

• 论 著 •

CD36c. C275T 基因突变导致 CD36 缺失的研究*

陈洁润, 蒋丽红, 李丽兰[△]

(南宁输血医学研究所/南宁中心血站, 广西 南宁 530003)

[摘要] **目的** 研究在广西 CD36 缺失个体中检测到的 CD36 基因突变 c. C275T, 是否可导致 CD36 缺失和在人群中的发生率。**方法** 采用血小板抗原单克隆抗体特异性免疫固定试验(MAIPA)和流式细胞技术检测确定广西地区 1 位汉族男性个体(XXX)的 CD36 表型, 应用 CD36 外显子测序、cDNA 克隆测序对其 CD36 缺失的分子基础展开研究, 构建真核表达细胞株及应用蛋白免疫印迹试验(Western blot)验证所检测到的 CD36 突变基因对 CD36 表达的影响。应用所建立的针对该突变基因的 DNA PCR-SSP 基因分型方法, 在随机的无血缘关系的 1 026 名广西地区人群中行人群分布调查。**结果** 经 MAIPA 和流式细胞技术检测鉴定 XXX 的 CD36 表型为 II 型 CD36 缺失。CD36 外显子测序发现其具有 CD36c. C275T(p. Thr92Met) 突变, 为突变杂合子, CD36cDNA 克隆测序发现该个体具有 c. 275C>T(p. Thr92Met) 突变型和 CD36 野生型 2 种 CD36 mRNA 转录本。通过建立的真核表达细胞株及 Western blot 验证结果显示 CD36 c. 275C>T 异常转录本可导致 CD36 表达缺失。该基因突变在人群的发生率研究显示, 在随机的 1 026 名广西人群中, CD36 c. 275C>T 突变的人群发生率为 0。**结论** CD36 基因突变 c. 275C>T(p. Thr92Met) 可导致 CD36 缺失, 并初步阐明了其导致 CD36 缺失的分子基础及在广西地区人群中的分布特征, 为了解中国人群 CD36 缺失的分子基础和特征提供了实验和理论依据。

[关键词] CD36 缺失; 基因突变; 分子机制及特征; 人群分布

DOI:10. 3969/j. issn. 1009-5519. 2023. 05. 003 **中图法分类号:**R394. 3;Q786

文章编号:1009-5519(2023)05-0730-05 **文献标识码:**A

Study of CD36 deficiency caused by CD36c. C275T gene mutation*

CHEN Jierun, JIANG Lihong, LI Lilan[△]

(Nanning Institute of Transfusion Medicine/Nanning Blood Center, Nanning, Guangxi 530003, China)

[Abstract] **Objective** To study whether CD36 gene mutation c. C275T which was detected in individuals with CD36 deficiency in Guangxi could lead to CD36 deficiency and the population incidence of the mutation. **Methods** The CD36 phenotype of a Han Chinese male individual (XXX) in Guangxi was detected by monoclonal antibody immobilization of platelet antigens assay (MAIPA) and flow cytometry (FCM). CD36 exons sequencing and cDNA cloning sequencing were used to study the molecular basis for CD36 deficiency. Eukaryotic expression cell lines were established for the CD36 mutation that was detected and Western blot was used to verify the effect of CD36 expression. The population incidence of the CD36 mutation was investigated among 1 026 random and unrelated individuals in Guangxi population by DNA-based polymerase chain reaction with sequence specific primer (PCR-SSP). **Results** MAIPA and FCM assay showed that the individual was type II CD36 deficiency. CD36 exons sequencing showed that the individual had carried a heterozygous mutation CD36c. C275T (p. Thr92Met), and CD36cDNA cloning sequencing confirmed that there were two kinds of CD36 mRNA transcripts; CD36 mRNA transcript variant c. 275C>T (p. Thr92Met) and wild-type CD36 mRNA transcript. It was verified that CD36 mRNA transcript variant c. 275C>T could lead to CD36 deficiency by the establishment of eukaryotic expression cell lines and Western blot assay. The population incidence of CD36 mutation c. 275C>T was 0 (0/1 026) in Guangxi randomized population. **Conclusion** This study identifies that CD36 mutation c. 275C>T (p. Thr92Met) can result in CD36 deficiency, and preliminary

* 基金项目:广西壮族自治区自然科学基金项目(2016GXNSFAA380143);南宁市科学研究与技术开发计划项目(20173117);广西科学研究与技术开发计划项目(08160-05)。

作者简介:陈洁润(1989—),本科,主管技师,主要从事免疫血液学相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: lililan2010@sina.com。

clarifies the molecular basis of CD36 deficiency and distribution characteristics of the mutation in Guangxi population. It help to provide experimental and theoretical basis for exploring the molecular basis and characteristics of CD36 deficiency in Chinese population.

