

· 论 著 ·

南京汉族人群 Duffy 血型等位基因 FYES 及 FYX 调查研究*

马 玲, 刘衍春[△]

(江苏省血液中心输血研究室, 江苏南京 210042)

摘 要:目的 研究南京地区汉族人群中 Duffy 血型等位基因 FYES 及 FYX 的表达情况。方法 随机提取 200 例无偿献血者 EDTA-K₂ 抗凝外周血血样 DNA, 采用 PCR-SSP 方法进行 Duffy 血型 FYA、FYB 等位基因分型; 采用 Sanger 双脱氧链末端终止测序法分析 Duffy 血型 FYES 及 FYX 等位基因序列特点。结果 PCR 基因分型结果与测序结果一致, 200 例标本中, 检出 FYA/FYA 180 例, FYA/FYB 20 例; 测序结果表明, 200 例标本中未发现 FYES 及 FYX 等位基因表达。结论 FYES 及 FYX 等位基因在中国南京地区汉族人群中表达频率极低, 与其他人种相比具有显著性差异。

关键词: Duffy 血型基因; 基因频率; FYES; FYX

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.16.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)16-2205-03

Survey and study on FYES and FYX alleles of Duffy blood group in Nanjing Han population*

MA Ling, LIU Yanchun[△]

(Department of Transfusin Research, Jiangsu Province Blood Center, Nanjing, Jiangsu 210042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the FYES and FYX allele expression situation of Duffy blood group in Han population of Nanjing area. **Methods** The genomic DNA was randomly extracted from peripheral EDTA-K₂ anticoagulation blood samples in 200 voluntary blood donors and Duffy blood group FYA and FYB allele typing was performed by PCR-SSP. The EYES and FYX allele sequence characteristics of Duffy blood group were analyzed by adopting Sanger double deoxygenation gene sequencing method. **Results** The PCR genotyping results were consistent with the sequencing results. Among 200 samples, 180 cases were FYA/FYA and 20 cases were FYA/FYB; the sequencing results showed that FYES and FYX allele expression was not been found in 200 samples. **Conclusion** The expression frequencies of FYES and FYX alleles are extremely low in Han population of Nanjing area, which has significant difference compared with other races.

Key words: Duffy blood group; gene frequency; FYES; FYX

DARC (Duffy antigen receptor for chemokines) 编码的 Duffy 血型系统包括 1 对等位抗原 Fya 及 Fyb 和 3 个高频抗原 Fy3、Fy5 及 Fy6^[1]。其中最主要的多态性表现为 Fya 和 Fyb, 它们第 42 位氨基酸分别为 Gly 和 Asp。除了相应的编码基因 FYA 及 FYB, 等位基因 FYES 及 FYX 也参与影响 Fya 及 Fyb 表达。FYES (ES 为 erythroid silent 缩写) 在基因编码区域上游转录因子 GATA-1 结合位点处产生纯合突变 (T-67C), 导致红细胞膜上不表达 Duffy 抗原, 而其他组织上 Duffy 抗原表达不受影响^[2]。另一等位基因 FYX, 与参考序列 FYB 相比存在 C265T 差异, 使得抗原产生 Arg89Cys 改变, 导致 Fyb 抗原在红细胞表面有微弱表达, 往往需要通过吸收放散的方法才能检测出^[3]。目前, 关于中国人群中等位基因 FYA 及 FYB 的研究已多有报道, 而 FYES 及 FYX 的频率分布及对 Fya/Fyb 抗原表达的影响鲜有研究, 本文根据 DARC 序列特点 (见图 1), 对 FYES 与 FYX 及其相关的 FYA 和 FYB 等位基因进行初步探讨, 以便进一步了解 DARC 表达状况, 现报道如下。

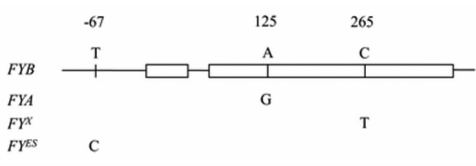


图 1 DARC 基因结构示意图, 其中 FYB 为参考序列

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机抽取本中心无血缘关系的汉族无偿献血者标本 200 例, 其中年龄、性别均为随机, 血液采集前均获得献血者知情同意。用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取血样 DNA, -30 ℃ 冻存待用。另取 6 例 Duffy 表型已知且经测序验证的样本作为对照, 其中 Fy(a+b+), Fy(a+b-) 及 Fy(a-b+) 各 2 例。

