

熔解曲线分析法对济南地区汉族人群 HLA-A、B 和 HPA1-18,21 基因多态性分布的研究

郝萧¹ 李杰¹ 刁雪芹¹ 夏小叶¹ 姚美雪²

[摘要] 目的:探讨济南地区汉族人群血小板抗原(HPA)1-18,21 和人类白细胞抗原(HLA-A、B)的基因多态性分布,为建立本地区机采血小板献血者基因分型资料库奠定基础。方法:采用荧光 PCR 熔解曲线分析法对本站随机选取的 347 例无亲缘关系固定献血者进行 HLA-A、B 和 HPA1-18,21 基因分型。结果:HLA-A、B 位点分别检测出 18 个和 34 个等位基因,基因频率较高的分布为 A* 02(0.278 1),A* 11(0.168 6),A* 24(0.147 0)与 B* 13(0.142 7)、B* 60(0.069 2)、B* 61(0.064 8)、B* 62(0.063 4)。最常见的 HPA 基因组合型为:HPA-1a/1a-2a/2a-3a/3b-4a/4a-5a/5a-6a/6a-(7-14)a/a-15a/15b-(16-18)a/a-21a/21a。结论:济南汉族人群 HLA 和 HPA 分布具有多态性,与其他地区和种族比较有差异性,应建立本地区血小板捐献者的 HLA 与 HPA 基因分型资料库。

[关键词] 人类血小板抗原;人类白细胞抗原;机采血小板

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2022.12.012

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] A

Study on distribution of HLA-A, B and HPA1-18, 21 gene polymorphisms in Han population in Jinan by melting curve analysis

HAO Xiao¹ LI Jie¹ DIAO Xueqin¹ XIA Xiaoye¹ YAO Meixue²

(¹Jinan Blood Station, Jinan, 250000, China; ²Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Xuzhou Medical University)

Corresponding author: YAO Meixue, E-mail: yaomeixue@163.com

Abstract Objective: To investigate the gene polymorphism distribution of platelet antigen(HPA) 1-18, 21 and human leukocyte antigen(HLA-A, B) in Han population in Jinan, so as to lay a foundation for establishing the genotyping database of mechanically collected platelet donors in this area. **Methods:** The HLA-A, B and HPA1-18, 21 genotypes of 347 unrelated fixed blood donors were analyzed by fluorescence PCR fusion curve analysis. **Results:** 18 alleles and 34 alleles were detected at HLA-A and B loci respectively. The higher gene frequencies were A* 02(0.278 1), A* 11(0.168 6), A* 24(0.147 0) and B* 13(0.142 7), B* 60(0.069 2), B* 61(0.064 8) and B* 62(0.063 4). The most common HPA genotypes were: HPA-1a / 1a-2a / 2a-3a / 3b-4a / 4a-5a / 5a-6a / 6A-(7-14) a / a-15a / 15b-(16-18) a / a-21a / 21a. **Conclusion:** The distribution of HLA and HPA in Jinan Han population was polymorphic, which was different from other regions and races. The HLA and HPA genotyping database of platelet donors in this region should be established.

Key words human platelet antigen; human leukocyte antigen; mechanically collected platelets

随着血小板血液制品的大量应用,多次输注血小板患者可产生血小板相关抗体,造成血小板输注无效(platelet transfusion refractory, PTR),PTR 可以由免疫和非免疫因素引起^[1]。虽然免疫因素只占 PTR 总数的 20%^[1-2],但是对反复输血或者输血小板的患者而言,多以此类为主。由于免疫方面的原因引起的 PTR 已成为一个重要的影响血小板正常输注的因素。一般认为,引起 PTR 的抗体主要为两类:即人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)和人类血小板抗原(human platelet

