

· 讲 座 ·

造血干细胞移植 HLA 配型指南

赵桐茂 (美国国立卫生研究院)

关键词:造血干细胞 移植 HLA 配型

中图分类号:R457.1⁺1 R331.1⁺42

文献标识码:A

文章编号:1004-549X(2005)01-0074-03

1957 年首例人类双生子之间骨髓移植成功, 为治疗白血病等恶性血液病开创了新疗法。继使用 HLA 匹配的无关供者造血干细胞移植成功后, 1988 年美国率先建立起无关供者骨髓库(美国国家骨髓供者计划, 简称 NMDP), 尔后又建立了公共脐带血库。根据世界骨髓供者协会(WMDA) 2003 年年度报告^[1], 目前已有 60 个国家或地区的骨髓库、37 个脐带血库参加 WMDA; 登记在案的骨髓供者数超过 900 万人; 库存脐带血达 18 万份; 全球每年无关供者骨髓移植病例超过 5000 例。与此同时, HLA 分型技术也从简单的血清学方法, 转变为更精确的基因分型。

尽管有关 HLA 配合程度对造血干细胞移植结果影响的报告数以百计, 但是由于在样本数、疾病类型和病情、HLA 分型水平等方面的异质性, 所得到的结论不尽相同。此外 HLA 基因分型结果及其生物学意义的解释也显得日趋复杂。这些情况对于非 HLA 专业人员, 在选择 HLA 最佳配合无关供者方面产生了一定困扰。为解决此问题, WMDA^[2,3]、美国 NMDP^[4] 以及欧洲免疫遗传学联盟(EFI)^[5] 等组织相继推出与 HLA 配型有关的工作指南。目前中国造血干细胞捐献者资料库管理中心(简称中华骨髓库)的供者数已超过 20 万人, 使用无关供者的造血干细胞移植也已普遍开展, 但国内造血干细胞移植工作者面临以上同样的问题。为此, 笔者希望通过介绍相关知识, 为今后建立中国造血干细胞移植配型标准有所助益。

1 HLA 抗原和基因

1.1 HLA 抗原 HLA 抗原是细胞表面上的一种蛋白质, 也就是 HLA 分子, 它刺激宿主免疫系统可产生相应抗体, 因此, 最初 HLA 抗原是使用血清学方法检测出来的(表 1)。由于 HLA 抗原之间存在交叉反应性, 比如, 某个体只受到一个 HLA-B7 抗原的免疫刺激, 结果产生抗-B7 和抗-B27 等多种特异性抗体^[6]。根据交叉反应性的特点, HLA 抗原可以分成许多交叉反应组(表 2)。同一个交叉反应组中的抗原, 共有一些免疫学决定簇, 或称为抗原表位。由于使用血清学鉴定的同一个 HLA 抗原, 可以是许多等位基因的产物, 因此已检测出的等位基因数, 远远多于 HLA 抗原数(表 3)^[7]。此外, 由于 HLA 抗体来源以及抗体特异性的限制, 并非所有等位基因对应的 HLA 抗原都可以用血清学方法

鉴定。换言之, 在 DNA 水平上的 HLA 多态性, 只有其中一部分可以用血清学方法来识别。

表 1 HLA 血清学分型和 DNA 分型比较

分型方法	检材	检测对象
A, B, C 血清学分型	单核细胞	细胞表面抗原
DR 血清学分型	B 淋巴细胞	细胞表面抗原
A, B, C 基因分型	基因组 DNA	外显子 2, 3
DRB1 基因分型	基因组 DNA	外显子 2

