

HPA1-6,15 基因遗传多态性在血小板输注中的应用研究*

赵毓宏¹ 曹建平¹ 邓永乐¹ 刘艳¹ 潘优敏¹ 阮国祥¹ 谢珏¹

【摘要】 目的:调查浙江地区人群 HPA 系统遗传多态性特点,探讨临床血小板输注中 HPA 配型输注的应用效果。方法:采用 PCR-SSP 方法对 400 例献血员及 54 例血小板抗体筛检阳性患者进行血小板抗原 HPA1-6,15 系统基因分型,对 54 例患者进行分组血小板输注治疗效果分析。结果:血小板抗原 HPA1-6,15 系统中 HPA-3 的 b 基因频率 0.51,系统 b 基因最高,HPA-15 的杂合度 0.33,系统杂合度最高,其余系统均以 aa 纯合子基因分型占绝对优势,超过 90%。血小板 HPA 配型输注组 CCI、PPR 均明显优于 ABO 随机输注组。结论:在血小板临床输注治疗中应用 HPA 配型血小板可防止输注无效的发生率,从而有效提高血小板输注疗效和安全性,值得推广和应用。

【关键词】 血小板特异性抗原;血小板供者库;血小板输注无效

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2017.08.003

【中图分类号】 R457.1 **【文献标志码】** A

Analysis on genetic polymorphism of human platelet antigen HPA1-6, 15 systems to platelet transfusions

ZHAO Yuhong CAO Jianping DENG Yonglei LIU Yan
PAN Youmin RUAN Guoxiang XIE Jue

(Department of Blood Transfusion, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, 310003, China)

Corresponding author: XIE Jue, E-mail:zyyyxj2011@163.com

Abstract Objective: To study the genetic polymorphism of human platelet antigens in zhejiang, understand the transfusion effect on platelet gene matching group in platelet transfusion. **Method:** Platelet antigen genotyping was performed by sequence-specific primer polymerase chain reaction (SSP-PCR) for the HPA1-6,15 systems in 400 platelet donors and 54 patients of Zhejiang. The effectiveness of different platelet transfusion for 54 patients of platelet antibody screening positive. **Result:** Among HPA1-6,15 systems, HPA-3 has the highest b gene frequency, its frequency is 0.51, HPA-15 has the highest heterozygosity, HPA-15ab 0.33, others systems is mainly aa homozygous genotype, more than 90%. Platelet gene matching group has higher CCI and PPR than the group that receives random platelet group. **Conclusion:** The effectiveness of patients transfusion gene matching platelet prevent from occurrence of platelet transfusion refractoriness and improve the effective rate of transfusion.

Key words human platelet alloantigens; platelet donor registry; platelet transfusion refractoriness

随着输血医学的不断发展,血小板输注日益增加,现已成为临床输血治疗疾病的重要手段,但随之而来的血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness, PTR)也越来越多, PTR 成为制约临床输血治疗的一大难题。现已有大量研究表明,人类血小板同种抗原(human platelet alloantigens, HPA)与新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜(neonatal alloimmune thrombocytopenic, NATP)、输血后紫癜(post transfusion purpura, PTP)以及多次输血后血小板输注无效等有密切关系,据报道 10%~20% 的 PTR、90% 的 NATP 和绝大多数

PTP 的产生与 HPA 基因分型不合相关^[1-2]。为了研究血小板基因遗传多态性在血小板输注疗效中的影响,我们应用序列特异性引物聚合酶链反应(polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP)技术^[3],对临床血小板输注后进行血小板同种抗体筛查,血小板同种抗体阳性患者开展 HPA 基因分型检测,同时构建 HPA 基因分型血小板供者库,为多次输注血小板后 PTR 患者选择 HPA 基因分型相合的供者血小板给予输注,取得了较理想的治疗效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2015-06—2017-06 我院输注血小板后进行血小板同种抗体筛查阳性住院患者 54 例,其中

* 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(No: 2015KYA089)

¹ 浙江大学医学院附属第一医院血液科(杭州,310003)

