

南宁地区血小板输注无效患者血小板同种抗体检测及特异性分析*

周燕 李丽兰 钟周琳 刘金莲 申卫东 吴国光

【摘要】 目的 分析血小板输注无效(PTR)患者血小板同种抗体的特异性,以便更好的为临床服务。方法 检测并鉴定 72 例 PTR 患者血小板同种抗体的特异性;采用流式细胞术(FCM)对其中 4 例患者进行血小板、单核细胞膜上的 CD36 抗原检测;基因测序法对上述 4 例患者进行 CD36 抗原缺失分型。结果 72 例 PTR 患者中有 22 例产生血小板同种抗体,其中 18 例为抗 HLA 抗体,3 例为抗 CD36 抗体,1 例为抗 CD36 及抗 HLA 抗体并存;4 例含抗 CD36 抗体的患者经证实均为 I 型 CD36 缺失个体,基因检测也证实为 CD36 基因突变所致的 CD36 抗原缺失。结论 PTR 患者血小板同种抗体以抗 HLA 多见,其次为抗 CD36;应对 CD36 抗原给予足够重视。

【关键词】 血小板输注无效 同种抗体 CD36 缺失 基因突变

【中图分类号】 R331.1⁺43 R392.11 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-2587(2015)02-0103-04

Detection and Analysis of Platelet Alloantibody in PTR Patients in Nanning ZHOU Yan, LI Li-Lan, ZHONG Zhou-Lin, et al. Nan-ning Blood Center, Nan-ning Institute of Transfusion Medicine, Nanning 530007

【Abstract】 **Objective** The specificity in the patients of platelet alloantibodies in platelet transfusion refractoriness (PTR) was detected and analyzed for its appropriate use in platelet transfusion. **Methods** Serum samples from 72 patients who were refractory to platelet transfusion were tested by ELISA. CD36 expression on platelets and monocytes were examined by flow cytometry(FCM). The CD36 mutation of the patients was confirmed by gene sequencing. **Results** Among 72 patients, 22 patients presented platelet alloantibody, of which 18 cases showed HLA antibodies, 3 exhibited CD36 antibodies, and CD36 and HLA antibodies coexisted in one patient. The 4 patients were found to be type I CD36 deficient, and CD36 mutation was identified by gene sequencing. **Conclusions** The platelet alloantibodies in PTR patients predominantly belong to HLA antibodies, followed by the antibodies against CD36, which is a crucial antigen in Chinese population.

【Key Words】 Platelet transfusion refractoriness Alloantibody CD36 deficiency Gene mutation

血小板表面有丰富且复杂的血型抗原,如人类血小板抗原(Human Platelet Antigen, HPA)、HLA-I 类及 ABH、CD36 抗原等,经免疫刺激可产生抗 HPA、抗 HLA、抗 CD36 抗体等。近年随着成分输血在临床上的不断推广和应用,血小板输注治疗有了突飞猛进的发展,现已成为血液病及肿瘤患者的有效支持疗法。但长期接受血小板支持治疗的患者极易产生同种免疫,导致血小板输注无效(Platelet Transfusion Refractoriness, PTR)。美

国临床肿瘤学会血小板输注指南^[1]将 PTR 定义为:至少 2 次 ABO 血型相合而保存时间少于 72 h 的血小板输注后,输注效果不满意。目前,临床上导致 PTR 的原因主要有两大类:① 非免疫性因素:多发生在脾肿大、发热、感染、出血和 DIC 患者,是导致 PTR 的主要原因^[2,3];② 同种免疫因素:约占 20%,与血小板同种抗体的产生有关^[4]。本研究拟通过对南宁地区 PTR 患者进行血小板同种抗体检测,分析研究其特异性,了解南宁地区引起 PTR 发生的常见抗体,以便有针对性的建立相应的血小板供者库,为南宁地区 PTR 患者提供更好的输血服务和指导,确保输血治疗安全、有效。现报道如下。

