

DOI: 10.1360/yc-007-0177

中国大陆地区发现一例罕见的血小板抗原 HPA-10bw 等位基因报告

冯明亮¹, 沈彤¹, 黄慧¹, 沈伟¹, 王健莲¹, 刘达庄¹, 赵桐茂²

1. 上海市血液中心, 上海 200051;
2. 美国国立卫生研究院, Bethesda, MD 20892

摘要: 采用序列特异性引物-聚合酶链式反应(PCR-SSP)为基础的人类血小板抗原(HPA)基因分型技术做群体调查, 在 1,000 例受检者中发现 1 例罕见的 HPA-10w(a+b+)杂合子个体, 为了验证分型的可靠性, 使用 PCR 反应特异性扩增 HPA-10 基因片段, 然后测序分析。结果表明, nt263 位 G→A 导致 GPIIIa 糖蛋白第 62 位精氨酸(CGA)→谷氨酰胺(CAA), 产生 HPA-10bw 抗原特异性。在中国人群中检测出 HPA-10bw 低频抗原, 提示在血小板同种免疫引起的新生儿同种免疫血小板减少症(NAIT)、输血后紫癜症(PTP)以及血小板输注无效症(PTR)的诊断中, 该抗原具有临床意义。

关键词: 中国人群; HPA-10bw 抗原; PCR-SSP HPA 基因分型; DNA 测序

Case report of a rare platelet-specific antigen HPA-10bw allele found in Chinese mainland

FENG Ming-Liang¹, SHEN Tong¹, HUANG Hui¹, SHEN Wei¹, WANG Jian-Lian¹,
LIU Da-Zhuang¹, ZHAO Tong-Mao²

1. Shanghai Blood Center, Shanghai 200051, China;
2. National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

Abstract: A total of 1,000 Chinese blood donors were typed for human platelet antigens (HPA) using a sequence specific primers -polymerase chain reaction (PCR-SSP) based HPA genotyping method. An individual with a rare HPA-10w(a+b+) genotype was found. In order to confirm the typing results, a fragment of HPA-10 gene was amplified by PCR and then sequenced. Sequencing data showed that a single G to A substitution at nucleotide 263 occurred, resulting in amino acid change from Arg(CGA) to Gln(CAA) at position 62 of GP_{IIIa} protein. The substitution generated antigenic specificity HPA-10bw. The detection of an HPA-10bw allele in the Chinese population suggests that this rare allele should be considered in platelet alloimmunization, such as neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT), post-transfusion thrombocytopenic purpura (PTP) and post-transfusion refractoriness to platelets (PTR).

Keywords: Chinese population; HPA-10bw antigen; PCR-SSP HPA genotyping; DNA sequencing

收稿日期: 2006-06-01; 修回日期: 2006-07-20

基金项目: 上海市医学重点学科——安全输血(编号: 05 003)及上海市自然科学基金资助课题(编号: 05ZR14107)资助[Supported by Research Project Transfusion Safety (No. 05III003) from the Shanghai Health Bureau and the Grant (No. 05ZR14107) from the Shanghai Natural Science Foundation]

作者简介: 冯明亮(1966—), 男, 上海人, 研究员, 研究方向: 免疫遗传学。Tel: 021-62758027; E-mail: fengml@sh163.net
通讯作者: 刘达庄(1945—), 女, 上海人, 研究员, 研究方向: 免疫血液学。Tel: 021-62758027; E-mail: fengml@sh163.net

人类血小板抗原(human platelet alloantigens, HPA)是由血小板糖蛋白携带的一类特异性抗原,具有单核苷酸多态性(SNP)^[1]。HPA抗原不配合会导致一系列临床同种免疫症状的出现^[2,3],如新生儿同种免疫血小板减少症(NAIT)、输血后紫癜症(PTP)、血小板输注无效症(PTR)等。

HPA-10w抗原位于血小板膜糖蛋白(GP) a上,GP a(CD61)糖蛋白由位于第 17 号染色体长臂上的 *GP3A** 基因所编码,是一个 90 kDa 的单链蛋白^[4]。HPA-10bw 抗原于 1997 年在一例 NAIT 病人家系中被首次检出^[5]。本文报告在中国大陆地区首次检出罕见 HPA-10bw 等位基因携带者 1 例。

1 材料和方法

1.1 DNA 样本来源

调查对象为 1,000 例无关汉族献血者,均知情同意。血样以 EDTA 抗凝,通过 QIAamp 试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)制备基因组 DNA, -30 保存备用。

