

广西地区壮族 瑶族人群人类血小板抗原基因的多态性分析<sup>\*</sup>

杨 兰, 梁秀云, 曾江辉(广西医科大学第三附属医院暨南宁市第二人民医院检验科 530031)

**【摘要】 目的** 研究广西地区壮族、瑶族人群人类血小板抗原(HPA)1~17bw 基因的表达差异。**方法** 采用序列特异引物-聚合酶链反应(PCR-SSP)方法对广西地区 100 例壮族和 100 例瑶族健康个体进行 HPA 1~17bw 系统基因分型,比较壮族和瑶族的 HPA 基因频率。**结果** 等位基因 a 是广西地区壮族、瑶族健康个体主要的 HPA1~17bw 基因型别。在 H-W 平衡检验中,瑶族健康人群 HPA1~17bw 基因多态性中除 HPA1、2、6 外,其他均符合 H-W 群体遗传平衡法则( $P>0.05$ );壮族健康个体中,所有 HPA 各系统符合 H-W 群体遗传平衡法则( $P>0.05$ )。瑶族和壮族 HPA 系统抗原不配合率分析中,HPA3 和 HPA15 不配合率最高,皆超过 30%。比较两个民族的基因频率,发现瑶族的 HPA-3 和 HPA-15 的基因多态性明显低于壮族( $\chi^2=12.242, P=0.002$ ;  $\chi^2=6.209, P=0.045$ )。**结论** 广西地区壮族和瑶族 HPA 基因多态性分布存在明显的种族差异,特别是 HPA-3 和 HPA-15 系统杂合度最高,抗原分布不配合比例相对高,在临床配合性血小板输注中必须加以重视。

**【关键词】** 壮族; 瑶族; 人类血小板抗原; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.20.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)20-2644-02

Human platelet antigen gene polymorphism analysis in Yao and Zhuang nationality in Guangxi<sup>\*</sup> YANG Lan, LIANG Xiu-yun, ZENG Jiang-hui (Department of Laboratory, the Third Hospital of Guangxi Medical University/Nanning Second People's Hospital, Nanning, Guangxi 530031, China)

**【Abstract】 Objective** To analyze the expression difference of human platelet antigen(HPA) 1-17bw gene between Yao and Zhuang nationality in Guangxi. **Methods** Genotyping of HPA 1-17bw system of 100 cases of Yao nationality and 100 cases of Zhuang nationality were conducted by using PCR-SSP, and genotype and gene frequency were calculated. **Results** The alleles a was the common genotype of HPA 1-17bw gene in Zhuang and Yao nationality of Guangxi. H-W population genetic equilibrium test indicated that, in Yao nationality, most gene polymorphisms of HPA 1-17bw gene, excepting HPA1, 2 and 6 gene polymorphisms, were conformable to H-W population genetic equilibrium law ( $P>0.05$ ), and in Zhuang nationality, all HPA system were conformable to H-W rule ( $P>0.05$ ). Among all HPA system, the mismatch rates of HPA3 and HPA15 were the highest, more than 30%, between Yao and Zhuang nationality. Comparison of gene frequencies between the two groups indicated that the gene polymorphisms of HPA3 and HPA15 in Yao nationality were lower than Zhuang nationality ( $\chi^2=12.242, P=0.002$ ;  $\chi^2=6.209, P=0.045$ ). **Conclusion** There could be significant ethnic difference of HPA gene polymorphism between Zhuang and Yao nationality in Guangxi. The distribution of HPA3 and HPA15 gene frequency could be polymorphous, and should be paid more attention in matched platelet transfusion in clinic.

**【Key words】** Zhuang nationality; Yao nationality; human platelet antigen; polymorphism

人类血小板抗原(HPA)多态性可导致血小板输注无效、输血后紫癜、免疫性血小板减少症等情况。而 HPA 的基因多态性具有地域和民族差异性,是遗传标志之一。广西地区居住着 25 个少数民族,研究广西地区最大的两个少数民族(壮族和瑶族)的 HPA 基因多态性,对指导临床血小板的输注和研究某些疾病易感性具有重要意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 100 例广西瑶族和 100 例广西壮族健康个体纳入研究。其中,壮族:男 59 例,女 41 例,年龄 3~75 岁,平均 48.3 岁;瑶族:男 62 例,女 38 例,年龄 5~71 岁,平均 46.9 岁。入选标准:(1)居住在广西瑶族主要分布区的瑶族个体或壮族主要分布区的壮族个体;(2)三代中未有与外族通婚的瑶族家族或壮族家族,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。两组研究对象在年龄和性

