

## 再生障碍性贫血患者HLA-A抗原表达缺失的研究

张会勤<sup>1,2</sup> 王化泉<sup>1</sup> 齐薇薇<sup>1</sup> 刘春燕<sup>1</sup> 邢莉民<sup>1</sup> 付蓉<sup>1</sup> 邵宗鸿<sup>1</sup>

<sup>1</sup>天津医科大学总医院血液科 300052; <sup>2</sup>天津医科大学第二医院血液科 300211

通信作者:王化泉, Email: wanghuaquan@tmu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(81170472);天津市科技重大专项与工程(18ZXDB-SY00140)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.11.012

### Study on the loss of HLA-A allele expression in patients with aplastic anemia

Zhang Huiqin<sup>1,2</sup>, Wang Huaquan<sup>1</sup>, Qi Weiwei<sup>1</sup>, Liu Chunyan<sup>1</sup>, Xing Limin<sup>1</sup>, Fu Rong<sup>1</sup>, Shao Zonghong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China;

<sup>2</sup>Department of Hematology, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

Corresponding author: Wang Huaquan, Email: wanghuaquan@tmu.edu.cn

再生障碍性贫血(AA)是一种以全血细胞减少为表现的骨髓造血功能衰竭综合征,主要临床表现是出血、贫血和感染等<sup>[1]</sup>。AA的发病机制尚未完全明确。细胞毒性T淋巴细胞(CTL)亢进导致的造血干/祖细胞(HPSC)免疫损伤是主要发病环节。宿主的遗传易感性是免疫损伤的基础<sup>[2]</sup>。CTL通过人类白细胞抗原(HLA)-I类分子识别HPSC自身抗原,激发自身免疫反应机制,在引发骨髓造血功能衰竭的自身免疫反应中发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。本文旨在研究AA患者外周血HLA-A等位基因在多谱系上的表达是否缺失,及对免疫抑制治疗(IST)疗效的影响,分析HLA-A的表达与临床指标的相关性。

### 病例与方法

1. 病例:回顾性分析2017年4月至2018年3月天津医科大学总医院血液内科收治的AA患者36例,其中初诊未治疗组患者17例,男8例,女9例,中位年龄39(17~73)岁。治疗组[经抗胸腺/淋巴细胞球蛋白(ATG/ALG)、环孢素A(CsA)等治疗后]患者19例,男10例,女9例,中位年龄41(13~68)岁。依据《再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017年版)》<sup>[5]</sup>来进行诊断、治疗和疗效评价,疗效评价时间是IST后6个月。患者信息详见表1。本研究方案经天津医科大学总医院伦理委员会批准,所有研究对象或其监护人均知情同意并签署知情同意书。

2. HLA-A2和A9检测:取3 ml外周血,肝素抗凝;各取50 μl外周血,加入到空白对照管(编号1)、同型对照管(编号02和03)、实验管(编号2和3)中,PE-HLA-A2和A9抗体分别加入实验2和3号管中,IgG1-PE分别加入同型对照02和03管中,空白对照管中不加PE抗体。试管编号2、02中加入Percp-CD3、APC-CD19、FITC-CD56;试管编号3、03中加入

表1 36例再生障碍性贫血(AA)患者的基本临床特征

| 临床特征                              | 初诊未治疗组<br>(17例) | 治疗组<br>(19例)    |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| 性别(例,男/女)                         | 8/9             | 10/9            |
| 中位年龄[岁, M(范围)]                    | 39(17~73)       | 41(13~68)       |
| 血常规                               |                 |                 |
| 中位HGB[g/L, M(范围)]                 | 61(42~86)       | 98(56~148)      |
| 中位PLT[×10 <sup>9</sup> /L, M(范围)] | 9(1~37)         | 51(9~293)       |
| 中位ANC[×10 <sup>9</sup> /L, M(范围)] | 0.37(0.16~1.97) | 2.94(1.50~8.54) |
| 中位Ret[×10 <sup>9</sup> /L, M(范围)] | 13.0(4.4~56.1)  | 41.5(5.2~84.9)  |
| IST前疾病严重程度(例)                     |                 |                 |
| VSAA                              | 2               | 4               |
| SAA(除外VSAA)                       | 9               | 10              |
| NSAA                              | 6               | 5               |
| 研究距诊断的时间[月, M(范围)]                | 3(1~7)          | 11(3~42)        |
| 研究距IST的时间[月, M(范围)]               | NA              | 6(2~24)         |
| 输血依赖(例)                           |                 |                 |
| 红细胞输注依赖                           | 16              | 2               |
| 血小板输注依赖                           | 13              | 1               |
| 感染(例)                             |                 |                 |
| 呼吸道感染                             | 5               | 1               |
| 皮肤感染                              | 1               | 0               |
| 口腔感染                              | 1               | 1               |
| IST方案(例) <sup>a</sup>             |                 |                 |
| ATG/ALG+CsA                       | 9               | 10              |
| CsA                               | 8               | 9               |

