

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.26.017

重庆汉族人群 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因多态性研究^{*}

王芳¹, 廖群^{2△}, 黄霞¹, 张涛¹, 朱素敏¹, 廖红梅¹, 李小红¹, 程磊¹, 谭茜茜¹, 黄红莉¹, 宋正利¹
(1. 重庆市血液中心输血研究所 400015; 2. 重庆市急救医疗中心输血科 400014)

摘要:目的 分析重庆地区汉族人群 HLA-A、B、DRB1 在高分辨基因分型水平上多态性及分布特征。方法 采用聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探针(PCR-SSOP)基因分型以及基因序列分型(SBT)技术,对重庆地区 2 067 例无关供者的 HLA-A、B、DRB1 位点上的等位基因进行高分辨分型,直接计数法计算等位基因频率,应用 Arlequin3.1 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。结果 共检出了 168 种 HLA 高分辨等位基因。其中 HLA-A 位点 42 种,频率大于 0.05 有 A*11:01, A*24:02, A*02:07, A*02:01, A*33:03; HLA-B 位点 81 种,频率大于 0.05 有 B*46:01, B*40:01, B*58:01, B*13:01, B*15:02; HLA-DR 位点 45 种,频率大于 0.05 有 DRB1*09:01, DRB1*15:01, DRB1*12:02, DRB1*08:03, DRB1*11:01。结论 获得了重庆地区汉族人群 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因频率数据,为人类学、法医学、移植配型及疾病相关性等研究提供可靠的参考数据。

关键词:HLA 抗原;高分辨基因分型;基因频率;多态性;重庆

中图分类号:R392.2 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)26-3455-03

Study on HLA-A、B、DRB1 high-resolution alleles polymorphism in Chongqing Han population^{*}

Wang Fang¹, Liao Qun^{2△}, Huang Xia¹, Zhang Tao¹, Zhu Sumin¹, Liao Hongmei¹, Li Xiaohong¹,
Cheng Lei¹, Tan Qianqian¹, Huang Hongli¹, Song Zhengli¹

(1. Blood Transfusion Research Institute, Chongqing Blood Center, Chongqing 400015, China; 2. Department of Blood Transfusion, Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400014, China)

Abstract: **Objective** To analyze the HLA-A、B and DRB1 alleles high-resolution polymorphism in Chongqing Han population. **Methods** The PCR-SSOP and PCR-SBT methods were applied for the HLA high-resolution genotyping of 2 067 unrelated healthy donors in the registry of Chongqing branch of Chinese National Marrow Donor Program(CMDP). The allele frequencies of HLA-A、B and DRB1 were estimated by the direct counting method and the Hardy-Weinberg equilibrium inspection was performed by using the Arlequin software 3.1. **Results** 168 high-resolution alleles were detected out, in which 42 alleles of A*11:01, A*24:02, A*02:07, A*02:01 and A*33:03 at the HLA-A locus were observed with the frequencies greater than 0.05; 81 alleles were detected at HLA-B locus, including B*46:01, B*40:01, B*58:01, B*13:01 and B*15:02 with the frequencies greater than 0.05; 45 alleles of DRB1*09:01, DRB1*15:01, DRB1*12:02, DRB1*08:03 and DRB1*11:01 at the HLA-DR locus were observed with the frequencies greater than 0.05. **Conclusion** The data of the HLA-A、B and DRB1 allelic frequencies at high-resolution level in Chongqing Han population are obtained, which provides the reliable reference data for the studies of anthropology, forensic medicine, transplantation matching and disease association.

Key words:HLA antigens; high-resolution typing; gene frequency; polymorphism; Chongqing

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)作为人体细胞表面的重要标志之一,位于人类第 6 号染色体短臂 6p21.3 区域,在免疫应答及免疫调节中具有重要作用,是迄今为止人类最复杂的显性多态性遗传系统,HLA 是临床移植配型的基础,可靠的 HLA 基因频率尤其是高分辨基因频率数据,是预计找到 HLA 匹配供者可能性的重要依据^[1-2]。HLA 基因具有高度的遗传多态性,不同地区和种族基因频率分布存在明显的不同,本文采用聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探针(PCR-SSOP)技术和基因序列分型(PCR-SBT)技术对重庆地区汉族人群中 2 067 例进行了进行高分辨分型,在高分辨的水平积累重庆地区 HLA-A、B、DRB1 等位基因频率资料具有很重要的医学价值,为进行造血干细胞移植的患者寻找健康

