



# 中华骨髓库第二届年会 论文汇编

中国造血干细胞捐献者资料库管理中心

二〇〇九年五月

## 中国造血干细胞捐献者资料库介绍

中国造血干细胞捐献者资料库(中华骨髓库),英文为 CMDP(Chinese Marrow Donor Program)。她的前身是 1992 年经卫生部批准建立的“中国非血缘关系骨髓移植供者资料检索库”。2001 年,在政府有关部门的支持下,中国红十字会重新启动了建设资料库的工作。同年 12 月,中央编办批准成立中国造血干细胞捐献者资料库管理中心,统一管理和规范开展志愿捐献者的宣传、组织、动员、HLA(人类白细胞抗原)分型、为患者检索配型相合的捐献者及移植相关服务等。

中华骨髓库的注册标志是由四颗红心围绕红十字组成,象征着中华骨髓库在中国红十字会领导下,秉承人道、博爱、奉献的红十字精神,动员和呼唤全社会奉献爱心,拯救患者生命。

中华骨髓库在中国红十字会总会的领导下,在国家彩票公益金的支持下,认真落实《中国红十字事业 2005~2009 年发展规划》和《中国造血干细胞捐献者资料库 2006~2010 年发展规划》要求。截至 2009 年 4 月 30 日,全国建立了 31 个省级分库、认定了 31 个 HLA 定点组织配型实验室、5 个高分辨实验室和 1 个质量控制实验室;可用于为患者检索服务的资料 97 万人份;与国境外百余家医院 10 余家骨髓库建立了业务联系,1200 余位志愿者为患者捐献了造血干细胞,其中向国境外提供造血干细胞 50 余例。中华骨髓库的建设和发展为拯救患者的生命发挥了积极的作用,为构建社会主义和谐社会产生了良好的社会效益。

我国人口众多,需要造血干细胞移植的患者逐年增加。中华骨髓库力争在 2010 年前建成一个 100 万人份数据的资料库,同时提高服务质量、促进技术进步,为造福于全球华人而努力。

# 中华骨髓库第二届年会 论文汇编

中国造血干细胞捐献者资料库管理中心  
二〇〇九年五月

## 目 录

## 第一部分 专题报告

- 1-1 中华骨髓库造血干细胞捐献志愿者 HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1  
高分辨基因频率和单倍型分析……………中华骨髓库质控实验室 (1)
- 1-2 484 例无关供者造血干细胞移植资料分析……………任汉云 (16)
- 1-3 美国骨髓库移植现状……………丹尼斯·康弗 (21)
- 1-4 为骨髓库的长期发展建立坚实的 HLA 基础……………凯瑞兰·赫丽 (27)
- 1-5 无关供者的选择和骨髓库移植率……………赵桐茂 (28)
- 1-6 无关供者骨髓及外周血采集经验介绍……………约翰·米勒 (33)
- 1-7 世界骨髓捐赠者协会 (WMDA): 它在国际合作中的角色……………伊芙琳·玛丽 (34)
- 1-8 HLA 配型相异干细胞移植进展……………徐胡蜀山 (35)
- 1-9 非血缘造血干细胞动员、采集和检测中的问题与对策……………童春容 (36)

## 第二部分 分组发言

## 分 库

- 2-1 世界骨髓库 20 年发展现状介绍……………汉 克 (52)
- 2-2 非血缘造血干细胞移植的伦理准则……………李本富 (53)
- 2-3 佛教慈济骨髓干细胞中心及慈济台湾骨髓数据库的现状及展望……………杨国梁 (54)
- 2-4 以人为本, 扎实做好志愿捐献者服务工作……………张 波 (55)
- 2-5 建立健全服务站, 不断推进分库建设……………单加海等 (58)
- 2-6 把好关口, 坚持自愿无偿捐献的原则……………张 瑾 (60)
- 2-7 加强管理 完善制度 努力为捐献者打造良好的服务平台……………张红梅 (62)
- 2-8 为提高库容使用率, 尽心尽责地服务于捐献者……………何一平 (64)
- 2-9 提高中华骨髓库有效库容率的几点思考……………张书环 (66)
- 2-10 克服困难 积极招募少数民族志愿者……………李爱华 (68)
- 2-11 做好涉外捐献 搭建服务新平台……………陈泽池等 (69)

- 2-12 动脑 造势 借力 做好捐献造血干细胞宣传工作 .....赵书平 (71)
- 2-13 认同和激励机制对志愿者组织的重要性 .....金 辉等 (73)
- 2-14 谈中华骨髓库的志愿者管理问题 .....刘丹莉 (78)

### 实验室

- 2-15 HLA Evolution Parallels with Prometheus or Epimetheus? ---Greek Mythology  
with Memory of Beijing Olympiad--- .....佐 治 (82)
- 2-16 供-受体 HLA 基因分型及错配频率在非亲缘骨髓移植中对选择供体的作用  
.....何 军等 (85)
- 2-17 黑龙江地区汉族 HLA-A、B、DRB1 基因及单倍型的研究与应用 .....刘 杰等 (89)
- 2-18 北方汉族人群 HLA-DRB1\*高分辨多态性 .....刘孟黎等 (102)
- 2-19 维吾尔族人群 HLA-Cw 等位基因遗传多态性研究 .....邓志辉等 (107)
- 2-20 HLA 实验室的质量保证 .....严力行 (114)
- 2-21 HLA 分型检测前的质量控制探讨 .....张德梅 (117)
- 2-22 DNA 序列分析鉴定 HLA 新等位基因 B\*4446 .....李剑平等 (119)
- 2-23 基因组 DNA 高通量提取技术及其在骨髓库捐献者样本 HLA 基因分型中的  
应用 .....王大明等 (122)
- 2-24 基于 PCR-SSP 技术的 HLA-A、B、Cw、DRB<sub>1</sub> 位点直接高分辨分型方法的  
评价 .....章 旭等 (128)

### 移植医院

- 2-25 非血缘造血干细胞移植相关的协调工作 .....张子维等 (134)
- 2-26 急性移植物抗宿主病的预防 .....王健民等 (139)
- 2-27 无关供者异基因造血干细胞移植进展 .....黄 河 (142)
- 2-28 抑制性和激活性 NK 细胞 KIR 受体与 HLA 配体之间的相互作用对非清髓性  
外周血造血干细胞移植高风险患者移植预后的影响 .....陈东风等 (147)
- 2-29 CD25 单抗与 ATG 在无关供者造血干细胞移植中疗效分析 .....胡亮钉等 (148)
- 2-30 非血缘异基因造血干细胞移植 91 例分析 .....王静波等 (150)
- 2-31 正常供者外周血造血干细胞动员影响因素的分析 .....张炜仪等 (153)
- 2-32 无关供者异基因造血干细胞移植治疗恶性血液疾病 .....高春记等 (160)
- 2-33 异基因造血干细胞移植早期供者来源的 NK 细胞 KIR 受体表达情况与移植  
预后的关系 .....鲍晓晶等 (161)
- 2-34 异基因造血干细胞移植 25 例分析 .....王景文等 (163)

- 2-35 异基因造血干细胞移植后全血细胞减少的脾切除治疗四例报告 .....丁家华等 (165)
- 2-36 53 例无关供体造血干细胞移植生存因素分析 .....陈 静等 (173)
- 2-37 造血干细胞动员剂 (G-CSF) 对健康供者免疫细胞的影响及其安全性 .....金 辉等 (177)

## 第三部分 大会交流

### 分 库

- 3-1 注重环节是保证工作成效的关键 .....刘耀堂等 (182)
- 3-2 坚持以人为本 认真做好干细胞捐献服务工作 .....马俊娥 (184)
- 3-3 加强志愿者心理辅导 确保再动员成功率 .....贾伍亮 (185)
- 3-4 注重志愿者心理 全面降低反悔率 .....左 彤等 (188)
- 3-5 髓缘雪域 秋菊更艳 .....邓珠郎杰 (191)
- 3-6 遴选和回访对提高志愿献髓者资料库有效率的研究 .....李惠文等 (193)
- 3-7 献髓志愿工作者在骨髓库建设中作用的研究 .....李惠文 (198)

### 实验室

- 3-8 HLA-B\*2736 等位基因的序列分析研究 .....李 楨等 (203)
- 3-9 长沙血液中心参加 HLA 分型室间质评和质量抽检结果分析 .....王赤林等 (210)
- 3-10 吉林省朝鲜族造血干细胞捐献者 HLA-A, B, DR 基因和单倍型分析  
.....林乾飞等 (213)
- 3-11 HLA 新等位基因 HLA-DRB1\*0453 的认定 .....张坤莲等 (218)
- 3-12 辽宁汉族人群 HLA-B 基因多态性的分布 .....陈 阳等 (222)
- 3-13 新等位基因 HLA-B\*070503 的认定 .....章 旭等 (227)
- 3-14 HLA 新等位基因 B\*5618 的发现和序列分析 .....邹红岩等 (232)
- 3-15 杂合性模棱两可引物分离法在 HLA-SBT 模棱两可分型结果中的应用  
.....程良红等 (238)
- 3-16 岳阳地区造血干细胞捐献者 HLA 等位基因多态性调查 .....代 敏等 (244)
- 3-17 PCR-SSP 检测 ABO 疑难血型在临床上的应用 .....粟玉萍等 (248)
- 3-18 倡导自主创新 坚持科学管理 .....李 荔等 (251)
- 3-19 新等位基因 HLA-B\*5413 的发现和确认 .....张德梅等 (255)
- 3-20 四川分库汉族人群 HLA-DRB1\*14 等位基因分布 .....王 珏等 (259)
- 3-21 四川分库汉族人群 HLA-B\*15 组的多态性研究 .....罗 玫等 (265)
- 3-22 3 例带有 HLA-DR\*0114 新基因的家系调查 .....刘孟黎等 (274)

- 3-23** 吉林省满族造血干细胞捐献者 HLA-A, B, DR 基因和单倍型分析……………于江虹等 (279)
- 3-24** 吉林地区 HLA-DRB1 基因与慢性 HBV 感染的相关性研究……………韩 瑜等 (286)
- 3-25** 吉林骨髓库造血干细胞捐献者 HLA-A、B、DR 基因分布和单倍型分析  
……………陈 琳等 (290)

### 移植医院

- 3-26** 血细胞分离机的临床应用观察……………符祥俊等 (298)
- 3-27** 21 例造血干细胞移植术后医院感染临床分析……………尚振川等 (299)
- 3-28** 血管通路方式的选择对健康供者外周血造血干细胞单采产量影响的研究  
……………陈惠珍等 (303)
- 3-29** 非清髓异基因造血干细胞移植治疗难治性阵发性睡眠性血红蛋白尿……………许多荣等 (306)
- 3-30** 异基因骨髓移植成功治疗原发性骨髓纤维化伴巨脾一例并文献复习……………许多荣等 (312)
- 3-31** 异基因造血干细胞移植与免疫抑制治疗重型再生障碍性贫血的疗效比较  
……………许多荣等 (317)
- 3-32** 在非亲缘异基因造血干细胞移植中 KIR/HLA 受配体错配模式和 iKIR 表达  
的研究……………何 军等 (323)
- 3-33** 输血相关急性移植物抗宿主病 3 例报告附文献复习……………董秀娟等 (325)

# Contents

## Part 1 Special Reports

- 1-1 Analysis of HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 high-resolution alleles frequencies and haplotype frequencies in Chinese Marrow Donor Program registry.....*CMDP QC laboratory* (1)
- 1-2 Analysis of 484 unrelated stem cell transplantations .....*Hanyun Ren* (16)
- 1-3 NMDP: Increasing unrelated donor transplantation and improving outcomes .....*Dennis L. Confer* (21)
- 1-4 Building a strong HLA foundation for the registry.....*Carolyn Hurley* (27)
- 1-5 How to select the unrelated donor and improve transplantation number .....*Tongmao Zhao* (28)
- 1-6 Unrelated marrow and PBSC donation: The NMDP Experience ..... *John P Miller* (33)
- 1-7 The World Marrow Donor Association (WMDA): its role in the international community..... *Evelyne MARRY* (34)
- 1-8 The present and future of HLA typing laboratories in US..... *Shushan Hu* (35)
- 1-9 The problems and their treatment during PBSC mobilization, harvests and CD34+ cell enumeration from unrelated donor.....*Chunrong Tong* (36)

## Part 2 Meeting speeches

### Branch registries

- 2-1 Bone Marrow Donors Worldwide 20 years: status and current practice ..... *Henk G.M.van der Zanden* (52)
- 2-2 Ethics rules for unrelated stem cell transplantation..... *Benfu Li* (53)
- 2-3 The current situation and prospects of the Buddhist Tzu Chi Stem Cells Center .....*Kuo-Liang Yang* (54)
- 2-4 How to service for the donors.....*Bo Zhang* (55)
- 2-5 How to establish and develop donor centers .....*Jiahai Shan, et al.* (58)
- 2-6 How to stick to the freewill and volunteer principle in donor recruitment..... *Jin Zhang* (60)



## Contents

---

- 2-7** How to improve and administer the donor centers .....*Hongmei Zhang* (62)  
**2-8** How to perform SOP in donor service work .....*Yiping He* (64)  
**2-9** How to improve the transplantation number ..... *Shuhuan Zhang* (66)  
**2-10** How to recruit the minority donors .....*Aihua Li* (68)  
**2-11** How to perform the international search .....*Zechi Chen, et al.* (69)  
**2-12** How to publicize CMDP and the PBSC donation ..... *Shuping Zhao* (71)  
**2-13** How to recruiter and promote volunteers to serve for CMDP .....*Hui Jin, et al.* (73)  
**2-14** How to manage volunteers .....*Danli Liu* (78)

## Laboratory

- 2-15** HLA Evolution Parallels with Prometheus or Epimetheus?.....*Saji, Hiroh* (82)  
**2-16** Effect on choosing donor of donor/recipient pairs of HLA genotypes  
and mismatch frequencies in unrelated Allo-HSCT ..... *Jun He et al.* (85)  
**2-17** The research of HLA alleles and haplotypes in Heilongjiang Chinese  
Han unrelated blood stem cells donors .....*Jie Liu, et al.* (89)  
**2-18** HLA-DRB1 polymorphism by high resolution typing in northern  
Hans of China .....*Mengli Liu, et al.* (102)  
**2-19** The genetic polymorphism of Uygur population at HLA-Cw locus by  
sequence based typing method .....*Zihui Deng, et al.* (107)  
**2-20** Quality assurance of the HLA laboratory .....*Lixing Yan* (114)  
**2-21** The quality control method in the pre-HLA examine .....*Demei Zhang* (117)  
**2-22** Identification of a novel HLA allele B\*4446 by sequencing-based typing  
..... *Jianping Li, et al.* (119)  
**2-23** Technique of high through-put genomic DNA isolation and its application  
in HLA genotyping for samples from bone marrow donor program  
.....*Daming Wang, et al.* (122)  
**2-24** Evaluation of the PCR-SSP based method for HLA-A、 B、 C<sub>w</sub>、 DRB<sub>1</sub>  
locus specific high resolution typing .....*Xu Zhang, et al.* (128)

## Transplantation hospitals

- 2-25** Coordinate work of unrelated donor stem cell transplantation.....*Ziwei Zhang, et al.* (134)  
**2-26** The prevention of acute GVHD..... *Jianmin Wang, et al.* (139)  
**2-27** Progress of the allogenic hematopoietic stem cell transplantation .....*He Huang* (142)

<b>2-28</b>	Relevance of Inhibitory and Activating Killer Ig-like Receptors and HLA Ligand on Outcomes in High-Risk Patients Undergoing Non-Myeloablative Haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplants .....	<i>Dongfeng Chen, et al.</i> (147)
<b>2-29</b>	The effectiveness compare CD25 antibody with ATG for unrelated stem cell transplantation .....	<i>Liangding Hu., et al.</i> (148)
<b>2-30</b>	Clinical study of 91 patients for unrelated donor hematopoietic cell transplantation .....	<i>Jingbo Wang et al.</i> (150)
<b>2-31</b>	Analysis of influence factors affecting the collection of allogenic peripheral blood stem cells in donors .....	<i>Weiye Zhang, et al.</i> (153)
<b>2-32</b>	Unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation for hematologic malignancies .....	<i>Chunji Gao, et al.</i> (160)
<b>2-33</b>	Study on the expression of donor origin KIRs on NK cells after allo-HSCT and its effect on clinical outcome .....	<i>Xiaojing Bao, et al.</i> (161)
<b>2-34</b>	Analysis of 25 cases received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation .....	<i>Jingwen Wang, et al.</i> (163)
<b>2-35</b>	Effect of splenectomy after allogeneic and syngeneic peripheral blood stem cell transplantation on Graft-Host diseases .....	<i>Jiahua Ding, et al.</i> (165)
<b>2-36</b>	Survival analysis of 53 cases received hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors .....	<i>Jing Chen, et al.</i> (173)
<b>2-37</b>	The effect of granulocyte colony stimulating factor on immune cells in healthy donor .....	<i>Hui Jin, et al.</i> (177)

### Part 3 Conference Communication

#### Branch registries

<b>3-1</b>	How to prevent donors] pull back from Collection stage .....	<i>Yaotang Liu, et al.</i> (182)
<b>3-2</b>	How to perform donor service work .....	<i>JuneMa</i> (184)
<b>3-3</b>	How to perform the donor's mental guidance .....	<i>Wuliang Jia</i> (185)
<b>3-4</b>	About the donor's mental guidance .....	<i>TongZuo, et al.</i> (188)
<b>3-5</b>	Introduce the volunteers work in Tibet .....	<i>Dengzhulangjie</i> (191)
<b>3-6</b>	Research on the Efficiency Improvement for Bone Marrow Donors' Data by Selection and Return Visit .....	<i>Huiwen Li</i> (193)
<b>3-7</b>	Voluntary Workers' Contribution to the Establishment of Bone Marrow Data .....	<i>Huiwen Li</i> (198)

laboratory

**3-8** Identifying and sequence analysis of HLA-B\*2736..... *Zhen Li, et al.* (203)

**3-9** An analysis of HLA genotyping error results generated in the HLA quality control project of Changsha Blood Center..... *Chilin Wang, et al.* (210)

**3-10** The frequencies of HLA alleles and haplotypes and their distribution among Korean population donors in the CMDP (Jilin) Registry..... *Qianfei Lin, et al.* (213)

**3-11** Identification of a novel HLA allele HLA-DRB1\*0453 ..... *Qunlian Zhang, et al.* (218)

**3-12** Distribution of HLA-B gene polymorphism of 8962 Han population in Liaoning ..... *Yang Chen, et al.* (222)

**3-13** Identification of a novel HLA allele B\*070503 by sequencing-based typing ..... *Xu Zhang, et al.* (227)

**3-14** Identification and sequence analysis of a novel HLA allele B\*5618 ..... *Hongyan Zou, et al.* (232)

**3-15** Application of Heterozygous Ambiguity Resolution Primers resolving ambiguous results of HLA alleles by sequence-based-typing method ..... *Lianghong Cheng, et al.* (238)

**3-16** Investigation on the HLA polymorphism of the donors in CMDP (Yueyang) Registry ..... *Min Dai, et al.* (244)

**3-17** Application of PCR-SSP to identifying suspicious ABO blood group..... *Yuping Su, et al.* (248)

**3-18** Technical innovation and scientific management in the HLA typing laboratory of CapitalBio company..... *Li Li, et al.* (251)

**3-19** Identification of a novel HLA allele HLA-B\*5413..... *Demei Zhang, et al.* (255)

**3-20** DRB1\*14 diversity in Sichuan Han population in China..... *Yu Wang, et al.* (259)

**3-21** Allele-specific HLA-B\*15 typing by PCR-SBT and its application to Sichuan Han population ..... *Mei Luo, et al.* (265)