别上差异无统计学意义( $P>0.05$ )。采样过程遵循知情同意原则,通过询问确保样本间无血缘关系。所有研究对象取静脉血 2 mL,加入乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,充分混匀。

**1.2 主要仪器和试剂** 9700 扩增仪(美国 ABI 公司);人类血小板抗原 HPA 1~17 基因分型试剂盒(中国江阴力通生命科技公司);低温高速离心机(美国 Beckman 公司);凝胶成像仪(珠海黑马生物公司)。

**1.3 DNA 制备** 应用深圳益生堂生物有限公司人类基因组 DNA 抽提试剂盒,采用离心柱法取 250  $\mu$ L EDTA 抗凝外周血,按说明书操作,最后将 DNA 溶于 TE 缓冲液, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.4 序列特异引物-聚合酶链反应(PCR-SSP)** (1)反应体系:PCR 在 15  $\mu$ L 总体积中进行,每孔反应体系内含 6  $\mu$ L PCR 混合反应液(含 dNTP、buffer)、Taq 酶(5 U/ $\mu$ L)0.06  $\mu$ L、无菌水 7.44  $\mu$ L 和 DNA 模板 1.5  $\mu$ L,充分混合。(2)扩增条件:

<sup>\*</sup> 基金项目:广西壮族自洽区南宁市科学研究与技术开发计划项目(201106032C)。

96 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 25 s,65 ℃ 50 s,72 ℃ 30 s,循环 5 次;95 ℃ 30 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 30 s,循环 30 次;最后 72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。(3)扩增产物电泳:取 7 μL 扩增产物,在 20 g/L 琼脂糖凝胶上点样,电压 100 V,电泳 30 min,自动凝胶图像分析仪下观察电泳结果。(4)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。

1.5 单基因测序 委托上海申工生物有限公司完成。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 进行数据处理,对每个 HPA 系统的 1 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)。壮族和瑶族 HPA1~17bw 基因频率分布的差异,采用  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 广西地区 100 例瑶族个体和 100 例壮族个体 HPA 基因分型结果见表 1。基因型别 a 是两个民族 HPA1~17bw 的主要型别,瑶族健康个体 HPA1~17bw 基因多态性中,具有最高杂合度的是 HPA15,其次是 HPA3。经 H-W 平衡检验,比较观察值和期望值,除了 HPA1、2、6,其他 HPA 各系统差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),符合 H-W 群体遗传平衡法则。壮族健康个体 HPA1~17bw 基因多态性中,具有最高杂合度的是 HPA15,其次是 HPA3。经 H-W 平衡检验,比较观察值和期望值,所以 HPA 各系统差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),符合 H-W 群体遗传平衡法则。

表 1 广西瑶族、壮族健康人群 HPA1-17bw 的基因检测结果

| HPA 基因 | 壮族(n=100) |    |    |       |       | H-W 值 P | MP    | 瑶族(n=100) |    |    |       |       | H-W 值 P | MP    |
|--------|-----------|----|----|-------|-------|---------|-------|-----------|----|----|-------|-------|---------|-------|
|        | aa        | ab | bb | a     | b     |         |       | aa        | ab | bb | a     | b     |         |       |
| 1      | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 97        | 2  | 1  | 0.98  | 0.02  | 0.000   | 0.038 |
| 2      | 98        | 2  | 0  | 0.990 | 0.010 | 0.919   | 0.020 | 96        | 3  | 1  | 0.975 | 0.025 | 0.000   | 0.048 |
| 3      | 22        | 48 | 30 | 0.460 | 0.540 | 0.735   | 0.373 | 42        | 44 | 14 | 0.640 | 0.360 | 0.652   | 0.355 |
| 4      | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 5      | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 6      | 98        | 2  | 0  | 0.990 | 0.010 | 0.919   | 0.020 | 96        | 3  | 1  | 0.975 | 0.025 | 0.000   | 0.048 |
| 7w     | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 8w     | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 9w     | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 10w    | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 11w    | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 12w    | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 13w    | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 14w    | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 15     | 25        | 55 | 20 | 0.525 | 0.475 | 0.414   | 0.374 | 40        | 39 | 21 | 0.595 | 0.405 | 0.056   | 0.366 |
| 16w    | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |
| 17w    | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       | 100       | 0  | 0  | 1     | 0     |         |       |

