

浙江地区人类血小板抗原基因 HPA-1~6, 15 的多态性分析

曹建平¹ 赵毓宏¹ 邓永乐¹ 程超¹ 谢珏¹

[摘要] 目的:研究分析浙江地区人类血小板特异性抗原 HPA-1~6,15 基因分布特点,建立浙江地区 HPA 基因资料库,为快速寻找基因配合型血小板输注,减少血小板输注无效提供理论基础。方法:采用序列特异性引物—多聚酶链反应(PCR-SSP)方法对 345 例浙江地区血小板捐献者进行基因分型,比较浙江地区和中国其他地区 HPA-1~6,15 系统基因型差异。结果:HPA-1~6,15 的基因频率分别为 HPA-1a 99.57%,HPA-1b 0.43%,HPA-2a 94.93%,HPA-2b 5.07%,HPA-3a 47.54%,HPA-3b 52.46%,HPA-4a 99.86%,HPA-4b 0.14%,HPA-5a 99.57%,HPA-5b 0.43%,HPA-6a 99.71%,HPA-6b 0.29%,HPA-15a 56.23%,HPA-15b 43.77%。经 H-W 分析,HPA-3,15 不符合 Hardy-Weinberg 遗传定律。与其他地区相比,HPA-2 和 HPA-5 与个别地区有差异。而 HPA-3 基因频率与多个地区有明显差异,其中 b 基因频率明显高于 a 基因频率。结论:浙江地区 HPA-1~6,15 系统基因分布具有多态性,其中杂合度最高的是 HPA-3 和 HPA-15,在临床血小板输注中这 2 种血小板特异性抗原容易引起血小板输注无效,需加以重视。其次杂合度较高的是 HPA-2,不同的是 HPA-3 的 b 基因频率高于 a 基因。

[关键词] 人类血小板特异性抗原;基因分型;基因频率

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.10.002

[中图分类号] Q343.1 **[文献标志码]** A

Polymorphism distribution of human platelet antigen gene HPA-1-6,15 in Zhejiang Province

CAO Jianping ZHAO Yuhong DENG Yongle CHENG Chao XIE Jue

(Department of Blood Transfusion, the First Affiliated Hospital, School of Medicine Zhejiang University, Hangzhou, 310003, China)

Corresponding author: XIE Jue, E-mail: zyyxj2011@zju.edu.cn

Abstract Objective: To study and analyze the distribution of human platelet antigen HPA-1-6,15 polymorphism in Zhejiang population and to provide theoretical basis for rapidly finding an antigenic gene matching platelet transfusion and reducing platelet transfusion refractoriness. **Method:** Sequence-specific primer polymerase chain reaction (SSP-PCR) was used to analyze platelet antigen HPA-1-6,15 genotypes of 345 platelet donors in Zhejiang and compare with other areas in China. **Result:** The gene frequency of HPA-1-6,15 were HPA-1a 99.57%, HPA-1b 0.43%, HPA-2a 94.93%, HPA-2b 5.07%, HPA-3a 47.54%, HPA-3b 52.46%, HPA-4a 99.86%, HPA-4b 0.14%, HPA-5a 99.57%, HPA-5b 0.43%, HPA-6a 99.71%, HPA-6b 0.29%, HPA-15a 56.23%, HPA-15b 43.77% respectively. According to H-W analysis, HPA-3,15 do not correspond with Hardy-Weinberg's law of inheritance. Compared with other regions, HPA-2 and HPA-5 differ from individual regions. While the frequency of HPA-3 gene is significantly different from that in many regions, of which the frequency of b gene is significantly higher than that of a gene. **Conclusion:** The frequencies of HPA-1-6,15 genes are polymorphic. HPA-3 and 15 have the highest heterozygosity followed by HPA-2, which are prone to cause platelet transfusion refractoriness and should be paid more attention to in clinical platelet transfusion. HPA-3 gene polymorphism has its characteristic in Zhejiang province.