antigen, HPA)。为 PTR 患者输注 HLA 和 HPA 配型相合的血小板可以显著提高血小板输注效果。HLA 和 HPA 具有较高的多态性^[3-4],其基因频率在不同的群体中存在差异,因此建立本地区血小板捐献者的 HLA 和 HPA 分型资料库,对有效解决因血小板同种免疫引起的 PTR 具有重要意义。目前,国内大多数机构都是采用 PCR-SSP 方法对 HLA 和 HPA 进行分型,该方法 PCR 扩增后还需要进行电泳鉴定,检测大量标本耗时耗力。因此,笔者采用荧光 PCR 技术通过熔解曲线分析对济南地区单采血小板捐献者 HLA-A、B 和 HPA1-18, 21 等位基因进行分析,研究其分布特点,以期建立已知基因型的血小板固定献血者资料库,为临床

¹ 济南市血液供保中心(济南,250000)

² 徐州医科大学公共卫生学院流行病学与生物统计学系
通信作者:姚美雪, E-mail: yaomeixue@163.com

PTR 患者搜寻 HLA/HPA 基因匹配的血小板,并为进一步扩充本地区血小板献血者库存提供资料,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

从济南地区汉族固定血小板献血者中随机选取 347 例,其中男 304 例,女 43 例,无血缘关系,定期捐献血小板(捐献次数>3 次),年龄 18~45 岁。根据知情同意原则采集 EDTA 抗凝静脉全血 2 mL。

1.2 仪器和试剂

紫外分光光度计(Eppendorf,德国),Agilent Mx3000P PCR 扩增仪(STARATAGENE,安捷伦,美国),eppendorf 5810R 离心机。TIANamp Blood DNA Kit(北京天根生化科技有限公司,批号:W9112),HLA 与 HPA 基因分型试剂盒(天津市秀鹏生物技术开发有限公司 K202106008, K202105001)

1.3 DNA 提取

分别取样本全血 400 μ L,用 TIANamp Blood DNA Kit(北京天根生化科技有限公司)提取,按试剂盒说明书进行操作。DNA 使用浓度为 30 ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 值为 1.6~2.0。DNA 保存于-80℃冰

箱备用。

1.4 HLA-A、B 和 HPA1-18,21 基因分型

严格按照天津秀鹏基因人类血小板同种抗原 HPA1-18,21 分型试剂盒与 HLA-AB 基因分型测定试剂盒说明书操作。

1.5 统计学处理

采用直接计数法计算基因频率,并用 χ^2 检验分析基因型观察值与期望值是否符合 Hardy-Weinberg 平衡验证,HPA 对偶抗原不配合率(MMP)= $2ab(1-ab)$,其中 a, b 为对偶抗原等位基因频率^[2],聚类分析比较本地区和其他群体基因分布的差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.6 血小板供者库的建立

将 347 例供者进行 HLA-A、B 与 HPA1-18,21 位点分型,将分型结果及其详细地址、身份证号码、血型数据整理入库。

2 结果

2.1 HLA-A、HLA-B 位点基因频率分布

HLA-A、B 位点分别检测出 18 个和 34 个等位基因,结果见表 1。两位点基因频率较高的分布为 $A^*02(0.2781)$, $A^*11(0.1686)$, $A^*24(0.1470)$ 与 $B^*13(0.1427)$ 、 $B^*60(0.0692)$ 、 $B^*61(0.0648)$ 、 $B^*62(0.0634)$ 。

