

혈소판 다형 수혈자에서
PCR-ASRA를 이용한
Glycoprotein I a(HPA-5, Br)의
G/A 유전자 다형성 분석

연세대학교 보건환경대학원
의생명과학전공
이 채 진

혈소판 다형 수혈자에서
PCR-ASRA를 이용한
Glycoprotein I a(HPA-5, Br)의
G/A 유전자 다형성 분석

지도 박 용 석 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005년 6 월 일

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학과

이 채 진

이채진 의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 보건환경대학원

2005년 6 월 일

감사의 글

이렇게 결실을 맺기까지는 너무나 많은 분들의 도움이 있었습니다. 실로 외로운 길만은 아닌, 더불어 사는 세상에 같이 있음을 몸소 경험한 것 같습니다.

밤늦은 시간까지 강의에 열정을 쏟으셨던 김종배 교수님, 양용석 교수님, 이해영 교수님, 오옥두 교수님, 김태우 교수님 그리고 실험을 할 수 있도록 배려해주시고 논문을 지도하여 주신 박용석 교수님께 진심으로 감사드립니다.

또한 저의 학업에 대한 열정에 성원을 아끼지 않으신 국립의료원 진단검사의학과 박혜란 과장님 및 저의 빈 자리를 아무 탈 없이 메워주신 진단검사의학과 전 직원 모두에게 고개 숙여 감사드립니다.

하얀 눈 속을 헤치고 실험을 하기 위해 달려갔던 영동고속도로가 아련하게 떠오르면서 세포 생물학 연구실의 고마운 얼굴들, 김홍성 선생님, 김근식 선생님을 비롯하여 인호, 종철, 은정, 그리고 임상병리학과 과사무실의 임병혁 선생님 모두가 그림기만 합니다.

지금의 제가 설 수 있게 저를 낳아주시고 사랑으로 키워주신 어머니에게 저의 노력의 결과를 드리고 싶고 늘 건강하시길 간절히 기원합니다.

그리고 저에게 가장 소중한 두 아이들 사랑하는 다영, 덕연 에게 항상 노력하는 엄마의 모습으로 비추일 수 있게 되길 바라며, 앞으로 학교생활에서 경쟁보다는 남을 먼저 배려할 줄 아는 사람으로 성장하기를 바랍니다. 누구보다도 공부에 전념하느라 소홀한 저를 묵묵히 지켜준 남편에게 이 논문을 바치고 싶으며, 가을에 있을 개인전이 모쪼록 성황리에 마무리되길 기원합니다.

2005년 7월

이 채 진

목 차

그림 차례	ii
표 차례	iii
약 기호표	iv
국문 요약	v
제 1 장 서 론	1
제 2 장 재료 및 방법	6
2. 1 연구 대상	6
2. 2 실험 방법	6
2. 2. 1 혈소판 수 측정	6
2. 2. 2 항혈소판 항체(Anti-platelet antibody) 검사	6
2. 2. 3 Genomic DNA 분리	7
2. 2. 4 Primer 제작	8
2. 2. 5 Nested PCR	11
2. 2. 6 RFLP	11
2. 2. 7 전기영동 및 결과 판독	12
제 3 장 결 과	13
3. 1 항혈소판 항체(Anti-platelet antibody) 검사	13
3. 2 PCR	15
3. 3 PCR 증폭산물의 RFLP 절단 양상	16
3. 4 HPA-5 유전자형 빈도 조사	18
제 4 장 고 찰	22
제 5 장 결 론	26
참 고 문 헌	28
영문 요약	37

그림 차례

Figure 1. Glycoprotein I a/IIa complex showing the polymorphic sites of HPA-5 antigen	4
Figure 2. Nucleotide sequence of GPIa gene surrounding the polymorphic base at genomic DNA	8
Figure 3. Illustration of restriction sites of PCR fragments for RFLP and a typical result of HPA-5a/b typing	12
Figure 4. DNA fragments of GP I a gene amplified by PCR	15
Figure 5. RFLP analysis of HPA-5(a/b) alleles DNAs amplified by PCR	17

표 차례

Table 1. Six major glycoproteins on platelet membrane surface	5
Table 2. Sequences of PCR primers for amplification of Gp I DNA fragment ..	9
Table 3. Polymorphism of integrin $\alpha 2$ subunit	10
Table 4. Detection of anti-platelet antibody in multi-transfused patients	14
Table 5. Genotyping of platelet-specific antigen, HPA-5	19
Table 6. Genotype frequency and gene frequency of HPA-5	20
Table 7. Comparison of genotype frequency of HPA-5	21

약 기호표

ASRA : allele- specific restriction enzyme analysis
bp : base pairs
BSA : bovine serum albumin
CCI : corrected count increment
DNA : deoxyribonucleic acid
EDTA : ethylenediamine tetra-acetic acid
EPO : erythropoietin
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor
Gps : glycoproteins
HLA : human leukocyte antigen
HPA : human platelet alloantigen
ITP : idiopathic thrombocytopenic purpura
MAIPA : monoclonal antibody immobilization of platelet antigen
NAIT : neonatal alloimmune thrombocytopenia
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PFA : para formaldehyde
PLT : platelet
PLTC : platelet concentrate
PTP : post-transfusion purpura
PTR : post-transfusion refractoriness to platelets
RFLP : restriction fragment length polymorphism
SDP : single donor platelet
SLE : systemic lupus erythematosus
VLA : very late antigen

국문 요약

혈소판 다핵 수혈자에서 PCR-ASRA를 이용한 Glycoprotein I a(HPA-5, Br)의 G/A 유전자 다형성 분석

혈소판 감소증의 유일한 치료수단으로서 혈소판 수혈은 동종면역 기전으로 인하여 동종항체(alloantibody)를 유도생성 한다. 이러한 항체를 유도하는 혈소판 특이 항원(human platelet alloantigen, HPA)은 인종 및 개체에 따라 혈소판 표면의 단백질구조상 아미노산의 차이에 기인하며, 유전자 내에 대립인자의 다형성(allelic polymorphism)에 따라 혈소판 항체와 다양한 면역반응(immune response)을 보일 수 있다.

최근 SDP(single donor platelet) 등 leuko-depleted platelet 사용이 증가하면서 HLA(human leukocyte antigen)항체로 인한 동종면역이 감소하고 있는 것으로 알려져 있다. 한편 동종면역에 의해 혈소판 수혈 효과를 얻을 수 없는 환자들에서 항혈소판 항체의 측정 및 실제 환자를 대상으로한 혈소판 특이항원에 대한 체계적인 연구보고가 없으며, 실무과정을 통해서도 혈소판을 수혈 받는 환자 다수에서 혈소판 수혈 불응증은 자주 볼 수 있다. 이에 본 연구를 통해 HPA-5a/b(Br^{b/a})가 위치하는 glycoprotein I a에 대한 유전자 다형성의 차이와 혈소판 감소증 발병과의 연관성을 알아보고자 하였다. 정상군 35명과 혈소판 감소증을 보인 20명을 대상으로 혈액을 채취하고, Gp I a gene의 point mutation이 존재하는 부위를 증폭한 후, 대립인자 특이적 제한효소법(allele-specific restriction enzyme analysis, ASRA))을 이용하여 유전자형 검사를 하였다. 동시에 혈소판 수혈을 받은 환자들

에게서 항혈소판 항체의 생성 여부를 조사하였다. 이러한 일련의 실험과정을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 2004년 3월에서 2005년 2월까지 국립의료원에서 2회 이상 혈소판 농축액이 요구되고 혈소판 수혈 후 수혈 불응증을 보인 환자 13명 및 기존 질환에 관계없이 심한 혈소판 감소증을 보인 환자 7명 등 총 20명에서 HPA-5(Br)의 유전자형이 모두 동일한 유전자형을 보였으며, 정상 대조군 35명에서의 HPA-5(Br)의 유전자형은 32명(91.4%)이 a+b-, 3명(8.6%)이 a+b+를 보였다.

2. 2회 이상 혈소판 반복 수혈 후 혈소판 불응증을 보인 환자의 항혈소판 항체 검사 결과 13명의 환자 중 3명(23%)이 양성으로 나타났으며, 10명(77%)은 음성으로 나타났다.

3. 항혈소판 항체 양성을 보인 환자와 항체 음성을 보인 환자의 HPA-5(Br)의 유전자형은 a+b-로 동일하였다.

이상의 결과를 종합해보면, 이번 연구를 통해 혈소판 항체에 의한 혈소판 수혈 불응증을 다회 혈소판 수혈 환자에서 확인할 수 있었으며, 항체의 성상을 규명하지 못했지만 한국인에서 HPA-5 항원의 a+b-형의 유전자 빈도가 우세하여도 HPA-5a+b+항원으로 인한 anti-HPA-5b의 생성 가능성을 배제할 수 없음을 알 수 있었다. 또한 환자군 내에서 Gp I a(HPA-5)의 G/A유전자 다형성(polymorphism)을 관찰할 수 없었고, 정상대조군과 환자군 사이에서 Gp I a(HPA-5)의 G/A유전자 다형성의 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 혈소판 감소증(thrombocytopenia) 발생기전과 Gp I a(HPA-5)의 유전형과는 중요한 연관성이 없는 것으로 생각된다.