注:ANC:中性粒细胞绝对计数;Ret:网织红细胞绝对计数;VSAA:极重型再生障碍性贫血;SAA:重型再生障碍性贫血;NSAA:非重型再生障碍性贫血;IST:免疫抑制治疗;ATG/ALG:抗胸腺/淋巴细胞球蛋白;CsA:环孢素A;NA:不适用。<sup>a</sup>初诊未治疗组完成HLA-A2和A9检测后接受IST方案治疗

APC-CD33、FITC-CD15,震荡摇匀,避光孵育 15 min 后每管加入 1 ml 溶血素,混匀,避光孵育 10 min,427×g 离心 5 min;离心后弃上清,每管加入 1 ml PBS,427×g 离心 5 min;离心后弃上清,每管加入 100 μl PBS;上流式细胞仪进行检测,每个样品收集 30 000 个细胞。

3. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)克隆检测:取 3 ml 外周血,肝素抗凝。采用 CD59 检测红细胞及荧光标记的嗜水气单胞菌溶素变异体(FLAER)联合 CD24 或 CD14 检测粒细胞和单核细胞的 PNH 克隆比例。

4. 统计学处理:应用 SPSS21.0 统计软件进行分析,计量资料数据用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验(数据符合正态分布)或 Wilcoxon 秩和检验(数据不符合正态分布),应用 Spearman 相关性分析描述指标间线性关联;分类变量组间比较采用 Fisher 精确概率法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. AA 患者外周血白细胞上 HLA-A 的表达:17 例初诊未治疗组患者中 6 例(35.29%)出现 HLA-A2 部分表达缺失,男 4 例,女 2 例,缺失细胞比例为 19.47%(7.42%~60.50%);1 例(5.89%)女性出现 HLA-A9 部分表达缺失,缺失细胞比例为 51.74%。19 例治疗组患者中 5 例(26.32%)出现 HLA-A2 部分表达缺失,男 2 例,女 3 例,缺失细胞比例为 27.01%(5.69%~71.83%);3 例(15.79%)HLA-A9 部分表达缺失,均为男性,缺失细胞比例分别为 49.31%、90.26%和 82.17%。

2. 不同白细胞亚型 HLA-A 表达情况:11 例检测到 HLA-A2 部分表达缺失的 AA 患者中,11 例都存在中性粒细胞(CD15<sup>+</sup>)HLA-A2 部分表达缺失,10 例检测到单核细胞(CD33<sup>+</sup>)HLA-A2 部分表达缺失,8 例检测到 NK 细胞(CD56<sup>+</sup>)HLA-A2 部分表达缺失,3 例检测到 B 淋巴细胞(CD19<sup>+</sup>)HLA-A2 部分表达缺失,2 例检测到 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>)HLA-A2 部分表达缺失。

4 例检测到 HLA-A9 部分表达缺失的 AA 患者中,4 例均存在中性粒细胞(CD15<sup>+</sup>)与单核细胞(CD33<sup>+</sup>)HLA-A9 部分表达缺失,2 例检测到 NK 细胞(CD56<sup>+</sup>)HLA-A9 部分表达缺失,1 例检测到 B 淋巴细胞(CD19<sup>+</sup>)HLA-A9 部分表达缺失,未检测到 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>)HLA-A9 部分表达缺失。

3. HLA-A 部分表达缺失与 PNH 克隆的关系:15 例存在 HLA-A 部分表达缺失的 AA 患者中 3 例(20.0%)PNH 克隆阳性,21 例不存在 HLA-A 部分表达缺失的 AA 患者中 8 例(38.1%)PNH 克隆阳性( $P = 0.295$ )。

