

湖北造血干细胞骨髓库 HLA-A 及 B 和 DRB1 基因多态性分布

刘光箭¹ 沈钢¹ 陈禹潭¹

【摘要】 目的:调查湖北省造血干细胞分库 HLA-A、B、DRB1 位点等位基因频率及单体型分布特征。**方法:**根据中国骨髓库组织配型实验室规程,采用 PCR-SSP、PCR-SSO 检测 20 979 名湖北分库造血干细胞捐献者 HLA-A、B、DRB1 基因型;采用最大数学预期值算法计算 HLA 基因和单体型频率,分析本库群体调查结果,统计相关遗传参数。**结果:**20 979 例造血干细胞捐献者中,共检出 77 种 HLA 基因型,455 条 HLA-A-B 单体型,457 条 HLA-B-DRB1 单体型,2 866 条 HLA-A-B-DRB1 单体型。其中频率大于 0.1 的基因型有 A02、A11、A24、B46、B60、B13、DR09、DR15、DR04、DR12,频率大于 0.01 的 HLA-A-B、HLA-B-DRB1、HLA-A-B-DRB1 单体型分别有 23、22、5 条。有 88 条 HLA-A-B 和 9 条 HLA-B-DRB1 单体型呈现显著的连锁不平衡,其中有 7 条 HLA-A-B 和 2 条 HLA-B-DRB1 单体型呈现强连锁不平衡。**结论:**湖北省造血干细胞库 HLA-A-B-DRB1 基因和单体型多态性分布具有本库群体特点,其频率分布和相关遗传参数为临床移植供受对的选择提供了数据参考。

【关键词】 骨髓库;造血干细胞;人类白细胞抗原;基因频率;单体型频率;多态性

【中图分类号】 R457.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1004-2806(2012)06-0356-04

Distribution of polymorphism of HLA-A, B and DRB1 genes in the Hubei registry of the CMDP

LIU Guangjian SHEN Gang CHEN Yutan

(Wuhan Blood Center, Hubei 430030, China)

Abstract Objective: To investigate the frequency distribution of HLA-A, B and DRB1 alleles and haplotypes in the Hubei registry of the CMDP. **Method:** HLA-A, B and DRB1 genes of the 20 979 donors were genotyped by PCR-SSP and PCR-SSO based on the procedure of Tissue Matching Laboratory of CMDP; HLA genes and haplotype frequencies were calculated by method of Expectation-Maximization; and genetic parameters were analyzed. **Result:** A total of 77 HLA alleles, 455 HLA-A-B haplotypes, 457 HLA-B-DRB1 haplotypes and 2 866 HLA-A-B-DRB1 were observed in which the frequencies of A02, A11, A24, B46, B60, B13, DR09, DR15, DR04 and DR12 genes were greater than 0.1 and the frequencies of 23 HLA-A-B, 22 HLA-B-DRB1 and 5 HLA-A-B-DRB1 haplotypes were greater than 0.01. 88 HLA-A-B and 9 HLA-B-DRB1 haplotypes showed significant linkage disequilibrium in which 7 HLA-A-B and 2 HLA-B-DRB1 haplotypes showed strong linkage disequilibrium. **Conclusion:** The distribution of polymorphism of HLA-A, B and DRB1 genes in the Hubei registry of the CMDP had features of the library groups. The frequency distribution and genetic parameters would support references for donor selection of clinical transplantation.

