

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.22.009

## 人类血小板抗原基因在广西地区主要民族中的多态性差异\*

梁秀云,杨 兰,曾江辉

(南宁市第二人民医院检验科,南宁 530031)

**摘要:**目的 研究广西地区壮族、瑶族、苗族、侗族和汉族健康人群中人类血小板抗原 HPA-1~17bw 系统基因多态性的差异。方法 选取祖上 3 代均为同民族的壮族、瑶族、苗族、侗族和同地区汉族的健康个体各 100 例,采用聚合酶链式反应-序列特异性引物(PCR-SSP)方法检测上述各民族个体的 HPA-1~17bw 系统基因,计算 HPA 各系统的不配合率和基因多态性,并比较 5 个民族间 HPA 系统的基因频率。结果 基因型 a 是 5 个民族 HPA-1~17 的主要型别,而 5 个民族的 HPA-3 和 HPA-15 的不配合率均大于 30%,HPA-2 在苗族中的不配合率大于 10%。比较 5 个民族血小板系统的基因频率,发现 HPA-2 苗族的杂合程度较其他 4 个民族高,但只与壮族的比较差异有统计学意义( $\chi^2=8.580, P=0.009$ );壮族 HPA-3 的杂合程度高于瑶族和汉族,差异有统计学意义( $\chi^2=12.242, P=0.002$ ;  $\chi^2=7.640, P=0.022$ );各民族间的 HPA-15 的杂合程度存在较大的差异( $P<0.05$ )。结论 广西地区壮族、瑶族、苗族、侗族和汉族 HPA 基因多态性分布存在明显的种族差异,HPA-3 和 HPA-15 系统杂合度最高,而 HPA-2 在苗族中可能具有较大意义,在临床血小板输注中应加以重视。

关键词:抗原;人血小板;广西;民族

中图分类号:R394

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)22-2855-04

## The difference analyses of polymorphism of human platelet antigen gene system in the main ethnics of Guangxi province\*

Liang Xiuyun, Yang Lan, Zeng Jianghui

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Nanning City, Nanning 530031, China)

**Abstract:** Objective To explore the difference of expression of human platelet antigen gene system in the main ethnics of Guangxi province. Methods The genotypes of HPA-1-17bw system were performed by polymerase chain reaction using sequence-specific primer(PCR-SSP) for each 100 healthy individuals whose ancestors in three generations were the same nationality of Zhuang, Yao, Miao, Dong and Han ethnic, then calculated the mismatch rates and polymorphism of each HPA system, and compare the gene frequency of HPA systems between the five ethnics. Results Genotype a was the main type of HPA-1-17 in five ethnics. The mismatch rates of HPA-3 and HPA-5 in five ethnics were greater than 30%, while the mismatch rate of HPA-2 in Miao ethnic was greater than 10%. In the comparison of gene frequencies of HPA system between five ethnics, the heterozygous degree of HPA-2 was greater in Miao than in other ethnics, but significant differences were only found between Miao and Zhuang( $\chi^2=8.580, P=0.009$ ). The heterozygous degree of HPA-3 was significantly greater in Zhuang than in Yao or Han( $\chi^2=12.242, P=0.002$ ;  $\chi^2=7.640, P=0.022$ ). The heterozygous degree of HPA-15 in five ethnics was significant different( $P<0.05$ ). Conclusion The polymorphism of HPA gene is significant different between Zhuang, Yao, Miao, Dong and Han ethnics in Guangxi. The highest heterozygous are HPA-3 and HPA-15 system, while HPA-2 in Miao ethnic may have great significances, which should be paid attention in clinical platelet transfusion.