通信作者:谢珏, E-mail:zyyyxj2011@163.com

男 22 例,女 32 例;年龄 18~67 岁(中位 38 岁)。随机选择我地区机采血小板供者库中献血者 400 例,用于构建 HPA 基因分型血小板供者库。

1.2 试剂与仪器

血小板抗体检测试剂盒(吉林长春博德生物有限公司);全血基因组 DNA 提取试剂盒(天津秀鹏公司);人类血小板同种抗原 HPA1-6,15 基因分型试剂盒(PCR-SSP 法)(天津秀鹏公司);Genecolour I 染料(北京金博益生物技术有限公司);PCR 扩增仪(AB 公司);凝胶电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);BIO-RAD 全自动凝胶成像系统(BIO-RAD 公司)。

1.3 血小板抗体筛查(固相凝集法)

按照血小板抗体检测试剂盒说明书操作,然后判读检测结果。阳性结果:指示红细胞平铺在反应孔底部表面;若指示红细胞只部分结合到反应孔底部,并且结合的区域比阴性对照大,即为弱阳性,表明患者血清或血浆中含有血小板抗体。阴性结果:指示红细胞在反应孔底部中央形成红细胞聚集,表明患者血清或血浆中不含有血小板抗体。如果结果可疑,或阳性对照和/或阴性对照没有出现正确结果,则重新检测。

1.4 全血基因组 DNA 提取

从抗凝试管中取标本全血 400 μ l/份,用全血基因组 DNA 提取试剂盒,按说明书操作,提取产物检测 A_{260}/A_{280} 比值:1.7~2.1,浓度 ≥ 4 μ g/400 μ l 人血。

1.5 HPA1-6,15 基因的 PCR 扩增

按照人类血小板同种抗原 HPA1-6,15 基因分型试剂盒(PCR-SSP 法)说明书操作,取扩增产物 10 μ l,在 2.5% 琼脂糖凝胶 140 V 电泳 15 min,电泳缓冲液为 1% TBE 溶液,凝胶成像分析仪判读结果并拍照。

阳性孔:有 2 条带,一条是内参带,另一条是特异性扩增带;阴性孔:只有一条带,为内参带,无特异性扩增带。无扩增:无任何条带,即内参引物扩增带也未被扩出,根据质控程序,试验无效,重新试验。

1.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 进行统计学分析。根据电泳条带判读每个标本的基因型并统计各基因型的频率,根据群体遗传 Hardy-Weinberg(H-W)平衡,直接计算等位基因频率和表型频率,用 χ^2 检验比较基因型分布观察值与期望值,验证是否符合 H-W 平衡。血小板输注效果的比较采用秩和检验。

等位基因频率: $f(a) = (2 \times \text{纯合子数} + \text{杂合子数}) / (2 \times \text{总数})$, $f(b) = 1 - f(a)$;预期表型频数: $n(aa) = [f(a)]^2 \times \text{观察总数}$, $n(ab) = 2f(a)f(b) \times \text{观察总数}$, $n(bb) = [f(b)]^2 \times \text{观察总数}$;杂合度频率: $f(ab) = \text{杂合子数} / \text{总数}$;不配合率= $f(ab)[1 - f(a)f(b)]$ 。

2 结果

2.1 HPA 基因分型扩增产物鉴定

内对照人类生长激素的扩增产物为 434 bp,其中 HPA-15a,b 内对照扩增产物为 865 bp。HPA1-6,15 的基因扩增产物片段长度见表 1,部分标本 HPA1-6,15 电泳结果见图 1。

表 1 HPA1-6,15 基因长度

HPA 基因	DNA 片段长度
HPA-1a,HPA-1b	196 bp
HPA-2a,HPA-2b	241 bp
HPA-3a,HPA-3b	267 bp
HPA-4a,HPA-4b	252 bp
HPA-5a,HPA-5b	249 bp
HPA-6a,HPA-6b	169 bp
HPA-15a,HPA-15b	278 bp

2.2 HPA1-6,15 等位基因分布

对 400 例献血员及 54 例患者进行 HPA 基因分型,结果显示,仅患者 HPA-1 基因分型均表现为 aa 纯合子,呈单态性表现,其余均表现有多态性;除献血员 HPA-3,15 和患者 HPA-3 基因分型不符合 H-W 平衡定律外,其余系统基因分型均符合 H-W 平衡定律;HPA-3,15 是高杂合度的血型系统,其两者抗原基因频率相似,b 基因频率超过 44%,其中 HPA-3 的 b 基因频率最高,HPA-15 的杂合度最高,其余系统均以 aa 纯合子基因分型占绝对优势,超过 90%,b 基因甚少;对献血员与患者 HPA1-6,15 等位基因分布进行比较,发现各系统($P > 0.05$)在献血员与患者间无差异,详见表 2~4。

