

中山地区血小板供者 HLA 基因分型资料库的建立

袁文声, 何锐洪, 梁玉初 (广东省中山市中心血站 528400)

【摘要】 目的 建立血小板供者 HLA 基因分型资料库, 探讨 HLA-A、B 基因频率及单体型频率, 为临床患者提供 HLA 匹配的血小板, 解决血小板输注无效 (PTR) 患者的血小板输注。方法 采用聚合酶链反应-序列特异寡核苷酸探针杂交技术 (PCR-SSOP) 对 568 名中山地区单采血小板捐献者进行 HLA-I 类 (A、B 位点) 基因分型并形成数据库, 根据 HLA 表型群体资料, 使用最大数学预期值算法 (EM) 计算 HLA-A、B 单体型频率。结果 HLA-A 位点共检出 17 种等位基因, HLA-B 位点共检出 29 种等位基因, 单体型数 153 种。结论 血小板供者 HLA 分型资料库的建立可以为 PTR 患者迅速寻找到 HLA 相合血小板, 提高血小板输注效果。

【关键词】 血小板供者; HLA; 基因频率; 单体型

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.13.021 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)13-1579-02

Establishment of platelet donor registry with known HLA typings in Zhongshan area YUAN Wen-sheng, HE Rui-hong, LIANG Yu-chu (The Red Cross Blood Center of Zhongshan City, Guangdong 528400, China)

【Abstract】 Objective To establish a voluntary apheresis platelet donor registry with HLA typings in Zhongshan and study the allelic frequencies and haplotype frequencies of HLA-A, B. In order to resolve the platelet transfusion refractoriness (PTR). **Methods** HLA class I of 568 regular apheresis platelet donors in Zhongshan region were genotyped by PCR-SSOP and haplotype frequencies were calculated by computer software named Arlequin which was based on Expectation-Maximization (EM) algorithms. **Results** The number of alleles identified was 17 for HLA-A, 29 for HLA-B, and 153 for haplotype respectively. **Conclusion** The establishment of voluntary apheresis platelet donors registry with HLA typings can rapidly find compatible donors for patients with platelet transfusions refractoriness (PTR), and improve the effect of platelet transfusion.

【Key words】 platelet donor; HLA; gene frequency; haplotype

临床上引发血小板输注无效 (PTR) 的原因很多, 包括免疫因素和非免疫因素, 对于反复输血或输血小板的患者, 多以免疫因素为主, 主要原因是由反复输血后引发同种免疫反应所致。文献报道反复输注血小板的患者中 HLA 抗体阳性率占 80%, 而单纯 HPA 抗体阳性率仅占少数^[1]。对于已发生 PTR 的患者, 在排除非免疫因素后, 如何进行血小板供者筛选至关重要。鉴于 HLA 的遗传多态性, 结合群体遗传资料建立适当规模的已知 HLA 分型信息的无偿血小板供者库成为解决 PTR 血小板输注的有效方法, 已知分型血小板供者库的建立可迅速找到匹配供者。本文应用聚合酶链反应-序列特异寡核苷酸探针杂交技术 (PCR-SSOP) 方法, 对中山地区固定单采血小板捐献者进行 HLA-I 类 (A、B 位点) 基因分型并形成数据库, 分析其 HLA-A、B 基因频率及单体型频率, 为解决 PTR 的临床输血奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 研究对象 中山 568 名加入中华骨髓库的固定无偿血小板捐献者, 采集血样 5 mL, 乙二胺四乙酸抗凝。

1.2 仪器与试剂 TECAN-100 型全自动 DNA 工作站 (瑞士 TECAN 公司), PE 型 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司); 3100 型、3730 型 DNA 测序仪 (美国 ABI 公司), DNA 提取试剂盒、HLA-A、B 基因分型试剂盒 (美国 Promega 公司)。

1.3 HLA-A、B 基因分型 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 基因频率 采用方根法计算基因频率 (GF)^[2]。计算公式为 $GF = 1 - (1 - C/N)^{1/2}$, N 为调查的人数, C 为观察到带有某基因的个体数。

1.5 HLA 单体型频率 采用最大数学预期值估算法 (EM)^[3], 计算软件应用 Arlequin。

1.6 血小板供者库规模 采用单体型频率 (HP) 估算供者库规模^[3], 假设有 95% 的把握在供者库中检测到该单体型, 那么计算公式: $N = -1.3010 / \lg(1 - 2HP + HP^2)$, N 为血小板供者库所需的最少人数, HP 为单体型频率。