**3-22** Investigation and analysis of three pedigrees with a novel allele HLA-DRB1\*0114 ..... *Mengli Liu, et al.* (274)

**3-23** Analysis of HLA-A,B,DR alleles and haplotypes in Man ethnic group PBSC donors in Jilin province ..... *Jinghong Yu, et al.* (279)

**3-24** Studies of Correlation between HLA-DRB1 gene and Chronic HBV infection in JiLin..... *Yu Han, et al.* (286)

**3-25** Jilin marrow library haemopoietic stem cell volunteer gene distribution of HLA-A、 B、 DR and haplotype analysis..... *Ling Chen, et al.* (290)

Transplantation hospitals

**3-26** Clinical observations of the blood cell separator .....*Xiangjun Fu, et al.* (298)

**3-27** Hospital infection after hamatopoietic stem cell transplantation:  
21 cases clinical analysis ..... *Zhenchuan Shang, et al.* (299)

**3-28** The influence of the PBSC collection yield by choosing the different  
venous accesses in the healthy donors ..... *Huizhen Chen, et al.* (303)

**3-29** Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for  
refractory paroxysmal nocturnal hemoglobinuria ..... *Duorong Xu, et al.* (306)

**3-30** A successful case of allogeneic bone marrow transplantation for primary  
myelofibrosis complicating megalosplenia and literature review ..... *Duorong Xu, et al.* (312)

**3-31** Effect comparison of two methods to cure the severe aplastic anemia,  
allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and immunosuppressive  
treatment ..... *Duorong Xu, et al.* (317)

**3-32** Impact of the KIR receptor ligand model and inhibitory KIR on outcome  
following in HLA matched unrelated hamatopoietic stem cell transplantation  
with leukemia ..... *Jun He, et al.* (323)

**3-33** Transfusion-associated GVHD: Three cases report and literature review  
..... *Xiujuan Dong, et al.* (325)

# 第一部分 专题报告

1-1

## 中华骨髓库造血干细胞捐献志愿者 HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 高分辨等位基因频率分析

中华骨髓库质量控制实验室

**摘要:** **目的** 分析中华骨髓库造血干细胞捐献者HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1五位点在高分辨基因分型水平上的等位基因频率特征。**方法** 根据718名中华骨髓库捐献者HLA五位点高分辨分型数据,运用直接计数法计算各位点基因频率。**结果** 在718名捐献志愿者中,共检出28个HLA-A等位基因、61个HLA-B等位基因、30个HLA-C等位基因、40个HLA-DRB1等位基因、18个HLA-DQB1等位基因;其中HLA-A位点最常见等位基因为A\*1101 (21.66%)、A\*2402 (16.37%)、A\*0201 (13.79%);HLA-B位点最常见等位基因为B\*4001 (11.49%)、B\*4601 (9.54%);HLA-C位点最常见等位基因为Cw\*0702 (15.74%)、Cw\*0102 (15.32%)、Cw\*0304 (11.56%);HLA-DRB1位点最常见等位基因为DRB1\*0901 (14.69%)、DRB1\*1501 (12.40%)、DRB1\*0701 (9.89%);HLA-DQB1位点最常见等位基因为DQB1\*0301 (20.54%)、DQB1\*0303 (15.81%)、DQB1\*0601 (10.79%)。**结论** 本研究提供了中华骨髓库718名捐献者HLA五位点高分辨等位基因频率数据,将为临床寻找HLA匹配的无关亲缘供者、法医学鉴定、HLA与疾病相关研究以及人类学研究等提供有价值的遗传学依据。

**关键词:** HLA; 高分辨基因分型; 等位基因频率; 中华骨髓库

### Analysis of HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 high-resolution alleles frequencies in Chinese Marrow Donor Program registry

**Abstract: Objective** To analyze HLA-A, -B, -C, -DRB1 and DQB1 high-resolution alleles and haplotype frequencies in Chinese Marrow Donor Program (CMDP) registry. **Methods** High-resolution genotypings at HLA-A, -B, -C, -DRB1 and DQB1 loci from 718 donors were extracted from CMDP registry, allele and haplotype frequencies were estimated using EXCEL software. **Results** A total of 28 HLA-A, 61 HLA-B, 30 HLA-C, 40 HLA-DRB1, 18 HLA-DQB1 alleles were identified in this population. The most frequent alleles at HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 were A\*1101 (21.66%), A\*2402

(16.37%), A\*0201 (13.79%), B\*4001 (11.49%), B\*4601 (9.54%), Cw\*0702 (15.74%), Cw\*0102 (15.32%), Cw\*0304 (11.56%), DRB1\*0901 (14.69%), DRB1\*1501 (12.40%), DRB1\*0701 (9.89%), DQB1\*0301 (20.54%), DQB1\*0303 (15.81%), DQB1\*0601 (10.79%). **Conclusion** The presentation of the high-resolution alleles data at HLA-A, -Cw, -B, -DRB1 and DQB1 loci in CMDP 718 marrow donors will be useful for estimating the probability of HLA matching in transplantation as well as for other medical and anthropologic applications in the Chinese population.

**Key words:** HLA high-resolution DNA typing Allele frequency Chinese Marrow Donor Program (CMDP)

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 基因定位于6p21.31区, 长约3600 kb。HLA是机体内特异性免疫识别和免疫应答的主要成分, 是影响造血干细胞移植成功的关键因素之一<sup>[1]</sup>。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, 对HLA与疾病相关性研究、群体遗传学研究以及法医学研究等方面也具备重要的应用价值<sup>[2~3]</sup>。目前有关中国人HLA I类抗原、II类抗原在不同地区、不同种族的等位基因频率分布已有众多报道, 但多基于HLA低分辨基因分型或者血清学分型, 样本量较少<sup>[4~7]</sup>。本研究根据中华骨髓库718例捐献者HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1五位点高分辨基因分型数据, 通过对各基因位点基因频率的计算和统计, 在高分辨水平提供一套较准确、详尽的HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1五位点等位基因频率数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本研究中所用的718例HLA高分辨分型数据是2006年9月至2007年9月期间由中华骨髓库的3家高分辨实验室, 在严格的质量控制下采用HLA高分辨基因分型方法(测序法或PCR-SSP法)对HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1五位点检测所获得的数据, 其中北京市红十字血液中心HLA高分辨实验室提供348例; 苏州市红十字中心血站HLA高分辨实验室提供301例; 深圳市输血医学研究所HLA高分辨实验室提供69份。

### 1.2 统计分析

根据直接计数法利用EXCEL软件分别计算HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1位点的等位基因频率。应用Arlequin 3.1软件<sup>[8]</sup>, 对各基因位点作Hardy-Weinberg平衡检验。

## 2 结果

### 2.1 HLA-A位点等位基因频率和特征

表1列出了HLA-A位点的等位基因频率, 其中共检出A位点等位基因28个, 基因频率高于10%的HLA-A等位基因是A\*1101 (21.66%)、A\*2402 (16.37%)和A\*0201 (13.79%)。在本研究中的718例捐献者中, 82.1%捐献者HLA-A位点等位基因为A\*1101, A\*2402, A\*0201, A\*0207, A\*3303, A\*0206和A\*3001 (等位基因频率均高于6%)。在HLA-A位点, A2组呈现较高的多态性, 共检出7个等位基因分别为: A\*0201, A\*0203, A\*0205, A\*0206, A\*0207, A\*0210和A\*0253。

表1 中华骨髓库志愿者 HLA-A 高分辨等位基因频率 (n=718)

等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)
A*0101	2.16	A*0210	0.49	A*2301	0.07	A*2601	1.95	A*3201	0.84
A*0201	13.79	A*0253	0.07	A*2402	16.43	A*2603	0.14	A*3301	0.07
A*0203	4.18	A*0301	1.74	A*2403	0.14	A*2901	0.35	A*3303	7.24
A*0205	0.35	A*0302	0.14	A*2408	0.14	A*3001	6.20	A*6901	0.07
A*0206	7.03	A*1101	21.66	A*2420	0.28	A*3018	0.07		
A*0207	9.75	A*1102	2.02	A*2421	0.07	A*3101	2.58		

## 2.2 HLA-B 位点等位基因频率和特征

表2列出了HLA-B位点的等位基因频率,其中共检出B位点等位基因61个,基因频率最高的HLA-B等位基因是B\*4001(11.49%),其次是B\*4601(9.54%)。对于HLA-B位点,50.1%的捐献者携带等位基因B\*4001, B\*4601, B\*1302, B\*1501, B\*1301, B\*5801和B\*5101(基因频率均高于5%), B\*15组显示高度的多态性,包括16个等位基因。

表2 中华骨髓库志愿者 HLA-B 高分辨等位基因频率 (n=718)

等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)
B*0702	2.23	B*1512	0.21	B*3502	0.07	B*4055	0.07	B*5502	3.55
B*0705	0.35	B*1518	0.77	B*3503	1.05	B*4402	0.77	B*5504	0.14
B*0801	0.42	B*1519	0.07	B*3508	0.14	B*4403	2.51	B*5512	0.14
B*1301	5.57	B*1525	0.35	B*3701	0.49	B*4601	9.54	B*5601	0.07
B*1302	7.10	B*1527	1.39	B*3801	0.56	B*4801	3.27	B*5603	0.14
B*1501	5.85	B*1532	0.14	B*3802	3.34	B*4803	0.21	B*5604	0.07
B*1502	3.34	B*1534	0.07	B*3901	2.37	B*4901	0.07	B*5701	1.11
B*1503	0.07	B*1558	0.14	B*3905	0.28	B*5001	0.42	B*5801	5.36
B*1504	0.07	B*1801	0.07	B*3909	0.07	B*5101	5.15	B*6701	0.28
B*1505	0.14	B*2704	1.05	B*4001	11.49	B*5102	1.32		
B*1507	0.56	B*2705	0.35	B*4002	2.93	B*5201	2.02		
B*1508	0.07	B*2725	0.07	B*4003	0.21	B*5401	2.72		
B*1511	1.67	B*3501	2.16	B*4006	3.76	B*5501	0.07		

## 2.3 HLA-C 位点等位基因频率和特征

表3列出了HLA-C位点的等位基因频率,其中共检出C位点等位基因30个,基因频率高于10%的HLA-C等位基因是Cw\*0702(15.74%)、Cw\*0102(15.32%)和Cw\*0304(11.56%)。在HLA-Cw位点,80.8%的捐献者的等位基因为Cw\*0702, Cw\*0102, Cw\*0304, Cw\*0801, Cw\*0602, Cw\*0303, Cw\*0401和Cw\*0302(基因频率均高于5%), Cw\*01、Cw\*04、Cw\*07组在HLA-C位点具有相对较高的多态性,均涵盖4个等位基因。

表3 中华骨髓库志愿者 HLA-C 高分辨等位基因频率 (n=718)

等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)
Cw*0102	15.32	Cw*0303	7.66	Cw*0501	0.70	Cw*0801	9.61	Cw*1403	1.25
Cw*0103	0.42	Cw*0304	11.56	Cw*0602	8.98	Cw*0803	0.98	Cw*1502	3.55
Cw*0106	0.14	Cw*0401	6.48	Cw*0701	0.49	Cw*0806	0.07	Cw*1505	0.35

等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)
Cw*0108	0.07	Cw*0403	0.56	Cw*0702	15.74	Cw*1202	2.93	Cw*1511	0.07
Cw*0202	0.21	Cw*0404	0.14	Cw*0704	0.42	Cw*1203	1.81	Cw*1602	0.28
Cw*0302	5.50	Cw*0407	0.07	Cw*0706	0.35	Cw*1402	4.25	Cw*1604	0.07

## 2.4 HLA-DRB1 位点等位基因频率和特征

表 4 列出了 HLA-DRB1 位点的等位基因频率, 其中共检出 DRB1 位点等位基因 40 个, 基因频率高于 10% 的 HLA-DRB1 等位基因是 DRB1\*0901 (14.69%) 和 DRB1\*1501 (12.40%), 其次为 DRB1\*0701 (9.89%); 对于 HLA-DRB1 位点, 58.4% 捐献者的等位基因为 DRB1\*0901, DRB1\*1501, DRB1\*0701, DRB1\*1202 (基因频率均高于 5%), DRB1\*0803 和 DRB1\*1101; DR4 and DR14 呈现较高的多态性, 分别包括 8 个等位基因。

表 4 中华骨髓库志愿者 HLA-DRB1 高分辨等位基因频率 (n=718)

等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)
DRB1*0101	1.11	DRB1*0407	0.21	DRB1*1101	5.64	DRB1*1301	1.25	DRB1*1407	0.56
DRB1*0301	3.69	DRB1*0410	0.35	DRB1*1104	0.28	DRB1*1302	3.13	DRB1*1412	0.07
DRB1*0401	1.05	DRB1*0701	9.89	DRB1*1106	0.07	DRB1*1303	0.14	DRB1*1418	0.07
DRB1*0402	0.14	DRB1*0802	0.49	DRB1*1128	0.07	DRB1*1312	0.35	DRB1*1422	0.07
DRB1*0403	1.81	DRB1*0803	6.76	DRB1*1201	3.69	DRB1*1401	3.06	DRB1*1501	12.40
DRB1*0404	0.70	DRB1*0809	0.21	DRB1*1202	8.98	DRB1*1403	0.77	DRB1*1502	2.65
DRB1*0405	4.74	DRB1*0901	14.69	DRB1*1206	0.07	DRB1*1404	0.42	DRB1*1504	0.14
DRB1*0406	3.69	DRB1*1001	0.84	DRB1*1210	0.07	DRB1*1405	3.06	DRB1*1602	2.65

## 2.5 HLA-DQB1 位点等位基因频率和特征

表 5 列出了 HLA-DQB1 位点的等位基因频率, 其中共检出 DQB1 等位基因 18 个, 基因频率高于 10% 的 HLA-DQB1 等位基因是 DQB1\*0301 (20.54%)、DQB1\*0303 (15.81%) 和 DQB1\*0601 (10.79%)。在 HLA-DQB1 位点, 83.3% 捐献者带有等位基因 DQB1\*0301, DQB1\*0303, DQB1\*0601, DQB1\*0202, DQB1\*0602, DQB1\*0302, DQB1\*0502 和 DQB1\*0503 (基因频率均高于 5%), 并发现 DQB1\*06 组具有较高多态性, 包括 6 个等位基因。

表 5 中华骨髓库志愿者 HLA-DQB1 高分辨等位基因频率 (n=718)

等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)	等位基因	频率 (%)
DQB1*0201	3.76	DQB1*0303	15.81	DQB1*0402	1.25	DQB1*0601	10.79	DQB1*0609	1.74
DQB1*0202	8.57	DQB1*0305	0.07	DQB1*0501	2.58	DQB1*0602	8.08	DQB1*0610	0.07
DQB1*0301	20.54	DQB1*0313	0.07	DQB1*0502	6.20	DQB1*0603	1.46		
DQB1*0302	7.66	DQB1*0401	4.39	DQB1*0503	5.64	DQB1*0604	1.32		

## 2.6 Hardy-Weinberg 平衡检验

统计分析表明 (表 6), HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB14 个位点各自表型观察值与期望值无显著性差异, 符合 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P > 0.05$ ), 但 HLA-DQB1 位点的观察值与期望值出现显著差异, 偏离了 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.05$ )。



表6 中华骨髓库志愿者 HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1 基因位点 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验 ( $n=718$ )

基因位点	观察值	期望值	$p$ 值
HLA-A	0.8677	0.8803	0.1094
HLA-B	0.9415	0.9498	0.4582
HLA-Cw	0.8844	0.9040	0.2631
HLA-DRB1	0.9109	0.9265	0.0895
HLA-DQB1	0.8705	0.8902	0.0077

### 3 讨论

本研究通过对中华骨髓库718例捐献者HLA高分辨分型资料的等位基因频率分析,在高分辨基因分型水平提供了一套有关中国人群HLA-A, B, C, DRB1和DQB1五位点基因频率数据,且样本量在目前类似研究中是最大的。

依据HLA频率分布趋势,整个中华民族包括南方和北方两大组群,这两大组群在HLA基因多态性分布上显现出不同。但目前随着人口流动性的日益增大,取得严格意义上大样本量的北方或南方人群资料变得日益困难。本研究中的分析人群来自北京地区、苏州地区和深圳地区,以汉族为主,从分析结果来看,该人群兼具中国南、北方汉族人群的特征。本研究共检出28个HLA-A等位基因,61个HLA-B等位基因,30个HLA-C等位基因,40个HLA-DRB1等位基因,18个HLA-DQB1等位基因。其中最常见等位基因是A\*1101(21.66%)、A\*2402(16.43%)、A\*0201(13.79%)、B\*4001(11.49%)、B\*4601(9.54%)、Cw\*0702(15.74%)、Cw\*0102(15.32%)、Cw\*0304(11.56%)、DRB1\*0901(14.69%)、DRB1\*1501(12.40%)、DQB1\*0301(20.54%)、DQB1\*0303(15.81%),该结果与已报道的结果基本一致<sup>[7, 9-11]</sup>。从目前的低分辨研究来看,A\*02(33%),A\*11(24%),B\*15(14%),B\*13(13%),C\*03(25%)和Cw\*07(18%)是中国汉族人群中常见等位基因<sup>[12]</sup>,在本研究中,根据基因频率计算A\*02, A\*11, B\*15, B\*13, Cw\*03和Cw\*07组基因频率分别为35.7%, 23.7%, 14.9%, 12.7%, 24.5%, 17%,与报道的结果相符。对于HLA II类抗原,DRB1\*09组仅检出DRB1\*0901,基因频率为14.7%,DRB1\*15组以DRB1\*1501为主(12.4%),DRB1\*0901, DRB1\*1501在本研究中为HLA-DRB1的最常见等位基因,这与Shi L等对南方汉族人群以及刘孟黎等对北方汉族人群在低分辨水平的分析结果相一致<sup>[7-13]</sup>。对于HLA-DQB,最常见的等位基因为DQB1\*0301(20.54%)、DQB1\*0303(15.81%),这与香港骨髓库的研究结果一致<sup>[14]</sup>。

从Hardy-Weinberg平衡检验来看,HLA-A, B, C, DRB1基因分布符合Hardy-Weinberg平衡定律( $P>0.05$ ),而HLA-DQB1基因分布偏离H-W平衡,这一现象在类似的研究中也有报道<sup>[9, 17]</sup>,这可能与罕见基因的干扰、样本量、样本选择压力等相关,该偏离有望随着样本量的进一步扩大而得到纠正。

总之,本研究基于中华骨髓库宝贵的HLA高分辨分型资料,首次在国内报道了较大样本量的HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1五位点高分辨等位基因频率数据,该数据将为临床上造血干细胞移植配型、预计从造血干细胞捐献者资料库中找到相配供者的可能性、以及人类学研究等提供有价值的遗传学依据。

(本研究是在中华骨髓库管理中心的大力支持和资助下完成的,同时该项研究凝聚了中华骨髓

库 3 家 HLA 高分辨实验室全体工作人员的大量心血,体现了多单位积极的协作精神,在此一并致谢!)

