

文章编号:1671-7554(2007)06-0569-04

山东地区5844例脐血HLA I类等位基因多态性分析

戴云鹏¹, 阎文英², 沈柏均², 王红美¹

(1. 山东大学临床医学院山东省立医院小儿血液科, 山东 济南 250021;

2. 山东省脐血造血干细胞库, 山东 济南 250021)

[摘要] 目的:研究山东地区脐带血HLA I类(HLA-A,-B)等位基因的分布特征,探讨中国其他地区及世界不同种族利用山东脐血供者进行造血干细胞移植的可能性。方法:应用PCR-SSO方法对山东地区5844例无血缘关系的汉族健康新生儿脐带血进行了HLA-A,-B等位基因的分布调查。结果:HLA-A等位基因,检出20种;HLA-B等位基因,检出46种。通过与不同地域汉族人群的比较显示:在不同种族的人群中有其各自独特的人群分布特征,在不同地域的同一民族人群中亦有其独特的地理分布特征。结论:山东脐血HLA I类基因具有多态性,能够代表山东汉族人群HLA的分布特征,北方人在山东脐血库中最容易寻找到HLA I类等位基因相合的异基因脐血供者,而南方人找到的机率较北方人稍低。

[关键词] 胎血;抗原,CD;多态性,单核苷酸**[中图分类号]** R394.5 **[文献标识码]** A

The allele polymorphisms of HLA class I (HLA-A and -B) of the umbilical cord blood of 5844 Shandong people

DAI Yun-peng¹, YAN Wen-ying², SHEN Bai-jun², WANG Hong-mei¹

(1. Department of Paediatrics, Shandong Provincial Hospital, School of Clinical Medicine, Shandong University, Jinan 250021, Shandong, China; 2. Shandong Umbilical Cord Stem Cell Bank, Jinan 250021, Shandong, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the HLA-A and -B allele polymorphisms in the umbilical cord blood of Shandong people. **Methods:** 5844 umbilical cord blood samples were drawn from the Shandong umbilical cord bank and determined by the polymerase chain reaction-sequence specific oligo-nucleotide (PCR-SSO) method. **Results:** Twenty alleles at HLA-A locus and forty-six alleles at HLA-B locus were detected. Of the twenty HLA-A alleles, the most prevalent five alleles were A*02(0.3041), A*11(0.1443), A*24(0.1434), A*30(0.0975) and A*33(0.0859), and the least prevalent alleles were A*34(0.0006), A*25(0.0005), A*66(0.0005), A*74(0.0004) and A*36(0.0001). Of the forty-six HLA-B alleles, the most prevalent five alleles were B*13(0.1348), B*51(0.0713), B*62(0.0712), B*61(0.0676) and B*60(0.0642), and the least prevalent alleles were HLA-B*77(0.0001), B*76(0.0002), B*47(0.0003), B*42(0.0003) and B*72(0.0004). Comparing the HLA-A and -B gene frequencies of Shandong umbilical cord blood samples with those of other Han Chinese, there were unique distribution features of the HLA-A and -B alleles among the populations studied from various regions with the same racial origin. The differences from various regions of the same race were fewer than those from different races. **Conclusion:** The HLA-A and -B alleles in Shandong umbilical cord blood have a rich polymorphism, which represents the distribution characters of the HLA-A and -B alleles in Shandong Hans. For a patient of northern Han Chinese it is easy to search for a HLA-A or -B matched cord blood donor from the Shandong umbilical cord blood bank. For a patient of southern Chinese it is possible

[基金项目] 山东省卫生厅青年科学基金资助项目(2005026)。**[作者简介]** 戴云鹏(1973-),男,医学博士,主治医师,主要从事小儿血液肿瘤及HLA相关性研究。

to receive a transplant of cord blood stem cells matched with HLA-A or B from the Shandong umbilical cord blood bank.

