

· 临床研究 ·

## Lewis 系统抗体阳性产妇 FUT2/FUT3 基因的多态性分析

曾选\*,王洁,陆瑶,李小燕,赖小丽

江西省妇幼保健院输血科,江西 南昌 330006

**[摘要]** 目的:对 Lewis 血型血清学分型和基因分型结果进行对比分析,分析单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)对 Lewis 血型表型的影响及相关表型的血清抗体。方法:用全自动血型仪采用微柱凝胶法进行抗体筛查和鉴定,使用人类红细胞 Lewis 血型基因分型试剂盒和测序试剂盒依照说明书进行 Lewis 血型血清抗体阳性标本的分型和序列测定。结果:24 例 Lewis 抗体阳性产妇中,抗 Le<sup>a</sup> 19 例,占 79.17%(19/24),抗 Le<sup>b</sup> 5 例,占 20.83%(5/24);基因检测结果和血清学检测结果相符,测序结果显示 FUT2 基因多态性 4 种,分别是 357C>T、385A>T、759C>A、849G>A,检测到 FUT3 基因多态性 6 种,分别是 59T>C、202T>C、314C>T、508G>A、612A>G、1067T>A。FUT2 的 357C>T、385A>T、849G>A 在中国人中比较常见,其中 357C>T 是同义突变,385A>T 突变会导致 FUT2 酶的活性降低至野生型的 20%,849G>A 突变会导致终止密码子提前出现,失去 FUT2 酶的活性。759C>A 突变之前未见报道。6 种 FUT3 基因多态性除 59T>C 突变降低 FUT3 酶的活性外,其余均导致 FUT3 酶活性丧失。结论:SNP 是导致 Lewis 血型系统两种酶活性降低或丧失的主要因素,其编码基因多态性与血清学表型之间有很好的对应关系。

**[关键词]** 产妇;Lewis 血型;血型基因;不规则抗体

**[中图分类号]** R457.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)11-1697-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20201123

1995 年 Rouquier 等<sup>[1]</sup>在第 19 号染色体长臂上定位了控制人类 ABO 血型物质分泌状态的基因座,命名为  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶基因(Alpha-1,2-fucosyltransferase gene, FUT2)。FUT2 基因决定 ABH 血型物质的分泌状态,同时也影响 Lewis 血型的表型<sup>[2]</sup>。两个同源基因 FUT2 和 FUT3 决定 4 种 Lewis 表型,其中 FUT3 基因决定 Lewis 抗原的表达与否,而 FUT2 基因决定 Le<sup>a</sup> 和 Le<sup>b</sup> 抗原多态性。在 I 型前体糖链基础上,通过  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶(即 FUT2 酶,由 FUT2 基因编码,存在于分泌型个体中)作用形成 H 糖链,进一步通过  $\alpha$ -1,3/4-岩藻糖基转移酶(即 FUT3 酶,由 FUT3 基因编码)形成 Le<sup>b</sup> 抗原和红细胞 Le(a-b+) 表型;当 FUT2 酶失活(非分泌型个体)无法形成分泌型 H 糖链时,FUT3 酶直接作用于 I 型前体糖链形成 Le<sup>a</sup> 抗原和红细胞 Le(a+b-) 表型;当 FUT2 酶部分失活(弱分泌型个体)时,则同时形成 Le<sup>a</sup>、Le<sup>b</sup> 抗原和红细胞 Le(a+b+) 表型;当 FUT3

基因变异导致功能性的 FUT3 酶缺陷时,无论个体是否具有功能性的 FUT2 酶,其前体糖链均无法进一步形成 Le<sup>a</sup> 或 Le<sup>b</sup> 抗原,表现为红细胞 Le(a-b-) 表型<sup>[3]</sup>。Lewis 血型系统抗体中抗-Le<sup>a</sup> 较常见,抗-Le<sup>b</sup> 少见,一般是自然发生的,以 IgM 为主,大部分仅室温有反应性,仅有少数溶血性输血反应是由抗-Le<sup>a</sup> 所致,由抗-Le<sup>b</sup> 引起的更加少见。

