

937 人份石家庄地区血小板捐献者基因资料库的建立*

苏蔓¹ 李茵¹ 赵倩¹ 钱明明¹ 赵佳¹ 谢晶¹ 王振雷¹ 何路军¹

[摘要] 目的:建立石家庄地区已知 HLA-I(A、B 位点)、HPA 基因型别机采血小板捐献者基因资料数据库,探讨石家庄地区血小板捐献者 HLA-I(A、B 位点)和 HPA-1~17 系统基因多态性分布特点。方法:采用聚合酶链反应-序列特异引物(PCR-SSP)方法石家庄地区 937 例无血缘关系血小板捐献者血液样本进行 HLA-I 类基因 A、B 位点、HPA-1~17 系统基因分型,计算基因频率和基因型频率。结果:937 例无血缘关系血小板捐献者共检出 HLA-A 位点抗原特异性 18 种,其中等位基因频率较高(>0.05)的特异性依次有 A2(0.374 1)、A11(0.166 5)、A24(0.160 7)、A30(0.074 9)、A33(0.065 1)、A1(0.058 2)、A3(0.054 9);检出 HLA-B 位点抗原特异性 40 种,频率大于 0.05 的有 8 个,依次为 B13(0.140 6)、B46(0.077 7)、B61(0.074 9)、B51(0.074 9)、B62(0.068 0)、B35(0.059 9)、B60(0.056 5)、B44(0.050 3),HLA-A-B 单体型频率最高的为 A2-B13(0.045 9),其次为 A2-B46(0.029 9);河北地区汉族人群 HPA 基因 HPA-7~14、HPA-16、HPA-17 均为 aa 纯合子,未检出 b 等位基因。HPA-1~6、15 中杂合度最高的为 HPA-15,不配合率为 37.45%;其次为 HPA-3,不配合率为 36.64%;然后为 HPA-2,不配合率为 6.84%;在 HPA-1~6 和 15 中,HPA-4 的杂合度最低,不配合率仅为 0.22%。结论:初步建立了石家庄地区本地化 HLA-A-B 和 HPA-1~17 基因分型库,并进行了基因频率和单体型频率统计,该基因资料库可为患者提供 HLA 和 HPA 相容或相合的血小板,减少血小板输注无效的发生。

[关键词] 血小板;人类白细胞抗原;人类血小板抗原;血小板输注无效;频率

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.08.017

[中图分类号] R558 **[文献标志码]** A

Establishment of platelet donor registry containing 937 persons with known HLA and HPA typings in Shijiazhuang Area

SU Man LI Yin ZHAO Qian QIAN Mingming ZHAO Jia
XIE Jing WANG Zhenlei HE Lujun

(Hebei Province Blood Center, Shijiazhuang, 050071, China)

Corresponding author: HE Lujun, E-mail: hlj888999@sina.com

Abstract Objective: To establish platelet donor registry with known HLA-I(A, B locus) and HPA typings in Shijiazhuang Area, and to investigate the distribution characteristics of HLA-platelet donor registry with known HLA-I(A, B locus) and HPA-1-17 polymorphisms in platelet donors. **Method:** A total of 937 unrelated platelet donors in Shijiazhuang were genotyped by HLA-I gene A, B locus and HPA-1-17 system by PCR-SSP method, and gene frequency and genotype frequency were calculated. **Result:** A total of 18 HLA-A specific antigens were detected in 937 unrelated platelet donors. The phenotypic specificity of the higher allele frequencies (greater than 0.05) was as follows: A2(0.374 1), A11(0.166 5), A24(0.160 7), A30(0.074 9), A33(0.065 1), A1(0.058 2), A3(0.054 9); In 937 unrelated platelet donors were detected 40 HLA-B specific antigenic sites. There were 8 antigens with a frequency greater than 0.05, there were B13(0.140 6), B46(0.077 7), B61(0.074 9), B51(0.074 9), B62(0.068 0), B35(0.059 9), and B60(0.056 5), B44(0.050 3); The highest frequency of haplotypes of HLA-A-B antigens was A2-B13(0.045 9), followed by A2-B46(0.029 9); In 937 unrelated platelet donors HPA-7-14, HPA-16 and HPA-17 were all homozygous for aa and no b allele was detected. HPA-15 had the highest degree of heterozygosity in HPA-1-6 and 15, and the mismatch rate was 37.45%; followed by HPA-3, the mismatch rate was 36.64%; then HPA-2, the mismatch rate was 6.84%. Among HPA-1-6 and 15, HPA-4 had the lowest heterozygosity, and the mismatch rate was only 0.22%. **Conclusion:** The localized HLA-A-B and HPA-1-17 genotyping libraries were initially established in Shijiazhuang, and the frequency of gene frequencies and haplotype frequencies were calculated. This gene database can provides patients with HLA and HPA compatible platelets and reduce the incidence of platelet transfusion refractoriness.