1.2 仪器与试剂 基因组 DNA 提取试剂盒 (原平皓公司, 中国); 2 * Taq PCR Mix (博尔迪生物, 中国); Labofuge 400R 低温高速离心机 (Heraeus Corp. 德国); PE9600PCR 扩增仪 (Applied Biosystem Corp. 美国); ND-100-Spectrophotometer DNA 定量分析仪 (NanoDrop Corp. 美国); Alphamager HP 凝胶成像系统 (Applied Biosystem, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 PCR-SSP 进行 DARC 基因分型 分 2 个体系进行 PCR, 分别加入 HGH 作为内参, 引物序列参见文献^[4]。PCR 总体积为 20 μL, FYA 及 HGH 引物浓度为 200 nmol/L, FYB 引物浓度为 800 nmol/L, PCR 条件为: 94 ℃, 5 min; 94 ℃, 30 s; 64 ℃ (FYB 为 60 ℃), 30 s; 72 ℃, 45 s; 35 个循环后 72 ℃, 7 min; 4 ℃。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像系统拍照观察结果并分析。

* 基金项目: 江苏省卫生和计划生育委员会青年科研课题资助项目 (Q201502)。

作者简介: 马玲, 女, 助理研究员, 主要从事免疫血液学相关研究。△ 通信作者, E-mail: lyc60@126.com。

1.3.2 扩增及测序引物设计 查找 GeneBank 数据库中 DARC 基因序列(GeneBank 序列号为 NG011626),应用 Prim-

er5 引物设计软件进行扩增及测序引物设计,扩增区域包含 FYES、FYX 及 FYA/FYB 位点,引物序列参见表 1。

表 1 DARC 扩增及测序引物

目的基因	扩增产物(bp)	引物序列	引物位置
DARC	1 051	F:5'-CCA ACC AGC CAA ATC CAA-3'	-222~-204
		R:5'- CCA AGA CGG GCA CCA CAA-3'	332~349

1.3.3 DARC 基因测序分析 PCR 扩增 DARC 部分基因序列,PCR 总体积为 20 μ L,引物浓度为 200 nmol/L,PCR 条件为:95 $^{\circ}$ C,5 min;95 $^{\circ}$ C,30 s;61 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,1 min;35 个循环后 72 $^{\circ}$ C,10 min;4 $^{\circ}$ C。PCR 产物经纯化后直接进行测序分析,测序引物同扩增引物。使用 Sequencing Analysis 和 SeqScape 软件进行测序图谱分析和序列比对。

1.4 统计学处理 DARC 等位基因频率采用直接计数法计算;利用群体遗传学分析软件 Arlequin35 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡验证。

2 结 果

2.1 DARC 分型结果 200 例标本中,检出 FYA/FYA 共 180 例,FYA/FYB 共 20 例,未发现 FYB/FYB;FYA 基因频率为 0.95, FYB 基因频率为 0.05。经检验该抽样符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2=0.554$; $P=0.457$)。测序结果表明与 PCR 分型结果完全一致,FYA 纯合型及 FYA/FYB 杂合型在 125 位分别为 G 纯合及 G/A 杂合;6 例对照样本其 PCR 分型结果与测序结果一致,分别与其相应血清学表型吻合(图 2C)。

2.2 DARC 测序结果 200 例标本中,基因序列-67 位碱基均为 T,未发现 T-67C 突变,即未发现 FYES(参见图 2A);同样在 265 位均为 C,未发现 C265T 突变,未检测到 FYX 存在(参见图 2B)。6 例对照样本同样未存在上述两突变位点。

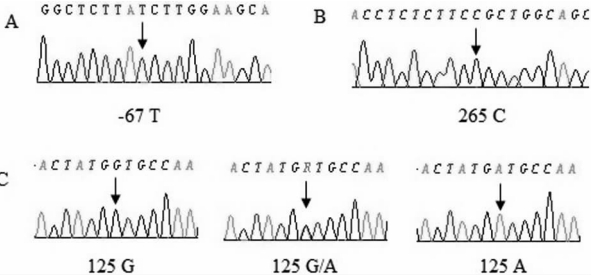


图 2 DARC 部分序列测序图

3 讨 论

FYA 与 FYB 是 Duffy 血型系统基因较为重要的一对等位基因,它们的多态性决定了相应 Fya 与 Fyb 抗原的表达与否。除此之外,FYES 及 FYX 也参与影响抗原表达,最终产生 5 种不同的 Duffy 血清学表型:Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+), Fy(a-b+w)和 Fy(a-b-)。在本次研究中,随机抽取 200 例健康献血者标本,进行 DARC 基因分型并对部分序列测序,其中 FYA/FYA 和 FYA/FYB 基因型分别为 180 例和 20 例,并未发现 FYB/FYB 基因型;测序结果提示-67 位及 265 位处核苷酸均与标准序列一致,未发现 T-67C 及 C265T 突变,即未检测到 FYES 及 FYX 等位基因存在,说明二者在中国南京汉族人群红细胞上表达频率极低。

