

• 临床检验研究论著 •

人类血小板抗原 1~17bw 基因系统在广西地区壮族、瑶族、苗族人群中的表达差异*

杨 兰, 梁秀云, 曾江辉

(广西医科大学第三附属医院/南宁市第二人民医院检验科, 广西南宁 530031)

摘 要:目的 研究广西地区壮族、瑶族、苗族健康人群中人类血小板抗原 HPA 1~17bw 系统基因的差异表达。方法 纳入祖上三代均为同民族的上述 3 个民族各 100 例, 采用 PCR-SSP 方法检测纳入对象的 HPA-1~17bw 系统基因, 并计算 HPA 各系统的不配合率。结果 3 个民族中除 HPA-1、2、3、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。3 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%, 在临床输注血小板时应值得注意。比较 3 个民族血小板系统的基因频率, 发现瑶族人群中的 HPA-3、15 基因杂合程度明显低于壮族($\chi^2=12.242, P=0.002$; $\chi^2=6.209, P=0.045$)和苗族($\chi^2=8.609, P=0.014$; $\chi^2=10.638, P=0.005$), 苗族中的 HPA-2 基因杂合程度明显高于其他两个民族($\chi^2=8.580, P=0.009$; $\chi^2=5.069, P=0.059$), 但与瑶族比较差异无统计学意义。结论 广西地区壮族、瑶族和苗族 HPA 基因多态性分布存在明显的种族差异, HPA-3 和 HPA-15 系统在 3 个民族发生同种免疫反应均有显著意义, 而 HPA-2 在苗族中可能具有较大意义, 在临床配合性血小板输注中应加以重视。

关键词: 抗原, 人血小板; 壮族; 苗族; 广西

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)17-2238-03

The difference analyses of polymorphism of human platelet antigen 1—17 bw gene system in Yao, Zhuang and Miao nationality of Guangxi*

Yang Lan, Liang Xiuyun, Zeng Jianghui

(Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University / Nanning Municipal Second People's Hospital, Nanning, Guangxi 530031, China)

Abstract: Objective To explore the difference of gene polymorphism of human platelet antigen (HPA 1—17 bw) system in Zhuang, Yao and Miao nationality of Guangxi. **Methods** Each 100 healthy Individual whose ancestor in three generations were the same nationality of Zhuang, Yao and Miao ethnic group as study sample, the genotypes of 17 HPA systems were performed by polymerase chain reaction using PCR-SSP for all samples, and calculated the mismatch rate of the each HPA gene system. **Results** The HPA gene systems of Zhuang, Yao and Miao ethnic group except HPA-1, 2, 3, 6, 15 gene system were a/a homozygote. The HPA-3 and HPA-15 mismatch rate of 3 national were greater than 30%, mismatch rate of HPA-2 in the Miao nationality was greater than 10%, and clinical platelet transfusion should be worthy of note. Analysis the gene frequency of three national platelets in Guangxi, the heterozygous degree of HPA-3, 15 gene in Yao nationality were significantly lower than Zhuang nationality ($\chi^2=12.242, P=0.002$; $\chi^2=6.209, P=0.045$) and Miao nationality ($\chi^2=8.609, P=0.014$; $\chi^2=10.638, P=0.005$), the heterozygous degree of HPA-2 gene in Miao nationality was significantly higher than other two ethnic groups ($\chi^2=8.580, P=0.009$; $\chi^2=5.069, P=0.059$), but the difference was not statistically significant between Miao and Yao nationality. **Conclusion** The ethnic difference is significant in HPA of Zhuang, Yao and Miao in Guangxi region. HPA-3 and HPA-15 system in three national have the same immune response. And HPA-2 in the Miao nationality may have great significances, should be paying attention when platelet transfusion in clinical.

