

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.25.019

血小板抗原谱细胞的建立在血小板同种抗体检测及鉴定中的应用*

周燕, 钟周琳, 刘金莲, 李丽兰, 申卫东, 吴国光[△]

(南宁中心血站/南宁输血医学研究所, 广西南宁 530007)

摘要:目的 建立血小板抗原谱细胞并应用于血小板同种抗体检测及鉴定。方法 采用 PCR-SSP 方法对南宁地区 1 500 名无偿献血员做 HPA 1-16 基因分型, 根据结果挑选 O 型血小板建立一组血小板抗原谱细胞, 并用第 14 届 ISBT 血小板免疫学研讨会参比血清验证该组血小板抗原谱细胞的表型。后应用于临床血小板同种抗体检测及第 14~15 届 ISBT 血小板免疫学研讨会样本检测。结果 挑选了 6 个表型与基因型一致、覆盖 HPA 1-5 和 15 系统的血小板建成血小板抗原谱细胞并成功应用于临床、科研样本检测及鉴定工作。结论 成功建立血小板抗原谱细胞, 为血小板同种免疫异常性疾病的诊断和研究提供了实验依据。

关键词:血小板; 谱细胞; 建立; 抗体; 检测

中图分类号: R446.6

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)25-3319-03

Establishment of platelet antigen panel cells and application in platelet alloantibody detection*

Zhou Yan, Zhong Zhoulin, Liu Jinlian, Li Lilan, Shen Weidong, Wu Guoguang[△]

(Nanning Blood Center/ Nanning Institute of Transfusion Medicine, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: Objective To establish the platelet antigen panel cells and to apply them in the detection and identification of platelet alloantibody. **Methods** Human platelet antigen (HPA) 1-16 genotyping from 1 500 un-related blood donors in Nanning area were performed by the polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) technique, platelet antigen cells with O blood type were chosen to establish the panel cells of platelet antigen. The phenotype of the panel cells were verified by the reference sera from the 14th platelet immunology workshop of the International Society of Blood Transfusion (ISBT). And then these panel cells were used in clinic to detect the platelet alloantibody and the samples from the 14th and 15th platelet immunology workshop of ISBT. **Results** Six platelet cells with consistent phenotype and genotypes and covering the HPA 1-5 and 15 systems were selected to establish the platelet panel cells and successfully applied them in the clinical and scientific sample detection and identification. **Conclusion** Platelet antigen panel cells are established successfully, which provides the experimental basis for the diagnosis and research of platelet allogenic abnormal immunity diseases.

Key words: platelets; panel cell; establish; antibody; detection

血小板表面有特异性人类血小板抗原 (human platelet antigen, HPA), 迄今已经被血小板命名委员会 (PNC) 正式命名的有 33 个血小板抗原^[1], 一个未正式命名, 其中 12 个抗原被归为 6 个双等位基因系统 (HPA-1、2、3、4、5、15)。根据制定的命名法, 在由 2 个对偶抗原组成的系统中, 对偶基因分别用字母 a 和 b 表示。字母 a 代表其中基因频率大于 50% 的等位基因, 字母 b 代表基因频率小于 50% 的另一等位基因。如果某血小板抗原的对偶抗原尚未被发现, 将给予暂时命名, 在等位基因数字后加后缀“w”表示, 如 HPA-6bw、HPA-7bw 等。只有在 2 个对偶抗原全被检测出来后, 才能被称为系统。HPA 均有特异性的免疫原性, 可通过输血、妊娠及骨髓移植等免疫因素而产生相应的抗体, 血小板抗原、抗体间的免疫反应将会导致血小板输注无效, 输血后紫癜, 新生儿同种免疫血小板减少症等血小板免疫异常性疾病^[2-3]。此类疾病的诊断须依据血小板同种抗体的检测及鉴定结果, 而血小板抗原单克隆抗体特异性免疫固定检测技术 (monoclonal antibody-specific immobi-

lization of platelet antigens, MAIPA) 被公认是检测及鉴定血小板同种抗体的金标准^[4]。MAIPA 技术涉及的关键问题很多, 其中最核心的环节就是血小板抗原谱细胞, 但该谱细胞在市场上并无商品化试剂出售, 这严重阻碍了血小板免疫异常性疾病的诊断与治疗。为此, 本研究组建了一组血小板抗原谱细胞并应用到临床及各项研究实践中, 为血小板同种抗体鉴定奠定技术基础, 为血小板免疫异常性疾病的诊断和治疗提供支持保障, 现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 2008 年南宁机采血小板献血员及南宁地区上林县、马山县和武鸣县等无血缘关系的成年人血样共 1 500 份, 每人均采集乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝血 5 mL, -80℃ 保存。南宁各临床医疗机构近年送检的疑似血小板免疫异常性疾病样本及第 14~15 届 ISBT 血小板免疫学研讨会血清学检测样品。

