

安徽汉族人血小板特异性抗原 1-17 多态性分布调查

朱帮强¹ 徐元宏² 陈影² 周娟³

摘要 目的 研究安徽汉族人群人类血小板特异性抗原 (HPA)1-17 多态性分布特点,为临床进行血小板相容性输注提供实验依据。方法 随机选取 150 例健康安徽汉族献血者,分别采集 2 ml 全血提取 DNA 后采用序列特异性引物聚合酶链式反应 (SSP-PCR) 方法进行 HPA1-17 基因分型。结果 安徽汉族人 HPA-1 a、2 a、3 a、4 a、5 a、6 a、15 a 基因频率分别为 0.996 6、0.880 0、0.626 7、0.996 6、0.970 0、0.953 3、0.483 3; HPA-1 b、2 b、3 b、4 b、5 b、6 b、15 b 基因频率分别为 0.003 4、0.120 0、0.373 3、0.003 4、0.030 0、0.046 7、0.516 7; HPA-7 a、8 a、9 a、10 a、11 a、12 a、13 a、14 a、16 a、17 a 基因频率为 1.000 0; HPA-7 b、8 b、9 b、10 b、11 b、12 b、13 b、14 b、16 b、17 b 未在本次调查中检出。结论 安徽汉族人群 HPA1-17 多态性分布显示出自身特点,HPA-2、HPA-3、HPA-15 具有较高的遗传多态性。

关键词 人类血小板特异性抗原;基因分型;多态性

中图分类号 R 457.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1120-04

人类血小板特异性抗原 (human platelet antigens, HPA) 位于血小板膜的糖蛋白分子上,HPA 不相容可引起血小板同种免疫反应,产生血小板同种抗体,导致同种免疫性血小板减少,诱发如血小板输注无效 (platelet transfusion refractoriness, PTR)、输血后血小板减少性紫癜 (post transfusion thrombocytopenic purpura, PTP) 及新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜 (neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura, NAITP) 等疾病,在临床移植中还会引起移植排斥等^[1],因此鉴定 HPA 对临床医学及输血实践具有重要意义^[2]。研究安徽地区汉族人群 HPA1-17 多态性分布情况,可预测血小板特异性同种免疫发

生的可能性,为临床进行血小板相容性输注提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 从 2012 年 8 月~2013 年 1 月在安徽省血液中心献血的 5 834 例安徽汉族合格献血者中,用 Microsoft Excel 2003 软件中的随机函数 RAND() 对此 5 834 例献血者编码各加上一个随机数标签,然后按照此随机数进行排序,选取前 150 例献血者,其中男 78 例,女 72 例;年龄 18~56 岁,中位年龄 37 岁,分别采集静脉血液 2 ml 于 EDTA 抗凝管中备用。

1.2 实验器材 台式高速离心机 (上海力申科学仪器有限公司,型号:Neofuge 13); 涡旋混匀器 (上海医科大学仪器厂,型号:XW-80A); 纯水仪 (上海摩勒科学仪器有限公司,型号:1010 a); 数字恒温水浴锅 (江苏金坛市江南仪器厂,型号:HH-W); 电子天平 (上海良平仪器仪表有限公司,型号:JY 2002); PCR 仪 (德国 BIOMETRA,型号:BIOMETRA 梯度 PCR 仪); 电泳仪 (北京市六一仪器厂,型号:DYY-10C); 电泳槽 (上海天能科技有限公司,型号:HE-90); 紫外凝胶成像系统 (美国伯乐,型号:BIO-RAD Gel Doc 2000); 紫外分光光度计 (上海光谱仪器有限公司,型号:sp-754)。

1.3 实验试剂 TIANamp Blood DNA Kit 血液基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化北京科技有限公司,批号:L 0628); Taq 酶 (普洛麦格生物技术有限公司,批号:20020105); 琼脂糖、溴化乙锭溶液 (批号:130121002)、TBE powder (批号:130227001)、HPA1-17 基因分型试剂盒 (批号:1207 A) (天津市秀鹏生物技术开发有限公司); DNA Marker-B: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp (上海生工,批号:081012); 无水乙醇 (安徽安特食品股份有限公司,批号:1205073601); 液体石蜡 (天津市赢达稀贵化学试剂厂,批号:20120904) 等。

1.4 全血 DNA 提取 采用 DNA 提取试剂盒按照操作说明提取所采集的血液标本 DNA。提取的

2014-04-18 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81171606)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 输血科、² 检验科,合肥 230022

³安徽医科大学公共卫生学院,合肥 230032

作者简介:朱帮强,男,硕士研究生,主管技师;