[KEY WORDS] Fetal blood; Antigens, CD; Polymorphism, single nucleotide

脐血造血干细胞由于具有原始、分化增殖能力强、移植后的免疫排斥反应和移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)程度轻、来源广泛、对供者无任何不良影响等优点,近年已成为异基因造血干细胞移植的最佳干细胞来源之一。在治疗白血病、再生障碍性贫血、免疫缺陷、某些遗传性疾病和恶性肿瘤等得到越来越广泛的临床应用^[1]。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)在同种组织器官移植中是导致移植排斥的主要抗原,并在机体的免疫应答、免疫调节及免疫分化中起重要作用,是移植成功与否的关键环节。HLA最主要的特征是具有高度多态性,并存在明显的地区和民族差异^[2]。本研究应用聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探针技术(polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide, PCR-SSO)对山东地区5 844例无血缘关系汉族健康新生儿脐血进行HLA-A、-B等位基因分布调查,并与相关文献中其他人种和不同地域的汉族人群作比较分析,进而探讨中国广大地区及世界其他地区的人群利用山东脐血库中A、B位点相合的脐血造血干细胞进行移植的可能性。同时为HLA在山东地区的群体免疫遗传学和其他组织器官移植的应用和科学研究提供并积累基础资料。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 样本 在脐血库采集的标本中,选取父母双方籍贯皆为山东,民族为汉族的无血缘关系的健康新生儿脐带血共5 844份(EDTA抗凝)。采样之前

对每例新生儿的父母亲进行了有关家族遗传代谢病史,艾滋病、乙肝、丙肝、梅毒等多种病原进行了调查和检测,全部符合要求后进行HLA-A、-B位点等位基因分型。

1.1.2 仪器与试剂 SmartSpec™ 3000型紫外分光光度计、Fast™ DNA提取试剂盒均购自美国Biorad公司;SSO-HLA分型试剂盒购自英国Dynal公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 从全血中提取基因组DNA,按说明书进行操作。测定DNA溶液的纯度和浓度,当OD₂₆₀/OD₂₈₀值在1.6~1.8时,说明DNA纯度较高,调整溶液浓度至50~100 mg/L,备用。

1.2.2 对样本HLA-A、-B等位基因分型 分别对样本HLA-A、-B等位基因进行分型。分别用不同引物,对具有高度多态性的HLA-A、-B位点第二、三外显子基因进行扩增。扩增之后,将扩增产物变性,使其成为单链,加到含有序列特异性寡核苷酸探针的尼龙薄膜上,使生物素标记的扩增产物与膜上探针结合,通过链合亲和素-辣根过氧化物酶与其反应,用H₂O₂和四甲基联苯胺进行显色,记录探针杂交情况,通过Dynal公司提供的分析软件分析出各样品HLA-A、-B的基因型。具体操作方法参照文献[3]。

1.3 统计学处理 基因频率参照赵桐茂^[4]所述方法进行计算,同时应用Excell软件和SPSS10.0统计软件,进行统计学分析。

2 结果

2.1 山东地区脐血HLA-A等位基因分布 见表1。

表1 山东脐血的HLA-A位点等位基因频率分布

HLA-A 基因	等位基因频数	等位基因频率	HLA-A 基因	等位基因频数	等位基因频率
A * 01	592	0.052 0	A * 30	1 084	0.097 5
A * 02	3 014	0.304 1	A * 31	461	0.040 3
A * 03	546	0.047 9	A * 32	232	0.020 1
A * 23	38	0.003 3	A * 33	961	0.085 9
A * 24 [△]	1 556	0.143 4	A * 74	5	0.004 3
A * 25	6	0.000 5	A * 68	103	0.008 9
A * 26	358	0.031 1	A * 69	16	0.001 4
A * 34	7	0.000 6	A * 28	19	0.001 6
A * 66	6	0.000 5	A * 36	1	0.000 9
A * 11	1 565	0.144 3	Blank	833	0.074 0
A * 29	142	0.012 2			

应用 PCR-SSO 技术对 5 844 例山东地区脐血 HLA-A 等位基因进行了分布频率的研究,共检出 20 种等位基因。其中分布频率较高的等位基因依次为: A * 02 (0.304 1), A * 11 (0.144 3), A * 24 (0.143 4), A * 30 (0.097 5) 和 A * 33 (0.085 9); 分布频率较低的等位基因依次为 A * 34 (0.000 6), A * 25 (0.000 5), A * 66 (0.000 5), A * 74 (0.000 4) 和 A * 36 (0.000 1)。

2.2 山东地区脐血 HLA-B 等位基因分布 见表 2。

在对 5 844 例山东地区汉族健康新生儿脐血进行 HLA-B 等位基因检测中,共检出 46 种等位基因,其频率分布相对分散。其中分布频率前五位的等位基因是: B * 13 (0.134 8), B * 51 (0.071 3), B * 62 (0.071 2), B * 61 (0.067 6) 和 B * 60 (0.064 2); 低频率的等位基因是 B * 77 (0.000 1), B * 76 (0.000 2), B * 47 (0.000 3), B * 42 (0.000 3) 和 B * 72 (0.000 4)。

