

岳阳汉族人群 HPA-1~6,15,21 多态性研究

黄志翔 易玲 谭涛 向雅香

(岳阳市中心血站 湖南 岳阳 414000)

摘要: 目的 研究岳阳汉族人群人类血小板抗原 HPA-1~6,15,21 基因多态性。方法 采用 PCR-SSP 方法对 374 名血小板固定捐献志愿者进行血小板抗原 HPA-1~6,15,21 系统基因分型,直接计算基因频率,采用统计学方法研究基因多态性。结果 HPA-3、HPA-15 系统基因表现型 ab 频率高于 aa, HPA-1、HPA-2、HPA-4、HPA-5、HPA-6、HPA-21 系统基因表现型以 aa 为主, HPA-15、HPA-3 抗原不配合率最高。结论 岳阳汉族人群 HPA 分布具有多态性, HPA-2、HPA-3、HPA-5、HPA-15 基因分布与国内其他地区汉族人群存在差异性。

关键词: 人类血小板抗原; 基因型; 基因多态性; PCR-SSP

Abstract Objective:To study the gene polymorphism of human platelet antigen (HPA) in Yueyang Han population. **Method:** The platelet antigen HPA-1~6,15,21 system genotyping was performed in 374 volunteers with regular platelet donation by PCR-SSP. The gene frequency was calculated directly and the gene polymorphism was figured up by statistical method. **Result:** The frequency of gene phenotype ab in HPA-3,15 system was higher than aa, while aa was the main gene phenotype of HPA-1,HPA-2,HPA-4,HPA-5,HPA-6,HPA-21. Compared with other regions, HPA-15 and HPA-3 antigen mismatch rate was the highest. **Conclusion:** The distribution of HPA in Yueyang Han population was obviously polymorphic, which HPA-2、HPA-3、HPA-5、HPA-15 genotypes are different in other areas of China.

Key words: HPA; genotype; genes polymorphism; PCR-SSP

人类血小板抗原 (human platelet antigen, HPA) 是位于血小板膜糖蛋白上、由血小板特有的抗原决定簇组成,表现血小板独特的遗传多态性,研究已发现 HPA 多态性分布与不同人种和地域有关^[1]。因此,了解不同地域人群 HPA 多态性分布,对指导临床精准输注血小板、避免血小板输注无效具有重要意义。我们采用聚合酶链反应核苷酸特异性引物技术 (PCR-SSP) 方法,研究了岳阳地区 374 名血小板固定捐献志愿者血小板抗原 HPA-1~6,15,21 系统基因多态性特点。

1 材料与与方法

1.1 研究对象 我站血小板固定捐献志愿者 374 名,每年捐献血小板 3 次以上,籍贯岳阳地区,均为汉族,男性 215 名、女性 159 名,年龄 18~50 岁,签署知情同意书和应急捐血同意书,留取 EDTA 抗凝全血 5ml/人。

1.2 试剂与仪器 人类血小板同种抗原 HPA1~6,15,21 基因分型试剂盒 (P20191009,天津基诺泰普公司),DNA 提取试剂盒 (R6903,北京天根生化公司),PCR 仪 (GeneAmp 9700,美国 ABI 公司),凝胶电泳仪 (JY300C,北京君意东方电泳设备有限公司),紫外分析仪 (JY02S,北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.3 DNA 提取 取 0.3ml EDTA 抗凝全血,按 DNA 提取试剂盒操作说明书操作, DNA 浓度 30~80ng/ul,纯度 A_{260}/A_{280} 比值 =1.6~1.8。

1.4 HPA 基因分型 应用 HPA1~6,15,21 基因分型试剂盒,采用 PCR-SSP 方法对 8 个抗原系统 16 个等位基因进行基因分型,操作按试剂和仪器说明书进行。PCR 扩增条件为: 96℃ 3min; 96℃ 25s, 68℃ 45s, 72℃ 30s, 5 个循环; 96℃ 25s, 61℃ 45s, 72℃ 30s, 22 个循环; 96℃、20s, 55℃ 45s, 72℃ 60s, 8 个循环; 72℃ 延伸 3min, 降温至 4℃ 保存。将 PCR 反应产物 8ul 转移到 2.5% 琼脂糖凝胶孔中,

140~150V 电泳 10~15 分钟 (内参质控带与阳性分型带清晰分开时即停止电泳),紫外凝胶成像系统下观察结果并拍摄成像,保存试验结果。对照孔物引位图判读基因分型结果。