对象与方法

1 对象 2010 年 1 月~2013 年 12 月南宁市各医院送检的 PTR 患者 72 例,全部为连续 2 次以上输注足量随机同型血小板,而血小板计数未见明显增高,临床未见有效止血或 24 h CCI $<4.5 \times 10^9/L$

DOI:10.3969/j.issn.1671-2587.2015.02.003

* 本课题受广西科学研究与技术开发计划项目(No. 主席资金 08160-05),南宁市科学研究与技术开发计划项目(No. 科技惠民重大科技专项 No. 20133141),广西自然科学基金项目(No. 2012GXNSFBA053127),广西科学研究与技术开发计划项目(No. 桂科攻 1355005-2-4)资助

作者单位:530007 广西南宁中心血站,南宁输血医学研究所

作者简介:周燕(1979-),女,壮族,湖南衡阳人,副主任医师,硕士,主要从事输血医学研究,(Tel)0771-3217522。

通信作者:吴国光,(E-mail)guangwu@szonline.net。

的病例。其中,男性 29 例,女性 43 例,年龄 4~84 岁。每人均抽取不抗凝静脉血 3 ml、EDTA 抗凝血 3 ml,备用。若需行血小板、单核细胞上 CD36 抗原检测则联系患者再送检 15 ml EDTA 抗凝血,并要求在抽血后 6 h 内送到本实验室。

2 方法

2.1 试剂与仪器 PAKPLUS 试剂盒(美国 GTI,批号 051308-PPB 及 072109-PP),小鼠 FITC-IgG1 同型对照(美国 Beckman Coulter,批号 46335),FITC-鼠抗人 CD36 单抗(美国 Beckman Coulter,批号 000039),PE-鼠抗人 CD14(美国 BD,批号 67580),DNA 抽提试剂盒 Puregene Blood Core kit(德国 QIAGEN,批号 8367305),TaKaRa EX Taq 酶(大连宝生物,批号 KA6201KA),琼脂糖凝胶、DNA green 绿如蓝核酸染料(北京天恩泽基因科技有限公司,批号 108111)。酶标仪及洗板机(瑞士 TECAN),FAC-SCalibur 流式细胞仪(美国 BD),GeneAmp9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI),Runone 全套水平电泳仪(美国 Embitec),BIO-BEST 凝胶成像仪(德国 Simen)。

2.2 血小板同种抗体的检测:不抗凝血离心后分离血清,备用。将待测血清加到相应微孔板中,微孔事先包被有亲和纯化的 HLA-I 类及不同血小板糖蛋白如 GPIIb/IIIa(HPA-1a/3a/4a 及 HPA-1b/3b/4a)、GPIb/IX(HPA-2a 及 HPA-2b)及 GPIa/IIa(HPA-5a 及 HPA-5b)、GPIV(CD36),可与待测血清中存在的血小板特异性抗体结合,而未结合的抗体则被洗脱。向微孔中加入碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG 并于 37℃ 孵育 30 min,洗去未结合的羊抗人 IgG,并加底物对-硝基苯磷酸酯(PNPP)室温避光显色 30 min 后,用 3N NaOH 终止反应。酶标仪检测各孔光密度值(OD 值),检测孔 OD 值大于阴性对照的 2 倍即可判为阳性。

2.3 血小板膜及单核细胞上 CD36 抗原表达的检测:采用流式细胞术(FCM)检测,具体步骤参见钟周琳^[5]等报道。

2.4 CD36 缺失型突变基因的检测

2.4.1 DNA 抽提:应用 Puregene DNA Purification Kit 提取血液样本 DNA,操作按试剂盒使用说明书。将 DNA 样本置于-20℃ 保存待用。

2.4.2 基因测序:参照吴国光^[6]等报道方法对 CD36 外显子进行测序。PCR 扩增 CD36 外显子

目的基因片段,对纯化后的 PCR 产物进行测序扩增,在基因测序仪上进行序列分析。

结 果

1 血小板输注无效患者血小板抗体特异性 72 例 PTR 中,共有 22 例检测到血小板同种抗体,其中有 18 例为抗 HLA 抗体,另有 3 例为抗 CD36 抗体,1 例同时含有抗 CD36 及抗 HLA 抗体。