[Key words] CD36 deficiency; Gene mutation; Molecular mechanism and characteristics; Population distribution

CD36 是 88 kDa 的膜整合糖蛋白,并由多种细胞表达,包括单核细胞/巨噬细胞、血小板和脂肪细胞等。CD36 是一个多功能的受体,可作为血小板反应蛋白、胶原蛋白、与恶性疟原虫感染的红细胞结合的受体,以及氧化的低密度脂蛋白(OxLDL)和长链脂肪酸等的受体,并可能参与巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬作用。CD36 缺乏可分为 2 种表型: I 型 CD36 缺失,其表型特征为血小板和单核细胞表面均出现 CD36 缺乏; II 型 CD36 缺失,其表型特征为仅血小板表面缺乏 CD36 的表达,但单核细胞上 CD36 表达正常^[1]。CD36 缺失个体,可通过输血、妊娠、骨髓移植等途径,免疫产生抗-CD36 同种抗体,从而导致包括免疫性血小板输注无效、输血后紫癜、胎儿(新生儿)同种免疫血小板减少症等免疫性血小板异常临床问题的发生^[2-4]。CD36 缺失个体在高加索人中比较罕见(<0.4%),而在亚洲地区则有较高占比(3%~11%)^[5-6]。在中国乃至亚洲地区中,抗-CD36 抗体是介导免疫性血小板减少症的特征性抗体,其发生率仅次于抗-HLA^[5-6]。在我国广西地区有着较高的 CD36 缺乏比例(4.13%)^[7],抗-CD36 导致的免疫性血小板减少的案例已常见于临床^[3,5-6]。一些 CD36 基因突变可导致 CD36 缺失^[8-11],CD36 c. 275C>T (p. Thr92Met) 是人类基因组测序中发现的基因突变^[12],其是否可导致 CD36 缺失,目前鲜见报道。本研究在广西 CD36 缺乏个体中,发现具有 CD36 c. 275C>T 突变的个体,因此针对该突变基因研究探讨其是否可导致 CD36 缺失,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 先证者(用 XXX 代替),男,1973 年出生,汉族,为本实验室开展的广西地区人群 CD36 缺失频率及分布特征研究中发现和确认的 CD36 缺失个体^[7],其父母和兄均为汉族。以随机的无血缘关系的 1 026 名广西地区健康献血者作为人群调查对象。所有研究对象分别采集静脉血 5 mL,以乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,于-20℃冻存待检。本项目研究按本单位伦理审批意见,于采血前均取得研究对象的知情同意,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 FITC 标记鼠抗人 CD36 单抗(美国 Beckman Coulter 公司);CD36 抗体阳性血清

(经本室检测含抗-CD36 的患者血清),鼠抗人 CD36 单抗(由美国东南威斯康星血液中心馈赠);Puregene DNA Purification Kit(德国 QIAGEN 公司,批号:8850000298),Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号:15596026),One Step RNA PCR Kit(日本 TaKaRa 公司,批号:AJ30794A),pLV4/Strip II-HIS10(深圳盎然生物),Mem-PERTMPlus 膜蛋白提取试剂盒(美国 Thermo 公司,批号:89842Y),PCR 扩增仪(美国 ABI 公司,型号:GeneAmp9700 型),凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:Molecular Imager Gel DocTM XR System),流式细胞仪(BD 公司),酶标仪(美国 TECAN 公司)等。

1.2.2 CD36 表型分析检测 应用本实验室建立的血小板流式细胞荧光免疫检测实验(PIFT-FC)和血小板单克隆抗体特异性免疫固定实验(MAIPA)^[7]检测先证者 XXX 及其家系成员血小板上 CD36 的表达情况。采用本实验建立的单核细胞流式细胞荧光免疫检测试验(MIFT-FC)^[7]检测先证者 XXX 及其家系成员单核细胞上 CD36 表达情况,以鉴定相关的 CD36 表型。