表 1 济南地区 347 例血小板捐献者 HLA-A、B 位点等位基因频率

等位基因	观察值	基因频率	等位基因	观察值	基因频率	等位基因	观察值	基因频率
A^*01	29	0.0418	B^*07	23	0.0331	B^*52	35	0.0504
A^*02	193	0.2781	B^*08	3	0.0043	B^*54	18	0.0259
A^*03	29	0.0418	B^*13	99	0.1427	B^*55	14	0.0202
A^*11	117	0.1686	B^*18	2	0.0029	B^*56	1	0.0014
A^*23	2	0.0029	B^*27	21	0.0303	B^*57	10	0.0144
A^*24	102	0.1470	B^*35	30	0.0432	B^*58	26	0.0375
A^*26	17	0.0245	B^*37	8	0.0115	B^*60	48	0.0692
A^*29	10	0.0144	B^*38	12	0.0173	B^*61	45	0.0648
A^*30	73	0.1052	B^*39	14	0.0202	B^*62	44	0.0634
A^*31	31	0.0447	B^*3901	8	0.0115	B^*63	1	0.0014
A^*32	14	0.0202	B^*41	1	0.0014	B^*65	2	0.0029
A^*33	49	0.0706	B^*44	33	0.0476	B^*67	13	0.0187
A^*34	2	0.0029	B^*46	41	0.0591	B^*71	13	0.0187
A^*66	1	0.0014	B^*48	39	0.0562	B^*72	1	0.0014
A^*68	8	0.0115	B^*49	2	0.0029	B^*75	38	0.0548
A^*203	8	0.0115	B^*50	7	0.0101	B^*81	1	0.0014
A^*210	6	0.0086	B^*51	37	0.0533			
A^*2403	3	0.0043	B^*5102	4	0.0058			

2.2 HPA 基因型和等位基因频率分布

HPA1-18,21 中,HPA7-14、16-18 抗原系统基因呈单特异性,未检测到 b 等位基因;杂合度较高

的是 HPA3 与 15,基因型 HPA3aa、HPA3ab、HPA3bb 的频率分别为 0.3141、0.5101、0.1758;基因型 HPA15aa、HPA15ab、HPA15bb 的频率分

别为 0.322 8, 0.440 9, 0.236 3, 见表 2。HPA-3 与 HPA-15 系统的对偶抗原不配合率也最高。经检

验 HPA 系统中所有等位基因均复合 Hardy-Weinberg 平衡。

表 2 济南地区 347 例血小板捐献者 HPA 基因型和基因频率分布

	基因型频率			基因频率		P (H-W 平衡)	MMP
	aa	ab	bb	a	b		
HPA-1	0.988 5	0.0115	0	0.994 2	0.005 8	0.137	0.011 4
HPA-2	0.887 6	0.109 5	0.002 9	0.942 4	0.057 6	1	0.102 7
HPA-3	0.314 1	0.510 1	0.175 8	0.569 2	0.430 8	0.881	0.370 2
HPA-4	0.994 2	0.005 8	0	0.997 1	0.002 9	1.000 0	0.005 7
HPA-5	0.968 3	0.031 7	0	0.984 1	0.015 9	1.000 0	0.030 7
HPA-6	0.979 8	0.020 2	0	0.989 9	0.010 1	1.000 0	0.019 8
HPA-7	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-8	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-9	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-10	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-11	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-12	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-13	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-14	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-15	0.322 8	0.440 9	0.236 3	0.543 2	0.456 8	0.329	0.373 1
HPA-16	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-17	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-18	1.000 0	0	0	1.000 0	0	NA	0
HPA-21	0.979 8	0.020 2	0	0.989 9	0.010 1	1.000 0	0.019 8

