

河北省唐山地区人群红细胞 A₂B 亚型分布情况及其分子机制的研究^{*}

李 君¹, 曹立瀛¹, 侯金友¹, 张 慧¹, 邹红蕊¹, 孙 超², 崔振超³

(1. 开滦总医院输血科, 河北唐山 063000; 2. 唐山市中心血站, 河北唐山 063000;

3. 秦皇岛市中心血站, 河北秦皇岛 066000)

摘要:目的 研究河北省唐山地区人群 A₂B 亚型分布情况及分子机制, 探讨输血前开展 A₂B 亚型检测的临床意义。方法 收集 2017 年 11 月~2018 年 3 月住院、门诊、急诊及体检的 AB 型标本, 采用抗-A₁ 试剂筛选 A₂B 亚型。采用 PCR 技术扩增 A₂B 标本 ABO 基因第 6~7 外显子并进行 Sanger 法双向测序分析。结果 535 例 AB 型样本检出 12 例 A₂B 表型标本 (2.24%)。基因测序显示 2 例标本基因型为 ABO * A2.01/ABO * B.01, 6 例为 ABO * A2.05/ABO * B.01, 1 例为 ABO * BA.02/ABO * O.01.02, 3 例为 ABO * A1.02/ABO * B.01。人群 ABO * A2.05 等位基因频率为 0.56%, ABO * A2.01 为 0.19%。结论 河北省唐山地区人群存在一定比例 A₂B 亚型, 其分子机制存在异质性; 输血前开展 A₂B 亚型检测能提升输血安全性。

关键词: A₂B 亚型; 基因测序; 分子机制; 输血安全性

中图分类号: R457.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)02-020-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.02.006

Study on Distribution and Molecular Mechanism of A₂B Subtype Individuals in Tangshan Region of Hebei Province

LI Jun¹, CAO Li-ying¹, HOU Jin-you¹, ZHANG Hui¹, ZOU Hong-rui¹, SUN Chao², CUI Zhen-chao³

(1. Blood Transfusion Branch, Kailuan General Hospital, Hebei Tangshan 063000,

China; 2. Tangshan Central Blood Station, Hebei Tangshan 063000, China;

3. Qinhuangdao Central Blood Station, Hebei Qinhuangdao 066000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution of A₂B subtype individuals and their molecular characteristic in Tangshan Region of Hebei Province. **Methods** The individuals with AB phenotype were collected in outpatients, in-patients, emergency department and physical examination department from November 2017 to March 2018. A₂B phenotype was screened with Anti-A₁. Then the exon 6 to 7 of ABO in the A₂B phenotype individuals was amplified by polymerase chain reaction and sequenced bidirectionally with Sanger method. **Results** A₂B phenotypic specimens were found in 12 out of 535 AB phenotype individuals (2.24%). The sequence results were showed that genotypes of 2 individuals were ABO * A2.01/ABO * B.01, 6 were ABO * A2.05/ABO * B.01, 1 was ABO * BA.02/ABO * O.01.02, and 3 were ABO * A1.02/ABO * B.01. The frequency of ABO * A2.05 allele was 0.56% and ABO * A2.01 was 0.19% in the Tangshan population. **Conclusion** There was a certain proportion of A₂B subtypes in Tangshan Region of Hebei Province, and its molecular mechanism was heterogeneous. Testing A₂B subtype before transfusion can improve the safety of blood transfusion.

Keywords: A₂B subtypes; gene sequencing; molecular mechanism; safety of blood transfusion

ABO 血型系统在临床输血中占有极其重要的地位, 血型鉴定是保障输血安全的必要前提^[1], 但实际工作中经常遇到正反定型不相符致血型鉴定困难的病例, 亚型是导致正反定型不符的常见原因之一, 其中以 A₂/A₂B 最常见。研究显示一定比例的 A₂ 或 A₂B 个体血清中含有抗-A₁ 抗体, 且 A₂B 个体检出抗-A₁ 抗体的比例高于 A₂ 个体^[2-3], 当 A₂B 型受血者血清中存在 37℃ 条件下反应的抗-A₁ 抗体时, 输入 AB 型血液可能导致溶血性输血反应或输注无效。但目前我国没有要求常规检测 A₂ 抗原, 输血前试验存在漏检的可能。因此开展