表 2 HLA-A, B, DR 抗原交叉反应组*

A 座位	B 座位	DR 座位
A1, 11, 36	B7, 42, 54(22),	DR1, 15(2), 16(2)
A2, 203, 210, 28	55(22), 56(22)	DR3, 11(5), 12(5),
A3, 11, 1	B38(16), 39(16), 8	13(6), 14(6)
A23(9), 24(9), 2403	B44(12), 49(21)	DR4, 7, 9
A25(10), 32	B45(12), 50(21), 41	DR11(5), 12(5), 8
A26(10), 33, 34, 43, 66	B49(21), 44(12),	DR13(6), 14(6), 17(3),
A30, 31	52(5), 53	18(3)
A36, 1, 80	B51(5), 52(5), 53	
A68(28), 2, 69(28)	B57(17), 62(15),	
A74, 32	63(15)	
	B58(17), 22	
	B60(40), 61(40), 48	
	B62(15), 35, 70,	
	75(15), 76(15)	
	B63(15), 53, 57(17),	
	58(17)	
	B64(14), 65(14), 8	
	B71(70), 35, 62(15),	
	72(70)	

* 每一行代表一个交叉反应组, 括号中数字代表对应的宽特异性

表 3 已检测出的 HLA 抗原数和等位基因数

座位	抗原数	等位基因数
A	25	325
B	50	592
C	9	175
DRB1	18	458

1.2 HLA 基因 HLA 基因位于细胞核内, 由 DNA 构成, 它编码细胞表面的 HLA 蛋白分子。在移植免疫反应中,

HLA 基因本身不直接参与,而是其编码的 HLA 抗原在发挥作用。HLA 基因分型的基本原理是检测 DNA 序列的差异。虽然 HLA-I 类和 II 类基因都含有多个外显子,但实际上 HLA-A, B, C, DR 基因分型只检测相应基因外显子 2 和外显子 3 的 DNA 序列(表 1)。HLA 等位基因由世界卫生组织(WHO)HLA 命名委员会统一命名,采用数字命名方法。在最新的 2002 年版本中,一个完整的 HLA 等位基因最多需要用 9 个数字表示^[7]。从表 4 可见,HLA 座位用大写字母右上角加星号表示。星号后第 1、2 位数字代表相应血清学特异性;第 3、4 位代表等位基因,即编码的氨基酸序列有所改变;第 5、6 位表示外显子中的非编码取代,该核苷酸碱基取代不改变所编码的氨基酸,因此,对应的 HLA 抗原的分子结构未改变;第 7、8 位代表内含子区域中的碱基取代。第 9 位后缀字母 S 代表该等位基因的产物是可溶性 HLA 分子,不存在于细胞表面;L 代表编码低表达抗原;N 代表无效基因,该基因不产生相应的 HLA 抗原分子。

表 4 HLA 基因数字命名原则示例

基因座位	对应血清学特异性	外显子碱基取代	外显子非编码取代	内含子碱基取代	特殊表达基因					
数字位数	*	1	2	3	4	5	6	7	8	9
命名示例	A*	2	9	0	1	0	1	0	1	
	A*	2	4	0	2	0	1	0	2	L
	B*	4	4	0	2	0	1	0	2	S
	B*	1	5	0	1	0	1	0	2	N
	Cw*	0	7	0	2	0	1	0	1	
	DRB1*	1	3	0	1	0	1			

HLA 不同座位上的基因,紧密连锁组合成 HLA 单体型,在家庭中以共显性等位基因的遗传方式传递^[6]。因此,每个人都带有 2 条分别来自父母的 HLA 单体型。父母和孩子之间总是共有一条 HLA 单体型。同胞之间,有 1/4 的机会得到 2 条相同的单体型;有 1/4 的机会得到 2 条不相同的单体型;还有 1/2 的机会得到一条相同的 HLA 单体型。如果一个体的某座位上带有 2 个相同的等位基因,被称为纯合子;如带有 2 个不相同的等位基因,即为杂合子。只有通过家系调查才能确定是否为纯合子个体。

