

云南佤族人群红细胞抗原多态性调查及生物学意义

张 婵¹, 陈婉璐¹, 程瑜静¹, 李 琦¹, 代 润¹, 宁 君^{2*}

(¹ 云南省第一人民医院, 昆明理工大学附属医院输血科, 云南 昆明 650031; ² 耿马县人民医院输血科, 云南 耿马 677500)

[摘要] 目的: 通过研究云南佤族人群 Rh、Duffy 血型系统抗原表现型的分布、抗原频率与不规则抗体产生几率的关系, 从而为云南少数民族人群血型分布的多态性提供科学依据。同时为该民族群体稀有血型库的建立、组织配型和免疫性输血反应的预防提供科学数据。方法: 采集云南省耿马县 3 代内无血缘关系的佤族人群(男女各 150 例)血样 5 mL(EDTA 抗凝), 采用微柱凝胶法检测 Rh、Duffy 及抗体筛选, Duffy 血型系统基因分型检测采用序列特异引物引导的 PCR 反应(PCR-SSP), 所得结果与当地汉族人群为对照, 作对比分析。结果: 300 例佤族人群中 RhD 阳性率为 99.0%, RhD 阴性率为 1.0%; Duffy 基因分型检测结果: Fy^a 基因频率 0.994 5, Fy^b 基因频率 0.003 5, Fy^{a+b} 检出 1 例; 佤族女性有 5 例抗体筛选检测为阳性, 均为同种抗体(E 抗体), 不规则抗体检出率占女性人群的 3.33%。结论: 云南佤族人群的 Rh、Duffy 血型系统抗原分布状况及抗原分布特征与当地汉族人群基本相符, 但也有本民族的特点, 佤族人群(尤其是妇女)的不规则抗体检出率比当地汉族人群高。

[关键词] Rh; Duffy 血型; 抗体筛选; 抗原分布; 基因频率; 云南佤族

[中图分类号] R392.21

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)03-361-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160322

耿马傣族佤族自治县, 隶属云南省临沧地区, 地处中国西南边陲, 与缅甸山水相连。佤族人口为 458 万, 占全县总人口的 15.5%。本研究通过检测云南省耿马县主要少数民族佤族人群的 Rh、Duffy 血型系统抗原表现型的分布, 计算出表现型频率及基因频率, 同时研究其主要抗原频率与不规则抗体产生几率的关系, 为该民族群体稀有血型库的建立、组织配型和免疫性输血反应的预防提供科学数据^[1]。同时确保输血安全, 为无偿献血工作提供便利, 现报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象

选取耿马县 3 代内无血缘关系的佤族健康人群 300 例, 年龄 18~50 岁, 其中男 150 例、女 150 例。同时采集当地 3 代内无血缘关系的汉族健康人群 300 例, 年龄 18~50 岁, 其中男 150 例、女 150 例, 作为对照。

抗人球蛋白检测卡(批号 20150211, 长春博讯生物科技有限责任公司), Rh 血型检测分型卡及 Duffy 血型系统抗原基因检测试剂盒(批号

20150301, 天津秀鹏生物技术有限公司); 筛选细胞、抗 Fy^a 和抗 Fy^b 标准血清(批号 20150202)、抗体筛选红细胞试剂(批号 20157035)、谱细胞(10 支, 批号 20151020, 上海血液生物医药有限公司); HAMILTON 全自动血型分析仪、KUBOTA 血型血清学专用离心机、Life Express Thermal 扩增仪(杭州 BIOER 公司), Alphalmager 凝胶成像仪(Alphalmager 公司, 美国), ND-100-Spectrop-hotometer DNA 定量分析仪(NanoDrop 公司, 美国), ABI3500DX 基因测序仪(ABI 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 试验方法