2.3 血小板输注疗效

对 54 例血小板抗体筛检阳性患者分组采用 2 种不同方法进行血小板输注,34 例 ABO 随机输注组患者均同型输注供者血小板,20 例 HPA 配型输注组患者均在 HPA 基因型供者库中找到相匹配的供者血小板输注。结果显示,血小板 HPA 配型输注组:校正血小板计数增加值(CCI)、血小板回收率(PPR)均明显优于 ABO 随机输注组;ABO 随机输注组与 HPA 配型组输注后 24 h 血小板计数、CCI、PPR 值均差异有统计学意义。HPA 配型输注组患者输注后皮肤、泌尿系、呼吸道、消化道等出血症状均得到控制。不同输注组血小板输注效果具体比较见表 5。

3 讨论

血小板输注治疗是一种有效预防和改善血小板减少或功能缺陷患者出血的方法。随着临床血小板输注治疗的广泛应用,PTR 的发生率也随之增加,尽管 PTR 涉及因素甚多,但研究表明血小板抗原抗体的同种免疫是影响临床血小板输注治疗

效果的重要因素之一,其中以人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA)抗体的频率最高,其次是 HPA 抗体^[4]。由于 HPA 抗体引起的输血反应程度远高于 HLA 抗体^[5],因此在临床上选择与受血者 HPA 基因配型的供者血小板是减少发生 PTR 的有效方法之一。

多次输血患者约有 8% 会产生 HPA 抗体^[6],

最常见为 HPA-2,3,15 系统,这与相应 HPA 系统在群体中的遗传分布频率有关,如果该人群 HPA 系统杂合度即 ab 基因型较高,则 HPA 系统分布不配合率相对较高,产生相应抗体机率也较高^[7-9]。在本研究中,经统计分析 HPA-15 系统不配合率最高,HPA-3 系统次之,值得注意的是 HPA-2 系统不配合率仅低于前两者,其余系统均以 aa 纯合子