### 参考文献

- [1] Petersdorf EW, Malkki M. Human leukocyte antigen matching in unrelated donor hematopoietic cell transplantation[J]. *Semin Hematol*, 2005, 42 (2): 76-84
- [2] 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, 12 (6): 381-384
- [3] Sun Yoon Choo. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing and clinical implications[J]. *Yonsei Med J*, 2007, 48 (1): 11-23
- [4] 宋永红, 朱传福, 吕红娟等. 山东骨髓库汉族人群 HLA-A, B, DRB1 位点基因频率调查[J]. *中国输血杂志*, 2005, 18 (4): 327-329
- [5] 马红京, 肖露露, 郭坤元等. 广东汉族人群 HLA-ABDR 基因频率分析[J]. *广东医学*, 2005, 26 (3): 324-326
- [6] 吴强驹, 刘孟黎等. 11755 名中国北方汉族造血干细胞供者 HLA-A、B、DRB1 基因和单倍型研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15 (2): 357-363
- [7] 刘孟黎, 刘耀堂, 刘晟等. 西安骨髓库北方汉族人群 HLA-DRB1 高分辨多态性[J]. *中国输血杂志*, 2007, 20 (4): 306-308
- [8] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005-1: 47-50
- [9] Yan C, Wang R, Li J, et al. HLA-A gene polymorphism defined by high-resolution sequence-based typing in 161 northern Chinese Han people[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2003, 1 (4): 304-309
- [10] Hong W, Fu Y, Chen S, et al. Distributions of HLA class I alleles and haplotypes in Northern Han Chinese[J]. *Tissue Antigens*, 2005, 66 (4): 297-304
- [11] 邓亚军, 杨光, 吴东颖等. 北京地区人群 HLA-A、B、DRB1 的聚合酶链反应-直接测序分型研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2006, 23 (1): 103-106
- [12] 袁方, 孙玉英, 骆媛等. 我国汉族人群 HLA I 类经典基因单倍型及连锁分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15 (5): 1084-1089
- [13] Shi L, Xu SB, Ohashi J, et al. HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 alleles and haplotypes in Naxi and Han populations in southwestern China (Yunnan province) [J]. *Tissue Antigens*, 2006, 67 (1): 38-44
- [14] Chang YW, Hawkins BR. HLA class I and class II frequencies of a Hong Kong Chinese population based on bone marrow donor registry data[J]. *Hum Immunol*, 1997, 56 (1-2): 125-35
- [15] 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
- [16] Leffell MS, Fallin MD, Hildebrand WH, et al. HLA alleles and haplotypes among the Lakota Sioux: report of the ASHI minority workshops, Part III[J]. *Hum Immunol*, 2004, 65 (1): 78-89

## 中华骨髓库造血干细胞捐献志愿者 HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 高分辨单倍型频率分析

中华骨髓库质量控制实验室

**摘要:** **目的** 分析中华骨髓库造血干细胞捐献者HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1五位点在高分辨基因分型水平上的单倍型频率及连锁不平衡特征。**方法** 根据718名中华骨髓库捐献者HLA五位点高分辨分型数据,运用Arlequin 3.1软件以最大似然法分析单倍型频率。**结果** 双座位连锁不平衡分析显示,HLA-C与HLA-B、HLA-DRB1与HLA-DQB1呈现较为显著的连锁不平衡;多位点单倍型频率分析结果显示,最常见的两位点、三位点、四位点和五位点单倍型分别为:A\*0207-B\*4601 (7.34%)、Cw\*0102-B\*4601 (8.71%)、B\*1302-DRB1\*0701 (6.19%)、DRB1\*0901-DQB1\*0303 (14.27%)、A\*3001-B\*1302-DRB1\*0701 (5.36%)、A\*0207-B\*4601-Cw\*0102 (7.06%)、A\*3001-Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701 (5.36%)、Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701-DQB1\*0202 (6.12%)、A\*3001-Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701-DQB1\*0202 (5.29%)。**结论** 本研究提供了中华骨髓库718名捐献者HLA五位点高分辨单倍型频率的分子遗传学数据,将为临床寻找HLA匹配的无关亲缘供者、法医学鉴定、HLA与疾病相关研究以及人类学研究等提供有价值的遗传学资料 and 依据。**关键词:** HLA; 高分辨基因分型; 单倍型频率; 中华骨髓库

### Analysis of HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 high-resolution haplotype frequencies in Chinese Marrow Donor Program registry

**Abstract: Objective** To analyze HLA-A, -B, -C, -DRB1 and DQB1 high-resolution haplotype frequencies in Chinese Marrow Donor Program (CMDP) registry. **Methods** High-resolution genotypings at HLA-A, -B, -C, -DRB1 and DQB1 loci from 718 donors were extracted from CMDP registry, haplotype frequencies were estimated using Arlequin softwares. **Results** Linkage Disequilibrium analysis between two alleles at different locus indicated Cw-B and DRB1-DQB1 exhibit the strongest association. The most common two-, three-, four- and five-locus haplotypes were: A\*0207-B\*4601 (7.34%), Cw\*0102-B\*4601 (8.71%), B\*1302-DRB1\*0701 (6.19%), DRB1\*0901-DQB1\*0303 (14.27%), A\*3001-B\*1302-DRB1\*0701 (5.36%), A\*0207-B\*4601-Cw\*0102 (7.06%), Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701 (6.20%), B\*1302-DRB1\*0701-DQB1\*0202 (6.12%), A\*3001-Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701 (5.36%), Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701-DQB1\*0202 (6.12%), A\*3001-Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701-DQB1\*0202 (5.29%). **Conclusion** The presentation of the high-resolution haplotypes data at HLA-A, -Cw, -B, -DRB1 and DQB1 loci in CMDP

718 marrow donors will be useful for HLA matching in transplantation as well as for other medical and anthropologic applications in the Chinese population.

**Key words:** HLA high-resolution DNA typing Haplotype frequency Chinese Marrow Donor Program (CMDP)

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 基因定位于人的第 6 号染色体短臂 (6p21.3), 是人体内最复杂的遗传多态性系统, 也是机体内特异性免疫识别和免疫应答的主要成分, 在排斥反应中起着重要作用<sup>[1]</sup>。准确和可靠的 HLA 基因频率和单倍型频率数据, 对于预计找到 HLA 匹配供者的可能性以及预计捐献者资料库的最佳库容量至关重要<sup>[2~4]</sup>。目前有关中国人群 HLA I 类抗原、II 类抗原在不同地区、不同种族的单倍型分布已有众多报道, 但多数是基于 HLA 低分辨基因分型或是血清学分型的数据, 而且分析多集中在 HLA-A, -B, -DRB1 位点<sup>[5~8]</sup>, 仅有一篇文献对 264 名广东籍夏威夷居民的 HLA I 类抗原和 II 类抗原基因高分辨单倍型频率进行了分析报道<sup>[9]</sup>。本研究根据中华骨髓库 (Chinese National Marrow Donor Program, CMDP) 提供的 718 例捐献者 HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1 五位点高分辨基因分型数据, 通过两位点、三位点、四位点、五位点单倍型频率分析, 在高分辨水平总结了中华骨髓库捐献者五位点常见的单倍型频率数据, 初步描绘了中国人群 HLA 高分辨单倍型频率的特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本研究中所用的 718 例 HLA 高分辨分型数据是 2006 年 9 月至 2007 年 9 月期间由中华骨髓库的 3 家高分辨实验室, 在严格的质量控制下采用 HLA 高分辨基因分型方法 (测序法或 PCR-SSP 法) 对 HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1 五位点检测所获得的数据, 其中北京市红十字血液中心 HLA 高分辨实验室提供 348 例; 苏州市红十字中心血站 HLA 高分辨实验室提供 301 例; 深圳市输血医学研究所 HLA 高分辨实验室提供 69 份。

### 1.2 统计分析

应用 Arlequin 3.1 软件<sup>[10]</sup>, 采用最大似然法 (Maximum-likelihood) 计算两位点、三位点、四位点和五位点单倍型频率, 采用双基因座连锁 (Pairwise Linkage) 作连锁不平衡 (Linkage Disequilibrium, LD) 分析, 其中  $D'$ 、 $r^2$  值反映了连锁不平衡强度,  $D'$  值为 0 代表平衡,  $D'$  值为 1.00 表示正的强连锁不平衡<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 两位点单倍型频率和双座位连锁不平衡分析

表 1 列出了频率高于 1% 的两位点单倍型及其连锁不平衡参数, 其中有 23 个 A-B 单倍型; 26 个 Cw-B 单倍型; 20 个 B-DRB1 单倍型; 22 个 DRB1-DQB1 单倍型。每种单倍型中频率最高的分别为: A\*0207-B\*4601 (7.34%), A\*0207-Cw\*0102 (7.04%), Cw\*0102-B\*4601 (8.71%), B\*1302-DRB1\*0701 (6.19%) 和 DRB1\*0901-DQB1\*0303 (14.27%)。连锁不平衡分析表明, 每组双座位间均有一些单倍型显示显著的连锁不平衡 ( $P < 0.05$ ), 其中表现为强连锁的单倍型为: A\*0101-B\*5701 ( $D'=0.94$ ,  $x^2=642.64$ ), Cw\*0702-B\*3802 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=265.88$ ), Cw\*0702-B\*0702

( $D'=1.00$ ,  $x^2=175.23$ ), Cw\*0602-B\*5701 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=163.94$ ), B\*1302-DRB1\*0701 ( $D'=0.86$ ,  $x^2=737.55$ ), DRB1\*0701-DQB1\*0202 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=1225.86$ ), DRB1\*030-DQB1\*0201 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=1408.39$ ), DRB1\*0406-DQB1\*0302 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=663.37$ ), DRB1\*1405-DQB1\*0503 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=759.32$ ), DRB1\*0403-DQB1\*0302 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=319.20$ ), DRB1\*1302-DQB1\*0609 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=786.47$ ), DRB1\*1302-DQB1\*0604 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=595.19$ ), DRB1\*1301-DQB1\*0603 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=1228.25$ ), DRB1\*0101DQB1\*0501 ( $D'=1.00$ ,  $x^2=611.79$ )。结果显示 Cw-B 和 DRB1-DQB1 呈现较为显著的强连锁不平衡现象。

表1 中华骨髓库 HLA 两位点高分辨单倍型频率和连锁不平衡分析 ( $n=718$ )

单倍型		频率 (%)	D'	$x^2$	p 值
A*0207	B*4601	7.34	0.74	770.20	<0.01
A*3001	B*1302	5.99	0.93	1067.32	<0.01
A*3303	B*5801	4.59	0.85	745.81	<0.01
A*1101	B*4001	4.14	0.22	32.24	<0.01
A*2402	B*4001	3.20	0.17	26.46	<0.01
A*1101	B*1301	2.91	0.41	51.43	<0.01
A*1101	B*1502	2.25	0.57	59.29	<0.01
A*0203	B*3802	2.15	0.63	452.58	<0.01
A*1101	B*1501	2.11	0.12	4.54	0.03
A*1101	B*5502	1.91	0.50	47.71	<0.01
A*3303	B*4403	1.60	0.61	176.38	<0.01
A*0201	B*4001	1.45	-0.30	2.63	0.11
A*2402	B*1501	1.35	0.09	3.61	0.06
A*0201	B*4801	1.31	0.31	29.00	<0.01
A*2402	B*5401	1.21	0.33	21.71	<0.01
A*2402	B*4801	1.20	0.21	11.09	<0.01
A*0201	B*1501	1.18	0.12	7.54	0.01
A*1101	B*3901	1.18	0.32	13.24	<0.01
A*0201	B*1301	1.16	0.09	3.97	0.05
A*0201	B*1511	1.13	0.66	66.82	<0.01
A*0206	B*5101	1.11	0.17	30.32	<0.01
A*0206	B*4006	1.09	0.26	51.29	<0.01
A*0101	B*5701	1.05	0.94	642.64	<0.01
Cw*0102	B*4601	8.71	0.90	672.88	<0.01
Cw*0602	B*1302	6.96	0.98	1065.05	<0.01
Cw*0702	B*4001	5.65	0.40	162.11	<0.01
Cw*0304	B*1301	5.36	0.96	594.36	<0.01
Cw*0302	B*5801	5.29	0.99	1359.44	<0.01
Cw*1402	B*5101	4.04	0.95	1054.09	<0.01
Cw*0801	B*4006	3.41	0.90	425.17	<0.01
Cw*0702	B*3802	3.34	1.00	265.88	<0.01

单倍型		频率 (%)	D'	$\chi^2$	p 值
Cw*0304	B*4001	3.34	0.20	56.04	<0.01
Cw*0801	B*1502	3.27	0.98	445.81	<0.01
Cw*0102	B*5401	2.51	0.91	183.15	<0.01
Cw*0102	B*5502	2.30	0.58	99.41	<0.01
Cw*0702	B*0702	2.23	1.00	175.23	<0.01
Cw*0702	B*3901	2.22	0.93	161.33	<0.01
Cw*0303	B*1501	2.02	0.29	91.02	<0.01
Cw*1202	B*5201	1.88	0.93	847.74	<0.01
Cw*0401	B*1501	1.85	0.27	98.55	<0.01
Cw*0303	B*1511	1.60	0.95	268.27	<0.01
Cw*0801	B*4801	1.60	0.44	86.51	<0.01
Cw*0401	B*1527	1.32	0.95	265.49	<0.01
Cw*0303	B*3501	1.30	0.58	128.83	<0.01
Cw*1403	B*4403	1.18	0.94	630.40	<0.01
Cw*1502	B*5102	1.18	0.89	414.99	<0.01
Cw*0304	B*4002	1.13	0.30	29.80	<0.01
Cw*0602	B*5701	1.11	1.00	163.94	<0.01
Cw*0303	B*4002	1.04	0.30	48.14	<0.01
B*1302	DRB1*0701	6.19	0.86	737.55	<0.01
B*4601	DRB1*0901	5.16	0.47	193.81	<0.01
B*5801	DRB1*0301	2.93	0.78	591.97	<0.01
B*5101	DRB1*0901	2.45	0.41	77.59	<0.01
B*4001	DRB1*1501	2.14	0.07	5.75	0.02
B*1502	DRB1*1202	2.11	0.61	187.76	<0.01
B*1301	DRB1*1202	2.10	0.33	91.81	<0.01
B*4001	DRB1*1101	2.03	0.32	66.25	<0.01
B*4006	DRB1*0901	1.68	0.37	44.71	<0.01
B*4601	DRB1*0803	1.66	0.17	27.86	<0.01
B*1301	DRB1*1501	1.64	0.22	27.73	<0.01
B*1501	DRB1*0406	1.55	0.40	140.87	<0.01
B*1501	DRB1*1501	1.55	0.17	18.45	<0.01
B*5801	DRB1*1302	1.53	0.46	173.44	<0.01
B*4001	DRB1*0803	1.36	0.11	10.56	<0.01
B*5401	DRB1*0405	1.30	0.49	192.54	<0.01
B*4001	DRB1*1202	1.26	0.03	0.85	0.36
B*5201	DRB1*1502	1.18	0.57	359.96	<0.01
B*4403	DRB1*0701	1.12	0.38	49.48	<0.01
B*4403	DRB1*1302	1.04	0.40	180.62	<0.01
DRB1*0901	DQB1*0303	14.27	0.97	1229.87	<0.01
DRB1*0701	DQB1*0202	8.57	1.00	1225.86	<0.01
DRB1*1202	DQB1*0301	8.57	0.94	485.89	<0.01

单倍型		频率 (%)	D'	$\chi^2$	p 值
DRB1*1501	DQB1*0602	7.94	0.98	857.11	<0.01
DRB1*0803	DQB1*0601	6.48	0.95	782.08	<0.01
DRB1*1101	DQB1*0301	5.20	0.91	273.00	<0.01
DRB1*0405	DQB1*0401	4.32	0.98	1281.76	<0.01
DRB1*0301	DQB1*0201	3.69	1.00	1408.39	<0.01
DRB1*0406	DQB1*0302	3.69	1.00	663.37	<0.01
DRB1*1201	DQB1*0301	3.44	0.91	174.33	<0.01
DRB1*1405	DQB1*0503	3.06	1.00	759.32	<0.01
DRB1*1602	DQB1*0502	2.49	0.94	526.32	<0.01
DRB1*1501	DQB1*0601	2.47	0.12	16.60	<0.01
DRB1*1401	DQB1*0502	1.89	0.59	237.61	<0.01
DRB1*1502	DQB1*0601	1.85	0.68	147.20	<0.01
DRB1*0403	DQB1*0302	1.81	1.00	319.20	<0.01
DRB1*1302	DQB1*0609	1.74	1.00	786.47	<0.01
DRB1*1302	DQB1*0604	1.32	1.00	595.19	<0.01
DRB1*1301	DQB1*0603	1.25	1.00	1228.25	<0.01
DRB1*0701	DQB1*0303	1.18	-0.24	1.74	0.19
DRB1*0101	DQB1*0501	1.11	1.00	611.79	<0.01
DRB1*1401	DQB1*0503	1.04	0.30	69.03	<0.01

## 2.2 三位点、四位点和五位点单倍型频率

表 2 列出了频率高于 1% 的三位点单倍型。在三位点单倍型中, 8 个频率高于 1% 的 A-B-DRB1 单倍型占据了分析人群的 19.1%; 20 个 A-B-C 单倍型占据了分析人群的 43.3%。每种单倍型最常见的为: A\*3001-B\*1302-DRB1\*0701 (5.36%)、A\*0207-B\*4601-DRB1\*0901 (4.12%)、A\*0207-B\*4601-Cw\*0102 (7.06%)、A\*3001-B\*1302-Cw\*0602 (5.99%)、A\*3303-B\*5801-Cw\*0302 (4.59%)。

表 2 中华骨髓库 HLA 三位点高分辨单倍型频率 (n=718)

单倍型			频率 (%)
A*3001	B*1302	DRB1*0701	5.36
A*0207	B*4601	DRB1*0901	4.12
A*3303	B*5801	DRB1*0301	2.37
A*1101	B*1502	DRB1*1202	1.66
A*0207	B*4601	DRB1*0803	1.59
A*0201	B*1301	DRB1*1202	1.42
A*3303	B*5801	DRB1*1302	1.39
A*1101	B*1301	DRB1*1501	1.23
A*0207	B*4601	Cw*0102	7.06
A*3001	B*1302	Cw*0602	5.99
A*3303	B*5801	Cw*0302	4.59

单倍型			频率 (%)
A*1101	B*1301	Cw*0304	3.05
A*1101	B*4001	Cw*0702	2.71
A*1101	B*1502	Cw*0801	2.25
A*0203	B*3802	Cw*0702	2.15
A*1101	B*1501	Cw*0401	1.38
A*1101	B*5502	Cw*0102	1.34
A*2402	B*4001	Cw*0304	1.33
A*2402	B*4001	Cw*0702	1.33
A*2402	B*5401	Cw*0102	1.23
A*1101	B*5101	Cw*1402	1.19
A*0206	B*4006	Cw*0801	1.18
A*0201	B*1511	Cw*0303	1.18
A*1101	B*3901	Cw*0702	1.15
A*0101	B*5701	Cw*0602	1.05
A*3303	B*4403	Cw*1403	1.05
A*0201	B*1301	Cw*0304	1.04
A*2402	B*0702	Cw*0702	1.03

在四位点单倍型中, 8 个频率高于 1% 的 A-Cw-B-DRB1 单倍型占据分析人群的 18.7% (表 3); 15 个 Cw-B-DRB1-DQB1 单倍型占据分析人群的 31.9%。最常见四位点单倍型为: A\*3001-Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701 (5.36%)、A\*0207-Cw\*0102-B\*4601-DRB1\*0901 (3.98%)、A\*3303-Cw\*0302-B\*5801-DRB1\*0301 (2.37%)、Cw \* 0602-B \* 1302-DRB1 \* 0701 - DQB1 \* 0202 (6.12%)、Cw \* 0102-B\*4601-DRB1\*0901-DQB1\*0303 (4.54%)、Cw\*0302-B\*5801-DRB1\*0301-DQB1\*0201 (2.93%)。

表 3 中华骨髓库 HLA 四位点单倍型频率 (n=718)

