

Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae[J]. *Diagnostic Microbiol Infect Dis*, 2011, 71(4):354-365.

[13] Yan L, Zhou J, Zheng Y, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA[J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(5):970-1003.

• 临床探讨 •

## 70 例白血病与 HLA-A、B、DRB1 基因遗传关联性初步分析\*

裴永峰, 李恒聪, 黄惠妮

(南宁中心血站/南宁输血医学研究所组织相容性与免疫遗传实验室, 南宁 530007)

[14] 罗茗月, 熊礼宽. 恒温扩增技术在病原体检测中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(7):972-976.

(收稿日期:2017-01-06 修回日期:2017-03-21)

**摘要:**目的 初步探讨广西地区 70 例白血病与人类白细胞抗原(HLA)基因的遗传关联性。方法 运用 PCR-SSP 法对广西地区 70 例白血病(病例组)进行 HLA-A、B、DR 基因分型并计算其基因频率,并与 2 583 例广西骨髓库健康人(对照组)比较。结果 病例组中检出 HLA-B\*46 和 B\*51 基因频率的频率分别为 0.228 6 和 0.100 0,显著高于对照组的 0.143 1 和 0.052 3 ( $P < 0.05$ );检出 B\*40 基因频率为 0.071 4,显著低于对照组的频率(0.146 2) ( $P < 0.05$ ),其余各基因在病例组和对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 HLA-A、B、DR 高频基因与广西地区健康人群基因频率基本一致,其中 B\*46 和 B\*51 等位基因可能是广西地区白血病的易感基因;B\*40 等位基因可能是广西地区白血病的保护基因。

**关键词:**白血病; 人类白细胞抗原; 基因频率; 广西

**DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.039 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)12-1787-03**

人类白细胞抗原(HLA)是人类免疫系统的主要组织相容性抗原复合物,是目前所知人类最复杂、最具多态性的遗传系统,其定位于第 6 号染色体短臂,在自我识别、免疫细胞的发育和特异性免疫应答中发挥重要作用,截止到 2016 年 7 月,HLA 数据库已正式纳入的 HLA 等位基因共有 15 020 个,已命名的 HLA-B 位点的等位基因达到 4 358 个<sup>[1]</sup>,HLA 等位基因频率及其连锁不平衡特点在分布上具有人种、种族及地域上的差异<sup>[2]</sup>。至今报道有关 HLA 与疾病相关的文章近万篇,涉及的疾病多达 500 多种<sup>[3]</sup>。多数学者认为,白血病是由物理、化学、生物、遗传等方面因素共同作用的结果。除了与外界环境因素有关外,患者自身免疫能力也具有同样重要的能力。近年来研究发现,许多 HLA 分子是白血病的保护因素或危险因素,不同地区白血病与 HLA 相关性的研究也有报道<sup>[4]</sup>。广西聚居着汉、壮、瑶等民族,而各型白血病在多个民族都有发生。本文采用 PCR-SSP 技术,对来本实验室的 70 例白血病患者进行 HLA 高分辨基因分型,探讨广西地区白血病与广西地区健康人群的 HLA 相关基因频率及抗原表达的差异,为临床移植配型提供可靠依据,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 病例组:采用 2011—2014 年在本实验室做造血干细胞移植配型的广西地区白血病患者 70 例,其中男 43 例、女 27 例,年龄 3~54 岁,中位年龄 33 岁,所有患者都是诊断明确的初诊患者,包括急性淋巴细胞白血病 30 例、急性髓细胞白血病 18 例、慢性粒细胞白血病 15 例、慢性淋巴细胞白血病 7 例。对照组:采用 2011—2014 年 2 583 例骨髓库捐献志愿者。所有研究者均为广西本地人,所有检测事先都征得研究对象的知情同意。

**1.2 仪器及试剂** 9800 型 PCR 扩增仪(美国 ABI),Thermo SCIENTIFIC NANODROP 1000 核酸蛋白测定仪(美国 Gene),全自动凝胶成像分析系统(英国 Bio-best),多功能水平

电泳系统(美国 Embi Tec),HLA-ABDR SSP Unitray 分型试剂(美国 Invitrogen),DNA 提取试剂(QIAamp DNA blood mini kit,51104,荷兰),单通道和八通道移液器(德国 eppendorf)。

**1.3 方法** 病例组和对照组均采用 5 mL 乙二胺四乙酸抗凝外周血,严格按试剂说明书提取 DNA,用核酸蛋白测定仪确定 DNA 质量,DNA 浓度为 40~100 ng/ $\mu$ L,260~280 nm 处的吸光度值(A 值)为 1.7~1.9,并用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测无 DNA 降解现象。用 HLA-ABDR SSP Unitray 分型试剂进行分型试验。