2 结果

2.1 HLA 分型 见表 1。共检出 A 位点表现型 17 个, B 位点检出表现型 29 个。其中 A 位点等位基因频率较高的表现型依次有 A11、A24、A2、A33, 共占该位点基因频率的 86.14%; B 位点等位基因频率较高的表现型依次有 B40、B15、B46、B58 和 B13, 共占该位点频率的 73.36%。

表 1 HLA-A、B 座基因频率

基因型	表现型	观察值 (n=568)	基因频率 (%)
A*01	A1	22	0.02
A*02	A2	329	0.16
A*03	A3	9	0.01
A*11	A11	355	0.40
A*23	A23	3	0.00
A*24	A24	188	0.18
A*26	A26	24	0.02
A*29	A29	12	0.01
A*30	A30	23	0.02
A*31	A31	16	0.01
A*32	A32	6	0.01

续表 1 HLA-A、B 座基因频率

基因型	表现型	观察值(n=568)	基因频率(%)
A * 33	A33	134	0.13
A * 34	A34	1	0.00
A * 66	A66	2	0.00
A * 68	A68	3	0.00
A * 69	A69	1	0.00
A * 74	A74	2	0.00
B * 07	B7	13	0.01
B * 08	B8	5	0.00
B * 13	B13	109	0.10
B * 14	B14	1	0.00
B * 15	B15	176	0.17
B * 18	B18	5	0.00
B * 27	B27	17	0.02
B * 35	B35	49	0.04
B * 37	B37	6	0.01
B * 38	B38	58	0.05
B * 39	B39	22	0.02
B * 40	B40	201	0.20
B * 41	B41	1	0.00
B * 44	B44	15	0.01
B * 45	B45	3	0.00
B * 46	B46	167	0.16
B * 47	B47	1	0.00
B * 48	B48	19	0.02
B * 49	B49	2	0.00
B * 50	B50	3	0.00
B * 51	B51	58	0.05
B * 52	B52	24	0.02
B * 54	B54	20	0.02
B * 55	B55	24	0.02
B * 56	B56	10	0.01
B * 57	B57	2	0.00
B * 58	B58	116	0.11
B * 67	B67	6	0.01
B * 73	B73	1	0.00

2.2 HLA-A、B 双座位单倍型频率 见表 2。

表 2 血小板捐献者 HLA-A、B 双座位单倍型频率 (HP>0.01)

单体型	频率(%)	单体型	频率(%)
A33~B58	0.088	A2~B38	0.023
A2~B15	0.067	A24~B46	0.022
A11~B15	0.062	A11~B38	0.019
A11~B40	0.062	A11~B35	0.016 9
A2~B46	0.057	A24~B15	0.016 9
A11~B46	0.047	A11~B51	0.016
A24~B40	0.047	A2~B35	0.012

续表 2 血小板捐献者 HLA-A、B 双座位单倍型频率 (HP>0.01)

单体型	频率(%)	单体型	频率(%)
A2~B13	0.043	A24~B51	0.010
A2~B40	0.043	A2~B51	0.010
A11~B13	0.039	A33~B40	0.010

2.3 血小板供者库最少规模估算 HF>0.01 的所有单体型频率之和为 0.713,即如果按照 HF=0.01 的单体型估算供者库规模为 150 人,即一个 150 人的供者库超过 70% 的患者有 95% 的可能性找到至少 1 例 HLA 相合的供者。HF>0.001 的所有单体型频率之和为 0.962,如果按照 HF=0.001 的单体型估算供者库规模为 1 500 人,即一个 1 500 人的供者库有超过 95% 的患者有 95% 的可能性找到至少 1 例 HLA 相合的供者。

