

丙型肝炎患者 HPA 多态性与血小板计数的关系

周世航¹ 夏悦昕¹ 陈玫¹ 于卫建¹ 刘铭² 梁晓华¹

[摘要] 目的:研究丙型肝炎患者血小板抗原(HPA)多态性与血小板计数的相关性。方法:对丙型肝炎患者进行 HPA-2、-3、-5 和 HPA-15 基因分型及血小板计数。结果:不同 HPA 基因型的丙型肝炎患者,其血小板计数差异无统计学意义。结论:HPA 多态性与丙型肝炎患者血小板计数无相关性。

[关键词] 血小板抗原;多态性;丙型肝炎;肝硬化

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2017.08.008

[中图分类号] R512.6 **[文献标志码]** A

Relationship between human platelet antigen polymorphism and platelet count in patients with HCV infection

ZHOU Shihang¹ XIA Yuexin¹ CHEN Mei¹

YU Weijian¹ LIU Ming² LIANG Xiaohua¹

(¹Dalian Blood Center, Dalian, 116001, China; ²Department of Cell Biology, Dalian Medical University)

Corresponding author: LIU Ming, E-mail: liuminglinxi@163.com; LIANG Xiaohua, E-mail: liangxiaohua1968@126.com

Abstract Objective: To evaluate the relationship between human platelet antigen(HPA) polymorphism and platelet count in the patients with HCV infection. **Method:** We genotyped the polymorphisms of HPA-2, -3, -5 and -15 in the patients with HCV infection. **Result:** Platelet count had no difference among HPA-2, -3, -5 or HPA-15 polymorphisms. **Conclusion:** There may be no relationship between HPA polymorphisms and platelet count in the patients with HCV infection.

Key words HPA; polymorphism; HCV; liver cirrhosis

丙型肝炎病毒是一种由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染引起的病毒性肝炎。据世界卫生组织统计,全球感染 HCV 的人数约为 1.85 亿,感染率约为 2.8%^[1]。一旦 HCV 病毒侵入宿主体内,会引起急性丙型肝炎,其中 80% 的患者会发展为慢性丙型肝炎。在 20 年内,超过 25% 的慢性丙型肝炎患者会发展为肝硬化。每年 6% 的肝硬化患者进而发展为失代偿性疾病或者肝细胞癌,导致其生存概率急剧下降。所以,在 HCV 感染的早期对肝硬化进行诊断有着重要的意义。

肝组织病理学检查是诊断肝硬化的标准方法,但是由于其侵入性操作的本质和患者依从性较差等原因,在临床上的应用受到极大的限制。目前,已经报道了多种可以在 HCV 感染的患者中诊断肝硬化的非创伤性方法,这些方法多数为由多个血清学指标组成的诊断模型,几乎所有模型均涉及到血小板计数^[2]。

血小板减少症是慢性 HCV 最常见的并发

症^[3],血小板减少也预示着高危人群发生肝细胞癌的风险升高,可作为诊断肝硬化的一个简单而有效的指标^[4]。引起血小板减少的原因有多种,但是起关键作用的是血小板特异性抗体。HCV 感染会引发机体免疫系统调节异常,游离 HCV 或其免疫复合物能够通过多种细胞表面受体与血小板表面糖蛋白结合诱发产生特异性抗血小板抗体,导致血小板减少,而血小板特异性抗体的水平由血小板表面抗原(human platelet antigen, HPA)的多态性决定。但是,迄今为止有关中国人群 HPA 多态性与丙型肝炎患者血小板计数的相关性研究尚未见报道。

在本次研究中,我们采用 Quantitative real-time PCR 方法检测 246 例丙型肝炎患者 HPA-2、-3、-5 和 HPA-15 的基因多态性,并用血细胞计数仪检测其血小板数量,研究丙型肝炎患者 HPA 基因多态性与血小板计数的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取大连市传染病医院确诊的 HCV 感染的丙型肝炎患者血样 246 例,其中男 128 例,女 118 例;年龄 20~83 岁。

¹大连市血液中心(辽宁大连,116001)

²大连医科大学细胞生物学教研室

通信作者:刘铭, E-mail: liuminglinxi@163.com; 梁晓华, E-mail: liangxiaohua1968@126.com

1.2 主要试剂与仪器

TaqMan[®] Universal Master Mix II (ThermoFisher 公司); 全血基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司); 7300 实时定量 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司); 血细胞计数仪: 日本 Sysmex 公司产品。

1.3 方法

血小板计数使用血细胞计数仪检测 HCV 患者的血小板数量, 具体操作按照仪器的操作说明进行。全血 DNA 提取: 使用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。Quantitative real-time PCR。