1.2 PCR-SSP HPA-10w 基因分型

采用 PCR-SSP 技术^[6]检测 HPA-10w 等位基因,根据来自 GenBank 的序列信息和公开序列数据设计引物^[7]合成试剂盒(G&T Biotech, Rockville, USA),见表 1,可以检测 10a 和 10b 两个等位基因。设计一对内对照控制引物 HGHF5'-GCCTTCCCAACCATTCCTTA-3'(nt 893 to 913, GenBank acc. no. M13438)和 HGHR 5'-TCACGGATTCTGTGTGTTTC-3'(nt 1319 to 1298),用以扩增人类生长激素基因的一 429 bp 片段。HPA-10w 基因分型 PCR 产物凝胶电泳格局见图 1,内对照条带为 429 bp,特异性(阳性)条带为 214 bp。

PCR 体系包括 1 μ L DNA 样本(40 ~ 60 ng), 1 μ L 稀释的 *Taq* 聚合酶(0.25 ~ 0.33 单位)和 8 μ L PCR 混合物,共 10 μ L,包括 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L 甲基苯

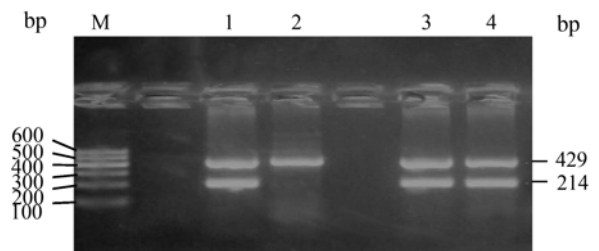


图 1 PCR-SSP HPA-10w 基因分型格局图

M: Marker; 1, 2: HPA-10w(a+b-) 纯合子分型结果; 3, 4: HPA-10w(a+b+) 杂合子分型结果。

Fig. 1 The pattern of HPA-10w genotyped by PCR-SSP

M: Marker; 1, 2: HPA-10w(a+b-) homozygous individuals; 3, 4: HPA-10w(a+b+) heterozygous individuals.

酚红, 0.001% (wt/vol) 明胶, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 μ mol/L 到 2.0 μ mol/L 的正、反向特异性引物, 0.2 μ mol/L 内对照引物。PCR 参数如下: 95 变性 5 min; 然后 30 个 PCR 循环, 每个循环包括 95 变性 30 s, 60 复性 30 s 和 72 延伸 1.5 min; 最后 72 延伸 5 min。PCR 产物通过含溴乙啶 0.5 μ g/mL 的 2% 琼脂糖凝胶电泳和紫外线透视显影法进行分析, 结果见图 1。

1.3 DNA 测序

设计正向引物 5'-GGTAGGGCCTGCAGGAGG-3'; 反向引物 5'-CCTCCTCAGACCTCCACC-3', 扩增 GPIIIa 编码基因完整的 exon 2, 扩增产物 347 bp, 使用 Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) 提纯, 产物电泳图谱见图 2。通过循环测序试剂盒 (BigDye Terminator Cycle Sequencing kit) 在 ABI

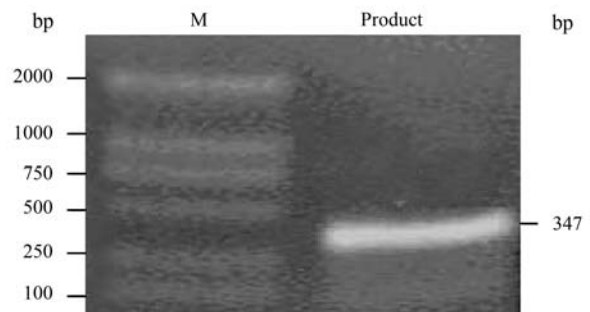


图 2 GPIIIa 编码基因 exon2 扩增产物电泳图

Fig. 2 PCR amplification product of GPIIIa exon 2

表 1 HPA-10w—PCR-SSP 基因分型引物

Table 1 Primers for the genotyping of HPA-10w by PCR-SSP

等位基因 Allele	序列 Sequence	特异引物序列(5'→3') Specific primer sequence(5'→3')	公共引物序列(5'→3') Common primer sequence(5'→3')	SNP	产物(bp) Product (bp)
10a	10aF	CCCAGTGAGTGAGGCCCG	10R ACTGACTCAATCTCGTCACG	263G	214
10b	10bF	TCCCAGTGAGTGAGGCCCA		263A	214

表 2 中国汉族人群 HPA-10w 基因型分布和基因频率

Table 2 The HPA-10w genotype distributions and gene frequencies in Chinese Han

HPA	基因型分布(N=1000) Genotype distributions			基因频率 Gene frequencies			
	aa(%)	ab(%)	bb(%)	χ^2	P*	a	b
HPA-10	999(99.9)	1(0.1)	0(0)	0.0003	>0.97	0.9995	0.0005

*: $P \geq 0.05$ 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡法则。

*: $P \geq 0.05$ The genotype distributions are in Hardy-Weinberg equilibrium.

