

盐城地区汉族人血小板抗原 HPA-1~17, Caba 基因多态性分析*

蒋钰瑶, 黄宏亮[△](江苏省盐城市中心血站 224005)

【摘要】 目的 研究盐城地区汉族人群血小板特异性抗原人类血小板同种抗原 1~17(HPA1~17), Caba 的基因分布, 建立本地区固定机采血小板供者 HPA 数据库。方法 应用序列特异性引物聚合酶链式反应(PCR-SSP)技术, 对盐城市中心血站 200 名汉族固定血小板献血者的血液进行 HPA1~17, Caba 基因分型。用 χ^2 检验统计分析各 HPA 血型系统基因分布的期望值与观察值, 验证其是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 并与国内外人群相比较。结果 盐城地区 200 名汉族血小板献血者的 HPA-1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a, 15a 的基因频率分别为 0.995 0、0.937 5、0.572 5、0.992 5、0.985 0、0.987 5、0.542 5, 呈多态性分布, HPA7~14、16~17 及 Caba 呈单线性分布; 不配合率大于 10% 的 HPA 系统有 HPA-2~3、15。结论 本研究已确认盐城地区 200 名固定血小板供者 HPA 基因分布特征, 与国内其他地区、其他国家相比有本地区人群特点; 在此基础上建立本地区已知 HPA 基因型固定机采血小板供者数据库, 为临床血小板 HPA 血型配合性输注提供可能。

【关键词】 人类血小板同种抗原; 基因频率; 基因分型

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.23.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)23-3266-03

Analysis of human platelet antigen 1-17 and Caba gene polymorphism in Yancheng Hans population* JIANG Yu-yao, HUANG Hong-liang[△](Yancheng Blood Center, Yancheng, Jiangsu 220005, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the distribution of human platelet antigen (HPA) 1-17 and Caba gene in Yancheng Han population, and to build a fixed HPA database of apheresis platelet donor in the local area. **Methods** A total of 200 blood samples, collected from platelet donors of Han population in Yancheng, were genotyped by polymerase chain reaction with sequence specific primers(PCR-SSP). The χ^2 test was used to compare the expected value and observed value of genotype distribution in HPA blood group system. The genotype distribution whether matching Hardy-Weinberg genetic equilibrium was verified, and data were compared with those in other areas. **Results** The gene frequencies of HPA-1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a and 15a were 0.995 0, 0.937 5, 0.572 5, 0.992 5, 0.985 0, 0.987 5, 0.542 5 respectively in 200 platelet donors of Han population in Yancheng, and presented polymorphism distribution. HPA 7-14, 16-17 and Caba presented a single linear distribution. The incidence of platelet transfusion refractoriness in HPA 2-3, 15 was higher than 10%. **Conclusion** This study could verify the characteristics of the distribution of HPA gene in Han population of Yancheng. To establish the local HPA genotype database of platelet donors in Yancheng could provide probability for HPA-matched platelets infusion.

【Key words】 human platelet alloantigens; gene frequency; genomic typing

临床输注人类血小板同种抗原(HPA)不匹配的血小板制品, 可引起同种免疫, 导致输血后紫癜(PTP)、免疫性血小板减少(TAT)、血小板输注无效(PTR)等不良反应。HPA 基因多态性研究不仅为人类遗传学等研究提供了依据, 也是血小板血型库建设的重要手段, 有利于临床为患者提供 HPA 配合性血小板制品, 避免血小板特异性免疫发生的可能^[1-2]。目前全国已有许多地区开展了建立 HPA 分型单采血小板数据库相关工作。江苏省内只有文献^[1, 3]报道的徐州、南京等少数地区做过相关工作, 省内建立 HPA 分型单采血小板供者数据库资料明显不足。本研究采用序列特异性引物聚合酶链式反应(PCR-SSP)技术, 对盐城地区 200 名汉族固定无偿献血者的 HPA1~17, Caba 进行基因分型^[3], 通过统计分析相关数据, 建立本地区已知 HPA 基因型固定机采血小板供者数据库, 为临床血小板 HPA 血型配合性输注提供可靠依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集盐城地区 200 名汉族固定无偿献血