1.2 试剂 DNA 抽提试剂盒 (批号: 158389) 购自美国 Gentra

* 基金项目: 广西科技厅主席资金项目 (08160-05); 南宁市科技局项目 (201003048C-2)。作者简介: 周燕 (1979-), 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事输血医学的研究。△ 通讯作者, Tel: (0771) 3217522; E-mail: guangwu@szonline.net。

公司,HPA 基因 PCR-SSP 试剂盒(批号:H03-H05)购自美国 G&T 公司。各类血小板膜糖蛋白单克隆抗体 CD41(批号:25)、CD49b(批号:19)购自 Beckman Coulter 公司,CD61(批号:611140)、CD42b(批号:555471)、CD109(批号:48462)购自 BD 公司,HLA 单克隆抗体(批号:099K4762)购自 Sigma 公司,羊抗鼠 IgG(批号:100378)、HRP-羊抗人 IgG(批号:78596)购自 Jackson ImmunoResearch 公司,OPD 片剂(批号:00071583)购自 Dako 公司。

1.3 仪器 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),酶标仪及洗板机(瑞士 TECAN)。

1.4 实验方法

1.4.1 DNA 提取 取 EDTA 抗凝血 300 μ L,用 DNA 试剂盒提取 DNA。详细步骤见 DNA 抽提试剂盒说明书。

1.4.2 PCR-SSP 扩增 在 384 孔板分装 HPA-1~16bw 系统基因分型引物混合物 7 μ L,备用。详细步骤见 HPA 基因 PCR-SSP 试剂盒说明书。

1.4.3 电泳 取扩增产物 5 μ L,加样于 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴乙锭)孔中,0.5 \times Tris-硼酸电泳(TBE)缓冲液,10 v/cm 电泳 20 min 后,置 UVP 凝胶成像仪上观察特异性条带,记录并分析实验结果。

1.5 血小板抗原谱细胞的挑选 按照血小板特异性抗原在南宁地区人群中的分布频率,尽可能地挑选出可覆盖 HPA1-5 和 15 系统、且为纯合子的 O 型血小板抗原谱细胞。

1.6 血小板抗原谱细胞表型的鉴定 采用 MAIPA 技术进行鉴定。将已知含血小板特异性抗体的参比血清与选定的血小板抗原谱细胞反应,以确认挑选出的血小板抗原谱细胞的表型。详细步骤见本课题组前期报道^[5]。

1.7 血小板抗原谱细胞的应用 应用该组血小板抗原谱细胞,采用 MAIPA 技术对近年南宁各临床医疗机构送检样本及第 14~15 届 ISBT 血小板免疫学研讨会血清学样本进行血小板同种抗体检测及特异性鉴定。

2 结果

2.1 建立血小板抗原谱细胞 根据 1 500 例样本 HPA 1~16 系统基因型分布频率认真挑选了 6 份 O 型样本,尽可能覆盖 HPA-1~5 和 15 系统中所有抗原,且要求尽量为纯合子的血小板细胞,组成血小板抗原谱细胞,见表 1。

表 1 6 个血小板谱细胞的 HPA1-5 和 15 系统的抗原分型表

序号	HPA-1	HPA-2	HPA-3	HPA-4	HPA-5	HPA-15
C1	1aa	2aa	3aa	4aa	5aa	15aa
C2	1bb	2aa	3ab	4aa	5aa	15aa
C3	1aa	2bb	3bb	4aa	5aa	15ab
C4	1aa	2aa	3bb	4aa	5aa	15bb
C5	1aa	2aa	3ab	4ab	5aa	15ab
C6	1aa	2ab	3aa	4aa	5ab	15ab