Key words marrow bank; hematopoietic stem cells; HLA; gene; haplotype; frequency; polymorphism

HLA-A、B、DRB1 基因是造血干细胞移植和器官移植中的 3 个最重要的功能基因,首先被列为临床移植供/受者组织相容性匹配检测项目之一。在进行异基因造血干细胞及器官移植时,供受者间 HLA 等位基因的匹配程度与移植成活率密切相关^[1]。目前,尚未见湖北地区大样本 HLA 基因和单体型频率相关参数。本中心对 2002—2010 年间湖北分库 HLA 分型数据进行了统计分析,得到了较大样本的 HLA-A-B-DRB1 分型数据及相关遗传参数,对湖北省分库 HLA 多态性分布情况及移植供受对的选择提供了数据参考。

1 材料与方法

1.1 调查对象

武汉、荆州、孝感、襄阳、荆门、黄冈、十堰、随

州、鄂州、仙桃、咸宁、天门、黄石、宜昌及恩施等地 2002—2010 年间登记加入中国造血干细胞捐献者资料库湖北分库的随机报名者,籍贯按自述原则确定,汉族占 98.8%,少数民族以土家族为主占 1.2%,其中有部分学生来自全国 32 个省份。

1.2 主要试剂与仪器

人类基因组 DNA 提取纯化试剂(美国 Gentra 公司),PCR-SSP 及 SSO 法 HLA-A、B、DRB1 基因分型试剂盒(SSP 法:美国 PEL-FREEZ 公司,SSO 法:美国 One Lambda 公司),Gene Quant pro DNA 测定仪,9700 PCR 扩增仪(PE 公司),GENEGENIUS 全自动凝胶成像分析系统(美国 Gene 公司),Luminex 100 流式细胞仪(美国 Luminex 公司)。

1.3 方法及基因型指定

样本 EDTA 抗凝,采用 PCR-SSP 法或 PCR-

¹ 武汉血液中心(武汉,430030)

SSO 流式磁珠法,按照中华骨髓库 HLA 检测规程,基因分型结果及抗原指定按 WHO 正式认可的命名法分型,依据 HLA 命名字典译为抗原特异性,并对中华骨髓库国家管理中心随机抽检分型准确率 100%的分型数据进行了统计,确保了湖北统计分析数据准确有效。

1.4 数据分析方法

在不存在空的等位基因的情况下,如果某基因座上检出 2 个等位基因,认为是杂合子,如果检出 1 个基因,认为是纯合子。采用最大数学预期值算法(Expectation-Maximization, EM),通过 Arlequin 3.5.1.2 软件计算 HLA 基因和单体型频率^[2],最大迭代次数设为 9999,起始值设为 50,结果输出精度为小数点后 7 位;并用 χ^2 检验法进行 Hardy-Weinberg 平衡检验计算 P 值,检验水准设为 0.05。两座位 HLA 单体型连锁不平衡参数计算,取检测概率 P=95%,通过公式 $N=-1.3010 / \log(1-HP)^2$,选取频率 $\geq 7.14 \times 10^{-5}$ 的有意义单体型计算连锁不平衡参数。通过 $E=-\sum f_i \times \log 2f_i$ (f_i 为 HLA 基因或单体型频率)计算频率分布熵值。

2 结果

2.1 基因频率

20 979 例捐献者中共检出 19 种 HLA-A 基因型,45 种 HLA-B 基因型,13 种 HLA-DRB1 基因型,共 77 种 HLA-A、B、DRB1 基因型,其按频率高

低排列见表 1。其中频率大于 0.1 的基因分别有 3、3、4 种,累加频率及熵值见表 2。未检出 A43、A80、B78、B82、DR18。表 2 显示熵值 HLA-B>DRB1>A,表明基因座位多态性程度依次降低。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验

用 χ^2 检验验证 HLA-A、B、DRB1 三基因位点分布是否符合 H-W 平衡定律,求得 P 值分别为 0.17、0.22、0.18,三位点均符合 H-W 平衡。

2.3 单体型频率

共检出 455 条 HLA-A-B,457 条 HLA-B-DRB1,2866 条 HLA-A-B-DRB1 单体型,分别占理论总数的 53.22%、78.12%和 25.78%。单体型频率分布情况见表 3。最常见的 20 条单体型及其频率见表 4。