者者乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血 5 mL。

1.2 仪器与试剂 基因组 DNA 提取试剂盒(购自 Invitrogen 公司); HPA1~17, Caba 基因分型试剂盒(购自天津秀鹏); Taq 酶(购自 TaKaRa 公司); 7500PCR 扩增仪(购自 ABI 公司); Gel DocXR 凝胶成像系统和 PowerPac Basic 电泳仪(均购自 Bio-Rad 公司); 5417R 台式温控离心机和 Bio photometer 核酸蛋白测定仪(均购自 Eppendorf 公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 200 份血小板抗凝血样均采用 Genomic DNA Mini Kit 提取 DNA, 采用核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度和纯度, -20 °C 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增 根据 HPA 基因分型试剂盒的要求, 进行 PCR-SSP。PCR 循环参数为: 96 °C 预变性 3 min; 96 °C 25 s, 68 °C 45 s, 72 °C 30 s, 5 个循环; 96 °C 25 s, 61 °C 45 s, 72 °C 30 s, 22 个循环; 96 °C 25 s, 55 °C 45 s, 72 °C 60 s, 8 个循环; 72 °C 3 min。

* 基金项目: 江苏省盐城市医学科技发展计划项目(YK2013046)。

作者简介: 蒋钰瑶, 女, 硕士, 实习研究员, 主要从事血液检验及输血研究。 △ 通讯作者, E-mail: catboy80@126.com。

1.3.3 电泳 取 10 μ L 的 PCR 扩增产物,于 2.5% 琼脂糖凝胶,150 V 15 min 电泳,用凝胶成像系统拍照分析。

1.4 统计学处理 计算公式如下^[4],等位基因频率: $f(a) = [2 \times \text{纯合子数} + \text{杂合子数}] / [2 \times \text{总例数}]$, $f(b) = 1 - f(a)$;基因型频率:基因型频率 = 观察值 / 总例数;期望值: $e(aa) = [f(a)]^2 \times \text{总例数}$, $e(ab) = 2f(a)f(b) \times \text{总例数}$, $e(bb) = [f(b)]^2 \times \text{总例数}$;不配合率 = $2ab(1-ab)$,a、b 分别为 a 和 b 等位基因频率; $\chi^2 = \sum(\text{观察值} - \text{期望值})^2 / \text{期望值}$;P 用 Excel 中公式 CHIDIST 计算得出。

2 结果

2.1 HPA 系统的等位基因频率 Hardy-Weinberg(H-W)平衡检验结果 对 HPA 系统的等位基因频率进行 H-W 平衡检验,差异无统计学意义($P > 0.05$),表明基因频率符合 H-W 遗传平衡。见表 1。

2.2 HPA1~17,Caba 基因型及等位基因频率统计 盐城地区汉族人群的 HPA1a、2a、3a、4a、5a、6a、15a 基因频率分别为

0.995 0、0.937 5、0.572 5、0.992 5、0.985 0、0.987 5、0.542 5;HPA1b、2b、3b、4b、5b、6b、15b 基因频率分别为 0.005 0、0.062 5、0.427 5、0.007 5、0.015 0、0.012 5、0.457 5,其中 HPA-1、2、4、5、6 系统未检测到 bb 纯合子个体。HPA-7、8、9、10、11、12、13、14、16、17 这几个系统均未见 b 基因,见表 1。Cab^{a/a} 的基因型频率为 1,Cab^{a+/a+} 的基因型频率为 0;Cab^a 的基因频率为 1,Cab^{a+} 的基因频率为 0。

2.3 HPA 对偶抗原不配合率计算 盐城地区血小板 HPA 对偶抗原不配合率高于 10% 的系统有 HPA-2、-3 和-15。见表 1。

2.4 盐城地区汉族人群 HPA 基因频率与其他地区、国家比较 盐城地区血小板献血者 HPA 基因频率与徐州、长春、中国台湾、日本地区人群相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);与广州地区人群 HPA-2 系统、泰国人群 HPA-4 系统、美国人群 HPA-1、2、5 系统及埃及人群 HPA-1、5 系统比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 盐城地区汉族人群 HPA1~17 基因的分型结果(n=200)