单倍型				频率 (%)
A*3001	Cw*0602	B*1302	DRB1*0701	5.36
A*0207	Cw*0102	B*4601	DRB1*0901	3.98
A*3303	Cw*0302	B*5801	DRB1*0301	2.37
A*1101	Cw*0801	B*1502	DRB1*1202	1.59
A*0207	Cw*0102	B*4601	DRB1*0803	1.40
A*3303	Cw*0302	B*5801	DRB1*1302	1.39
A*1101	Cw*0304	B*1301	DRB1*1202	1.37
A*1101	Cw*0304	B*1301	DRB1*1501	1.24
Cw*0602	B*1302	DRB1*0701	DQB1*0202	6.12
Cw*0102	B*4601	DRB1*0901	DQB1*0303	4.54
Cw*0302	B*5801	DRB1*0301	DQB1*0201	2.93



单倍型				频率 (%)
Cw*1402	B*5101	DRB1*0901	DQB1*0303	2.39
Cw*0304	B*1301	DRB1*1202	DQB1*0301	2.16
Cw*0801	B*1502	DRB1*1202	DQB1*0301	1.96
Cw*0801	B*4006	DRB1*0901	DQB1*0303	1.52
Cw*0102	B*4601	DRB1*0803	DQB1*0601	1.47
Cw*0304	B*1301	DRB1*1501	DQB1*0601	1.46
Cw*0302	B*5801	DRB1*1302	DQB1*0609	1.39
Cw*0401	B*1501	DRB1*0406	DQB1*0302	1.39
Cw*0102	B*5401	DRB1*0405	DQB1*0401	1.22
Cw*0702	B*4001	DRB1*0803	DQB1*0601	1.14
Cw*1202	B*5201	DRB1*1502	DQB1*0601	1.11
Cw*1403	B*4403	DRB1*1302	DQB1*0604	1.05

表 4 列出了单倍型频率高于 0.5% 的五位点单倍型, 22 个频率高于 0.5% 的 A-Cw-B-DRB-DQB1 单倍型占据分析人群的 27.9%。最常见的五位点单倍型为: A\*3001-Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701-DQB1\*0202 (5.29%)、A\*0207-Cw\*0102-B\*4601-DRB1\*0901-DQB1\*0303 (3.84%)、A\*3303-Cw\*0302-B\*5801-DRB1\*0301-DQB1\*0201 (2.37%)。

表 4 中华骨髓库 HLA 五位点单倍型频率 (n=718)

单倍型					频率 (%)
A*3001	Cw*0602	B*1302	DRB1*0701	DQB1*0202	5.29
A*0207	Cw*0102	B*4601	DRB1*0901	DQB1*0303	3.84
A*3303	Cw*0302	B*5801	DRB1*0301	DQB1*0201	2.37
A*1101	Cw*0801	B*1502	DRB1*1202	DQB1*0301	1.67
A*0207	Cw*0102	B*4601	DRB1*0803	DQB1*0601	1.46
A*0201	Cw*0304	B*1301	DRB1*1202	DQB1*0301	1.44
A*3303	Cw*0302	B*5801	DRB1*1302	DQB1*0609	1.32
A*1101	Cw*0304	B*1301	DRB1*1501	DQB1*0601	1.18
A*3303	Cw*1403	B*4403	DRB1*1302	DQB1*0604	0.98
A*1101	Cw*0401	B*1501	DRB1*0406	DQB1*0302	0.95
A*1101	Cw*1402	B*5101	DRB1*0901	DQB1*0303	0.84
A*0101	Cw*0602	B*5701	DRB1*0701	DQB1*0303	0.70
A*2402	Cw*0102	B*5401	DRB1*0405	DQB1*0401	0.69
A*1101	Cw*0304	B*1301	DRB1*1202	DQB1*0301	0.64
A*2402	Cw*0401	B*1527	DRB1*0406	DQB1*0302	0.63
A*1101	Cw*0702	B*4001	DRB1*0803	DQB1*0601	0.60
A*0206	Cw*0801	B*4006	DRB1*1501	DQB1*0602	0.56
A*1101	Cw*0304	B*4001	DRB1*1101	DQB1*0301	0.56
A*2402	Cw*0801	B*4006	DRB1*0901	DQB1*0303	0.56
A*0206	Cw*1402	B*5101	DRB1*0901	DQB1*0303	0.56
A*0203	Cw*0702	B*3802	DRB1*1602	DQB1*0502	0.55
A*2402	Cw*1202	B*5201	DRB1*1502	DQB1*0601	0.52

### 3 讨论

HLA是人体调控特异性免疫应答和决定病原体或疾病易感性个体差异的主要基因系统,具有高度多态性和显著的人种、民族、地域差异。目前有关HLA基因多态性在人群中分布的报道尽管已有很多,但多数是在低分辨基因分型水平,或是在高分辨基因分型水平研究个别基因位点。本研究首先对中华骨髓库718例捐献者HLA-A, B, C, DRB1和DQB1五位点高分辨分型资料进行了Hardy-Weinberg平衡检验,结果表明HLA-A, B, C, DRB1基因分布符合H-W平衡定律( $P>0.05$ ),而HLA-DQB1基因分布偏离H-W平衡,这可能与罕见基因的干扰、样本量、样本选择压力等相关,该偏离有望随着样本量的进一步扩大而得到纠正,在此基础上我们利用国际公认的Arlequin软件对该资料进行了连锁不平衡和单倍型频率分析,从而在高分辨基因分型水平提供了一套有关中国人相对完整和详尽的HLA-A, B, C, DRB1和DQB1五位点基因多态性数据,且样本量在目前类似研究中是最大的。

双基因座LD分析结果表明,HLA-C与HLA-B、HLA-DRB1与HLA-DQB1间的连锁不平衡现象较为显著,其中表现为强连锁( $D'$ 值接近于1.00)且单倍型频率大于1%的主要为:A\*0101-B\*5701、Cw\*0702-B\*3802、Cw\*0702-B\*0702、Cw\*0602-B\*5701、DRB1\*0701-DQB1\*0202、DRB1\*0301-DQB1\*0201、DRB1\*0406-DQB1\*0302、DRB1\*1405-DQB1\*0503、DRB1\*0403-DQB1\*0302、DRB1\*1302-DQB1\*0609、DRB1\*1302-DQB1\*0604、DRB1\*1301-DQB1\*0603、DRB1\*0101-DQB1\*0501,与已有文献结果基本相符<sup>[11]</sup>。目前众多研究集中在HLA A-B-DRB1单倍型的研究,并且大多数为低分辨水平,吴强驹等对11755名中国北方汉族骨髓捐献者的研究表明,A30-B13-DR7(4.4%)、A2-B46-DR9(2.4%)和A33-B58-DR17(1.4%)是中国北方汉族人群中最常见的单倍型<sup>[7]</sup>,类似的结果也在Du KM等对上海骨髓库26266名捐献者的研究中报道<sup>[5]</sup>,但两者的单倍型频率略有差异,后者为A30-B13-DR7(4.52%)、A2-B46-DR9(4.56%)和A33-B58-DR17(3.25%),这可能是由于捐献者人群分布所造成的。本研究中,最常见的HLA A-B-DRB1的单倍型为A\*3001-B\*1302-DRB1\*0701(5.36%)、A\*0207-B\*4601-DRB1\*0901(4.12%)、A\*3303-B\*5801-DRB1\*0301(2.37%),与低分辨研究结果相一致。有关HLA四位点单倍型的研究,对新加坡骨髓库中的536名中国捐献人群(主要为福建籍和广东籍)的分析表明,A\*02-Cw\*01-B\*46-DRB1\*09(5.59%)、A\*33-Cw\*03-B\*58-DRB1\*03(5.11%)和A\*11-Cw\*08-B\*15-DRB1\*12(4.04%)最为常见<sup>[12]</sup>,我们的研究显示最常见的A-C-B-DRB1-DQB1单倍型为A\*3001-Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701(5.36%)、A\*0207-Cw\*0102-B\*4601-DRB1\*0901(3.98%)和A\*3303-Cw\*0302-B\*5801-DRB1\*0301(2.37%),两者之间的差异可能与前者的研究对象主要为南方人群有关。对于目前仅有的一篇关于中国人HLA class I 和class II高分辨单倍型的研究<sup>[9]</sup>,其推导出在264名广东籍的夏威夷居民中最常见的七位点单倍型可能是A\*3303-Cw\*0302-B\*5801-DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201-DPB1\*0401和A\*0207-Cw\*0102-B\*4601-DRB1\*0901-DQA1\*0301-DQB1\*0303-DPB1\*0501。我们的结果表明,在718名中华骨髓库骨髓捐献者中最常见的HLA A-C-B-DRB1-DQB1五位点单倍型为A\*3001-Cw\*0602-B\*1302-DRB1\*0701-DQB1\*0202(5.29%)、A\*0207-Cw\*0102-B\*4601-DRB1\*0901-DQB1\*0303(3.84%)、A\*3303-Cw\*0302-B\*5801-DRB1\*0301-DQB1\*0201(2.37%),两者间的差异同样也是因为前者的研究对象主要是南方人群,而我们

的研究加入了大量的北方人群数据。

总之,本研究基于中华骨髓库宝贵的HLA高分辨分型资料,首次报道了较大样本量的HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1五位点高分辨单倍型频率,该数据将为临床上造血干细胞移植配型提供重要的参考依据,有利于预计从中华造血干细胞捐献者资料库中找到相配供者的可能性,也有利于较精确地估计骨髓库的最佳库容量。同时该研究也将为HLA与疾病相关性研究、法医学HLA鉴定以及人类学研究等提供有价值的资料。

(本研究是在中华骨髓库管理中心的大力支持和资助下完成的,同时该项研究凝聚了中华骨髓库3家HLA高分辨实验室全体工作人员的大量心血,体现了多单位积极的协作精神,在此一并致谢!

### 参考文献

- [1] Petersdorf EW, Malkki M. Human leukocyte antigen matching in unrelated donor hematopoietic cell transplantation[J]. *Semin Hematol*, 2005, 42 (2): 76-84
- [2] 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, 12 (6): 381-384
- [3] Hurley CK, Fernandez Vina M, Setterholm M. Maximizing optimal hematopoietic stem cell donor selection from registries of unrelated adult volunteers[J]. *Tissue Antigens*, 2003, 61 (6): 415-24
- [4] Sun Yoon Choo. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing and clinical implications[J]. *Yonsei Med J*, 2007, 48 (1): 11-23
- [5] Du KM, Ji Y, Xie JH, et al. HLA-A, -B, -DR haplotype frequencies from DNA typing data of 26, 266 Chinese bone marrow donors[J]. *Hum Immunol*, 2007, 68 (10): 854-866
- [6] Miao KR, Pan QQ, Tang RC, et al. The polymorphism and haplotype analysis of HLA-A, -B and -DRB1 genes of population in Jiangsu province of China[J]. *Int J Immunogenet*, 2007, 34 (6): 419-24
- [7] 吴强驹, 刘孟黎等. 11755名中国北方汉族造血干细胞供者HLA-A、B、DRB1基因和单倍型研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15 (2): 357-363
- [8] 刘孟黎, 刘耀堂, 刘晟等. 西安骨髓库北方汉族人群HLA-DRB1高分辨多态性[J]. *中国输血杂志*, 2007, 20 (4): 306-308
- [9] 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
- [10] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005-1: 47-50
- [11] Chang YW, Hawkins BR. HLA class I and class II frequencies of a Hong Kong Chinese population based on bone marrow donor registry data[J]. *Hum Immunol*, 1997, 56 (1-2): 125-35
- [12] Tang TF, Hou L, Chen M, et al. HLA haplotypes in Singapore: a study of mothers and their cord blood units[J]. *Hum Immunol*, 2007, 68 (5): 430-438

## 484 例无关供者造血干细胞移植资料分析

任汉云

异基因造血干细胞移植目前仍是治疗许多血液系统疾病的金标准,但只有约 30% 的患者有 HLA 配型相合的同胞供者。对于找不到 HLA 配型相合的同胞供者的患者来说,无血缘关系供者成为最有潜力的干细胞来源。中华骨髓库自 1992 年成立以来发展迅速,目前登记在册的骨髓捐献者已近 70 万人,成功进行无关供者造血干细胞移植共 800 余例。本研究总结了 2004 年 1 月~2007 年 9 月共 484 例来自中华骨髓库的供者进行异基因外周血造血干细胞移植的疗效,报道如下。

### 病例和方法

#### 1 研究对象

2004 年 1 月~2007 年 9 月在中华骨髓库配型成功,进行无血缘关系供者异基因造血干细胞移植的患者 484 例。其中 2004 年度 109 例,2005 年度 155 例,2006 年度 210 例和 2007 年的 10 例。

患者地域分布:境外患者 13 例,北京 156 例,上海 77 例,江苏 46 例,广东 38 例,福建 24 例,广西 17 例,河南 16 例,天津 15 例,四川 15 例,湖北 13 例,重庆 13 例,浙江 12 例,陕西 8 例,黑龙江 5 例,湖南 4 例,山东 3 例,云南、河北各 2 例,安徽、海南、甘肃、新疆各 1 例。

年龄分布:<10 岁患者 34 例,10~20 岁 123 例,20~30 岁 143 例,30~40 岁 119 例,40~50 岁 45 例,>50 岁 15 例,年龄不详者 5 例。

疾病种类分布见表 1。根据移植前疾病状态将恶性疾病中的 AML-CR<sub>1</sub>, ALL-CR<sub>1</sub>, CML-CP<sub>1</sub>, MDS-RA 定义为稳定期,其它为进展期。本组资料中有 234 例确定为稳定期,91 例为进展期。

#### 2 外周血干细胞的动员和采集

所有患者均采用经 G-CSF 动员的外周血干细胞进行移植。皮下注射 rhG-CSF (惠尔血) 5~15μg/kg/d,于第 4、5 天或第 5、6 天采集外周血干细胞。

#### 3 资料来源与统计学分析

由各移植医院定期填报随访表格,根据随访资料,应用 SPSS14.0 统计软件系统分析移植后临床结果。累积发生率、生存率统计采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析,Log-Rank 检验进行组间生存比较。总体生存(OS)时间指从移植之日至死亡或最后一次随访。造血重建指标为中性粒细胞(ANC)连续 3 天 $\geq 0.5 \times 10^9/L$  的第 1 天。

## 结 果

#### 1 一般资料

患者中位年龄 25 (1~60) 岁。男性 298 例,女性 181 例,5 例性别不详。465 例患者中位随访时间 14 (1~36) 月,19 例患者失访。

---

任汉云,北京大学第一医院教授,血液科主任,代表中华骨髓库专家委员会整理

## 2 造血重建

中位 WBC 植入时间为 14 (7~53) 天, 累积 WBC 植入率 98.2%, 如图 1。移植后 30 天 96.4% 患者达到 WBC 植入。

表 1 484 例无关供者造血干细胞移植病种分布

恶性疾病	450 例	白血病	430	CML	194
				AML	107
				ALL	127
				JMML	1
				CLL	1
				MDS	9
				淋巴瘤	8
				NHL	5
				HL	3
				MPD	1
MM	1				
噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(HLH)				1	
良性疾病	27 例	再生障碍性贫血	17	SAA	16
				CAA	1
				先天性纯红再障	1
				重型-β地中海贫血	6
				遗传性疾病	10
				先天性免疫缺陷症	1
				大理石骨病	1
粘多糖贮积症	1				
不详			7 例		

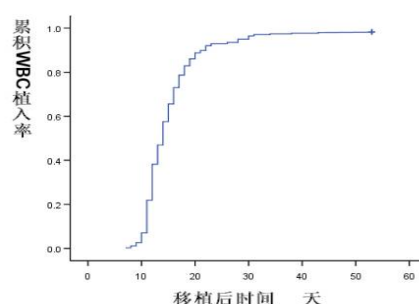


图 1 累积 WBC 植入率

## 3 GVHD 发生率

II~IV° aGVHD 的累积发生率为 42.7%, III~IV° aGVHD 的累积发生率为 18.6%。在移植后生存时间大于 100 天的 330 例患者中, cGVHD 的累积发生率为 39.7%, 广泛型 cGVHD 的累积发生率为 18.4%。见图 2。

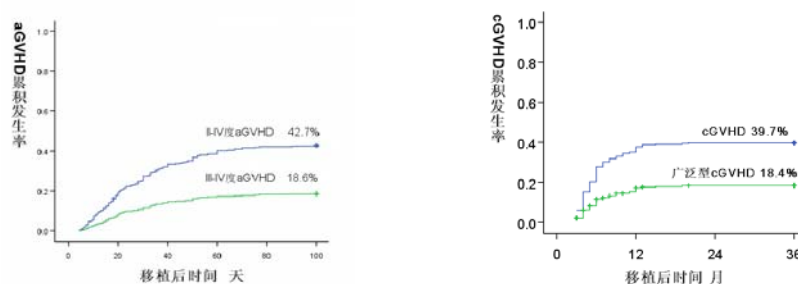


图 2 aGVHD 和 cGVHD 的累积发生率

#### 4 生存分析

484 例患者的 3 月累积总生存率 (OS) 为 83%，1 年 OS 为 67%，2 年 OS 为 62% (图 3)。良性疾病患者 (27 例) 的 2 年 OS 高于恶性疾病患者 (427 例)，73.4% vs 60.8%，但两组比较无统计学意义 ( $P=0.31$ ) (图 4)。

疾病稳定期患者 (234 例) 的 2 年 OS 明显高于疾病进展期 (91 例)，73.5% vs 38.8%， $P<0.001$ 。对疾病稳定期患者进行年龄分组显示， $\geq 40$  岁组患者 (25 例) 的 2 年 OS 明显低于  $<20$  岁组 (65 例) 和 20~40 岁组 (143 例)，55.5% vs 73.8% vs 76.4%， $P=0.03$  (图 5)。

在各型白血病中，CML (184 例) 患者的 2 年 OS 高于 AML (102 例) 和 ALL (121 例)，66.1% vs 56.3% vs 55.6%， $P=0.09$  (图 6)。

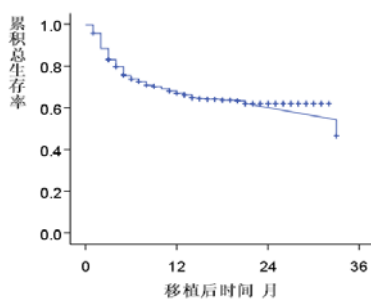


图 3 484 例患者的 OS

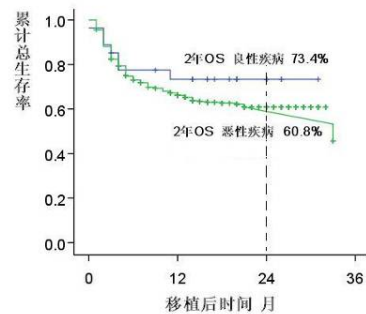


图 4 良、恶性疾病患者的 2 年 OS 比较， $P=0.31$ ；

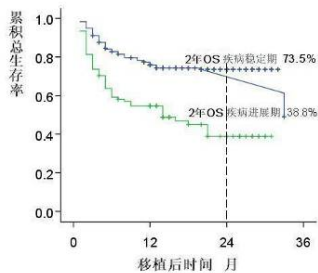


图 5 不同疾病状态的 2 年 OS 比较， $P<0.001$ ；疾病稳定期患者中各年龄组的 2 年 OS 比较， $P=0.03$ 。

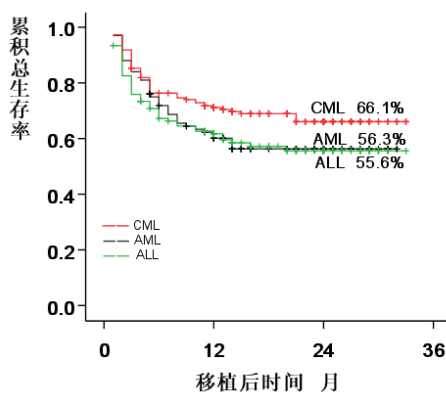
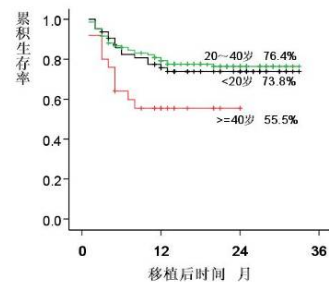


