

广州地区正常人群Haptoglobin型别的测定

伍新尧 蔡锐波

(法医学教研室)

附属第一医院血库

指导者: 郭景元副教授

1939年Polonovski和Jayle等⁽¹⁾发现血清中有一种蛋白能与血红蛋白结合,并显著增强血红蛋白的过氧化酶活性。这种蛋白被命名为haptoglobin(结合珠蛋白,简称Hp)。

1955年Smithies⁽²⁾首先将人血清在淀粉凝胶中进行电泳,根据所出现的区带移动度分为三型,即 Hp^{1-1} 型、 Hp^{2-1} 型和 Hp^{2-2} 型,还用超速离心法将之分离出来。

此后,许多学者继续研究,认为Hp的多形性是由遗传控制的,并把Hp的分型测定作为亲权鉴定的手段之一应用于法医学实践中。也有少数研究血痕的Hp分型^(3,4)。

关于Hp型别的测定,国内有些报道^(5,6,7)。本文报导广州地区正常人群Hp型别测定结果。

材 料 和 方 法

一、标本来源及准备 本组测定Hp的血标本全部来自附属第一医院血库的献血员。每人取血1毫升分离血清,按1/20(v/v)的比例加10%的血红蛋白溶液于血清中充分混匀;其中31例取1毫升新鲜血液滴在已编号的干净纱布上,室内晾干,室温下保存。

二、聚丙烯酰胺凝胶的制备 取内径为0.5厘米,长8厘米之玻璃管,按下列配方配成7%凝胶液后灌入玻璃管至7厘米高处。再于其上加蒸馏水至管满(蒸馏水与凝胶液注意勿搞混)。在室温下(20~25℃)放置1小时左右(室温偏高时放置时间可稍短,室温偏低时放置时间可稍长)凝胶即会凝固,以后置冰箱保存备用(于4℃处为宜,注意不要使凝胶降温太低)。

聚丙烯酰胺凝胶的配方:

- | | |
|------------------|------------------|
| 1. 23.3% 丙烯酰胺单体; | 2. Tris—EDTA缓冲液; |
| 3. 10% 过硫酸铵溶液; | 4. TEMED原液。 |

三、电泳

将上述制备好的凝胶玻璃管甩去凝胶面上的水,加入20~40微升已混合有血红蛋白的血清标本(或血痕浸出液—制备步骤见下文),其中一管另加一小滴0.2%溴酚蓝指示剂,再于其上缓慢加满上槽电泳液(Tris—甘氨酸缓冲液pH8.3),外套胶塞插入圆盘

电泳槽的孔洞中，上槽加上槽电泳缓冲液。下槽加硼酸缓冲液（pH9）。

上槽接负极，下槽接正极。

电泳开始后，保持每管通过的电流为 2 mA，直至溴酚兰指示剂离管下端 0.5 厘米左右关机（约需 80 至 90 分钟时间）。

上、下槽电极缓冲液过滤后回收，可重复使用 4 次。

血痕浸出液的制备：取血痕纱布约 0.5 平方厘米，剪碎置小试管中，加 5% 蔗糖水 0.1 毫升于 4℃ 下浸泡过夜。浸泡液加 0.15 毫升氯仿充分振荡使过量之血红蛋白凝固，再于 4000rpm 离心 10 分钟，最上层之带红色透明液即为血痕浸出液。

若此液之颜色太浓超过按 1/20 比例加血红蛋白溶液之血清标本颜色，即表示其中所含血红蛋白量太多，这时重复加氯仿 2~3 次，充分振荡后离心。

四、显色 经电泳后的凝胶管用 10 厘米长的 6 号注射针头沿管壁边进针边推水剥出凝胶柱。先于清水中浸泡片刻（此步骤可使显色清晰），后移入已加有 30% 过氧化氢液 6 滴的醋酸联苯胺染色液（12 管用 50 毫升左右），短时即可见凝胶柱上逐渐显出兰色区带，约 5 分钟后，一般所有区带都应显示出来。个别区带显现较慢者可以适当延长显色时间。然后将凝胶柱小心用自来水冲洗，尽量冲去醋酸联苯胺染色液。最后将凝胶柱移置白色背景下仔细观察区带分型（随放置时间的延长，区带的颜色会慢慢变为棕褐色）。