采集符合条件的献血者 EDTA 抗凝血标本 5 mL 2 管, 使用试剂盒提取 DNA, -20℃ 保存运送至实验室备用。吸取标本管底部沉积红细胞 1 滴, 用生理盐水洗涤 3 次, 配成 2%~5% 红细胞悬液。按照说明书, 采用微柱凝胶法检测 RhD 血型及抗体筛选, 对 RhD 阴性者仍采用微柱凝胶法进一步明确是否为 Du 型、RhD 阴性、RhD^d 型。采用抗人球蛋白检测卡, 进行 Fy^a、Fy^b 抗原测定, 对检测结果为 Fy^a 阴性的标本, 采用序列特异引物引导的 PCR 反应(PCR-SSP) 作为辅助手段, 准确进行基因分型。按照人类 Duffy 血型系统基因分型检测试剂盒说明书完成, 该试剂盒根据 GenBank 公布的基因序列, 通过针对 FY1 和 FY2 基因背景的不同设计引物, 其中每孔包被人

[基金项目] 云南省教育厅科学研究理工类重点基金(2014Z038)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangchanyzt@163.com

类生长激素(human growth hormone, HGH)的保守片段设计的内参质控品作为内对照。Duffy 血型系统 PCR 循环参数为:96℃ 预变性 2 min;96℃ 20 s, 68℃ 60 s, 5 个循环;96℃ 20 s, 65℃ 45 s, 72℃ 30 s, 10 个循环;96℃ 20 s, 62℃ 45 s, 72℃ 30 s, 15 个循环;最后 72℃ 延长 3 min, 4℃ 保存。PCR 产物经 2.5% 琼脂糖凝胶, 140~150 V 电泳 15~20 min, 自动凝胶图像分析仪成像记录实验结果^[2]。采用卡式法进行不规则抗体初筛, 对不规则抗体初筛结果为阳性的标本使用谱细胞鉴定抗体类型(微柱凝胶法)。

1.2.2 计算血型表现型频率及基因组频率

人群基因频率计算按照 Mourant AE 方法^[3]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS12.0 软件, 数据比较采用 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义, 证实人群基因分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡原则。

2 结果

云南耿马县佤族人群 RhD 血型系统观察值、期望值、基因型、基因频率经 χ^2 检验, 差异无统计学意义($P > 0.05$), D 基因频率 0.961 0, d 基因频率 0.039 0, dd 基因型频率 0.039 0, DD 基因型频率 0.851 0, Dd 基因型频率 0.110 0, 人群基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡原则(表 1)。Rh 血型各表现型的观察值、期望值比较差异无统计学意义($P > 0.05$), D 基因频率 0.961 0, d 基因频率 0.039 0, C 基因频率 0.840 0, c 基因频率 0.160 0, E 基因频率 0.263 3, e 基因频率 0.736 7, 人群基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡原则(表 2)。

表 1 300 例佤族人群 RhD 抗原分布结果

表现型	观察值		期望值	
	例数	频率(%)	例数	频率(%)
RhD(+)	297	99.0	296	98.7
RhD(-)	3	1.0	4	1.3

云南耿马县佤族人群 Duffy 血型系统观察值、期望值、基因型、基因频率经 χ^2 检验, 差异无统计学意义($P > 0.05$), Fy^a 基因频率为 0.994 5, Fy^b 基因频率为 0.003 5, Fy^{E_s} 基因频率为 0.002 0, 人群基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡原则(表 3)。

