

· 论 著 ·

山东地区汉族脐血供者 HLA-I 等位基因多态性研究

戴云鹏 阎文英 沈柏均 王红美

【摘要】目的 研究山东地区汉族人群 HLA-A, -B 等位基因的分布特征, 探讨中国广大地区甚至世界其它人种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** 在山东汉族人群 HLA-A 等位基因中, 共检出 20 种等位基因, 其中频率较高的等位基因依次为 A * 02 (0.3041), A * 11 (0.1443), A * 24 (0.1434), A * 30 (0.0975) 和 A * 33 (0.0859); 频率较低的等位基因是 A * 34 (0.000599), A * 25 (0.000513), A * 66 (0.000513), A * 74 (0.000428) 和 A * 36 (0.0000856)。在 HLA-B 等位基因中, 共检出 46 种等位基因, 其中频率较高的等位基因依次为 B * 13 (0.1348), B * 51 (0.07128), B * 62 (0.0712), B * 61 (0.0676) 和 B * 60 (0.0642); 频率较低的等位基因是 B * 77 (0.0000856), B * 76 (0.000171), B * 47 (0.000257), B * 42 (0.000342) 和 B * 72 (0.000428)。通过山东汉族人群与不同地域的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, 并且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 基因具有丰富的多态性, 能够代表山东汉族人群 HLA 的分布特征, 进一步反映了北方汉族 HLA 的分布规律; 同时, 北方人在山东脐血库中最容易寻找到 HLA-A, -B 等位基因相合的异基因脐血供者。中国南方人在山东也完全可能寻找到 I 类等位基因相合的异基因脐血供者, 其机率较北方人稍低。

【关键词】 脐血; 人类白细胞分化抗原; 基因多态性

Determination of HLA-A, -B allele polymorphism in Shandong umbilical cord samples Dai Yun-peng, Yan Wenyong, Shen Baijun, Wang Hongmei. Paediatric Department, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan, Shandong 250021, China

【Abstract】Objective To investigate the HLA-A, -B allele polymorphism in Shandong Han population and explore the possibility of providing the cord blood donor matched for more patients from larger region of China to perform the stem cell transplantation. **Methods** 5844 cord blood samples from Shandong Umbilical Cord Bank were investigated by polymerase chain reaction-sequence specific oligo-nucleotide (PCR-SSO). **Results** 20 alleles at HLA-A locus, and 46 alleles at HLA-B locus in Shandong Hans donors were detected. Of 20 HLA-A alleles detected, 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); A * 34 (0.000599), A * 25 (0.000513), A * 66 (0.000513), A * 74 (0.000428) and A * 36 (0.0000856) had lower frequency detection. Of 46 HLA-B alleles detected, the most prevalent five alleles were B * 13 (0.1348), B * 51 (0.07128), B * 62 (0.0712), B * 61 (0.0676) and B * 60 (0.0642); HLA-B * 77 (0.0000856), B * 76 (0.000171), B * 47 (0.000257), B * 42 (0.000342) and B * 72 (0.000428) showed lower frequency expression. Comparing the HLA-A, -B gene frequency of Shandong Han population with that of other

作者单位: 250021 济南, 山东省立医院小儿血液肿瘤科 (戴云鹏, 王红美); 山东脐血造血干细胞库 (阎文英, 沈柏均)

通讯作者: 戴云鹏

Han Chinese, there were unique distribution of HLA-A, -B alleles among the studied population groups from various regions with the same race origin. The difference from various regions in the same race was less than that among different races. **Conclusion** There are rich polymorphism of HLA-A, -B in Shandong umbilical cord blood donors, reflecting the distribution characteristics of HLA-A, -B not only in Shandong Han but also in northern Han Chinese. A patient of northern Han Chinese is easier to match a HLA-A, -B cord blood donor in Shandong Umbilical Cord Blood Bank. It is also possible for some patients from southern Chinese to receive a transplant of cord blood stem cell matched with HLA-A, B from Shandong Umbilical Cord Blood Bank.