引物和探针序列: 利用 TaqMan-MGB 探针进行 Quantitative real-time PCR 反应, 引物和探针序列见表 1, 引物由 Takara-宝生物工程 (大连) 有限公司合成, 探针由 ThermoFisher 公司合成。

表 1 Quantitative real-time PCR 引物和探针序列

引物/探针名称	序列 5'-3'
HPA-2 正向引物	ctgaaaggcaatgagctgaagac
HPA-2 反向引物	ttgttagccagactgagcttctc
HPA-2a 探针	VIC-ctcctgaCgcccacac-MGB-NFQ
HPA-2b 探针	FAM-ctcctgaTgcccacac-MGB-NFQ
HPA-3 正向引物	gggectgaccactcctttg
HPA-3 反向引物	tgggccgggtgaatgg
HPA-3a 探针	VIC-ctgcccaTccccag-MGB-NFQ
HPA-3b 探针	FAM-tgcccaGccccag-MGB-NFQ
HPA-5 正向引物	tgagtgcactaaagaagaggaagga
HPA-5 反向引物	caaatgcaagttaaattaccagtactaaagca
HPA-5a 探针	VIC-ctgtttactatcaaaGaggtaa-MGB-NFQ
HPA-5b 探针	FAM-ctgtttactatcaaaAaggtaa-MGB-NFQ
HPA-15 正向引物	tgtatcagttcttggtttgtgatgtt
HPA-15 反向引物	cccaagaagttagatagaatcaggtaca
HPA-15a 探针	VIC-tcagttCaggattta-MGB-NFQ
HPA-15b 探针	FAM-tcagttAcaggatttac-MGB-NFQ

注: 大写加粗的碱基为基因多态性的位点。

基因分型, 反应体系为 20 μ l, 包括: 2 $\times$ TaqMan[®] Universal PCR Master Mix II 10 μ l, DNA 1 μ l (10 ng/ μ l); 正向引物和反向引物各 0.2 μ l (20 μ mol/L); FAM 探针和 VIC 探针 0.2 μ l (20 μ mol/L); H₂O 6.8 μ l。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 15 s; 60℃ 退火延伸 1 min, 共 40 个循环。扩增结束后, 读取扩增后荧光信号, 软件自动得出基因分型结果。

1.4 统计学方法

使用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。P < 0.05 代表差异有统计学意义。采用 *t* 检验分析 HPA-2、-3、-5 和 HPA-15 的 aa 型与 ab 或 bb 型之间血小板计数的差异; 为消除年龄、性别等其他因素对结果产生的影响, 采用多元线性回归方法, 以血小板计数为因变量, 年龄、性别和 HPA 基因型为自变量, 自动剔除一些对血小板计数无显著影响的因素, 最终探究 HPA 基因多态性与血小板计数之间的关系。

2 结果

2.1 HPA 基因分型结果

246 例丙型肝炎患者 HPA-2、-3、-5、-15 基因分型结果见表 2。

表 2 HPA-2、-3、-5、-15 基因分型结果

基因型/等位基因	数量	频率/%
HPA-2 基因型		
aa	206	83.74
ab	39	15.85
bb	1	0.41
HPA-3 基因型		
aa	90	36.59
ab	113	45.93
bb	43	17.48
HPA-5 基因型		
aa	242	98.37
ab	4	1.63
bb	0	0.00
HPA-15 基因型		
aa	59	23.98
ab	140	56.91
bb	47	19.11

2.2 丙型肝炎患者血小板计数与 HPA 多态性关系

采用 *t* 检验方法对 HPA-2、-3、-5、-15 aa 型与 ab 或 bb 型血小板数量进行比较 (表 3), 发现 HPA-2 和 HPA-5 aa 型血小板计数值低于 ab 或 bb 型, HPA-3 和 HPA-15 aa 型血小板计数值高于 HPA-3 和 HPA-15 ab 或 bb 型, 但由于各组均 P > 0.05, 说明不同基因型血小板计数值的差异均无统计学意义, HPA 多态性与丙型肝炎患者血小板计数值无关。

为了进一步消除年龄、性别等其他因素对结果产生的影响, 我们以血小板计数为因变量, 年龄、性别、HPA-2、-3、-5、和 HPA-15 基因型为自变量, 进行了多元线性回归分析, 虽然 HPA-3 和 HPA-15 进入方程, 但均 P > 0.05 (表 4), 表明丙型肝炎患者 HPA-2、-3、-5、和 HPA-15 的多态性与血小板计数