我们对检出的 Fy^{a+b} 标本采用 PCR-SSP 方法进行了分析, 确为 Fy^{a+b} , 未检测到 Fy^a , 只检测到 Fy^b (图 1)。

300 例佤族人群中 有 5 例女性、1 例男性检测

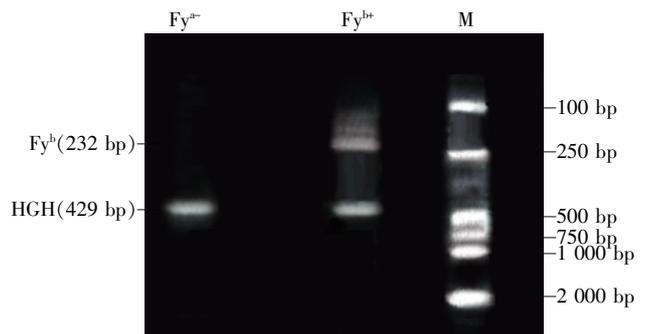
表 2 云南 300 例佤族人群 Rh 血型抗原分布及基因频率

表现型	观察值		期望值	
	例数	频率(%)	例数	频率(%)
CCDee	123	0.410 0	122	0.407 0
CcDee	80	0.266 7	79	0.263 0
CcDEe	43	0.143 3	44	0.146 7
ccDEe	17	0.056 7	18	0.060 0
ccDee	15	0.050 0	15	0.050 0
ccDEE	15	0.050 0	15	0.050 0
Ccdee	2	0.006 7	2	0.006 7
CcDEE	3	0.010 0	3	0.010 0
Ccdee	1	0.003 3	1	0.003 3
CCDEe	1	0.003 3	1	0.003 3

表 3 云南 300 例佤族人群 Duffy 血型抗原分布结果

表现型	观察值		期望值		基因型
	例数	频率(%)	例数	频率(%)	
Fy^{a+b}	37	12.33	40	13.33	Fy^a/Fy^b
Fy^{a-b}	262	87.33	260	86.67	Fy^a/Fy^a
Fy^{a+b}	1	0.33	0	0	Fy^b/Fy^b
Fy^{a-b}	0	0	0	0	Fy/Fy

到不规则抗体, 经谱细胞鉴定 5 例 E 抗体, 1 例 c 抗体, 5 例女性均有妊娠史, 无输血史, 1 例男性(检测到 c 抗体)因消化道出血, 曾有多次输血史。在 300 例当地汉族人群中仅有 1 例女性检测到不规则抗体, 经谱细胞鉴定为 c 抗体, 该名女性有妊娠史, 无输血史。佤族妇女不规则抗体(同种抗体)检出率 3.33%, 高于当地汉族妇女的不规则抗体(同种抗体)检出率 0.67%, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 4)。



Fy^a 和 Fy^b 基因的 PCR 产物长度应为 232 bp, 内对照为 HGh 基因, 扩增产物为 429 bp。

图 1 Duffy 血型 $Fy^{(a+b)}$ 型基因检测分型凝胶成像图

表 4 云南 300 例佤族人群与当地汉族人群不规则抗体检测结果

组别	不规则抗体阳性 [n(%)]	抗体类型
汉族男性(n=150)	0(0)	-
佤族男性(n=150)	1(0.67)	c 抗体
汉族女性(n=150)	1(0.67)	c 抗体
佤族女性(n=150)	5(3.33)*	E 抗体

与汉族女性比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

血型是人类的一种遗传性状,具有多态性和复杂性的特征。当前,人类红细胞血型系统已增加到 33 个,共 270 个抗原,且全部 33 个系统的基因序列也已获知^[4]。人类红细胞抗原由多个位点决定,各个位点具有多个等位基因,这些复等位基因的频率在人群中分布不均^[5]。不同位点上不同复等位基因的随机组合,使群体中个体的基因型多样,红细胞抗原的另一特征是等位基因的共显性关系,每个等位基因都能表达,这就使个体表型具有多样性^[6]。

本研究通过对云南特有少数民族佤族人群的 Rh、Duffy 血型抗原分布进行调查,计算其表现型频率及基因频率,检测被检者 Rh 等血型系统抗原表现型及产生的不规则抗体,进而根据结果分析血型抗原分型在输血前检测中的重要作用,有利于 RhD(-)等稀有血型档案库的建立,可为各医院、血站间血液资源共享提供可靠信息,避免偏型采集造成血液浪费,为动态采集、储存等血源管理提供指导,也将有效提高临床诊治中的输血水平,降低输血过程中免疫性反应发生的频率。