**1.4 统计学处理** 等位基因频率是指某基因个数占该座位上全部基因中的百分比,采用平方根法计算每个等位基因的频率。数据用 SPSS 19.0 统计软件分析,两组间的等位基因频率比较采用四格表  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。当差异有统计学意义时,并计算比值比(OR)和 95%可信区间(CI)。

### 2 结果

**2.1 HLA-A 位点的基因频率比较** 病例组中共检出 HLA-A 等位基因 9 个,具体见表 1。其中基因频率在前 5 位的基因分别是 A\*02(0.371 4)、A\*11(0.357 1)、A\*24(0.114 3)、A\*33(0.092 9)和 A\*26(0.028 6)。对照组基因频率在前 5 位的基因与病例组一样,只是顺序有所不同,其分别是 A\*11(0.345 4)、A\*02(0.316 4)、A\*24(0.133 9)、A\*33(0.095 8)和 A\*26(0.024 2)。病例组 9 个等位基因的基因频率与对照组相比,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.2 HLA-B 位点的基因频率比较** 病例组中共检出 HLA-B 等位基因 17 个,具体见表 2。其中基因频率在前 5 位的基因分别是 B\*46(0.228 6)、B\*15(0.150 0)、B\*13(0.114 3)、B\*58(0.100 0)和 B\*51(0.100 0)。对照组基因频率在前 5 位的基因与病例组有 4 个相同,其前 5 位分别是 B\*15

\* 基金项目:广西壮族自治区卫生厅科技研究计划项目(Z2010198);广西壮族自治区南宁市科学研究与技术开发计划项目(201003048C-3)。

(0.160 1)、B\*40(0.146 2)、B\*46(0.143 1)、B\*58(0.120 4) 和 B\*13(0.094 9)。病例组 17 个等位基因的基因频率与对照组相比,其中 B\*46 和 B\*51 基因频率明显高于对照组( $P < 0.05$ ),B\*40 基因频率明显低于对照组( $P < 0.05$ )。

**2.3 HLA-DRB1 位点的基因频率比较** 病例组中共检出 HLA-DRB1 等位基因 12 个,具体见表 3。其中基因频率在前 5 位的基因分别是 DRB1\*15(0.228 6)、DRB1\*14(0.142 9)、DRB1\*12(0.121 4)、DRB1\*16(0.107 1)和 DRB1\*03(0.100 0)。对照组基因频率在前 5 位的基因与病例组也有 4 个相同,其前 5 位分别是 DRB1\*15(0.188 0)、DRB1\*14(0.122 4)、DRB1\*03(0.107 6)、DRB1\*12(0.102 8)和 DRB1\*13(0.102 8)。病例组 12 个等位基因的基因频率与对照组相比,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**表 1 HLA-A 等位基因数及基因频率在病例和对照组的比较**

基因型	病例组(n=70)		对照组(n=2 583)		$\chi^2$	P
	等位基因数	基因频率	等位基因数	基因频率		
A*02	52	0.371 4	1 635	0.316 4	0.944	0.347
A*11	50	0.357 1	1 784	0.345 4	0.041	0.866
A*24	16	0.114 3	692	0.133 9	0.354	0.616
A*33	13	0.092 9	495	0.095 8	0.011	1.000
A*26	4	0.028 6	125	0.024 2	0.104	0.777
A*03	2	0.014 3	73	0.014 1	0.000	1.000
A*29	1	0.007 1	44	0.008 5	0.030	1.000
A*31	1	0.007 1	65	0.012 6	0.322	1.000
A*32	1	0.007 1	22	0.004 3	0.260	0.461

**表 2 HLA-B 等位基因数及基因频率在病例和对照组的比较**

基因型	病例组(n=70)		对照组(n=2 583)		$\chi^2$	P	OR	95%CI
	等位基因数	基因频率	等位基因数	基因频率				
B*46	32	0.228 6	739	0.143 1	5.595	0.026	0.626	0.423~0.926
B*15	21	0.150 0	827	0.160 1	0.075	0.908		
B*13	16	0.114 3	490	0.094 9	0.485	0.471		
B*58	14	0.100 0	622	0.120 4	0.430	0.598		
B*51	14	0.100 0	270	0.052 3	5.282	0.037	0.523	0.298~0.918
B*38	11	0.078 6	361	0.069 9	0.136	0.737		
B*40	10	0.071 4	755	0.146 2	4.918	0.024	2.046	1.072~3.904
B*55	6	0.042 9	99	0.019 2	3.710	0.063		
B*56	5	0.035 7	217	0.042 0	0.124	1.000		
B*27	2	0.014 3	86	0.016 6	0.045	1.000		
B*39	2	0.014 3	87	0.016 8	0.052	1.000		
B*52	2	0.014 3	60	0.011 6	0.082	0.680		
B*35	1	0.007 1	114	0.022 1	1.390	0.372		
B*48	1	0.007 1	89	0.017 2	0.811	0.732		
B*54	1	0.007 1	87	0.016 8	0.767	0.730		
B*07	1	0.007 1	93	0.018 0	0.901	0.520		
B*08	1	0.007 1	23	0.004 5	0.217	0.475		