图 6 不同白血病类型的 2 年 OS 比较， $P=0.09$

#### 5 复发分析

484 例患者的累积复发率为 13.5%，1 年累积复发率为 9.7%，2 年累积复发率为 13.5% (图 7)。

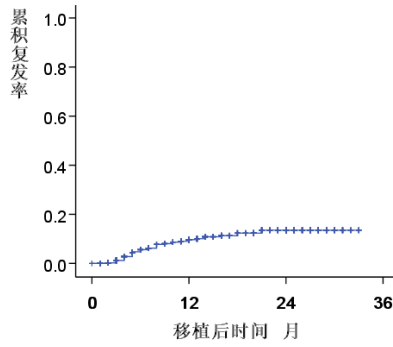


图 7 484 例患者的累积复发率

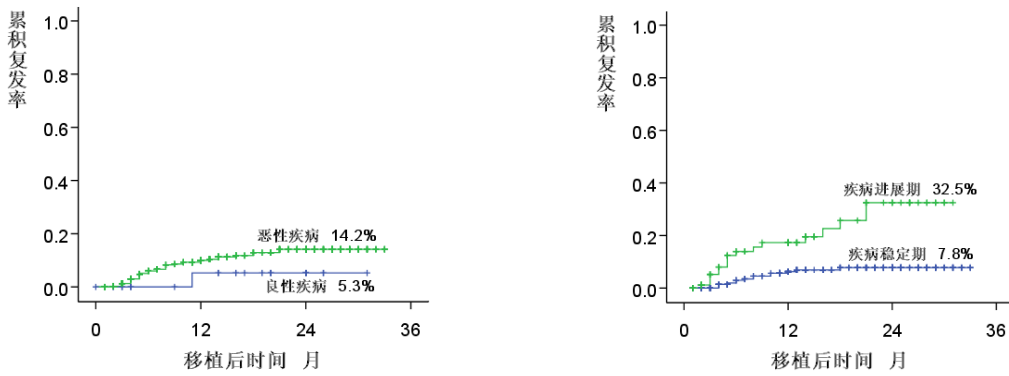


图 8 良恶性疾病患者的累积复发率比较,  $P=0.29$ ;  
不同疾病状态的累积复发率比较,  $P<0.001$ 。

其中, 良性疾病的复发率低于恶性疾病 (5.3% vs 14.2%), 但两组比较无统计学意义,  $P=0.29$ 。而对于疾病稳定期患者, 复发率明显低于疾病进展期 (7.8% vs 32.5%),  $P<0.001$  (图 8)。

在各型白血病中, CML 的复发率明显低于 AML 和 ALL (6.1% vs 19.0% vs 22.6%),  $P<0.001$  (图 9)。

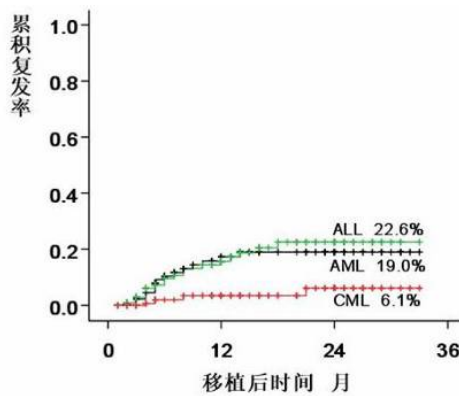


图 9 不同白血病类型的累积复发率比较,  $P<0.001$ 。

## 6 移植相关死亡

截至随访日期, 共有 183 例患者死亡, 其中移植相关死亡 (TRM) 141 例 (29.1%), 死亡原因分别为 GVHD 66 例 (46.8%), 感染 31 例 (22.0%), 间质性肺炎 19 例 (13.5%), 预处理毒

性 6 例（4.3%），移植失败 5 例（3.5%），肝静脉阻塞病 2 例（1.4%），其它 12 例（8.5%）。

### 小 结

1. 98%的无关供者干细胞移植患者可以达到造血重建。
2. 累积 aGVHD 发生率：II~IV° 42.7%，III~IV° 18.6%；累积 cGVHD 发生率为 39.7%，其中广泛型 18.4%。
3. 484 例患者 1 年 OS 为 67%，2 年 OS 为 62%；累积复发率为 13.5%。
4. 良性疾病患者的 2 年 OS 高于恶性疾病（73% vs 61%， $P=0.31$ ），累积复发率低于恶性疾病（5% vs 14%， $P=0.29$ ）。
5. 疾病稳定期患者的 2 年 OS 明显高于疾病进展期（74% vs 39%， $P<0.001$ ），累积复发率明显低于疾病进展期（8% vs 33%， $P<0.001$ ）。
6. 在疾病稳定期患者中， $\geq 40$  岁组、 $< 20$  岁组和 20~40 岁组的 OS 分别为 56%、74%和 76%， $\geq 40$  岁组患者的 2 年 OS 明显低于 $< 20$  岁组和 20~40 岁组（ $P=0.03$ ）。
7. CML、AML 和 ALL 患者的 2 年 OS 分别为 66.1%、56.3%和 55.6%。CML 患者的 2 年 OS 明显高于 AML 和 ALL（ $P=0.09$ ）；CML、AML 和 ALL 患者的累积复发率分别为 6%、19%和 23%，CML 患者的累积复发率明显低于 AML 和 ALL（ $P<0.001$ ）。



1-3

# 美国骨髓库移植现状

丹尼斯·康弗

**NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM**

## National Marrow Donor Program: Increasing Unrelated Donor Transplantation and Improving Outcomes

美国骨髓库: 增加移植数量和改善结果

Dennis L. Confer, M.D.  
Chief Medical Officer 首席医疗官员  
National Marrow Donor Program 美国骨髓库

May 2009  
2009年5月

Creating Connections. Saving Lives!

**NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM**

## 1970-2006: Blood and marrow transplants worldwide

1970-2006: 世界范围内的骨髓和周边血液移植

Creating Connections. Saving Lives!

**NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM**

## Indications for Hematopoietic Stem Cell Transplantation in North America

北美地区的造血干细胞移植适应症

Disease 疾病

Creating Connections. Saving Lives!

**NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM**

## Current Worldwide Annual Activity Estimates

现在世界每年的移植分析

- Autologous transplants ~40,000 annually  
每年差不多40,000自体移植
- Allogeneic transplants ~25,000 annually  
每年差不多25,000异基因的移植
  - More than half of allogeneic transplants use unrelated donor products  
半数以上异基因的移植来自非血缘关系捐赠者
  - More than 14 million adult donors are registered worldwide  
全世界有超过1400万造血干细胞志愿捐献者
  - The world's inventory of unrelated donor (i.e., public) umbilical cord blood units exceeds 350,000  
全世界有超过35万份的非亲属(即公用)脐带血

Creating Connections. Saving Lives!

**NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM**

## 1997-2006: Worldwide unrelated donor hematopoietic cell transplantation

1997-2006: 全世界无关供者造血干细胞移植

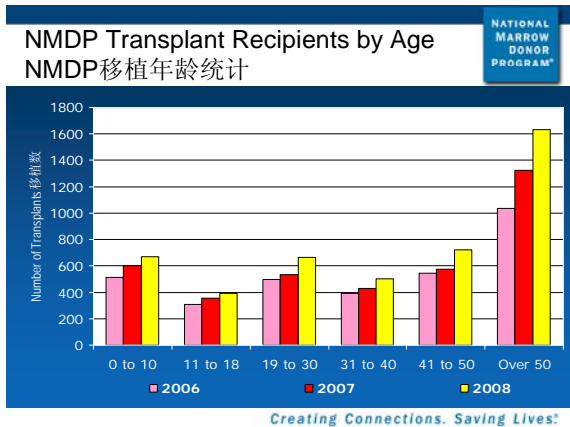
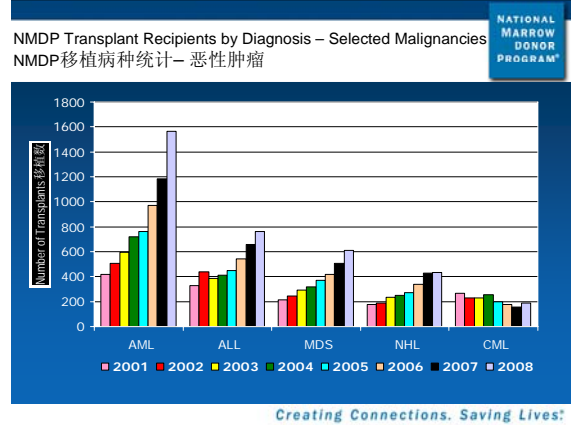
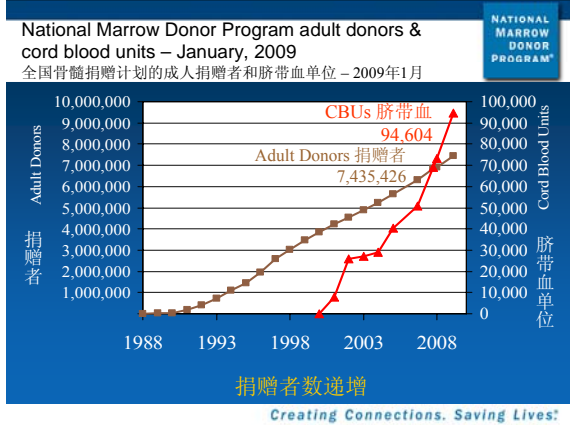
Creating Connections. Saving Lives!

**NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM**

## NMDP facilitated transplants (fiscal year 1987-2008)

1987-2006通过NMDP进行配型的移植

Creating Connections. Saving Lives!



### Contents

Biology of Blood and Marrow Transplantation

Volume 14 Number 9 Supplement 3 2008

[www.bbmt.org/issues](http://www.bbmt.org/issues)

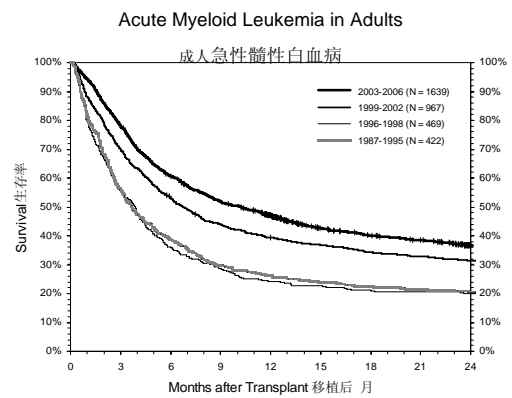
Section	Topic	Authors
Introduction	20th Anniversary of the NMDP	David Weisdorf
2	The National Marrow Donor Program 20 Years of Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation	Karen K. Ballen, Robert J. King, Pratik Chopra, Charles D. Blain Jr., Edward Agura, Robert J. Hartman, Nancy A. Kernan
8	Twenty Years of Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation for Adult Recipients Facilitated by the National Marrow Donor Program	Chunshu Karner, Gene O. Nelson, Pratik Chopra, Edward Agura, Karen K. Ballen, Charles D. Blain, David L. Porter, Joseph P. Uberti, Robert J. King, Dennis L. Confer
16	Twenty Years of Unrelated Donor Bone Marrow Transplantation for Pediatric Acute Leukemia Facilitated by the National Marrow Donor Program	Margaret L. MacMillan, Stella M. Davies, Gene O. Nelson, Pratik Chopra, Dennis L. Confer, Robert J. King, Nancy A. Kernan
23	Donation Activities and Product Integrity in Unrelated Donor Allogeneic Hematopoietic Transplantation: Experience of the National Marrow Donor Program	Charles D. Blain, Robert J. Hartman, Elizabeth H. Perry, Lance Trainor, John Miller, Rebecca Miller, Lori Hanley, Pratik Chopra, Robert J. King

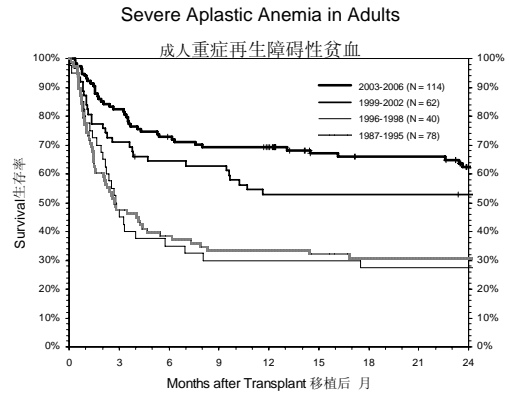
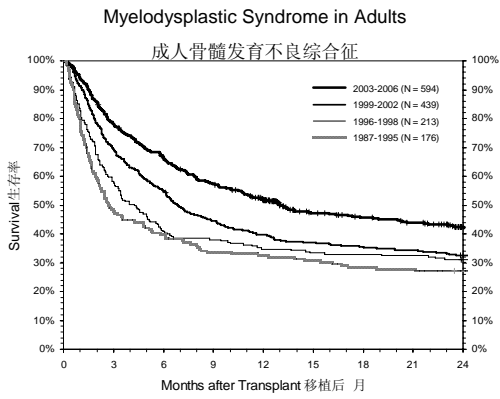
### 20 Years of Adult Transplantation

#### 20年的移植分析

- 11,418 adults >17 years of age  
11,418 成人大于十七岁
- Includes leukemia, MDS, NHL, Hodgkins and aplastic anemia  
包括白血病, MDS, NHL, HL, 和再生障碍性贫血
- Includes bone marrow (7399), PBSC (3882) and umbilical cord blood (137)  
包括骨髓(7399), 外周血干细胞(3882), 和脐带血(137)
- Both myeloablative (8254) and reduced intensity/non-ablative regimens (2931)  
清髓(8254)和非清髓(2931)的预处理
- Analyzed in four time periods from 1987 through 2006  
从1987年至2006年分析了四个时期

Creating Connections. Saving Lives!



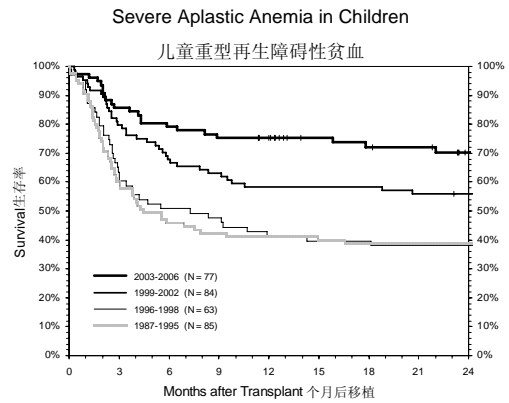
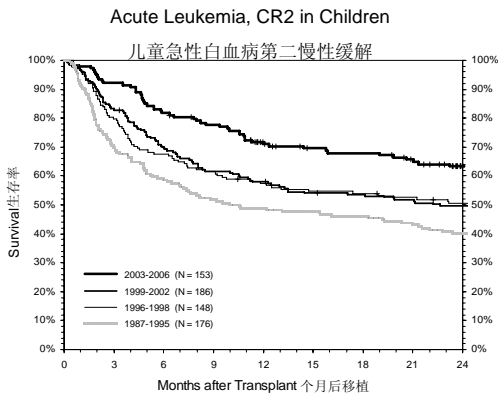
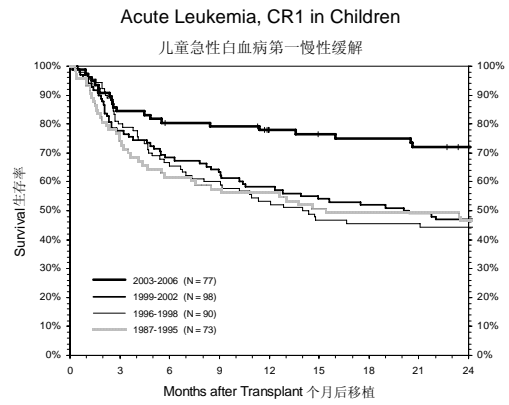


**NMDP Pediatric Transplantation**  
NMDP 患儿的移植

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM

- 1,494 children <18 years of age  
1494 名小于十八岁的儿童
- Only bone marrow transplants were considered  
只考虑骨髓移植
- Only acute leukemia and aplastic anemia  
只有急性白血病和再生障碍性贫血
- Analyzed in four time periods from 1987 through 2006  
从1987年至2006年分析了四个时期

Creating Connections. Saving Lives!



### Evidence of Improving Survival 生存率的逐年提升

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM

- NMDP center-specific analysis – Evaluates one-year survival of URD HCT recipients at all US transplant centers  
NMDP 的分析：全美移植中心采用无关供者进行移植的受者的一年生存率
- Employs a rolling 5-year window

Report Year 报告年	Period 时间	1-Year Survival 一年生存率
2003	1997-2001	42.2%
2006	2000-2004	48.8%
2007	2001-2005	51.5%
2008	2002-2006	54.0%

Creating Connections. Saving Lives!

### Further Evidence 进一步的证据

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM

1-year survival for a defined subset of patients evaluated over time 1年期生存率的调查

- Restricted to patients <50 years age 限于患者年龄小于50岁
- Myeloablative regimens only 只有清髓的预处理
- Acute leukemias in any remission 急性白血病处于缓解期
- Chronic Myelogenous Leukemia (CML) 慢性粒细胞白血病
- Myelodysplastic Syndromes – RA or RARS only 骨髓发育不良综合征 (只有 RA 或 RARS)

Analysis completed in mid-2007 2007年年中完成分析

- 6,450 recipients through December 31, 2005 截止05年12月31日, 6450病人参与研究
- Adjusted for recipient age, sex, race, CMV status, BMI, disease type, stage, risk and duration, performance score, coexisting disease 通过病人的年龄, 性别, 种族, 巨细胞病毒情况, 提标指数, 疾病类型, 疾病阶段, 风险和期限, 评分, 并发症加以评判

Creating Connections. Saving Lives!

### NMDP adjusted 1-year survivals over time 通过NMDP进行的移植的一年存活率

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM

Survival at 1 Year 一年存活率

Adjusted Survival 生存率

Creating Connections. Saving Lives!

### Survivals over time: unrelated vs. related donors 随着时间的推移生存: 有关与无关捐赠者

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM

Survival at 1 Year 一年存活率

Adjusted Survival 生存率

Sibling Donor 同胞捐助

Creating Connections. Saving Lives!

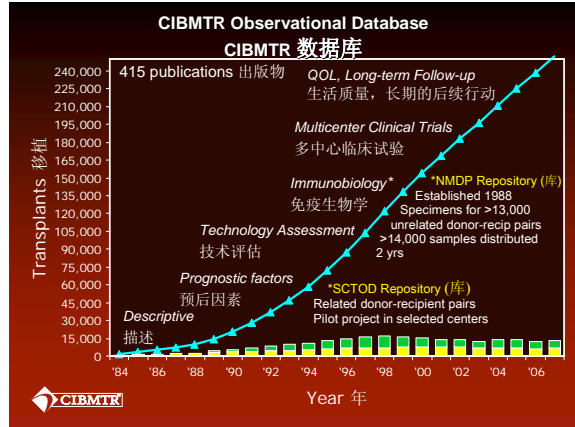
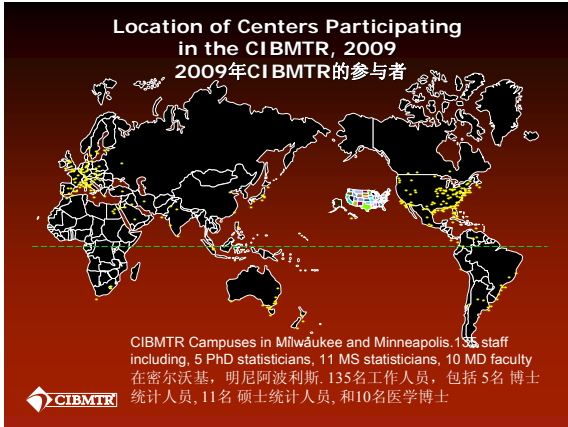
### NMDP's Commitment to Research: Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR)

全国骨髓捐赠计划致力于研究:  
国际血液和骨髓移植研究中心

Creating Connections. Saving Lives!