康相配的造血干细胞供者、法医学个体识别、疾病相关性及人类学等研究提供基础资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2 067 例血样均采自中国造血干细胞捐献者资料库重庆分库登记的无关供者,捐献者均现为重庆地区人群,相互间无血缘关系,符合捐献者健康征询表的要求,年龄在 18~45 岁。收集所有研究对象的外周血标本 5~8 mL,用 EDTA 抗凝并-80℃冷冻保存。

1.2 主要的设备 Gene Quant Pro 型 DNA 浓度测定仪(英国),C1000TM Thermal Cycler、PTC-225 Peltier Thermal Cycler 和 GeneAmp PCR System 9700 型扩增仪(美国),POWER PAC 3000 型电泳仪(美国),KST-5500 型凝胶成像分析系统

^{*} 基金项目:重庆市卫生局科研项目(2011-2-405)。 作者简介:王芳(1977—),本科,主管技师,主要从事输血医学的研究。 △ 通讯作者, Tel:(023)63692206; E-mail:1499713737@qq.com。

(北京东迅),Luminex IS 200 流式分析仪(美国)、ABI 3730 基因测序仪(美国)。

1.3 主要的试剂 DNA 提取试剂采用 TIANamp Blood DNA Kit 血液基因组 DNA 提取试剂(天根生化科技北京有限公司)和 Puregene Blood Core Kit B DNA 提取试剂(德国 Qiagen 公司),PCR/SSOP LABType 分型试剂盒(美国 Onelambda 公司),PCR-SBT 测序试剂由 SeCoreTM 测序试剂盒(美国 Invitrogen 公司)和 HLA SBT Typing Kit(北京 ROSE 公司)。

1.4 实验方法 采用 TIANamp Blood DNA Kit 血液基因组 DNA 提取试剂(天根生化科技北京有限公司)和 Puregene Blood Core Kit B DNA 提取试剂(德国 Qiagen 公司)从冻存(−80 ℃)的全血标本中提取 DNA。浓度大于 20 ng/μL,OD260/OD280 比值在 1.6~1.9 的标本可用于实验,根据 PCR/SSOP LABType 分型试剂盒、SeCoreTM 测序试剂盒和 HLA SBT Typing Kit 分型试剂盒的说明书进行 HLA-A、B、DRB1 等位基因高分辨检测。对模棱两可的结果,采用不同厂家给出的解决方案和文献[2]进行,获得真正高分辨结果。

1.5 统计学处理 根据直接计数法计算 HLA-A、B、DRB1 等位基因频率,应用 Arlerquin3.1 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, $P>0.05$ 为期望值与观察值差异无统计学意义。

2 结 果

2.1 HLA-A 位点等位基因频率和特征 共检出 A 位点等位基因 42 种。其中常见的等位基因是 A*11:01,A*24:02,A*02:07,A*02:01,A*33:03,A*02:03,A*02:06,A*31:01,A*26:01,A*30:01,A*01:01,A*11:02,(频率大于 0.01,累计频率为 95.69%),见表 1。A2 和 A24 组呈现较高的多态性,分别检出 10 个和 8 个等位基因。

表 1 重庆汉族人群 HLA-A 常见高分辨等位基因频率(>0.01)分布		
HLA-A 位点等位基因	数量	频率
01:01	100	0.024 19
02:01	363	0.087 81
02:03	175	0.042 33
02:06	160	0.038 70
02:07	524	0.126 75
03:01	70	0.016 93
11:01	1 125	0.272 13
11:02	90	0.021 77
24:02	686	0.165 94
26:01	127	0.030 72
30:01	117	0.028 30
31:01	136	0.032 90
33:03	283	0.068 46
总计	3 956	0.965 90

2.2 HLA-B 位点等位基因频率和特征 共检出 B 位点等位基因 81 种。其中常见的等位基因是 B*46:01,B*40:01,B*58:01,B*13:01,B*15:02,B*51:01,B*15:01,B*55:02,B*13:02,B*38:02,B*54:01,B*52:01,B*35:01,B*

40:06,B*39:01(频率大于 0.01,累计频率为 87.71%),见表 2。B40 和 B15 组呈现较高的多态性,分别检出 7 个和 18 个等位基因。