A₂B 亚型检测能提升输血安全性, 有效减少溶血性输血反应^[3-4]。本文通过研究河北省唐山地区人群 A₂B 亚型的分布情况及分子机制, 从而探讨输血前开展 A₂B 亚型检测的临床意义, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2017 年 11 月~2018 年 3 月在本医院进行血型检测的所有住院、门诊、急诊患者及体检人员, 选择血型为 AB 表型的人群进行研究。采集患者或体检人员 EDTA 抗凝血标本各 2 管, 1 管进行血清学试验, 1 管进行 ABO 基因扩增及测序。

1.2 试剂与设备 单克隆抗-A、抗-B 试剂、抗-H

^{*} 作者简介: 李 君 (1985—), 女, 硕士, 从事临床输血工作, E-mail: 278800026@qq.com。

试剂、抗-A₁试剂购自上海血液生物医药有限责任公司;抗-AB购自法国Diagast公司;反定型试剂细胞、抗筛细胞、ABO、RhD血型定型检测卡、抗人球蛋白检测卡购自长春博迅生物技术有限责任公司,所有试剂均在有效期内使用。BASO血库专用离心机、TD-3A离心机、FYQ免疫微柱孵育器。

1.3 方法

1.3.1 血清学检测:微柱凝胶卡式法检测ABO、RhD血型按照试剂说明书进行操作。微柱凝胶卡式法ABO正反定型为AB型的标本,采用试管法抗-A₁和抗-H试剂初筛。与抗-A₁反应阴性,再次复核ABO正反定型试验;其中正定型与抗-A、抗-B、抗-A₁、抗-AB、抗-H反应,反定型与Ac、Bc、Oc,自身细胞(4℃,室温,37℃)反应,试管法血型定型参考文献[5]操作。

1.3.2 基因组DNA提取:采用MagCore Nucleic Acid Extractor提取仪器进行全基因组DNA抽提,严格按照试剂说明书进行操作。标本A_{260nm}/A_{280nm}比值为1.70~1.90,调节标本DNA浓度为50~100 ng/μl。

1.3.3 ABO基因扩增和测序分析:参照文献[6]进行操作。简要如下:采用特异性引物扩增外显子6~7序列,扩增反应总体积20 μl,包括10×PCR缓冲液,DNA,LA Taq DNA聚合酶(TaKaRa公

司产品,大连);dNTP和MgCl₂终浓度分别为0.2 mmol/L和2.0 mmol/L,引物终浓度为0.5 μmol/L。扩增产物经酶切纯化后进行测序反应,测序产物在ABI PRISM 3730测序仪进行电泳分析。使用SeqScape V2.5软件进行序列分析比对,根据碱基多态性判定标本ABO等位基因型。ABO等位基因参照国际输血协会(ISBT)工作组的命名原则。

1.4 统计学分析 应用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。计数资料用百分率(%)表示。

2 结果

2.1 A₂B亚型的分布情况 535例AB表型案例,其中男性278例,女性257例。在535例AB型样本中,检出12例A₂B亚型标本,比例为2.24%。

2.2 A₂B个体ABO基因测序情况 基因测序显示2例标本基因型为ABO * A2.01/ABO * B.01,6例为ABO * A2.05/ABO * B.01,1例为ABO * BA.02/ABO * O.01.02,3例为ABO * A1.02/ABO * B.01。人群ABO * A2.05等位基因频率为0.56%,ABO * A2.01为0.19%。12例标本碱基序列多态性情况见表1。ABO基因双链测序分析见图1。

表 1

12例标本碱基序列多态性情况

基因型	碱基序列多态性
ABO * A2.01/ABO * B.01	c.297AG,c.467CT,c.526CG,c.657CT,c.703GA,c.796CA,c.803GC,c.930GA,c.1061C/del
ABO * A2.05/ABO * B.01	c.297AG,c.467CT,c.526CG,c.657CT,c.703GA,c.796CA,c.803GC,c.930GA,c.1009AG
ABO * BA.02/ABO * O.01.02	c.261del/G,c.297GG,c.526CG,c.646TA,c.657CT,c.681GA,c.700CG,c.703GA,c.771CT,c.796CA,c.803GC,c.829GA,c.930GA
ABO * A1.02/ABO * B.01	c.297AG,c.467CT,c.526CG,c.657CT,c.703GA,c.796CA,c.803GC,c.930GA