**表 3 HLA-DRB1 等位基因数及基因频率在病例和对照组的比较**

基因型	病例组(n=70)		对照组(n=2 583)		$\chi^2$	P
	等位基因数	基因频率	等位基因数	基因频率		
DRB1*15	32	0.228 6	971	0.188 0	0.969	0.341
DRB1*14	20	0.142 9	632	0.122 4	0.409	0.520
DRB1*12	17	0.121 4	531	0.102 8	0.409	0.488
DRB1*16	15	0.107 1	425	0.082 3	0.919	0.356
DRB1*03	14	0.100 0	556	0.107 6	0.067	0.891
DRB1*11	10	0.071 4	294	0.057 0	0.468	0.463
DRB1*13	9	0.064 3	531	0.102 8	1.864	0.198
DRB1*09	8	0.057 1	293	0.056 7	0.000	1.000
DRB1*04	8	0.057 1	419	0.081 2	0.920	0.427
DRB1*07	3	0.021 4	195	0.037 7	0.952	0.491
DRB1*08	3	0.021 4	203	0.039 3	1.097	0.376
DRB1*10	1	0.007 1	80	0.015 5	0.617	0.725

**3 讨 论**

HLA 参与机体的免疫应答和免疫调节,因不同个体对疾病易感性的差异在一定程度上是由遗传因素所决定的,在群体调查中比较患者与健康人某些特定等位基因及其产物的频率,是研究疾病易感性的主要方法。因此,研究广西地区白血病患者中 HLA 等位基因分布频率及特征与健康人群是否存在差异,对白血病的发病机制、早期诊断、预后及基因治疗具有深远的意义和临床研究价值。目前有许多关于 HLA 和白血病相关性的研究报道,但报道的结果并不一致。据外文文献报道,HLA-DRB1\*09 可增加儿童再生障碍性贫血患病风险<sup>[5]</sup>;欧洲多个国家研究表明,HLA-B8、A3 和 DRB14 对慢性粒细胞白血病有保护作用<sup>[6]</sup>。

在中国也有许多 HLA 和白血病相关性的研究报道。在天津脐带血库移植查询的白血病患者中,HLA-B\*56、B\*70 基因有遗传易感性,为白血病发生的危险标志;HLA-A\*03、A\*30、B\*13、B\*44、B\*61、DRB1\*07、DRB1\*15 基因是白血病的保护性标志<sup>[7]</sup>;中国汉族人群中,HLA-CW7 基因与急性淋巴细胞的白血病相关;HLA-A30、B13、CW4 基因频率与

急性淋巴细胞白血病发生呈负相关,可能是急性淋巴细胞白血病的保护性基因<sup>[8]</sup>;中国人群中,HLA-DRB1\*08 基因可能是急性髓性白血病的易感基因,而 HLA-DRB1\*13 基因是其保护基因<sup>[9]</sup>;中国北方汉族人群中,HLA-DRB1\*09 基因与急性淋巴细胞白血病的发生呈负相关,可能是其保护性基因;而 HLA-B\*18 与慢性髓性白血病基因的发生呈正相关,可能是其易感性基因<sup>[10]</sup>。

本文病例组中共检出 HLA-A 等位基因 9 个,B 等位基因 17 个,DRB1 等位基因 12 个,其中基因频率最高的前 5 位分别是 A\*02、A\*11、A\*24、A\*33、A\*26、B\*46、B\*15、B\*13、B\*58、B\*51,DRB1\*15、DRB1\*14、DRB1\*12、DRB1\*16、DRB1\*03。其中 A\*02、A\*11、A\*24、B\*46、B\*15、B\*13、B\*58、B\*51、DRB1\*14、DRB1\*12 和 DRB1\*16 的基因频率均超过 10%。病例组与本地区健康人群中,HLA-A、B、DRB1 基因频率基本一致,因此具有该类基因的患者在本地区找到合适的供体机会较大。病例组 HLA-A 和 DRB1 2 个位点共 21 个等位基因的基因频率与对照组相比,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );HLA-B 位点 17 个等位基因中,只有 B\*46 和 B\*51 等位基因频率显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),因此 B\*46 和 B\*51 可能是本地区白血病的易感基因;B\*40 等位基因频率显著低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其可能是本地区白血病的保护基因。