핵심 되는 말 : 혈소판 수혈, 동종 면역, 혈소판 특이항원, HPA-5, 유전자 다형성, 대립인자 특이적 제한 효소법

제 1 장 서 론

최근 유전자 재조합의 기술진보로 Erythropoietin(EPO), Granulocyte colony stimulating factor(G-CSF) 등의 적혈구, 호중구에 관한 조혈인자 등의 수혈 대체 치료의 가능성이 제시되고 있지만, 혈소판 감소증에 대하여서는 혈소판 수혈이 유일한 치료수단이다. 혈소판 수혈은 혈소판 감소증을 동반하는 백혈병, 재생불량성 빈혈 등 혈소판기능장애를 가진 환자들에 있어 출혈의 예방, 치료목적으로 이용되며, 그 사용량은 수혈용 성분제제 사용량의 3분의 1 이상을 차지하고 있다(Asahi *et al.*, 2000).

혈소판 사용증가 원인으로는 최근 들어 악성종양과 여러 혈액 질환에 있어서 보다 집중적 치료가 이루어지면서 혈소판에 대한 요구가 증대되었기 때문이며(박선양, 1990; 김현옥, 1996) 이러한 혈소판 수혈은 1회에 10단위 이상이 장기간에 걸쳐 투여되기 때문에 혈소판 동종항원의 감각 등 문제점을 가지고 있다. 혈소판 수혈을 자주 받게 되는 환자들은 결국엔 혈소판 수혈에 불응성(platelet refractoriness)이 생겨 예상한 만큼 말초혈소판 수가 증가하지 않는 경우가 많다(Ford *et al.*, 1982). 이러한 혈소판 불응성은 빈번한 수혈로 인해 동종면역기전을 통해 항체가 생성되고, 생성된 항체가 혈소판을 파괴하는데 기인하는 것으로 알려져 있다(Kelton & Ali, 1983; Mentove, 1983).

본 연구에서 다루고자하는 human platelet alloantigen(HPA) 체계의 5번으로 명명되는 Br 항원은 1988년 Kiefel 등이 MAIPA(monoclonal antibody Immobilization of platelet antigens) 검사법을 이용하여 신생아 동종면역성 혈소판 감소증(neonatal alloimmune thrombocytopenia, NAIT)를 일으킨 환자의 엄마로부터 anti-Br^a 항체를 발견함으로써 처음 발표되었다(Kiefel *et al.*, 1988; Kiefel *et al.*, 1987). Gp I a(alpha 2 subunit)에 위치하는 HPA-5 system은 Gp II a와 complex를 이루며 혈소판응집에 중요한 역할을 하는 혈소판 표면에 존재하는 콜라겐 수용체(collagen receptor)이며 (Santoso & Zutter, 1995; Deckmyn *et al.*, 1990), 이전에는 megakaryocytes와 혈소판에만 국한적으로 존재하는 것으로 알려

졌다(Newman & Valentin, 1995). 이러한 $\alpha 2\beta 1$ complex 는 endothelial cell, fibroblasts, epithelial cells, activated lymphocytes 등 다양한 조직에 분포하며 (Castro *et al.*, 2004), 세포상호간의 신호전달(signalling)을 하는 수용체로 세포 표면에 발현되어 작용하는 것으로 알려져 있다(Takada & Hemler, 1989).

HPAs(human platelet alloantigens)는 1950년대 말에서 1960년대 초에 이르기까지 처음으로 기술된 이래(van Loghem *et al.*, 1959), 생화학적으로 중요한 혈소판 구성 성분에 대해 알려지기 시작했다. HPA alloepitopes에 의해 유도되는 항체로 인한 임상적 증상으로는 신생아 동종면역 혈소판 감소증(NAIT), 수혈 후 자반 증(post-transfusion purpura, PTP), 혈소판 수혈 불응증(post-transfusion refractoriness to platelet, PTR)이 있다. 최근 platelet glycoprotein의 다형성(polymorphism)과 vascular disease에서 genetic risk factor로서의 연관성에 대한 연구(Castro *et al.*, 2004; Zotz *et al.*, 1998)가 활발히 진행되고 있으며, 장기이식에서 minor histocompatibility antigen으로 역할에 대한 연구도 있다(Jonse *et al.*, 2003).

Br alloantigen은 Br^a와 Br^b의 두 가지 대립항원(allele)으로 구성되어 있으며 각 allele은 autosomal co-dominant하게 유전된다(Kiefel *et al.*, 1988). 동종항체를 유도하는 혈소판 특이 항원 Br은 혈소판 막 당단백질에 항원 결정기(antigenic determinants)를 가지며, 대립유전자 내 한 개의 DNA 염기가 치환된 결과(A↔G)로 즉 하나의 아미노산의 변화(Lys↔Glu)로 인하여 표현형이 결정된다(Santoso *et al.*, 1993). 혈소판 특이항원은 인종에 따라 대립항원 표현빈도가 다르며 (Muller-Eckhardt *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 2003; Halle *et al.*, 2004; Shih *et al.*, 2003; Chiba *et al.*, 2000), 백인에게는 HPA-1b, 2b, 5b 항원빈도가 높게 나타나며 (Shih MC *et al.*, 2003), 가장 강력한 항원성을 가지는 것은 HPA-Ia(Anti-PI^{A1})로 알려져 있다(Goldberger *et al.*, 1991). 두 번째 임상적으로 중요하게 다루는 항원은 HPA-5(anti-HPA5b)(Williamson *et al.*, 1992)로 혈소판 수혈무반응증과도 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Santoso & Kiefel, 1989; Berling *et al.*, 1989). 이런 서양인에 비해 한국인 대부분에게는 HPA-I(a/a) 와 HPA-V(a/a) 단일 유전자형을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(Kim *et al.*, 1995; 김백수 등 1995; 서동

희 등 1997). 같은 동양인에서도 일본인 경우에는 HPA-4b(Yuk^a)항체에 의해 NAIT가 발생한 것으로 보고되었지만(Matsui *et al.*, 1995), 국내에서는 현재까지 혈소판 특이 항원에 의한 NAIT 발생보고는 없었다. 다만 김 등(김현옥 등 1997; 서장수 등 1990)이 Ko^a항체를 규명하고, 혈소판 다회 수혈자에서 혈소판 특이항원으로 인한 동종면역사례는 보고한 바 있다. 또한 김 등(김백수, 1995)의 연구에 의하면 면역성 혈소판감소증과 혈소판특이항원과의 연관성을 환자군과 정상군과의 HPA system I-V 까지 유전적 다형성으로 비교하여 보고한 바 있다. 그들은 HPA I-IV항원에 의한 항체로 수혈 후 혈소판 감소증이나 임신으로 인한 신생아 동종면역성 감소증의 발생빈도는 매우 낮을 것으로 추정하였으나, HPA-V(Br)의 a+b+유전자형을 가진 환자군과 혈소판 감소증과의 관련성에 대한 추가적 연구의 필요성이 제시하였다.

이에 본 연구를 통해 HPA-5 유전적 다형성과 혈소판 감소증과의 연관성을 알아보려고 하였다. Gp I a gene을 PCR-ASRA(allele-specific restriction enzyme analysis)를 이용하여 얻고, 분자생물학적 방법(Simsek *et al.*, 1993; Unkelbach *et al.*, 1995)을 이용하여 Br항원의 대립유전자를 분석하고자 하였다. 이러한 항원으로 인한 동종면역에 대한 잠재적 risk를 조사함과 동시에, 혈소판 수혈을 받은 환자들의 혈소판 항체 생성군과 비 생성군의 Br alloantigen system(Br^a/Br^b)의 유전자형을 분석하여 immunogenicity의 차이점을 알아보려고 하였다.

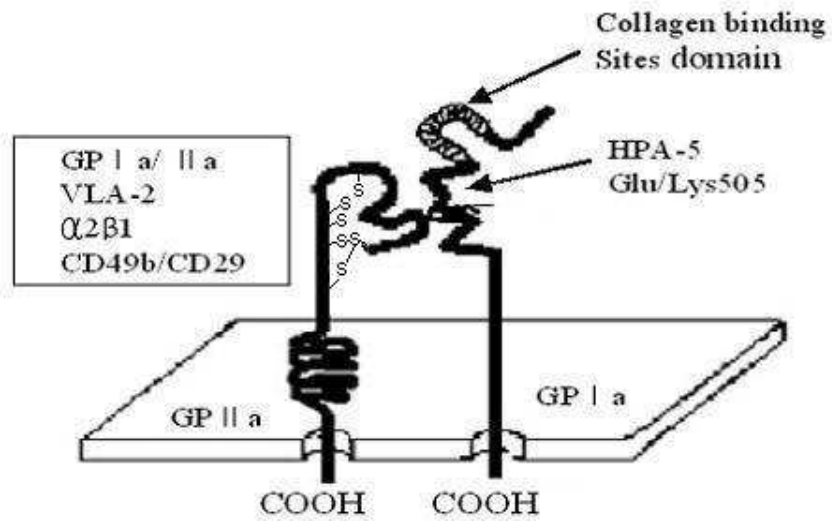


Figure 1. Glycoprotein I a/II a complex showing the polymorphic site of HPA-5 antigen(indicated by arrow). In HPA-5a/5b polymorphisms, ⁵⁰⁵Glu is substituted by Lys in GP Ia (Simseck *et al.*, 1994).