Key words: antigens; human platelet; Guangxi; nationality

人类血小板抗原(human platelet antigen, HPA)是存在于人类血小板上的抗原,是由血小板特有的抗原决定簇组成,也是血小板膜蛋白的重要组成部分,具有血小板独特的遗传多态性。近年来有研究发现 HPA 基因具有区域和民族多态性<sup>[1-2]</sup>。由于 HPA 的多态性可能导致血小板输注无效、输血后紫癜、免疫性血小板减少症等<sup>[3]</sup>,因此,在临床血小板输注中具有重要意义。广西是一个多民族地区,居住着 25 个少数民族,其中壮族、瑶族、苗族和侗族在少数民族人口中约占 98%。本研究通过检测和分析广西地区人口最大的几个少数民族和本地区汉族健康人群人类血小板抗原基因多态性及基因频率,以了解 5 个民族间 HPA 系统的表达差异,并为减少广西地区

民族间血小板输注并发症的发生提供实验依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 参照以下入选标准:(1)居住在广西壮族自洽区少数民族聚居地的,没有血缘关系的壮族(南宁、柳州)、瑶族(都安、巴马)、侗族(融水、三江)、苗族(隆林、南丹)健康个体各 100 例及这些地区的汉族健康个体 100 例;(2)所有入选者均无家族遗传疾病史和其他急慢性疾病史;(3)选择第 3 代个体为研究对象,且入选者祖上 3 代均为同民族的,并追踪其历史,确保研究对象在可追踪的历史期间无外族通婚。性别分别为:壮族男 59 例,女 41 例;瑶族男 62 例,女 38 例;苗族男 57 例,女 43 例;侗族男 51 例,女 49 例;汉族男 60 例,女 40 例。平均

\* 基金项目:广西壮族自治区南宁市科技攻关项目(201106032C)。 基金方向研究。

作者简介:梁秀云(1963—),本科,副主任技师,主要从事临床检验免

年龄分别为:壮族(48.3±5.7)岁;瑶族(46.9±4.6)岁;苗族(50.3±4.7)岁;侗族(48.3±5.1)岁;汉族(49.4±5.3)岁。5 组研究对象在年龄、性别方面比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。所有研究对象均签署知情同意书,并通过询问确保样本间无血缘关系。

**1.2 仪器和试剂** 人类基因组 DNA 抽取采用深圳益生堂生物有限公司提供的试剂盒;人类血小板抗原 HPA1~17 基因分型采用的 PCR 扩增仪(型号:9700)由美国 ABI 公司提供,试剂盒(批号:20130330)由中国江阴力通生命科技公司提供;低温高速离心机由美国 Beckman 公司提供;电泳仪及凝胶成像仪由珠海黑马生物公司提供。

**1.3 全基因组 DNA 制备** 抽取受试者外周静脉血 3 mL 于抗凝管(抗凝剂为 250  $\mu$ L 乙二胺四乙酸)。采用离心柱法,严格按照说明书操作抽取人 DNA。将抽取的人 DNA 溶于 50  $\mu$ L 的 TE 缓冲液中备用。

**1.4 聚合酶链式反应-序列特异性引物(PCR-SSP)**

**1.4.1 体系** 包括 6  $\mu$ L PCR 混合反应液、1.5  $\mu$ L DNA 模板、7.5  $\mu$ L 无菌水和 0.06  $\mu$ L Taq 酶。

**1.4.2 扩增条件** 95  $^{\circ}$ C 10 min 预变性;95  $^{\circ}$ C 25 s,65  $^{\circ}$ C 50 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,5 个循环;95  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4  $^{\circ}$ C 保存。

**1.4.3 扩增产物电泳** 取 7  $\mu$ L 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶上点样,100 V 电压下电泳 30 min,利用自动凝胶图像分析仪

观察电泳结果。

**1.4.4 电泳结果判读** 内对照引物为人类生长激素基因特异性引物,HPA-12a 和 HPA-12b 的内参照为 796 bp,其余长度为 429 bp。当每孔出现内参照时认为扩增成功,如果在相应碱基对位置有特异性条带出现则判定为阳性,若未出现则判断为阴性。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理,基因频率按群体遗传基因计数法计算,5 个民族间比较用  $\chi^2$  检验;计算各系统对偶抗原不配合率 MP,Hardy-Weinberg(H-W)平衡检验 HPA 系统的 17 对等位基因频率是否符合 H-W 遗传平衡。检验水准取  $\alpha=0.05$ 。