Key words human platelet alloantigen; HPA genotyping; gene frequency

血小板特异性抗原(human platelet alloantigen, HPA)是血小板表面特有的抗原决定簇,表现为血小板特有的遗传多态性^[1]。目前共计发现 35 个 HPA,分别位于 6 个血小板糖蛋白(Glycoprotein, GP)分子上, GPIIb, GPIIIa, GPIb α , GPIb β ,

GPIa 和 CD109。按照国际输血协会的命名原则,将 35 个 HPA 分为 29 个系统(或准系统)^[2]。其中,12 个 HPA 为对偶抗原,分别归入 6 个系统(HPA-1~5 和 HPA-15),属于双等位共显性遗传。其余 23 个 HPA 均为单个低频抗原(HPA-6bw~14bw, HPA-16bw~29bw),未发现相应的高频对偶抗原,归入 23 个准系统。已有研究表明 HPA 在

¹ 浙江大学医学院附属第一医院输血科(杭州,310003)
通信作者:谢珏, E-mail: zyyxj2011@zju.edu.cn

不同地域不同种族人群中分布不同,且与多种临床血小板疾病密切相关,如新生儿同种免疫性血小板减少症(FNAIT)、输血后紫癜(PTP)^[3]。另外 HPA 抗原抗体的同种免疫已成为临床血小板输注无效(PTR)的重要因素之一^[4],因此 HPA 基因型测定对于多种血小板疾病患者的诊断和预后以及血小板相容性输注至关重要。本研究采用序列特异性引物—多聚酶链反应方法(polymerase chain reaction-sequence specific primers,PCR-SSP)对我地区 345 例随机血小板捐献者的 HPA-1~6 和 HPA-15 进行基因分型研究,建立我地区 HPA 基因多态性数据库,与我国其他一些地区 HPA-1~6,15 基因频率分布进行比较,分析本地区存在的可能引起 HPA 同种免疫的血小板特异性抗原基因,为临床血小板的合理应用提供更好的保障。

1 资料与方法

1.1 研究对象

随机选择我省血液中心本地区机采血小板献血者 345 例,献血者捐献血小板时留取全血标本 3~5 ml/人份(EDTA 抗凝)备用。

1.2 试剂与仪器

人类血小板抗原 HPA-1~6,15 基因分型试剂盒(天津秀鹏公司);PCR 仪(美国 AB 公司);DNA 提取试剂盒(天津秀鹏公司);Genecolour I 染料(北京金博益生物技术有限公司);凝胶电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);全自动凝胶成像分析仪(Gel DocTM XR+,美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 DNA 提取

从收集的全血标本中取抗凝血 400 μ l/份,用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,DNA 浓度(50~100)ng/ μ l、DNA 纯度 1.7~2.0。

1.4 HPA-1~6,15 基因的 PCR-SSP 扩增

按照试剂盒说明书操作:配制 Buffer-酶-样本混合液,分别向每个引物孔各加入 10 μ l,上 PCR 扩增仪扩增;取扩增产物 10 μ l,在 2.5% 琼脂糖凝胶中(含溴化乙锭 1 μ g/ μ l)电泳 15 min,电泳缓冲液为 1% TBE 溶液,凝胶成像分析仪观察结果并拍照。