1.5 统计学分析 直接计算等位基因频率和表型频率。HPA 抗原不配合率采用公式 $P=2ab(1-ab)$ (a, b 为等位基因频率) 计算,并进行 Hardy-Weinberg (H-W) 平衡检验^[2]。不同地区人群 HPA-1~6,15,21 基因频率差异采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 岳阳地区汉族人群 HPA-1~6,15,21 基因分型结果 374 名血小板固定捐献志愿者 HPA-1~6,15,21 基因分型电泳图见图 1,同时检测到 a,b 等位基因,各等位基因频率分别为 1a 0.9880、1b 0.0120、2a 0.9599、2b 0.0401、3a 0.6043、3b 0.3957、4a 0.9987、4b 0.0013、5a 0.9947、5b 0.0053、6a 0.9866、6b 0.0134、15a 0.4479、15b 0.5521、21a 0.9933、21b 0.0067。各等位基因不配合率从高到底分别为 HPA-15: 0.3723、HPA-3: 0.3639、HPA-2: 0.0740、HPA-6: 0.0261、HPA-1: 0.0234、HPA-21: 0.0132、HPA-5: 0.0105、HPA-4: 0.0026。Hardy-Weinberg 平衡检验, HPA-1~6,15,21 的 $P>0.05$,符合 H-W 平衡,结果见表 1。

图 1 岳阳地区汉族人群 HPA1~6,15,21 基因分型电泳图

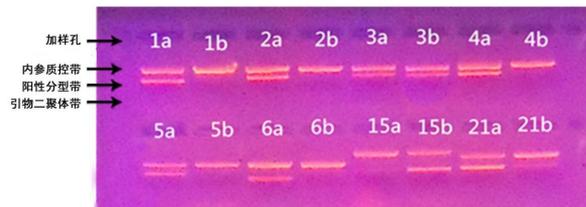


表 1 岳阳地区汉族人群血小板固定捐献志愿者 HPA1~6,15,21 基因型和等位基因频率分布

| HPA 系统 | 表现型 | 观察值 | 频率 | 期望值 | Hardy-Weinberg 吻合度检验 | | 基因频率 | | 抗原不配合率 |
|--------|-----|-----|--------|--------|----------------------|-------|------|--------|--------|
| | | | | | χ^2 | P | 基因型 | 频率 | |
| HPA1 | aa | 365 | 0.9759 | 365.08 | 0.0519 | >0.05 | 1a | 0.9880 | 0.0234 |
| | ab | 9 | 0.0241 | 8.87 | | | 1b | 0.0120 | |
| | bb | 0 | 0 | 0.05 | | | | | |
| HPA2 | aa | 345 | 0.9225 | 344.61 | 0.2888 | >0.05 | 2a | 0.9599 | 0.0740 |
| | ab | 28 | 0.0749 | 28.79 | | | 2b | 0.0401 | |
| | bb | 1 | 0.0027 | 0.60 | | | | | |
| HPA3 | aa | 143 | 0.3824 | 136.58 | 1.9323 | >0.05 | 3a | 0.6043 | 0.3639 |
| | ab | 166 | 0.4439 | 178.86 | | | 3b | 0.3957 | |
| | bb | 65 | 0.1738 | 58.57 | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|-------|----|-----|--------|--------|---------|-------|-----|--------|--------|
| HPA4 | aa | 373 | 0.9973 | 373.03 | 0.0015 | >0.05 | 4a | 0.9987 | 0.0026 |
| | ab | 1 | 0.0027 | 0.9711 | | | 4b | 0.0013 | |
| | bb | 0 | 0 | 0.0006 | | | | | |
| HPA5 | aa | 371 | 0.9920 | 370.05 | 98.9677 | >0.05 | 5a | 0.9947 | 0.0105 |
| | ab | 2 | 0.0053 | 3.94 | | | 5b | 0.0053 | |
| | bb | 1 | 0.0027 | 0.01 | | | | | |
| HPA6 | aa | 364 | 0.9733 | 364.04 | 0.0712 | >0.05 | 6a | 0.9866 | 0.0261 |
| | ab | 10 | 0.0267 | 9.89 | | | 6b | 0.0134 | |
| | bb | 0 | 0 | 0.07 | | | | | |
| HPA15 | aa | 79 | 0.2112 | 75.03 | 0.6938 | >0.05 | 15a | 0.4479 | 0.3723 |
| | ab | 177 | 0.4733 | 184.97 | | | 15b | 0.5521 | |
| | bb | 118 | 0.3155 | 114.00 | | | | | |
| HPA21 | aa | 369 | 0.9866 | 369.00 | 0.0201 | >0.05 | 21a | 0.9933 | 0.0132 |
| | ab | 5 | 0.0134 | 4.98 | | | 21b | 0.0067 | |
| | bb | 0 | 0 | 0.02 | | | | | |