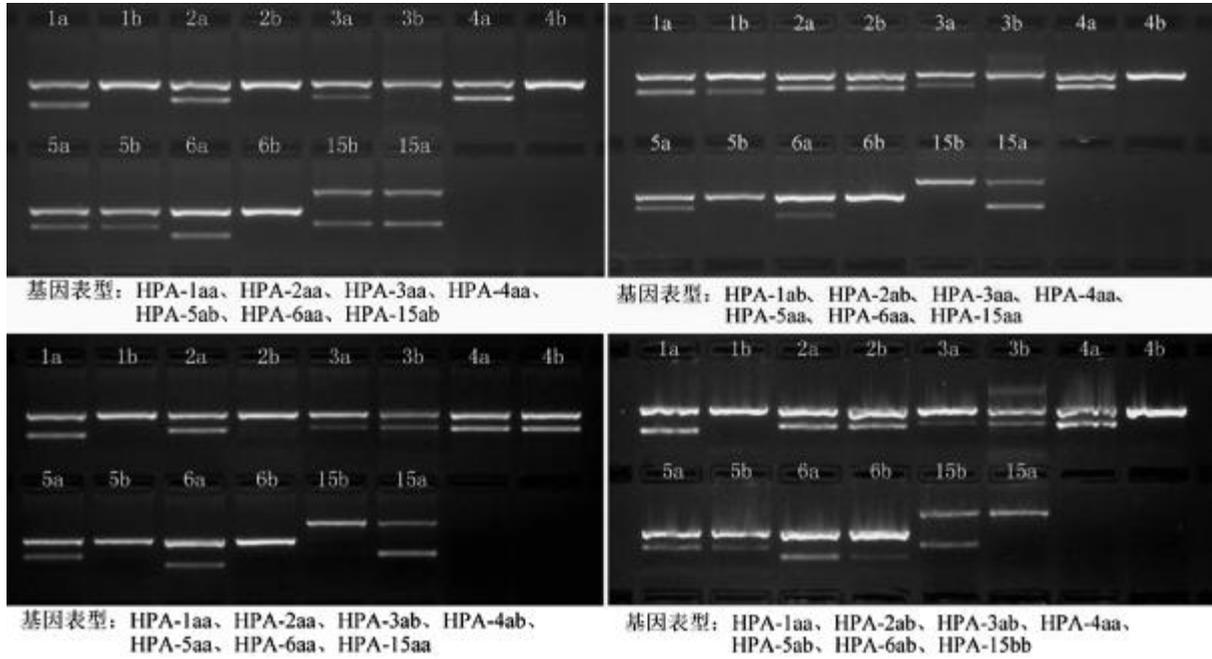


图 1 部分标本 HPA1-6,15 电泳结果

表 2 献血员 HPA1-6,15 等位基因分布结果

n=400

HPA 类型	基因分型(观察值)			基因分型(预期值)			H-W 分析(df=1)	基因频率		不配合率
	aa	ab	bb	aa	ab	bb		a	b	
HPA-1	397	3	0	397.0455	2.9490	0.0055	$\chi^2=0.006$ P=0.936	0.9963	0.0037	0.0075
HPA-2	363	36	1	362.9025	36.1950	0.9025	$\chi^2=0.012$ P=0.914	0.9525	0.0475	0.0860
HPA-3	119	154	127	96.0400	199.9200	104.0400	$\chi^2=21.103$ P<0.001	0.4900	0.5100	0.3109
HPA-4	398	2	0	398.0025	1.9950	0.0025	$\chi^2=0.003$ P=0.960	0.9975	0.0025	0.0050
HPA-5	396	4	0	396.0100	3.9800	0.0100	$\chi^2=0.101$ P=0.920	0.9950	0.0050	0.0100
HPA-6	396	4	0	396.0100	3.9800	0.0100	$\chi^2=0.101$ P=0.920	0.9950	0.0050	0.0100
HPA-15	139	167	94	123.7879	197.4642	78.7479	$\chi^2=9.523$ P=0.002	0.5563	0.4437	0.3303

注: P<0.05, 即不符合 H-W 平衡定律。

表 3 患者 HPA1-6,15 等位基因分布结果

n=54

HPA 类型	基因分型(观察值)			基因分型(预期值)			H-W 分析(df=1)	基因频率		不配合率
	aa	ab	bb	aa	ab	bb		a	b	
HPA-1	54	0	0	54	0	0	NA	1	0	0
HPA-2	49	5	0	49.1154	4.7689	0.1157	$\chi^2=0.027$ P=0.721	0.9537	0.0463	0.0883
HPA-3	19	19	16	15.0429	26.9165	12.0406	$\chi^2=4.671$ P=0.031	0.5278	0.4722	0.2900
HPA-4	53	1	0	53.0003	0.9951	0.0046	$\chi^2=0.005$ P=0.946	0.9907	0.0093	0.0183
HPA-5	53	1	0	53.0003	0.9951	0.0046	$\chi^2=0.005$ P=0.946	0.9907	0.0093	0.0183
HPA-6	53	1	0	53.0003	0.9951	0.0046	$\chi^2=0.005$ P=0.946	0.9907	0.0093	0.0183
HPA-15	17	26	11	16.6693	26.6661	10.6646	$\chi^2=0.034$ P=0.854	0.5556	0.4444	0.3656

注: P<0.05, 即不符合 H-W 平衡定律, NA: 无效。

表 4 献血员与患者 HPA1-6,15 等位基因分布比较

HPA 类型	基因分型(献血员)			基因分型(患者)			基因分型比较(df=1)	
	aa	ab	bb	aa	ab	bb		
HPA-1	397	3	0	54	0	0	$\chi^2=0.408$	$P=0.523$
HPA-2	363	36	1	49	5	0	$\chi^2=0.139$	$P=0.933$
HPA-3	119	154	127	19	19	16	$\chi^2=0.667$	$P=0.716$
HPA-4	398	2	0	53	1	0	$\chi^2=1.325$	$P=0.250$
HPA-5	396	4	0	53	1	0	$\chi^2=0.317$	$P=0.573$
HPA-6	396	4	0	53	1	0	$\chi^2=0.317$	$P=0.573$
HPA-15	139	167	94	17	26	11	$\chi^2=0.808$	$P=0.668$