Key words platelet; human leucocyte antigen; human platelet antigen; platelet transfusion refractoriness; frequency

* 基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划(No:ZL20140047)

¹ 河北省血液中心(石家庄, 050071)

通信作者:何路军, E-mail: hlj888999@sina.com

血小板输注是目前用于预防和治疗血小板减少或血小板功能缺失引发出血而采取的主要治疗手段。然而多次输血或输注血小板的患者可产生血小板同种抗体,血小板抗体的产生概率随着血小板输注量和输注次数的增多而不断增高^[1]。血小板同种抗体,包括红细胞抗原(ABH)抗体、人类白细胞抗原(human leucocyte antigen,HLA)抗体、人类血小板抗原(human platelet antigen,HPA)抗体^[2]。同种抗体的产生会导致血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness,PTR),严重影响临床治疗效果同时也造成宝贵的血小板资源的浪费。大量研究资料表明,输注 HLA 和 HPA 同型血小板可有效避免血小板抗体的产生,这就需要有一个已知型别的小血小板捐献者基因资料库。本研究采用 PCR-SSP 技术对石家庄地区 937 例固定无偿献血小板捐献者的 HLA-A-B 位点和 HPA-1~17 系统的 34 个等位基因进行分型,初步建立了石家庄地区已知型别血小板捐献者基因资料库,同时统计了本地区血小板捐献者 HLA-A-B 和 HPA-1~17 系统基因分布特点,现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

石家庄地区汉族无血缘关系固定机采血小板捐献者 937 例,告知其试验目的,留取静脉 EDTA 抗凝血 5 ml/例。

1.2 DNA 提取

采用 TIANGEN 血液基因组 DNA 提取试剂盒(批号:O3327)进行 DNA 提取,PCR 扩增前将浓度调整至 30~70 ng/ μ l。

1.3 HLA 基因分型

HLA 基因分型采用 TBG 公司 MorganTM HLA SSP ABDR Typing Kit(批号:FA16091),严格按试剂说明书操作,电泳后凝胶成像记录结果。利用 Arlequin 软件进行 HLA 单体型统计。

1.4 HPA 基因分型

HPA 基因分型采用 TBG 公司 HPA typeTM Platelet SSP Typing Kit(批号:M316121K),严格按试剂说明书操作,电泳后凝胶成像记录结果。

1.5 统计学分析

HLA-A、B 位点基因分型,抗原频率(f):表型具有某抗原的个体数占群体中的比率或百分率。 $f = C/N$, C :具有某抗原的个体数, N :调查样本的群体总数。基因频率(Gene Frequency,GF):采用方根法由已知的抗原频率推导出, $GF = 1 - \sqrt{1-f}$ 。