表 2 脐血的 HLA-B 位点等位基因频率分布

HLA-B 基因	等位基因频数	等位基因频率	HLA-B 基因	等位基因频数	等位基因频率
B * 51	803	0.071 3	B * 50	96	0.008 3
B * 52	427	0.037 3	B * 54	325	0.028 2
B * 07	545	0.047 8	B * 55	192	0.016 6
B * 08	131	0.011 3	B * 56	30	0.002 6
B * 44	624	0.054 9	B * 27	246	0.021 3
B * 45	24	0.002 1	B * 35	591	0.051 9
B * 13	1 469	0.134 8	B * 37	168	0.014 5
B * 14	29	0.002 5	B * 60	727	0.124 0
B * 64	8	0.000 7	B * 61	763	0.131 0
B * 65	15	0.001 3	B * 41	11	0.000 9
B * 15	97	0.008 3	B * 42	4	0.000 3
B * 63	30	0.002 6	B * 46	618	0.054 4
B * 77	1	0.000 1	B * 47	3	0.000 5
B * 62	802	0.071 2	B * 48	370	0.032 2
B * 75	365	0.031 7	B * 53	29	0.002 5
B * 76	2	0.000 2	B * 59	12	0.001 0
B * 38	288	0.025 0	B * 67	125	0.010 8
B * 39	199	0.017 2	B * 71	201	0.017 4
B * 57	215	0.018 6	B * 70	41	0.003 5
B * 58	475	0.041 3	B * 22	13	0.001 1
B * 40	48	0.004 1	B * 81	19	0.001 6
B * 18	67	0.005 6	B * 5	15	0.001 3
B * 49	27	0.002 3	B * 72	5	0.000 4
Blank	334	0.029 01			

2.3 山东地区脐血与其他人群的部分 HLA-A, -B 基因频率比较 见表 3。

表 3 山东与不同地区部分 HLA-A, -B 基因频率的比较

HLA 基因	不同地区基因频率			
	山东	天津 ^[5]	江浙沪 ^[6]	广州 ^[7]
A * 1	5.2	5.16	2.22 [△]	0.49 [△]
A * 3	4.785	4.68	1.61 [△]	1.11 [△]
A * 24	14.341	14.84	16.93	22.16 [△]
A * 66	0.513 4	0.11	0.66	33.42 [△]
A * 30	9.749	7.39	5.89	2.12 [△]
B * 7	4.78	3.28	1.46 [△]	1.49 [△]
B * 8	1.12	1.19	0.61 [△]	0.12 [△]
B * 44	5.49	5.16	2.23 [△]	1.49 [△]
B * 14	0.248 5	0.51	0.04 [△]	0.12 [△]
B * 50	0.825 18	1.13	0.26 [△]	
B * 81	0.162 77	0.16	0.06 [△]	
B * 75	3.174 8		5.55	9.84 [△]
B * 38	2.496 4	2.37	2.59	6.23 [△]
B * 58	4.152 2	5.79	6.96	7.42
B * 60	6.429 9	1.75 [△]	11.65	16.81 [△]
B * 46	5.438	0.02 [△]	11.73 [△]	16.81 [△]

[△]P < 0.05 vs 山东脐血 HLA-A, -B

山东地区汉族脐血 HLA-A 等位基因频率与华北地区汉族人群基因频率分布非常相近,前 5 位高频率等位基因的顺序基本一致;前 5 位低频率等位基因相同,顺序稍有变化。在 HLA-B 等位基因中,基因频率分布都比较分散,与华北地区差别较小,与华南地区差异较大。

3 讨论

脐血中含有丰富的造血干/祖细胞,成为继骨髓、胎肝之后的又一干细胞来源,而且具有易采集, GVHD 低,易找到 HLA 相配的供者等优点,越来越多地应用于白血病、某些恶性肿瘤、免疫缺陷及遗传代谢性疾病的干细胞移植治疗中。因此,建立脐血资源的 HLA 数据资料,一方面为临床提供更多的 HLA 相匹配的异基因造血干细胞;同时通过大量的易收集的脐血资源,通过先进的分子生物学技术,可以获得更为准确翔实的 HLA 数据,从而为人类学、