2.4 连锁不平衡参数

取检测概率 P=95%,通过公式 $N=-1.3010 / \log(1-HP)^2$,选取频率 $\geq 7.14 \times 10^{-5}$ 的有意义单体型计算连锁不平衡参数。有 88 条 HLA-A-B 呈现显著的连锁不平衡,其中 7 条呈现强连锁不平衡。有 9 条 HLA-B-DRB1 呈现显著的连锁不平衡,其中 2 条呈现强连锁不平衡,见表 5。

3 讨论

湖北位于我国中部长江中下游,人口约 6 000 万,少数民族占全省人口近 5%,地理位置处于承东启西,贯通南北得天独厚的地域。本次调查分析主要从骨髓库寻找移植配型思路建立湖北分库

表 1 HLA-A、B、DRB1 基因频率

HLA-A	基因频率	HLA-B	基因频率	HLA-B	基因频率	HLA-DRB1	基因频率
02	0.30633	46	0.13885	56	0.00577	09	0.17100
11	0.25742	60	0.12870	50	0.00467	15	0.13254
24	0.17122	13	0.10184	18	0.00327	04	0.11900
33	0.08041	62	0.06635	76	0.00281	12	0.11130
30	0.04817	51	0.06440	65	0.00179	08	0.08771
31	0.02982	58	0.06387	63	0.00169	07	0.07722
01	0.02789	75	0.05231	49	0.00117	14	0.06526
26	0.02746	61	0.05017	41	0.00088	11	0.06464
03	0.02405	35	0.03863	59	0.00083	13	0.05634
32	0.00977	54	0.03167	45	0.00081	17	0.04676
29	0.00746	38	0.02955	81	0.00055	16	0.03222
68	0.00603	44	0.02853	77	0.00050	01	0.02023
23	0.00176	55	0.02748	72	0.00043	10	0.01578
66	0.00055	07	0.02348	53	0.00033		
74	0.00055	39	0.02267	47	0.00017		
69	0.00050	52	0.02104	64	0.00017		
34	0.00038	27	0.02023	42	0.00014		
25	0.00019	48	0.01959	70	0.00007		
36	0.00005	37	0.01292	22	0.00005		
		57	0.00982	16	0.00002		
		71	0.00906	40	0.00002		
		08	0.00663	73	0.00002		
		67	0.00603				

表 2 HLA-A、B、DRB1 基因频率分布

频率范围 /%	HLA-A		HLA-B		HLA-DRB1	
	n	Cum fre/%	n	Cum fre/%	n	Cum fre/%
>10	3	73.497	3	36.939	4	53.384
1~10	6	23.780	16	57.289	9	46.616
0.1~1	4	2.502	11	5.271	0	0.000
<0.1	6	0.222	15	0.499	0	0.000
总计	19		45		13	
熵值	E=2.736		E=4.218		E=3.454	

表 3 HLA-A-B、B-DRB1、A-B-DRB1 单体型频率分布

频率范围 /%	HLA-A-B		HLA-B-DRB1		HLA-A-B-DRB1	
	n	Cum fre/%	n	Cum fre/%	n	Cum fre/%
1~10	23	57.477	22	37.743	5	6.943
0.1~1	113	35.350	169	55.224	209	53.327
0.01~0.1	174	6.516	152	6.509	1020	32.533
0.00~0.01	145	0.658	114	0.524	1632	7.198
未观察到	400	0	128	0	8249	0
总计	855		585		11115	
熵值	E=6.596		7.373		E=9.575	