1.5 统计学分析

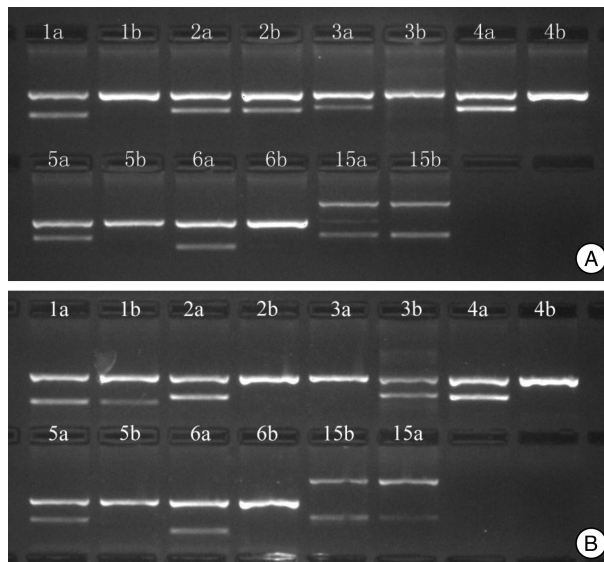
根据电泳结果判读和统计各基因型,进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验(H-W 检验),求得观察值与期望值间的 P 值,以 $P>0.05$ 为符合平衡法则。计算公式如下:等位基因频率: $f(a)=[2 \times \text{纯合子数} + \text{杂合子数}]/[2 \times \text{总的个体数}]$, $f(b)=1-f(a)$,表现型频率: $f(aa)=[f(a)]^2$, $f(ab)=2f(a)f(b)$, $f(bb)=[f(b)]^2$;不配合率= $2ab(1-ab)$;a、b 分别代表 a 和 b 基因频率。不同地区间基因频率比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 HPA 基因分型扩增产物鉴定

2 例不同表型分型电泳结果图见 1。



A: 基因表型: HPA-1aa、HPA-2ab、HPA-3aa、HPA-4aa、HPA-5aa、HPA-6aa、HPA-15ab; B: 基因表型: HPA-1ab、HPA-2aa、HPA-3bb、HPA-4aa、HPA-5aa、HPA-6aa、HPA-15ab。

图 1 不同表型电泳结果图

2.2 HPA-1~6,15 基因型分布及基因频率

根据遗传学基因计数方法得出 HPA-1~6 和 HPA-15 系统基因频率见表 1。HPA-1a 99.57%, HPA-1b 0.43%, HPA-2a 94.93%, HPA-2b 5.07%, HPA-3a 47.54%, HPA-3b 52.46%, HPA-4a 99.86%, HPA-4b 0.14%, HPA-5a 99.57%, HPA-5b 0.43%, HPA-6a 99.71%, HPA-6b 0.29%, HPA-15a 56.23%, HPA-15b 43.77%,其中 HPA-3 和 HPA-15 系统杂合度最高,不符合 H-W 平衡定律。HPA-2 系统杂合度较高。

2.3 本地区与其他地区 HPA 基因频率比较

与国内其他地区相比,HPA-1、HPA-4、HPA-6 和 HPA-15 与其他地区没有差异。HPA-2 系统与上海比较差异有统计学意义,HPA-3 系统与上海、河南、吉林、黑龙江、贵州、重庆相比差异均有统计学意义,具有较明显的地区特点。HPA-5 系统与黑龙江、贵州和重庆比较差异有统计学意义。具体比较结果见表 2。

3 讨论

人类血小板抗原是一个复杂的血型系统,包括血小板共同抗原和血小板特异性抗原。血小板共同抗原是指与其他细胞或组织共有的抗原,包括白

表 1 我地区 HPA-1~6,15 基因多态性分布

抗原	基因型	观察值	期望值	基因型频率	HW 分析		基因频率
					χ^2	P	
HPA-1	aa	342	342.006 5	0.991 3	0.006 579	0.935 4	1a 0.995 7
	ab	3	2.986 957	0.008 7			1b 0.004 3
	bb	0	0.006 522	0			
HPA-2	aa	311	310.887 7	0.901 4	0.0157 71	0.900 1	2a 0.949 3
	ab	33	33.224 64	0.095 7			2b 0.050 7
	bb	1	0.887 681	0.002 9			
HPA-3	aa	100	77.959 42	0.289 9	22.639 06	<0.001	3a 0.475 4
	ab	128	172.081 2	0.371 0			3b 0.524 6
	bb	117	94.959 42	0.339 1			
HPA-4	aa	344	344.000 7	0.997 1	0.000 727	0.948 5	4a 0.998 6
	ab	1	0.998 551	0.002 9			4b 0.001 4
	bb	0	0	0			
HPA-5	aa	342	342.006 5	0.991 3	0.006 579	0.935 4	5a 0.995 7
	ab	3	2.986 957	0.008 7			5b 0.004 3
	bb	0	0.006 522	0			
HPA-6	aa	343	343.002 9	0.994 2	0.002 915	0.956 9	6a 0.997 1
	ab	2	1.994 203	0.005 8			6b 0.002 9
	bb	0	0	0			
HPA-15	aa	124	109.089 9	0.359 4	10.638 09	0.001 1	15a 0.562 3
	ab	140	169.820 3	0.405 8			15b 0.437 7
	bb	81	66.089 86	0.234 8			