表 1 血小板抗体特异性结果

抗体特异性	例数	阳性率(%)
抗-HLA	18	25.00
抗-CD36	3	4.17
抗-CD36+抗-HLA	1	1.39
合计	22	30.56

2 4 例含 CD36 抗体的 PTR 患者血小板、单核细胞上的 CD36 抗原检测 该 4 例患者的血小板、单核细胞上均无 CD36 抗原表达,为 I 型 CD36 抗原缺失者^[6]。

3 基因测序结果 根据基因测序结果分析,病例 1 为 380C>T 杂合突变,病例 2 和 4 为 329-330 del AC 杂合突变,病例 3 为 1156C>T 杂合突变所致的 CD36 缺失个体。病例 1~4 的基因测序结果见图 1。

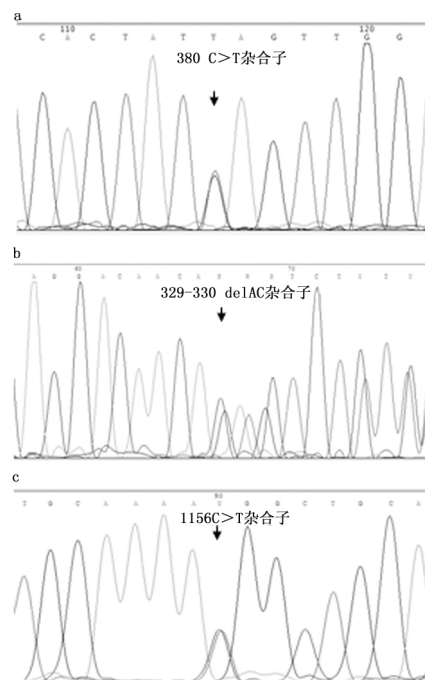


图 1 病例 1(a)、病例 2 和 4(b)、病例 3(c) CD36 基因测序结果

讨 论

血小板输注适用于预防和治疗血小板减少或血小板功能缺陷引起的出血,是临床上重要的支持疗法。然而患者在多次输注血小板后,可能产生血小板同种抗体,从而导致 PTR。本研究采用 ELISA 检测方法,对 72 例 PTR 患者进行血小板同种抗体检测,结果检测到 22 例血小板同种抗体,约占 30.56%。据国内外研究显示^[7-9],在由免疫因素引起 PTR 患者中,绝大部分是由抗 HLA 抗体引起。本研究中有 18 例为抗 HLA 抗体所致的 PTR,约占 81.9%,与国内外研究一致;另有 3 例由抗 CD36 引起,1 例由抗 CD36 及抗 HLA 抗体所致,未检测到 HPA 抗体所致 PTR。CD36 也称为血小板糖蛋白 IV (GP IV) 或 Naka,在血小板、单核细胞、毛细血管内皮细胞等均有表达。一些健康人群可缺失 CD36 抗原,称为 CD36 缺失个体,CD36 抗原缺失可分为两种类型:Ⅰ型是血小板、单核细胞上均缺失 CD36 抗原,Ⅱ型为血小板上无 CD36 抗原表达,但单核细胞上有 CD36 表达^[10]。不同人群 CD36 缺失比例不同,如在日本、中国等亚洲人中约有 3%~11% 为 CD36 缺失个体^[11,12],但在白种人中却极为罕见,不足 0.5%^[13]。CD36 缺失个体可通过输血、妊娠、骨髓移植等途径产生抗 CD36 抗体。在本研究中,我们检测到 4 例 CD36 抗体导致的 PTR,并且通过 FCM 技术证实该 4 例患者血小板、单核细胞上均无 CD36 抗原表达,即为Ⅰ型 CD36 缺失者。同时,通过基因测序方法明确该 4 例患者分别为 380C>T、329-330 del AC、1156C>T、329-330 del AC 基因突变所致的 CD36 缺失(见图 1)。