Key words: antigens, human platelet; Zhuang nationality; Miao nationality; Guangxi

广西是一个多民族地区, 居住着壮族、瑶族、苗族、侗族等 25 个少数民族, 检测和分析广西地区最大的 3 个少数民族壮族、瑶族和苗族人类血小板抗原 (HPA) 基因多态性及其基因频率, 对减少广西地区民族间血小板输注无效、输血后紫癜、免疫性血小板减少症等情况具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入壮族、瑶族、苗族健康个体各 100 例。其中壮族男 59 例, 女 41 例, 年龄 3~75 岁, 平均年龄 48.3 岁; 瑶族男 62 例, 女 38 例, 年龄 5~71 岁, 平均年龄 46.9 岁; 苗族男 57 例, 女 43 例, 年龄 10~74 岁, 平均年龄 50.3 岁。入选标准:

(1) 居住在广西壮族、瑶族和苗族主要分布区的本民族健康个体; (2) 祖上 3 代均为同民族的, 选择第三代个体为研究对象, 且尽可能确保研究对象在其可追踪的历史上没有与外族通婚; (3) 均无遗传性疾病家族史及其他急、慢性病史。3 组研究对象年龄和性别比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 9700 扩增仪由美国 ABI 公司提供; 凝胶成像仪由珠海黑马生物公司提供。人类血小板抗原 HPA 1~17 基因分型试剂盒由中国江阴力通生命科技公司提供; 人类基因组 DNA 抽取试剂盒由深圳益生堂生物有限公司提供; 低温高速离心机由美国 Beckman 公司提供。

* 基金项目: 广西南宁市科学研究与技术开发计划项目 (201106032C)。 作者简介: 杨兰, 女, 主管检验技师, 主要从事医学免疫学研究。

1.3 方法

1.3.1 DNA 制备 取 250 μ L EDTA 抗凝外周血,采用离心柱法抽取 DNA,一切操作严格按照说明书操作,最后将 DNA 溶于 Tris-EDTA 缓冲液,−20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 PCR-SSP 反应体系 每孔反应体系中含 6 μ L PCR 混合反应液(含 d NTP、buffer)、Taq 酶(5U/ μ L)0.06 μ L、无菌水 7.5 μ L 和 DNA 模版 1.5 μ L,总共 15 μ L。

1.3.3 扩增条件 96 $^{\circ}$ 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。

1.3.4 扩增产物电泳 取 7 μ L 扩增产物,在 2%琼脂糖凝胶上点样,电压 100 V,电泳 30 min,自动凝胶图象分析仪下观察电泳结果。

1.3.5 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,长度为 429 bp。每孔出现内参照带认为扩增成功,在相应碱基对位置观察有无特异性条带出现,如果出现特异性条带判读为阳性,若未出现特异性条带判断为阴性。

1.4 统计学处理 采用统计学软件 SPSS 13.0 进行数据处理,对 HPA 系统的 17 对等位基因频率进行 Hardy-Weinberg (H-w)平衡检验, $P>0.05$ 即表明该基因频率符合 H-W 遗传平衡。各系统对偶抗原不配合率计算 $MP=2ab(1-ab)$ (a、b 分别代表 a 和 b 的基因频率)。3 个民族 HPA1~17bw 基因频率分布的差异,采用卡方检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 广西地区壮族、瑶族和苗族健康个体 HPA 基因分型 大部分 HPA 基因型分布符合 H-W 群体遗传平衡法则,表明选取人群具有代表性。具体结果见表 1。HPA 系统对偶抗原的不配合率分析中,3 个民族的 HPA-15、HPA-3 不配合率均大于 30%,值得注意的是苗族的 HPA-2 的不配合率达到 13.6%。

2.2 广西壮族、瑶族和苗族 HPA1~17bw 基因多态性的比较 见表 2。

表 1 广西地区壮族、瑶族和苗族人群 HPA1~17 的基因分型结果

HPA 基因	壮族(n)					H-W 值		瑶族(n)					H-W 值		苗族(n)					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	0	—	—	97	2	1	0.98	0.02	0.000	3.8	98	2	0	0.99	0.01	0.919	2.0
2	98	2	0	0.99	0.01	0.919	2.0	96	3	1	0.975	0.025	0.000	4.8	87	10	3	0.92	0.08	0.001	13.6
3	22	48	30	0.46	0.54	0.735	37.3	42	44	14	0.64	0.36	0.652	35.5	25	48	27	0.49	0.51	0.692	37.5
4	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
5	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
6	98	2	0	0.99	0.01	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	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
8w	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
9w	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
10w	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
11w	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
12w	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
13w	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
14w	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
15w	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	0.55	0.45	0.011	37.2
16w	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—
17w	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—	100	0	0	1	0	—	—