表 2 重庆汉族人群 HLA-B 常见高分辨等位基因频率(>0.01)分布		
HLA-B 位点等位基因	数量	频率
07:02	56	0.013 55
13:01	253	0.061 20
13:02	130	0.031 45
15:01	173	0.041 85
15:02	209	0.050 56
15:11	68	0.016 45
35:01	98	0.023 71
37:01	62	0.015 00
38:02	113	0.027 33
39:01	87	0.021 04
40:01	528	0.127 72
40:02	73	0.017 66
40:06	94	0.022 74
44:03	64	0.015 48
46:01	640	0.154 81
48:01	65	0.015 72
51:01	206	0.049 83
51:02	49	0.011 85
56:01	42	0.010 16
58:01	273	0.066 04
总计	3 626	0.877 10

2.3 HLA-DRB1 位点等位基因频率和特征 共检出 DRB1 位点等位基因 45 种。其中常见的等位基因是 DRB1*09:01,DRB1*15:01,DRB1*12:02,DRB1*08:03,DRB1*11:01,DRB1*03:01,DRB1*07:01,DRB1*14:54,DRB1*16:02,DRB1*04:05,DRB1*13:02,DRB1*04:06,DRB1*12:01,DRB1*15:02,DRB1*14:05(累计频率为 90.81%),见表 3。DR4 和 DR14 组呈现较高的多态性,分别检出 10 个等位基因。

表 3 重庆汉族人群 HLA-DRB1 常见高分辨等位基因频率(>0.01)分布		
HLA-DRB1 位点等位基因	数量	频率
01:01	67	0.016 21
03:01	206	0.049 83
04:03	67	0.016 21
04:05	155	0.037 49
04:06	113	0.027 33
07:01	204	0.049 35
08:03	280	0.067 73
09:01	744	0.179 97

续表 3 重庆汉族人群 HLA-DRB1 常见高分辨等位基因频率(>0.01)分布

HLA-DRB1 位点等位基因	数量	频率
10:01	73	0.017 66
11:01	263	0.063 62
12:01	106	0.025 64
12:02	391	0.094 58
13:02	115	0.027 82
13:12	79	0.019 11
14:05	92	0.022 25
14:54	197	0.047 65
15:01	456	0.110 30
15:02	102	0.024 67
16:02	157	0.037 98
总计	3 754	0.908 10

2.4 HLA-A、B、DRB1 基因座 Hardy-Weinberg 平衡检验
结果 *P* 值均大于 0.05,结果表明本次调查对象来源群体的基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,见表 4。

表 4 重庆汉族人群 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因多态性的 Hardy-Weinberg 平衡检验

基因座位	观察值	期望值	<i>P</i>
A	0.842 77	0.862 50	0.068 65
B	0.927 43	0.937 13	0.439 02
DRB1	0.915 34	0.923 25	0.050 93

3 讨 论

HLA 基因复合体是人类的主要组织相容性复合体(MHC),HLA-I 类基因区靠近染色体顶端,长约 1 500 kb,编码移植抗原;HLA-II 类基因区靠近染色体着丝点,长约 1 000 kb,该区域基因多与免疫反应有关。不同地域和种族基因多态性差异较大,作为个体组织细胞的遗传标志,在抗原识别、递呈、免疫应答与调控等方面都起着非常重要的作用。根据 IMGT/HLA 2012 年 1 月发布最新数据库 3.7 显示目前已确定的 HLA 等位基因数已达 7 269 个,其中 HLA-A 位点 1757 个,HLA-B 位点 2 338 个,HLA-DRB1 位点 1067 个,而中国人群的 CWD 表也于 2011 年 7 月正式公布,各位点的等位基因数目分别为 HLA-A 位点 78 个,HLA-B 位点 118 个,HLA-DRB1 位点 59 个。目前有关中国人群的 HLA-A、B、DRB1 的高分辨等位基因频率分布已有较多报道,但重庆地区的 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因频率未见报道,本研究首次报道了重庆地区的 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因的频率,也是对中国人群高分辨等位基因频率数据的一个补充。

本研究采用 PCR-SSOP 与 PCR-SBT 方法对重庆地区 2 067 名汉族健康无关供者进行了 HLA-A、B、DRB1 的高分辨等位基因分型检测,结果检出的 HLA-A、B、DRB1 等位基因分别为 42、81、45 种,占现有中国人群 HLA-CWD 各位点等位基因数量的 53.85%(42/78)、68.64%(81/118)和 76.27%(45/

59),共 168 种等位基因,说明重庆地区汉族人群的 HLA 高分辨等位基因多态性较丰富,基本上涵盖了中国人的 HLA-A、B 和 DRB1 高分辨等位基因,在高分辨水平上提供了一套重庆汉族人群 HLA-A、B、DRB1 等位基因频率数据。