Rh 血型抗原是同种异型抗原,是人类遗传多态性的标志之一。与 ABO 血型系统不同,人血清中不存在抗 Rh 的天然抗体,Rh 血型系统通过输血和妊娠可产生免疫性抗体^[7]。临床上 Rh 血型系统抗原抗体的不相容可致溶血性输血反应、新生儿溶血病以及自身免疫性溶血性贫血^[8]。Rh 血型系统 5 种主要抗原的频率随不同种族差异较大,本研究血清学检测采用微柱凝胶技术,该技术具有操作简便、影响因素少、结果可保存等优点,尤其提高了免疫凝集试验的敏感性,目前已广泛地应用在国内临床免疫检验中,以微柱凝胶技术包含的 5 种基本抗体对云南佤族人群 Rh 系统 D、C、c、E、e 抗原分布进行检测^[9]。结果表明云南耿马县佤族人群 Rh 血型系统观察值、期望值、基因型、基因频率与当地汉族人群比较,差异无统计学意义,人群基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡原则。

同 Rh 血型系统类似,Duffy 血型系统可通过输血和妊娠产生免疫性抗体继而产生严重临床后果^[10]。国际输血协会(ISBT)指定 Duffy 血型系统编号为 008,确定 4 种表型即 Fy^{a+b} 、 Fy^{a+b+} 、 Fy^{a+b-} 、 Fy^{a+b} 。近年来随着研究的深入,大量研究表明 Duffy 血型系统是一种与临床输血、溶血性疾病、新生儿溶血病以及疾病诊断相关的重要血型系统,所产生抗体的主要类型

是 IgG,大多数是 IgG₁,能引起急性和迟缓性输血反应^[11]。Duffy 血型主要包括 2 个主要的抗原 Fy^a 和 Fy^b ,分别是由等位基因 Fy^a 和 Fy^b 所编码,这两个等位基因不同之处在于第 2 外显子 125 位上发生了 G→A 置换;另外还有 1 个重要的等位基因是 Fy^{Es} ,该等位基因是在 Fy^b 等位基因的基础上于启动子-33 位点发生了 T→C 的突变,导致了编码区上游 GATA-1 的转录因子结合位点产生突变,这个突变阻止了 Fy^b 抗原在红细胞上的表达,但没有阻止 Duffy 抗原在其他组织的表达。因此,尽管血清学技术可以很好地检测到 Fy^a 和 Fy^b 抗原,但是由于等位基因 Fy^{Es} 的存在,以基因检测作为辅助手段对 Duffy 血型准确分型^[12],对于扩大供血范围和紧急情况下的输血是很有必要的^[13]。同时,Duffy 血型系统抗原在不同人种、不同地域分布存在差异, Fy 基因在不同人种中差异最大, Fy^{a+b} 在非洲黑人中高达 90%,在白种人中不到 0.1%^[14],因此是一种非常重要的遗传标志,有必要在不同种族间调查其抗原分布状况。本研究表明,云南耿马县佤族人群 Duffy 血型系统观察值、期望值、基因型、基因频率与当地汉族人群比较,差异无统计学意义,人群基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡原则。同时,我们对检出的 Fy^{a+b} 标本采用 PCR-SSP 方法进行了确认分析,确实为 Fy^{a+b} 。

佤族妇女 E 抗体的检出率较高,有 5 例女性检测到不规则抗体,经谱细胞鉴定均为 E 抗体,不规则抗体(同种抗体)检出率 3.33%,高于当地汉族妇女(0.67%),差异有统计学意义。因此,云南省耿马县佤族妇女的同种抗体分布有独特的民族特点。目前,我们在患者输血前常规对 ABO 血型和 Rh 血型系统中 D 抗原进行检测,对其他血型系统未进行常规检测,如果首次输血未考虑到 ABO、Rh 血型以外的血型系统,可能会输注含有不同血型系统阳性抗原的血液,导致机体产生相应抗体,再次输血会增加免疫性输血反应发生的几率。为保障输血安全,减少免疫性输血反应,我们建议当地医疗机构对需要输血治疗的佤族妇女尽量选用 e 抗原血液进行输注。

[参考文献]

- [1] 宋 宁,郑世荣,姚志强,等. 四川地区汉族人群 Kidd 血型系统基因频率调查[J]. 中国输血杂志,2008,21(12): 926-927
- [2] Jungbauer C, Hobel CM, Schwartz DW, et al. High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors [J]. Vox Sang, 2012, 102