五、定型标准 凝胶柱经过显色后，可见电泳速度最快的区带为血红蛋白带（阳极端）。此带的颜色一般较深、区带较宽。

如果凝胶柱上血红蛋白带后面只有一条色深的区带（在 7 厘米长的凝胶柱上，按上述电泳条件，此带离血红蛋白带约 1~1.5 厘米）称为 Hp^{1-1} 型如图（1）所示。

Hp^{2-2} 型则在远离“1”带的凝胶阴极端有数条界线清楚的区带（有时多达 8 条），其中跑在最前面的一条带其色泽较后面一条明显淡薄。这些区带分布密集。如图（3）。

Hp^{2-1} 型则同时具有 1-1 型与

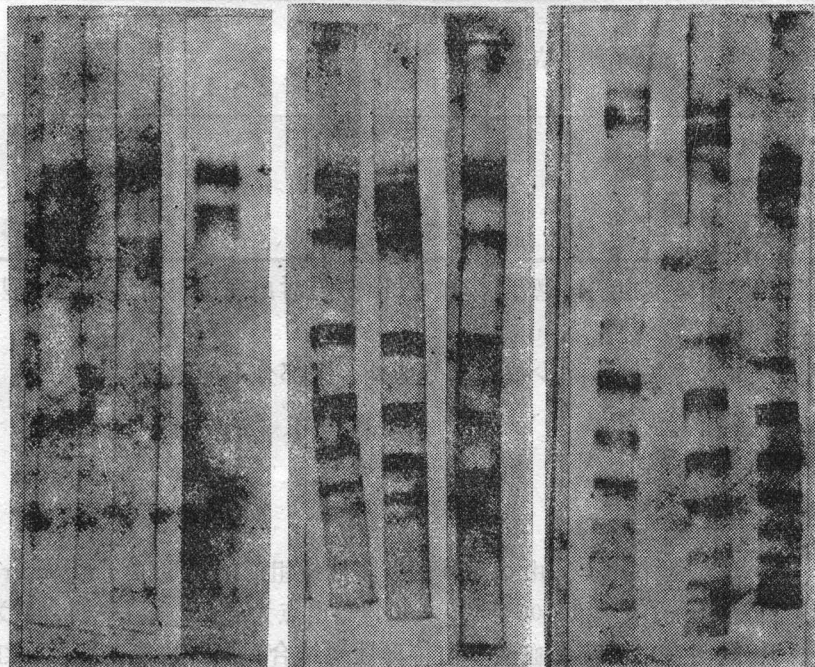


图 1 Hp^{1-1} 型

图 2 Hp^{2-1} 型

图 3 Hp^{2-2} 型

2—2型的全部区带,而且在“1”带后面“2”带区的第一条带颜色特别深。如图(2)。

不出现Hp区带者,称为Hp0—0型。

实 验 结 果

1. 501例正常人血清Hp各型分布情况如表1。

表1 501例正常人血清Hp各型分布情况

Hp 型 别	例 数	%
0~0	2	0.4
1~1	63	12.57
2~1	187	37.33
2~2	249	49.7
合 计	501	100.00

2. 31例3天时间的血痕Hp型别测定的结果如表2。

表2 31例3天时间的血型Hp型别测定结果

Hp 型 别	血清测定结果	血 痕 测 定 结 果			误 判 率*
		1~1	2~1	2~2	
1~1	5	5			0
2~1	7	2	3	2	4/7(57.0%)
2~2	19	2	8	9	10/19(52.6%)

* 误判率指血清Hp型别作血痕Hp分型时出现错误结果数与本型血清标本例数的比例。

一周后的血痕,除少数可以分型外,大部分不能定型。

讨 论

一、Hp的生化特性

Hp是血清中的一种由 α 、 β 两条多肽链组成的糖蛋白(glycoprotein),为纤维母细胞合成。分子量100,000至400,000,等电点为4.1,血清中的含量为100~260毫克/分升。Hp能与血中游离的血红蛋白特异性地结合,同时也能与变性血红蛋白结合。这种结合相当稳定⁽¹⁾。肝硬变等肝脏实质性损害时血中Hp的含量下降,在炎症、外伤、肾病、