### CIBMTR SCIENTIFIC ACTIVITIES CIBMTR 的科学活动

- Observational Research 观测研究
  - Clinical outcomes 临床成果
  - Immunobiology 免疫生物学
  - Health Services 保健服务
- Prospective Clinical Trials 未来的临床试验
  - Bone Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN) 血液和骨髓移植临床试验网络
  - Resource for Clinical Investigation In Blood and Marrow Transplant (RCI BMT) 临床研究资源对血液和骨髓移植
- Statistical Methodology 统计方法

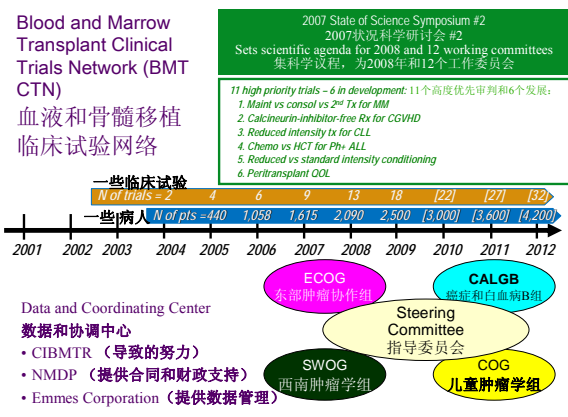


### Working Committees 工作委员会

- Acute Leukemia 急性白血病
- Chronic Leukemia 慢性白血病
- Lymphoma 淋巴瘤
- Plasma Cell Disorders 浆细胞病
- Solid Tumors 实体肿瘤
- Pediatric Cancer 儿科癌症
- Non-Malignant Marrow Disorders 非恶性骨髓疾病
- Immune Deficiencies / Inborn Errors 免疫缺陷 / 先天性
- Autoimmune Diseases 自身免疫性疾病
- Graft Sources/Manipulation 移植来源 / 操纵
- GVHD 移植植物抗宿主病
- Late Effects & QOL 后期影响和生活质量
- Immunobiology 免疫生物学
- Infection / Immune Reconstitution 感染 / 免疫重建
- Regimen-related Toxicity 方案相关毒性
- Emerging Cellular Therapies 新兴的细胞疗法
- Health Services & Psychosocial Issues 保健服务和心理问题
- Donor Health & Safety 捐赠者的健康和平安
- International Studies 国际研究

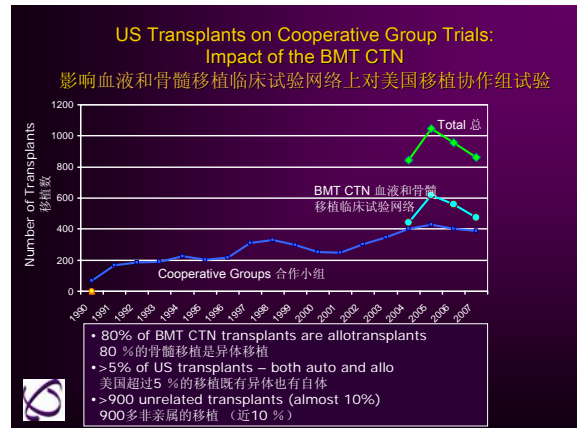
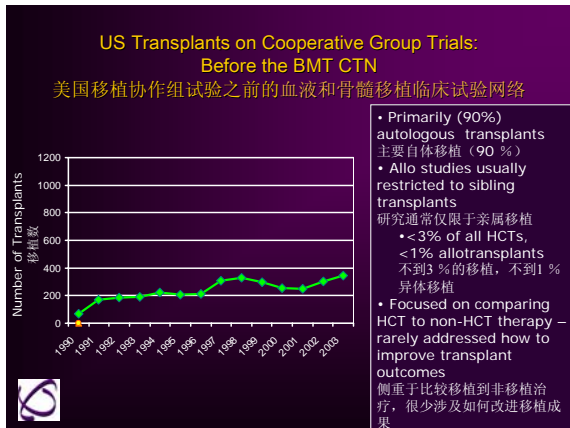
### BLOOD AND MARROW TRANSPLANT CLINICAL TRIALS NETWORK 血液和骨髓移植临床试验网络

- Established: Sept. 2001; renewed Oct. 2006  
2001年9月成立, 在2006年10月重新启动
- 16 Core Center cooperative agreements  
16核心中心合作协议
- 1 DCC cooperative agreement: CIBMTR with subcontracts to NMDP & EMMES  
1数据和协调中心合作协议: CIBMTR 是领先的数据和协调中心, Emmes 提供数据管理和 NMDP 提供合同和财政支持。
- Goal of the Program 目标计划:  
Provide the infrastructure needed to allow promising HCT therapies to be developed/evaluated in high quality multicenter studies  
提供所需的基础建设, 使有希望的血细胞生成的移植治疗方法是制订和评估的高品质多中心研究



### Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN) 血液和骨髓移植临床试验网络

- 4 Trials completed accrual 完成了4项实验
- 10 Trials are enrolling 共有10项列入计划
- 4 Trials unrelated donor strategies  
关于非血缘关系捐赠者的4项实验:  
 • Peripheral Blood vs. Bone Marrow – 469 pairs enrolled, 81 to go! 周边血液与骨髓  
 • Umbilical cord blood in pediatrics 儿童应用脐带血移植  
 • SCURT – Sickle Cell Unrelated Transplant Study 研究镰状细胞贫血使用非血缘关系捐赠者移植的研究  
 • Umbilical cord blood in adults 成人应用脐带血移植
- 9 Trials are in development 九项实验正在开发中



## Summary 摘要

- Transplantation of all types is increasing worldwide  
全世界范围内各类移植量逐年增长
- NMDP data supports the conclusion that survival rates are improving  
NMDP数据支持的结论是, 存活率提升
- Multiple factors likely account for better survival, but clinical research at single- and multi-institutional levels is a key component

Creating Connections. Saving Lives!

1-4

## Building a Strong HLA Foundation for the Registry

*Carolyn Hurley, PhD, D (ABHI)*

*CW Bill Young Donor Recruitment and Research Program, Georgetown University, Washington, DC USA*

In 1992, the unrelated hematopoietic stem cell donor registry in the United States, the National Marrow Donor Program, began a series of projects aimed at improving the accuracy and resolution of HLA typing of patients and volunteer donors, identifying the optimal matching criteria, enhancing the search algorithm, and speeding up the donor search process. Changes to recruitment typing involved transition to DNA-based typing methods and development of a series of quality control measures to improve the accuracy of typing. Centralizing the high resolution typing of donors potentially matching a patient and access to repository samples has speeded up the donor selection process. Retrospective high resolution typing of a repository of donor and recipient samples and access to an outcomes database has resulted in guidelines for matching. As international searches for matched donors have increased and over 40% of donors now come from a country different from the patient, international standards and guidelines related to HLA have become increasingly important.

## 为骨髓库的长期发展建立坚实的 HLA 基础

凯瑞兰·赫丽

CW Bill Young 供者招募和研究中心 美国华盛顿乔治城大学

1992 年起，美国造血干细胞无关供者招募组织——美国骨髓库，开展了一系列关于如何提高供患 HLA 分型的准确性和分辨率，制定最佳供患者之间的 HLA 配型标准，完善检索方法以及加速供者查询过程的工作。对招募供者的 HLA 分型的方法从血清学到 DNA 以及一系列质量监控的方法的建立达到提高 HLA 分型的准确性。通过将有可能和患者全相合的供者样品集中高分辨分型和总库样品库的建立缩短了选择供者的过程。通过回顾供患者的高分辨分析和对临床移植结果数据的掌握，美国骨髓库建立了患者和供者 HLA 配型指南。随着国际之间的供者申请检索配型的与日俱增，目前已经有超过 40% 的供患来自不同的国家，因此建立一个国际通用的 HLA 配型标准和指南显得越来越重要。

## 无关供者的选择和骨髓库移植率

赵桐茂

美国国立卫生研究院 NIH

提供造血干细胞的供者占骨髓库供者总数的比例，通常被称为骨髓库移植率。移植率越高，代表更多的病人得到治疗。骨髓库的移植率取决于：（1）骨髓库供者的数量；（2）供者种族群体背景多元化的程度；（3）选择 HLA 匹配供者的标准。采用 HLA 等位基因匹配供者，比采用 HLA 抗原匹配供者的移植效果为好。但是在找不到 HLA 等位基因完全匹配供者时，不得不采用 HLA 部分匹配，甚至 HLA 错配的供者。因此制定一个合理的、以临床资料为基础的选择 HLA 匹配供者的标准，是个重要的议题。本文主要介绍美国国家骨髓供者计划（NMDP）以及国际上采用的选择无关供者 HLA 匹配标准，希望对提高骨髓库移植率有所助益。

### 1 选择 HLA 匹配无关供者的标准

#### 1.1 供受对 HLA 匹配格局的分类

2008 年 NMDP 根据移植存活率，将供受者 HLA 匹配格局分为“完全匹配”，“部分匹配”，和“错配”等 3 种类型。按照此分类准则，在 NMDP 报告的 14797 例移植病人中，完全匹配 7477 例（50%），部分匹配 4962 例（34%），错配 2358 例（16%）；5 年存活率分别为 54.1%，43.7%和 33.4%。此资料表明，病人和供者的匹配程度每升高 1 级，5 年存活率可以提高 10%左右。

（1）完全匹配（Well-matched）包括：HLA-A, -B, -C, -DRB1 高分辨分型匹配（8/8）；HLA-A, -B, -DRB1 高分辨和 HLA-C 低分辨分型匹配（8/8）；HLA-A, -B, -C 低分辨和 HLA-DRB1 高分辨分型匹配（8/8）；HLA-A, -B, -DRB1 高分辨分型匹配（6/6），HLA-C 位点未知。

（2）部分匹配（Partially matched）包括 7 种格局：HLA-A, -B, -C, -DRB1 高分辨分型中，有 1 个等位基因错配（7/8）；HLA-A, -B, -DRB1 高分辨分型中，有 1 个等位基因错配（5/6），HLA-C 位点未知；HLA-A, -B, -C, -DRB1 高分辨分型中，有 1 个抗原错配（7/8）；HLA-A, -B, -DRB1 高分辨、HLA-C 位点低分辨分型中有 1 个错配（7/8）；HLA-A, -B 低分辨，-DRB1 高分辨分型匹配（6/6），HLA-C 位点未知；HLA-A, -B, -C, -DRB1 低分辨分型匹配（8/8）；HLA-A, -B, -C 低分辨，-DRB1 高分辨分型中，1 个错配（7/8）。

（3）错配（Mismatched）。以下 10 种格局被列入错配类型：HLA-A, -B, -C, -DRB1 高分辨分型中 2 个或大于 2 个等位基因错配（<7/8）；HLA-A, -B, -DRB1 低分辨分型匹配（6/6），HLA-C 位点未知；HLA-A, -B 低分辨，-DRB1 高分辨分型中 1 个错配（5/6），HLA-C 位点未知；HLA-A, -B, -C, -DRB1 高分辨分型中 2 个或 2 个以上错配，其中 1 个抗原错配（7/8）；HLA-A, -B, -C, -DRB1 高分辨分型中 2 个或 2 个以上错配，其中 2 个抗原错配（7/8）；HLA-A, -B, -DRB1 高分辨分型中，1 个抗原错配（5/6），HLA-C 位点未知；HLA-A, -B, -C 低分辨，-DRB1 高分辨分型中，2 个或 2 个以上错配（<7/8）；HLA-A, -B, -C, -DRB1 低分辨分型中，1 个错配（7/8）；HLA-A, -B, -DRB1 高分辨，HLA-C 低分辨分型中，2 个或 2 个以上错配（<7/8）；HLA-A, -B, 低分辨、



-DRB1 高分辨分型中, 2 个或 2 个以上错配 ( $<5/6$ ), HLA-C 位点未知。

### 1.2 NMDP 对可接受供者的最低匹配要求

NMDP 初期采用血清学方法对供者做 HLA-A, -B, -DR 位点抗原分型, 要求鉴定到抗原分解物水平。可接受供者的最低匹配标准是和病人 6 个抗原中至少有 5 个抗原相同, 即要求至少 5/6 匹配。这个标准延续至今并未改变, 但是匹配的内涵已有所更新。现在要求采用 DNA 对 HLA-A, -B, -DRB1 基因做高分辨分型。高分辨分型的定义是鉴定 HLA-I 类基因外显子 2 和外显子 3, HLA-II 类基因外显子 2 的碱基序列差异所决定的等位基因。2005 年, NMDP 要求增加 HLA-C 位点分型。最近研究表明, 匹配程度高于最低标准, 比如增加 HLA-C, -DP, -DQ 等位点高分辨分型匹配, 可以改进移植效果。

### 1.3 NMDP 对最佳匹配供者的要求

NMDP 建议对病人和潜在的匹配供者做 HLA-A, -B, -C, -DRB1 位点高分辨分型, 首先寻找此 4 个位点高分辨分型完全匹配的供者。但是 NMDP 也指出, 如果没有这样的完全匹配供者, 并不意味着是移植禁忌。在错配不可避免的情况下, 应该寻找单独一个 HLA-A, -B, -C, -DRB1 错配的供者。HLA-DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQB1, -DPB1 位点匹配的重要性尚未完全评估, 但是在检索时需要考虑。HLA-DRA, -DQA1, -DPA1 位点无需匹配, 检索时也不必考虑。

### 1.4 等位基因完全匹配移植有较高成功率

2007 年 Lee 等对 NMDP 的 3857 例移植供受者, 做 HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPB1, -DPA1 等 8 个位点上的高分辨分型。病人 5 年存活率, 在供受对 HLA-A, -B, -C, -DRB1 位点 8/8 匹配病人中为 37%, 7/8 匹配病人中为 29%, 6/8 匹配病人中为 22%。

### 1.5 HLA-C 位点匹配的重要性

2004 年发表的一份研究报告注意到在白种人中, HLA-C 位点错配对移植有负面效果。该文章将 666 例 HLA-C 位点低分辨错配的无关供者移植, 和 1125 例 HLA-C 完全匹配移植进行比较, 发现前者死亡率显著升高 (相对危险 1.21,  $P=0.007$ )。在另一份 111 例移植病人的调查中, 78 例为 HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 位点 10/10 匹配, 33 例在 C 位点上有 1 个或 1 个以上的抗原或等位基因错配。这 2 组病人的 2 年移植存活率, 分别为 51% 和 30%, 有显著差异 ( $P=0.008$ ); 移植相关的死亡率分别为 16% 和 48%, 也有显著差异 ( $P=0.0001$ ); 累积复发率分别为 55% 和 35% ( $P=0.09$ ), 无显著差异。日本学者在 2007 年发表的资料中, 采用了 HLA 高分辨基因分型, 回顾性分析了 5210 例移植病例, 鉴定出 7 个 HLA-C 位点等位基因的“不容许错配组合”。带有该组合的移植病人发生急性 GVHD 风险显著升高, 死亡率也有所升高, 提示在日本人中 HLA-C 位点错配对移植效果有影响。

### 1.6 HLA-DQB1, -DPB1 位点的作用

在 NMDP 资料中, 未观察到 HLA-DQB1 错配像其他 HLA-A, -B, -C, -DRB1 等 4 个位点错配的负面作用。但是在某些疾病或是与其他位点同时错配, DQB1 匹配可能是重要的。最近资料表明 HLA-DPB1 是个经典的移植基因, DPB1 错配增加急性 GVHD 的风险, 但是由于移植物抗白血病作用 (GVL) 而减少复发率, 故不影响存活率, 在死亡率中亦不重要。

## 2 使用 HLA 不完全匹配供者的移植

在临床造血干细胞移植实践中，采用 HLA 不完全匹配无关供者不是移植禁忌，而且实际上是不可避免的。对大量移植病人观察发现，一部分采用 HLA 部分匹配或错配供者的病人得以存活，提示可能存在“可容许错配抗原”或“可容许错配基因”。鉴定供受者之间可允许的 HLA 错配组合，阐明其机理，从而改善移植效果，是目前研究重点之一。

### 2.1 使用不完全匹配供者移植的数量

在美国 NMDP 和国际血液和骨髓移植研究中心 (CIBMTR) 报告的 14797 例无关供者移植病人中，HLA-A, -B, -C, -DRB1 位点上 6/6 或 8/8 相同的有 9385 例 (64%)；5/6 相同或 7/8 相同的 3733 例 (25%)；小于 5/6 或 7/8 的 1679 例 (11%)。因此大约近 40% 的病人采用不完全匹配供者。另一份报告统计了美国 NMDP 在 2000 到 2005 年之间的 7486 例移植，HLA 完全匹配者 4329 例 (58%)，部分匹配者 2192 例 (29%)，错配者 965 例 (13%)。其中使用完全匹配供者的比例，由 2000 到 2001 年间的 44%，提高到 2004 到 2005 年间的 66%。在 4050 例日本无关供者移植病人中，972 例 (24%) 与供者在 HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 位点上 12/12 等位基因相；3078 例 (76%) 为 HLA 错配。

### 2.2 错配程度和移植病人存活率的关系

在 Lee 等报告的 3857 例病例中，HLA 高分辨错配移植发生急性 GVHD 机会显著升高，存活率显著降低。假如 8/8 匹配病人存活率为 1，1 个错配 (7/8) 存活率下降相对风险 (RR) 为 1.26；2 个错配 (6/8) RR 为 1.66；3 个错配 (5/8) RR 为 1.64；4 个错配 (4/8) RR 为 2.05。而且还发现在白人受者中，HLA-A, 或-B 错配，显著增加发生急性 GVHD 的危险；HLA-A, -C 和-DRB1 位点错配与移植相关死亡率，以及总死亡率与相关；而 HLA-DQB1 错配是可以允许的。

### 2.3 “可容许错配组合”和“不容许错配组合”

日本学者对 5210 例移植病例比较了供受者 HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 等 6 个位点上等位基因匹配程度，与发生急性 GVHD 之间的关系。假如等位基因 12/12 完全匹配病人发生急性 GVHD 的危险率 (HR) 为 1，在供者是 HLA-A\*0201，受者是 A\*0206 的组合中，发生急性 GVHD 的相对危险是 1.23，但是无显著性差异 ( $P=0.223$ )，这个组合被定义为“可容许错配组合”；但是反过来，在供者为 A\*0206，受者为 A\*0201 的组合中，发生急性 GVHD 的相对危险为 1.78，显著性升高 ( $P<0.001$ )，该组合被定义为高危险“不容许错配组合”。再如供受者为 A\*0206 和 A\*0207 的组合， $HR=3.45$  ( $P<0.001$ )，属于“不容许错配组合”；反之供受者为 A\*0207 和 A\*0206 的组合， $HR=0.71$ ，无显著性差异 ( $P=0.57$ )，是“容许错配组合”。照此分析方法，他们检测出 4 个 A 位点，1 个 B 位点，7 个 C 位点，1 个 DRB1 位点，2 个 DPB1 位点，以及 1 个 DRB1-DQB1 单体型等 16 个“不容许错配组合”。