FYES 是由于 DARC 编码区域上游-67 位处 T 突变为 C 导致(早期报道中,该位点曾称为-33 或-46^[1]),该位点恰好为转录因子 GATA-1 结合位点处,由此导致基因转录表达受

阻。由于 GATA-1 主要调节红细胞系的增殖与分化,因此该突变只影响了红细胞膜上 Duffy 抗原的表达,而其他组织,例如肾、肺静脉内皮细胞等上 Duffy 抗原的表达并不受影响^[5]。FYES 通常在 FYB 等位基因上发生突变,罕见地在 FYA 基因单链的 GATA-1 结合位点突变在巴布亚新几内亚地区曾被发现报道过^[6]。FYES 主要在撒哈拉以南非洲地区及非裔美国人中高表达,其他人种中极为罕见^[7]。Duffy 血型抗原是间日疟原虫受体,不表达 Duffy 抗原的 Fy(a-b-)个体红细胞可以抵抗间日疟原虫感染,或许 FYES 在非洲人群高表达是自然压力选择的结果^[8]。本次研究的 200 例标本中,并未发现 FYES 表达;苏宇清等^[9]在 182 例深圳血液中心献血人群中筛查同样未发现;而在凉山地区彝族人群的一项调查中^[10],在 162 例标本中检出 FYA/FYB/FYES7 人份,FYES 阳性比例高达 4.32%,该现象十分有趣,提示 DARC 于不同民族表达的异质性,在研究民族起源、遗传、迁徙方面具有一定的参考意义。

FYX 是在 FYB 的分子基础上发生一处点突变 C265T,导致基因产物第 89 位氨基酸 Gys 被 Arg 取代,该位置位于 Duffy 蛋白第一个胞内环中,造成蛋白结合不稳定。采用流式及免疫印迹技术发现,FYX 并不影响 Fyb 抗原决定簇,而仅仅减少了红细胞膜上 Duffy 糖蛋白(包括 Fyb、Fy3、Fy5 及 Fy6)的表达^[11]。在瑞典、澳大利亚和美国的高加索裔献血者中调查发现,FYX 的基因频率分别为 0.025、0.015 及 0.010,在非裔美籍中频率为 0.005,但在 100 例非洲南部黑人中并未发现^[12-13]。本次研究在 200 例中国南京汉族人群中也未发现 FYX 表达。由此看来,FYX 的表达更倾向于高加索裔人群。

Duffy 血型系统在输血相关领域有着重要的临床意义,相应的抗 Fya、Fyb 抗体可以引起急性或迟发性溶血性输血反应以及新生儿溶血病。除此之外,Duffy 抗原还为红细胞膜上杂性趋化因子受体,也是 HIV 感染的辅助受体之一^[8]。已有研究关注到 DARC 基因多态性与炎症反应、肿瘤免疫及 HIV 感染等之间的关系,推测不同基因型红细胞表达的 Duffy 抗原的数量和质量不同,导致细胞因子结合能力及疾病发生率存在显著差异。对 DARC 进行分型研究,无论是对输血医学,还是对血型相关疾病的研究,都有着重要作用。本次研究采用的 DARC 分型方法,可以较为快速地进行 DARC 分型,适用于大规模筛查,且结果准确可信,Duffy 表型已知的对照样本基因检测结果与其血清学表型完全吻合。尽管 FYES 及 FYX 会影响 Fya 和 Fyb 的表达,但由于中国汉族人群中 FYES 及 FYX 表达极低,采用基因检测方法进行 FYA/FYB 分型,来预测 Duffy 表型应该是可行的。需要提醒的是,对其他种族人群进行 DARC 分型研究,联合考虑 FYES 及 FYX 检测是必要的。

参考文献

[1] Reid ME. The blood group antigen [M]. 3rd ed. UK: Elsevier Ltd,2012;361-362. (下转第 2209 页)

本研究中,产 CTX-M 大肠埃希菌对青霉素类、大多数头孢菌素类、 β -内酰胺酶抑制剂、氨基糖苷类和氟喹诺酮类的耐药率高于不产 CTX-M 组的细菌,这与笔者前期对多药耐药大肠埃希菌的耐药基因分析结果一致^[7],也与 Andrea 等^[8]学者的研究结果相相似,表明,产 CTX-M 大肠埃希菌很可能同时携带其他多种耐药基因而成为多药耐药菌。