Table 1. Six major glycoproteins of platelet membrane surface¹⁾

GP II b	HPA- 3, 9
GP III a	HPA- 1, 4, 6, 7, 8, 10, 11 and Oe ^a
GP I b	HPA- 2
GP I a	HPA- 5 and 13
GP I b β	HPA- 12
CD 109	Gov

1) Shih *et.al.*, 2003.

제 2 장 재료 및 방법

2. 1 연구 대상

2004년 3월에서 2005년 2월 까지 국립의료원에 내원한 환자 중 여러 가지 병인으로 인하여 혈소판 감소증(혈소판 수 $50 \times 10^3/\mu\text{l}$)을 보이는 환자 및 혈소판 수혈을 2회 이상 반복적으로 수혈 받은 후에 불응성 혈소판 감소증(corrected count increment: CCI가 $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ 이하)을 보인 환자를 대상으로 하였다.

또한, 혈소판 수치에 이상이 없는(정상치: $130 \times 10^3 \sim 400 \times 10^3/\mu\text{l}$) 정상인 35명을 정상 대조군으로 선정하였으며 환자군의 말초혈액과 대조군의 말초혈액을 항응고제(ethylenediamine tetra-acetic acid, EDTA)를 포함하여 5~10 ml를 채취하고 실험 전까지 -20°C 에서 보관하였으며, 다회수혈자의 혈청은 항혈소판 항체(anti-platelet antibody)검사를 실시하기 위하여 냉동 보관하였다.

2. 2 실험 방법

2. 2. 1 혈소판 수 측정

혈소판 수는 EDTA가 포함된 항응고 혈액으로 부터 혈액자동분석기(LH 750, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 측정하였다.

2. 2. 2 항 혈소판 항체(Anti-platelet antibody)검사

항혈소판 항체의 측정은 간접면역 형광항체법(indirect fluorescent antibody: IFA)을 이용하였다. 환자의 혈청 내에 있는 혈소판 항체를 O형의 혈소판에 감작시켜 FITC-labelled anti-human immunoglobulin과 반응시키고 형광현미경으로 검정하여 판독하였다. 이때 양성대조는 항혈소판 항체가 확인된 환자의 혈청을 사

용하였고 음성대조는 수혈을 받은 적이 없는 AB형 혈청을 사용하였다.

3인 이상 O형의 혈액 7 ml와 Na-EDTA 2 ml를 혼합하여 1시간 정도 실온에 방치한 후 1000 rpm으로 15분간 원심시켜 상층을 걷어내고, Na-EDTA를 조금씩 넣으면서 3000 rpm에서 10분간 원심하였다. 상층액은 버리고 침전이 풀리도록 부유한 후 Tyrodes EDTA-BSA로 3회 세척하였다(3000 rpm, 10분). 세척후 1 % PFA-PBS 3 ml를 넣고 tray mixer에서 10분간 흔들어 준 후, Tyrodes EDTA-BSA로 3회 세척하여 Tyrodes EDTA-BSA로 혈소판을 부유시켰다. 이때 $40\sim 100\times 10^3/\mu\text{l}$ 이 되도록 조절하였다. 환자혈청 100 μl 와 혈소판 부유액 100 μl 를 microplate에 잘 혼합하고 37℃에서 1시간 반응시킨 후 Tyrodes EDTA-BSA로 3회 세척하였다(3000 rpm, 13분). Microplate의 각 well당 FITC-conjugate (goat-anti-human Ig) 100 μl (1:20 희석액)씩 넣고 실온암소에서 30분간 반응시키고 Tyrodes EDTA-BSA로 3회 세척하였다(3000 rpm, 13분). 각 well당 30 % glycerol-PBS를 25 μl 씩 넣은 후 잘 부유시켜 이를 slide 위에 한 방울 떨어뜨린 후 coverglass를 덮어 형광현미경으로 관찰하였다.

2. 2. 3 Genomic DNA 분리

DNA추출을 하기위해 EDTA가 첨가된 환자군 및 정상군의 말초혈액을 37℃ 온수조에서 해동시킨 후 상품화된 DNA 추출 kit (DNeasy tissue kit, QIAGEN Co, USA)를 이용하였다. 혈액 300 μl 에 들어있는 적혈구를 lysis buffer로 용해시킨 후 proteinase K 20 μl 를 첨가 후 70℃에서 10분간 가온하였다. 용해질에 200 μl 의 ethanol(96~100 %)를 가한 후 DNeasy Mini spin column으로 옮기고, 8000 rpm으로 1분간 원심한 후 세척 완충액으로 2회 세척하였다.

분리된 genomic DNA는 실험하기 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.

2. 2. 4 Primers 제작

HPA-5 의 유전자형 a+b-, a+b+, a-b+의 결정을 위해 HPA-5 항원 유전자의 점 돌연변이(point mutation)가 포함되게 하여 다음과 같은 primer를 주문제작 하였다(Bioneer Co, Korea). 또한 외부 primer로 PCR후 내부 primer로 2차 PCR하는 nested PCR을 실시하였다.

```
>pr1
gaaggaaactg tgctctctgt cttcatgttc caagcacttt gcaaatagta aacactcaat tttgtgtat
tgaatgagca agtaaagtgt cagtgttaata ttagaagtat atgaatccta ggaattctaa gtttaacatg
ttttattact ccagattggc tcctattttg gtagtgtgct gtgttcagtt gatgtggata aagacacat
                                     >pr3
tacagacgtg ctcttggtag gtgcaccaat gtacatgagt gacctaaga aagaggaagg
aagagtctac ctgtttacta tcaaagaggt aaaaaaaaaa aaataaacta atagtttaat ttgctttagt
actggtaatt taacttgcat ttggaaagaa aaatttatta ttattgaatg ataatttgca cagatagat
ggtttacatt tcatcatttt tgaggatgtc cccattaagt tatgatttta aaaatcacat taacaggaaa
                                     <pr4
aactagagtt gaatgtatag tgtactgcca ttttccatga gaggtctttg aatatatagt ctcttatgca
aataaagcca ttataagtgc acatcgttta ttgaaatatg cacacacaca aacatttggt tatttctcta
                                     <pr2
gtatcacatg taattttttg cgataaagac aacaataaca gggcaatgct ttcttgttat
```

Figure 2. Nucleotide sequence of GPIa gene surrounding the polymorphic base at genomic DNA. Primers used for PCR are underlined. Sense (>) and antisense (<) primers are indicated.

Table 2. Sequences of PCR primers for amplification of Gp I a DNA fragments

gene (primer)	5'-oligonucleotides sequences-3'	size of product
Gp I - I (pr1) :	ACT GTG CTC TCT GTC TTC ATG TTC	606 bp
Gp I - II (pr2) :	GCA TTG CCC TCT TAT TGT TGT C	
NGp I - I (pr3) :	GTG ACC TAA AGA AAG AGG	274 bp
NGp I - II (pr4) :	CTC TCA TGG AAA ATG GCA G	

Table 3. polymorphism of integrin α_2 subunit 2)

cDNA position	Br ^{a/a}	Br ^{b/b}	RFLP	Amino acid change*
1648	<u>A</u> AG	<u>G</u> AG	<i>Mn</i> ℓ <i>I</i>	⁵⁰⁵ Lys ↔ ⁵⁰⁵ Glu

*The base change from A to G in the Br^{b/b} individuals results in an amino acid change from lysin (AAG) to glutamic acid (GAG) at position 505 of mature GPI a.

2) Takada & Hemler, 1989.

2. 2. 5 Nested PCR 실시

1차 PCR을 하기 위하여 DNA template 2 μ l에 pr1과 pr2의 외부 primer (Table 2)를 10 pM로 희석하여 각각 1 μ l씩 넣고 멸균증류수로 전체 양을 20 μ l로 맞추었다. 여기에 PCR용 혼합용액(Tris-HCL 10 mM, KCL 40 mM, MgCl₂, 1.5 mM dNTP, 250 μ M, *Taq*.DNA polymerase 1 U)(AccuPower Premix, Bioneer Co, Daejeon, Korea)에 혼합한 후 PCR을 시행하였다. PCR은 denaturation 95 $^{\circ}$ C, annealing 55 $^{\circ}$ C, extension 72 $^{\circ}$ C로 하여 각각 1분 30초에서 35 cycle을 시행하였다. 2차 PCR은 1차 PCR product를 10배 희석하여 2 μ l에 pr3과 pr4를 10 pM로 희석한 내부 primer(Table 2)를 각각 1 μ l씩 넣고 멸균증류수로 전체 양을 20 μ l로 맞추어 PCR용 혼합용액을 넣고 PCR을 시행하였다. 이때 annealing 온도는 1차와 다르게 51 $^{\circ}$ C에서 실시하였고 denaturation과 extension의 온도는 1차와 동일한 조건으로 하였으며, 시간은 각각 1분씩 시행하였다. PCR은 DNA Thermal Cycler(GeneAmp PCR system 2700, Perkin-Elmer Cetus, USA)를 이용하였으며 오염을 줄이기 위하여 Bio-Workstation(n-BioTEK)에서 실시하였다.