FUT2 基因有 2 个外显子,外显子 2 是酶作用位点编码基因,外显子长度 1 000 bp 左右,具有单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),基因突变会影响 FUT2 酶的活性,目前已经发现 29 种导致酶活性丧失的突变。FUT2 基因变异具有种族和地域特异性;FUT3 基因有 3 个外显子,外显子 3 是酶作用位点编码基因,目前已经发现 37 种导致 FUT3 酶活性丧失的突变<sup>[4-5]</sup>。

近些年,国内抗体筛查的多中心研究做了很多工作<sup>[6-8]</sup>,但国内关于 Lewis 血型编码基因多态性的研究少见报道。本研究对江西省妇幼保健院 2015 年 11 月—2020 年 3 月产科抗体鉴定为抗 Le<sup>a</sup> 和 Le<sup>b</sup> 的患者 FUT2 和 FUT3 编码基因多态性进行分析,为阐明 Lewis 血型系统抗体产生的分子机制

**[基金项目]** 江西省科技应用研究培育计划(20181BBG78007)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:zengxuan888@163.com

奠定基础。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

回顾性分析2015年11月—2020年3月在江西省妇幼保健医院产科做产前检查或者住院的鉴定为Lewis血型抗体阳性的患者资料,对满足基因检测需求的24例患者样本进行基因检测和测序分析。本研究经医院伦理委员会批准(EC-LW-202001),所有患者知情同意。

抗球蛋白卡(Ortho-Clinical Diagnostics公司,美国);筛选细胞(上海血液生物医药有限责任公司);质控品(北京金豪制药股份有限公司);全自动血型分析仪(强生公司,美国)。核酸提取试剂(批号C011806R0,厦门德必基生物科技有限公司);人类红细胞Lewis血型基因分型试剂盒(荧光PCR法)(批号20190403、20190723),人类红细胞Lewis血型基因测序试剂盒(批号20190607)(江苏中济万泰生物医药有限公司);BigDye(批号1712182)、HIDI(批号1805564)(苏州赛默飞世尔科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血清学试验

使用全自动血型仪对样本采用微柱凝胶法进行不规则抗体筛查,对阳性样本使用谱细胞进行抗体鉴定,依《全国临床检验操作规程》操作。

#### 1.2.2 基因检测及序列分析

核酸提取严格按照试剂盒说明书进行操作,提取物-25℃保存。基因分型严格按照人类红细胞Lewis血型基因分型试剂盒(荧光PCR法)说明书进行操作,样本DNA浓度为40~70 ng/μL,PCR缓冲液160 μL、样本DNA 16 μL,混合离心,加入引物10 μL,封膜,离心。PCR扩增条件:95℃ 20 s,68℃ 1 min;96℃ 20 s,66℃ 50 s,72℃ 45 s,共30个循环;72℃延伸2 min。严格按照人类红细胞Lewis血型基因测序试剂盒说明书进行测序操作,样本DNA浓度为40~70 ng/μL,PCR缓冲液35 μL、样本DNA 3.5 μL,混合离心,加入38 μL引物,盖上盖子离心。PCR扩增条件:96℃ 20 s,68℃ 1 min;96℃ 20 s,65℃ 50 s,72℃ 45 s;96℃ 20 s,62℃ 50 s,72℃ 1 min,共37个循环;72℃延伸2 min,4℃反应终止。回收PCR产物凝胶作为模板,取模板1 μL,测序引物1 μL, Big-Dye 4 μL,加水至20 μL,PCR扩增,EDTA、无水乙醇沉淀及HIDI变性上述扩增产物。产物通过测序仪确认结果。

## 2 结果

### 2.1 抗体鉴定结果

抗体鉴定结果见表1。24例Lewis抗体阳性患者中,19例(19/24,79.17%)为抗Le<sup>a</sup>抗体,只有5例(5/24,20.83%)为抗Le<sup>b</sup>抗体;3例(3/24,12.50%)患者产生了混合抗体,除Lewis系统血型抗体外还分别产生了抗Mur或抗S。