## 3 使用无关脐血的移植

在骨髓库中寻找不到合适供者时，可以考虑使用无关脐带血。采用脐带血的优点是 HLA 匹配程度要求较低，一旦找到合适脐带血可以马上移植；缺点是造血干细胞的剂量受到限制。在目前已进行的脐带血移植中，主要是儿童病例。其中小部分采用 HLA 完全匹配脐带血，绝大部分采用 1 到 2 个抗原错配的脐带血。

### 3.1 选择 HLA 匹配无关脐带血的标准

和使用无关供者骨髓或外周造血干细胞的移植相比，使用无关脐带血达到造血干细胞植活标准所需要的时间较长，总体植活概率也较低。除了和移植的细胞剂量有关外，还和 HLA 匹配程度相关。采用 HLA 不完全匹配脐带血，发生急性 GVHD 的机会升高，移植存活率下降。NMDP 推荐的选择脐带血的标准为：在 HLA-A, -B 位点抗原和 HLA-DRB1 位点等位基因中，等于或大于 4/6 匹配的脐带血可接受移植。HLA-C 和-DQ 位点匹配对移植影响目前尚不明了。在一项研究中，评估了 122 例脐带血移植的高分辨分型的匹配情况，发现 HLA 等位基因错配和移植效果之间，无统计学意义的关联。

### 3.2 使用 2 份 HLA 部分匹配的无关脐血

在成人使用脐带血的移植中，单独使用 1 份脐带血与移植相关死亡率升高相关，主要是由于移植物的植活期较长而发生感染。为了突破细胞剂量限制的瓶颈，Barker 等采用 2 份 HLA-A, -B, -DRB1 部分匹配的脐带血移植，结果表明该方法安全，有助于提高植活率。使用无关脐带血，结合 RIC (Reduced intensity conditioning) 处理，可以提高移植效果。Ballen 等对中位数年龄为 49 岁的 21 例病人，RIC 临床处理后采用 4/6 或更高匹配的脐带血移植，1 年存活率达到 67%。Majbal 等分析了 43 例年龄在 55 岁以上，RIC 处理后接受 2 个单位脐带血病人，其中 93% 移植 1 到 2 个错配的脐带血；对照组为 47 例接受 6/6 匹配的相关供者的移植病人。两组病人在 3 年存活率，急性和慢性 GVHD 的发生，以及植活率等方面均无显著性差异。

## 4 选择 HLA 匹配无关供者的检索工具

现在全球造血干细胞无关供者已超过 1200 万人，他们的 HLA 分型层次和表示方法各异。随着 HLA 等位基因数量和供者数量不断增加，为便于快速检索到 HLA 匹配供者，国际学术组织对 HLA 分型结果采用一些特殊的表示方法，衍生出 CWD 等位基因，检索决定簇 SD 等名词，并建立了“HLA 字典”。2006 年 5 月，中华骨髓库与美国骨髓库签订合作协议，将在相互检索、技术交流、加强信息联系等方面进行合作。熟悉掌握以下专业名词的含义，以及相关符号之间的对应关系，将有助于我国医务人员参与国际检索。

### 4.1 CWD 等位基因和基因分型报告

严格说高分辨分型应该只有一种结果，但是采用目前技术，不可避免地会出现分型结果模棱两可的情况。比如高分辨分型结果可能是 B\*3501, B\*4901 组合，也可能是 B\*5001, B\*5301 组合。此时该如何提供临床高分辨分型报告？是否需要继续“细分”？为此美国组织相容性和免疫遗传学协会 (ASHI) 制定了 CWD (common and well-documented) 和罕见等位基因标准。规定可接受的高分辨分型报告只含有一个或两个 CWD 等位基因。ASHI 所定义的常见等位基因是指基因频率等于或大于 0.001，即在 1500 人的群体中，至少观察到 3 或 3 例以上；Well-documented 等位基因是指虽然无可靠的基因频率资料，但是在不同的实验室中至少观察到 3 例；罕见等位基因是指迄今只有一例报告。2007 年 ASHI 在 1782 个 HLA-A, B, DRB1 等位基因中，确定了 518 (29%) 个为 CWD 等位基因。

按照 ASHI 标准，分型结果报告为 (B\*3501, B\*4601) 或 (B3562, B\*4608) 是可以接受的。但是在出具临床 HLA 分型报告时必须注明“基因型 (B\*3501, B\*4601) 可能性比 (B3562, B\*4608)

至少高 1000 倍”。分型报告 (B\*0705, B\*1502) 或 (B\*0706, B\*1502) 也是可以接受的结果的。因为两种组合都带有相同的 B\*1502, 而 B\*0705 和 B\*0706 在外显子 2, 3 具有相同序列, 只是在外显子 5 区域碱基序列有差异。在出具临床 HLA 分型报告时必须注明“此两等位基因在位于细胞穿透膜区域的 281 位置上有一个氨基酸不同, 此差异与免疫原性相关甚微”。ASHI 的 HLA 高分辨分型报告优点之一是提供了移植免疫学方面的信息, 有助于临床医生在多例潜在的无关供者中选择最佳者。

#### 4.2 整合 HLA 表型的检索决定簇 SD

全球骨髓库现存资料中, 供者 HLA 表型的表达形式众多。有血清学的宽特异性和窄特异性, 有基因分型的低分辨、中分辨、和高分辨等。如何在不同形式的表型资料中, 快速初筛出匹配供者是个实际问题。美国 NMDP 在 2004 建立了 HLA 等位基因和血清学特异性检索决定簇 SD (Search Determinants), 将各种不同的 HLA 表示形式整合成单一的 SD, 极大地提高了检索效率。指定 SD 的基本原则是将所有形式的表型, 转换成血清学窄特异性。中华骨髓库要求 HLA 的 DNA 分型结果必须指定相应血清学窄特异性, 和美国 NMDP 的 SD 具有类似功能。

#### 4.3 HLA 字典:

在移植排斥反应中, 免疫系统识别的是免疫活性细胞表面上的 HLA 抗原, 而不是编码 HLA 抗原的 DNA。因此使用 DNA 检测出的 HLA 基因多态性不能完全代表 HLA 抗原多态性。实际上许多等位基因的产物具有相同的抗原特异性。比如在目前检测出的 134 个 HLA-A\*02 等位基因中, 除 10 个是不表达的无效基因外, 121 个等位基因对应的血清学特异性都是 A2, 1 个对应 A201, 1 个对应 A203, 还有一个未定。为建立 HLA 等位基因与血清学鉴定的 HLA 抗原之间的对等关系, 由 HLA 因子 WHO 命名委员会, 美国加州大学 UCLA 国际细胞交流计划, 美国 NMDP, 世界骨髓供者协会 (WMDA) 等国际组织合作制定 HLA 字典, 目前更新到第 5 版。该字典将 DNA 提供的信息转换为免疫学上的意义, 在选择最佳匹配无关供者中是个有用的工具。

#### 参考文献

- [1] Weisdorf D, Spellman S, Haagenson M, et al. Classification of HLA-Matching for retrospective analysis of unrelated donor transplantation: revised definitions to predict survival. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, 14: 748-758
- [2] Bray RA, Hurley CK, Kamani NR, et al., National Marrow Donor Program HLA matching guidelines for unrelated marrow transplants. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, 14: 45-53
- [3] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplant. *Blood* 2007, 110: 4576-4583
- [4] Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, et al. Impact of HLA class I and class II high resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplant outcome. *Blood*, 2004, 100: 1923-1930
- [5] Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft versus host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood*, 2007, 110: 2235-2241
- [6] Kamani K, Spellman S, Hurley CK, et al. State of the art review: HLA matching and outcome of unrelated donor umbilical cord blood transplants, *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, 14: 1-6

- [7] Cano P, Klitz W, Mack SJ, et al. Common and well-documented HLA alleles. *Hum Immunol*, 2007, 68: 392-417
- [8] Hurley CK, Setterholm M, Lau M, et al. Hematopoietic stem cell donor registry strategies for assigning search determinants and matching relationships. *Bone Marrow Transplant*, 2004, 33: 443-450
- [9] Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SGE, et al. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens*, 2009, 73: 95-170
- [10] 赵桐茂. 造血干细胞移植中无关供者的选择. *中国输血杂志*, 2009年, 第4期(待发表)

## 1-6

### Unrelated Marrow and PBSC Donation: The Experience of the National Marrow Donor Program

*John P Miller, M.D., Ph.D.*

This session will discuss the National Marrow Donor Program (NMDP) experience with bone marrow and peripheral blood stem cell (PBSC) donation for unrelated hematopoietic cell transplantation (HCT). NMDP has been collecting bone marrow since 1987 and PBSCs for primary transplantation since 1999 and to date over 35,000 products have been collected and provided for transplantation. Data will be presented on the magnitude and trends in cell source selection (PBSC vs. marrow vs. cord blood). Donor safety will be reviewed with a focus on short and long term adverse events associated with PBSC collection, which may be related to filgrastim administration, central line placement or the apheresis procedure. A brief overview of the adverse events related to bone marrow donation will be presented to allow participants to compare the acute and long term safety profiles of these two types of stem cell donation. The discussion will also address common questions and concerns that donors have related to filgrastim administration, including fertility issues and long term risks such as development of hematologic malignancy.

### 无关供者骨髓及外周血采集经验介绍

约翰·米勒

本文将介绍美国骨髓库 (NMDP) 非血缘骨髓及外周血干细胞移植供者的捐献经验。NMDP 从 1987 年开始采集骨髓, 1999 年开始采集外周血干细胞, 累计至今已经完成了超过 35000 例的采集和移植。本文将详细介绍造血干细胞来源的选择和比例的趋势 (外周血 vs 骨髓 vs 脐血)。本文将总结外周血造血干细胞的采集对无关供者的短期和长期的不良反应, 这些不良反应和动员剂的使用, 中心插管的位置和采集程序的关系。同时也会介绍骨髓采集中出现的各种不良反应, 以供参会

者比较两种采集方式的短期和长期的安全性。本文还会介绍一些关于供者对注者动员剂时比较常见的问题和担忧，包括生育问题和长期风险，如引发恶性血液病等。

1-7

## The World Marrow Donor Association (WMDA) : its role in the international community

*(Evelyne MARRY MD – WMDA board member/Secretary Europe/Africa – French unrelated donor stem cell Registry Director)*

The World Marrow Donor Association is an international organization created in 1994. Its goals are to gather all international stem cell donor Registries and cord blood Banks, in order to ensure the quality and availability of unrelated hematopoietic stem cells for all patients, the security and protection of all unrelated donors registered in the world, to issue recommendations and good practices in order to promote the use of unrelated stem cells for the benefits of all patients worldwide, and to monitor the number of stem cell collections and cord blood unit release activity at the international scale.

69 Registries and 47 Cord Blood Banks, in 41 different countries are now part of this network. 3157 bone marrow donations, 6327 peripheral blood stem cell donations and 2743 cord blood unit releases have been facilitated in 2007, allowing the exchange of 4928 grafts within European countries, 1991 grafts within Asian countries and 2276 grafts within North America.

Through its various working groups and committees, the WMDA facilitates the exchange of experience and knowledge in the field of unrelated hematopoietic stem cell donation and transplantation, contributes via its large and worldwide represented membership to a better and constantly updated communication and promotes a pro-active international collaboration based on permanent evolution of Quality standards.

Being a member of the World Marrow Donor Association is the best way, for any Registry, to be and to stay part of the international community and to give a better chance to any patient in the world to receive the best source of unrelated stem cells, with respect to their various genetic origins.

## 世界骨髓捐赠者协会 (WMDA)：它在国际合作中的角色

伊芙琳·玛丽

博士—WMDA 董事会成员/欧洲区秘书/法国骨髓库主任

世界骨髓捐赠者协会作为一个国际组织成立于 1994 年。它成立的目的是汇集国际上所有的干细胞库和脐带血库的资源，以确保为患者提供质量可靠且可用的非血缘关系造血干细胞；保护在全世界的无关供者；提出建议和好的事例以促进全世界患者对无关造血干细胞的使用，指导国际范围

内的干细胞采集和脐带血移植。

来自 41 个不同国家的 69 家干细胞库和 47 家脐带血库是世界骨髓捐献协会的成员。2007 年，共有 3157 例骨髓移植、6327 例外周血干细胞移植和 2743 例脐带血移植。欧洲地区相互交换造血干细胞 4928 例，亚洲地区 1991 例，北美地区 2276 例。

通过其不同的工作组和委员会，世界骨髓捐赠者协会可以推动在非血缘造血干细胞移植领域相关知识的传播和经验的交流；基于质量标准的长期发展，促进其庞大的成员队伍建立积极主动的长期交流与合作机制。

对于任何一家骨髓库而言，保持国际联系及在世界范围内选择最适无关供者的最好方法就是加入世界骨髓库。

## 1-8

# HLA 配型相异干细胞移植进展

徐胡蜀山

### A. 影响干细胞移植成功最主要因素

#### B. 不同干细胞捐赠者来源

1. HLA 抗原配对完全相合的兄弟姐妹（10/10 相合）
2. HLA 抗原配对部分相合的亲属（5-9/10 相合）
3. HLA 抗原表现型完全相合的非血缘捐赠者（10/10 相合）
4. HLA 抗原表现型部分相合的非血缘捐赠者（7-9/10 相合）
5. HLA 抗原表现型完全或部分相合的脐带血（3-6/6 相合）

#### C. 选择 HLA 配型相异捐赠者原则

1. permissive mismatch
2. non permissive mismatch

#### D. 各类 HLA 抗原配对相异干细胞移植成功率之比较及结论

1-9

## 非血缘造血干细胞动员、采集和检测中的问题与对策

童春容

### CMDP PBSC CD34+绝对值计数指南 说明

### CMDP制定 PBSC CD34+绝对值计数指南 的依据与过程

- 接受CMDP领导的委托
- 参考国际多个组织机构的指南
- 了解国内采集医院实验室的状况
- 征询国内及国际有关专家的意见
- 几次修改

### CMDP制定 PBSC CD34+绝对值计数指南 的目的

- 尽量准确反映PBSC中的CD34+细胞数量，帮助临床工作
- 减少实验室之间的误差
- 与国际接轨

### 检测方法简介

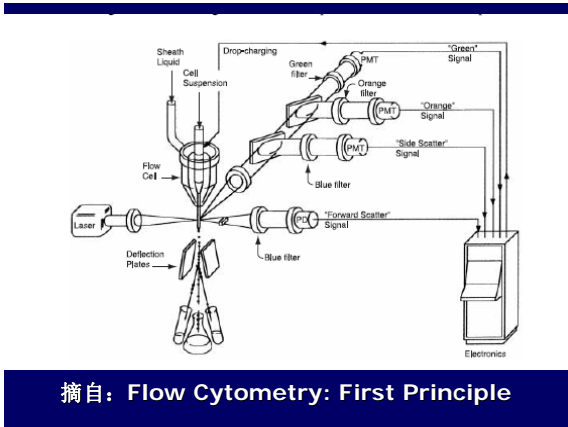
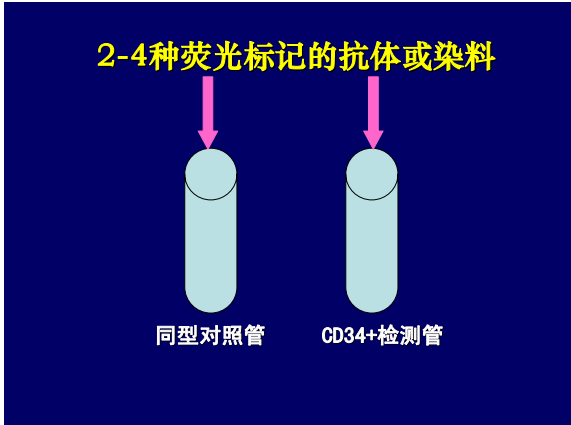
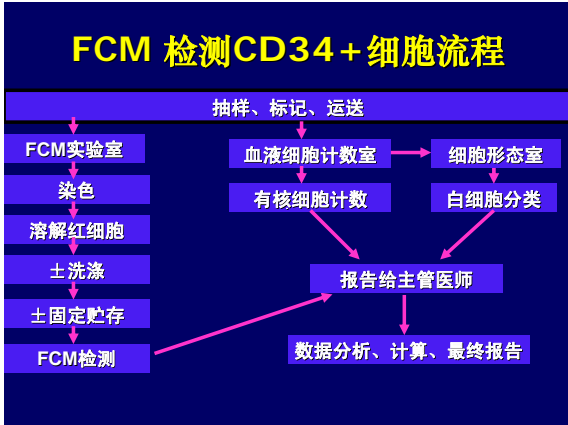
### CD34+细胞 绝对值计数检测方案

- 单平台：在抗体染色的细胞中等容量加入确定浓度的荧光微球，直接用FCM检测出采集物中的CD34+浓度，然后计算出采集物中的CD34+细胞总数
- 双平台：分别用FCM检测出CD34+细胞在有核细胞中的比例，用血液细胞计数仪检测出有核细胞浓度，在光镜下进行白细胞分类，然后再计算出采集物中CD34+细胞总数

### CD34+细胞 绝对值计数主要设门方案

- 单平台方案：
  - ISHAGE：国际血液与移植工程协会
  - ProCount：BD公司
  - Stem-Kit：Beckman-Coulter公司
- 双平台方案：
  - ISHAGE
  - Milan/Nadir：米兰/北欧
  - SIHON：德国血液肿瘤免疫分型基金会
  - Bender：



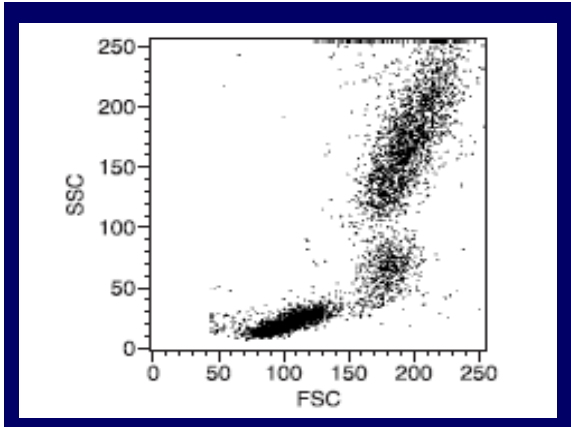


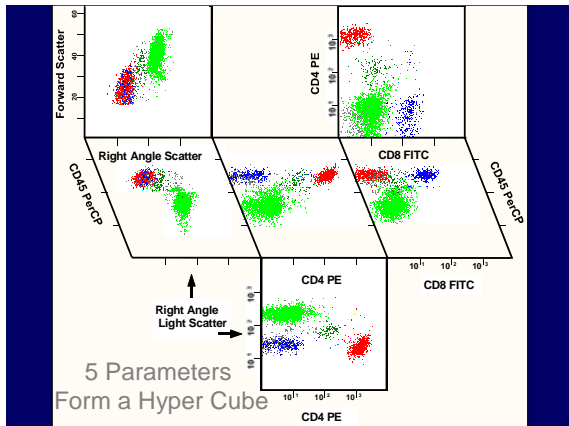
### FCM的构造

- 流动室与液流驱动系统
  - 石英玻璃: 透光, 单孔在中心, 供单个细胞通过
  - 鞘液: 真空泵的压力促使鞘液与细胞流按一恒定的压力通过流动室
  - 细胞流: 样本流速增高时, 可能会造成误差, 因此检测分辨率要求高的样本, 如DNA时, 应选用低速
- 激光光源与光束形成系统: 激光、透镜聚焦
- 光学系统: 透镜、滤光片、小孔, 发射光的通过、吸收
- 信号检测与分析: 荧光信号的线性、对数、面积、宽度测量, 光谱重叠的校正(补偿)
- 数据的贮存、显示与分析