4. HLA-A 表达缺失与 IST 疗效关系:初诊未治疗组中,7 例 HLA-A 表达缺失患者中 5 例(71.4%)IST 有效;10 例 HLA-A 表达无缺失患者中 4 例(40.0%)IST 有效。治疗组中,8 例 HLA-A 表达缺失患者中 5 例(62.5%)IST 有效;11 例 HLA-A 表达无缺失患者中 5 例(45.5%)有效。

5. HLA-A 等位基因的表达缺失与临床指标的相关性:HLA-A2 等位基因表达缺失比例与中性粒细胞绝对计数呈

负相关( $r_s = -0.645, P = 0.032$ ),与 HGB 呈正相关( $r_s = 0.691, P = 0.019$ ),与 WBC、PLT 和网织红细胞绝对计数(Ret)均无明显线性相关性( $P$  值均  $> 0.05$ )。HLA-A9 等位基因表达缺失比例与 WBC、HGB、PLT 和 Ret 等均无明显线性相关性( $P$  值均  $> 0.05$ )。

## 讨 论

CTL 异常活化及其功能亢进是 AA 的主要发病机制。CTL 通过 HLA-I 类分子识别和杀伤 HPSC,从而导致骨髓衰竭。Katagiri 等<sup>[6]</sup>发现部分 AA 患者 6 号染色体短臂杂合子缺失,致使 HLA 等位基因表达缺失,从而导致部分 HSPC 发生免疫逃逸,避免被 CTL 杀伤。

我们通过检测 HLA-A2 和 A9 的表达,发现部分 AA 患者存在 HLA-A 等位基因的表达缺失。HLA 可能参与 AA 的发病机制,其表达的缺失使 HSPC 发生免疫逃逸,避免被杀伤。我们将 AA 患者分为初诊未治疗组与已行 IST 治疗组,发现初诊未治疗组的 HLA-A 的表达缺失率为 41.1%,高于 Katagiri 等<sup>[2]</sup>报道的结果。这可能因为两者应用的检测技术不同,即 FCM 检测缺失率高于 SNP 检测。另外,部分 AA 患者 HLA-A 的表达缺失不是 6 号染色体短臂杂合子缺失导致,而是 HLA-A 等位基因的编码区序列的突变,或者其他体细胞基因突变导致的<sup>[7-9]</sup>。

Maruyama 等<sup>[10]</sup>发现部分 AA 患者存在 HLA-A 的表达缺失,表达缺失可出现在白细胞上的多谱系中(中性粒细胞、单核细胞、B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞)。但并不是所有患者在白细胞多谱系上均有表达缺失,部分患者在两系或者三系上表达缺失,部分患者仅在一系上表达缺失。中性粒细胞和单核细胞上表达缺失的 AA 患者相对较多,淋巴细胞上的表达缺失的相对较低。我们也发现 AA 患者在白细胞多谱系上存在 HLA-A 表达缺失,可以累及一系或者多系,各系的表达缺失率有差异。我们研究发现,NK 细胞也存在 HLA-A 的表达缺失,缺失率稍低于中性粒细胞和单核细胞,但高于 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞。

我们研究亦发现,HLA-A 表达缺失患者 PNH 克隆阳性比例低于 HLA-A 表达无缺失患者。这可能是 AA HPSC 逃避 T 细胞免疫攻击时,会选择 HLA 表达缺失的方式,也可以选择 PNH 克隆缺失的方式。部分患者同时存在这两种缺失方式<sup>[11]</sup>。

有报道初诊未治疗组 HLA 表达缺失 AA 患者 IST 的有效率高达 100%,显著高于 HLA 表达无缺失患者<sup>[10]</sup>。本研究中,初诊未治疗组 HLA-A 表达缺失患者 IST 有效率(71.4%)高于表达无缺失患者(40.0%),但并未达到 100.0%,治疗组 HLA-A 表达缺失患者 IST 有效率(62.5%)也高于表达无缺失患者(45.5%),由于病例数较低未进行统计学比较。未来需要大样本进一步探索 HLA 表达缺失与 IST 疗效是否在统计学水平具有显著性差异。

我们发现 HLA-A2 表达缺失与 ANC 呈负相关,与 HGB 呈正相关性。提示在 AA 患者中,HLA-A2 表达缺失的 HPSC

可能偏向红系分化,逃避免疫损伤;但HLA-A2表达缺失的中性粒细胞没有逃避免疫杀伤。不同HLA表达缺失后的HPSC的增殖分化功能可能不同,有待于进一步研究。

参考文献

[1] Young NS. Aplastic Anemia[J]. N Engl J Med, 2018, 379(17): 1643-1656. DOI: 10.1056/NEJMra1413485.