表1 24例患者Lewis血型抗体鉴定结果

| 样本编号 | ABO血型 | Rh血型 | 抗体鉴定                  |
|------|-------|------|-----------------------|
| 1    | B     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 2    | B     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 3    | A     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 4    | O     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 5    | B     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 6    | A     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 7    | A     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 8    | A     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 9    | A     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 10   | O     | -    | 抗Le <sup>b</sup>      |
| 11   | O     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 12   | AB    | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 13   | A     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 14   | A     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 15   | AB    | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 16   | A     | +    | 抗Le <sup>b</sup>      |
| 17   | B     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 18   | A     | +    | 抗Le <sup>b</sup> +S   |
| 19   | AB    | +    | 抗Le <sup>a</sup> +Mur |
| 20   | A     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 21   | AB    | -    | 抗Le <sup>b</sup> +Mur |
| 22   | A     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 23   | O     | +    | 抗Le <sup>a</sup>      |
| 24   | A     | +    | 抗Le <sup>b</sup>      |

### 2.2 基因检测及测序结果

基因检测及测序结果见表2。在24例(1例因标本原因无法进行基因分型和测序)测序检测的样本中,检测到FUT2基因多态性4种,分别是357C>T、385A>T、759C>A、849G>A,其中759C>A还未见报道,是一种新的FUT2基因多态性,需要通过家系分析进一步确认,分析突变对FUT2酶活性的影响。检测到FUT3基因多态性6种,分别是59T>C、202T>C、314C>T、508G>A、612A>G、1067T>A,除59T>C突变导致FUT3酶活性降低外,其余突变均导致FUT3酶失活。

表2 24例产生Lewis抗体患者的基因检测及测序结果

| 样本<br>编号 | FUT2基因突变位点 |        |        |        | FUT3基因突变位点 |        |        |        |        |         | 红细胞<br>表型 | 分泌液<br>表型 |
|----------|------------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|--------|--------|---------|-----------|-----------|
|          | 357C>T     | 385A>T | 759C>A | 849G>A | 59T>C      | 202T>C | 314C>T | 508G>A | 612A>G | 1067T>A |           |           |
| 1        | Homo       | Heter  | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Wt     | Homo    | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 2        | Homo       | Heter  | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Wt     | Homo    | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 3        | Heter      | Wt     | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Homo   | Wt     | Wt      | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 4        | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Homo   | Wt     | Wt      | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 5        | Heter      | Wt     | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Wt     | Homo    | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 6        | Homo       | Homo   | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Wt     | Homo    | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 7        | Heter      | Wt     | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Wt     | Homo    | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 8        | Homo       | Heter  | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Heter  | Wt     | Heter   | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 9        | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Heter  | Wt     | Heter   | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 10       | Heter      | Wt     | Wt     | Wt     | Heter      | Heter  | Heter  | Wt     | Wt     | Wt      | 不能确定      | 不能确定      |
| 11       | Homo       | Heter  | Wt     | Wt     | Wt         | Heter  | Heter  | Wt     | Wt     | Wt      | 不能确定      | 不能确定      |
| 12       | Homo       | Heter  | Wt     | Wt     | N          | N      | N      | N      | Wt     | N       | 不能确定      | 不能确定      |
| 13       | Heter      | Wt     | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Wt     | Homo    | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 14       | Heter      | Heter  | Wt     | Wt     | Wt         | Homo   | Homo   | Wt     | Wt     | Wt      | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 15       | Homo       | Heter  | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Heter  | Wt     | Heter   | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 16       | Homo       | Wt     | Hetero | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Wt     | Homo    | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 17       | Homo       | Homo   | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Homo   | Wt     | Wt      | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 18       | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Homo   | Wt     | Wt      | 不能确定      | 不能确定      |
| 19       | N          | N      | N      | N      | Heter      | Heter  | Wt     | Wt     | Wt     | Wt      | 不能确定      | 不能确定      |
| 20       | N          | N      | N      | N      | Heter      | Heter  | Wt     | Wt     | Wt     | Heter   | 不能确定      | 不能确定      |
| 21       | Homo       | Homo   | Wt     | Wt     | Homo       | Wt     | Wt     | Homo   | Wt     | Wt      | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 22       | Homo       | Wt     | Wt     | Wt     | Wt         | Wt     | Wt     | Wt     | Heter  | Wt      | Le(a+b-)  | Le(a+b-)  |
| 23       | Wt         | Wt     | Wt     | Heter  | Homo       | Wt     | Wt     | Homo   | Wt     | Wt      | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |
| 24       | Homo       | Homo   | Wt     | Wt     | Heter      | Heter  | Heter  | Wt     | Wt     | Heter   | Le(a-b-)  | Le(a-b-)  |