2.3 济南地区血小板献血者 HLA-A、B 高频等位基因与我国其他不同地区的比较

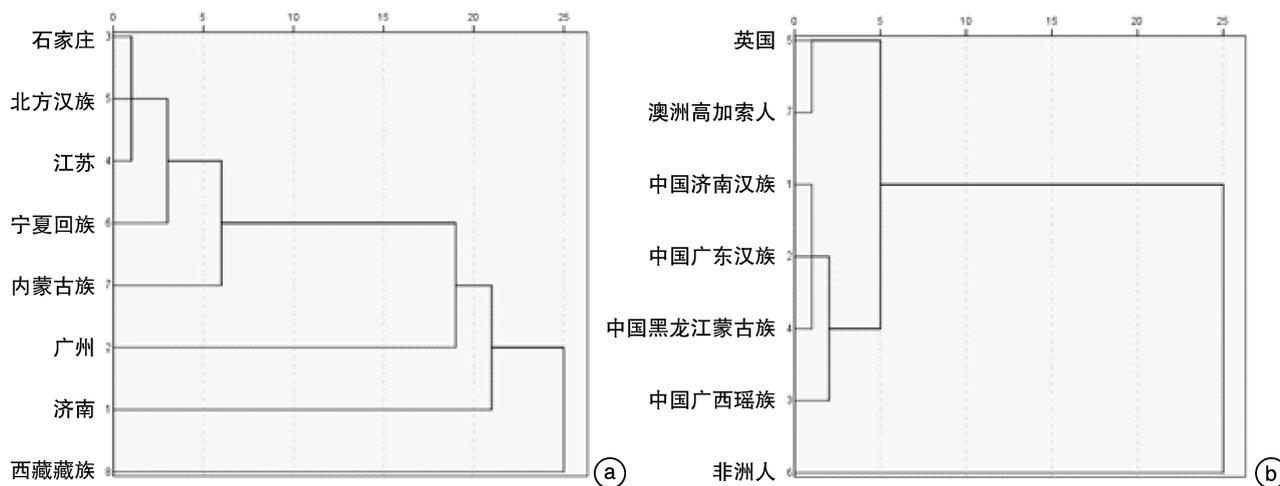
济南地区汉族 A* 11 与广州汉族人群^[5] 基因频率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); A* 30 的基因频率与广州、北方汉族^[6]、宁夏回族^[7]、西藏藏族^[8] 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与石家庄汉族^[9]、内蒙古蒙古族^[10] 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); A* 31、A* 32、B* 13、B* 51 的基因频率与西藏藏族比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); B* 61 与广州汉族、西藏藏族比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B* 62 与西藏藏族比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B* 75 与广州汉族、西藏藏族比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。济南地区汉族与其他人群之间的 HLA 单倍型比较见图 1a。

2.4 济南地区血小板献血者 HPA 基因频率与我国其他不同地区的比较

济南汉族人群与广州汉族和国内其他少数民族比较, 差异无统计学意义。我国济南地区汉族的 HPA-1、2、3、5、15 系统抗原基因分布频率与南非人比较, 差异有统计学意义^[11]; HPA-1、5 与英国^[12]、澳洲高加索人^[13] 比较, 差异有统计学意义。济南地区汉族与不同国家、不同民族之间的 HPA 基因频率比较见图 1b。

3 讨论

PTR 是由非免疫因素和免疫因素引起的, 前者包括患者有脾肿大伴脾功能亢进、感染、发热、药物作用(阿司匹林、肝素、两性霉素等)、弥散性血管内凝血等情况时可使血小板破坏或消耗增加, 从而导致 PTR; 后者是由于患者反复输注血小板, 患者血清中可产生血小板的同种抗体, 当再次输入血小板后, 会产生血小板抗原和抗体的免疫反应^[1]。HLA 抗体是免疫性 PLT 的主要原因^[14], 约占免疫因素的 80%。济南地区血小板献血者中 HLA-A、B 中基因频率较高的有 A* 02(0.278 1), A* 11(0.168 6), A* 24(0.147 0) 与 B* 13(0.142 7)、B* 60(0.069 2)、B* 61(0.064 8)、B* 62(0.063 4)。A* 11 与广州汉族人群的基因频率有显著差异; A* 30 的基因频率与广州、北方汉族、宁夏回族、西藏藏族有显著差异, 与石家庄汉族、内蒙古蒙古族有差异; A* 31、A* 32、B* 13、B* 51 的基因频率与西藏藏族有显著差异; B* 61 与广州汉族、西藏藏族有差异; B* 62 与西藏藏族有差异; B* 75 与广州汉族、西藏藏族有显著差异^[5-10]。由此可见, 济南地区汉族人群血小板捐献者 HLA 基因分布具有区域性特点, 因此, 有必要建立本地区 HLA 基因型血小板捐献者资料库。