徐元宏,男,教授,主任技师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xyhong1964@163.com

DNA 用紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度, DNA 产物浓度为 25 ~ 30 ng/ μ l, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0 之间符合实验要求。

1.5 PCR 扩增 采用序列特异性引物聚合酶链式反应(sequence specific primer polymerase chain reaction, SSP-PCR)方法扩增。根据 GenBank 序列信息和公开序列数据^[3-4]设计引物(天津市秀鹏生物技术开发有限公司,批号:1207 A),将 34 对 HPA1-17 正反向特异性干燥引物和人类生长激素保守片段引物按顺序预先包被在 96 孔 PCR 反应板的 34 孔内,然后向反应板中的每孔加入如下物质:35 ~ 42 ng DNA 样本,0.5 U Taq 酶,8 μ l PCR 混合缓冲液,最后向每孔加入石蜡油。PCR 循环程序设定为:① 96 $^{\circ}$ C 变性 3 min;② 96 $^{\circ}$ C 变性 25 s,68 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,5 个循环;③ 96 $^{\circ}$ C 变性 25 s,61 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,22 个循环;④ 96 $^{\circ}$ C 变性 20 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,8 个循环;⑤ 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,⑥ 降温至 25 $^{\circ}$ C,完成 PCR 扩增。

1.6 电泳及凝胶成像 将 6 μ l PCR 产物按序转移于 2.5% 琼脂糖凝胶孔中,于 148 V 下电泳 20 min 后将凝胶置于凝胶成像系统中成像并保存实验结果。

1.7 统计学处理 按群体遗传基因计数法计算基因频率,用 SPSS 17.0 进行统计分析,计算 χ^2 值后比较基因型期望值与观察值,验证是否符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则。按照血小板随机输注错配概率(mismatch probability in random transfusion, MP)公式 $MP = a^2(1 - a^2) + b^2(1 - b^2) = 2ab(1 - ab)$ 计算得出血小板随机输注错配概率^[4](a, b 为对偶抗原等位基因频率)。

2 结果

2.1 HPA1-17 等位基因分型结果凝胶成像图

(以 1 号样本为例)图 1~3 所示 HPA1-17 分型结果为:HPA-1a(+),HPA-1b(-),HPA-2a(+),HPA-2b(+),HPA-3a(+),HPA-3b(+),HPA-4a(+),HPA-4b(-),HPA-5a(+),HPA-5b(-),HPA-6a(+),HPA-6b(+),HPA-15b(+),HPA-15a(-),HPA-7a(+),HPA-7b(-),HPA-8a(+),HPA-8b(-),HPA-9a(+),HPA-9b(-),HPA-10a(+),HPA-10b(-),HPA-11a(+),HPA-11b(-),HPA-12a(+),HPA-12b(-),HPA-13a(+),HPA-

13b(-),HPA-14a(+),HPA-14b(-),HPA-16a(+),HPA-16b(-),HPA-17a(+),HPA-17b(-)。HPA-1a,1b 特异性条带为 196 bp,HPA-2a,2b 特异性条带为 241 bp,HPA-3a,3b 特异性条带为 267 bp,HPA-4a,4b 特异性条带为 252 bp,HPA-5a,5b 特异性条带为 249 bp,HPA-6a,6b 特异性条带为 169 bp,HPA-15b,15a 特异性条带为 278 bp,HPA-7a,7b 特异性条带为 160、162 bp,HPA-8a,8b 特异性条带为 190、188 bp,HPA-9a,9b 特异性条带为 212 bp,HPA-10a,10b 特异性条带为 216 bp,HPA-11a,11b 特异性条带为 184 bp,HPA-12a,12b 特异性条带为 194 bp,HPA-13a,13b 特异性条带为 156、154 bp,HPA-14a,14b 特异性条带为 200、197 bp,HPA-16a,16b 特异性条带为 165、164 bp,HPA-17a,17b 特异性条带为 210、212 bp。



图 1 1 号样本 HPA-1、2、3、4、5、6、15、7 分型结果

M:Marker; 1~16: HPA-1a、1b、2a、2b、3a、3b、4a、4b、5a、5b、6a、6b、15b、15a、7a、7b 基因分型结果



图 2 1 号样本 HPA-8、9、10、11、12、13、14、16 分型结果

M:Marker; 1~16: HPA-8a、8b、9a、9b、10a、10b、11a、11b、12a、12b、13a、13b、14a、14b、16a、16b 基因型结果