2. 2. 6 RFLP

PCR로 증폭된 산물을 제한효소(*Mn*ℓ I)로 처리하여 RFLP를 시행하여 유전자형 검사를 하였다. 제한효소 처리는 PCR 산물 2 μ l에 제한효소 1 μ l(New England BioLabs, Inc, USA.), NEB buffer 5 μ l, BSA 0.5 μ l를 혼합 후 멸균증류수로 총 반응액이 50 μ l이 되게 만든 후, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다.

2. 2. 7 전기영동 및 결과 판독

PCR 산물 2 μ 를 1.8 % (w/v) agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동 하였으며, 제한효소처리산물 20 μ 는 4 % Metaphor agarose gel 에서 어름에 담긴 상태로 100 V에서 40분~1시간 동안 전기영동하면서 관찰하였다. 전기영동이 끝난 후 ethidium bromide 용액에서 15분간 담가둔 후 ultraviolet trans-illuminator(Gel Doc BioRad, USA)를 이용하여 DNA band를 확인하였다(Figure 4). RFLP에서 제한효소 *MnI*의 인식부위는 GAGG로서 잘리는 유형을 보고 HPA-5 유전자형을 결정하였다. 최종 증폭산물 274 bp에서 33 bp, 136 bp, 98 bp로 잘리면 a+/b-형, 169 bp, 98 bp로 잘리면 a-/b+형, 33 bp, 136 bp, 98 bp, 169 bp 등 네 band가 모두 관찰되면 a+/b+형으로 판독하였다.

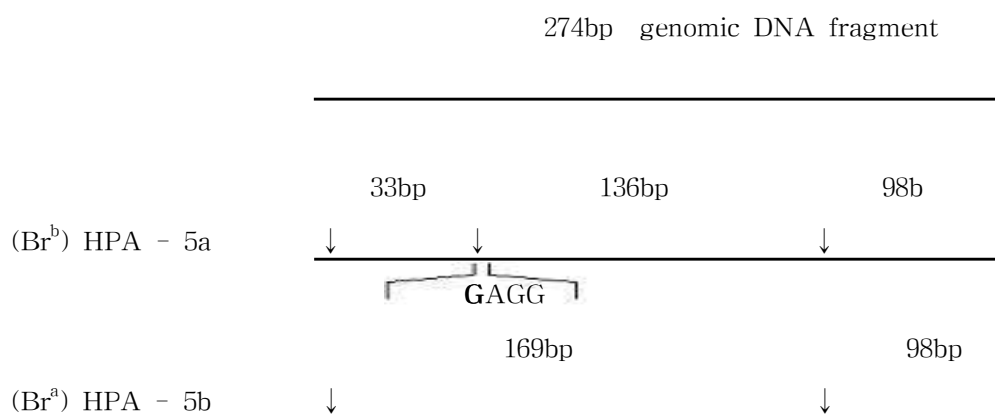


Figure 3. Illustration of restriction sites of PCR fragments for RFLP and typical result of HPA-5a/b typing.

제 3 장 결 과

3. 1 항혈소판 항체 (anti-platelet antibody)검사

동종항체를 검출하는 검사로서 수혈로 인하여 동종면역을 형성한 것으로 보이는 환자를 대상으로 실시하였다. 이들 전체의 평균 수혈량은 69.5단위(unit)(표준편차: 54.7)이고, 평균 수혈기간은 2.5개월(표준편차: 2.1)로 조사되었으며, 평균 수혈횟수는 9.3회(표준편차: 7.6)이고, 수혈기간 동안 측정된 평균 혈소판 수치는 38,930/ μl (표준편차: 20.395)였다. 본 연구 대상자중 2회 이상 혈소판 반복 수혈 후 혈소판 수가 증가되지 않는 환자(CCI가 $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ 이하) 전체 13명중 7개월간 9회에 걸쳐 83단위를 수혈 받은 환자와 2개월간 15회에 걸쳐 116단위, 5개월간 11회에 걸쳐 50단위를 수혈 받은 환자 3명(23.1 %)에서 항체 양성반응이 나왔으며, 이들 항체생성군의 평균 수혈량은 83단위(전체평균 69.5)였으며, 평균 수혈기간은 4.6개월(전체평균 2.5), 평균 수혈횟수는 11.6회(전체평균 9.3), 수혈기간 동안의 평균 혈소판 수치는 26,666/ μl (전체평균 38,930)이었다. 나머지 반복 수혈 후 혈소판 수치 상승하지 않은 환자 10명은 항체생성 음성으로 나타났으며 2개월간 15회에 걸쳐 116단위를 수혈 받은 환자와 5개월간 27회에 걸쳐 190단위를 수혈 받은 환자, 4개월간 18회에 걸쳐 150단위를 수혈 받은 환자도 항체를 생성하지 않은 군에 포함 되었다. 항체 생성군과 비생성군에서의 평균 수혈량은 각각 83단위(표준편차: 33) 및 66단위(표준편차: 63.3)로 나타났으며 수혈횟수는 각각 11.6회(표준편차: 3.1) 및 8.7회(표준편차: 8.5)로, 수혈기간은 각각 4.6개월(표준편차: 2.5) 및 1.8개월(표준편차: 1.5)로 나타났다(Table 4).

Table 4. Detection of anti-platelet antibody in multi-transfused patients

patient No.	*age/sex	unit of PLTC	duration (month)	frequency	**PLT(/ $\mu\ell$)	anti-platelet antibody
1	53/M	16	1m	2	4,100	***N
2	79/M	83	7m	9	22,000	***P
3	60/M	24	1m	3	40,000	N
4	55/M	10	1m	2	68,000	N
5	64/F	116	2m	15	22,000	P
6	64/M	50	5m	11	36,000	P
7	77/F	56	1m	7	44,000	N
8	75/F	111	2m	15	55,000	N
9	65/F	15	1m	2	21,000	N
10	47/M	30	1m	5	29,000	N
11	41/M	190	5m	27	69,000	N
12	48/F	53	1m	6	65,000	N
13	43/F	150	4m	18	31,000	N

* Age (mean \pm SD): 59.3 \pm 12.3yrs, M:F = 7:6.

** PLT: average peripheral platelet count during transfusion (reference range: 130~400 \times 10³/ $\mu\ell$).

*** P: positive, N: negative.

3. 2 PCR

환자군 20명, 정상대조군 35명 등 총 55명의 혈액에서 genomic DNA를 분리하여 PCR을 시행 후 1.8 % agarose gel로 전기영동하여 확인한 결과 모든 검체에서 274 bp band를 확인하였다.

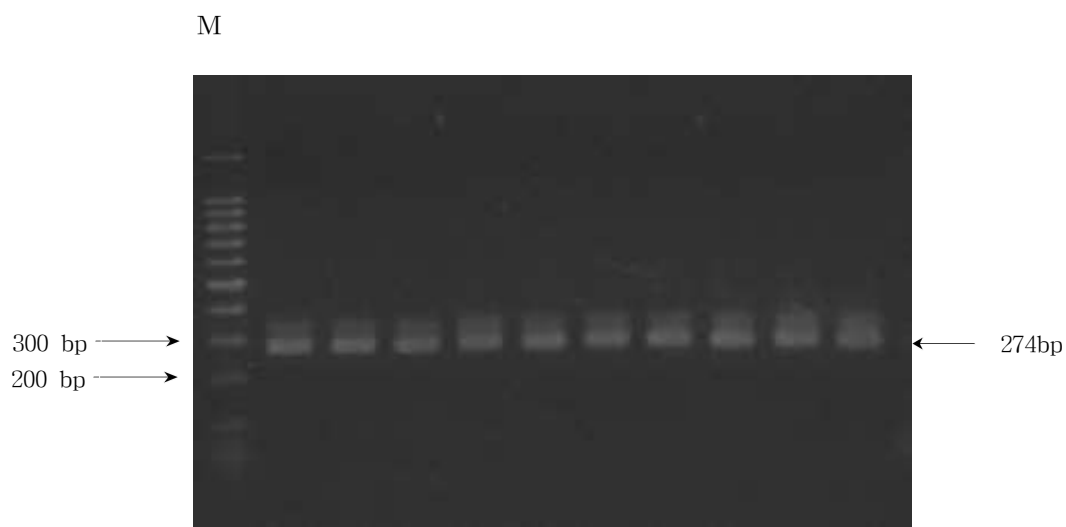


Figure 4. DNA fragments of GPIIb/IIIa gene amplified by PCR. Marker:100 ladder. A region (274 bp) in the genomic DNA, in which the HPA-5 polymorphism is located, was amplified by PCR.