冠状动脉疾患、恶性肿瘤等时Hp的含量上升。头部受伤时血中Hp的水平也会变动^(8,9)。

Hp在纸上电泳时的移动度如 α_2 球蛋白，而Hp—Hb(血红蛋白)复合物的移动度则与 β_1 球蛋白相当⁽¹⁾。

二、Hp的定型标准

关于Hp电泳区带的分型，有过许多报道。有些学者将有上述三种区带外，还附有其他区带或不典型的称为变异型：如将“1”带比平常2—1型的“1”带色更浓，而“2”带部分比平常2—1型的“2”带较淡的称为变异的2—1型。

还有Hpca型，2—1Ca型，2—1M型，J—1型以及K—1型等等。

1962年，Connell等报道，将Hp提纯用mercaptoethanol还原裂解后，在含有8M尿素的酸性淀粉凝胶中电泳时，可见Hp^{1F}带分为Hp^{1F}(表示泳动速度快)和Hp^{1S}(表示泳动速度慢二条带)^(10,11)。

1963年，Nance等提出不仅Hp¹可以分成Hp^{1F}和Hp^{1S}，就连Hp²也还可以再分为2FF，2SS，2FS，2SF⁽¹²⁾。

但是，由于技术的复杂性，一般实验室还难以做到。

其实，2—1型的变异型和2—1型只有很小的差异⁽⁸⁾。Ca型也是2—1型，只不过“2”带部分的浓度较2—1型时更高些。所谓K—1型者实际上也可归为1—1型⁽⁸⁾。

在一般实验室，如果根据凝胶柱上出现的主要区带来划分，都易于区分为1—1，2—1，2—2三种类型。

国外报道有少数人为无Hp血症(ahaptoglobinemias)，即Hp0—0型⁽⁹⁾。所以出现这种情况，有的学者认为可能有潜在性疾病，如溶血性疾病，这种溶血足以消耗血液里的Hp，用普通的检验技术又发现不了，或认为是由于有其他抑制性遗传基因⁽⁹⁾。在某些情况下组蛋白也会抑制Hp/Hb复合物的过氧化酶活性而不显色⁽¹³⁾。

国内一些作者报道的Hp0—0型出现率很低，最高的1.56%⁽⁷⁾、最低的为0^(5,6)。本组501例出现两例(0.4%)。

值得一提的是在确定Hp为0—0型(即无Hp血症)时，必须谨慎。有怀疑时最好将凝胶柱装入盛有蒸馏水的试管中在白色背景下进行观察。有的时候，这些实际上是很弱的2—2型。一般1—1型或2—1型误为0—0型或其他型的可能性极小(图4)。

三、国内外部分作者Hp分型测定结果如表3，

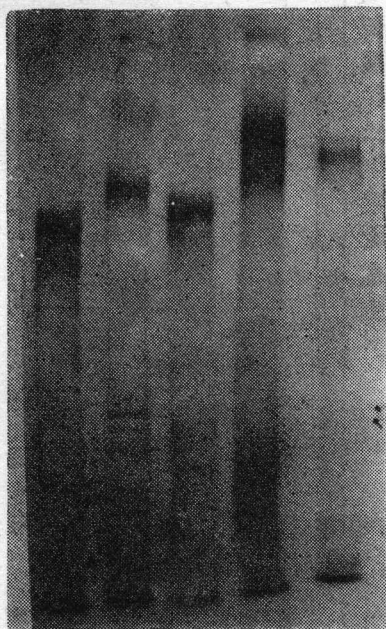


图4 微弱的Hp2—2型(易误为Hp0—0型)