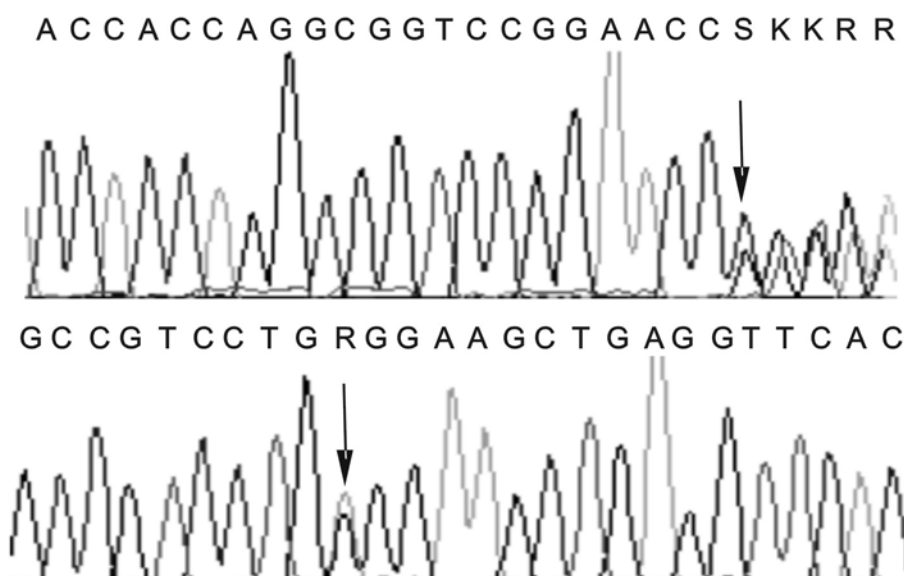


图 1 ABO * A2.01/ABO * B.01 基因型标本(上图,箭头所指处为 c.1061C/del 杂合)和 ABO * A2.05/ABO * B.01 基因型标本(下图,箭头所指处为 c.1009AG 杂合)

3 讨论 血型鉴定是保证临床输血安全的首要环节,通常利用血清学技术可准确鉴定 ABO 表型,但人群中存在一定比例 ABO 亚型,它们往往表现为抗原抗体减弱或者正反定型不一致,不仅干扰输血前血型鉴定试验,还影响输血的安全和效果^[7-8]。现已知 ABO 血型系统存在的亚型中以 A₂ 和 A₂B 较为常见,但目前我国输血前试验没有要求常规检测 A₂ 抗原,存在 A₂ 或 A₂B 亚型漏检的可能。若将献血者 A₂B 亚型误定为 AB 型输注给 AB 型患者,不会导致溶血性输血反应的发生;但对于受血者而言,将 A₂B 亚型误定为 AB 型,输血后则有可能刺激患者产生抗-A₁ 抗体^[3-4],从而导致迟发型溶血性输血反应或输注无效的发生。因此 A₂B 个体的输血问题应引起临床重视。

YING 等^[9]对浙江汉族人群的研究发现 A₂B 在 AB 人群中的比例为 1.96%,OGASAWARA 等^[10]研究发现,日本东京人群中 A₂B 在 AB 型频率为 0.16%,本实验的筛查数据表明唐山地区人群中存在一定比例的 A₂B 亚型。国外研究显示 1%~8% 的 A₂ 个体血清中含有抗-A₁ 抗体,22%~35% 的 A₂B 个体血清中含有抗-A₁ 抗体^[2],但是本实验中我们在 12 例 A₂B 个体均未发现抗 A₁ 抗体,这与 YING 等^[9]报道的研究结果一致,他们在 134 例 A₂ 和 A₂B 个体中只发现 1 例存在抗 A₁ 抗体,提示中国人群中 A₂ 或 A₂B 个体血清中含有抗-A₁ 的概率远低于白种人群^[9]。

A₂ 表型的分子机制主要是 ABO 基因碱基的点突变或缺失^[9],目前 ISBT 正式命名的 A₂ 等位基因有 18 个^[11]。我们的实验结果显示本地区以 ABO * A2.05 为主,与国内其他地区的研究结果相符^[9,12-13]。与 ABO * A1.02 等位基因进行比较,ABO * A2.01 在 1 061 位 C 缺失从而引起移码突变,使得 A₂ 糖基转移酶与 A₁ 糖基转移酶相比活力降低了 30~50 倍^[10]。而 ABO * A2.05 仅存在 1009 位 A>G,导致 337 位精氨酸变为甘氨酸,推测这个氨基酸的改变可能降低了糖基转移酶的活性。此外还检出 1 例罕见 ABO * BA.02 等位基因,由于 B(A)表型与 A₂B 个体的血清学特性基本相似,常规的筛选中可能将 B(A)表型误认为 A₂B 表型,但正确鉴定 B(A)亚型,对新生儿溶血病的防治和安全输血有着极其重要的作用。本实验中我们发现 3 例 A₂B 标本基因型为正常的 ABO * A1.02/ABO * B.01 基因型,YING 等^[9]通过 ABO 基因全部外显子研究结果也显示浙江汉族人群部分 A₂B 个体,在测序序列范围内未发现突变。他们推测表观遗传、内含子红系特异性调控元件或其他机制可能影响这些 A₂B 个体抗原的表达,这有