3. 3 PCR 증폭산물 의 RFLP 절단 양상

RFLP 유형으로 유전자형을 결정하였다. 총 55명의 혈소판 특이항원 HPA-5의 유전자형(genotype)은 Table 5와 같으며, Figure 5A는 혈소판 감소증을 보이는 환자군에 대한 전기영동 결과이며, Figure 5B는 혈소판 수치가 정상인군의 전기영동 결과이다.

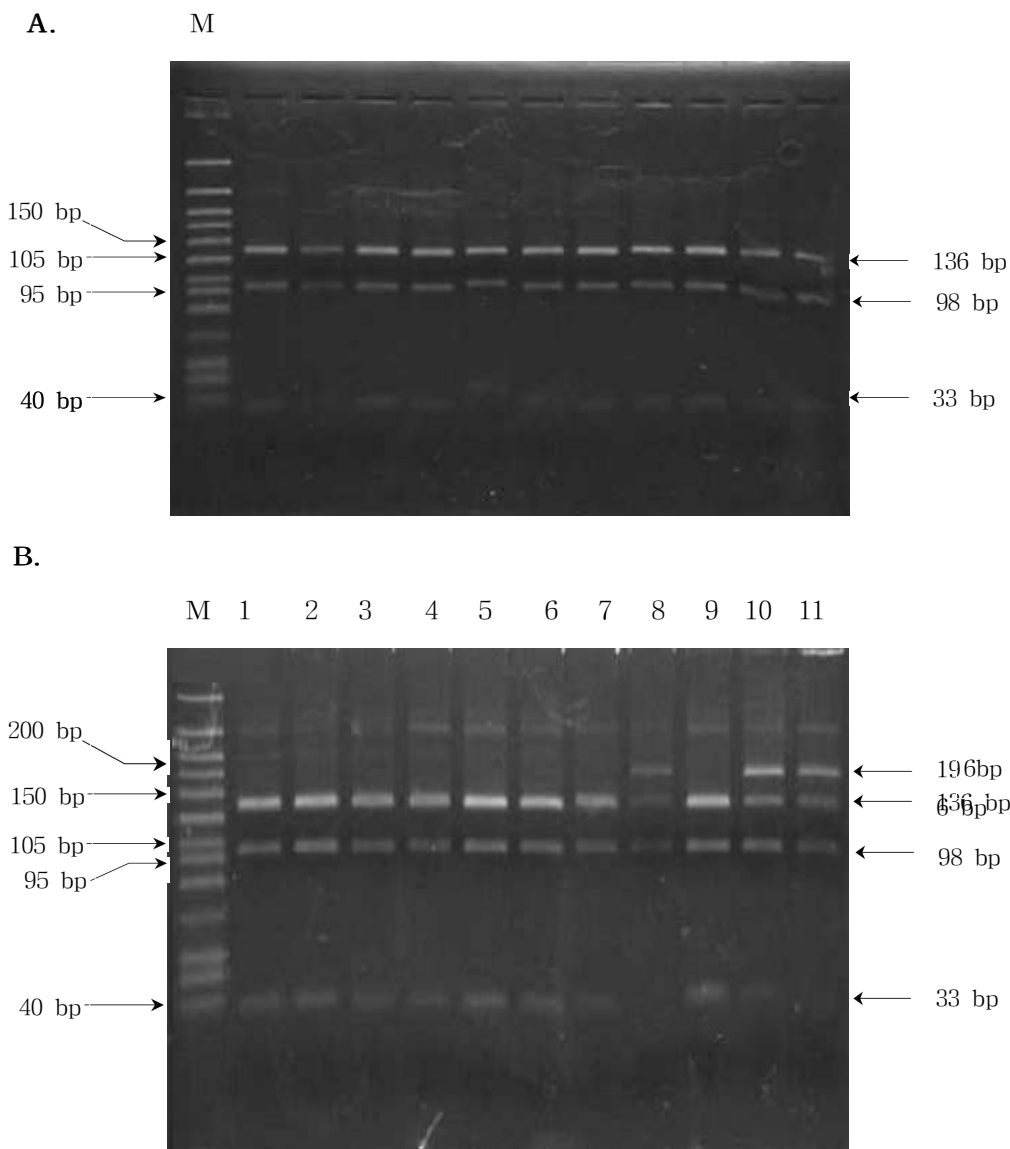


Figure 5. RFLP analysis of HPA-5(a/b) alleles DNAs amplified by PCR.

Metaphor agarose gel(4 %) analysis of digested PCR products from Br genotype cases. A: a patient group. All Lanes show the HPA-5(a+/b-) pattern of DNA fragments digested by *Mnl*I. B: a normal group, Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 show the HPA-5(a+/b-) pattern of DNA fragments digested by *Mnl*I. Lane 8, 10, 11 show the HPA-5(a+/b+) pattern of DNA fragments digested by *Mnl*I. M; the PRA marker(M&D, Korea).

3 . 4 HPA-5 유전자형 빈도 조사

Table 7에서 보듯이 백인의 HPA-5a/a의 동형접합자는 대략 80%, 흑인의 HPA-5a/a의 동형접합자는 대략 55%로 조사되었다. 한국인의 경우는 94~98 %로 백인과 흑인보다 높다. 한국인에서 HPA-5a/b 빈도는 1.9~6.6%로 백인에 비해 매우 낮은 것으로 조사되었고, 흑인의 경우는 35~42%로 상당히 높게 나타나는 것으로 조사 되었다. 한국인과 남미인에서는 HPA-5b/b 동형접합자는 없는 것으로 관찰되었다. 이번 연구에서는 HPA-5a/a가 94.5%, HPA-5a/b가 5.5%로 나타났으며 HPA-5b/b는 이전의 연구와 마찬가지로 관찰되지 않았다(Table 5).

본 연구에 포함된 20 명의 환자군에서도 다수혈군 중 혈소판 항체를 생성한 3 명이 33 bp, 98 bp, 136 bp에서 잘리는 HPA-5a/a homozygotes로 나타났으며, 항체를 생성하지 않은 군 10명 모두 33 bp, 98 bp, 136 bp에서 잘리는 HPA-5a/a homozygotes로 나타났다. 그 외 혈소판 감소증을 보인 환자 7명 모두 HPA-5a/a homozygotes로 관찰되었다(Figure 5A). 또한 정상대조군 35명중 32명은 33 bp, 98 bp, 136 bp에서 잘리는 HPA-5a/a형으로, 나머지 3명은 33 bp, 98 bp, 136 bp, 196 bp로 잘리는 HPA-5a/b 즉, heterozygotes로 판단되었으며, HPA-5b/b는 어느 군에서도 관찰되지 않았다(Figure 5B).

Table 5. Genotyping of platelet-specific antigen, HPA-5

	Patient Group			Normal Group	
	multi-transfused patients antibody formation	No antibody formation	non-transfused patients		
a+b-	3	10	7	32	94.5(%)
a+b+	0	0	0	3	5.5(%)
a-b-	0	0	0	0	0.0(%)

Table 6. Genotype frequency and gene frequency of HPA-5

	Genotype frequency(%)			Gene frequency	
	a+b-	a+b+	a-b+	a	b
multi-transfused pt.	100.0	0.0	0.0	1.000	0.000
non-transfused pt.	100.0	0.0	0.0	1.000	0.000
normal	91.4	8.6	0.0	0.957	0.043

Table 7. Comparison of genotype frequency of HPA-5

	HPA-5 Genotype Frequency (%)		
	a+b-	a+b+	a-b+
서 등 ³⁾	95.5	4.5	0.0
김 등 ⁴⁾	98.1	1.9	0.0
김 등 ⁵⁾	94.0	6.0	0.0
Whites ⁶⁾	79	19	2.0
Japanese ⁷⁾	93.0	6.0	1.0
Brazilian ⁸⁾	64.9	35.1	0.0
Amazon indians ⁹⁾	92.6	7.4	0.0
Cameroon ¹⁰⁾	56.8	35.6	7.6
Congo ¹¹⁾	52.0	42.4	5.6
this study	94.5	5.5	0.0

3) 서동희 등 1997.

4) 김백수 등 1995.

5) Kim *et al.*, 1995.

6) Kim *et al.*, 1995.

7) Tanaka *et al* 1996; Fujiwara *et al.*, 1982.

8) chiba *et al*, 2000.

9) chiba *et al*, 2000.

10) Halle L *et al.*, 2004.

11) Halle L *et al.*, 2004.