本文报道的结果与上述文献报道结果又有不同,分析原因,一方面可能与本研究的人群及样本量大小不同有关;另一方面可能是因为高度多态性分布的 HLA 系统具有明显种族和地域性差异<sup>[2]</sup>,在不同的群体中都有各自不同的优势等位基因,反映了进化过程中优势选择所造成的遗传学上的突变。从分子机制来分析,HLA 分子通过特异性免疫应答来保护机体,而某些 HLA 分子不能很好地呈递白血病相关抗原,导致免疫逃逸<sup>[11]</sup>;而且不同 HLA 分子对不同抗原肽的呈递能力不同,导致了不同地区和人群中白血病与 HLA 相关的基因频率不同;在不同地区及人群中观察到的与白血病相关的保护基因或易感基因,可能不是 HLA 基因本身在起作用,实际上是由连锁不平衡的尚未认识的基因在发挥相应的作用<sup>[10]</sup>,需要进一步来研究。目前尚无一种学说能完全阐述 HLA 与疾病的关联机制,但是目前的 HLA 与疾病相关性学说如连锁不平衡学说、受体学说、拟态学说、免疫应答基因学说、共同表位学说都能不同程度地解释和说明一些问题。

本实验室是中华骨髓库指定的广西唯一实验室,同时也具有给临床标本检测 HLA-A、B、DRB1 的资质。但是到目前为止,临床标本相对比较少,分析原因,可能有以下 2 个方面。首先,广西由于经济发展相对落后,人民群众的生活水平相对不是很高。所以当患者患上白血病,需要做造血干细胞移植时,一部分患者考虑到大量的移植费用,而放弃了做移植,甚至连患者自身的 HLA 基因分型都选择不做;其次,部分经济水平较好的患者又会去北京、广州等大城市去做治疗和检测,多方面的原因导致来本实验室的白血病检测病例相对较少,但也有部分文献对病例比较少的血液病与 HLA 的关系进行了报道<sup>[12]</sup>。所以本研究对广西地区白血病 70 例与 HLA-A、B、

DRB1 基因相关性方面仅做了初步探索,将为广西地区白血病的研究和寻找移植供体等提供有益的参考。对 HLA 分型与广西地区白血病之间的关联、移植治疗疗效的相关性研究尚需要深入的大样本的收集与后续研究,才能得出更精确的结论。

## 参考文献

- [1] Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, et al. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (Database issue): D423-D431.
- [2] Shao LN, Zhang ST, Yu WJ, et al. HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allele and haplotype frequencies of 14 529 Chinese Han bone marrow donors living in Dalian, China [J]. *Int J Immunogenet*, 2016, 43(2): 79-85.
- [3] Mahmoodi M, Nahvi H, Mahmoudi M, et al. HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in female patients with early onset breast cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(1): 49-55.
- [4] 胡安华. 新疆地区维吾尔族、汉族白血病与 HLA 基因相关性分析 [J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(9): 841-845.
- [5] Chen C1, Lu S, Luo M, et al. Correlations between HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 Allele polymorphisms and childhood susceptibility to acquired aplastic anemia [J]. *Acta Haematol*, 2012, 128(1): 23-27.
- [6] Posthuma EF, Falkenburg JH, Apperley JF, et al. HLA-DR4 is associated with a diminished risk of the development of chronic myeloid leukemia (CML). *Chronic Leukemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Registry* [J]. *Leukemia*, 2000, 14 (5): 859-862.
- [7] 杜颖, 梁晓岚, 李茜, 等. HLA-A、B、DRB1 基因与白血病的相关性研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(2): 285-288.
- [8] 刘楠, 林晓娥, 袁方, 等. HLA-A、B、DRB1 基因与白血病的相关性研究 [J]. *军事医学*, 2013, 37(8): 574-577.
- [9] 霍明瑞, 郝斌, 于燕, 等. HLA-DRB1 基因多态性与急性髓性白血病的相关性研究 [J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2012, 32(4): 330.
- [10] 王晓静, 张益枝, 孙海燕, 等. 1186 例 HLA 基因与白血病相关性分析研究. [J] *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(2): 613-616.
- [11] Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens immune surveillance, and tumor immune escape [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(3): 346-355.
- [12] 韦妮波, 陈深, 严煜林. 广西汉族婴幼儿皮肤血管瘤与 HLA-DRB1 等位基因的相关性研究 [J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2013, 20(6): 383-386.

(收稿日期: 2017-01-07 修回日期: 2017-03-22)