a: 济南地区汉族与其他人群之间的 HLA 单倍型比较; b: 济南地区血小板献血者 HPA 基因频率与不同地区的比较。

图 1 树状分析图

HPA 是血小板表面所具有的血小板独特性抗原,是 PTR 产生的仅次于 HLA 同种免疫的重要因素。由于种族多态性及地区差异,HPA 不相合血小板输注可引起血小板同种免疫反应,诱发输血后血小板减少性紫癜(PTTP)、PTR 等疾病^[15]。济南地区 HPA-3、HPA-15 系统具有多态性,HPA 的基因型受影响较大,是 HPA 相合性输注的重点。HPA7-14、16-18 抗原系统基因呈单特异性,未检测到 b 等位基因,均为 aa 纯合;济南汉族人群中 HPA1-18,21 中对偶抗原不配合概率从高到低为 HPA-15、3、2、5、6、21。我国济南地区汉族的 HPA-1、2、3、5、15 系统抗原基因分布频率与南非人有显著差异;HPA-1、5 与英国、澳洲高加索人^[11-13] 比较存在显著差异。

熔解曲线分析法是近年来兴起的用于基因分型的遗传学分析方法,该方法利用 PCR 结束后根据不同碱基序列构成核苷酸熔解温度不同这一物理性质,利用饱和染料监控核苷酸的熔解过程得到特征性熔解曲线。本研究方法基于 PCR-SSP 的反应原理,在反应扩增液中使用 SYBR Green I 荧光染料,形成扩增曲线及特征性熔解曲线表示扩增有效,通过对特征性熔解曲线 Tm 值定性判断孔位的阴阳性,依据引物孔位图定性判读基因分型结果,基因分型结果符合人类基因遗传规则。该方法比常规 SSP 方法节省了电泳跑胶的时间,节约了时间、人力、物力。

有报道在造血干细胞移植中,输注 HLA 配型的水小板有利于减少 PTR 的发生,其输注有效率优于常规交叉配型的水小板^[16]。本研究对济南地区血小板捐献者 HLA-A、B 和 HPA1-18,21 系统抗原基因多态性进行检测,初步建立了血小板捐献者 HLA 和 HPA 的基因型资料库,实现患者 HLA

和 HPA 抗原配合性输注,可以有效地避免输注无效的发生,减少血液的浪费,提高成分输血的安全性与有效性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 贺锋,李彦勋,程金凤. 免疫性血小板减少性紫癜患者血小板输注疗效影响因素分析[J]. 临床血液学杂志, 2020,33(12):825-828.

[2] 张忠印,吉飞跃,周小玉. HLA-I 抗体及血小板膜糖蛋白 CD41a 的表达与血小板输注无效的相关性及影响因素分析[J]. 临床血液学杂志, 2021, 34(8): 545-547,551.

[3] 杜飞嫦,洪文旭,吴凡,等. 稀有血型库和血小板供者资料库的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(2):276-278.

[4] 王超,胡晓玉,赵阳,等. 安徽省汉族人群 HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1 等位基因分布及单体型多态性研究[J]. 中国输血杂志, 2021,34(3):240-244.

[5] 苏湘晖,孙昂,粟玉萍,等. 岳阳地区无偿献血小板捐献现状调查和血小板供者库扩容[J]. 中国误诊学杂志, 2019,14(4):148-150.

[6] 许飞,贺晨峰,曹锁春,等. 常州地区单采血小板捐献者 HLA 抗原分布情况[J]. 临床血液学杂志, 2018, 31(4):294-296.

[7] 吕启露,廖秀云,纪欣,等. 四川德阳地区血小板捐献者 HPA-1~6w、HPA-15 及 HPA-32bw~35bw 多态性研究[J]. 中国输血杂志, 2022,35(2):149-153.

[8] 刘孟黎,齐珺,沈春梅,等. 中国西藏藏族人群 HLA-A/B/DRB1 座位基因遗传多态性和单体型分析[J]. 中国输血杂志, 2011,24(2):96-100.

[9] 苏蔓,李茵,赵倩,等. 石家庄地区已知 HLA 型别单采血小板捐献者基因资料库库容评价[J]. 临床输血与检验, 2020,22(3):290-294.