大肠埃希菌的种系分型对于判断细菌引起的肠外感染具有一定的临床重要性^[9]。在欧美等国家,产 CTX-M 大肠埃希菌多为 B2 型,D 型次之^[9],因为和 A 及 B1 型大肠埃希菌相比,B2 和 D 型大肠埃希菌主要属于肠外致病菌。本研究中,产 CTX-M 的大肠埃希菌主要属于 D 型,B2 型次之,这和日本及韩国等的研究结果一致^[8],其差异可能与地理位置等有关。

毒力是指同种病原微生物不同菌株或菌株的不同程度的致病能力,构成毒力的物质称为毒力基因。引起肠外感染的大肠埃希菌其致病性主要与其所产生的特定的毒力因子如毒素、黏附素、脂多糖、侵袭素等密切相关。本研究中,iutA、chuA 和 traT 显著分布于产 CTX-M 大肠埃希菌中,表明,铁色素的摄取对于产 CTX-M 大肠埃希菌的耐药播散有一定的作用。

总之,产 CTX-M 大肠埃希菌是本院尿路感染的主要致病菌,大多属于 D 型,其耐药率显著增高,且与毒力基因 iutA、chuA 和 traT 密切相关,是尿路感染患者临床治疗的一个潜在威胁。

参考文献

[1] Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and escherichia coli clones[J]. Microbial Drug Resistance, 2011, 17(1): 83-97.
[2] CLSI. M02-A Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test[S]. Wayne, PA: CLSI, 2014.
[3] Dallenne C, Da Costa A, Decré D, et al. Development of a

set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3): 490-495.
[4] Gordon DM, Clermont O, Tolley H, et al. Assigning escherichia coli strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method[J]. Environ Microbiol, 2008, 10(10): 2484-2496.
[5] Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise[J]. J Infect Dis, 2000, 181(1): 261-272.
[6] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157: H7, Salmonella, and Shigella for Pulse Net[J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3(1): 59-67.
[7] Cao X, Zhang Z, Shen H, et al. Genotypic characteristics of multidrug-resistant Escherichia coli isolates associated with urinary tract infections[J]. APMIS, 2014, 122(11): 1088-1095.
[8] Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, et al. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance [J]. Med Microbiol, 2013, 303(3): 305-317.
[9] Chakraborty A, Adhikari P, Shenoy S, et al. Clinical significance and phylogenetic background of extended spectrum β -lactamase producing Escherichia coli isolates from extra-intestinal infections [J]. J Infect Public Health, 2015, 8(3): 248-253.

(收稿日期: 2017-02-17 修回日期: 2017-04-17)

(上接第 2206 页)

[2] Daniels G. Human blood groups[M]. 3rd ed. UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013: 388.
[3] Chown B, Lewis M, Kaita H. The Duffy blood group system in Caucasians: evidence for a new allele[J]. Am J Hum Genet, 1965, 17(3): 384-389.
[4] 贺云蕾. 一种新的稀有血型基因检测方法的建立及应用[D]. 上海: 华东师范大学, 2013: 11-36.
[5] Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, et al. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals[J]. Nat Gene, 1995, 10(2): 224-228.
[6] Zimmerman PA, Wooley I, Masinde GL, et al. Emergence of FY * Anull in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(24): 13973-13977.
[7] Howes RE, Patil AP, Piel FB, et al. The global distribution of the Duffy blood group[J]. Nat Commun, 2011, 2(2): 266.
[8] Meny GM. The Duffy blood group system: a review[J]. Immunohematology, 2010, 26(1): 51-56.

[9] 苏宇清, 梁延连, 张印则, 等. 中国人群 Duffy 血型基因启动子 GATA-1 序列研究[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(6): 575-577.
[10] 王胜蓝, 吴明瞬, 刘红英, 等. 凉山地区彝族人群 Duffy 血型表型基因型分布[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(2): 158-159.
[11] Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, et al. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fyx individuals[J]. Blood, 1998, 92(21): 2147-2156.
[12] Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, et al. The Fyx phenotype is associated with a missense mutation in the Fyb allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein[J]. Br J Haematol, 1998, 103(10): 1184-1191.
[13] Gassner C, Kraus RL, Dövc T, et al. Fyx is associated with two missense point mutations in its gene and can be detected by PCR-SSP [J]. Immunohematology, 2000, 16(1): 61-67.

(收稿日期: 2017-02-13 修回日期: 2017-04-13)