HLA-A-B-DRB1 分型数据及相关遗传参数,统计了 20 979 名捐献者 HLA-A、B、DRB1 基因频率和单体型频率,共检出 77 种基因型,455 条 HLA-A-B,457 条 HLA-B-DRB1,2866 条 HLA-A-B-DRB1 单体型,表明本群体中 HLA 基因多态性较为丰富。其中 A 座位中 9 个等位基因频率之和超过 97%,B 座位中 19 个等位基因频率之和超过 94%,而 DRB1 基因分布相对均衡,提示湖北分库 HLA-A、B 等位基因分布较为集中。常见基因为 A02、A11、A24、B46、B60、B13、DR09、DR15、DR04、DR12,比较少见 A36、A25、A34、A69、A74、A66、B73、B40(40)、B16、B22、B70、B42、B64、B47、B53、B72、B77、B81、B45、B59、B41,未检出 A43、A80、B78、B82、DR18 基因。该群中 HLA-A、B、DRB1 基因基本包含了中国人群 HLA 基因,比较上海、广东、四川、吉林各分库 HLA-A、B、DRB1 基因频率^[3-6],发现 A01、A02、A03、A23、A26、A30、A31、A66、A68、A69、B07、B08、B13、B18、B44、B45、

表 4 20 条最常见 HLA-A-B、B-DRB1、A-B-DRB1 单体型频率($\times 10^{-6}$)

HLA A-B	HF	HLA B-DRB1	HF	HLA A-B-DRB1	HF
02-46	57033	46-09	44473	02-46-09	20758
33-58	49740	13-07	38109	33-58-13	13489
11-60	42614	62-04	24667	02-13-07	12798
02-60	40278	60-09	23237	02-62-04	11726
02-13	39420	60-08	18590	11-46-09	10653
11-46	36846	60-04	18089	02-60-09	9438
11-13	29744	46-15	16778	11-62-04	8913
02-62	28004	58-13	16588	11-13-07	8627
24-60	27909	60-15	16421	02-60-08	8580
02-75	22832	46-12	14800	02-60-04	8008
24-46	22046	46-08	14776	02-46-08	7984
11-62	19972	60-12	14395	11-60-09	7412
11-75	19591	13-04	13585	02-75-09	7364
11-51	16969	51-09	12178	33-58-15	7102
24-51	16540	75-12	12012	30-13-07	6983
02-61	15230	75-09	11773	02-46-04	6530
02-38	14967	51-15	11726	11-60-04	6482
02-35	13966	13-12	11463	11-46-15	6315
24-61	13919	60-11	11225	02-13-09	6101
24-54	12942	46-14	10963	11-60-08	5982

表 5 强连锁不平衡的 HLA-A-B、B-DRB1 单体型

HLA A-B	HF($\times 10^{-6}$)	ALD	RLD	χ^2	HLA B-DRB1	HF($\times 10^{-6}$)	ALD	RLD	χ^2
30-42	119	0.0001	0.8249	80.69	08-17	5434	0.01	0.81	3755.22
33-58	49526	0.0446	0.7594	18879.19	13-07	38110	0.03	0.44	5888.91
11-64	119	0.0001	0.6152	7.64					
69-52	310	0.0003	0.6109	364.70					
30-53	191	0.0002	0.5497	83.64					
01-37	6197	0.0058	0.4648	4135.12					
01-63	763	0.0007	0.4349	469.05					

B48、B50、B51、B52、B53、B54、B57、B61、B62、B63、B65、B67、DR01、DR07、DR13 由北部向中部和南部递减,A33、A74、B27、B38、B39、B41、B46、B55、B56、B58、B60、B75、B76、B77、DR16 则由北部向中部和南部递增。A11、B38、B46、B56、B76、DR01、DR10、DR13、DR14、DR16 由西向中部和东部递减。A02、A23、A30、A31、A69、B13、B27、B45、B51、B52、B53、B54、B57、B59、B61、B62、B64、B81、DR04、DR07 由西部向中部和东部递增。A24、A34、B47、DR11 基因频率相对均衡。上海未检出 A36、A80、B70、B78、B82、DR18,广东未检出 A25、A36、A43、A80、B71、B72、B73、B78、B82、DR18,四川未检出 A25、A43、A80、B71、B72、B82、DR18,吉林未检出 B78、B82。在比较 77 个等位基因中,中部未出现频率最高的基因,表现出本分库中部地域性。从 HLA-A、B、DRB1 基因频率分布范围熵值分析 $HLA-B > HLA-DRB1 > HLA-A$,说明 HLA-A、HLA-DRB1、HLA-B 多态性依次递增。