[2] 杨洁茹,王化泉,邵宗鸿.再生障碍性贫血发病机制的研究进展[J].中华血液学杂志,2019,40(9):796-800. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.09.022.

[3] Babushok DV, Duke JL, Xie HM, et al. Somatic HLA Mutations Expose the Role of Class I-Mediated Autoimmunity in Aplastic Anemia and its Clonal Complications [J]. Blood Adv, 2017, 1 (22):1900-1910. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017010918.

[4] Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, et al. Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia [J]. Blood, 2017, 129(21): 2908-2916. DOI: 10.1182/blood-2016-11-752378.

[5] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组.再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017年版)[J].中华血液学杂志,2017,38(1):1-5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.01.001.

[6] Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, et al. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in

acquired aplastic anemia[J]. Blood, 2011, 118(25):6601-6609. DOI: 10.1182/blood-2011-07-365189.

[7] Heyrman B, De Becker A, Verheyden S, et al. False homozygous HLA genotyping results due to copy number neutral loss of heterozygosity in acquired aplastic anaemia[J]. BMJ Case Rep, 2017: bcr2016217867. DOI: 10.1136/bcr-2016-217867.

[8] Betensky M, Babushok D, Roth JJ, et al. Clonal evolution and clinical significance of copy number neutral loss of heterozygosity of chromosome arm 6p in acquired aplastic anemia[J]. Cancer Genet, 2016, 209(1-2):1-10. DOI: 10.1016/j.cancer-gen.2015.10.002.

[9] Savage SA, Viard M, O'hUigin C, et al. Genome-wide Association Study Identifies HLA-DPB1 as a Significant Risk Factor for Severe Aplastic Anemia [J]. Am J Hum Genet, 2020, 106(2):264-271. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.01.004.

[10] Maruyama H, Katagiri T, Kashiwase K, et al. Clinical significance and origin of leukocytes that lack HLA-A allele expression in patients with acquired aplastic anemia[J]. Exp Hematol, 2016, 44(10):931-939.e3. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.05.013.

[11] Ueda Y, Nishimura J, Murakami Y, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with copy number-neutral 6pLOH in GPI (+) but not in GPI (-) granulocytes [J]. Eur J Haematol, 2014, 92(5):450-453. DOI: 10.1111/ejh.12253.

(收稿日期:2021-03-01)  
(本文编辑:刘爽)

中华医学会血液学分会第十一届委员会委员名单

- 主任委员 吴德沛  
前任主任委员 王建祥  
候任主任委员 胡豫  
副主任委员 肖志坚 刘启发 赵维莅 张晓辉  
常务委员(按姓氏笔画为序) 王景文 牛挺 方美云 付蓉 刘代红 刘启发 吴德沛  
肖志坚 张曦 张连生 张晓辉 李娟 李薇 李建勇 杨林花 陈协群  
周剑峰 周道斌 胡豫 赵维莅 侯明 侯健 黄河 赖永榕  
委员兼秘书长 陈苏宁  
委员(按姓氏笔画为序) 王昭 王少元 王景文 王季石 牛挺 方美云 付蓉  
朱尊民 江明 江倩 刘利 刘林 刘竞 刘澎 刘代红 刘启发  
纪春岩 闫金松 农卫霞 杜欣 苏雁华 吴德沛 肖志坚 沈建平 邵宗鸿  
张梅 张曦 张连生 张晓辉 李剑 李娟 李薇 李文倩 李军民  
李建勇 李振宇 杨仁池 杨同华 杨林花 陈协群 陈苏宁 陈洁平 邱林  
罗建民 周凡 周剑峰 周道斌 胡豫 赵维莅 赵谢兰 侯明 侯健  
施均 姜中兴 姚红霞 徐才刚 高素君 黄河 黄晓军 黄瑞滨 常英军  
崔丽娟 韩悦 韩艳秋 梁爱斌 曾庆曙 赖永榕 蔡真 魏辉 潘耀柱  
糜坚青