2.2 广西壮族和瑶族 HPA1~17bw 基因多态性的比较 使用  $\chi^2$  检验比较壮族和瑶族人群中 HPA1~17bw 基因多态性分布,发现瑶族的 HPA-3 基因杂合程度明显低于壮族基因频率,差异有统计学意义( $\chi^2=12.242,P=0.002$ );瑶族 HPA-15a 基因杂合程度也显著低于壮族的 HPA-15 基因多系统,差异具有统计学意义( $\chi^2=6.209,P=0.045$ )。

3 讨 论

HPA 是存在于血小板糖蛋白上的一类特异性抗原,是血小板最重要的抗原之一。至今使用血清学方法已检出 24 个血小板抗原,其中有 22 个抗原已被血小板命名委员会正式命名,分布在糖蛋白 GP I a(HPA5、13)、GP I bα(HPA2)、GP I bβ(HPA12)、GP II b(HPA3、9)和 GP III a(HPA1、4、6、7、8、10、11、14、16)和 CD109(HPA15)上<sup>[1-2]</sup>。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,且存在种族、地区差异<sup>[3]</sup>;其多态性除 HPA14bw 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<sup>[4]</sup>。

作者采用 PCR-SSP 方法检测广西地区壮族和瑶族健康人

群 HPA1~17bw 基因多态性,发现 HPA3、15 是 HPA 基因多态性中杂合程度最高的,这与国内其他地区的研究结果一致<sup>[4-5]</sup>,是外源性血小板输注有效性及安全性最重要的 HPA 系统<sup>[6]</sup>。HPA1、2、6 基因壮族和瑶族人群均有表达,但杂合程度不高,主要以 a 基因型别为主。分析广西地区瑶族、壮族健康人群血小板系统的基因频率,发现瑶族人群中的 HPA3、15 基因杂合程度明显低于壮族的,差异有统计学意义,表明两民族间的 HPA3、15 基因多态性具有民族差异性,临床血小板输注时应高度重视。在随机血小板输注中,不配合概率的高低,反映了抗原在输血治疗时刺激宿主免疫系统产生血小板同种抗体概率的大小。本研究中广西地区壮族和瑶族 HPA 基因频率分布结果均显示,HPA3、15 是对于血小板同种免疫反应发生最有意义的 HPA 系统,其不配合率均高达 30% 以上,表明 HPA3、15 在两个民族人群中存在重要意义。但其他 HPA 系统不配合率均小于 2%,与邓燕玲等<sup>[7]</sup>研究不一致。

综上所述,HPA 基因在广西地区最大的两个民族间存在差异,因此建立一个血小板基因库,为临床输注成分血小板的患者提供配型相合的成分血小板,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。(下转第 2647 页)

表 1 胰腺癌肿瘤标志物在氩氦刀冷冻手术前的表达与Ⅳ期生存期比较(±s)

| 项目           | 正常均值      | Ⅳ期生存期(个月) | 异常均值                | Ⅳ期生存期(个月) | P     |
|--------------|-----------|-----------|---------------------|-----------|-------|
| CA19-9(U/mL) | 7.45±7.34 | 6.00±1.67 | 35 299.70±46 078.12 | 5.88±4.81 | >0.05 |
| CEA(ng/mL)   | 2.75±0.91 | 7.87±6.13 | 120.57±427.49       | 5.43±3.42 | <0.01 |

表 2 胰腺癌氩氦刀冷冻手术后肿瘤标志物的变化与Ⅳ期生存期比较

| 项目           | 上升(%)  | Ⅳ期生存期(个月) | 下降(%) | Ⅳ期生存期(个月) | P     |
|--------------|--------|-----------|-------|-----------|-------|
| CA19-9(U/mL) | 92.50  | 8.65±5.71 | 24.80 | 7.07±4.86 | >0.05 |
| CEA(ng/mL)   | 111.97 | 9.67±6.50 | 27.14 | 7.00±4.66 | >0.05 |