移植免疫学是一门研究极为活跃发展极为迅速的临床科学,移植时尤其强调组织配型的重要性。凭借高频率基因及单体型在非血缘关系群体中找到带有相同 HLA 基因及单体型的移植供受对可能性更大,特别是有些频率甚高的等位基因还会相互组成单体型,研究单体型频率能帮助估算移植患者在骨髓库中寻找合适的供者概率。在本次调查的 HLA 基因中,理论上可组成 855 种 HLA-A-B,585 种 HLA-B-DRB1 和 11115 种 HLA-A-B-DRB1 单体型,实际观察到 A-B 单体型 455 条,B-DRB1 457 条,A-B-DRB1 2 866 条。未观察到的单体型分别为 400 条,128 条和 8 249 条,提示本分库 HLA-A-B-DRB1 等位基因间存在连锁不平衡。其中 HLA-A-B、HLA-B-DRB1 表现为显著连锁不平衡单体型分别为 88 条和 9 条,呈现强连锁不平衡分别为 7 条和 2 条见表 5。在单体型频率间,高频单体型不一定连锁不平衡,而频率较低的基因频率间也存在显著的连锁不平衡,如 A69B52、A11B64、A30B42 等单体型,频率都小于 0.001,在统计学上表现为强连锁不平衡。本库群体中观察到频率大于 0.001 的 214 条 HLA-A-B-DRB1 单体型,占观察到的单体型总数的 7.47%,其余 2 652 条单体型频率均小于 0.001。最常见的

HLA-A-B-DRB1 单体型为 A02B46DR09、A33B58DR13、A02B13DR07、A02B62DR04、A11B46DR09、A02B60DR09、A11B62DR04、A11B13DR07、A02B60DR08、A02B60DR04,因 HLA-A-B-DRB1 单体型在分布上存在种族地域差异,对于不同表现型的移植配型患者,在不同种族、地域的骨髓库中找到 HLA 相同供者的机率不尽相同。在临床移植中单倍型匹配比表型匹配移植存活率更高。

HLA 系统是迄今为止发现多态性最高的基因系统之一,想要在骨髓库中找到 HLA 相匹配的供者的概率,取决于骨髓库供者数量以及 HLA 单倍型频率^[7],频率的研究也为人类遗传进化演变、疾病关联和法医学提供了依据。值得注意的是,本库群体中被定为纯合子的基因中还存在一些未被检出的“空白基因”,提示本库群体中可能有新的 HLA 基因未被发现,疑难分型样本及新基因测序将另文报道。

(致谢:感谢湖北省红十字会造血干细胞分库的领导和同仁对本工作的大力支持和帮助!)

参考文献

- [1] 赵桐茂. 造血干细胞移植 HLA 配型指南[J]. 中国输血杂志, 2005, 16(1,2): 74-76,170-174.
- [2] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. Arlequin ver. 2.000: a software for population genetics data analysis[M]. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, 2000:51-54.
- [3] 孙继丽,杜可明,傅敏,等. 20596 名汉族造血干细胞供者 HLA 多态性统计学分析[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(5): 379-384.
- [4] 吴国光,邓志辉,高素青,等. 6965 名汉族骨髓供者 HLA 多态性分析[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(8): 473-477.
- [5] 曾洁,王憬惺,孙水仙,等. 四川造血干细胞捐献者资料库 HLA-A、B、DRB1 基因和单体型研究[J]. 中国输血杂志, 2005, 5(18): 384-388.
- [6] 陈琳,焦立新,任海波,等. 吉林骨髓库汉族造血干细胞捐献者 HLA-A、B、DRB1 基因分布和单体型分析[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(1): 35-39.
- [7] 赵桐茂. 寻找 HLA 匹配无关供者概率曲线的计算及其应用[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(6): 381-384.

(收稿日期:2011-11-15)