无关。

表 3 HPA-2、-3、-5、-15 aa 型与 ab 或 bb 型血小板数量的比较

	aa	ab 或 bb	P
HPA-2	152.3±60.4	168.9±79.3	0.214
HPA-3	157.8±66.9	153.3±62.4	0.601
HPA-5	154.9±63.9	161.3±78.7	0.843
HPA-15	161.4±61.2	152.9±64.9	0.359

表 4 血小板计数与 HPA-3、-15 的多元线性回归分析

	偏回归系数	标准误	标准回归系数	t	P
年龄	-1.623	0.284	-0.351	-0.5710	0.000
HPA-3 aa vs ab 或 bb	5.682	8.564	0.043	0.664	0.508
HPA-15 aa vs ab 或 bb	-5.385	9.393	-0.036	-0.573	0.567

HCV 可在骨髓干细胞内复制,表达其抗原,导致骨髓干细胞发育及成熟障碍而使血小板减少;④免疫功能异常:HCV 感染会引发机体免疫系统调节异常,游离 HCV 或其免疫复合物能够通过多种细胞表面受体与血小板表面糖蛋白结合诱发产生特异性抗血小板抗体,导致血小板减少。有研究表明,在慢性丙型肝炎伴血小板减少症患者中,85%血小板轻度减低的患者存在自身免疫功能异常;57.6%血小板中度减低的患者存在骨髓抑制与免疫功能异常;93.33%血小板计数小于 $100\times10^9/L$ 的患者存在骨髓抑制与免疫功能异常。可见,由 HCV 病毒导致的机体免疫功能异常是导致丙型肝炎患者血小板计数偏低的主要原因。免疫功能异常诱发机体产生特异性抗血小板抗体,而血小板特异性抗体的水平由 HPA 抗原的多态性决定。

此外,研究发现 HPA 基因多态性与多种疾病的发生有关:HPA-1a、HPA-5b 和 HPA-15 等与新生儿同种免疫血小板减少症存在高度关联;HPA-1a、HPA-1b、HPA-3b 和 HPA-15 等与输血后紫癜密切相关^[5];HPA-2b 等位基因可能是心肌梗死发病的独立遗传性危险因素;HPA-2 抗原系统基因多态性可能是贵州地区老年人群脑梗死发病的遗传易感因素^[6]。

Gentile 等^[7]在一项针对 56 例丙型肝炎患者的研究中发现,HPA-3 aa 基因型是导致丙型肝炎患者血小板计数偏低的独立影响因素。然而,我们的研究发现 HPA 多态性与丙型肝炎患者血小板计数不存在相关性。虽然 HPA 抗原多态性与多种疾病相关,但由于血小板抗原多态性受地区、种族影响较大,对不同国家、人群的研究结果也有很大差异。Cater 等对 609 例缺血性脑卒中患者的研究结果表明,HPA-1

3 讨论

慢性丙型肝炎患者在病情进展过程中常出现血小板计数偏低,而引起血小板计数偏低的原因有很多:①脾脏的作用:丙型肝炎并发肝硬化,由于肝门静脉高压可导致脾功能亢进会使血小板被阻滞在脾脏内而不能释放入外周血,并且单核巨噬细胞系统活跃对血小板的破坏增加也使血小板数量减少;②肝脏合成促血小板生成素的能力下降,使血小板的生成减少;③骨髓抑制:体内外研究发现,

多态性是青年缺血性脑卒中的危险因素。而张涌等对 108 例脑血栓形成患者研究中却未发现 HPA-1 和 HPA-2 多态性与脑血栓形成之间存在相关性。因此,由于人种、地区差异可能会导致的实验结果差异。

由于 HPA 抗原共有 6 个双等位基因系统,34 个抗原,但其中 HPA-1、-6 抗原系统和其他 HPA 抗原基因在中国人中多为 aa 纯合子,因此本次实验只检测了 HPA-2、-3、-5 和 HPA-15 四个有明显多态性的 HPA 抗原系统的基因型,未包含所有抗原,因此结果存在一定的局限性,后期可将所有的抗原都进行基因分型再分析结果。

本次试验对大连地区 246 例丙型肝炎患者进行了血小板抗原基因分型和血小板计数,分析显示不同的 HPA 基因型的丙型肝炎患者血小板计数的差异没有显著性。但由于本试验结果存在一定局限性,且 HPA 基因多态性受地区、种族、人群影响很大,因此有待进一步研究确证。

参考文献

[1] Hanafiah KM, Groeger J, Flaxman AD, et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence [J]. Hepatology, 2013, 57:1333—1342.

[2] Chen B, Ye B, Zhang J, et al. RDW to platelet ratio: a novel noninvasive index for predicting hepatic fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B [J]. PLoS One, 2013, 8:e68780.