注: $P<0.05$, 即不符合 H-W 平衡定律。

表 2 中国不同地区汉族人群 HPA 单倍型基因频率分布

单倍型	浙江 ($n=345$)	上海 ^[5] ($n=137$)	山东 ^[6] ($n=234$)	河南 ^[7] ($n=160$)	吉林 ^[8] ($n=419$)	黑龙江 ^[9] ($n=123$)	贵州 ^[10] ($n=1270$)	重庆 ^[11] ($n=533$)
HPA-1a	0.995 7	0.988 9	0.995 7	0.987 5	0.992	0.987 8	0.994	0.995 3
HPA-1b	0.004 3	0.011 1	0.004 3	0.012 5	0.008	0.012 2	0.006	0.004 7
HPA-2a	0.949 3	0.888 1*	0.946 6	0.946 9	0.934	0.959 4	0.938	0.936 2
HPA-2b	0.050 7	0.111 9*	0.053 4	0.053 1	0.066	0.040 7	0.062	0.063 8
HPA-3a	0.475 4	0.598 9*	0.536 3	0.590 6*	0.592*	0.682 8**	0.614**	0.572 2*
HPA-3b	0.524 6	0.401 1*	0.463 7	0.409 4*	0.408*	0.317 1**	0.386**	0.427 8*
HPA-4a	0.998 6	0.996 3	1.000 0	0.996 9	0.996	1.000 0	0.998	0.996 2
HPA-4b	0.001 4	0.003 7	0.000 0	0.003 1	0.004	0.000 0	0.002	0.003 8
HPA-5a	0.995 7	0.990 7	0.991 5	0.990 6	0.998	0.971 5*	0.973*	0.941 8**
HPA-5b	0.004 3	0.009 3	0.008 5	0.009 4	0.002	0.028 5*	0.027*	0.058 2**
HPA-6a	0.997 1	0.983 2	NA	0.981 2	0.992	0.983 7	NA	0.985 9
HPA-6b	0.002 9	0.016 8	NA	0.018 8	0.008	0.016 3	NA	0.014 1
HPA-15a	0.562 3	0.641 8	0.515 0	0.540 6	0.564	0.479 6	0.512	0.541 3
HPA-15b	0.437 7	0.358 2	0.485 0	0.459 4	0.436	0.520 4	0.488	0.458 7

注: * 为 $P<0.05$, ** 为 $P<0.001$, NA 表示未检测到。

细胞抗原(HLA 系统)和红细胞抗原(ABO 血型抗原等)。而血小板特异性抗原 HPA 为血小板特有,是血小板膜 GP 的构成部分,其抗原表型多态性是由单核苷酸的置换导致 GP 多肽链上单个氨基酸的改变所引起^[12-13]。研究表明,HPA 与血小

板功能密切相关,其中 HPA-2,5,15 基因多态性与血小板数量密切相关,HPA-5 基因多态性与平均血小板体积相关^[14]。通过对比研究,Eyada 等^[15]发现具有 HPA-2b 基因的埃及人发生 ITP 的可能性是没有 HPA-2b 基因的埃及人的 2.37 倍。

Thude 等^[16]的研究数据显示在肝移植患者中,急性细胞排斥反应与 HPA-3 的不相容性有关,急性细胞排斥受体中 HPA-3bb 基因型频率明显高于非急性细胞排斥受体。因此 HPA 多态性不仅在 PTR、PTP、FNAIT 等疾病中发挥重要作用,在骨髓和器官移植也不可忽视^[17]。