**2 结 果**

**2.1 广西地区 5 个民族各 100 例健康个体 HPA 基因分型结果** 广西地区壮族、瑶族、苗族、侗族和汉族健康个体 HPA1~17bw 基因分型结果见表 1,电泳图见图 1。Hardy-Weinberg 平衡检验研究对象中大部分 HPA 基因型的分布符合 H-W 群体遗传平衡法则,人群的选取具有代表性。5 个民族中除 HPA-1、2、3、5、6、15 基因系统有 b 基因型别外,其他 HPA 基因系统均为 a/a 纯合子。瑶族和汉族健康个体 HPA-1~17bw 基因多态性中,HPA-15 具有最高杂合度,其次是 HPA-3。壮族具有最高杂合度的是 HPA-3,其次是 HPA-15。偶抗原不配合率方面,5 个民族的 HPA-15、HPA-3 的不配合率均大于 30.0%,HPA-2 配合率较低,但苗族的 HPA-2 的不配合率达到 13.6%。

表 1 广西地区 5 个民族人群 HPA-1~17 的基因分型结果

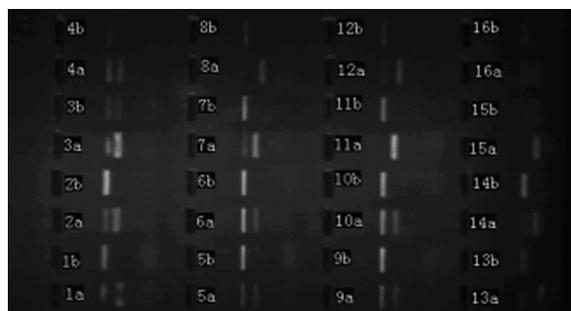
HPA 基因	壮族(n=100)						H-W 值		瑶族(n=100)						H-W 值		苗族(n=100)						H-W 值	
	aa	ab	bb	a	b	P	MP(%)	aa	ab	bb	a	b	P	MP(%)	aa	ab	bb	a	b	P	MP(%)			
1	100	0	0	1.000	0			97	2	1	0.98	0.02	0.000	3.8	98	2	0	0.990	0.010	0.919	2.0			
2	98	2	0	0.990	0.010	0.919	2.0	96	3	1	0.975	0.025	0.000	4.8	87	10	3	0.920	0.080	0.001	13.6			
3	22	48	30	0.460	0.540	0.735	37.3	42	44	14	0.640	0.360	0.652	35.5	25	48	27	0.490	0.510	0.692	37.5			
4	100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0					
5	100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0					
6	98	2	0	0.990	0.010	0.919	2.0	96	3	1	0.975	0.025	0.000	4.8	94	5	1	0.965	0.035	0.009	6.5			
7w~14w	100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0					
15	25	55	20	0.525	0.475	0.414	37.4	40	39	21	0.595	0.405	0.056	36.6	24	62	14	0.550	0.450	0.011	37.2			
16w~17w	100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0					

续表 1 广西地区 5 个民族人群 HPA-1~17 的基因分型结果

HPA 基因	侗族(n=100)						H-W 值		汉族(n=100)						H-W 值	
	aa	ab	bb	a	b	P	MP(%)	aa	ab	bb	a	b	P	MP(%)		
1	98	1	1	0.985	0.015	0.000	2.9	100	0	0	1.000	0				
2	99	1	0	0.995	0.005	0.000	1.5	92	7	1	0.955	0.045	0.063	8.2		
3	28	44	28	0.500	0.500	0.652	36.9	36	48	16	0.600	0.400	1.00	36.5		
4	100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0				
5	100	0	0	1.000	0			96	3	1	0.975	0.025	0.000	4.8		
6	100	0	0	1.000	0			98	1	1	0.985	0.015	0.000	2.9		
7w~14w	100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0				
15	26	43	31	0.475	0.525	0.656	37.1	21	38	41	0.400	0.600	0.037	36.5		
16w~17w	100	0	0	1.000	0			100	0	0	1.000	0				