1.2.3 DNA 和 RNA 提取 利用 Puregene DNA Purification Kit 按照说明书提取研究对象血液样本 DNA,于-20℃保存备用。使用 Trizol 试剂盒提取样本总 RNA,于-80℃保存备用。

1.2.4 CD36 基因检测 按本实验室建立的方法^[8-9],对先证者 XXX 及其家系成员进行 CD36 基因(参考序列:NG_008192.1,下同)第 3~14 外显子测序;反转录扩增获取先证者 XXX 个体包含 CD36 mRNA(参考序列:NM_000072.3,下同)开放阅读框(Open Reading Frame,ORF)序列全段的 cDNA(简称 CD36 cDNA),所获得的 CD36 cDNA,按本实验室建立的方法^[10],构建包含 CD36 cDNA 和荧光报告基因 EGFP 的 pLV4/StripII-HIS10 真核表达质粒(简称 CD36-EGFP 真核质粒),转化大肠杆菌,筛选培养,挑取克隆菌落 60 个,进行菌落 PCR,琼脂糖凝胶电泳后,挑选有目的条带的阳性克隆菌液 30 管,测序检测。

1.2.5 真核稳定表达细胞株的建立及蛋白免疫印迹试验(Western Blot)验证 按本实验室建立的方法^[10],将 CD36-EGFP 真核质粒转染入 CHO-K1 细

胞系,筛选和建立包含 CD36 cDNA 异常转录本的真核表达细胞株(MT-CD36 细胞株),并建立包含 CD36 cDNA 野生型转录本的真核表达细胞株(WT-CD36 细胞株)作为蛋白印迹试验阳性对照,和建立仅包含 EGFP 报告基因的真核表达细胞株(EGFP-细胞株)作为蛋白印迹试验阴性对照。所建立的真核表达细胞株均提取细胞株的 RNA,通过反转录扩增测序检测和认证所建立细胞株对所转染的目的基因片段的表达状态。

按参考文献[9]方法,使用 Mem-PERTM Plus 膜蛋白提取试剂盒提取所建立真核表达细胞株的细胞膜蛋白,应用 Western blot 方法检测这些真核表达细胞株 CD36 蛋白的表达情况。

1.2.6 CD36 突变基因的人群分布调查 应用本实验室专利技术^[10]中包含的针对所发现的 CD36 基因新突变建立序列特异性引物聚合酶链式反应(PCR-SSP)基因分型检测方法,对 1 026 名广西地区随机人群进行基因分型检测分析。

2 结 果

2.1 CD36 表型分析结果及突变基因的人群分布调查 先证者 XXX 其血小板 CD36 表达阴性,而其单核细胞 CD36 表达阳性,为 II 型 CD36 缺失个体;其母血小板和单核细胞上均不表达 CD36,为 I 型 CD36 缺失个体;其父和其兄血小板和单核细胞上 CD36 表达均为阳性,均为 CD36 表达阳性个体。未发现具有 CD36 c. 275C>T 突变的个体,该突变在广西地区人群中的发生率为 0(0/1 026)。见表 1、图 1。

表 1 CD36 c. 275C>T 在广西地区人群中的分布情况 (n=1 026)

CD36 基因型	所占百分比
c. 275 C/C	1 026(100.00)
c. 275 C/T	0
c. 275 T/T	0

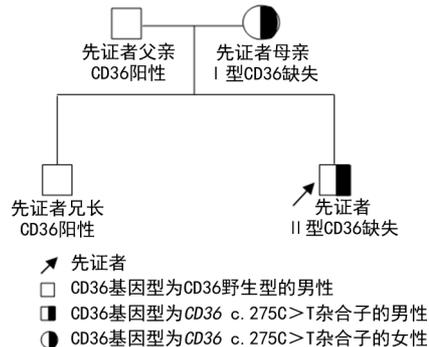


图 1 先证者家系 DNA 遗传图谱

2.2 CD36 基因检测结果

2.2.1 CD36 第 3~14 外显子测序结果 先证者 XXX 及其母亲均具有 CD36 c. 275C>T (p. Thr92Met) 突变,为突变杂合子,该突变位于外显子 4,其余外显子 3 和 5~14 均未见基因突变;其父和其兄 CD36 外显子 3~14 均未见突变(图 1、2)。

