

广东汉族人群 HLA-Cw 多态性及单体型分析

马红京¹, 肖露露², 尹晓林¹, 郭坤元¹, 叶欣² (第一军医大学珠江医院血液科, 广东广州 510282; ² 广州器官移植配型中心, 广东广州 510095)

摘要: 目的 检测广东汉族人群 HLA-Cw 及 HLA-A、B、DRB1 基因频率, 分析该人群 HLA-Cw 等位基因多态性及其单体型特点。方法 骨髓移植供者 185 例, 抗凝血提取 DNA, 半量全自动 PCR-RSSO 分型检测 HLA-A、B、Cw、DRB1 基因型。结果 在分辨水平检出 Cw 等位基因 11 个, 其中分布频率较高的依次为: Cw*03 (0.2580)、Cw*07 (0.1887)、Cw*01 (0.1732)、Cw*08 (0.1070)。统计分析呈现显著连锁不平衡的 HLA-Cw-A 单体型 7 个, HLA-Cw-B 单体型 20 个, HLA-Cw-DRB1 单体型 10 个。结论 广东汉族群体 HLA-Cw 基因具有较为丰富的多态性, 其与 HLA-A、B、DRB1 间连锁不平衡单体型具有地区性遗传特征。

关键词: 人类白细胞抗原 -Cw; 单体型; 基因频率; 多态性

中图分类号: R392.13 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)08-0900-04

HLA-Cw alleles polymorphism and haplotypes in Guangdong Han population

MA Hong-jing¹, XIAO Lu-lu², Yin Xiao-lin¹, GUO Kun-yuan¹, Ye Xin²

¹Department of Hematology, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China;

²Guangzhou Tissue Typing Center, Guangzhou 510095, China

Abstract: Objective To analyze the polymorphism and haplotypes of HLA-Cw and detect HLA-A, B, Cw and DRB1 allele frequencies in Guangdong Han population. **Method** An auto semi-quantitative PCR with reverse sequence-specific oligonucleotide was adopted to explore the HLA-A, B, Cw and DRB1 genotypes of 185 bone marrow donors. **Result** Eleven HLA-Cw alleles were obtained in which Cw*03 (0.2580), 07 (0.1887), 01 (0.1732), and 08 (0.1071) had much higher allele frequencies. A total of 7 HLA-Cw-A, 20 HLA-Cw-B and 10 HLA-Cw-DRB1 haplotypes were found. **Conclusion** HLA-Cw alleles have richer polymorphisms and their linkage disequilibrium with HLA-A, B, DRB1 exhibits geographic genetic characteristics.

Key words: HLA-Cw; haplotype; allele frequency; polymorphism

人类白细胞抗原 (HLA) 位于第 6 号染色体短臂 6p21.3 区域, 是人类基因组中最复杂的免疫遗传系统。不同地域和种族 HLA 多态性差异较大, 并且不同 HLA 基因座位之间存在显著的连锁不平衡现象, 是人类遗传学的重要标志。对于 HLA-A、B、DRB1 基因多态性及其单体型的研究较为深入, 然而尚缺乏大样本、华人 HLA-Cw 基因多态性及其单型的分析资料, 这是由于 HLA-Cw 抗原在细胞表面表达水平较低, 难于获得可靠性强、特异性高的标准血清, 采用传统血清学分型技术检测 HLA-Cw 空白抗原频率高达 40%~50%^[1]。随着分子生物学技术的不断发展, 基因分型技术的应用使 HLA-Cw 基因型检测的准确性及成功率大为提高。本研究旨在分析广东汉族人群 HLA-Cw 基因多态性及其与 HLA-A、B、DRB1 位点间连锁不平衡规律, 为群体遗传学、法医学、人类学研

究提供参数, 同时也为 HLA 与疾病相关性研究、骨髓/造血干细胞移植供者选择提供信息。

1 材料和方法

1.1 标本收集

1996~2000 年广东地区骨髓移植供者 185 例, ACD-B 抗凝血。

1.2 模板 DNA 提取

使用 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany), Pharmacia Gene Quant RNA/DNA Calculator 测定 DNA 纯度和浓度。

1.3 半量全自动 PCR-RSSO 分型

按有关文献操作步骤进行^[2]。用 DYNAL AUTO RELI48 全自动杂交仪将检测变性 PCR 产物。HLA-A、B、Cw、DRB1 基因型采用 DYNAL 公司 PMP503 版本和美国骨髓库编解码软件 (NMDP) 分析后经人工技术判断结果。