제 4 장 고 찰

최근에 개발된 다양한 분자진단법을 통해 genotyping을 손쉽게 수행할 수 있다. 종전의 전통적 방법(serological typing)인 immunofluorescence test(Schneider *et al.*, 1981), mixed passive hemagglutination method(Shibata *et al.*, 1981), monoclonal antibody-specific immobilization of platelets antigen assay(Kifel *et al.*, 1987; Kifel, 1992), modified antigen capture ELISA(Mcmillian *et al.*, 1987) 등은 genotyping에 만족스러운 결과를 제공해주질 못하고 있다. 이러한 혈청학적 방법에는 각각 특이도와 민감도에 따른 장단점이 있다(김현욱 등, 1996). 우선 가장 큰 취약점은 항원빈도가 낮은 항원(rare human anti-sera), 예를 들면 HPA-5b, HPA-1a과 같은 항원에 대한 항혈청을 구하기가 매우 어렵다는 것이다. 따라서 PCR 방법을 기반으로 하여 다양한 HPA typing technique이 많이 개발되어 사용되고 있다. 본 연구에서도 PCR과 RFLP 방법을 바탕으로 HPA-5의 genotyping을 분석하여, 혈소판 감소증의 원인이 되는 항체의 존재를 간접적으로 규명해 보고자 하였다.

최근 일본에서 유럽과 중국, 미국에 비하여 매우 낮은 빈도를 보이는 Br^a homozygotes 산모(HPA-5a-b⁺)에서 만들어진 anti-HPA-5a(Br^b) 항체로 인해 신생아 동종면역성 혈소판 감소증(Br^b-NAIT)이 발생할 수 있다고 보고하였다(Yoshikane *et al.*, 2004). 이 경우 아버지와 아이의 유전자형은 모두 HPA-5a+b⁺(Br^{b/a})였다. 일본과 마찬가지로 우리나라에서도 HPA-5a+b⁺ 항원빈도가 매우 낮은 것으로 보고되었고(Table 7), 또한 HPA-5a+b⁺(Br^{b/a})로 인하여 HPA-5a+b-형 사람에게 anti-HPA-5b 항체생성으로 인한 혈소판 감소증이 발생할 가능성이 있을 수 있음을 간접적으로 증명한 바 있다.

국내에서 혈소판 특이항체에 의한 혈소판 동종 면역반응 빈도가 60%에 이르는 것으로 보고되었으며(한규섭 등 1991), 본 연구를 통해서도 혈소판 특이항원에 의해 유도되는 항체로 인한 혈소판 수혈 불응성이 다회 수혈환자들에게서 발생하고 있음을 확인할 수 있었다(Table. 4). 그러나 platelet surface GpIIa/IIIa의 항원결

합부위가 60,000 개(Santos *et al.*, 1989)가 넘지만, HPA-5가 위치하는 Gp I a/II a 분자의 항원결합부위는 이보다 적은 약 2,000개 이상이어서(Warkentin *et al.*, 1992) 어떠한 당단백을 표적으로 하는 항체인지는 혈청학적 방법으로는 동정이 곤란하다. 이전의 발표에 의하면 약 30~50 %의 환자는 계속적인 수혈에도 동종면역이 발생 하지 않는 것으로 알려져 있으며(Dutcher *et al.*, 1981), 그 이유도 명확하게 밝혀져 있지 않다. 또한 반복수혈에 의해 동종면역(alloimmunization)되어 혈소판 수혈효과를 얻을 수 없는 환자들을 대상으로 항혈소판 항체생성 여부에 대한 보고가 많지 않다. 이에 대한 원인으로서는 혈소판 감소증의 일차적인 원인이 면역기전에 의하지 않을 가능성과 항체검출의 어려움에 기인하는 것으로 생각된다(박근조, 1987). 그러나 혈소판 수혈 불응증을 초래하는 동종면역은 동종항체를 생성하는 면역 현상이므로 항혈소판 항체생성 여부는 동종면역 환자의 진단을 위한 검사로 가치가 있다고 사료된다.

본 연구에서 항혈소판 항체를 생성한 군과 생성하지 않은 군을 비교하였을 때, 오히려 더 많은 양의 수혈을 받았거나, 더 오랜 기간 동안 수혈을 받았음에도 항체를 생성하지 않은 경우가 있었다. 이는 항혈소판 항체가 검출한계 이내로 미량 존재할 가능성이 있고, 또한 1회의 혈소판 항체검사만으로 항체생성 여부를 판단하기는 곤란하다. 현재 검사실에서 많이 이용되고 있는 IFA의 민감도는 32~50%로 알려져 있다.

이전의 연구에 의하면 혈소판 반복수혈 환자들의 2/3 정도는 4-6주 내에 동종면역반응이 일어나는 것으로 알려진 바(Howard *et al.*, 1978), 이번 연구에서 7명의 환자가 수혈 후 한 달 이내에 퇴원하여 입원기간중의 항체생성이 일어나지 않았을 수도 있다. 또한 혈소판 수혈량과 수혈기간과에 상관관계가 있다는 보고가 있는 반면(Howard *et al.*, 1982), 그런 상관관계를 부정하는 보고도 있다(Dutcher *et al.*, 1981). 그러한 원인으로서는 연구 성격의 차이, 혈소판 농축액에 포함된 임파구 수, 혈소판 공여자의 수, 수혈된 다른 성분제제의 영향, 대상 환자 수, 일차 질환과 조사기간 중에 치료 여부와 내용의 차이에 기인하는 것으로 설명되고 있다(박선양, 1990). 그러나 본 연구의 대상을 분석해본 결과, 성별이나 연령과의 연관성을 찾아 볼 수 없었으며 혈소판 수혈량, 수혈횟수, 수혈기간 등은 증가할수

특 동종면역 발생에 영향을 주는 것으로 판단되었다.

최근에는 백혈구제거(Leuko-reduction) 성분채집 혈소판제제(SDP)나 방사선 조사 혈액제제(irradiation components) 등 백혈구를 제거하여 수혈하는 것이 권장되어, 그동안 수혈 후 동종면역 발생의 주요 원인으로 알려진 HLA항체에 대한 빈도가 10~20 %로 급격하게 감소되었다(Daly *et al.*, 1980; Hogge *et al.*, 1990). 따라서 최근 혈소판에 특이적으로 존재하는 혈소판 특이항원의 분자유전학적 규명이 활발하게 이루어지면서 혈소판에 존재하는 당단백의 구조 및 HPAs의 대립인자 다형성(allelic polymorphism)에 대한 연구가 중요시 되고 있다(Nurden, 1995). 그동안의 연구들은 당단백 중 다형성이 가장 큰 GpIIIa/IIb complex를 표적항원으로 주로 연구되었다(Tanaka *et al.*, 1996).

본 연구에서는 항원 결정기 수가 적어 혈청학적 규명이 어렵고, 우리나라에서는 그다지 관심이 집중되지 않지만 서양에서는 관심이 많은 항원인 HPA-5가 위치하는 Gp I a에 대한 유전적 다형성(genetic polymorphism)을 분석하고, 그 차이에 따른 혈소판 감소증 발병과의 연관성을 알아보려고 하였다.

HPA-5 유전자 빈도를 기존의 연구결과와 본 연구결과를 비교해보면(Table 7) (1) 우선 HPA-5a-b+ homozygote가 55 명중 한 명도 관찰되지 않은 점에서 기존 보고와 일치하였으며(Lyou *et al.*, 2002; 위재호 등 1998; 서동희 등 1997; Kim *et al.*, 1995; 김백수 등 1995), (2) HPA-5a+b- 경우 또한 기존의 결과(94.0~98.1%)와 이번 연구결과(94.5%)가 유사하였고, (3) HPA-5a+b+ heterozygote도 기존연구결과(1.9~6.0%)내에 이번 연구결과(5.5%)가 포함되었다. 그러나 대상군이 소규모였고, 기존에 보고 된 비율보다 HPA-5a+b+ heterozygote의 빈도가 높을 가능성을 배제할 수 없어, 이에 대한 추가연구가 필요하다.

본 연구에서 2회 이상 혈소판 수혈 후 혈소판 수치가 $10 \times 10^3 \mu\text{l}$ 이상 상승되지 않는 환자 13명과 기존 질환에 관계없이 조사기간 중 $50 \times 10^3 \mu\text{l}$ 이하의 낮은 혈소판수치를 보이는 환자 7명을 포함하여 총 20명을 대상으로 DNA를 추출하여 HPA-5의 유전자형을 분석하였다. 분석결과 대상 환자 20명 모두가 HPA-5a+b-homozygosity임을 확인할 수 있었다. HPA-5a+b+ 유전자형이 혈소판 막 이외에 활성화된 T세포 표면에도 동일한 분자구조(VLA-2)를 발현되기 때문에(Takada &

Hemler, 1989), 혈소판 특이항원으로 유도되는 항체(humoral immunity) 이외에 HPA alloepitope에 의한 cytotoxic immunity(CMI) 가능성을 제시한 바 있다(김백수, 1995). 본 연구에서도 HPA-a+b+의 혈소판 수용체와 혈소판 감소증과의 상호작용에 확인하고자 하였으나, 환자군에는 HPA-5a+b+ 유형이 없었고 정상군에서도 3명만이 관찰됨에 따라 Gp1a의 유전형과 thrombocytopenia와의 관련이 적다고 판단되었다. 그러나 추후 보다 많은 표본을 대상으로 하여 Gp1a의 유전형과 ITP나 SLE 등 자가 면역 질환에서 당단백과의 연관성 및 혈소판 감소증 환자에 있어서 다양한 혈소판 특이 항원계와의 연관성을 밝히는 연구는 의미가 크다.