HPA 基因分型采用直接计数法计算基因频率。HPA 系统对偶抗原不配合率采用公式 $P =$

$2ab(1-ab)$ (a, b 分别代表 a 和 b 的基因频率)计算。

2 结果

937 例石家庄地区血小板捐献者共检出 HLA-A 位点抗原特异性 18 种,HLA-B 位点抗原特异性 40 种。其中 A 位点等位基因频率较高的特异性依次有 A2(0.374 1)、A11(0.166 5)、A24(0.160 7)、A30(0.074 9)、A33(0.065 1)、A1(0.058 2)、A3(0.054 9),共占该位点基因频率的 76.3%,见表 1。B 位点等位基因频率较高的特异性依次有 B13(0.140 6)、B46(0.077 7)、B61(0.074 9)、B51(0.074 9)、B62(0.068 0)、B35(0.059 9)、B60(0.056 5)、B44(0.050 3),见表 2。

937 例血小板捐献者频率 >0.01 的 HLA-A-B 单体型共 25 种,频率最高的为 A2-B13,见表 3。血小板捐献者 HPA-1~17 基因分布 HPA-7~14、HPA-14、HPA-15 呈单特异性,未检出相应的 b 等位基因。HPA-1~6 和 HPA-15 中,不配合率较高的是 HPA-15 和 HPA-3,见表 4。

表 1 石家庄地区血小板捐献者 HLA-A 位点抗原频率和基因频率

基因型	抗原特异性	抗原频率	基因频率
A*01	A1	0.113 1	0.058 2
A*02	A2	0.608 3	0.374 1
A*210	A210	0.009 6	0.004 8
A*203G	A203	0.037 4	0.018 9
A*03	A3	0.106 7	0.054 9
A*11	A11	0.305 2	0.166 5
A*24	A24	0.295 6	0.160 7
A*2403	A2403	0.002 1	0.001 1
A*25	A25	0.005 3	0.002 7
A*26	A26	0.080 0	0.040 8
A*29	A29	0.009 6	0.004 8
A*30	A30	0.144 1	0.074 9
A*31	A31	0.069 4	0.035 3
A*32	A32	0.041 6	0.021 0
A*33	A33	0.125 9	0.065 1
A*66	A66	0.006 4	0.003 2
A*68	A68	0.037 4	0.018 9
A*69	A69	0.002 1	0.001 1

3 讨论

目前我国临床血小板输血只考虑 ABO 血型相合,主要采用随机输血,即所谓的“盲输”。多次“盲输”会引起患者产生免疫排斥反应而导致输注无效,严重者可导致患者因血小板数量下降而发生出血或死亡,同时浪费大量宝贵的血液资源,给“血荒”现象雪上加霜。多次输血的患者会产生血小板

表 2 石家庄地区血小板捐献者 HLA-B 位点抗原频率和基因频率

基因型	抗原特异性	抗原频率	基因频率	基因型	抗原特异性	抗原频率	基因频率
B* 07	B7	0.068 3	0.034 8	B* 4002G	B61	0.1441	0.074 9
B* 08	B8	0.033 1	0.016 7	B* 41	B41	0.004 3	0.002 2
B* 13	B13	0.261 5	0.140 6	B* 44	B44	0.098 2	0.050 4
B* 1401G	64	0.001 1	0.000 6	B* 45	B45	0.003 2	0.001 6
B* 1402G	65	0.011 7	0.005 9	B* 46	B46	0.149 4	0.077 7
B* 1501G	B62	0.131 4	0.068 0	B* 47	B47	0.002 1	0.001 1
B* 1502G	B75	0.080 0	0.040 8	B* 48	B48	0.093 9	0.048 1
B* 1503G	B72	0.001 1	0.000 6	B* 49	B49	0.004 3	0.002 2
B* 1510G	B71	0.045 9	0.023 2	B* 50	B50	0.020 3	0.010 2
B* 1512G	B76	0.001 1	0.000 6	B* 51	B51	0.144 1	0.074 9
B* 1513G	B77	0.002 1	0.001 1	B* 5102	B5102	0.019 2	0.009 6
B* 1516G	B63	0.004 3	0.002 2	B* 52	B52	0.070 4	0.035 8
B* 18	B18	0.007 5	0.003 8	B* 54	B54	0.045 9	0.023 2
B* 27	B27	0.031 0	0.015 7	B* 55	B55	0.028 8	0.014 5
B* 35	B35	0.116 3	0.060 0	B* 56	B56	0.007 5	0.003 8
B* 37	B37	0.042 7	0.021 9	B* 57	B57	0.018 1	0.009 1
B* 38	B38	0.063 0	0.032 0	B* 58	B58	0.073 6	0.037 5
B* 39	B39	0.004 3	0.002 2	B* 59	B59	0.001 1	0.000 6
B* 3901	B3901	0.028 8	0.014 5	B* 67	B67	0.023 5	0.011 8
B* 4001G	B60	0.109 9	0.056 5	B* 81	B81	0.003 2	0.001 6