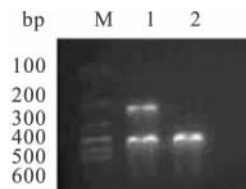


图 3 1 号样本 HPA-17 分型结果

M:Marker; 1~2:HPA-17a、17b 基因分型结果

2.2 HPA 基因型及等位基因频率分布 根据计算和统计分析,150 例安徽汉族人群 HPA1-17 基因型、等位基因频率及血小板 MP 见表 1。检测出多态性的 HPA-1、2、3、4、5、6、15 经 χ^2 检验 P 值均大于 0.05 符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡法则。

表1 安徽汉族人 HPA1-17 基因型及等位基因频率分布表

抗原	基因型人数及频率						基因频率		χ^2 值	P 值	MP 值
	aa	ab	bb	aa (%)	ab (%)	bb (%)	a	b			
HPA-1	149	1	0	99.33	0.67	0	0.996 6	0.003 4	0.002	>0.05	0.01
HPA-2	114	36	0	76.00	24.00	0	0.880 0	0.120 0	2.789	>0.05	0.19
HPA-3	58	72	20	38.67	48.00	13.33	0.626 7	0.373 3	0.100	>0.05	0.36
HPA-4	149	1	0	99.33	0.67	0	0.996 6	0.003 4	0.002	>0.05	0.01
HPA-5	141	9	0	94.00	6.00	0	0.970 0	0.030 0	0.143	>0.05	0.06
HPA-6	137	12	1	91.33	8.00	0.67	0.953 3	0.046 7	1.527	>0.05	0.09
HPA-7	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0
HPA-8	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0
HPA-9	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0
HPA-10	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0
HPA-11	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0
HPA-12	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0
HPA-13	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0
HPA-14	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0
HPA-15	35	75	40	23.33	50.00	26.67	0.483 3	0.516 7	0.000 1	>0.05	0.37
HPA-16	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0
HPA-17	150	0	0	100.00	0	0	1.000 0	0	NA		0

NA:无法评估

3 讨论

血小板表面具有复杂的血型抗原,除与其他细胞、组织共有抗原如红细胞血型系统和人类白细胞抗原-I (human leucocyte antigen-I, HLA-I) 类抗原等外,还存在 HPA^[1]。截至目前经血清学鉴定的 24 个 HPA 抗原中有 23 个 HPA 抗原的基因多态性的遗传基础已经阐明^[5],HPA 基因位于第 5、6、17 和 22 号染色体上,为双等位共显性遗传,除 HPA-14bw 是由核苷酸 1909~1911 位上的碱基序列 AAG 3 个碱基缺失外,其余 HPA 系统均是由于血小板膜糖蛋白结构基因中的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)引起^[6]。HPA 抗原都存在于血小板糖蛋白上^[7],其抗原分布在血小板糖蛋白 GP I a(HPA-5,13)、GP I b α (HPA-2)、GP I b β (HPA-12)、GP II b(HPA-3,9)、GP III a(HPA-1,4,6,7,8,10,11,14,16,17)和 CD109(HPA-15)上^[8],每种 HPA 抗原由于碱基改变引起氨基酸的置换导致表达的血小板膜糖蛋白质结构改变,产生了不同的肽,从而导致同种免疫应答^[7],引起同种免疫性血小板减少。国际输血协会和国际血栓和止血协会在 2003 年建立的国际血小板命名委员会对人类血小板特异性抗原设定的命名原则为 HPA 加数字表示,a 表示基因频率大于 50% 的等位基因,b 表示基因频率小于 50% 的另一相应等位基因^[6]。

由血小板特有抗原决定簇组成的 HPA 表现出血小板独特的遗传多态性,其多态性分布研究对临床及输血实践具有重要意义^[2]。HPA 不相容的血小板输注易诱发血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness, PTR)等疾病,根据 HPA 多态性分布情况可以预测本地区血小板特异性同种免疫发生的可能性,确定在临床上进行血小板输注时具有重要性的 HPA,进行 HPA 相容性的血小板输注,可以提高临床输血的安全性和有效性。传统 HPA 血清学分型方法由于受到难以获得高质量和高特异性抗血清等因素制约,限制了 HPA 分型工作的开展,而基于 HPA 基因分子生物学特点设计的 SSP-PCR 技术可以对 HPA 进行准确的基因分型^[8]。本研究通过 SSP-PCR 技术对 150 例安徽汉族人 HPA1-17 进行了基因分型,结果显示安徽汉族人 HPA1-17 多态性分布具有如下特点:① HPA2a/2b、HPA3a/3b、HPA15a/15b 具有较高的遗传多态性;② HPA-1b、HPA-4b、HPA-5b、HPA-6b 基因频率较低;③ HPA-7b、HPA-8b、HPA-9b、HPA-10b、HPA-11b、HPA-12b、HPA-13b、HPA-14b、HPA-16b、HPA-17b 未在本次调查中检出。分析本研究结果可以发现安徽地区汉族人 HPA 系统引起的血小板 MP 从高到低前 3 位依次由 HPA-15、HPA-3、HPA-2 系统引起,提示在临床输血实践中进行 HPA-2、3、15 基因分型对预防由 HPA 引起 PTR 具有重要意义。