本研究中未检测到国外常见的抗 HPA-1a、抗 HPA-5b 抗体等血小板特异性同种抗体,推测与 HPA 抗原分布频率有关:HPA 系统对偶抗原不配合比例越高,产生同种免疫的机会越大,但因南宁地区 HPA-1a、HPA-5a 的基因频率分别为 0.9915 和 0.985^[14],意味着出现 HPA-1ab/1bb 或 HPA-5ab/5bb 的机率很低,因此包括南宁在内的中国人产生抗 HPA 的概率通常很小。值得我们关注的是,前期研究结果显示广西地区人群 CD36 抗原缺失率约为 4.13%,主要壮族更是高达 5.76%^[5],结合我们在短时间内连续检测到 4 例抗 CD36 抗体介导的血小板输注无效,提示 CD36 抗原对于南宁地区人群而言,是一个很重要的、能导致血小板

同种免疫反应的特色抗原,其重要性可能更胜于 HPA 抗原,应当引起重视。

通过本研究我们了解到南宁地区引起 PTR 的常见血小板同种抗体是 HLA 抗体,其次是抗 CD36 抗体,利用南宁地区引起 PTR 常见的抗体特异性,可指导我们有针对性的建立 HLA 及 CD36 抗原缺失型血小板供者资料库,这样既可提高输血治疗效果,确保安全,又可节约成本,减轻患者痛苦和负担。鉴于 CD36 的重要性,我们建议有条件的输血实验室应开展 CD36 抗原检测,对血小板减少的患者进行配合性输注,从而使血小板输注无效、胎/婴同种免疫血小板减少症、输血后紫癜等并发症的发生率降低,使需要血小板输血治疗的患者达到最大的疗效,将输血风险降到最低,为患者带来福音。

参 考 文 献

- 1 Schiffer C A, Anderson K C, Bennett C L, *et al.* Platelet transfusion for patients with cancer: Clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(5): 1519-1538.
- 2 Slichter SJ, Davis K, Enright H, *et al.* Factors affecting post-transfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients [J]. *Blood*, 2005, 105(10): 4106-4114.
- 3 Cameron B, Rock G, Olberg B, *et al.* Evaluation of platelet transfusion triggers in a tertiary-care hospital [J]. *Transfusion*, 2007, 47(2): 206-211.
- 4 Heikal NM, Smock KJ. Laboratory testing for platelet antibodies [J]. *Am J Hematol*, 2013, 88(9): 818-821.
- 5 钟周琳, 申卫东, 周燕, 等. 广西地区汉、壮和瑶族人群 CD36 缺失结构实验分析和特征研究 [J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(1): 14-17.
- 6 吴国光, 周燕, 钟周琳, 等. 抗 CD36 介导血小板输注无效的实验研究—附 4 例病历报告 [J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(1): 18-21.
- 7 Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness [J]. *Br J Haematol*, 2008, 142(3): 348-360.
- 8 Laundry GJ, Bradley BA, Rees BM, *et al.* Incidence and specificity of HLA antibodies in multitransfused patients with acquired aplastic anemia [J]. *Transfusion*, 2004, 44(6): 814-825.
- 9 伍伟健, 王文敬, 卢瑾, 等. 佛山地区血小板输注无效患者的血小板抗体分析 [J]. *国际输血及血液学杂志*, 2014, 37(3): 193-196.
- 10 Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, *et al.* Plat-