免疫遗传学、法医学和其它组织器官移植的应用和科学研究提供和积累准确的基础资料。

截至目前,HLA-A位点共检测出24种等位基因,HLA-B位点共检测出51种等位基因^[8]。我们采用PCR-SSO方法,首次对5844例山东地区汉族大量脐血样本进行HLA-A、-B位点的基因分型。在A位点上,共检测出除A*9、A*43、A*10外的20种等位基因,其中检测出稀有基因A*28、A*36。在B位点上,共检测出46种等位基因,没有检测出B*16、B*21、B*12、B*17、B*73和B*78等位基因。检测出了除B*21外曾认为中国人群不具有的B*18、B*77、B*42、B*47、B*48、B*53、B*59、B*67基因,并明确了这些基因的分布频率。没有检测出A*9、A*43、A*10、B*16、B*21、B*12、B*17、B*73和B*78等位基因,说明这些基因在该人群中存在较少或不存在。

为了研究山东脐血HLA-A、-B等位基因分布情况及其与我国其他地区人群的差别,借此了解它们利用山东脐血干细胞的可能性,我们分别对天津地区、江浙沪地区、广州地区HLA相应位点分布情况进行比较。我们发现山东脐血HLA-A、-B基因频率分布与天津地区接近,但与中国南方汉族HLA基因频率分布有显著差异。各地区除未检测出的某些基因外,在HLA-A位点上,由北到南频率降低的基因有:A*1, A*3, A*23, A*26, A*11, A*30, A*68;其中A*1, A*3, A*26, A*30与江浙沪、广州差异显著($P < 0.05$);升高的基因有:A*24, A*66,与广州地区差异显著($P < 0.05$)。在HLA-B位点上,由北到南频率明显降低的基因有:B*51, B*52, B*7, B*8, B*44, B*14, B*50和B*81,其中B*7, B*8, B*44, B*14, B*50和B*81与广州地区差异显著($P < 0.05$)。升高的基因有:B*75, B*38, B*58, B*60, B*46,它们与广州地区差异显著($P < 0.05$)。在山东人群中A*1, A*3, A*30, A*32, B*44, B*7和B*51基因频率相对江浙沪汉族人群则增高($P < 0.05$),而基因频率呈北低南高分布的基因,除A*24外, B*46, B*60基因频率相对江浙沪汉族人群则下降($P < 0.05$)。由此可见,山东人群基因频率总体分布属于北方人群。

通过上述比较可推论,北方汉族人在山东脐血库中最容易寻找到等位基因相合的异基因脐血造血干细胞。南方汉族人在山东脐血库中完全可以寻找到A、B位点低分辨等位基因相合的异基因脐血干细胞供者。

通过以上各人群间的对比进一步证实:在不同种族的人群中有其各自独特的人群分布特征,在不同地域,同一民族HLA有其独特的地理分布特征。

综上所述,山东汉族脐血样本HLA-A、-B基因具有中国北方汉族共有的遗传特征,但也有其自身的分布特点,具有较为丰富的多态性及地区性遗传特征,能够代表山东地区汉族人群HLA的分布特征。分析HLA基因多态性频率分布特点,为有些疾病的相关性研究、造血干细胞移植供者的选择提供信息。

[参考文献]

- [1] 奚永志,唐佩弦.深入开展脐血干细胞的基础与临床研究[J].中华血液学杂志,1999,20(1):297-298.
- [2] 张工梁,赵桐茂.HLA人群分布[M].北京:人民卫生出版社,2002.112-131.
- [3] 戴云鹏,阎文英,沈柏均,等.急性淋巴细胞白血病患者HLA-DRB1基因多态性研究[J].中国免疫学杂志,2003,19(3):352-354.
- [4] 赵桐茂主编.人类血型遗传学[M].北京:科技出版社,1987.218-219.
- [5] 杨丛林,梁晓岚,燕丽,等.天津地区2854份脐血HLA-I类基因多态性分析[J].中华血液学杂志,2003,24(2):660-661.
- [6] 陈权新,郭晓俊.中华(上海)骨髓库江浙沪汉族人群HLA基因多态性调查[J].全科医学临床与教育,2005,3(2):76-79.
- [7] 马红京,肖露露,郭坤元,等.广东汉族人群HLA-A, B, DR基因频率分析[J].广东医学,2005,26(10):324-326.
- [8] Schreuder GM, Hurley CK, Marsh SGE, et al. The HLA dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ antigens[J]. Tissue Antigens, 2005, 65(1):1-55.

[收稿日期 2006-05-24]

(编辑:张翠英)