HPA 系统	aa			ab			bb			等位基因频率		H-W 平衡		不配合率
	观察值	期望值	基因型频率	观察值	期望值	基因型频率	观察值	期望值	基因型频率	a	b	χ^2	P	
HPA-1	198	198	0.990	2	2	0.010	0	0	0	0.995 0	0.005 0	0	1	0.009 9
HPA-2	175	175.8	0.875	25	23.4	0.125	0	0.8	0	0.937 5	0.062 5	0.913 0	0.339 3	0.110 3
HPA-3	66	65.5	0.330	97	97.9	0.485	37	36.6	0.185	0.572 5	0.427 5	0.016 5	0.897 8	0.369 7
HPA-4	197	197	0.985	3	3	0.015	0	0	0	0.992 5	0.007 5	0	1	0.014 8
HPA-5	194	194	0.970	6	6	0.030	0	0	0	0.985 0	0.015 0	0	1	0.029 1
HPA-6	195	195	0.975	5	5	0.025	0	0	0	0.987 5	0.012 5	0	1	0.024 4
HPA-7	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0
HPA-8	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0
HPA-9	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0
HPA-10	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0
HPA-11	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0
HPA-12	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0
HPA-13	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0
HPA-14	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0
HPA-15	60	58.9	0.300	97	99.3	0.485	43	41.8	0.215	0.542 5	0.457 5	0.108 3	0.742 0	0.373 2
HPA-16	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0
HPA-17	200	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0

注:P>0.05,表明差异无统计学意义,符合 H-W 平衡,证明结果是可信的;NA:不适用。

表 2 盐城地区汉族人群 HPA 基因频率与国内其他地区、国家比较

HPA	盐城 (n=200)	徐州 ^[1] (n=100)	长春 ^[5] (n=172)	广州 ^[6] (n=500)	中国台湾 ^[2] (n=300)	日本 ^[7] (n=331)	泰国 ^[7] (n=500)	美国 ^[7] (n=100)	埃及 ^[7] (n=134)
1a	0.995 0	0.995	0.994	0.998	0.996 7	0.988	0.985	0.92 ^a	0.840 ^a
1b	0.005 0	0.005	0.006	0.002	0.003 3	0.002	0.015	0.08	0.160
2a	0.937 5	0.935	0.913	0.998 ^a	0.960 0	0.898	0.952	0.82 ^a	0.925
2b	0.062 5	0.065	0.087	0.002	0.040 0	0.102	0.048	0.18	0.075
3a	0.572 5	0.590	0.596	0.563	0.575 0	0.594	0.56	0.63	0.627
3b	0.427 5	0.410	0.404	0.437	0.425 0	0.406	0.44	0.37	0.373

续表 2 盐城地区汉族人群 HPA 基因频率与其他地区、国家比较

HPA	盐城 (n=200)	徐州 ^[1] (n=100)	长春 ^[5] (n=172)	广州 ^[6] (n=500)	中国台湾 ^[2] (n=300)	日本 ^[7] (n=331)	泰国 ^[7] (n=500)	美国 ^[7] (n=100)	埃及 ^[7] (n=134)
4a	0.992 5	0.995	0.994	0.999	0.998 3	0.990	1.000 ^a	1.00	1.000
4b	0.007 5	0.005	0.006	0.001	0.001 7	0.010	0.000	0.00	0.000
5a	0.985 0	0.980	0.985	0.988	0.985 0	0.960	0.968	0.79 ^a	0.914 ^a
5b	0.015 0	0.020	0.015	0.012	0.015 0	0.040	0.032	0.21	0.086
6a	0.987 5	0.975	0.988	0.986	—	—	0.986	—	1.000
6b	0.012 5	0.025	0.012	0.014	—	—	0.014	—	0.000
15a	0.542 5	0.575	0.535	0.551	—	—	0.505	—	0.160 ^a
15b	0.457 5	0.425	0.465	0.449	—	—	0.495	—	0.840

注:HPA7-14、HPA16-17、Caba 系统未作比较;—表示无数据;与盐城地区比较,^a P<0.05。

3 讨 论

随着血小板输注的不断应用和推广,血小板同种免疫引起的临床血小板输注无效的情况时有发生,已成为血小板输血的棘手问题。研究发现,HPA 同种免疫是仅次于人类白细胞抗原(HLA)同种免疫的重要因素^[8]。HPA 分布于血小板糖蛋白上,其基因为双等位共显性基因。输血、妊娠、服用特定药物及自身免疫性疾病等均可导致机体发生血小板免疫反应,产生血小板抗体破坏血小板,导致输血后紫癜、新生儿血小板减少及血小板输注无效等不良反应。