2.2.2 CD36 cDNA 克隆测序结果 先证者 XXX 包含 CD36 c. 275C>T (p. Thr92Met) 异常转录本和 CD36 的野生型转录本 2 种(图 3)。

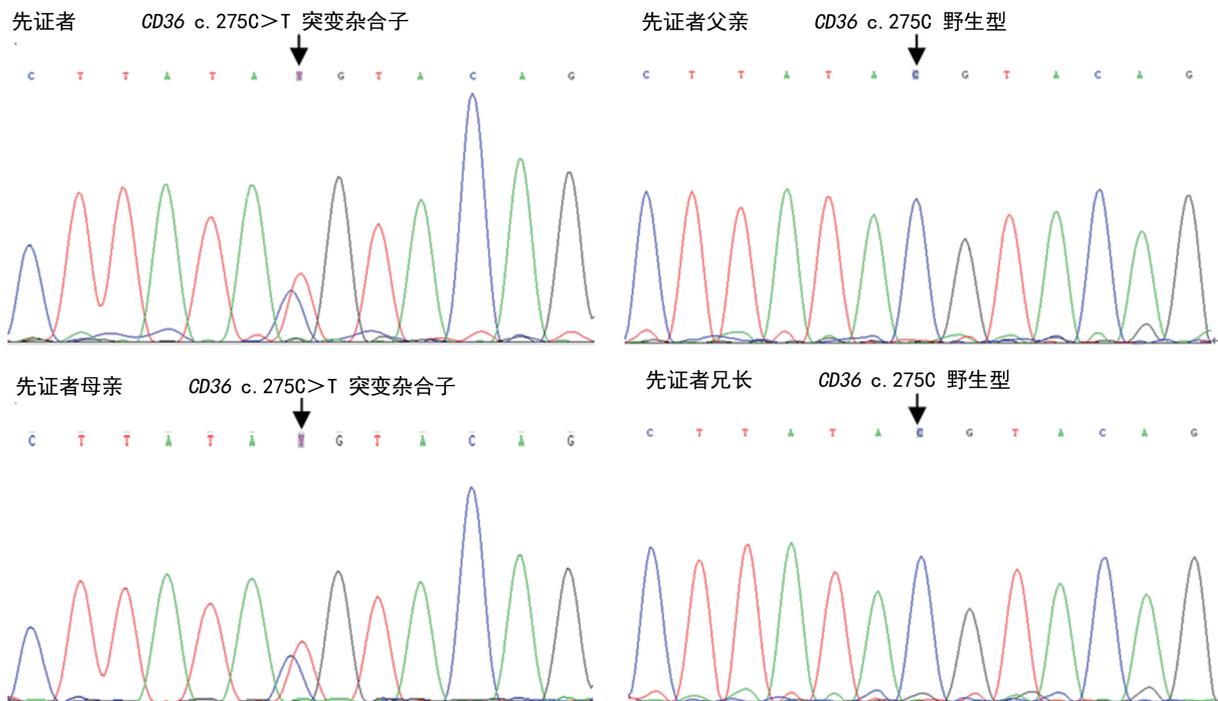


图 2 先证者及其家系成员 CD36 外显子 3~14 测序结果

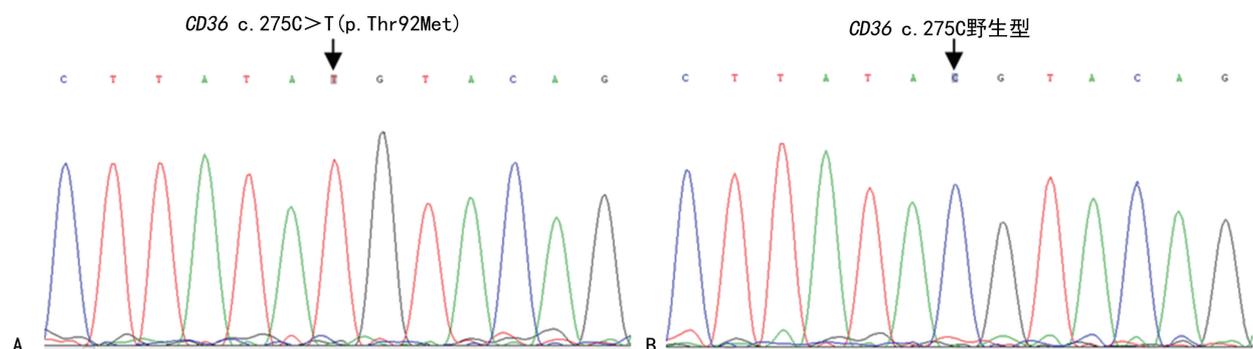
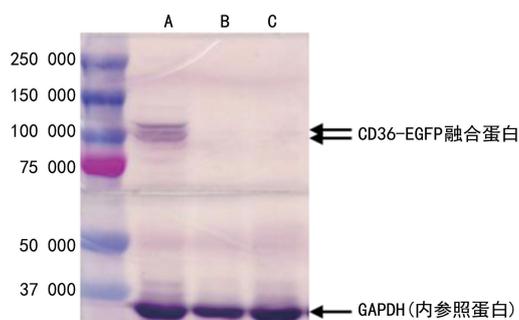