HLA 不同座位上的等位基因之间存在连锁不平衡,即实际观察到的某些基因出现在同一条单体型上的频率显著

高于预期值,提示这些基因倾向于组合在一起^[6]。不同种族中的连锁不平衡格局不尽相同。比如,HLA-A2, B46, DR9 和 HLA-A30, B13, DR7 是中国人中最常见的存在连锁不平衡的单体型。HLA-A1, B73, DR10 是中国人中发现的罕见连锁不平衡 HLA 单体型。

1.3 HLA 分型方法 经典的 HLA 血清学分型方法是使用微量淋巴细胞毒试验,其基本原理是使用特异性的抗体检测细胞表面的抗原。根据使用的抗体特异性的不同,又有宽特异性和窄特异性之分。比如,HLA-A⁹ 抗原是宽特异性,它可以被分解为 A23 和 A24 两个窄特异性;HLA-B15 被分解为 B62, B63, B75, B76, B77 等窄特异性;DR2 分解为 DR15 和 DR16 窄特异性(表 2,表 5)^[6]。

由于 HLA 血清学分型方法错误率高,以及受抗体来源的限制,目前已被以 DNA 为基础的 HLA 基因分型方法所取代。常用方法有 3 种:①PCR-SSP 分型 使用序列特异性引物(SSP)特异性地扩增 HLA 基因,然后通过凝胶电泳检测 PCR 产物,根据是否得到 PCR 产物,以及产物的片段大小来指定 HLA 基因型;②PCR-SSOP 分型 首先使用 PCR 扩增某一段 HLA 基因,然后通过与序列特异性寡核苷酸探针(SSOP)杂交来鉴定 HLA 型;③SBT 分型 以测定 DNA 序列为基础的 HLA 基因分型。由于在以上方法中可以使用不同的引物和探针,因此,HLA 基因分型的分辨水平不尽相同。一般分为低、中和高分辨等 3 个水平。低分辨率分型只要求鉴定到星号后 2 位数,即鉴定出对应的血清学宽特异性或窄特异性。表 5 受检者 HLA-B 座位血清学窄特异性为 B62 和 B60,低分辨率基因分型结果为 B*15XX, 40XX。根据中华骨髓库的要求,在 HLA 低分辨率基因分型中必须鉴定到对应的抗原窄特异性水平,因此进一步表示为 B*15XX (B62), 40XX (B60),括号中是 HLA 特异性。而中分辨率分型要求鉴定到星号后 4 位数。由于分型试剂的限制,在这个水平上的基因分型,往往得到一系列可能的结果,即一定的范围,而非特定的等位基因。如,表 5 受检者 HLA-B 座位的第一个基因,可能是 B*1501/1504/1505/1507 中的一个;第二个基因可能是 B*4001/4007/4010 中的一个。在高分辨分型中,应该得到独一无二的等位基因,故又被称为等位基因分型。表 5 受检者高分辨分型结果为 B*15010101 和 B*4001。B*15 基因被指定到星号后 8 位数。同时也注

表 5 HLA 分型方法和分型水平的比较

方法和水平	HLA-A	HLA-B	HLA-DR
血清学分型			
宽特异性水平	A9, -	B15, B40	DR2, DR6
窄特异性水平	A24, -	B62, B60	DR15, DR13
DNA 基因分型			
低分辨率水平 [△]	A*24XX, 68XX	B*15XX (B62), 40XX (B60)	DRB1*15XX, 13XX
中分辨率水平	A*2402/2404	B*1501/1504/1505/1507	DRB1*1501/1503/1505
	A*6801/6802/6811N	B*4001/4007/4010	DRB1*1301/1305/1306
高分辨水分	A*2404, 6811N	B*15010101, 400103	DRB1*150101, 1306

△ 一般可以指定出对应的 HLA 抗原窄特异性。中华骨髓库要求在括号中注明对应的抗原特异性

意到该受检者的 A 座位上存在一个无效等位基因 A * 6811N, 因此在使用血清学方法鉴定细胞表面 HLA 抗原时, 未检测出 HLA-A68 抗原。事实上只有比较血清学分型和基因分型的差异, 才能发现无效型等位基因。