1.4 统计学处理

HLA-A、B、Cw、DRB1 基因频率采用直接计数法计算, HLA-Cw 与 HLA-A、B、DRB1 双座位连锁不平衡参数 (LD)、相对连锁不平衡参数 (RLD) 及 χ^2 检验

收稿日期: 2004-02-26

基金项目: 广州市重大科研项目基金 (2000-Z-022-01)

Sponsored by Foundation for Key Science Research Project of Guangdong Province (2000-Z-022-01)

作者简介: 马红京 (1967-), 女, 副主任医师, 第一军医大学在读博士生, 电话: 020-61643281

通讯作者: 郭坤元, 第一军医大学珠江医院血液科, 电话: 020-61643287

LD显著性参见文献 [3]。

表 1 广东汉族人群 HLA-A、B、Cw、DRB1 基因频率
(n=185)

Tab.1 Allele frequencies of HLA-A, B, Cw and DRB1
in Guangdong Han population (n=185)

HLA Locus	Allele	Allele frequency
HLA-A	01	0.012 7
	02	0.297 4
	11	0.334 4
	23	0.006 3
	24	0.135 8
	26	0.019 2
	30	0.019 2
	31	0.012 7
	32	0.012 7
	33	0.128 6
	66	0.006 3
	68	0.006 3
	blank	0.007 5
HLA-B	07	0.012 7
	13	0.072 2
	15	0.012 7
	17	0.006 3
	27	0.006 3
	35	0.025 6
	37	0.012 7
	38	0.038 7
	39	0.025 6
	40	0.006 3
	44	0.032 2
	46	0.114 1
	51	0.072 2
	52	0.012 7
	54	0.052 0
	55	0.019 2
	57	0.019 2
	58	0.117 4
	60	0.128 5
	61	0.035 4
	62	0.032 2
	75	0.012 7
	76	0.012 7
blank	0.024 3	
HLA-Cw	0.1	0.173 2
	03 (9, 10)	0.258 0
	04	0.058 0
	05	0.012 7
	06	0.032 2
	07	0.188 7

HLA Locus	Allele	Allele frequency
HLA-DRB1	08	0.107 0
	12	0.038 7
	14	0.065 4
	15	0.045 3
	16	0.003 2
	blank	0.016 9
	01	0.019 2
	04	0.092 9
	07	0.032 2
	08	0.079 1
09	0.114 1	
10	0.019 2	
11	0.052 0	
12	0.177 1	
13	0.045 3	
14	0.121 3	
15	0.092 9	
16	0.038 7	
17	0.079 1	
blank	0.037 2	

2 结果

2.1 HLA-A、B、Cw、DRB1 基因频率

采用直接计数法统计的广东汉族人群 HLA-A、B、Cw、DRB1 基因频率分布见表 1。在中分辨水平检出 HLA-A 等位基因 12 个,HLA-B 等位基因 23 个,HLA-Cw 等位基因 11 个,HLA-DRB1 等位基因 13 个。广东汉族人群 HLA-A*11 (0.3344)、A*02 (0.2974)、A*24 (0.1358)、A*33 (0.1285)、HLA-B*60 (0.1285)、B*75 (0.1213)、B*58 (0.1177)、B*46 (0.1141)、HLA-Cw*03 (0.2580)、Cw*07 (0.1887)、Cw*01 (0.1732)、Cw*08 (0.1071)、HLA-DRB1*12 (0.1771)、DRB1*14 (0.1213)、DRB1*09 (0.1141) 具有较高的基因频率分布 (<0.10)。

2.2 HLA-A-Cw、HLA-Cw-B、HLA-Cw-DRB1 双座位单体型频率

按照文献估算双座位单体型频率 (HF)、连锁不平衡参数 (LD)、相对连锁不平衡参数 (RLD) 及 χ^2 值见表 2。表 2 显示为存在显著连锁不平衡 ($\chi^2 > 3.84$, $P < 0.05$) 的单体型,HLA-A-Cw 单体型 7 个,HLA-Cw-B 单体型 20 个,HLA-Cw-DRB1 单体型 10 个。其中 A*02-Cw*01、A*33-Cw*03、Cw*01-B*46、Cw*03-B*13、Cw*03-B*58、Cw*08-B*75、Cw*14-B*51、Cw*03-DRB1*17、Cw*08-DRB1*12 呈现非常显著的连锁不平衡 ($\chi^2 > 10.83$, $P < 0.001$)。

表 2 广东汉族人群 HLA 双座位单体型分布
Tab.2 Distribution of HLA two-locus haplotypes in Guangdong Han population