- (3):234-242
- [3] 刘忠,方勤. 人类ABO血型基因型检测及其多态性分布的研究[J]. 中国输血杂志,1998,11(4):178-180
- [4] 王振芳,代伟伟,王亚,等. 稀有血型微量检测方法及其临床研究[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(18):3199-3200
- [5] 袁义达,杜若甫. 中国不同人群的红细胞抗原多态性及血型组合[J]. 人类学学报,1985,4(2):182
- [6] 李勇,马学严. 实用血液免疫学血型理论和实验技术[M]. 北京:科学出版社,2006:396-398
- [7] 刘钟瀚,李健,廖耘,等. 成都地区汉族献血者ABO、Rh红细胞血型的分布[J]. 中国输血杂志,2005,18(5):415
- [8] Daniels GL. The molecular genetics of blood group polymorphism[J]. Hum Genet,2009,126(2):729-742
- [9] 徐华,叶世辉,邢荷香,等. 西安地区Rh阴性个体D基因多态性的研究[J]. 中国输血杂志,2010,23(2):124-125
- [10] el-Danasoury AS,Eissa DG,Abdo RM,et al. Red blood cell alloimmunization in transfusion-dependent Egyptian patients with thalassemia in a limited donor exposure program[J]. Transfusion,2012,52(1):43-47
- [11] 许德义,彭明喜,董国飞,等. 250例RH(D)阴性献血者MN、Rh、Kidd、Lewis血型基因频率遗传学多样性分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2009,17(2):31-33
- [12] Kempínska-Podhorodecka A,Knap O,Drozd A,et al. Analysis for genotyping Duffy blood group in inhabitants of Sudan,the Fourth Cataract of the Nile[J]. Malar J,2012,11(4):115
- [13] Yan L,Zhu F,Fu Q,et al. ABO,Rh,MNS,Duffy,Kidd,Yt,Scianna,and Colton blood group systems in indigenous[J]. Chin Immunohematol,2005,21(1):10-14
- [14] 赵桐茂. 人类血型遗传学[M]. 北京:科学出版社,1987:113-115

[收稿日期] 2015-12-14

(上接第344页)

- with vestibular defects[J]. Hum Mol Genet,1999,8(2):361-366
- [6] Gallant E,Francey L,Fetting H,et al. Novel COCH mutation in a family with autosomal dominant late onset sensorineural hearing impairment and tinnitus[J]. Am J Otolaryngol,2013,34(3):230-235
- [7] Kuhlenbäumer G,Hullmann J,Appenzeller S. Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders[J]. Hum Mutat,2011,32(2):144-151
- [8] Rabbani B,Tekin M,Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics[J]. J Hum Genet,2014,59(1):5-15
- [9] Vona B,Müller T,Nanda I,et al. Targeted next-generation sequencing of deafness genes in hearing-impaired individuals uncovers informative mutations[J]. Genet Med,2014,16(12):945-953
- [10] Vozzi D,Morgan A,Vuckovic D,et al. Hereditary hearing loss:a 96 gene targeted sequencing protocol reveals novel alleles in a series of Italian and Qatari patients[J]. Gene,2014,542(2):209-216
- [11] Yang Y,Wu J,Liu H,et al. Two homozygous nonsense mutations of GNPTAB gene in two Chinese families with mucopolidosis II alpha/beta using targeted next-generation sequencing[J]. Genomics,2013,102(3):169-173
- [12] Chen DY,Chai YC,Yang T,et al. Clinical characterization of a novel COCH mutation G87V in a Chinese DFNA9 family[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol,2013,77(10):1711-1715
- [13] Choi BY,Park G,Gim J,et al. Diagnostic application of targeted resequencing for familial nonsyndromic hearing loss[J]. PLoS One,2013,8(8):e68692
- [14] Brownstein Z,Friedman LM,Shahin H,et al. Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in Middle Eastern families[J]. Genome Biol,2011,12(9):R89

[收稿日期] 2015-11-02