[10] Shen CM,Zhu BF,Li SB. [HLA-A,B,and DRB1 gene polymorphisms in Mongol ethnic group of Inner Mongolia,China][J]. Yi Chuan,2008,30(2):164-168.

生,尤其是 Kidd 血型系统抗体,该血型系统抗体微弱、联合存在、半衰期短的特点极易造成漏检。因此平时工作中应学会并掌握分析凝集强度有差别的谱细胞格局,熟练运用抗体剂量效应及积分制原则鉴定不规则抗体特异性。在鉴定复杂抗体时,还可以采用吸收放散试验排除不同血型系统抗体干扰,保证抗体鉴定的准确性,从而选择相应抗原阴性的血液,保障临床输血安全。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨红梅,郑皆炜,向东,等. 抗-G 联合抗-D、抗-C 抗体导致交叉配血不合临床分析[J]. 临床血液学杂志, 2019,32(12):918-921.
- [2] 桂嵘,张志昇,王勇军. 输血相容性检测及疑难病例分析[M]. 北京:人民卫生出版社,2018:30.
- [3] Skov F, Hughes-Jones NC. Observations of the number of available C antigen sites on red cells[J]. Vox Sang, 1977,33:170-174.
- [4] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M], 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015:118-137.
- [5] 杨红梅,邹昕,郑皆炜,等. 抗-cE 及抗-Jkb 和抗-Mur 混合抗体致疑难配血分析—附 1 例报告[J]. 中国输血杂志,2020,33(1):70-72.
- [6] Jajosky RP, Lumm WC, Wise SC, et al. A suspected delayed hemolytic transfusion reaction mediated by anti-Jka[J]. Immunohematology, 2017,33(2):73-75.
- [7] 王德平,何卫社,刘乐霞. 多次流产致 IgG 抗-E、抗-Jka 引起配血不合结果分析[J]. 临床输血与检验, 2018,20(6):670-671.
- [8] 毛娟,褚晓月,左琴琴,等. IgG-Jka 联合 IgG-cE、IgG-Fyb 抗体鉴定及输血策略分析[J]. 中国输血杂志, 2019,32(8):811-813.
- [9] 姚韵,许进明,赵凌,等. D 变异型受血者产生同种抗-D 合并抗-E 及抗-C 抗体 1 例[J]. 临床血液学杂志, 2020,33(2):140-142.
- [10] 刘世佳,张勇萍,杨世明,等. IgM 抗 Lea、抗 P1 抗体联合 IgG 抗 E 抗体的血清学检测分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021,37(10):932-935.
(收稿日期:2022-05-23 修回日期:2022-06-27)
- (上接第 891 页)
- [11] Foxcroft ZK, Schlebusch CM. Human Platelet Antigen(Hpa) 1-5 And-15 Frequencies In South African Blood Donors [J]. Africa Sanguine, 2008, 11 (1):15-18.
- [12] 薛敏,潘芹芹,樊甦,等. 已知 HLA 单采血小板供者资料库库容估计[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27 (1):266-271.
- [13] Bennett JA, Palmer LJ, Musk AW, et al. Gene frequencies of human platelet antigens 1-5 in indigenous Australians in Western Australia[J]. Transfus Med, 2002,12(3):199-203.
- [14] 刘瑛,许先国,马开荣,等. HLA I 基因型配合输注策略用于免疫性血小板输注无效的实验研究[J]. 中国输血杂志, 2021,34(8):832-835.
- [15] 王晓伟,邵春燕,张菁,等. 北京地区 HPA1-6,15 基因库的建立与应用[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28 (1):296-299.
- [16] Seike K, Fujii N, Asano N, et al. Efficacy of HLA virtual cross-matched platelet transfusions for platelet transfusion refractoriness in hematopoietic stem cell transplantation [J]. Transfusion, 2020, 60 (3):473-478.
(收稿日期:2022-05-09 修回日期:2022-07-04)