그 동안의 연구에서는 혈소판 당단백질이 자가 면역 질환과 혈소판 수혈 후 무 반응증 및 수혈과 관련된 혈소판 감소증, 신생아 혈소판 감소증 등의 치료 및 예방, 진단을 위하여 주로 연구되어 왔다. 앞으로 cardiovascular disease(Zotz *et al.*, 1998; Ardissino *et al.*, 1999; Mikkelsson *et al.*, 2001)에 HPA 다형성의 유전적 위험인자(genetic risk factor)로서의 연관성에 대한 연구와 더불어 고형장기이식(solid organ transplantation)과 골수이식에 있어서의 HPA 다형성이 미치는 영향에 대해 계속적인 연구가 필요하다(Kekomaki *et al.*, 2001).

본 연구결과가 향후 혈소판 특이항원에 작용하는 항체로 발생하는 혈소판 수혈 불응증 연구와 효과적인 혈소판 수혈을 위한 유용한 자료가 되기를 기대한다.

제 5 장 결 론

정상대조군 35명과 혈소판 감소증 환자 및 혈소판 반복 수혈자 20명을 대상으로 HPA-5 유전자(Gp I a gene)를 증폭한 후 대립인자 특이적 제한효소법(ASRA)을 이용하여 HPA-5의 A/G polymorphism(다형성)을 조사하였으며, 반복 수혈자에게는 항혈소판 항체 보유여부를 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 2004년 3월에서 2005년 2월까지 국립의료원에서 2회 이상 혈소판 농축액이 요구되고 혈소판 수혈 후 수혈불응증을 보인 환자 13명 및 기존 질환에 관계없이 심한 혈소판 감소증을 보인 환자 7명등 총 20명의 유전자를 분석한 결과, HPA-5(Br)의 유전자형 모두 동일한 유전자형(a+b-)을 보였으며, 정상 대조군 35명에서의 HPA-5(Br)의 유전자형은 32명(91.4 %)이 a+b-, 3명(8.6 %)이 a+b+를 보였다.

2. 2회 이상 혈소판 반복 수혈 후 혈소판 불응증을 보인 환자의 항혈소판 항체 검사 결과 13명의 환자 중 3명(23 %)이 양성으로 나타났으며 10명(77 %)은 음성으로 나타났다. 이들 전체의 평균 수혈량은 69.5단위(표준편차: 54.7)이고, 평균 수혈기간은 2.5개월(표준편차: 2.1)로 조사되었으며, 평균 수혈횟수는 9.3회(표준편차: 7.6)로, 수혈기간 동안 측정된 평균 혈소판 수치는 38,930/ μ l(표준편차: 20.395)로 나타났다.

3. 항혈소판 항체 양성을 보인 환자의 HPA-5(Br) 유전자형은 a+b-, 항체 음성을 보인 환자의 HPA-5(Br)의 유전자형도 동일한 a+b-였다.

이상의 연구결과를 종합해보면 혈소판 특이항체에 의한 혈소판 수혈 불응증을 다회 혈소판 수혈 환자에서 확인 할 수 있었으며, 항체의 성상을 규명하진 못했지만 한국인에서 HPA-5 항원의 a+b- 형의 빈도가 우세하여도 HPA-5a+b+의 유전자형으로 인한 anti-HPA-5b의 생성 가능성을 배제 할 수 없었다. 환자군 내에서 Gp I a(HPA-5)의 G/A 다형성을 관찰 할 수 없었고, 정상대조군과 환자군 사이에도 Gp I a(HPA-5)의 유전자 다형성의 유의한 차이를 관찰 할 수 없었다. 따라서 혈소판 감소증(thrombocytopenia) 발생기전에 Gp I a(HPA-5)의 유전적 다형성이

미치는 영향은 크지 않을 것으로 생각된다.

참고 문헌

- 김백수, 송경순, 김현옥, 한지숙(1995). 면역성 혈소판 감소증 환자에서 혈소판 특이 항원 계 유전자 다형성. *한국지혈혈전학회지* 2:127-137
- 김백수, 송경순, 이승무, 김형옥, 권오현(1992). 한국인의 혈소판 특이 항원 계 유전자형 및 유전자 빈도. *한국지혈혈전학회지* 2:117-125
- 김현옥(1996). 세브란스병원에서의 성분수혈(1986-1995). *대한의학협회지* 39:796-802
- 김현옥, 임환섭, 김문정, 조성란, 이정문, 남정현, 김휘준(1996). 혈소판 감소증 환자에서 혈소판 항체 검출을 위한 Modified Antigen Capture ELISA 방법의 적용. *대한혈액학회지* 31:373-381.
- 김현옥, 김문정, 조성란(1997). DNA 유전자형 검사를 이용한 혈소판 항원 Panel의 제작경험. *대한수혈학회지* 8:125-130.
- 박근조, 박선양, 김승택, 김병국, 김노겸, 이문호(1987). 혈소판동종면역이 Platelet-Associated IgG (PAIgG)에 미치는 영향과 ELISA법을 이용한 혈소판 적합성 검사에 관한 연구. *대한내과학회지* 33:11-20.
- 박선양(1990). 혈소판 동종 면역의 발생 기원과 빈도. *대한수혈학회지* 1:179-181
- 서동희, 박성섭, 김대원, 한규섭(1997). 한국인의 혈소판특이항원 유전자형 (Genotype) 빈도. *대한수혈학회지* 8:93-102

서장수, 김재식(1990). 혼합수신혈구 응집 반응법을 이용한 혈소판 항원 Panel의 제작. *대한수혈학회지* 1 : 57-64

송도영, 이중원, 이원길, 김재식, 최영철, 서장수(1997). 한국인 임부에서의 혈소판 당 단백질 IIIa 특이 항원 및 과립구 항원 유전자 형 빈도. *대한수혈학회지* 8:325-335

위재호, 김경희, 김아성, 정기철, 한진영, 김정만(1995). 유세포분석기를 이용한 혈소판 항체에 관한 연구. *대한임상병리학회지* 15:317-326

한규섭, 김상인, 김병국, 박선양, 오영철(1991). 다회 수혈자에 있어서 혈소판 동종 면역 형성에 관한 연구. *대한수혈학회지* 2:19-27.

Asahi, T, Ikeda H, Kajii E, Kawamura A, Ohto H, Osada K, Shimotama R, Takahashi D, Takamatsu J, Takamoto S, Yamamoto T(2000). Transfusion Medicine. Theories and perspectives. (Ikeda CH, Shimoyama R, eds) p.216-230. Hokkaido University Press. Japan

Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, Duca F, Fetsiveau R, Tagliabue L, Tubaro, M, Galvani M, Ottani F, Ferrario M, Corral J, Margaglione M(1999). Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood*. 94:46-51.

Bierling P, Fromont P, Bettajeb A, Duedari N(1989). Anti-Br^a antibodies in the french population. *Br J Haematol*. 73 : 428-429.

Castro V, Alberto FL, Lepikson-Neto J, Gualandro SFM, Figueiredo MS(2004). Polymorphism of the human platelet antigen-5 system is a risk factor for

- occlusive vascular complications in patients with sickle cell anemia. *Vox Sang.* 87:118-123.
- Chiba AK, Bordin JO, Kuwano ST, Frgueiredo MS, Carvalho KI, Vieira JPB and Kerbauy J(2000). Platelet alloantigen frequencies in Amazon Indians and Brazilian blood donors. *Transfusion Medicine* 10:207-212.
- Dutcher JP, Schitter CA, Aisner J, Waiernik PH(1981). Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose-response relationship. *Blood.* 57:395-398.
- Daly PA, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH(1980). Platelet transfusion therapy: one hour post-tranfusion increments are valuable in predicting the need for HLA-matched preparations. *JAMA* 243:435-438.
- Deckmyn H, Chew SL, Vermynen J(1990). Lack of platelet response to collagen associated with an autoantibody against glycoprotein Ia: a novel cause of acquires platelet dysfunction. *Thromb Haemost.* 64:74-79.
- Ford JH, Brown LM, Cullen HH(1982). Combines granalocyte and platelet transfusion: development of alloimmunization as reflected by decreasing cell recovery values. *Transfusion* 22:498-503.
- Fujwara K, Isa K, Oka T, Maekawajiri S, Yamane A, Akaza T(1996). Large-scale DNA typing for human platelet alloantigens by PCR-PHFA (preferentia homoduplex formation assay). *Br J haematol.* 95:198-203.
- Goldberger A, Kolodziej M, Poncz M, Bennett JS, Newman P(1991). Effect of