【Key words】 Umbilical cord blood; Human leukocyte antigen; Genetic polymorphism

脐血造血干细胞由于具有更原始、分化增殖能力更强、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、且脐血来源广泛、对供者无任何不良影响等众多优点,近年来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多种疾病中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 oligo-nucleotide, PCR-SSO) 方法对山东地区 5844 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,并与相关文献中其它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甚至世界其它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它组织器官移植的应用和科学研究提供和积累基础资料。

对象与方法

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,且民族为汉族的无血缘关系的健康新生儿脐带血共 5844 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。

2 基因组 DNA 提取 采用美国 Bio-Fast™ DNA 提

取试剂盒,从全血中提取基因组 DNA,按说明书进行操作。用 Biorad 公司 Smart Spec™3000 型紫外分光光度计,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 ng/ul,备用。

3 对样本 HLA-A, -B 等位基因进行分型 采用英国 Dynal RELI TMSO-HLA 分型试剂盒,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]。

4 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。

结 果

山东地区汉族新生儿脐血 HLA-A 等位基因分布 (见表 1)。

应用 PCR-SSO 技术对 5844 例山东地区汉族健康新生儿脐血 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 (0.3041), A * 11 (0.1443), A * 24 (0.1434), A * 30 (0.0975) 和 A * 33 (0.0859); 分布频率较低的等位基因依次为 A * 34 (0.000599), A * 25 (0.000513), A * 66 (0.000513), A * 74 (0.000428) 和 A * 36 (0.000856)。

山东地区汉族新生儿脐血 HLA-B 等位基因分布 (见表 2)。

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	0.0520	A * 30	1084	0.0975
A * 02	3014	0.3041	A * 31	461	0.0403
A * 03	546	0.0479	A * 32	232	0.0201
A * 23	38	0.0033	A * 33	961	0.0859
A * 24 ^Δ	1556	0.1434	A * 74	5	0.0043
A * 25	6	0.0005	A * 68	103	0.0089
A * 26	358	0.0311	A * 69	16	0.0014
A * 34	7	0.0006	A * 28	19	0.0016
A * 66	6	0.0005	A * 36	1	0.0009
A * 11	1565	0.1443	Blank	833	0.0740
A * 29	142	0.0122			

表 2 脐血的 HLA-B 位点等位基因频率分布

HLA-B	等位基因频数	等位基因频率	HLA-B	等位基因频数	等位基因频率
B * 51	803	0.07128	B * 50	96	0.00825
B * 52	427	0.03725	B * 54	325	0.02822
B * 07	545	0.04780	B * 55	192	0.01657
B * 08	131	0.01128	B * 56	30	0.00257
B * 44	624	0.05492	B * 27	246	0.02128
B * 45	24	0.00206	B * 35	591	0.05194
B * 13	1469	0.13484	B * 37	168	0.01449
B * 14	29	0.00249	B * 60	727	0.124
B * 64	8	0.00069	B * 61	763	0.131
B * 65	15	0.00128	B * 41	11	0.00094
B * 15	97	0.00834	B * 42	4	0.00034
B * 63	30	0.00257	B * 46	618	0.05438
B * 77	1	0.0000856	B * 47	3	0.00051
B * 62	802	0.0712	B * 48	370	0.03219
B * 75	365	0.0317	B * 53	29	0.00249
B * 76	2	0.00017	B * 59	12	0.00103
B * 38	288	0.02496	B * 67	125	0.0108
B * 39	199	0.01718	B * 71	201	0.0174
B * 57	215	0.01858	B * 70	41	0.00352
B * 58	475	0.04125	B * 22	13	0.00111
B * 40	48	0.00412	B * 81	19	0.00162
B * 18	67	0.00575	B * 5	15	0.00128
B * 49	27	0.00231	B * 72	5	0.00043
Blank	334	0.02901			

在对 5844 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 (0.1348), B * 51 (0.07128), B * 62 (0.0712), B * 61 (0.0676) 和 B * 60 (0.0642);低频率的等位基因是 B * 77 (0.0000856), B * 76 (0.000171), B * 47 (0.000257), B * 42 (0.000342) 和 B * 72 (0.000428)。