HPA 作为人类遗传多态性标记,HPA 基因分型研究可为群体遗传学和人类学研究提供重要数据,应用于人类进化与迁徙的研究,同时还应用于某些疾病的相关性研究^[9-11]。安徽汉族人 HPA1-17 多态性分布研究不仅为进一步进行相关研究提供了重要资料,利用本研究掌握的部分 HPA 型别已知的献血者信息亦为临床上由 HPA 不合引起的疾病患者需要输注血小板时寻找 HPA 相容的供者提供了便利。

参考文献

- [1] 李 勇,马学严.实用血液免疫学血型理论和实验技术[M].北京:科学出版社,2006:283-311.
- [2] Thomas J,Kunicki D,Diane J,et al. Human platelet Antigens[M]//Hillyer,Silberstein,Ness,et al. Blood Banking and Transfusion Medicine. 2nd. Philadelphia: Churchill Livingstone,2006:112-24.
- [3] Lyou J Y,Chen Y J,Hu H Y,et al. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to-13w [J]. Transfusion 2002,42(8):1089-95.
- [4] Feng M L,Liu D Z,Shen W,et al. Establishment of an HPA-1 to-16-typed platelet donor registry in China [J]. Transfusion Med, 2006,16(5):369-74.
- [5] Stafford P, Garner S F, Rankin A, et al. A single-nucleotide polymorphism in the human ITGB3 gene is associated with the platelet-specific alloantigen Va (HPA-17bw) involved in fetal maternal alloimmune thrombocytopenia [J]. Transfusion, 2008, 48(7):1432-8.
- [6] Metcalfe P, Watkins N A, Ouwehand W H, et al. Nomenclature of human platelet antigens [J]. Vox Sang 2003, 85(3): 240-5.
- [7] Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection [J]. Vox Sang 2004, 87 Suppl 1:82-6.
- [8] 赵桐茂. 人类血小板抗原研究概况 [J]. 中国输血杂志, 2004, 17(2):129-32.
- [9] Reiner A P, Kumar P N, Schwartz S M, et al. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women [J]. Stroke 2000, 31(7):1628-33.
- [10] Wiwanitkit V. PIA1/A2 polymorphism of the platelet glycoprotein receptor IIb/IIIa and its correlation with myocardial infarction: an appraisal [J]. Clin Appl Thromb Hemost 2006, 12(1):93-5.
- [11] 梁晓浏,王保龙,上官志敏,等. 特发性血小板减少性紫癜与 HPA 等位基因相关性研究 [J]. 中国输血杂志, 2009, 22(3): 207-10.

Genetic polymorphism of human platelet antigens 1-17 in Anhui Han population

Zhu Bangqiang¹, Xu Yuanhong², Chen Ying², et al

(¹Dept of Blood Transfusion, ²Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the genetic polymorphism of HPA-1 to-17 antigens in Anhui Han population, so as to provide experimental basis to screen compatible platelets for clinical. **Methods** A total of 150 samples from Anhui Han blood donors were randomly selected and collected 2 ml whole blood respectively, DNA was extracted from whole blood and then genotyped HPA1-17 by sequence specific primer polymerase chain reaction (SSP-PCR). **Results** The gene frequencies of HPA-1 a 2 a 3 a 4 a 5 a 6 a, 15 a were 0.996 6, 0.880 0, 0.626 7, 0.996 6, 0.970 0, 0.953 3 and 0.483 3 respectively in Anhui Han population. HPA-1 b 2 b 3 b 4 b 5 b 6 b, 15 b were 0.003 4, 0.120 0, 0.373 3, 0.003 4, 0.030 0, 0.046 7, 0.516 7. The gene frequencies of HPA-7 a 8 a 9 a, 10 a, 11 a, 12 a, 13 a, 14 a, 16 a, 17 a were 1.000 0. HPA-7 b 8 b 9 b, 10 b, 11 b, 12 b, 13 b, 14 b, 16 b, 17 b alleles were not detected. **Conclusion** HPA1-17 in Anhui Han population shows its own characteristics, HPA-2, HPA-3, HPA-15 are highly polymorphic.

Key words human platelet antigens; genomic typing; polymorphic