中国汉族人群主要包括两大组群:北方汉族人群和南方汉族人群,这两组人群在 HLA 基因多态性分布上呈现出不同^[1,3-6],而重庆地处于中国的西南部,通过与中国地区其他省市报道的基因频率进行分析比较,重庆地区 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因的分布特征基本符合南方汉族人群特征,这一结论与毛伟等^[7]报道的重庆地区人群 HLA-A、B、DRB1 基因多态性研究相一致。重庆地区 HLA-A 频率大于 0.05 有 A*11:01,A*24:02,A*02:07,A*02:01,A*33:03(频率从高到低),与南方汉族人群、北方汉族人群的高分辨基因频率的研究结果相一致,而被认为是区分南北方汉族人群的遗传标记之一的 A*02:07 和 A*02:03,在南方汉族人群中的频率要明显地高于北方汉族人群^[8],在重庆汉族人群里检出频率分别为 0.126 75 和 0.042 33,明显高于河南、陕西、山东半岛等北方汉族人群。对于 HLA-B 高分辨等位基因,共检出 81 个,常见的 HLA-B 高分辨等位基因(频率大于 0.05)为 B*46:01,B*40:01,B*58:01,B*13:01,B*15:02,与台湾人群^[9]、南方汉族人群^[3,6]的研究结果相一致,与北方汉族人群相比,差异在于北方汉族人群 B*13:01 和 B*15:02 较低,而 B*51:01 较南方汉族人群高。对于 HLA-DRB1 高分辨等位基因,共检出 45 个等位基因,常见的等位基因(频率大于 0.05)为 DRB1*09:01,DRB1*15:01,DRB1*12:02,DRB1*08:03,DRB1*11:01 与南方汉族人群的研究结果相一致,其中 DRB1*12:02 在所有中国人群中均常见^[9-13],而 DRB1*09:01 是所有汉族人群中常见的等位基因^[9-11],在此次的研究中未发现最常见的 DRB1*09 和 DRB1*07 组呈现出多态性,只检出 DRB1*09:01 和 DRB1*07:01 高分辨等位基因。

通过以上分析表明重庆地区汉族人群 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因多态性与中国南方汉族基本一致,具有南方汉族的特点。这将有助于为本地区需要进行造血干细胞移植的血液患者快速寻找无关供者和选择适合的供者提供基础资料,同时也为法医学个体识别、疾病相关性及人类学等研究提供可靠的参考数据。

参考文献:

[1] 刘晓华,冯智慧,胡彬,等. 山东半岛地区汉族人群 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因及单体型多态性的研究[J]. 中国输血杂志,2010,23(8):592-595.
[2] 邹红岩,程良红,金士正,等. 中国南方汉族人群 HLA-A、B、DRB1 基因测序分型模棱两可结果的分布及其解决方案[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(53):10481-10486.
[3] 朱为刚,鲍自谦,蓝欲晓,等. 中国南方汉族人群 HLA-A、B、DRB1 基因的序列分析和单体型分布[J]. 中国输血杂志,2009,22(11):893-897.
[4] 王小芳,刘孟黎,刘晟,等. 陕西籍汉族造血干细胞献血者 HLA-A、B、DRB1 高分辨多态性分析[J]. 中国输血杂志,2011,24(7):584-587. (下转第 3460 页)

能够有效地保护 BBB 结构,降低其通透性。通过对脑组织含水率的研究发现,TBI 大鼠脑组织含水率在造模后整个变化过程呈抛物线样改变,这种脑组织含水率的变化规律与脑组织内 NE 浓度的变化规律一致,而通过西维来司钠的干预后,脑组织含水率虽然仍明显高于对照组,但在 48、72、168 h 低于 TBI 组,说明了西维来司钠可以通过抑制 NE 的生物活性和降低 NE 浓度来减轻脑组织水肿,对脑组织起到一定的保护作用,这种在 TBI 过程中的保护作用与在脑组织缺血/再灌注损伤中研究结果基本一致,这种保护作用可能与抗炎、抗氧化、抗凋亡有关^[12]。

本研究结果提示:TBI 大鼠脑组织内 NE 浓度明显高于对照组。这表明创伤后,中性粒细胞释放的 NE 参与了脑组织损伤的病理过程,NE 在 TBI 的病理生化机制中可能起着重要作用,NE 可能是 BBB 通透性和脑组织含水率的增高重要因素之一,是 TBI 继发性脑水肿形成的重要原因。西维来司钠可抑制 NE 浓度的增高,降低 NE 的生物活性,可显著性降低 TBI 大鼠的 BBB 通透性和脑组织含水率,表明西维来司钠能够减轻 TBI 导致的继发性脑水肿。这一发现可能将为治疗 TBI 后脑水肿开辟一条新的途径。但目前对于西维来司钠减轻脑水肿的具体机制仍不明确,值得研究者继续探索。

参考文献:

[1] Korkmaz B,Horwitz MS,Jenne DE,et al. Neutrophil elastase,proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases[J]. *Pharmacol Rev*,2010,62(4):726-759.