近年来,已发现血小板特异性抗原与越来越多的疾病有密切联系,因此关于其基因分型的研究越来越受到重视。目前普遍采用的 HPA 基因分型方法中,最简便快速应首推 PCR-SSP 分型方法。本次研究中我们应用 PCR-SSP 方法得出了浙江人群血小板特异性抗原 HPA-1~6 和 15 的基因频率并与我国其他某些地区进行比较,初步描绘出浙江地区人类 HPA 基因多态性分布情况,其中 HPA-3 和 15 是杂合度最高的 2 个系统。杂合度高产生相应抗体的概率就高,引起 PTR 的可能性就大,因此在血小板输注过程中须高度重视 HPA-3 和 HPA-15。对于多次输血患者,产生血小板抗体的可能性更大,更容易获得 PTR。我们已有研究表明 HPA 同型输注可以较有效减少 PTR 发生率^[18],因此对血小板捐献者进行 HPA 基因分型检测,构建 HPA 基因分型血小板供者资料库,对于 PTR 患者选择 HPA 基因相合的血小板输注,提高血小板输注疗效具有重要意义。此次研究中的捐献者多为固定血小板捐献者,我们已经将这 300 余人加入血小板捐献者 HPA 基因资料库,争取为临床提供更多的 HPA 配合的血小板以减少血小板输注无效。HPA 基因型分析具有重要的理论和实际意义,今后将继续进行更多的 HPA 相关研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens[J]. Vox Sang, 2003, 85: 240—245.
- [3] Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens-2013[J]. Vox Sang, 2014, 106: 93—102.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 朱传福, 王淑荣, 王玫, 等. 山东汉族人群血小板特异性抗原基因的多态性研究[J]. 山东医药, 2006, 46(14): 14—16.
- [7] 滑世轩, 王书勤, 岑东, 等. 河南汉族人群血小板抗原 HPA1—16bw 基因多态性研究[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(7): 545—547.
- [8] 杨帆, 韩瑜, 焦立新, 等. 吉林地区人群 HPA-1~6, 15 系统基因多态性分析[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(5): 750—751.
- [9] 颜廷宇, 李鑫, 丁镌, 等. 黑龙江省汉族人群血小板抗原 1~17 系统基因多态性研究[J]. 临床输血与检验, 2017, 19(6): 623—627.
- [10] 尹红, 杨芳, 杨晋渝, 等. 贵州地区随机人群血小板抗原基因频率调查和不配合率分析[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(3): 279—282.
- [11] 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.
- [12] Portela CN, Schriefer A, Albuquerque SR, et al. The human platelet alloantigen profile in blood donors from Amazonas, Brazil[J]. Transfus Med, 2016, 26: 448—456.
- [13] Shaiegan M, Samiei S, Ataee Z, et al. Frequency of human platelet antigens (HPA-2/3/5) polymorphism in Iranians evaluated by RFLP-PCR[J]. IJBC, 2011, 3: 101—105.
- [14] Zhou S, Liang X, Wang N, et al. Association of human platelet antigen polymorphisms with platelet count and mean platelet volume[J]. Hematology, 2018, 27: 1—5.
- [15] Eyada TK, Amin DG, Samih I, et al. Human platelet antigen 1, 2 and 5 gene polymorphisms in Egyptians and their potential association with susceptibility to immune thrombocytopenic purpura in Egyptian patients[J]. Hematology, 2018, 23: 111—116.
- [16] Thude H, Bischoff W, Sterneck M, et al. Polymorphisms of the human platelet antigen-1, -2, -3, -5, and -15 systems and acute cellular liver transplant rejection[J]. Hum Immunol, 2017, 78: 534—539.
- [17] Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens(HPA) in blood transfusion and transplantation[J]. Transpl Immunol, 2002, 10: 165—181.
- [18] 赵毓宏, 曹建平, 邓永乐, 等. HPA1-6, 15 基因遗传多态性在血小板输注中的应用研究[J]. 临床血液学杂志, 2017, 30(4): 587—590.

(收稿日期: 2018-07-07)