表 3 常见 HLA-A-B 抗原单体型频率

单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率
A2-B13	0.045 9	A2-B35	0.018 1	A11-B62	0.012 3
A2-B46	0.029 9	A2-B60	0.015 5	A2-B7	0.011 2
A2-B62	0.026 7	A11-B60	0.015 5	A24-B48	0.011 2
A2-B61	0.025 1	A24-B13	0.014 9	A24-B62	0.011 2
A33-B58	0.022 9	A2-B48	0.014 4	A24-B46	0.011 2
A30-B13	0.022 4	A24-B61	0.014 4	A11-B61	0.010 1
A11-B13	0.021 3	A24-B51	0.014 4	A11-B46	0.010 1
A2-B75	0.020 8	A11-B51	0.013 9		
A2-B51	0.018 1	A33-B44	0.013 3		

表 4 石家庄地区血小板捐献者 HPA 基因型和基因频率分布

抗原	基因型个数			基因频率		MMP
	aa	ab	bb	a	b	
HPA-1	926	11	0	0.994 1	0.005 9	0.011 7
HPA-2	868	69	0	0.963 2	0.036 8	0.068 4
HPA-3	352	405	180	0.591 8	0.408 2	0.366 4
HPA-4	935	2	0	0.998 9	0.001 1	0.002 2
HPA-5	918	19	0	0.989 9	0.010 1	0.019 8
HPA-6	928	9	0	0.995 2	0.004 8	0.009 5
HPA-7	937	0	0	1.000 0	0	0
HPA-8	937	0	0	1.000 0	0	0
HPA-9	937	0	0	1.000 0	0	0
HPA-10	937	0	0	1.000 0	0	0
HPA-11	937	0	0	1.000 0	0	0
HPA-12	937	0	0	1.000 0	0	0
HPA-13	937	0	0	1.000 0	0	0
HPA-14	937	0	0	1.000 0	0	0
HPA-15	314	351	272	0.5224	0.477 6	0.374 5
HPA-16	937	0	0	1.000 0	0	0
HPA-17	937	0	0	1.000 0	0	0

抗体,HLA 与 HPA 抗体是血小板抗体最主要的组成部分也是导致 PTR 的主要原因^[3]。韩文导等^[4]的研究表明,血小板抗体阳性率及 PTR 例数与输血次数呈正相关。对于已经产生由于同种免疫反应所导致的 PTR 患者,目前多选用交叉配型的方式选择相合的血小板进行输注,这是一种是较为经济适用且有效降低 PTR 的措施。但是,利用交叉配合试验进行血小板输注仅能保证当次使用的有效性,对于已经产生 PTR 的患者,每次输注前必须进行大量的血小板交叉配合试验,极大增加了患者的负担,同时采用交叉配血进行血小板输注虽然可以有效降低免疫性血小板输血反应的发生,但仍无法彻底避免^[5]。进行血小板 HLA 和 HPA 配合性输注可有效避免 PTR 的发生,而对于临床已经出现 PTR 的患者,采取 HLA 和 HPA 同型输注也可以明显改善疗效,Moroff 等^[6]研究表明输注 HLA A 级和 Bu 级相合的血小板效果好于仅交叉配型相合的血小板。而要实现 HLA 和 HPA 同型输注就需要建立一个本地化已知 HLA 和 HPA 型别血小板捐献者基因资料库,对解决本地区同种免疫造成的 PTR 具有重要的意义。