3 讨 论

血小板已被广泛应用于预防和治疗因血小板减少和(或)血小板功能缺陷患者的出血,尤其是随着恶性肿瘤以及白血病大剂量化疗的应用,造血干细胞移植的广泛开展,血小板输注更成为重要的辅助疗法。但是,患者在多次输注全血和血小板、妊娠及器官移植后可产生血小板抗体而引起同种异体免疫而致血小板破坏,导致血小板输注无效(PTR),文献报道反复输注血小板的患者中 HLA 抗体阳性率占 80%^[1],而单纯 HPA 抗体阳性仅占少数。对于已发生 PTR 的患者,在排除非免疫因素后,如何进行血小板供者筛选至关重要。鉴于 HLA 的遗传多态性,结合群体遗传资料建立适当规模的已知 HLA 分型信息的无偿血小板供者库为解决 PTR 血小板输注的有效方法,已知分型血小板供者库的建立可迅速找到匹配供者,准确的血小板 HLA 抗原分型对于疾病的诊断和治疗非常有价值。至于如何建立血小板供者库,在国内已有较成熟的经验^[4-6]。本文结合实际,主要依靠 2 个方面,一是从无偿血小板捐献者中发展其加入外周血干细胞捐献者资料库;二是从已加入外周血干细胞捐献者资料库献血者中发展血小板捐献者。通过这两种途径可以有效的降低血小板捐献者 HLA 基因分型资料库的建库成本。本站现已建立有 568 名血小板捐献者的 HLA 基因分型资料库。经分析,该 568 名血小板捐献者 HLA 基因频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡。中山地区血小板捐献者 HLA 基因频率较高的表达有 A11、A24、A02、A33、B40、B15、B46、B58 和 B13,与国内其他地区汉族的基因频率分布大致相同。另外,A33~B58、A2~B15、A11~B15、A11~B40 和 A2~B46 单体型表达频率较高,具有地域性特点。

一个血小板供者库到底有多大才能有实际意义,从理论上讲,供者库越大其使用价值越大,但是这样会使建库成本过大。文献报道,一个 5 000 人的血小板供者库,有 80% 的患者可以在其中找到 5 个 A 级配合的供者^[7]。但不同遗传背景的患者在同一血小板供者库中找到配合性供者的概率差别很大^[8],因此血小板供者库的建立要因因地制宜,根据当地人群 HLA 分布频率,建立本地区供者库,主要满足本地患者需要。本研究发现在中山人群如果供者库规模到 1 500 人,那么 95% 的患者可有 95% 的可能可以找到至少 1 个 HLA 完全相合的供者,但若结合 ABO 同型输注的要求,供者库的规模需要更大,且由于患者的遗传背景不同,不同的患者在同一个血小板供者库中找到配合性供者的概率差别很大。(下转第 1582 页)

3 讨 论

GH 已成为最常见的性传播疾病之一,且发病率快速增长,生殖器感染 HSV 后临床表现多种多样,典型表现为具有特征性的水疱、脓疱、小溃疡,但表现不典型、亚临床无症状感染相当多见^[2-3];不典型的表现有裂隙、裂纹、细小线状溃疡,非特异性红斑、丘疹、毛囊炎、硬结、疖肿等^[4]。对该疾病的诊断主要依据病史、临床表现及实验室检查。常用的检验诊断技术包括细胞学、微生物学、免疫学和分子生物学诊断。细胞培养分离病毒是生殖器疱疹病原学诊断的“金标准”,但操作繁琐,培养周期长,且技术要求较高,不便于一般实验室开展。在没有生殖器疱疹临床损害而无法检测 HSV-Ⅱ 抗原时,测定血清抗体具有它的优越性,机体在感染 HSV 后,血液中针对 HSV 的抗体会在 1 周左右出现,在 3~4 周达到高峰,并可持续多年,但由于 HSV 感染后产生的潜伏状态,使得正常的非发患者群仍具有较高的 HSV 抗体阳性率^[5],可以发现是否曾有过 HSV-Ⅱ 感染。所以 HSV 抗体的血清学检测方法有其他实验室检测方法不能比拟的优势,该法适用于检测亚临床无症状 HSV 患者、复发人群及大规模的流行病学调查^[6]。发现有典型 GH 皮损患者组 HSV-Ⅱ 血清抗体阳性率为 61.29%,无典型 GH 皮损患者组,HSV-Ⅱ 血清抗体阳性率为 22.76%,提示应用 ELISA 检测 HSV-Ⅱ 抗体有一定意义。至于 36 例有典型临床表现的 GH 患者均未检出任何抗体,可能与下列因素有关,是单纯疱疹Ⅰ型所致,在 HSV-Ⅱ 感染初期,血清中尚未出现抗体,还有机体对 HSV-Ⅱ 感染的免疫低反应性,不能形成易检测抗体。