[3] 赵西平. 慢性肝病患者血小板减少发生机制及治疗 [J]. 临床血液学杂志, 2016(1):11—15.

[4] Giannini EG. Thrombocytopenia in patients with chronic liver disease: what's in a name? [J]. Dig Dis Sci, 2013, 58:299—301.

老年 2 型糖尿病患者血清雌二醇水平和颈动脉硬化相关性*

张杰¹ 方红辉² 王曼曼³

[摘要] **目的:**探讨老年 2 型糖尿病患者血清雌二醇水平和颈动脉硬化的相关性。**方法:**选择 2013-08—2016-01 在我院进行诊治的老年 2 型糖尿病患者 182 例为观察组,同期选择在我院进行体检的健康老年人(≥ 60 岁)182 例为对照组,2 组都进行性激素(雌二醇、睾酮)及常规代谢指标(TC、TG、LDL、Glu、HDL)的测定,同时采用超声观察颈动脉硬化状况与相关性分析。**结果:**观察组的血清 TC、TG、LDL、Glu 含量显著高于对照组,HDL 含量显著低于对照组,2 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组血清雌二醇与睾酮含量分别为 (119.49 ± 16.29) nmol/L 和 (18.34 ± 2.47) nmol/L,对照组分别为 (160.35 ± 17.24) nmol/L 和 (11.42 ± 3.11) nmol/L,2 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在观察组中,血清雌二醇含量与 HDL 呈现明显正相关性($P < 0.05$),而与 TC、TG、LDL、Glu、内中膜厚度(IMT)呈明显负相关($P < 0.05$);多重线性回归分析显示雌二醇、LDL、Glu 为导致 IMT 增厚的主要独立危险因素($P < 0.05$)。**结论:**老年 2 型糖尿病患者血清雌二醇水平呈现低表达和颈动脉硬化状况,可加重糖脂代谢紊乱,促进糖尿病的发生、发展。

[关键词] 老年人;2 型糖尿病;雌二醇;颈动脉硬化;相关性

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2017.08.009

[中图分类号] R587.1 **[文献标志码]** A

Correlation between serum estradiol level and carotid atherosclerosis in elderly patients with type 2 diabetes mellitus

ZHANG Jie¹ FANG Honghui² WANG Manman³

(¹Department of Comprehensive Internal Medicine, Second Clinical Hospital of Jinan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, 508020, China; ²Department of Laboratory, Second Clinical Hospital of Jinan University, Shenzhen People's Hospital; ³Department of Endocrine, The Third Affiliated Hospital of Zhongshan University)

Corresponding author: FANG Honghui, E-mail: fanghonghui30@163.com

Abstract Objective: To investigate the relationship between serum estradiol and carotid atherosclerosis in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. **Method:** From August 2013 to January 2016, 182 elderly patients with type 2 diabetes mellitus were selected in our hospital for diagnosis and treatment as the observation group, and 180 health elderly cases were selected at the same period as the control group, sex hormone and metabolic indicators of two groups were measured, and the carotid atherosclerosis was observed and the correlation analysis was carried on. **Result:** The serum levels of TC, TG, Glu and LDL in the observation group were significantly higher than those in the control group, the HDL level was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The serum levels of T and E2 in the observation group were (18.34 ± 2.47) nmol/L and (119.49 ± 16.29) nmol/L respectively, the control group were (11.42 ± 3.11) nmol/L and (160.35 ± 17.24) nmol/L respectively, and the differences between the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). In the observation group, the serum levels of E2 and HDL were showed significant positive correlation ($P < 0.05$), and TC, TG, LDL, Glu and IMT

* 基金项目:2013 年广东省自然科学基金项目(No:S2013010011533)

¹暨南大学第二临床医学院 深圳市人民医院综合内科(广东深圳,508020)

²暨南大学第二临床医学院 深圳市人民医院检验科

³中山大学附属第三医院内分泌科

通信作者:方红辉,E-mail:fanghonghui30@163.com

[5] 李园,曾惠,吴海兵,等. 患者 HPA 1-6,9,15 基因多态性对血小板输注无效的临床意义 [J]. 中国生化药物杂志,2016,4(36):173-175.

[6] 尹红,曾小菁,杨芳,等. 贵州地区常住人口人类血小板抗原 1-5、15 基因多态性与脑梗死关系的研究 [J]. 中国输血杂志,2015,28(10):1260-1263.

[7] Gentile I, Meola M, Buonomo AR, et al. Human platelet antigen-3 genotype predicts platelet count in patients with HCV infection [J]. Vivo, 2013, 27: 773-777.

(收稿日期:2017-03-30)