Homo:纯合子;Heter:杂合子;Wt:野生型;N:没有检测。

### 3 讨论

Le<sup>a</sup>和Le<sup>b</sup>抗原是上皮细胞合成后分泌到血浆和体液中,红细胞通过吸附血浆中的Le<sup>a</sup>和Le<sup>b</sup>抗原形成Lewis血型。编码Lewis血型抗原的2个基因FUT2和FUT3均具有多态性,而且这种多态性与民族和地域相关。本研究检测到的4种FUT2多态性中,357C>T、385A>T、849G>A都是中国人比较常见的突变,其中357C>T是同义突变,385A>T突变会导致FUT2酶的活性降低至野生型的20%<sup>[9]</sup>,849G>A突变会导致终止密码子的提前出现,失去FUT2酶的活性。本研究发现的759C>A突变之前未见报道,需要进一步的家系调查、血清学分析以及酶活性测定,以确定基因突变对酶的影响。本研究发现的6种FUT3基因多态性除59T>C突变降低FUT3酶的活性外,其余均导致FUT3酶活性丧失。

虽然Lewis血型抗体引起的溶血在临床上鲜见

报道,但是不规则抗体的存在会干扰血型鉴定和配血,基因检测能够更好地确定受血者的血型,从而帮助选择相合的血液。研究报道Lewis血型的多态性与儿童消化道和呼吸道疾病具有关联性<sup>[10]</sup>,因此,对父母和婴儿Lewis血型编码基因多态性的检测有助于婴儿出生后的疾病预防。中性寡糖是保护婴儿胃肠道的天然屏障,能够降低婴儿的腹泻和肠道感染<sup>[11-12]</sup>,还能够降低泌尿道和呼吸道感染<sup>[13]</sup>。母乳中的中性寡糖主要为岩藻糖基寡糖,FUT2基因多态性和母乳中的岩藻糖基寡糖具有相关性,因此,Lewis血型的基因多态性检测还可能对婴儿出生后的母乳喂养提供指导性意见。

#### [参考文献]

- [1] ROUQUIER S,LOWE J B,KELLY R J, et al. Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group a (1, 2) fucosyltransferase gene and two H bloods-related DNA restriction fragments[J]. J Riol Chen,

(下转第1703页)