GH 常见临床症状是生殖器部位出现水疱、脓疱、溃疡或糜烂,对其疱液或渗出液进行 HSV 检测,PCR 检出率阳性率高为 92.47%,但对无皮损的泌尿生殖道分泌物进行 HSV 检测阳性率较低为 15.45%。PCR 检测作为一种近年来广为使用的检查手段,在微量体液的病毒检测方面显示出了巨大的潜力^[7-8]。具特异性高,检验快速等优点,它的敏感性较细胞培养高,已初步在临床病毒检验工作中,显示出了较大的优越性^[9],该法适应于有典型 GH 皮损疑为单纯疱疹感染患者,但由于标本易受污染,尤其对病毒含量少,成分复杂的女性生殖道标本处理困难,易造成假阳性或假阴性结果。且需要特殊的仪器和试剂,在普及推广中,目前尚有困难。建议在 GH 有临床症状时采用 PCR 检查,无典型皮损的患者可采用血清学作抗体检

查。

虽然 HSV 的感染机制尚不甚明了,但随着分子生物学的推广应用,检测技术和治疗预防措施的不断改进,以及联合疫苗的研发,人类肯定能彻底解密 HSV 感染,做到早预防、早发现、早治疗。

参考文献

- [1] 鄢黎明,张俊,胡飞虎,等.疑似生殖器疱疹患者单纯疱疹病毒抗原检测结果分析[J].中国皮肤性病杂志,2006,20(7):428-429.
- [2] Safrin S, Shaw H, Bolan G, et al. Comparison of virus culture and the polymerase chain reaction for diagnosis of mucocutaneous herpes simplex virus infection [J]. Sex Transm Dis, 1997, 24(3):176-180.
- [3] 赖伟红,韩国柱,王千秋,等.126 例生殖器疱疹的临床和病毒学检查的分析[J].临床皮肤科杂志,2001,30(2):75-77.
- [4] 赖伟红,邵长庚.生殖器疱疹的研究进展[J].中国麻风皮肤病杂志,2002,18(4):372-374.
- [5] 徐安健,赵高潮,乌娜娜,等.单纯疱疹病毒血清学检测及其临床应用进展[J].国际医学寄生虫病杂志,2010,37(6):381-383.
- [6] 李翠英.对 ELISA 检测生殖器疱疹患者 HSV 及其临床应用的评价[J].中国皮肤性病杂志,2005,19(10):630-631.
- [7] 李莉,宋武琦,李晓光,等.病毒分离和 PCR-RFLP 法对急性结膜炎标本中腺病毒感染及其分型的分析[J].中国微生态学杂志,2005,17(2):97-99.
- [8] 范松涛,孙洪臣.聚合酶链式反应检测角膜内皮炎泪液及房水中单纯疱疹病毒 DNA [J].中国实用眼科杂志,2002,20(10):738-740.
- [9] 蒲力群,杨丕忠,霍满鹏,等.PCR 检测分析单纯疱疹病毒及其意义[J].延安大学学报:医学科学版,2005,3(2):6-8.

(收稿日期:2012-03-08)

(上接第 1580 页)

通过建立已知的血小板捐献者 HLA 基因分型资料库,掌握本地域人群中 HLA 基因分布情况,可以为临床提供 HLA 匹配的血小板制品,降低免疫性血小板输注无效的发生率,进一步提高临床输注血小板的安全性、有效性。

参考文献

- [1] 刘达庄,包于勤,陆萍,等.血小板抗体检测在输血中的重要意义[J].中国输血杂志,1999,12(2):116-119.
- [2] 吴国光,邓志辉,高素青,等.6 965 名汉族骨髓库供者 HLA 多态性分析[J].中华内科杂志,2004,25(8):473-477.
- [3] 孙继力,杜可明,傅敏,等. HLA-A, B, DRB1 单体型频率计算机在骨髓库的应用[J].中国输血杂志,2005,18(4):280-285.
- [4] 金蕾,傅启华,严力行.血小板供者库的建立与应用初探

[J].临床输血与检验,2001,3(3):8210.

- [5] 付涌水,夏文杰,叶欣,等.广州地区汉族人群人类血小板同种抗原及 HLA-I 抗原基因分型库的建立[J].中国输血杂志,2009,22(4):274-277.
- [6] 焦淑贤,迟晓云,冯智慧,等.青岛地区已知 HLA 和 HPA 分型血小板供者库的建立和临床应用[J].中国输血杂志,2010,23(9):675-678.
- [7] Takahashi K, Juji T, Miyazaki H. Determination of an appropriate size of unrelated donor pool to be registered for HLA-matched platelet transfusion[J]. Transfusion, 1987, 27(5):394-398.
- [8] Schiller CA, Keller C, Dutcher JP, et al. Potential HLA-matched platelet donor availability for alloimmunized patients[J]. Transfusion, 1983, 23(4):286-289.

(收稿日期:2012-03-12)