图 3 先证者 CD36 cDNA 克隆测序结果

2.3 真核稳定表达细胞株的建立和 Western Blot 验证结果 成功建立了表达 CD36 c. 275C>T 异常转录本的真核表达细胞株 (MT-275 细胞株), 以及表达 CD36 野生型转录本的真核表达细胞株 (WT-CD36 细胞株) 和单纯表达 EGFP 荧光报告基因的真核表达细胞株 (EGFP-细胞株), 通过 mRNA 的反转录扩增测序确证以上所建的细胞株所表达的 CD36 cDNA 序列和 (或) EGFP 基因序列与转染接入的基因片段均一致。

Western Blot 验证结果显示, 所建立的 MT-275 细胞株和 EGFP-细胞株 (阴性对照) CD36 蛋白表达均为阴性, 而 WT-CD36 细胞株 (阳性对照) CD36 表达阳性 (图 4)。



注: A. WT-CD36 细胞株 (阳性对照); B. MT-275 细胞株; C. EGFP-细胞株 (阴性对照)。

图 4 Western Blot 验证结果

3 讨论

CD36 基因位于染色体 7q11.2 上, 具有 15 个外显子。其中外显子 1、2 和 15 不编码蛋白质。外显子 3、14 分别编码 CD36 蛋白的 N 端和 C 端结构域 (由 472 个氨基酸组成的肽链)^[13]。CD36 缺失可由 CD36 基因突变所导致, 不同地区、不同人群导致 CD36 缺失的分子特征有所不同, 在 CD36 缺乏高比例较高的广西人群中, 已发现和报道了多个可导致 CD36 缺失的基因新突变^[7-9]。本研究在广西地区 CD36 缺失个体中发现有个体具有 CD36c. C275T (p. Thr92Met) 突变基因, 因此针对该突变, 是否为该个体导致 CD36 缺

失的分子基础和在人群分布进行了研究。

具有该 CD36 基因突变的个体是 1 名广西汉族男性健康个体 (XXX), 经 CD36 表型鉴定该个体为 II 型 CD36 缺失。为探讨其导致 CD36 缺失的分子基础, 本研究在 DNA 水平, 应用外显子测序探讨其所涉及编码 CD36 蛋白外显子的 DNA 序列变化情况, 发现该个体具有 CD36 c. 275 C>T 突变杂合子 (图 1、2), 该突变位于 CD36 外显子 4; 从 mRNA 水平, 探讨其导致 CD36 mRNA 转录遗传信息的变化情况, 应用 cDNA 克隆测序发现该个体存在 CD36 c. 275 C>T 和 CD36 野生型 (c. 275C) 2 种 CD36 mRNA 转录本 (图 3), 其中 CD36 c. 275 C>T 异常转录本可使编码 CD36 蛋白的第 92 位氨基酸由苏氨酸 (Thr) 改变为甲硫氨酸 (Met) (CD36 p. Thr92Met), 使 CD36 蛋白氨基酸序列发生改变。本研究通过建立真核表达细胞株和 Western Blot, 探讨 CD36 mRNA 异常转录本 c. 275 C>T (p. Thr92Met) 对 CD36 蛋白表达的影响, 表明携带 CD36 c. 275 C>T 异常转录本的真核表达细胞株 (MT-275 细胞株) CD36 表达阴性, 与阴性对照细胞株 (EGFP-细胞株) 结果一致, 而携带 CD36 野生型转录本的真核表达细胞株 (WT-CD36 细胞株) CD36 表达为阳性 (图 4), 证实了该 CD36 mRNA 异常转录本可导致 CD36 表达缺失。