本研究得出的 HPA-1~17、Caba 各基因型的分布及基因频率,可初步描绘出盐城地区固定血小板捐献人群 HPA 基因的分布情况,经 χ^2 检验验证各基因频率均符合 H-W 平衡(P>0.05)。研究发现,盐城地区汉族人群 HPA-1~17 中,除 HPA-1~6、15 系统检出基因 b 以外,其他 HPA 系统均为 aa 纯合子。Caba 的基因型及基因频率与文献^[3,8-9]的报道相同。盐城地区汉族人群 HPA 对偶抗原不配合概率大于 10% 的系统有 HPA-2、3、15,其中 HPA3、15 的不配合率均大于 30%,这与文献^[1,5,9-10]所报道的国内其他地区一致。临床研究表明,血小板制品 HPA 对偶抗原的不配合比例越高,临床输血产生抗体的概率越大。李志强等^[12]对上海地区汉族人 HPA-1~16 基因进行鉴定,并结合国内文献综合分析指出,随机输注血液制剂,发生 HPA 不相合的情况以 HPA-15 最为多见。在随机血小板输注中,不配合率的高低,反映了血小板抗原在输血治疗时刺激受血者免疫系统产生血小板同种免疫的概率大小,这说明 HPA-2、3、15 是临床导致血小板同种免疫最重要的系统,在临床血小板 HPA 配合性输注时需首要考虑这几个系统^[13]。盐城地区与徐州、长春、中国台湾、日本地区同类资料相比差异无统计学意义(P>0.05),而与广州、泰国、美国、埃及人群相比部分基因频率差异有统计学意义(P<0.05),说明 HPA 基因存在着种族、地域性差异,盐城地区 HPA 基因频率有着自身特点。

综上所述,HPA 基因多态性的研究,在人类遗传学研究和临床输血中都有着重要的意义。研究本地区固定血小板供者的 HPA 基因的多态性,并以此建立盐城地区已知 HPA 基因型固定机采血小板供者数据库,为临床血小板 HPA 配合性输注及同型输注提供可能。

参考文献

[1] 胡金萍,毕星秀,孟宪军. 徐州地区汉族人群血小板 HPA 基因多态性的研究[J]. 现代检验医学杂志,2012,27(4):

35-37.

[2] 张刚,曹丽群,谢毓滨,等. 长沙地区汉族人血小板抗原(HPA1-17)基因多态性调查[J]. 中国实验诊断学,2013,17(2):331-333.

[3] 薛敏,刘衍春,魏鹏. 中国南京地区汉族人群血小板 HPA-1-18 遗传多态性研究[J]. 中国实验血液学杂志,2012,20(5):1235-1239.

[4] Bertrand G, Jallu V, Saillant D, et al. The new platelet alloantigen Cab a; a single point mutation Gln 716 His on the alpha 2 integrin[J]. Transfusion, 2009, 49(10):2076-2083.

[5] 于江虹,杨帆. 长春地区无偿献血者 HPA1-6,15 基因分型及频率调查[J]. 中国输血杂志,2010,15(S1):143.

[6] 陈扬凯,叶欣,夏文杰,等. 血小板特异性基因(HPA-1~17)在广州地区人群中分布的多态性研究[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(8):699-702.

[7] 刘丙现,高广平,王丹,等. 中国牡丹江地区献血人群 HPA 基因分布特征的研究及数据库的建立[J]. 中国实验血液学杂志,2012,20(3):757-761.

[8] 戴宇东. 中国汉族人群 HPA 分型单采血小板供者库的建立模式与库容[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(4):1046-1050.

[9] 刘衍春,马玲,吴敏慧. 血小板新等位基因 Cab~(a+)在汉族人群中的调查[J]. 中国输血杂志,2010,23(12):1040-1041.

[10] 刘建军,李志强. 上海地区汉族人群人类血小板抗原基因的多态性研究[J]. 临床输血与检验,2008,10(3):209-214.

[11] 周豪杰,杨承东,聂咏梅. 广州汉族配偶人类血小板抗原基因分型的调查[J]. 热带医学杂志,2012,12(6):757-760.

[12] 李志强,乐嘉宜,刘建军,等. 人类血小板抗原 1-16 基因与血小板输注无效风险研究[J]. 中国输血杂志,2009,22(5):346-349.

[13] Hadhri S, Gandouz R, Chatti N, et al. Gene frequencies of the HPA-1 to -6 and -15 human platelet antigens in Tunisian blood donors[J]. Tissue Antigens, 2010, 76(3):236-239.