血小板表面存在 HLA-I 类抗原,缺少 HLA-II 抗原。HLA 抗原性较强,输注 HLA 不合的血小板易引起同种免疫,据报道,90%的免疫性 PTR 由 HLA 抗体引起^[7]。本研究中石家庄地区血小板无偿捐献者 HLA 基因频率表达最高的为 A2 和 B13,与其他地区汉族差别不大。HPA 抗体在免疫性 PTR 中所占的比例较 HLA 抗体低,但 HPA 抗体引起的输血反应破坏程度远高于 HLA 抗体^[8]。HPA 抗体的产生概率与人群中 HPA 抗原分布频率有关,对偶抗原不配合的比例越高,产生 HPA 抗体的概率越大,导致 PTR 的可能性越大。石家庄地区 937 例血小板捐献者 17 个 HPA 系统中 HPA-7~14、HPA-16、17 均为 aa 纯合,HPA-1~6、HPA15 同时检测到 a、b 等位基因,其中不配合率最高的为 HPA-15、HPA-3,均超过 35%,在血小板输注中需给予关注。

各地区 HLA、HPA 人群分布情况有其自身的特点,故血小板供者库的库容,因人种、遗传背景不同,相关报道的数据也不相同。Takahashi 计算后认为理论上日本 5 000 例的供者库中 80%的患者可以找到 5 个 A 级配合供者,而在高加索人和北美人则可能分别需要 18 000 和 25 000 例供者

库。戴宇东^[9]研究认为中国汉族人群 HPA 分型单采血小板供者单库容 600 例的供者库可以满足 75%患者,有 95%的可找到至少 1 名 HPA-1~16 系统完全相同的供者。但此库容估算仅考虑了 HPA 和 ABO 血型相合,没有考虑 HLA 相合,由于 HLA 抗原有着丰富的遗传多态性,要做到供受者间 HLA 全相同较为困难。采用配合型血小板输注策略可以有效解决这一问题,即 HPA 全相同,HLA CREG 相同的配型策略^[10],但即便是 HLA CREG 相同也使得需要血小板捐献者基因资料库的库容成几何级增长,我们目前建立的 937 例的血小板供者基因资料库虽然已经进行临床应用并且输注效果良好,但还远不能保证石家庄产生免疫性抗体的患者都能有机会找到合适的供者,这就需要进一步扩大库容以满足临床需要。

参考文献

- [1] 周琼秀,李执如,林嘉.血小板配型在血小板输注中的应用[J].中国输血杂志,2008,21(7):526-527.
- [2] 赵桐茂.人类血小板抗原(HPA)研究概况[J].中国输血杂志,2004,17(2):129-132.
- [3] 朱奕,伍昌林,党鑫堂,等.反复输血患者血小板抗体检测结果分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(9):1130-1131.
- [4] 韩文导,罗华山,魏明燕.反复输血患者的血小板抗体检测分析及其意义[J].临床血液学杂志(输血与检验),2017,30(8):618-620.
- [5] 张晰,冯明亮,沈彤,等.单采血小板输血反应调查及其输注无效解决策略[J].中国输血杂志,2013,26(6):506-510.
- [6] Moroff G, Garratty G, Heal J, et al. Selection of platelets for refractory patients by HLA matching and prospective crossmatching [J]. Transfusion, 1992, 32: 633-640.
- [7] 李归宁,胡丽华.血小板输注无效[J].临床血液学杂志(输血与检验),2009,22(10):564-567.
- [8] 于江虹,杨帆,焦立新,等.长春地区无偿献血者 HPA1-6,15 基因分型及频率调查[J].中国实验诊断学,2011,15(4):680-682.
- [9] 戴宇东.中国汉族人群 HPA 分型单采血小板供者库的建立模式与库容[J].中国实验血液学杂志,2010,18(4):1046-1050.
- [10] 陆萍,沈彤,沈伟,等. HPA 和 HLA 已知型的血小板供者库建立及应用[J].中国输血杂志,2012,25(10):1026-1027.

(收稿日期:2018-06-08)