在家系调查中, 发现先证者其父亲和兄长 CD36 表型均为 CD36 表达阳性, CD36 DNA 外显子和 mRNA 均为野生型, 而其母亲 CD36 表型为 I 型 CD36 缺失, 其 CD36 DNA 外显子序列与先证者一致均为 CD36 c. 275 C>T 突变杂合子 (图 1、2), 表明先证者的突变基因遗传自其母亲。

目前, 在研究报道中, CD36 突变杂合子可见于 CD36 表达阳性个体、I 型 CD36 缺失个体和 II 型 CD36 缺失个体, 本研究先证者及其母亲均具有 CD36 DNA c. 275 C>T 突变杂合子, 而 CD36 表型分别为 II 型和 I 型 CD36 缺失, 与既往报道的现象相似^[8-9, 13-14]。

为了解该 CD36 基因突变 c. C275T(Thr92Met)在广西地区人群中的发生情况,应用所建立的 CD36c. C275T PCR-SSP 基因分型技术方法^[10],在广西地区人群中展开调查研究,发现该 CD36 突变在广西地区人群中的发生率为 0(0/1 026),在本人群调查的 1 026 名个体中均未发现具有 CD36 c. 275 C>T 突变基因型的个体(表 1),表明该基因突变在广西地区人群中是一个比较罕见的类型。

综上所述,本研究 CD36 基因突变 c. C275T(Thr92Met)可导致 CD36 缺失。该突变基因在广西地区人群中是一个罕见的突变型。本研究有助于了解中国地区人群 CD36 缺失发生的分子基础。

参考文献

[1] YAMAMOTO N, AKAMATSU N, SAKURABA H, et al. Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes[J]. Blood, 1994, 83(2):392-397.

[2] 吴国光,周燕,钟周琳,等. 抗-CD36 介导血小板输注无效的实验研究-附 4 例病例报告[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(1):18-21.

[3] CURTIS B R, ALI S, GLAZIER A M, et al. Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV): description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature[J]. Transfusion, 2002, 42(9):1173-1179.

[4] SCHMIDT A, SAHAI T, REFAAL M, et al. Severe platelet transfusion refractoriness in association with antibodies against CD36[J]. Lab Med, 2020, 51(5):540-544.

[5] WU G G. Detection of clinically relevant platelet antibodies in the Asian population[J]. ISBT Sci Ser, 2014, 9(1):112-117.

[6] WU G, ZHOU Y, LI L, et al. Platelet immunol-

ogy in China: research and clinical applications [J]. Transfus Med Rev, 2017, 31(2):118-125.

[7] 钟周琳,申卫东,周燕,等. 广西地区汉、壮和瑶族人群 CD36 缺失结构实验分析和特征研究[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(1):14-17.

[8] 李丽兰,何保仁,周燕,等. CD36 基因新突变 T538C(Trp180Arg)导致的 CD36 缺失和序列特异性引物 PCR 的基因分型技术的建立[J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33(5):619-624.

[9] 李丽兰,陈洁润,蒋丽红,等. 位于 CD36 基因剪切位点的 2 个新突变及其导致 CD36 缺失的分子基础[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(6):2056-2065.

[10] 李丽兰,吴国光. 一种检测由 6 个 CD36 突变基因所导致 GPIV 缺失的基因分型试剂盒[P]. 中国:CN201910908778. 5. (2019-09-25)[2020-09-15]. <https://pss-system.cponline.cnipa.gov.cn/retrieveList?prevPageTit=changgui>

[11] RAC M E, SAFRANOW K, PONCYLJUSZ W, et al. Molecular basis of human CD36 gene mutations[J]. Mol Med, 2007, 13(56):288-296.

[12] NM_001001548. 3 (CD36): c. 275C>T (p. Thr92Met) [EB/OL]. (2022-04-10) [2018-01-12]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/908922/?new_evidence=false.

[13] RAC M, SAFRANOW K, PONCYLJUSZ W, et al. Molecular basis of human CD36 gene mutations[J]. Mol Med, 2007, 13(5/6):288-296.

[14] IMAI M, TANAKA T, KINTAKA T, et al. Genomic heterogeneity of type II CD36 deficiency[J]. Clin Chim Acta, 2002, 321(12):97-106.

(收稿日期:2022-05-22 修回日期:2022-11-12)