HLA 新等位基因 HLA-B* 35:155 的确认*

王振雷 苏蔓 钱明明 李茵 胡光磊 郭霞 赵佳 威海 李浩 张蓓 李醒 何路军

【摘要】 目的 发现和认定一个人类白细胞抗原(HLA)新等位基因。方法 应用多聚酶链式反应—基于测序的分型技术(polymerase chain reaction-sequence based typing, PCR-SBT)进行 HLA 常规分型, HLA-B 位点分型结果与等位基因 B* 35:03:01, 51:01:01 在 112 位有一个碱基不匹配, 不能指定为任何 HLA-B 位点等位基因, 用针对于 B* 35、B* 51 的序列特异性 SSSP 引物测序, 确认与同源性最高的 HLA 等位基因序列的差异。结果 测序结果表明该等位基因与其同源性最高的等位基因 B* 35:03:01 的差异是在第 2 外显子 112 位的 C>T, 其突变导致密码子 CGG>TGG, 结果造成 B* 35:03:01 氨基酸序列中 14 位的精氨酸(R)变为色氨酸(W)。结论 该等位基因为 HLA-B 位点的一个新等位基因, 世界卫生组织(WHO)HLA 命名委员会将其正式命名为 HLA-B* 35:155。

【关键词】 人类白细胞抗原 PCR-SBT HLA-B 新等位基因

【中图分类号】 R457.7 R392.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-2587(2015)02-0106-04

Identification A Novel HLA Allele HLA-B* 35:155 WANG Zhen-lei, SU Man, QIAN Ming-ming, et al. Hebei Blood Center, Shijiazhuang 050071

【Abstract】 **Objective** To identify a novel human leukocyte antigen (HLA) allele. **Methods** Polymerase chain reaction based sequencing (PCR-SBT) was used in routine HLA typing, the B locus typing results of one sample was one base mismatch with B* 35:03:01, 51:01:01 at locus 112, The sequence specific sequencing primers (SSSP) which target at B* 35 and B* 51 were used to confirm difference between the new allele and highest homologous allele. **Results** The sequencing results showed that the new allele with highest homologous allele B* 35:03:01 was the difference in the second exon at position 112 C>T, which caused the codon mutations CGG>TGG, resulting in an amino acid sequence of B* 35:03:01 at position 14 that shifted from arginine (R) to tryptophan (W). **Conclusion** This allele is a new HLA-B allele and has been designated as HLA-B* 35:155 by the World Health Organization (WHO) HLA Nomenclature Committee.

【Key words】 Human leukocyte antigen PCR-SBT HLA-B Novel allele

DOI:10.3969/j.issn.1671-2587.2015.02.004

* 本课题受 2012 年度医学适用技术跟踪项目(No. GL2012020)资助

作者单位:050071 石家庄,河北省血液中心(王振雷,苏蔓,钱明明,李茵,胡光磊,郭霞,赵佳,威海,张蓓,李醒,何路军);承德市中心血站(李浩)

作者简介:王振雷(1969—),男,河北唐山人,副主任技师,学士,主要从事免疫学检验及 HLA 分型工作,(Tel)0311-87820544(E-mail) lei123456789101112@sina.com。

通信作者:何路军,男,教授,主任医师,博士,(Tel)0311-87828148(E-mail)hlj888999@sina.com。

- 11 Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, et al. A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion[J]. Vox Sang, 1989, 57(3):213-217.
- 12 Shibata Y, Kin N, Morita S, et al. Monoclonal antibody OKM5 and platelet alloantibody anti-Nak(a) have the same specificity[J]. Proc Jpn Acad Ser, 1990, 66(2):41-42.
- 13 Curtis BR, Ali S, Glazier AM, et al. Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV): description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature[J]. Transfusion, 2002, 42(9):1173-1179.
- 14 申卫东, 李丽兰, 廖燕, 等. 多重 PCR-SSP 技术应用于 HPA-1~17bw 基因分型研究和广西壮族人群 HPA 多态性的分布[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(1):8-13.

(收稿日期:2014-11-02)

(本文编辑:王虹)