表3 国内外部分作者测定血清Hp型别分布结果比较表

作者	检查人数	表 现 型			基 因 频 率			X ²	P
		Hp ¹⁻¹ (%)	Hp ²⁻¹ (%)	Hp ²⁻² (%)	Hp ⁰⁻⁰ (%)	Hp ¹	Hp ²		
夏其昌等 ⁽⁵⁾	103	8.74	41.75	49.51	0	0.2961	0.7039	1.8724	>0.5
李腾铭等 ⁽⁶⁾	200	16.5	33.0	50.5	0	0.33	0.77	0.3395	>0.5
上海生物所等 ⁽⁷⁾	1,155	11.17	43.98	43.29	1.56	0.3369	0.6631	11.2595	0.01<P<0.05
孔禄卿等 ⁽⁸⁾ (未发表)	1,231	9.91	35.34	53.94	0.81	0.2572	0.6650	4.6683	>0.05
上海市E化所 (未发表) ⁽⁹⁾	500	9.4	34.0	56.4	0.2			5.434	>0.05
北京一二六所 ⁽³⁾	200	11	40	49	0			1.325	>0.5
丰增翼等 ⁽¹⁵⁾	1,009	6.9	38.6	53.3	1.2*(1)	0.2653*(2)	0.7347	15.36	<0.01
Nakashima等 ⁽¹⁴⁾	437	4.92	34.09	60.99	0	0.22	0.78	24.65	<0.01
Allison等 ⁽⁹⁾	180	10.1	55.5	31.7	2.7			31.28	<0.01
Galatius-Jensen ⁽⁹⁾	2,050	16.0	47.2	36.6	0.2	0.397	0.603	30.08	<0.01
本 文	501	12.57	37.33	49.7	0.4	0.3136	0.6864		

* (1) 包括1例(0.1%) Hp2J-1型

(2) 此处的Hp¹基因频率系Hp¹¹与Hp¹²之和。

与本组测定结果比较可发现, 本组与夏其昌、李腾铭、孔禄卿、“一二六所”等的实验结果其Hp型别分布的构成比无显著差异, 但与上海生物制品所等单位对广西1,155名壮族人Hp型别分布的调查结果的差异有著显意义。此外, 与日本、丹麦、英国人群中Hp型别调查结果的差异都有极显著意义。

这一现象说明Hp型别的分布有种族差异。广西壮族人群其Hp²⁻¹型所占比例特高, 而Hp²⁻²型的比例偏低。日本人群中则Hp²⁻²型所占比例特高。而Hp¹⁻¹型所占比例很低。丹麦、英国人群Hp²⁻¹型比例也很高。

这样的差异无疑在人类学上会有一定的意义。

四、Hp分型在亲子鉴定方面的应用

Hp的多形性由遗传决定, 同其他遗传特性一样, 同受孟德尔遗传规律控制, 这一点已被公认。关于其遗传基因, 学者意见不一。有认为存在两个等位基因Hp¹和Hp²(⁹), 也有认为存在Hp^{1F}、Hp^{1S}和Hp^{2FF}、Hp^{2SS}、Hp^{2FS}、Hp^{2SF}这样多等位基因(¹⁰⁻¹²), 还有认为存在有Hp⁰基因的(⁸)。这些基因除Hp⁰外都是共显性的。如果是Hp⁰基因的纯合子, 其表现型就是0-0型。

从1955年Smithies等首先发现Hp的多形性并确定是由遗传决定以来, 有一些国家已利用它(如丹麦自1957年开始)作为法医学物证检验的一个手段应用于亲子鉴定(⁹)。

但由于Hp分型受影响的因素较多(如新生儿只有10%可测出, 4个月以前的小儿还有11%不能测出, 个别情况直至15岁以后Hp分型才可能; 许多疾病, 如急性肝炎、肝硬化、尿毒症、阿迪森氏病, 白血病、冷球蛋白血症、溶血性贫血、特发性贫血等都可能出现无Hp血症(⁹)。毫无疑问, 这样的情况会影响到Hp分型在法医学实际检案中的应用。

五、关于干燥血痕的Hp分型。

到目前为止, 尽管有少数作者介绍成功地在血痕中进行Hp分型(^{3, 4})。据我们重复这方面的研究, 发现3天时间的血痕, 由于其中所含的血红蛋白量过多, 用通常清除多余血红蛋白的氯仿方法效果不佳, 往往在Hb带至“1”带区间全部染上颜色, 造成对有无“1”带的误判, 3天时间的血痕误判率高达57%, 因而丧失了其分型的价值(图5)。超过7天的血痕, 除个别外, 大部分血痕的Hp区带都显现不良。这可能是Hp易于变性, 特别是在受热、酸、碱、有机溶媒或重金属离子等作用时。实际上, 在法医学检案中, 日常所碰到的大部分检材都是这种血痕材料, 显然, 这限制了它的实际应用。对这方面的问题, 还须继续探讨。