表 2 广西地区壮族、瑶族、苗族、侗族和汉族 HPA-1~17bw 基因多态性的比较

民族间比较	HPA-2		HPA-3		HPA-6		HPA-15	
	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P
壮族和瑶族	1.221	0.543	12.242	0.002	1.221	0.543	6.209	0.045
壮族和苗族	8.580	0.009	0.349	0.840	2.369	0.306	1.498	0.743
壮族和侗族	0.338	0.561	0.963	0.618			3.862	0.145
壮族和汉族	3.967	0.138	7.640	0.022	1.333	0.513	10.685	0.005
瑶族和苗族	5.069	0.059	8.609	0.014	0.521	0.771	10.638	0.005
瑶族和侗族	2.046	0.359	7.467	0.024			5.088	0.079
瑶族和汉族	1.685	0.431	0.769	0.681	1.021	0.600	12.383	0.002
苗族和侗族	5.757	0.056	0.362	0.834			9.940	0.007
苗族和汉族	1.669	0.434	4.798	0.091	2.750	0.253	19.215	0.000
侗族和汉族	5.757	0.056	4.447	0.108			2.229	0.328



1b, 2b, 4b, 5b, 6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b, 12b, 13b, 14b, 16b 为阴性；1a, 2a, 3a, 3b, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a, 9a, 10a, 11a, 12a, 13a, 14a, 15a, 15b, 16a 为阳性。

图 1 广西地区 5 个民族健康个体 HPA 基因分型电泳图

2.2 广西 5 个民族间 HPA-1~17bw 基因多态性的比较 5 个民族血小板系统的基因型频率比较中, HPA-2 苗族的杂合程度较其他 4 个民族高, 但只与壮族的比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。HPA-3 的杂合程度比较中, 壮族最高, 其次为苗族, 其中, 壮族与瑶族、壮族与汉族、瑶族与苗族、瑶族与侗族之间的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。HPA-6 的杂合程度比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而 HPA-15 杂合程度比较中, 壮族和瑶族、壮族和汉族、瑶族和苗族、瑶族和汉族、苗族和侗族及苗族和汉族之间的差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

3 讨论

血小板抗原是由血小板特有的抗原决定簇组成, 通常分为血小板特异性抗原和血小板相关抗原, 前者与临床上血小板输注无效 (PTR)、新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜 (NAITP) 以及输血后紫癜 (PTP) 密切相关<sup>[4-5]</sup>。随着血小板制品临床应用日益广泛, HPA 逐渐成为国内外研究热点之一, HPA 是血小板膜糖蛋白上的抗原表位, 属于血小板本身固有抗原, 具有独特遗传多样性。HPA 基因属于双等位共显性遗传系统, 其基因多态性 (HPA-14bw 基因除外) 取决于相应血小板膜糖蛋白结构基因中单个核苷酸多态性 (SNP) 导致相应位置的单个氨基酸变异<sup>[6]</sup>。HPA 可以介导同种抗体的产生, HPA 基因的多态性导致临床血小板输注时引起同种免疫反应, 引发同种免疫性血小板减少, 引发 PTR 和 PTP 等<sup>[7-8]</sup>。因

此, HPA 在输血和妊娠时具有重要的临床意义, 尤其是在产生 HPA 抗体后, 输血时必须 HPA 相配合。

HPA 基因多态性分布存在种族和地区的差异。广西是以壮族为主体的少数民族自治区, 也是全国少数民族人口最多的地区 (少数民族人口 1 711.05 万人, 占 37.18%), 境内居住着壮、汉、瑶、苗、侗等 25 个民族。据统计, 壮族、瑶族、苗族和侗族在广西少数民族人口中占 98%<sup>[9]</sup>。由于广西地区民族众多且所占比例较大, 因此, 在本地区进行 HPA 基因多态性的调查, 对于减少广西地区民族间血小板输注并发症的发生尤为重要。