2.2 岳阳地区汉族人群 HPA-1~6,15,21 基因分布与不同地区汉族人群比较。岳阳地区汉族人群 HPA-1~6,15,21 基因分布与石家庄汉族人群^[34]、南京汉族人群^[5]、广州人群^[67]、南昌人群^[8]、吉林汉族人群^[9]、河南汉族人群^[10]、山东汉族人群^[11]、长沙汉族人群^[12]、黑龙江汉族人群^[13]比较, HPA-2 基因分布与南京人群 ($\chi^2=5.5720$, $P=0.0183$) 和广州人群 ($\chi^2=21.6100$, $P<0.0001$) 有差异; HPA-3 基因分布与石家庄人群有差异 ($\chi^2=8.7480$, $P=0.0031$); HPA-5 基

因分布与南京人群 ($\chi^2=5.1760$, $P=0.0229$) 和黑龙江人群 ($\chi^2=5.7300$, $P<0.0167$) 有差异; HPA-15 基因分布差异最大, 与石家庄人群 ($\chi^2=9.2220$, $P=0.0024$)、广州人群 ($\chi^2=8.8610$, $P=0.0029$)、南昌人群 ($\chi^2=5.7900$, $P=0.0161$)、吉林人群 ($\chi^2=4.6890$, $P=0.0304$)、山东人群 ($\chi^2=10.7200$, $P=0.0011$)、长沙人群 ($\chi^2=6.9580$, $P=0.0083$) 均存在差异。HPA-1、HPA-4、HPA-6、HPA-21 基因分布与其他地区人群比较无统计学差异。

表 2 岳阳地区汉族人群 HPA-1~6,15,21 等位基因分布频率与不同地区人群比较

| HPA | 岳阳 (n=374) | 石家庄 (n=3591) | 南京 (n=300) | 广州 (n=500) | 南昌 (n=158) | 吉林 (n=419) | 河南 (n=160) | 山东 (n=962) | 长沙 (n=618) | 黑龙江 (n=123) |
|-----|---------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 1a | 0.9880 | 0.9914 | 1.000 | 0.9980 | 1.0000 | 0.9920 | 0.9875 | 0.9918 | 0.9930 | 0.9878 |
| 1b | 0.0120 | 0.0086 | 0 | 0.0020 | 0 | 0.0080 | 0.0125 | 0.0082 | 0.0070 | 0.0122 |
| 2a | 0.9599 | 0.9445 | 0.9183 | 0.9985 | 0.9557 | 0.9340 | 0.9469 | 0.9419 | 0.9680 | 0.9594 |
| 2b | 0.0401 | 0.0555 | 0.0817 | 0.1500 | 0.0443 | 0.0660 | 0.0531 | 0.0592 | 0.0320 | 0.0407 |
| 3a | 0.6043 | 0.5242 | 0.6100 | 0.5630 | 0.5601 | 0.5920 | 0.5906 | 0.5841 | 0.5870 | 0.6829 |
| 3b | 0.3957 | 0.4758 | 0.3900 | 0.4370 | 0.4399 | 0.4080 | 0.4094 | 0.4174 | 0.4130 | 0.3171 |
| 4a | 0.9987 | 0.9981 | 1.0000 | 0.9990 | 0.9968 | 0.9960 | 0.9969 | 0.9969 | 0.9940 | 1.0000 |
| 4b | 0.0013 | 0.0019 | 0 | 0.0010 | 0.0032 | 0.0040 | 0.0031 | 0.0031 | 0.0060 | 0 |
| 5a | 0.9947 | 0.9962 | 0.9733 | 0.9880 | 0.9778 | 0.9980 | 0.9906 | 0.9892 | 0.9890 | 0.9715 |
| 5b | 0.0053 | 0.0038 | 0.0267 | 0.0120 | 0.0222 | 0.0020 | 0.0094 | 0.0108 | 0.0110 | 0.0285 |
| 6a | 0.9866 | 0.9868 | 0.9883 | 0.9860 | 0.9842 | 0.9920 | 0.9812 | 0.9835 | 0.9890 | 0.9837 |
| 6b | 0.0134 | 0.0132 | 0.0117 | 0.0140 | 0.0158 | 0.0080 | 0.0188 | 0.0175 | 0.0110 | 0.0163 |
| 15a | 0.4479 | 0.5315 | 0.5250 | 0.5510 | 0.5063 | 0.5640 | 0.5406 | 0.5488 | 0.5360 | 0.4796 |
| 15b | 0.5521 | 0.4685 | 0.4750 | 0.4490 | 0.4937 | 0.4360 | 0.4594 | 0.4512 | 0.4640 | 0.5204 |
| 21a | 0.9933 | 0.9913 | | 0.9950 | | | | | | |
| 21b | 0.0067 | 0.0087 | | 0.0050 | | | | | | |