1.4 HLA 基因分型结果转换成 HLA 抗原特异性 移植排斥反应是免疫活性细胞间的相互作用。在移植免疫反应中, 宿主细胞识别的是外来 HLA 抗原表位, 而不是 HLA 基因。虽然 HLA 基因分型比经典的血清学分型准确, 而且可以检测出血清学难以鉴定的 HLA 基因产物, 但是分型结果只是提供受检者带有哪些 HLA 基因的信息, 不能直接反映出该基因编码的 HLA 抗原在细胞表面的表达情况以及免疫原性。目前还不可能根据 HLA 基因的 DNA 序列预测相应抗原的免疫原性。因此从临床造血干细胞移植配型角度考虑, HLA 基因分型结果必需“翻译”成 HLA 抗原特异性才有意义。此外, 在数以百万计的造血干细胞供者中, 如何快速寻找到 HLA 匹配者, 也需要一个简便的检索途径。WMDA 要求以 HLA 抗原为基础进行检索。中华骨髓库也要求对造血干细胞供者 HLA 基因分型的同时指定相应血清学窄特异性。在此背景下一部国际通用的《HLA 字典》应运而生^[8], 而美国 NMDP 进一步建立起以血清学代码为基础的 SD (search determinants) 检索系统(表 6)^[9]。

1.4.1 HLA 字典 HLA 字典的基本目的是建立 HLA 等位基因和对应的 HLA 抗原之间的对等关系。涵盖的 HLA 基因有 HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 和 DQB1 基因, 对应的血清学抗原包括 HLA-A, B, C, DR, 和 DQ 抗原。在 2001 年发表的最新版本中, 约有 65% 的 HLA-A 座位和 DRB1 座位等位基因, 80% 的 HLA-B 座位等位基因的对应血清学特异性已被建立。目前该字典仍在不断补充更新之中。

1.4.2 美国 NMDP 的 SD 检索系统 SD 系统整合了 HLA 字典提供的信息, 以及 HLA 基因 DNA 序列的特点, 将等位基因转换成与抗原特异性密切相关的代码。其优点是对那些血清学特异性未知等位基因, 也给出代码, 这为寻找 HLA 匹配供者提供了方便。在表 6 的示例中可见, B * 1523, B *

1538, B * 1544 和 B * 1547 在 HLA 字典中无相应特异性, 但 SD 系统给予了代码。实际上这些代码和 HLA 抗原特异性命名是一致的, 即提供了这些基因编码抗原可能的特异性的信息。

1.4.3 中华骨髓库的特异性指定系统 该系统基本上以《HLA 字典》为标准指定 HLA 特异性。对于血清学特异性未知的等位基因, 采用以血清学宽特异性表示的方法处理。比如表 6 示例中的 B * 1523, B * 1538, B * 1544 和 B * 1547 等位基因, 都被指定为 B15。按此方法指定的特异性范围一般比 SD 系统为宽, 但以后可以按照《HLA 字典》提供的新信息而更新。

表 6 HLA 等位基因对应的血清学特异性以及编码系统示例

等位基因	HLA 字典 特异性	美国 NMDP SD 系统	中华骨髓库 指定特异性
B * 1501	B62	62	B62
B * 1502	B75	75	B75
B * 1503	B72	70	B72
B * 1509	B70	70	B70
B * 1510	B71	70	B71
B * 1512	B76	62/76	B76
B * 1513	B77	77	B77
B * 1516	B63	63	B63
B * 1523	—	70	B15
B * 1526N	无效	空白	无效
B * 1529	B15	70	B15
B * 1538	—	62	B15
B * 1544	—	75	B15
B * 1547	—	70	B15
B * 1555	B15	75	B15
B * 1558	B15	62	B15

(未完待续)

(2005-01-18 收稿)

本文编辑: 王良华