Two-locus	Haplotype	HF	LD	RLD	χ^2
Cw-A					
	Cw*01-A*02	0.116 9	0.065 4	0.537 4	21.230 0
	Cw*03-A*33	0.093 6	0.060 4	0.633 6	22.764 8
	Cw*05-A*11	0.012 7	0.008 5	1.000 0	4.1246 3
	Cw*06-A*30	0.012 6	0.012 0	0.646 4	3.973 0
	Cw*07-A*11	0.096 8	0.033 7	0.268 1	4.387 6
	Cw*08-A*11	0.062 7	0.027 0	0.378 5	4.725 6
	Cw*12-A*11	0.029 2	0.016 2	0.628 1	4.667 0
Cw-B					
	Cw*01-B*46	0.106 4	0.080 6	0.854 9	43.544 1
	Cw*01-B*54	0.036 5	0.027 5	0.640 4	9.367 0
	Cw*03-B*13	0.055 0	0.036 3	0.678 0	12.839 0
	Cw*03-B*15	0.012 7	0.009 5	1.000 0	4.136 5
	Cw*03-B*58	0.113 4	0.083 1	0.951 0	45.647 3
	Cw*04-B*76	0.012 7	0.012 0	1.000 0	4.155 3
	Cw*05-B*44	0.012 7	0.010 3	1.000 0	4.144 6
	Cw*05-B*62	0.012 7	0.012 3	1.000 0	4.156 9
	Cw*06-B*57	0.012 6	0.012 0	0.646 4	3.973 0
	Cw*07-B*27	0.017 8	0.013 0	0.623 2	4.050 6
	Cw*07-B*35	0.017 8	0.012 7	0.623 2	4.050 6
	Cw*07-B*38	0.030 9	0.023 6	0.750 5	8.534 0
	Cw*07-B*39	0.025 6	0.020 8	1.000 0	8.606 7
	Cw*07-B*60	0.055 0	0.030 7	0.294 6	6.606 9
	Cw*08-B*75	0.074 0	0.061 0	0.648 6	25.264 8
	Cw*12-B*52	0.012 7	0.012 2	1.000 0	4.154 8
	Cw*14-B*44	0.018 5	0.016 4	0.546 1	5.377 5
	Cw*14-B*51	0.037 7	0.033 0	0.543 7	11.789 3
	Cw*14-B*52	0.012 7	0.019 9	1.000 0	4.154 8
	Cw*15-B*51	0.017 6	0.014 3	0.341 3	4.149 7
Cw-DRB1					
	Cw*01-DRB1*09	0.042 1	0.022 3	0.236 4	4.073 0
	Cw*03-DRB1*11	0.034 7	0.021 3	0.552 6	5.970 3
	Cw*03-DRB1*15	0.034 7	0.021 3	0.552 6	5.970 3
	Cw*03-DRB1*17	0.066 2	0.045 8	0.780 1	18.740 3
	Cw*04-DRB1*15	0.023 1	0.017 6	0.331 5	4.886 5
	Cw*06-DRB1*07	0.025 6	0.024 6	0.789 2	8.588 1
	Cw*08-DRB1*08	0.028 0	0.019 5	0.276 8	4.889 4
	Cw*08-DRB1*12	0.059 5	0.040 5	0.460 3	12.496 9
	Cw*12-DRB1*12	0.023 2	0.016 3	0.512 5	4.660 3
	Cw*14-DRB1*13	0.017 8	0.014 9	0.351 0	4.430 6

HF: Haplotype frequency; LD: Linkage disequilibrium; RLD: Relative linkage disequilibrium

3 讨论

近年来 HLA-Cw 的研究取得了长足进步, 以往认为 Cw 不具广泛多态性, 在细胞表面表达水平较低, 生物学功能有限, 近年来认识到 HLA-Cw 与

HLA-A、B 分子一样具有高度多态性, 广泛分布于有核细胞表面, 不仅提呈内源性多肽给 CD8+T 细胞, 诱发特异性细胞杀伤效应, 还可作为 NK 细胞免疫球蛋白受体 (KIR) 的配体参与免疫反应^[4]。同时其与疾病相关性研究、在移植免疫、抗病毒、抗肿瘤免疫中的作用日益受到重视。