- [4] CHEN W W, CHENG X, ZHANG X, et al. The expression features of serum cystatin C and homocysteine of Parkinson's disease with mild cognitive dysfunction [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(16):2957-2963
- [5] DUTTA G, BARBER D S, ZHANG P, et al. Involvement of dopaminergic neuronal cystatin C in neuronal injury-induced microglial activation and neurotoxicity [J]. *J Neurochem*, 2012, 122(4):752-763
- [6] TEIXEIRA F G, CARVALHO M M, PANCHALINGAM K M, et al. Impact of the secretome of human mesenchymal stem cells on brain structure and animal behavior in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(2):634-646
- [7] PASALA S, CARMODY J B. How to use serum creatinine, cystatin C and GFR. *Archives of disease in childhood* [J]. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 2017, 102(1):37-43
- [8] 梁凯,万辛,瞿卫,等.核医学肾动态显像与血清胱抑素C评价肾积水患者肾功能的应用价值[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*,2016,36(2):197-200
- [9] DONG X, ZHENG D, NAO J. Measurement of serum cystatin C: a valuable tool for evaluating dyskinesia in Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 705:172-176
- [10] CAGGIU E, ARRU G, HOSSEINI S, et al. Inflammation, infectious triggers, and Parkinson's disease [J]. *Front Neurol*, 2019, 10:122
- [11] CAMACHO-SOTO A, GROSS A, SEARLES NIELSEN S, et al. Inflammatory bowel disease and risk of Parkinson's disease in medicare beneficiaries [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2018, 50:23-28
- [12] ZHANG Y, SUN L. Cystatin C in cerebrovascular disorders [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2017, 14(4):406-414
- [13] MATHEWS P M, LEVY E. Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2016, 32:38-50
- [14] OKUNEVA O, LI Z, KORBER I, et al. Brain inflammation is accompanied by peripheral inflammation in Cstb (-/-) mice, a model for progressive myoclonus epilepsy [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1):298
- [15] 曹雯燕,刘晓光,马灿灿,等.不同运动表型帕金森病患者非运动症状的相关因素研究[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*,2019,39(12):1764-1768
- [16] YALCIN S, ULAS T, EREN M A, et al. Relationship between oxidative stress parameters and cystatin C levels in patients with severe preeclampsia [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2013, 49(3):118-123
- [17] BECKER A, FASSBENDER K, OERTEL W H, et al. A punch in the gut - intestinal inflammation links environmental factors to neurodegeneration in Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2019, 60:43-45
- [收稿日期] 2019-06-20

(上接第1699页)

- 1995, 270(9):4632-4639
- [2] 苏宇清,吴国光,魏天莉,等.中国汉族人群FUT2基因385位点突变与Lewis表型的相关性[J].*临床输血与检验*,2004,6(2):81-83
- [3] 许先国,朱发明,洪小珍,等.中国浙江人群中Lewis血型相关的FUT3基因多态性初步研究[J].*中国实验血液学杂志*,2006,14(3):601-604
- [4] 张焯,刘素芳,张磊,等.Lewis血型系统抗体的研究[J].*北京医学*,2015,37(6):592-593
- [5] MISEVIC G. Lewis (Le) blood group system phenotypes and genotypes [J]. *APJBG*, 2019, 3(2):1-8
- [6] 吴秋梦,王秋实,何燕京,等.Lewis血型系统抗体在备血患者中检出情况分析[J].*中国输血杂志*,2017,30(1):70-72
- [7] 李慧,徐焕铭,张毅,等.输血前患者不规则抗体筛查及鉴定结果分析[J].*中国实验血液学杂志*,2015,23(3):861-865
- [8] 李秀文,芦慧霞,李凤龙,等.4200例输血前患者不规则抗体检验结果的分析[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*,2015,35(12):1835-1836
- [9] 王保捷,丁梅,赵东,等.FUT2基因座4个新变异等位基因的分析[J].*中国法医学杂志*,2002,17(3):141-146
- [10] BARTON S J, MURRAY R, LILLYCROP K A, et al. FUT2 gene variants and reported respiratory and gastrointestinal illnesses during infancy [J]. *J Infect Dis*, 2019, 219(5):836-843
- [11] PAYNE D C, CURRIER R L, STAAT M A, et al. Epidemiologic association between FUT2 secretor status and severe rotavirus gastroenteritis in children in the United States [J]. *JAMA Pediatr*, 2015, 169(11):1040-1045
- [12] KAMBHAMPATI A, PAYNE D C, COSTANTINI V, et al. Host genetic susceptibility to enteric viruses: a systematic review and metaanalysis [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62(1):11-18
- [13] ARSLANOGLU S, MORO G E, SCHMITT J, et al. Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestation and infections during the first two years of life [J]. *J Nutr*, 2008, 138(6):1091-1095
- [收稿日期] 2020-07-02