PRISM 3700 DNA 测序仪(Applied Biosystems, Foster, CA, USA)上进行测序, 测序结果见图 3。

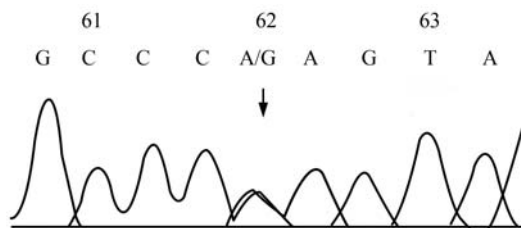


图 3 GPIIIa 编码基因 exon2 扩增产物 DNA 测序图

Fig. 3 DNA sequencing chromatogram of the amplified product of GPIIIa exon 2

2 结果与讨论

在 1,000 例无关汉族献血者的分型过程中发现一例罕见 HPA-10bw 等位基因携带者, 表型为 HPA-10w(a+b+) 杂合子, 其余样本分型结果均为 HPA-10w(a+b-) 纯合子, HPA-10bw 基因频率约为 0.05%(表 2)。该献血员女性, 年龄 55 岁, B 型, Rh 阳性, HLA-A2,11; B13,46。实验中, 用 3 个分别抽提的该样本 DNA 进行 HPA-10w 基因分型, 结果均一致, 为 HPA-10w (a+b+)。

对该女性献血员 GPIIIa 编码基因 exon2 测序结果表明 nt263 位 G→A 导致 GPIIIa 糖蛋白第 62 位精氨酸(CGA)→谷氨酰胺(CAA), 产生 HPA-10bw 抗原特异性, 见图 3。测序结果已在 GenBank 注册, 注册号: DQ454156。

HPA-10bw 等位基因在各人群中出现频率很低。目前世界上关于 HPA-10bw 等位基因的报告共有 2 例。第一例为 Peyruchaud 等^[5]于 1997 年在法国发现, 第二例是由 Lyou 等^[7]于 2002 年在中国台湾地区发现, 但样本未经 DNA 测序证实。本文报告的 HPA-10bw 等位基因, 通过 DNA 测序证实分型结果无误。

综上, 通过对 HPA 抗原频率分布的系统研究, 填补了中国人 HPA 分型资料中的空白。在中国人

群中检测出 HPA-10bw 低频抗原, 提示在血小板同种免疫引起的 NAIT、PTP 以及 PTR 的诊断中, 该抗原具有临床意义。

参考文献(References):

- [1] ZHAO Tong-Mao. Human platelet antigens (HPA). *China J Blood Transfusion*, 2006, 17(2): 129–132.
赵桐茂. 人类血小板抗原(HPA)研究概况. *中国输血杂志*, 2004, 17(2): 129–132.
- [2] Bessos H, Wilson D, Metcalfe P, Allen D, Urbaniak S. Report on the 12th international society of blood transfusion platelet immunology workshop. *Vox Sang*, 2005, 89(2): 105–113. [\[DOI\]](#)
- [3] DENG Zhi-Hui, WU Guo-Guang, LI Da-Cheng. Study on the simultaneous genotyping of human platelet antigens of 1,2,3,4,5,6 system by PCR-SSP and its applications. *Hereditas* (Beijing), 2004, 26(5): 594–598.
邓志辉, 吴国光, 李大成. 人类血小板抗原 1~6 系统同步基因分型的研究. *遗传*, 2004, 26(5): 594–598.
- [4] Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transplant Immunology*, 2002, 10(2): 165–181. [\[DOI\]](#)
- [5] Peyruchaud O, Bourre F, Morel-Kopp MC, Revirion D, Mercier P, Nurden A, Kaplan C. HPA-10wb (La^a): Genetic determination of a new platelet-specific alloantigen on glycoprotein a and its expression in COS-7 cells. *Blood*, 1997, 89(7): 2422–2428.
- [6] FENG Ming-Liang, SHEN Wei, HUANG Hui, WANG Jian-Lian, SHEN Tong, ZHANG Xi, KONG Xiang-Rong, DU Ke-Ming, YANG Jian-Hao, LIU Da-Zhuang. Gene frequencies of the HPA-15(Gov) platelet alloantigen system in Chinese Han population. *China J Blood Transfusion*, 2006, 19(2): 97–99.
冯明亮, 沈伟, 黄慧, 王健莲, 沈彤, 张晰, 孔祥荣, 杜可明, 杨建豪, 刘达庄. 中国汉族人群人类血小板抗原 HPA-15(Gov)多态性调查. *中国输血杂志*, 2006, 19(2): 97–99.
- [7] Lyou JY, Chen YJ, Hu HY, Lin JS, Tzeng CH. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w. *Transfusion*, 2002, 42(8): 1089–1095. [\[DOI\]](#)