3 讨论

近年来,随着输血技术研究的深入,成分输血得到了大力推广和应用,机采血小板已成为治疗各种因血小板减少和功能障碍引起出血性疾病的重要血液成分。但是由于 HPA 遗传多态性, HPA 基因分布在不同种族、不同地区的人群中分布存在差异性,在临床血小板随机输注中,HPA 抗原引起同种免疫的风险表现出一定的地域特征,在再次或多次输注血小板时易发生血小板输注无效、输血后紫癜、新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜等疾病^[14]。因此,了解一个地区人群 HPA 基因多态性分布特点,对指导临床精准输注血小板具有重要意义。本研究采用 PCR-SSP 方法对岳阳地区 374 名血小板固定捐献志愿者 HPA-1~6,15,21 基因分型并进行基因多态性研究,初步掌握了本地区 HPA 基因多态性及分布特征,HPA-3、HPA-15 系统基因表现型 ab 频率高于 aa, HPA-1、HPA-2、HPA-4、HPA-5、HPA-6、HPA-21 系统基因表现型以 aa 为主, HPA-15、HPA-3 不配合率最高,在临床血小板输注中应特别重视。而对于研究较少的 HPA-21 系统, HPA-21b 基因频率为 0.67%,随机输血其不配合率为 0.0132,在临床血小板输注中也不能忽视。H-W 平衡检验发现, HPA-1~6,15,21 基因分布不符合 H-W 平衡规律。岳阳地区人群 HPA-1~6,15,21 基因多态性与国内其他地区人群比较,

HPA-2、HPA-3、HPA-5、HPA-15 基因分布存在统计学意义,具有本地区多态性分布特点,这与岳阳自古水陆交通便利、人口迁徙较大的遗传背景有关。

目前,临床血小板输注为随机输注,大多未进行 HPA 基因检测,HPA 基因多态性特点易产生血小板同种抗体,再次或多次输血后易发生输血不良反应。随着输血技术的发展,如何使临床精准输血、最大限度的避免免疫性输血不良反应,从而达到科学合理、效果更好是输血技术研究的重要方向^[15]。对固定献血者检测 HPA 系统基因、建立献血者 HPA 基因信息库,对配合型血小板输注具有重要临床意义。本研究初步建立了岳阳地区血小板志愿捐献者 HPA 基因信息库,对保证本地区血小板的精准输注发挥了重要作用。

基金项目:岳阳市指导性科技计划项目(项目编号:岳市科发[2020]20号)

参考文献

- [1]李勇,李一.实用血小板免疫生物学[M].北京:科学出版社,2013:280-285.
- [2]赵柯茂.人类血型遗传学[M].北京:科学出版社,1987:351-353.
- [3]李茵,苏蔓,何路军,等.石家庄汉族血小板捐献者 HPA1-17 基

(下转第 12 页)

- (上接第 10 页)
- 因多态性研究[J].中国输血杂志,2019,32(5):427-429.
- [4]胡光磊,苏蔓,张泓楠,等.石家庄汉族血小板捐献者 HPA-18~21 基因多态性研究[J].临床血液学杂志,2019,32(10):747-750.
- [5]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):1235-1239.
- [6]陈扬凯,叶欣,夏文杰,等.血小板特异性基因(HPA-1~17)在广州地区人群中分布的多态性研究[J].中国免疫学杂志,2010,26(8):699-702.
- [7]周豪杰,汪传喜,聂咏梅.广州地区汉族献血人群 HPA-21 多态性调查[J].中国输血杂志,2013,26(8):705-707.
- [8]张晓丽,杜忻.南昌地区无偿献血者血小板基因频率调查分析[J].实验与检验医学,2017,35(6):882-885.
- [9]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.
- [10]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.
- [11]刘艳,朱海峰,乔文本,等.山东汉族人群血小板抗原基因多态性分析[J].中国实验血液学杂志,2020,28(6):2066-2070.
- [12]张刚,曹丽群,谢毓滨,等.长沙地区汉族人血小板抗原(HPA1-17)基因多态性调查[J].中国实验诊断学,2013,17(2):331-333.
- [13]颜廷宇,李鑫,丁鏊,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.
- [14]胡丽华,王学锋,阎石.临床输血学检验技术[M].北京:人民卫生出版社,2016:72-79.
- [15]杨丹波,陈明拓,刘陵,等.中国血液产品自给自足的挑战与策略[J].中国输血杂志,2014,27(11):1096.
- 作者简介:黄志翔(1983.08-),主管技师,主要从事血型参比和血液检测工作,