待于进一步研究。

综上所述,河北省唐山地区人群中存在一定比例的 A₂B 亚型,准确的血型鉴定有助于提升输血的安全性和有效性,可预防不相合输血导致的溶血性输血反应或输注无效。

参考文献:

- [1] 李双玉,董磊,解金辉,等.一例罕见 AB 亚型的分子生物学研究分析[J].现代检验医学杂志,2018,33(4):70-72.
LI Shuangyu, DONG Lei, XIE Jinhui, et al. Study on the molecular mechanism of a case of rare AB subtype [J]. J Mod Lab Med, 2018, 33(4): 70-72.
- [2] American Association of Blood Banks. Technical Manual[M]. 18th Ed. Bethesda: AABB, 2014: 315.
- [3] 韩芳,顾松琴. A₂B 亚型致配血不合一例报告[J]. 青海医药杂志, 2016, 46(3): 72-73.
HAN Fang, GU Songqin. One case of A₂B subtype leads to cross blood mismatch [J]. Qinghai Medical Journal, 2016, 46(3): 72-73.
- [4] 赵春米. 输血前 A₂/A₂B 亚型和 RH 弱 D 血型检测的意义[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(8A): 121-122.
ZHAO Chunmi. Significance of A₂/A₂B subtype and RH weak D blood type test before blood transfusion [J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use, 2014, 7(8A): 121-122.
- [5] 兰炯采, 负中桥, 陈静娴. 输血免疫血液学实验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 24.
LAN Jiongcai, YUN Zhongqiao, CHEN Jingxian. Blood transfusion immunological techniques [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2011: 24.
- [6] ZHU Fengrong, TAO Shiheng, XU Xuhua, et al. Distribution of ABO blood group allele and identification of three novel alleles in the Chinese Han population [J]. Vox Sang Uinis, 2010, 98(4): 554-559.
- [7] GIRIYAN S S, AGRAWAL A, BAJPAI R, et al. A1 and A2 sub-types of blood group 'A': a reflection of their prevalence in north karnataka region [J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(5): EC40-EC42.
- [8] MATZHOLD E M, DREXLER C, WAGNER T. A novel ABO O allele caused by a large deletion covering two exons of the ABO gene identified in a Caucasian family showing discrepant ABO blood typing results [J]. Transfusion, 2016, 56(11): 2739-2743.
- [9] YING Yanlin, HONG Xiaozhen, XU Xianguo, et al. Serological characteristic and molecular basis of A2 subgroup in the Chinese population [J]. Transfus Apher Sci, 2013, 48(1): 67-74.
- [10] OGASAWARA K, YABE R, UCHIKAWA M, et al. Different alleles cause an imbalance in A2 and A2B phenotypes of the ABO blood group [J]. Vox Sanguinis, 1998, 74(4): 242-247. (下转 26 页)

(上接 22 页)

- [11] MÖLLER M, JÖUD M, STORRY J R, et al. Erythro gene: a database for in-depth analysis of the extensive variation in 36 blood group systems in the 1000 Genomes Project[J]. Blood Adv, 2016, 1(3): 240-249.
- [12] 陈妍, 马玲, 朱绍汶, 等. 南京地区汉族人群红细胞 A 血型亚型分子生物学研究[J]. 临床血液学杂志, 2016, 29(10): 773-776.
CHEN Yan, MA Ling, ZHU Shaowen, et al. Analysis and research on molecular mechanism of A subtype groups in Nanjing Han population[J]. J Clin Hematol(China), 2016, 29(10): 773-776.
- [13] 杜振军, 牟曦光, 魏莉, 等. 中国北方汉族人群 A204

等位基因的发现及家系调查[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(3): 135-138.

DU Zhenjun, MOU Xiguang, WEI Li, et al. Discovery of A204 allele and its family study of Han individuals in northern China[J]. Chin J Blood Transfusion, 2013, 26(3): 135-138.

- [14] 邓刚. B(A)血型分子机制及红细胞表面抗原表达的研究[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(9): 861-863.
DENG Gang. Study on the molecular mechanism of B(A) and antigen expression of red blood cell surface[J]. Chin J Blood Transfusion, 2013, 26(9): 861-863.

收稿日期: 2019-02-10

修回日期: 2019-02-23