HPA 同种抗体一般由输血、妊娠或骨髓移植等免疫刺激而产生, 不配合率越高, 产生同种抗体的概率也越高<sup>[10]</sup>。国外研究发现, 约 2.5% 的妊娠妇女以及约 1.7% 的输血患者体内存在血小板抗体, 而多次输血患者中, 血小板特异性抗体的产生率更高达 8.0%<sup>[11-12]</sup>。因此, 了解各个民族中 HPA 基因多态性的不配合率, 对减少血小板输注不良反应具有重要意义。本研究结果显示, 5 个民族的 HPA-3 和 HPA-15 基因多态性中不配合率均大于 30.0%, 提示诱发相应抗体的潜在可能性较高, 与国内研究结果一致<sup>[13-15]</sup>。HPA-2 和 HPA-6 基因在几个民族的健康人群中均有表达, 应引起注意的是, HPA-2 仅在苗族中的不配合率大于 10.0%, 与国内研究报道不一致<sup>[16]</sup>, 而其他基因系统杂合程度均不高, 且主要以 a 基因型别为主。比较 5 个民族血小板系统的基因频率, HPA-2 苗族的杂合程度较其他 4 个民族高, 但只与壮族的比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 可能与样本量不足有关, 随着样本增加, 与其他几个民族的差异也应有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。壮族 HPA-3 的杂合程度高于瑶族和汉族, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。瑶族 HPA-3 的杂合程度与苗族和侗族的差异也有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 因此, 临床血小板输注时应注意民族间的差异, 以免引起输血后紫癜、输注血小板无效等情况。汉族 HPA-15 的杂合程度与壮族、瑶族和苗族比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 瑶族 HPA-15 的基因频率与壮族、苗族间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 苗族 HPA-15 的基因杂合程度与汉族的差异也有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。HPA-15 基因位点在各民族间的差异最为明显, 临床血小板输注时应特别引起重视。本研究确定了广西地区壮族、瑶族、苗族和侗族几个少数民族和汉族的血小板

抗原基因,用于预测血小板输注时不同民族间同种免疫发生的可能性,为寻找更快捷、更合适的血小板输注提供实验室依据,避免了血小板输注无效的情况发生,提高了血小板输注疗效。为广西地区建立各民族血小板基因库积累资料等各方面均具有重要的临床意义。

总之,广西地区壮族、瑶族、苗族、侗族和汉族健康人群中 HPA-1~17bw 系统基因多态性存在差异。因此,了解各民族的 HPA 类型,建立对应的血小板基因库,对减少广西地区少数民族患者输血后紫癜、血小板输注无效等有很大助益,具有积极的临床意义。

#### 参考文献:

- [1] 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):200-204.
- [2] Tan JY,Lian LH,Nadarajan VS. Genetic polymorphisms of human platelet antigens-1 to -6, and -15 in the Malaysian population[J]. Blood Transfus, 2012, 10(3): 368-376.
- [3] Arinsburg SA,Shaz BH,Westhoff C,et al. Determination of human platelet antigen typing by molecular methods: importance in diagnosis and early treatment of neonatal alloimmune thrombocytopenia[J]. Am J Hematol, 2012, 87(5):525-528.
- [4] Aster RH. Blood platelet kinetics and platelet transfusion[J]. Clin Invest, 2013, 123(11):4564-4565.
- [5] Nakastoev IM,Grachev AE,Gemdzhian EG,et al. Clinical efficiency of transfusion of pathogen-inactivated platelet concentrates[J]. Ter Arkh, 2013, 85(8):77-80.
- [6] Xu X,Liu Y,Ying Y,et al. Human platelet antigen allele frequencies and new mutations on platelet glycoprotein genes in the Chinese Han population[J]. Transfus Med,

2011,21(5):330-337.