但是, Hp的型别是终生不变的, 尽管有些疾病可能引起无Hp血症。而且超过4个月的儿童, 其Hp98~99%可以定型(⁹)。经过大量的家庭, 母亲一子女和双胞胎的调查证明(⁹)检查结果与预期的遗传规律相符合。作为亲子鉴定的手段之一, 在排除了明显的疾病状态外, Hp分型还是可靠的。

此方法易于掌握, 条件要求不高, 一般法医学实验室都可以推广。



图5 3天时间血痕(血清Hp²⁻²型)Hp分型结果

小 结

一、本文用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法测定了广州地区501名健康成人血清Hp型别,经统计学处理,其分布情况与国内作者在北京、上海地区调查结果无显著差异,但与广西壮族人群中调查的结果以及国外报道的结果之差异有显著意义,说明Hp型别的分布有种族差异。

二、对31份血痕的Hp型别进行了检测,结果3天内的血痕虽可分型,但误判率较高,7天后血痕的Hp分型未能成功。

(本文图片由肖建中同志协助摄制,黄金奇、高翔同志协助工作,谨表谢意)

参 考 文 献

- [1] Allison A C et al: The binding of Hb by plasma proteins (haptoglobin). Brit Med J 2:1137, 1957
- [2] Smithies O: Zone electrophoresis in starch gels: Group variation in the serum proteins of normal human adults. Biochem J 61:629, 1955
- [3] 公安部一二六研究所法医研究室:应用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法检验血痕中的Hp型。内部资料, 1980
- [4] Blake E T and Sensabugh G F: Hp typing of bloodstains: Electrophoresis of immunoprecipitated Hp. Forensic Sci Soc J 18:237, 1978
- [5] 夏其昌等:应用淀粉凝胶电泳法测定一个中国人群体的Hp型。复旦大学学报(8):121, 1963
- [6] 李腾铭等:200例血清结合珠蛋白分型的研究。遗传学报(6):117, 1979
- [7] 上海生物制品所等:广西壮族ABO、MN、P、Rh、分泌型、Hp型分布。新医学(5):546, 1974
- [8] 孔禄卿等:上海居民Hp血清型的分析研究。(未发表)
- [9] Frank Lundquist: Methods of Forensic Science Vol I, p497~535, 1962
- [10] Connell G E: Subdivision of the three common Hp types based on "Hidden" differences. Nature 193:505, 1962
- [11] Eloise R Giblett et al: Hp Subtypes in three racial groups. Nature 197:576, 1963
- [12] Nance W E and Smithies O: New haptoglobin alleles; A prediction confirmed. Nature 198:869, 1963

- [13] Giannitsis D J: Inhibitory effect of histone on the peroxidase activity of the Hp/Hb Complex. J Clin Chem Clin Biochem 15:509, 1977
- [14] Nakashima et al: Distribution of haptoglobin types, ABO, MN, and D (Rho) blood groups in Amami Oshima Island, Japan. Med J, Kagoshima Univ. 31(3):501~504, 1979
- [15] 丰增翼等: The Distribution of Hp₂ subtypes in a Japanese population. 日本法医学杂志 34(2):125, 1980

Determination of Sera Hp(haptoglobin) Types in Guangzhou Population

Wu Xinyao Chai Ruibo

Director: Kuo Jingyuan

(Department of Forensic Medicine, Zhong Shan Medical College)

Abstract

Sera Hp types of 501 normal adults in Guangzhou were determined by polyacrylamide gels disc electrophoresis. The results are Hp¹⁻¹12.57%, Hp²⁻¹37.33%, Hp²⁻²49.7%, Hp⁰0.4%. It is found that the difference between different races is statistically significant as compared with those determined by some authors at home and abroad.

At the sametime, the method was also used to determine Hp types of 31 bloodstains. It had been found that the misjudgement rate of Hp types of 3-day-bloodstains was very high, and the Hp bands of 7-day-bloodstains revealed themselves badly, so that the practical application of the Hp typing of bloodstain for case work was still difficult.

However, the method can be easily mastered, and the conditions demanded for detection are not complicated. It is worth while to recommend it in forensic medical practice as a routine method for disputed paternity.