表 5 不同血小板输注组血小板输注效果比较

$\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$

分组	例数	血小板计数		CCI 24 h	PPR 24 h/%	输注效果/例		PTR 发生率/%
		输注前	输注后 24 h			有效	无效	
ABO 随机输注	34	4.83±1.07	14.33±6.80	4.76±2.30	15.92±6.87	9	25	73.53
HPA 配型输注	20	5.83±1.57	39.67±13.09	16.78±4.64	58.11±17.52	20	0	0
		-1.234	-2.807	-2.722	-2.722			
		0.217	0.005	0.006	0.006			

注:目前临床上以 CCI:20~24 h CCI<4.5×10⁹/L;PPR:20~24 h PPR<20%判定为 PTR。

居多,这与文献报道结果基本一致。在临床血小板输注治疗过程中,由于 ABO 同型随机输注往往会使受血者因血小板同种抗原不相匹配而产生相应抗体。因此,在发生 PTR 时,应尤其注意 HPA-3, 15 系统配合性输注,受血者如为 aa 或 bb 纯合子应尽量选择同型供者。另外,本研究结果发现 HPA-1ab、HPA-2bb、HPA-4ab、HPA-5ab、HPA-6ab 为 HPA 系统低频基因型,构建 HPA 系统供者库可以为低频基因型受血者在发生 PTR 时提供保障,给予 HPA 基因配型血小板,避免输注后发生抗原抗体同种免疫反应。

近年来,国内外对血小板抗原基因分型研究较多,临床上大部分地区并未开展血小板抗原基因配型输注的研究。导致临床上血小板输注疗效较差,有时甚至还出现相反的效果。本研究将 54 例血小板抗体检测阳性患者进行分组输注,同时检测不同治疗方法的两组患者 CCI24 和 PPR。结果显示,血小板 HPA 配型输注组 CCI24、PPR 值均明显优于 ABO 随机输注组;ABO 随机输注组与 HPA 配型输注组输注后 24 h 血小板计数、CCI、PPR 值均有显著性差异,HPA 配型输注组 PTR 发生率为 0。

综上所述,在血小板输注中应用血小板抗原基因配型可防止血小板免疫性抗体的产生及输注无效的发生,从而能有效提高输血疗效和安全性,值得推广和应用。在临床血小板输注治疗中对需多次反复输注血小板治疗患者应考虑给予 HPA 或 HPA 和 HLA 配型输注,减少临床上 PTR 产生,减少血小板的浪费。

参考文献

[1] Boehlen F, Bulla O, Michel M, et al. HPA-genotyping and antiplatelet antibodies in female blood donors

[J]. Hematol J, 2003, 4: 441-444.
 [2] Vassallo RR. Recognition and management of antibodies to human platelet antigens in platelet transfusion-refractory patients[J]. Immunohematology, 2009, 25: 119-124.
 [3] Goldman M, Trudel E, Richard L. Report on the Eleventh International Society of Blood Transfusion Platelet Genotyping and Serology Workshop [J]. Vox Sang, 2003, 85: 149.
 [4] Kupatawintu P, Nathalang O, Charoen R, et al. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and 15 human platelet antigens in Thai blood donors [J]. Immunohematol, 2005, 21: 5-9.
 [5] Feng ML, Liu DZ, 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] Boehlen F, Bulla O, Michel M, et al. HPA-genotyping and antiplatelet antibodies in female blood donors[J]. Hematology Journal, 2003, 4: 441-444.
 [7] Landau M, Rosenberg N. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders [J]. Transfusion, 2011, 51: 558-569.
 [8] Ghevaert C, Rankin A, Huiskes E, et al. Alloantibodies against low-frequency human platelet antigens do not account for a significant proportion of cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: evidence from 1054 cases [J]. Transfusion, 2009, 49: 2084-2089.
 [9] Xu X, Zhu F, Ying Y, Tao S, et al. Simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to 17w by polymerase chain reaction sequence-based typing [J]. Vox Sang, 2009, 97: 330-337.

(收稿日期:2017-07-07)