)	0(0.00)	491(98.20)	9(1.80)
HPA-6	229(91.60)	17(6.80)	4(1.60)	475(95.00)	25(5.00)
HPA-7	250(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	500(100.00)	0(0.00)
PA-8	250(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	500(100.00)	0(0.00)
HPA-9	250(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	500(100.00)	0(0.00)
HPA-10	250(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	500(100.00)	0(0.00)

总之,研究本地区 HPA 系统主要抗原的分布频率,有着重要临床意义和必要性。遗憾的是,本研究涉及的样本数量有限,需增加研究对象作进一步研究,并建立起本地区的 HPA 基因库,为患者提供 HPA 相配合的单采血小板。特别针对那些因 HPA 特异性抗体引起的血小板无效输注患者,可以更好的提高输注效果,挽救患者生命。

参考文献

- [1] 张冬霞. 吉林地区汉族人群血小板抗原系统基因分型研究[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(10): 46-47.
- [2] 周琼秀, 李执如, 陈静娴. PCR-SSP 在人类血小板抗原 1-6、15 系统基因分型中的应用[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(4): 43-44.
- [3] MCY EY M, CSERTI-GAZDEWICH C M. Platelet transfusion refractoriness responding preferentially to single donor aphaeresis platelet compatible for both ABO and HLA[J]. Transfus Med, 2010, 20: 346-353.
- [4] XIA W J, YE X, TIAN L W, et al. Establishment of platelet donor registry improves the treatment of platelet transfusion refractoriness in Guangzhou region of China[J]. Transfus Med, 2010, 20: 269-274.
- [5] FENG M L, LIU D Z, SHEN W, et al. Establishment of an HPA-1- to -16-typed platelet donor registry in China[J]. Transfus Med, 2006, 16: 369-374.
- [6] COLLINS C L, SCOTT J P, PANEPINTO J A, et al. Severe thrombocytopenia in a child secondary to passive platelet antibody transfer from a plasma transfusion[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2013, 35: 226-228.

机洗冰冻红细胞在日常及突发事件中 伤员救治的应用

张伟强¹ 王君¹ 邬丽娜¹ 饶月丽¹ 章立¹ 李亮¹

[摘要] 目的:机器洗涤冰冻红细胞在日常和突发事件中的紧急抢救可行性。方法:选择日常及交通伤患者的大出血中冰冻红细胞输注,观察各种指标。结果:患者在输注冰冻红细胞后各项指标正常,效果明显,无输血反应。结论:冰冻红细胞可应用于日常和紧急大出血的抢救。

[关键词] 冰冻红细胞;突发事件;抢救

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2014.06.009

[中图分类号] R555 **[文献标志码]** A

Application of frozen red blood cells in routine and emergency

ZHANG Weiqiang WANG Jun WU Lina RAOYueli ZHANG Li LI Liang

(PLA 117 Hospital Blood Transfusion, Hangzhou, 310013, China)

Abstract Objective: To investigate the feasibility of frozen red blood cells in the daily and unexpected events to rescue the wounded. **Method:** Frozen red blood cell transfusions of the operative and traffic injury patients were chosen, and various indexes were observed. **Result:** After frozen red blood cell transfusion, various indexes in patients were normal and there had obvious effect and no blood transfusion reaction. **Conclusion:** Frozen red blood cells could be applied to the daily life and in the event of an emergency of bleeding.

Key words frozen red blood cells; unexpected events; emergency

在日常工作及突发事件中伤员大出血的救治离不开大量输血治疗。因部队血站规模小,库存量偏少又容易偏型,短时间碰到大量失血患者很难满足抢救需要。为此,我站建立冰冻保存红细胞库,并应用于临床,统计从 2011-05—2012-12 对大出血患者,使用普通红细胞基础上加用冰冻红细胞取得较好效果,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

选择高速公路车祸伤员,失血量 >800 ml 患者 28 例,其中男 18 例,女 10 例;平均年龄 39.5 岁;平均体重 59.6 kg。外科手术,失血量 >800 ml、血红

蛋白 <70 g/L 的患者 53 例,其中男 27 例,女 26 例;平均年龄 52.4 岁;平均体重 62.2 kg。内科选择有持续的红细胞破坏、丢失或生成障碍引起的慢性贫血并伴缺氧症状、血红蛋白 <60 g/L 或血细胞比容 <0.2 的患者 31 例,其中男 17 例,女 14 例;平均年龄 48.1 岁;平均体重 61.5 kg。

1.2 方法

1.2.1 仪器设备 冰冻保护剂(北京博德桑特采血器材科技开发中心),B-255 红细胞洗涤机(四川南格尔生物医学股份有限公司),K24500 全自动血细胞计数仪、UF2100 尿常规分析仪(Sysmex 公司),7170 全自动生化分析仪(日立公司)。

¹解放军第 117 医院输血科(杭州,310013)

[7] SHEHATA N, DENOMME G A, HANNACH B, et al. Mass-scale high-throughput multiplex polymerase chain reaction for human platelet antigen single-nucleotide polymorphisms screening of apheresis platelet donors[J]. Transfusion, 2011, 51: 2028—2033.

[8] BHATTI F A, UDDIN M, AHMED A, et al. Human platelet antigen polymorphisms (HPA-1, -2, -3, -4, -5 and -15) in major ethnic groups of Pakistan[J]. Transfus Med, 2010, 20: 78—87.

(收稿日期:2013-10-14)