- single amino acid substitutions on the formation of the PIA and Bak alloantigenic epitopes. *Blood* 78:681-687.
- Halle L, Bigot A, Mullen-lmandy G, M' Bayo K, Jaeger G, Anani L, Martageix C, Bianchi F, Julien E, Kaplan C(2005). HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. *Tissue Antigens* 65:295-298.
- Howard JE, Perkins HA(1978). The natural history of alloimmunization platelets. *Transfusion* 18:496-503.
- Hogge DE, Datcher JP, Aisner J, Schiffer CA(1983). Lymphocytotoxicity antibody is a predictor of response to random donor platelet transfusion. *Am J Hematol.* 14:363-369.
- Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, Young NT, Marshall SE(2003). Human platelet alloantigens(HPAS): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunogenet.* 30:415-419.
- Kelton JG, Ali AM(1983). Platelet transfusion: A critical appraisal. *Clin Oncol.* 2:549-585.
- Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF(1995). Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African Americans, white, and Korean populations. *Transfusion* 35:863-867.
- Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Mueller-Eckhardt CL(1988). A new platelet-specific alloantigen Br^a: Report of 4 cases with neonatal alloimmune

- thrombocytopenia. *Vox sang* 56:101-106.
- Kiefel V, Santoso S, weisheit M, Mueller-Eckhardt C(1987). Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens(MAPIA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 70:1222-1226.
- Kekomaki S, Kyllonen L, Salmela K, Koskimies S, Kekomaki R(2001). Platelet-specific alloantigens in cadaveric renal transplantation. A prospective study. Effect of HPA-5b mismatch in acute vascular rejection of renal allografts. *Tissue Antigens*. 57:154-157.
- Kiefel V(1992). The MAPIA assay and its applications in immunohaematology. *Transfusion Med*. 2:181-188.
- Nurden AT(1995). Human platelet membrane glycoprotein: Structure and clinical significance. *Thromb Haemost*. 74:345-351.
- Newman PJ, Valentin N(1995). Human platelet alloantigens: Recent findings, new perspectives. *Thromb Haemost*. 74:234-239.
- Matsui K, Ohsaki E, Goto A, Koresawa M, Kigasawa H, Shibata Y(1995). Perinatal intra-cranial hemorrhage due to severe neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura(NAITP) associated with anti-Yukb (HPA-4a) antibodies. *Brain Dev*. 17:352-355.
- Mentove JE(1983). Platelet transfusion for alloimmunized patients. *Clini Oncol*. 2:587-609.

- Mikkelsson J, Perola M, Penttila A, Karhunen PJ(2001). Platelet glycoprotein Ibalpha HPA-2 Met/VNTR B haplotype as a genetic predictor of myocardial infarction and sudden cardiac death. *Circulation* 104:876-880.
- McFarland JG, Frenzke M, Aster RH(1989). Testing of maternal sera in pregnancies at risk for neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 29:128-133.
- Mueller-Eckhardt C, Santos S, Kiefel V(1994). Platelet-alloantigen-molecular, genetic, and clinical aspects. *Vox Sang* 67:89-93.
- McMillan R, Tani PH, Millard F(1987). Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 70:1040-1045.
- Pegels JG, Bruynes EC, Engerliet CP, von dem Borne AE(1982). Serological studies in patients on platelet-and-granulocyte-substitution therapy. *Br J Haematol*. 52:59-68.
- Santos S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C(1989). Human platelet alloantigens Br^a/Br^b are expressed on the very late activation antigen 2(VLA-2) of T lymphocytes. *Hum. Immunol*. 25:237-246.
- Santos S, Zutter MM(1995). The $\alpha 2\beta 2$ Integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost*. 74:813-821.
- Santos S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman DJ(1993). The human platelet allontigens Br^a and Br^b are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin α subunit). *J*

Clin Invent. 92:2427-2432.

Schneider W, Schnaidt M(1981). The platelet adhesion immunofluorescence test: a modification of the platelet suspension immunofluorescence test. *Blut* 43:389-392.

Shih MC, Liu TC, Lin IL, Lin SF, Chen CM, and Chang JG(2003). Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-13, Oe and Gov platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, Filipino and Thai populations. *International Journal of Molecular Medicine* 12:609-614.

Shibata Y, Jugi T, Nishizawa Y(1981). Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang* 41:25-31.

Simsek S, Gallardo D, Riber A. von dem Borne AE(1994). The human platelet a allonotigens, HPA-5(a+b-) and HPA-5(a-b+) are associated with a Glu 505/Iys505 polymorphism of glycoprotein Ia (the alpha 2 subunit of VLA-2). *Br J Haematol.* 86:671-674.

Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, Vlekke ABJ, Huiskes E, Goldschmeding R, von dem Borne AEGKR(1993). Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA(allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 81:835-840.

Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H, Shibata Y(1996). Gene frequencies of the human platelet antigen on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion* 36:813-817.

- Takada Y, Hemler E(1989). The primary structure of the VLA-2/collagen receptor $\alpha 2$ subunit (platelet GpIa): homology to other integrins and the presence of possible collagen-binding domain. *J cell Biol.* 109:397-407.
- Unkelbach K, Kalb T, Santoso S, Kroll H, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V(1995). Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw(PIA), Ko, Bak and Br(HPA-1, 2, 3, 5). *Br J Haematol* 89:169-176.
- van Loghen JJ, Dorfmeijer H, van der Hart M(1959). Serological and genetical studies on a platelet antigen(ZW). *Vox Sang* 4:161-169.
- von dem Bone AEGKR, Decary F(1990). ICSH/ISBT working party on platelet serology: nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox Sang* 57:176-182.
- van der Weerd CM, Veenhoven-von Reisz LE, Nijenhuis LE, van Loghen JJ(1963). The Zw Blood group system in platelets. *Vox Sang* 8:513-530.
- Warkentin TE, Smith JW, Hayward CP, Ali AM, Kelton JG(1992). Thrombocytopenia caused by passive transfusion of anti-glycoprotein. I a/II a alloantibody(anti-HPA-5b). *Blood* 79:2480-2484.
- Williamson LM, Bruce D, Lubenko A, Chana HJ, Ouwehand WH(1992). Molecular biology for platelet alloantigen typing. *Transfus Med.* 2:255-264.
- Yoshikane Y, Takahashi Y, Seki M, Manase K, Jouo K(2004). Neonatal alloimmune thrombopenic purpura associated with HPA-5. *Pediatric Int.* 46:363-365.

Zotz RB, Winkelmann BR, Namk M, Giers G, Maruhn Debowski B, Marz W(1998). Polymorphism of platelet glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PLA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 79:731-735

영문 요약

Analysis of G/A Polymorphism of Glycoptotein Ia(HPA-5, Br) in Multiple Platelet-transfused Patients Using PCR-ASRA

Lee, Chae Jin

Dept. of Biomedical Life Science

The Graduate School of Health and Environment

Yonsei University

Platelet transfusion, which is the only means of curing reduction of platelet, induce transformed alloantibodies due to the mechanism of immunity. Human platelet antigens (HPAs), known to stimulate the immune system, have varied amino acid sequences in individuals or ethnic groups, and induce various immune responses by allelic polymorphisms in the respective gene.

Recently, alloimmunization to human leukocyte antigens (HLAs) has been decreased by application of single donor platelets(SDP) or leuko-depleted platelets to patients who are not expected to yield any practical results from platelet transfusion. Platelet refractoriness among the patients treated platelet transfusion is often seen in the hospital. However, until now there are little reports about correlation of platelet specific antigens and alloantigens.

To identify correlation of genetic polymorphisms of HPA-5a/b(Br^{b/a}) and thrombocytopenia, I examined a point mutation of Gp Ia gene using PCR-ARSA technique and detected anti-platelet antibodies among the patients (20 persons) associated with symptoms of thrombocytopenia through laboratory

analysis. The genotype of HPA-5(Br) in a patient group of 20 (13 persons with platelet refractoriness after two times or more platelet transfusion and 7 persons with severe thrombocytopenia regardless of present diseases) was all a+b⁻ type. In addition, analysis of the genotype of HPA-5(Br) in a normal group of 35 exhibited that 32 persons were the a+b⁻ type (91.4%) and 3 persons were the a+b⁺ type (8.6%). Analysis of anti-platelet antibody exhibited 3 positives and 10 negatives among 13 patients who had platelet refractoriness after transfusion two times or more. The genotype of HPA-5(Br) in the positive and negative patients shows all the a+b⁻ type.

In this research, I have investigated antibody formation in patients requiring repeated platelet transfusions. Although the genotype of HPA-5 a/a is more frequent in the Korean population, possibility of anti-HPA-5b antibody induction caused by HPA-5a+b⁺ can not be completely excluded. I did not observe any differences in the G/A polymorphism of Gp I a (HPA-5) among the patients and neither in other genetic polymorphisms of Gp I a among the normal or patient group. The results in this study suggested that there were no significant correlations between the incidence of thrombocytopenia disorder and the G/A polymorphism pattern in Gp1a(HPA-5).

Key Words : Platelets transfusion. Alloimmunization, Human platelet antigen.
Genetic polymorphism. Allele-specific restriction enzyme analysis.