—:无数据。

表 2 广西壮族、瑶族、苗族 HPA1~17bw 基因多态性的比较

基因型别		壮族与瑶族	壮族与苗族	瑶族与苗族
HPA-1	χ^2	3.046	2.020	1.005
	P	0.218	0.155	0.605
HPA-2	χ^2	1.221	8.580	5.069
	P	0.543	0.009	0.059
HPA-3	χ^2	12.242	0.349	8.609
	P	0.002	0.840	0.014
HPA-6	χ^2	1.221	2.369	0.521
	P	0.543	0.306	0.771
HPA-15	χ^2	6.209	1.498	10.638
	P	0.045	0.473	0.005

3 讨 论

人类血小板抗原(HPA)是存在于血小板糖蛋白上的一类特异性抗原,而这些 HPA 的基因都位于第 5、6、17 和 22 号染色体上的 6 个遗传位点,具有独特的型特异性,属于双等位共显性遗传系统,存在种族、地区差异^[1-2],其多态性除 HPA-14bw 外,绝大多数是由于相应血小板膜糖蛋白结构基因中的单核苷酸多态性(SNP)引起,从而导致相应位置的单个氨基酸变异所致^[3-4]。HPA 基因的多态性导致血小板抗原改变引起同种免疫异常,并最终导致临床血小板输注时发现免疫反应,导致血小板破坏增多,数量减少^[5-6],引起输血后紫癜、输注血小板无效等情况。

广西地区居住着 25 个少数民族,而 HPA 基因多态性分布存在种族地区差异,因此很有必要进行 HPA 基因多态性的

调查。壮族、瑶族和苗族是广西地区人口数量最多的 3 个少数民族,广西地区这 3 个少数民族的 HPA 基因多态性,对临床血小板输注具有重要意义。研究者采用 PCR-SSP 方法检测了壮族、瑶族和苗族的健康人群 HPA1~17bw 基因多态性,发现 HPA-1、2、3、6、15 基因系统有基因型别 b 以外,其他 HPA 基因系统均为 a/a 纯合子。HPA 同种抗体一般因为输血、妊娠或骨髓移植等免疫刺激而产生,不配合率越高,产生抗体的机会也越高。本研究中 3 个民族的 HPA-3 和 HPA-15 基因多态性中不配合率均大于 30%,提示诱发相应抗体的潜在可能性较高。这与国内其他地区的研究一致^[7-9],HPA-3 和 HPA-15 是外源性血小板输注有效性及安全性的最重要的 HPA 系统^[10-11]。HPA-1、2、6 基因在 3 个民族人群中人群均有表达,除 HPA-2 在苗族中的不配合率大于 10%,值得注意以外,其他基因系统杂合程度均不高,主要以 a 基因型别为主,这与邓燕玲等^[12]研究表明苗族、瑶族 HPA-5 不配合率大于 10%的结果不一致。分析广西地区瑶族、壮族、苗族健康人群血小板系统的基因频率,发现瑶族人群中的 HPA-3、15 基因杂合程度明显低于壮族和苗族的,而苗族中的 HPA-2 基因杂合程度明显高于其他两个民族,虽然与瑶族比较差异无统计学意义,但随着样本增加,差异应有显著的统计学意义。

综上所述,广西地区最大的 3 个民族间 HPA 基因系统存在差异,因此建立一个血小板基因库,为临床输注血小板的少数民族患者提供配型相合的成份血小板,对提高输血小板疗效,降低免疫性血小板减少症发生有很大的帮助。

参考文献

- [1] 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,2008,3(10):209-213.