采用半量全自动 PCR-RSSO 分型技术检测广东汉族人群 HLA-Cw, 空白基因频率仅为 0.0169。在中分辨水平共检出 11 个 Cw 等位基因, 表明广东汉族人群 HLA-Cw 具有较为丰富的多态性与特点。广东汉族人群中 Cw*03、07、01、08 具有相对较高的频率分布 (>0.10), 上海汉族 Cw*03、01、06、07 出现频率较高^[5], 台湾闽南及客家人群中 Cw*03、07、01 分布频率较高, 但 Cw*08 频率较低^[6], 日本人高频 Cw 等位基因依次为 Cw*03、07、01、14^[7]。HLA-Cw 在上述东亚人群中分布具有相似性, Cw*03、01、07 在这些群体中分布频率均较高, 而 Cw*02、13、16、17、18 频率均较低或未检出。广东汉族与欧洲高加索人、西非人群^[8,9] Cw 分布频率差异较大。Cw*07、03、04、06、05 在高加索人中分布频率较高, Cw*04、16、03、07 在非洲人中具有高频分布。在广东、上海、台湾、日本人中属于高频基因的 Cw*01, 在高加索及西非人中表现为低频分布。在上述东亚人群中较少见的 Cw*16、17、18, 在西非人中出现频率相对较高。表明不同地域、不同人种 HLA-Cw 频率分布存在较明显的差异。

广东汉族人群存在连锁不平衡的 A-Cw 单体型主要有 A*02-Cw*01、A*33-Cw*03、A*11-Cw*05、A*11-Cw*07 等 7 个, Cw-B 单体型主要有 Cw*01-B*46、Cw*03-B*13、Cw*03-B*58、Cw*08-B*75、Cw*14-B*51 等 20 个, Cw-DRB1 单体型有 Cw*03-DRB1*17、Cw*08-DRB1*12、Cw*06-DRB1*07、Cw*03-DRB1*11 等 10 个。HLA-B、Cw 位点在染色体上相距仅 100 kb, 而 A、Cw 位点间相距约 1 500 kb, Cw、DRB1 间距约 1 300 kb, 因此 HLA-Cw 与 HLA-B 位点间具有更强的连锁不平衡倾向, 本次研究结果显示 HLA-B-Cw 单体型明显多于 Cw-A 及 Cw-DRB1, 也证实了这一点。广东汉族人群中仅具有 7 个 Cw-A 单体型, 其中呈现强连锁不平衡的 Cw*01-A*02, 在朝鲜及日本人中亦常见, 广东人群常见的 Cw*03-A*33、Cw*06-A*30 单体型在朝鲜人可见但日本人群未见到。在日本、朝鲜人及欧洲人群均检出的 Cw*04-A*11, 在广东汉族中两者不存在显著关联。7 个 Cw-A 均与欧洲人群常见的 Cw-A 单体型不同, 后者主要为: Cw*07-A*01、Cw*05-A*02、Cw*04-A*03 等。广东汉族 Cw-B 单体型丰富, 其中 Cw*03-B*13、Cw*03-B*15、Cw*07-B*39、Cw*14-B*51、Cw*14-B*52、

Cw*15-B*51 在日本及欧洲人群中均常见,而 Cw*01-B*46 和 Cw*14-B*44 在广东及日本人群常见,于欧洲人群中未检测到。广东及欧洲人群都具有的 Cw*05-B*44、Cw*06-B*57、Cw*07-B*27 在日本人群未见。广东人群具有的其它单体型如: Cw*04-B*76、Cw*05-B*62、Cw*07-B*35、Cw*07-B*38、Cw*07-B*60、Cw*08-B*75、Cw*12-B*52 在日本和欧洲人群均未检测出^[7,10-12]。广东汉族 Cw-DRB1 连锁不平衡强度介于 Cw-B 与 Cw-A 之间,存在 10 个单体型,Cw*03-DRB1*17、Cw*08-DRB1*12 呈现非常显著的连锁不平衡。说明不同地域、不同人种 Cw 与其它 HLA 基因构成的单体型各具特点,并且存在较大差异。

综上所述,广东汉族人群 HLA-Cw 基因具有较为丰富的多态性,其与 HLA-A、B、DRB1 间连锁不平衡单体型具有地区性遗传特征。分析 HLA-Cw 基因多态性及其单体型分布特点,为群体遗传学、法医学、人类学研究提供详尽的资料参数,同时也为 HLA 与疾病相关性研究、骨髓/造血干细胞移植供者选择提供信息。

参考文献:

- [1] Torio MA, Moya-Quiles MR, Muro M, *et al.* Discrepancies in HLA-C typing in transplantation: comparison of PCR-SSP and serology results [J]. *Trans Proc*, 2002, 34: 419-20.
- [2] 肖露露,郝桂琴,叶欣,等. PCR-RSSO 基础上 HLA-I、II 基因分型的研究 [J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(1): 58-61.
Xiao LL, Hao GQ, Ye X, *et al.* HLA genotyping by automatic semi-quantitative polymerase chain reaction-reverse sequence specific oligonucleotide [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(1): 58-61.
- [3] 谭建明,周永昌,唐孝达. 组织配型技术与临床应用 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002. 91-3.
- [4] Davies SM, Ruggieri L, *et al.* Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatch unrelated donor hematopoietic transplants killer immunoglobulin-like receptor [J]. *Blood*, 2002, 100(10): 3825-7.
- [5] 冯明亮,张雁征,杨颖,等. PCR-SSP 分型检测上海汉族人群 HLA-Cw 位点血清学和非血清学鉴定的等位基因 [J]. 遗传学报, 1998, 25(2): 95-102.
Feng ML, Zhang YZ, Yang Y, *et al.* HLA-Cw genotyping of serologically and non-serologically defined alleles using sequence-specific primers(PCR-SSP) in Shanghai Han population [J]. *Acta Genet Sin*, 1998, 25: 95-102.
- [6] Lin M, Chu CC, Chang SL, *et al.* The origin of Minnan and Hakka, the so called "Taiwanese" inferred by HLA study [J]. *Tissue Antigens*, 2001, 57: 192-9.
- [7] Saito S, Ota S, Yamada E, *et al.* Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population [J]. *Tissue Antigens*, 2000, 56: 522-9.
- [8] Bunce M, Barnardo MC, Procter J, *et al.* High resolution HLA-C typing by PCR-SSP: identification of allelic frequencies and linkage disequilibria in 604 unrelated random UK Caucasoids and a comparison with serology [J]. *Tissue Antigens*, 1997, 50: 100-11.
- [9] Sanchez-Mazas A, Steiner QG, Grundschober C, *et al.* The molecular determination of HLA-Cw alleles in the Mandenka (West Africa) reveals a close genetic relationship between Africans and Europeans [J]. *Tissue Antigens*. 2000, 56: 303-12.
- [10] Park MH, Hwang YS, Park KS, *et al.* HLA haplotypes in Koreans based on 107 families [J]. *Tissue Antigens*, 1998,51: 347-55.
- [11] Wang H, Tokunaga K, Ishikawa H, *et al.* A high-resolution genotyping method for HLA-C alleles and possible shared HLA-C-B haplotypes between Japanese and Caucasians [J]. *Tissue Antigens*, 1997, 50: 620-6.
- [12] Bugawan TL, Klitz W, Blair A, *et al.* High-resolution HLA class I typing in the CEPH families: analysis of linkage disequilibrium among HLA loci [J]. *Tissue Antigens*, 2000, 56: 392-404.
- [13] Koga M, Eisman JA, Sutherland RL. Regulation of epidermal growth factor receptor levels by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1988, 48: 2734-9.
- [14] Wang DS, Miura M, Demura H, *et al.* Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells [J]. *Endocrinology*, 1997, 138: 2953-62.
- [15] Swain LD, Schwartz Z, Boyan BD. 1,25-(OH)₂D₃ and 24,25-(OH)₂D₃ regulation of arachidonic acid turnover in chondrocyte cultures is cell maturation specific and may involve direct effects of phospholipase A2 [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1992, 1136: 45-51.
- [16] Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(6): 763-86.
- [17] Amano A, Roban R, Kuroki M, *et al.* Requirement for vascular endothelial growth factor in wound and inflammation-related corneal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [J], 1998, 39: 18-22.

(上接 896 页)

alpha, 25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6800-5.

[9] Dekaris I, Zhu SN, Dana MR. TNF-alpha regulates corneal Langerhans cell migration [J]. *J Immunol*, 1999, 162(7): 4235-9.

[10] Dana MR, Dai R, Zhu S, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist suppresses Langerhans cell activity and promotes ocular immune privilege [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39(1): 70-7.

[11] 谢立信,史伟云,董晓光,等. 高危角膜移植术后免疫排斥反应规律的临床研究 [J]. 眼科研究, 2000, 18(5): 439-41.

Xie LX, Shi WY, Dong XG, *et al.* Clinical investigation of allograft in high-risk keratoplasty [J]. *Ophthal Res*, 2000,18(5), 439-41.

[12] Fujioka T, Hasegawa M, Ishikura K, *et al.* Inhibition of tumor growth and angiogenesis by vitamin D₃ agents in murine renal cell carcinoma [J]. *J Urol*, 1998, 160(1): 247-51.