山东地区脐血与其他人群的部分 HLA-A, B 基因频率比较^[6~8] (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 ^[6]	江浙沪 ^[7]	广州 ^[8]
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	0.5134	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	0.2485	0.51	△0.04	△0.12
B * 50	0.82518	1.13	△0.26	
B * 81	0.16277	0.16	△0.06	
B * 75	3.1748		5.55	△9.84
B * 38	2.4964	2.37	2.59	△6.23
B * 58	4.1522	5.79	6.96	7.42
B * 60	6.4299	△1.75	11.65	△16.81
B * 46	5.438	△0.02	△11.73	△16.81

注:△与山东脐血 HLA-A, -B 比较, P < 0.05

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。

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^[5]。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 基因。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^[6]、江浙沪地区^[7]、广州地区^[8] 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;它们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

(下转第 251 页)

大量资料表明,在白血病的治疗中,放疗对患儿的远期内分泌功能有明显的影 响,如颅脑的放疗可能由于其破坏激素抑制性的反馈通路,导致性发育提前^[7,8];甲状腺因受到较多的剂量的照射而致使甲状腺功能损害;以及睾丸白血病时睾丸的放疗对睾丸功能的损害等。而本组患儿在髓外白血病的防治上是采用三联鞘注及 HD-MTX 冲击治疗,而在一例已有 CNSL 的患儿也取得了良好的效果,现无病生存时间也达到了 6 年。从本组观察的结果来看长期的鞘注并没有明显影响到患儿的生长发育,而在 HD-MTX 冲击治疗中,只要注意监测血浆 MTX 浓度,调整好应用 CF 的次数及剂量,并注意进行水化碱化,既能有效防治髓外白血病,又能减少其副作用。故而长期的、定期的鞘注和 HD-MTX 冲击治疗能有效预防髓外复发且能减少远期的副作用^[9]。

参 考 文 献

1. 中华医学会儿科学分会血液组. 小儿急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第二次修订草案). 中华儿科杂志,1999;37(5):305.
2. 张之南,杨天楹,郝玉书,主编. 血液病学. 北京:人民卫生出版

社,2003;1031-1038.

3. 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 对中枢性(真性)性早熟诊断和治疗的建议. 中华儿科杂志,2003;41(4):272-273.
4. Bessho F. Organ dysfunctions caused by cancer therapy in children. Gan No Rinsho-Japancsc Journal of Cancer Clinics,1985;31(9):1231-1239.
5. 陈静,顾龙君,姚慧玉,等. 22 例小儿急性白血病长期无病生存质量的评估. 中华儿科杂志,2000;38(2):111-112.
6. 毕亚欣,刘学公. 中小学生在青春期前后性激素变化测定. 中国学校卫生,1999;20(5):366-367.
7. Pasqualini T, Escobar ME, Domene H, et al. Evaluation of gonadal function following long-term treatment for acute lymphoblastic leukemia in girls. Am J Pediatr Hematol Oncol, 1987;9(6):15-22.
8. Groot-Loonen JJ, Van Setten P, Otten PJ, et al. Shortened and diminished pubertal growth in boys and girls treated for acute lymphoblastic leukaemia. Acta Paediatrica, 1996;85(9):1091-1095.
9. Hasle H, Helgestad J, Christensen JK, et al. Prolonged intrathecal chemotherapy replacing cranial irradiation in high-risk acute lymphatic leukaemia: long-term follow up with cerebral computed tomography scans and endocrinological studies. European Journal of Pediatrics, 1995;154(1):24-29.

(收稿日期:2006-01-04;修回日期:2006-03-12)

(上接第 247 页)

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 I 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造血干细胞供者。

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. 中华血液学杂志,1999;20:297-298.
2. 张工梁,赵桐茂. HLA 人群分布. 见:组织配型技术与临床应用. 北京:人民卫生出版社,2002;12-131.
3. 戴文鹏,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. 中国免疫学杂志,2003;19:352-354.
4. 赵桐茂主编. 人类血型遗传学,北京:科技出版社,1987;218-219.
5. 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. Tissue Antigens, 2005;65:1-55.
6. 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. 中华血液学杂志,2003;24:660-661.
7. 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. 全科医学临床与教育,2005;13:76-79.
8. 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. 广东医学,2005;26:324-326.

(收稿日期:2006-01-27;修回日期:2006-03-06)