(上接第 2237 页)

部感染很难消除,常反复发作,同时由于广谱抗菌药物的广泛应用,导致其耐药性日趋严重,给临床治疗带来了困难^[11]。该菌含有 β -内酰胺酶,对亚胺培南天然耐药。故临床治疗应首选磺胺类和喹诺酮类抗菌药物,本组资料显示,嗜麦芽寡养单胞菌对左氧氟沙星、米诺环素和复方新诺明有较高的敏感性。洋葱伯克霍尔德菌耐药机制极其复杂,对多种抗菌药物天然耐药,是一种天然的多重耐药病原菌。本组资料显示该菌对头孢他啶和美罗培南有较高耐药性,临床治疗时应根据药敏结果选择抗菌药物,切勿凭经验用药^[12]。

综上所述,临床工作中需重视老年患者的呼吸道管理,加强隔离与宣教,防止交叉感染。同时不断进行病原学监测,了解当地流行菌株的分布及耐药状况,加强抗菌药物的规范化管理和合理使用。在抗感染治疗前先进行细菌培养和药敏试验,根据药敏结果选择抗菌药物,对控制耐药菌株的产生意义重大。

参考文献

- [1] 谢梓正,刘华.老年肺炎发病危险因素的研究进展[J].中国当代医药,2011,18(33):13-15.
- [2] 邱令法,裴碧娜.产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的检测和耐药性分析[J].检验医学,2012,27(5):421-423.

- [2] Metcaife P, W atkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens[J]. Vox Sanguinis, 2003, 85(3): 240-245.
- [3] 赵桐茂.人类血小板抗原(HPA)研究概况[J].中国输血杂志,2004,17(2):129-132.
- [4] Kroll H, Kiefel V, Santoso S. Clinical aspects and typing of platelet alloantigens[J]. Vox Sang, 1998, 74 (suppl 2): S345-354.
- [5] 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.
- [6] 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):587-588.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 林国连,高发平,陈雅雯.血小板抗原基因的分型与配型临床疗效[J].河北医学,2005,10(9):369-370.
- [10] 夏兰,蔡兴权,陈鑫萍,等.海南岛黎族人血小板 1~17 抗原系统基因多态性研究[J].中华医学遗传学杂志,2010,27(2):229-230.
- [11] 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(6): 236-239.
- [12] 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:2012-11-08)

- [3] 郭美丽,曾松芳,林之婕,等.产 ESBLs 大肠埃希菌的检测及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(4):831-833.
- [4] 寿叶女,陈建江,单平因,等.405 株肺炎克雷伯菌感染临床分布与耐药研究[J].中华医院感染学杂志,2012,22(3):614-616.
- [5] 辛续丽,杨朵,王松雪,等.铜绿假单胞菌院内感染分布及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(1):99-101.
- [6] 王迁,马金群.鲍曼不动杆菌的临床感染分布及耐药特征分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(9):1078-1079.
- [7] 罗祥文,汤小燕.金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药性分析[J].临床肺科杂志,2012,17(3):422-424.
- [8] 黄健云,陈光辉,李璐琳,等.耐甲氧西林溶血葡萄球菌感染情况调查及药敏分析[J].吉林医学,2012,33(17):3592-3594.
- [9] 吴佳学,朱德全.肺炎链球菌耐药性及分子流行病学调查[J].国际检验医学杂志,2012,33(3):345-347.
- [10] 桂和翠,王中新,沈继录.48 株流感嗜血杆菌耐药性分析及 β -内酰胺酶基因检测[J].安徽医科大学学报,2012,47(1):56-59.
- [11] 王晓娟,易有峰,张秀华.嗜麦芽寡养单胞菌肺部感染的耐药性分析[J].中华肺部疾病杂志:电子版,2012,5(1):46-48.
- [12] 陈晓玲.4 850 例痰标本洋葱伯克霍尔德菌分布与耐药分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(11):1379-1380.

(收稿日期:2013-01-12)