[2] Tsujii S,Okabayashi T,Shiga M,et al. The effect of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat on early injury after liver resection[J]. *World J Surg*,2012,36(5):1122-1127.

[3] Stowe AM,Adair-Kirk TL,Gonzales ER,et al. Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion[J]. *Neurobiol Dis*,2009,35(1):82-90.

[4] Groutas WC,Dou D,Alliston KR. Neutrophil elastase in-

hibitors[J]. *Expert Opin Ther Pat*,2011,21(3):339-354.

[5] Thompson HJ,Lifshitz J,Marklund N,et al. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation [J]. *J Neurotrauma*,2005,22(1):42-75.

[6] Korkmaz B,Moreau T,Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions [J]. *Biochimie*, 2008,90(2):227-242.

[7] Gunawardena KA,Gullstrand H,Perrett J. An oral neutrophil elastase inhibitor, in healthy volunteers and patients with COPD[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*,2013,51(4):288-304.

[8] Roghanian A,Sallenave JM. Neutrophil elastase(NE) and NE inhibitors: canonical and noncanonical functions in lung chronic inflammatory diseases (cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease) [J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*,2008,21(1):125-144.

[9] 张红,苟大明,李健权,等. 西维来司钠对体外循环中血浆弹性蛋白酶、补体 C3、C4 及尿 NAG 的影响[J]. *第三军医大学学报*,2006,28(4):331-333.

[10] Lungarella G,Cavarra E,Lucattelli M,et al. The dual role of neutrophil elastase in lung destruction and repair[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2008,40(6/7):1287-1296.

[11] Iwata K,Doi A,Ohji G,et al. Effect of neutrophil elastase inhibitor(sivelestat Sodium) in the treatment of acute lung injury(ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): a systematic review and meta-analysis[J]. *Intern Med*,2010,49(22):2423-2432.

[12] 丁丽君,董志,乐乐,等. 西维来司钠对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制[J]. *中国药理学通报*,2011,27(1):54-58.

(收稿日期:2014-03-10 修回日期:2014-06-09)

(上接第 3457 页)

[5] 王兆福,张伯伟,马茹,等. 河南省骨髓库汉族捐献者 HLA-A、B、DR 高分辨基因多态性调查分析[J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2011,15(31):5801-5804.

[6] 丁浩强,叶欣,梁华钦,等. 广州地区献血人群 HLA-A、B、DRB1 高分辨等位基因及单体型多态性的研究[J]. *中国免疫学杂志*,2010,26(9):810-813.

[7] 毛伟,黄霞,王蓉感,等. 重庆地区人群 HLA-A、B、DRB1 基因多态性研究[J]. *重庆医学*,2006,35(14):1286-1288.

[8] 程良红,金士正,高素青,等. 中国南北汉族人群 HLA-A * 02 等位基因的分布差异[J]. *第一军医大学学报*,2005,25(3):321-324.

[9] Wen SH,Lai MJ,Yang KL. Human leukocyte antigen-A,-B,and -DRB1 haplotypes of cord blood units in the Tzu Chi Taiwan Cord Blood Bank[J]. *Hum Immunol*, 2008,69(7):430-436.

[10] Trachtenberg E,Vinson M,Hayes E,et al. HLA class I (A,B,C) and class II (DRB1,DQA1,DQB1,DPB1) alleles and haplotypes in the Han from southern China [J]. *Tissue Antigens*,2007,70(6):455-463.

[11] Yang G,Deng YJ,Hu SN,et al. HLA-A,-B,and -DRB1 polymorphism defined by sequence-based typing of the Han population in Northern China[J]. *Tissue Antigens*, 2006,67(2):146-152.

[12] Shi L,Ogata S,Yu JK,et al. Distribution of HLA alleles and haplotypes in Jinuo and Wa populations in Southwest China[J]. *Hum Immunol*,2008,69(1):58-65.

[13] Ogata S,Shi L,Matsushita M,et al. Polymorphisms of human leucocyte antigen genes in Maonan People in China[J]. *Tissue Antigens*,2007,69(2):154-160.

(收稿日期:2014-04-08 修回日期:2014-06-18)