3 讨 论

**3.1** 癌胚抗原 CEA 作为细胞表面蛋白,主要形成于胃肠道和胰腺,CA19-9 是胰腺癌的首选肿瘤标志物<sup>[2-3]</sup>。因此本研究探讨此 2 项肿瘤标志物在氩氦刀冷冻治疗晚期胰腺癌时与患者Ⅳ期生存期的关联。

**3.2** 术前 CEA 值正常的病例,平均Ⅳ期生存期(7.87±6.13)个月,CEA 值异常的病例,平均Ⅳ期生存期(5.43±3.42)个月,两者差异有统计学意义( $P<0.01$ )。术前检测 CEA 对手术治疗患者的生存期预测有重要意义。术前 CA19-9 值正常和异常的病例平均Ⅳ期生存期两者差异无统计学意义( $P>0.05$ )。这与中外学者的观点在高水平 CA19-9 提示胰腺癌的生存期明显缩短,术前血清 CA19-9 水平与胰腺癌的预后密切相关有所不同<sup>[4-6]</sup>,证明了本院氩氦刀冷冻术+碘粒子植入治疗晚期胰腺癌患者的良好效果。

**3.3** 术后 CA19-9 值上升的病例和均值下降的病例,Ⅳ期生存期差异无统计学意义( $P>0.05$ );术后 CEA 值上升的病例和下降的病例相比,Ⅳ期生存期差异无统计学意义( $P>0.05$ )。因肿瘤细胞破坏数值可能升高,本院术后抽血检测肿瘤标志物一般在 1 周内,这与国内其他学者的结论手术切除可以引起 CA19-9 下降不同<sup>[7]</sup>;因为手术方法不同,氩氦刀冷冻手术主要作用是引起肿瘤组织的消融,细胞灭活坏死。但在原发灶进行彻底的冷冻手术,肿瘤标志物水平可能降低。术前检测肿瘤标志物一般在 1 周内,因患者个体差异有所不同,本研究收集术前、术后 1~4 周内的数据。

**3.4** 研究总生存期、或以手术日期作为开始观察日期作生存期评价的文章不少,但以转移时间开始计算生存期的不多,作者回顾性研究 72 例晚期胰腺癌病例,50%的病例Ⅳ期生存期大于或等于 6 个月,这要高于文献中位生存期不到 6 个月的报道<sup>[8]</sup>。因病例不足够多,无法探讨不同手术部位肿瘤标志物的表达及变化与生存期的关联,存在局限性。

志谢:陈继斌博士、本院科教部李澧以及本院随访组。

参考文献

[1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2012[J]. CA Cancer J Clin,2009,62(1):10-29.

[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006.

[3] 葛丽卫,郭满盈,罗媛烨. 30 例胰腺癌患者血清 3 种肿瘤标志物联合检测结果分析[J]. 检验医学与临床,2010,7(9):863-876.

[4] Lundin J,Roberts PJ,Kuusela P,et al. Prognostic significance of serum CA 242 in pancreatic cancer. A comparison with CA 19-9[J]. Anticancer Res,1995,15(5B):2181-2186.

[5] 傅德良,倪泉兴,虞先浚,等. 血清肿瘤标志物联合检测在胰腺癌诊治中的作用[J]. 外科理论与实践,2001,6(2):84.

[6] 曾林山,肖卫东,李勇. 胰腺癌血清肿瘤标志物的研究现状[J]. 国际外科学杂志,2010,12(37):840.

[7] 徐近,倪泉兴,傅德良,等. 胰腺癌术后介入化疗作用的探讨[J]. 中国实用外科杂志,2004,5(5):32-34.

[8] 史文昕,赵秋. 221 例胰腺癌早期诊断临床分析[J]. 重庆医学,2007,6(12):1175-1176.

(收稿日期:2013-01-23 修回日期:2013-05-17)

(上接第 2645 页)

参考文献

[1] Metcalfe P,Watkins NA,Ouwehand WH,et al. Nomenclature of human platelet antigens[J]. Vox Sang,2003,85(3):240-245.

[2] Kroll H,Kiefel V,Santoso S. Clinical aspects and typing of platelet alloantigens[J]. Vox Sang,1998,74(Suppl 2):345-354.

[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] 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.

[5] 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析的调查[J]. 热带医学杂志,2012,12(6):757-760.

[6] 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(3):236-239.

[7] 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:2013-03-11 修回日期:2013-04-29)