- [7] Shehata N,Denomme GA,Hannach B,et al. Mass-scale high throughput multiplex polymerase chain reaction for human platelet antigen single-nucleotide polymorphisms screening of apheresis platelet donors[J]. Transfusion, 2011,51(9):2028-2033.
- [8] 周豪杰,杨承东,聂庸梅.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):587-588.
- [9] 广西壮族自治区统计局.广西 2010 年第六次全国人口普查主要数据公报[N].广西日报,2011-07-01.
- [10] 周燕.血小板输注无效及其预防和治疗[J].重庆医学,2010,39(10):1298-1300.
- [11] 夏文杰,叶欣,付涌水,等.血小板特异性糖蛋白抗体和 HLA 抗体在特发性血小板减少性紫癜的表达[J].中国实验血液学杂志,2009,17(4):1032-1035.
- [12] Matsushashi M,Tsuno NH,Sone S,et al. The role of alloantibodies against human platelet antigen-15 in multiply platelet transfused patients[J]. Transfusion, 2014, 54(4): 1093-1099.
- [13] 毛伟,王芳,王跃华,等.重庆汉族人群 HPA1-7、15 多态性分布[J].重庆医学,2009,38(12):1422-1424,1426.
- [14] 孙瑜,李国良,肖莉,等.南昌地区机采血小板捐献人群中人类血小板抗原基因多态性初步分析[J].中国输血杂志,2008,21(9):700-703.
- [15] 张冬霞.吉林地区汉族人群血小板抗原系统基因分型研究[J].中国输血杂志,2011,24(10):869-870.
- [16] 邓燕玲,覃小梅,黄军垣.人血小板抗原基因多态性在广西壮族、瑶族、苗族、侗族及仫佬族老年人中的表达差异[J].中国老年学杂志,2012,32(6):2499-2501.

(收稿日期:2014-01-11 修回日期:2014-04-02)

(上接第 2854 页)

缺陷综合征的思路和切入点[J].中医杂志,2006,47(6):412-414.

- [2] 郭会军,王丹妮,刘学伟.中医药治疗艾滋病应重视对无症状 HIV 感染期的早期干预[J].上海中医药杂志,2006,40(7):17-18.
- [3] 李勇,王阶,林洪生,等.中医“治未病”思想在艾滋病早期免疫重建中的作用[J].辽宁中医杂志,2010,37(11):2117-2119.
- [4] Phillips AN,Lundgren JD. The CD4 lymphocyte count and risk of clinical progression[J]. Current Opinion in HIV & AIDS, 2006, 1(1):43-49.
- [5] Srinivasula S,Lempicki RA,Adelsberger JW,et al. Differential effects of HIV viral load and CD4 counts on proliferation of naive and memory CD4 and CD8 T lymphocytes[J]. Blood, 2011, 118:262-270.

- [6] Choi BS,Park YK,Lee JS,et al. The CD28/HLA-DR expressions on CD4<sup>+</sup> T but not CD8<sup>+</sup> T cells are significant predictors for progression to AIDS[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 127(1):137-144.
- [7] Krueger A,Fas SC,Baumann S,et al. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis[J]. Immunol Rev, 2003, 193:58-69.
- [8] McDermott AB,Koup RA. CD8<sup>+</sup> T cells in preventing HIV infection and disease[J]. AIDS, 2012, 26(10):1281-1292.
- [9] Glencross DK,Janossy G,Coetzee IM,et al. CD8/CD38 activation yields important clinical information of effective antiretroviral therapy findings from the first year of the CIPRA-SA cohort[J]. Cytometry, 2008, 74(1):131-140.

(收稿日期:2014-02-09 修回日期:2014-03-20)