2.2 血小板抗原谱细胞表型的鉴定 经 MAIPA 技术鉴定,所挑选的 6 份血小板抗原谱细胞表型与基因型一致,可用于血

小板同种抗体的检测及特异性鉴定。

2.3 血小板抗原谱细胞的应用 临床样本检测:2008~2012 年南宁各临床医疗机构送检疑似血小板同种免疫异常性疾病样本共 568 份,全部采用本组血小板抗原谱细胞进行血小板同种抗体检测及鉴定。科研样本检测:采用本组血小板抗原谱细胞检测第 14~15 届 ISBT 血小板免疫学研讨会血清学样本。

3 讨论

血小板抗体检测及鉴定在分析血小板免疫异常性疾病方面有着重要的价值。目前血小板免疫学诊断技术已从血清学技术发展到了分子生物学水平。但是血小板抗体的检测技术无论是检测血小板自身抗体,还是检测血小板同种抗体,都比检测其他血液成分抗体困难^[6],虽然目前已有非常成熟的分子生物学商业试剂盒用于检测血小板抗原,但 DNA 技术不能用于抗体的筛查和鉴定,各种抗体的检测方法仍然是建立在抗原、抗体反应的血清学技术的基础之上,因此血小板抗原谱细胞的筛选及组建是鉴定血小板抗体特异性的重要步骤。

本研究中,采用 PCR-SSP 方法检测了 1 500 名南宁地区无血缘关系人群的血小板基因型^[7],根据南宁地区人群中 HPA 1~16 系统基因型分布频率选择了 HPA-1aa/2aa/3aa/4aa/5aa/15aa(标记为 C1)、HPA-1bb/2aa/3ab/4aa/5aa/15aa(标记为 C2)、HPA-1aa/2bb/3bb/4aa/5aa/15ab(标记为 C3)、HPA-1aa/2aa/3bb/4aa/5aa/15bb(标记为 C4)、HPA-1aa/2aa/3ab/4ab/5aa/15ab(标记为 C5)及 HPA-1aa/2ab/3aa/4aa/5ab/15ab(标记为 C6)共 6 个“O”型细胞作为血小板抗原谱细胞,这 6 个细胞覆盖了 HPA-1~5 及 15 系统所有血小板抗原。

因 PCR-SSP 技术检测的是血小板基因型,故在确定 6 个血小板抗原谱细胞之后,本研究利用已知含血小板特异性抗体的参比血清检测这 6 份血小板抗原谱细胞的表现型,结果该 6 份血小板抗原谱细胞的表现型与基因型相一致,能运用于血小板同种抗体的检测及鉴定。

在南宁各临床医疗单位送检的疑似血小板同种免疫异常患者血样中,通过该组血小板抗原谱细胞成功诊断了国内首例由抗 HPA-3a 抗体导致的新生儿同种免疫性血小板减少症,有关该例患儿的实验室检测及诊断本课题组前期已报道^[5],与同行共同分享血小板免疫学检测的经验与心得。本研究快速诊断也为该患儿的后续治疗争取到了宝贵时间,提供了基础和保障。此后,通过该组血小板抗原谱细胞亦成功诊断了 1 例抗 HPA-5b 抗体引起的新生儿同种免疫血小板减少症^[8],4 例抗 CD36 抗体引起的血小板输注无效病例^[9],为患者明确了诊断,确保后续输血治疗安全有效。通过 500 多例临床样本的检测,发现白种人中多见的由抗 HPA-1a 及 5b 抗体导致血小板免疫异常性疾病在我国人群中不算多见^[10-11],而由抗 CD36 抗体介导的血小板免疫异常性疾病所占比例较高^[9,12],说明我国血小板免疫异常性疾病的病因与白种人存在差异,这也是值得注意和警惕的问题。

此外,在 2008 年第 14 届、2010 年第 15 届 ISBT 血小板免疫学研讨会血清学样本检测中,亦使用该组血小板谱细胞进行血小板同种抗体检测和特异性鉴定,本次的检测结果与主办方公布的结果相符^[2,13]。

总之,本研究成功组建了血小板抗原谱细胞并在临床及科

研实践中证明:该组血小板抗原谱细胞可应用于血小板同种免疫异常性疾病的检测和诊断,为同种免疫血小板减少症等疾病的诊断和研究提供了依据,为后续治疗奠定基础。

参考文献:

- [1] Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens-2013 [J]. *Vox Sang*, 2014, 106(2):93-102.
- [2] Wu GG, Kaplan C, Curtis BR, et al. Report on the 14th international society of blood transfusion platelet immunology workshop[J]. *Vox Sang*, 2010, 99(4):375-381.
- [3] Boehlen F, Bulla O, Michel M, et al. HPA-genotyping and antiplatelet antibodies in female blood donors[J]. *Hematol J*, 2003, 4(6):441-444.
- [4] Nguyen XD, Goebel M, Schober M, et al. The detection of platelet antibodies by simultaneous analysis of specific platelet antibodies and the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens; an interlaboratory comparison[J]. *Transfusion*, 2010, 50(7):1429-1434.
- [5] 周燕, 钟周琳, 李丽兰, 等. 抗 HPA-3a 抗体所致新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜 1 例并文献复习[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(1):45-48.
- [6] 马印图, 李振奇, 王全立. 血小板抗体检验技术进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(11):1041-1044.
- [7] 廖燕, 申卫东, 李丽兰, 等. 南宁地区人群血小板抗原

HPA1-16bw 基因分布频率的研究[J]. *中国输血杂志*, 2010, 23(6):424-429.

- [8] 周燕, 钟周琳, 李丽兰, 等. 国内首例抗 HPA-5b 引发的新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜的检测、诊断及分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(2):399-402.
- [9] 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 例病例报告[J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(1):18-21.
- [10] Bessos H, Wilson DW, Metcalfe P, et al. Report on the 12th international society of blood transfusion platelet immunology workshop[J]. *Vox Sang*, 2005, 89(2):105-113.
- [11] Kiefel V, Konig C, Kroll H, et al. Platelet alloantibodies in transfused patients [J]. *Transfusion*, 2001, 41(6):766-770.
- [12] 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.
- [13] Sachs UJ, Kiefel V, Kroll H, et al. Report on the 15th international society of blood transfusion platelet immunology workshop[J]. *Vox Sang*, 2012, 103(4):343-351.

(收稿日期:2014-04-11 修回日期:2014-07-01)

(上接第 3318 页)

- effect of benzyl isothiocyanate on proliferation in vitro of human glioma cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(4):2607-2610.
- [2] 陈骏, 余永强, 钱银锋, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤生长的动态观察和 MR 灌注成像可行性研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2004, 3(1):18-21.
- [3] 范国光, 臧培卓, 景奉东, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤 MR 扩散加权成像及灌注成像与组织学对照研究[J]. *中华放射学杂志*, 2005, 39(6):613-618.
- [4] 李香营, 魏晓, 刘辉, 等. Wistar 大鼠 C6 脑胶质瘤晚期阶段模型的建立及 MR 成像[J]. *实用放射学杂志*, 2012, 28(3):461-464.
- [5] Yoon JH, Kim JH, Kang WJ, et al. Grading of cerebral glioma with multiparametric Mr imaging and 18F-FDG-PET: concordance and accuracy[J]. *Eur Radiol*, 2014, 24(2):380-389.
- [6] Toh CH, Wei KC, Chang CN, et al. Assessment of angiographic vascularity of meningiomas with dynamic susceptibility contrast-enhanced perfusion-weighted imaging and diffusion tensor imaging [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2014, 35(2):263-269.

- [7] Provenzale JM, Wang GR, Brenner T, et al. Comparison of permeability in high-grade and low-grade brain tumors using dynamic susceptibility contrast Mr imaging[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2002, 178(3):711-716.
- [8] 黄丙仓, 耿道颖, 刘培, 等. 大鼠 C6 胶质瘤模型建立及 7T 动物磁共振表现实验研究[J]. *中国医学计算机成像杂志*, 2011, 17(6):545-548.
- [9] 叶成坤, 李少武, 高之宪, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤高场强动物磁共振的影像学特征[J]. *中华神经外科杂志*, 2013, 29(8):849-853.
- [10] Wang W, Steward CE, Desmond PM. Diffusion tensor imaging in glioblastoma multiforme and brain metastases: the role of p, q, L, and fractional anisotropy[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2009, 30(1):203-208.
- [11] 李香营, 魏晓, 陈晶, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤磁共振扩散张量成像及感兴趣区选择研究[J]. *实用放射学杂志*, 2012, 28(12):1953-1957.
- [12] Nie J, Shen D. Automated segmentation of mouse brain images using multi-atlas multi-ROI deformation and label fusion[J]. *Neuroinformatics*, 2013, 11(1):35-45.

(收稿日期:2014-04-17 修回日期:2014-06-23)