### FCM检测的参数

- FSC: 细胞大小
- SSC: 细胞内颗粒多少及细胞内构造的复杂性
- FL1
- FL2
- FL3
- FL4





## CD34+ 细胞在FCM的特点

- CD34弱阳性至强阳性
- CD45弱阳性
- FSC与淋巴细胞相同或更大
- SSC与淋巴细胞相同或略大

## 国际一些组织对CD34+ 细胞绝对值计数的一些研究结果

### CD34+ 绝对值检测的研究

比利时、荷兰、卢森堡三国联盟

Wilfried H.B.M. Levering, Cytometry, 2007, 72B-178

1996年开始该联盟建立了CD34+细胞绝对值计数室间质控方案，共56个实验室参与。今年5月，他们报告了九年(96-04)的经验与结果。从2000年工作组开始推荐采用ISHAGE的单平台方案

### CD34+ 绝对值检测室间质控方法

比利时、荷兰、卢森堡

- 质控物稳定剂
  - 短期: TransFix™: Cytomark, UK
  - StabliCyte™: BioErgonomics, MN
  - WAK: Bad Soden, Germany
  - Streck: Omaha, NE
  - 长期: Sheffield, UK, UK NEQAS
- 质控物一天内送到检测实验室，要求做3个平行检测管计算出室内差异
- 由新西兰的医学实验室质控基金会 (SKML) 的数据中心计算出室间质控结果

### CD34+ 绝对值检测质控研究参数

比利时、荷兰、卢森堡

- 实验室
- 实验室是否有工作组成员: WSN (德国干细胞实验室工作组) EBMT (欧洲血液骨髓移植工作组)
- 是否参加2000工作组: 单平台 ISHAGE方案
- 标本来源: PB, PBSC, CB
- 质控物稳定剂: 长期、短期
- 设门方案: ISHAGE、Milan/Milan/Nordic、Bender etc
- 检测平台: 单平台、双平台
- FCM仪器: BD, Beckman-Coulter等
- 血细胞计数仪: Technicon-Bayer, Sysmex, Beckman etc
- 荧光微球: TruCount, FlowCount etc
- CD34 Mab: HPCA-2, 581等
- CD34 Mab 标记荧光: FITC, PE
- 标本制备方法: LW, LNW, NLNW, MNC

### 9年来CD34+绝对值检测方案的变化 比利时、荷兰、卢森堡

	1996	2004
• Milan:	21%	5%
• Bender:	11%	11%
• SIHON:	55%	11%
• ISHAGE:	11%	55%
• Stem-Kit:	0%	11%
• ProCount:	0%	7%
• PE-CD34:	39%	95%
• 单平台:	5%	53%
• 单平台ISHAGE (参加2000年工作组者)		75%

### 9年来检测CD34+绝对值仪器的变化 比利时、荷兰、卢森堡

	1996	2004
• LNW:		增加
• FACScan:	68%	11%
• FACSCaliber:	5%	53%
• FACStar:	13%	5%
• Epics XL™:	8%	34%
• Ortho:	11%	0%
• Technicon-Bayer:	21%	5%
• Beckman-Coulter:	26%	16%
• Sysmex	21%	16%
• Abbott	3%	8%

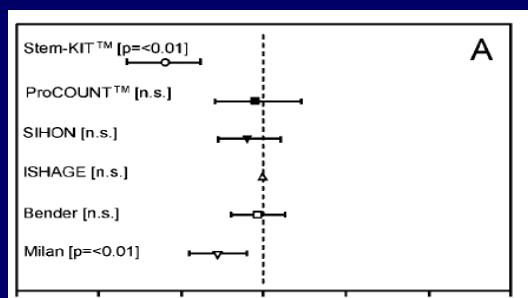
### CD34+绝对值检测试剂的调查 比利时、荷兰、卢森堡

	使用的实验室
定量荧光微球:	
• TruCount, BD	3-11%
• FlowCount, Beckman Coulter	3-18%
• Perfect Count, Cytognos	3%
• 其它	3-20%
• 容积法	2-3%
• CD34 Mab克隆	
• HPCA-2, BD	76-93%
• 581, Beckman-Coulter	其次

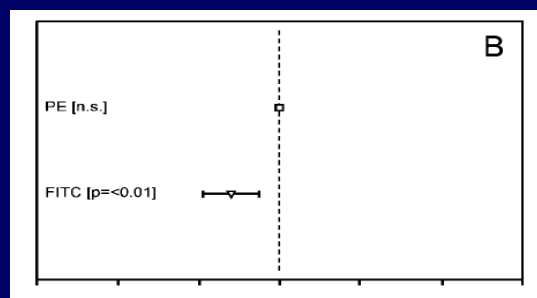
### 影响CD34+绝对值结果的主要因素 比利时、荷兰、卢森堡

- 设门方案
- 实验室
- CD34 Mab的荧光标记
- 流式细胞仪
- 标本制备方式

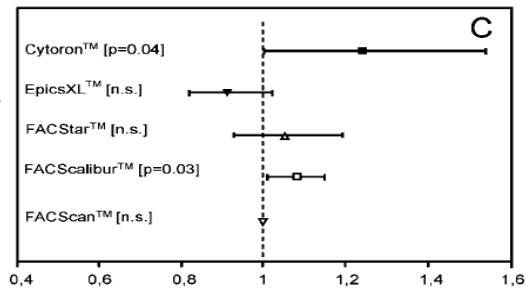
### 设门方案对CD34+绝对值的影响 (比利时、荷兰、卢森堡)



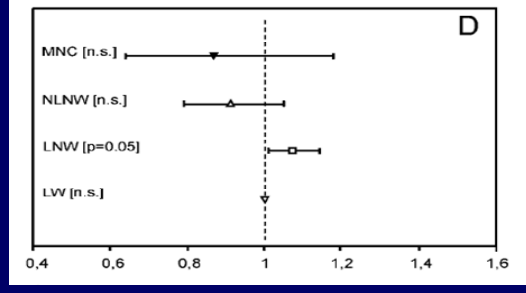
### 荧光标记对CD34+绝对值的影响 (比利时、荷兰、卢森堡)



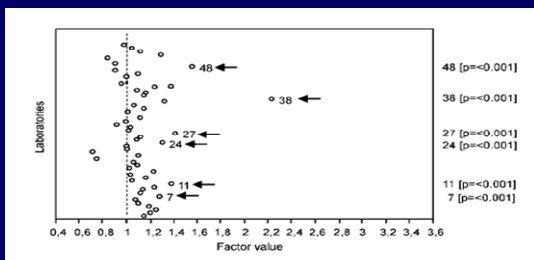
### FCM对CD34+绝对值的影响 (比利时、荷兰、卢森堡)



### 标本制备对CD34+绝对值的影响 (比利时、荷兰、卢森堡)



### 不同实验室检测对CD34+的影响 (比利时、荷兰、卢森堡)



参加室内质控少, 采用非标准设门的实验室与标准结果差异较大

### 影响CD34+绝对值变异性的主要因素 比利时、荷兰、卢森堡

- 检测平台: 双平台的变异性明显比单平台大
- 实验室: 有EBMT或WSN会员专家的实验室检测变异性明显比无会员的实验室小
- 工作小组: 采用统一的标准可减小检测的变异性

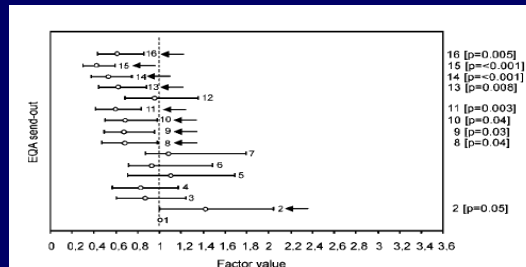
### 单平台vs双平台 检测CD34+的变异性 (比利时、荷兰、卢森堡)

Table 4  
Multivariate Analysis of Factors Influencing Variability of Absolute CD34<sup>+</sup> Cell Count Results

Variable (overall P)	Category	P-value
Platform methodology (<0.01)	Single platform	n.s.
	Dual platform	0.01
Laboratory (<0.01)	n.a.	

Only categorical variables with significant effects are shown. n.a., not applicable; n.s., not significant.

### 工作小组的标准化对CD34+绝对值变异性的影响 比利时、荷兰、卢森堡



## 不同实验室检测CD34+的变异性 (比利时、荷兰、卢森堡)

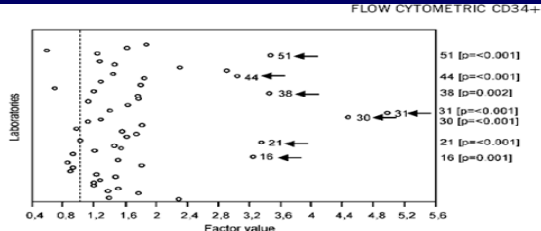


Fig. 4. Analysis of the variability of CD34<sup>+</sup> cell enumeration. Unique laboratory number. Factor value = 1 for laboratory no. 22 which had no missing data ("benchmark"). The factor value mirrors the relative difference of the other categories related to the category with factor value = 1. P-values are shown between brackets for laboratories with significantly higher variability than the benchmark laboratory.

## CMDP CD34+细胞 绝对值检测指南推荐方法及注意事项

推荐采用ISHAGE设门方案，尽可能用单平台ISHAGE检测方案，也可以采用双平台方案

## 样本的采集、标记、运送、保存

- 一旦PBSC采集完成，立即抽样，抽样前要将采集袋中的PBSC采集物与小瓣中的采集物混合5次以上，再封闭小瓣，剪取小瓣中的采集物，在小瓣上标记供者编号、姓名及标本名称。送实验室检测。
- 实验室接到样本后，立即进行染色，以检测CD34+或/和有核细胞计数、白细胞分类。采集至染色的时间不得超过12小时。对不能立即染色的标本，应置于2-8℃避光保存。

## 采集物的有核细胞计数

1. 采用全自动分析仪来检测有核细胞计数。
4. 在振荡器上充分混匀后抽样。
5. 用配套的细胞稀释液将采集物分别稀释2倍、10倍。
6. 再次在振荡器上充分混匀后上机检测。
7. 将2、10倍稀释后的样本的平均值作为最终报告数值。

## CD34+细胞检测试剂

1. 抗体：使用临床诊断用抗体，选用PE-CD34鼠抗人单抗，BD公司的HPCA-2克隆、或Beckman-Coulter公司的581克隆。FITC-CD45鼠抗人抗体选用可识别3种CD45抗原的共同抗体。CD34的同型对照抗体选用同一公司同一荧光标记的同一亚型的Ig抗体。置2-8℃冰箱避光保存，在有效期内使用。
2. 红细胞裂解液：选用相应抗体生产厂家配套的红细胞裂解液，经有关部门批准为临床诊断用试剂。按试剂生产厂家的要求保存和使用。使用当天稀释为工作液使用。
3. PBS：稀释或洗涤细胞用的PBS的PH为7.4，配置成含1%的白蛋白及0.1%的叠氮钠的工作液后，置2-8℃冰箱，一周内使用。

## 染色(1)

1. 对每份标本设立2个平行检测管，即1个同型对照(Ig-PE/CD45-FITC)及两个CD34检测管(CD34-PE/CD45-FITC)。
2. 用含1%白蛋白及0.1%叠氮钠的PBS调节采集物细胞浓度为 $1-2 \times 10^{10}/L$ 。每只试管加细胞 $5-10 \times 10^5$ 。
3. 按试剂生产厂家的要求加入适量抗体、混匀。
4. 如用单平台检测，精确将样本及试剂加入试管底部，不得残留在试管内壁，如有残留，用棉签拭去。加样本、抗体及荧光微球为同一加样器。

## 染色(2)

5. 染色一般在2-8℃条件30分钟，20-25℃室温10分钟，避光。
6. 染色后用红细胞裂解液10分钟溶解红细胞。
7. 溶解红细胞后可用含1%的白蛋白及0.1%的叠氮钠的PBS洗涤细胞1次后再检测，也可不洗涤后再检测。

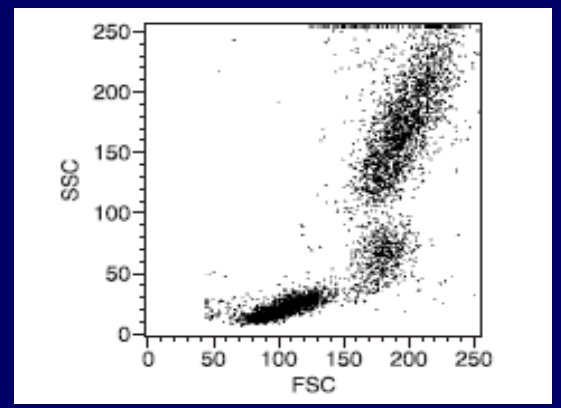
**推荐采用只溶解不洗涤的方法。**

## 细胞的收集(1)

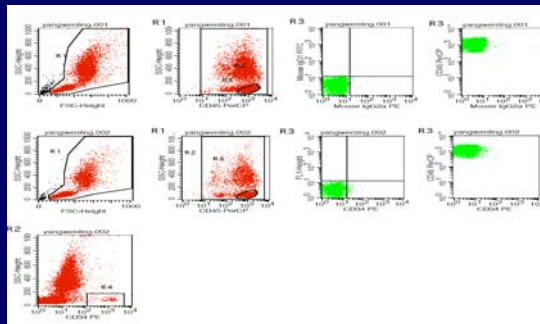
1. 使用校正微球设定光电倍增管(PMT)电压，调节荧光补偿，并检测仪器灵敏度。
2. 打开FSC/SSC点图、FL1/FL2点图、FL1/SSC点图、FL2/SSC点图获取窗口。先用对照管优化条件，调整各参数PMT电压。
3. 换为CD34测定管，调节FL1/FL2的荧光补偿。在CD45-FITC/SSC点图中围绕CD45+细胞(白细胞)画一个大的长方形，定义为R1。CD45-FITC/CD34 PE点图中画R2区，包括所有CD34+细胞，不要丢掉CD34弱阳性细胞。检查R1，确定没有丢掉CD45弱表达的CD34+细胞，必要时可以调整R1。高速获取R1内至少80000个细胞及CD34+细胞至少100个细胞。
4. 同样方法获取对照管细胞至少60000个。
5. 对照管与检测管细胞的收集条件须一致。

## 细胞的收集(2)

6. 如为单平台方案，上机检测前，取出已知浓度的荧光微球(如Beckman-Coulter的FlowCount，BD公司的TruCount等)振荡20秒后，加入100ul(与加入的细胞溶液等量)至检测试管中，再振荡5秒上机检测。
7. 如为单平台方案，至少收集75000个细胞及2500个荧光微球，FSC参数不要用threshold去除细胞。收集速度须均匀一致。
8. 对同一试管的细胞最好收集存两份文件，有助于了解仪器的稳定性。
9. 存贮的文件最好有2个备份。



## 细胞的收集(3)



## 细胞的收集(4)

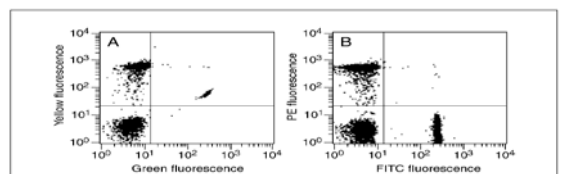
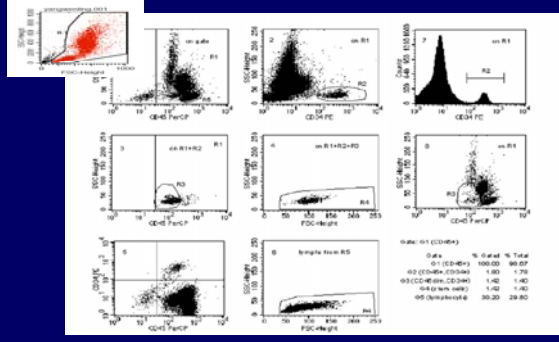


Figure 1.3.7 Example of spectral overlap with FITC- and PE-stained beads. Three populations are shown in each dot plot: unstained beads, FITC-stained beads, and PE-stained beads, with unstained beads appearing in the lower left quadrant. (A) Uncompensated data with FITC-stained beads in the upper right quadrant with about 300 units of green fluorescence and 80 units of yellow fluorescence. PE-stained beads are in the upper left quadrant with about 8 units of green fluorescence and 800 units of yellow fluorescence. Unstained beads have about 6 units of green and 5 units of yellow fluorescence. (B) Same data after compensating for spectral overlap to make the dot-plot axes represent fluorescence from a specific fluorochrome rather than a color of fluorescence signal. Note that the FITC-stained beads in the lower right quadrant of B have the same mean "PE" fluorescence as the unstained beads, and the PE-stained beads in the upper left quadrant have the same amount of "FITC" fluorescence as unstained beads. FITC beads have no more PE signal than unstained beads, and PE beads have no more FITC signal than unstained beads.

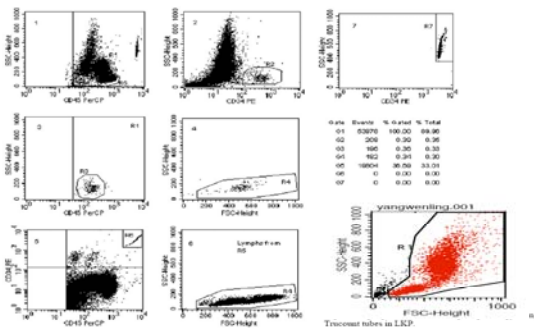
### 结果分析-ISHAGE双平台方案



### ISHAGE双平台方案 采集物中CD34+绝对值的计算

1. FCM检测试管CD34+(%) - 同型对照管CD34+(%) = CD34+细胞占采集物有核细胞中的百分比。两支平行测试管的均值为最终的CD34+(%)
2. 用全自动血液细胞分析仪检测2、10倍稀释的采集物的有核细胞浓度，再乘以稀释倍数，取其均值。同时用采集物涂片，姬姆萨染色，显微镜（1000倍）下进行白细胞分类，如存在有核红细胞，应从以上计数的有核细胞浓度中扣除，得采集物的有核细胞浓度。有核细胞浓度再乘以采集物容量即为采集的有核细胞总数（注意有核细胞浓度单位应和采集物容积单位一致）
3. CD34+细胞占有核细胞中的百分比 × 采集物有核细胞总数 = 采集物的CD34+细胞绝对值

### 结果分析-ISHAGE单平台方案



### ISHAGE单平台方案检测采集物 CD34+绝对值的计算

1. 检测管中CD34+细胞的绝对值（细胞数/ul）  
= 检测到的CD34+细胞总数 × 荧光微球浓度 / 检测到的荧光微球个数
2. 测试管的CD34+细胞浓度减去同型对照管的CD34+细胞浓度为CD34+细胞浓度。两支平行测试管的均值为最终的CD34+细胞浓度。
3. 以上浓度乘以样本稀释倍数及采集物总容量（注意浓度与容量单位一致），即得采集物中CD34+细胞总数。

### CD34+细胞绝对值计数 质量保证及质量控制

### 质量保证的环节

- 方案、SOP、规程的确认
- 质控
- 熟练性的测试
- 操作人员的培训与资格确认
- 监测与审查

### 在确定了检测方案、试剂、仪器等时可能引起结果误差的状况

- 样本：
  - 抽样
  - 标记
  - 保存温度
  - 检测时间
- 操作人员：
  - 技术差异
  - 处理认识问题的能力
  - 是否执行SOP
- 仪器设备：
  - 每天状况不同
  - 不同仪器
  - 不同实验室
- 试剂：
  - 不同批号
  - 荧光的漂白
  - 污染
  - 保存不当

### CD34+绝对值计数-对技术人员要求

- PBSC采集单位检测CD34+细胞绝对值的主要技术人员：
  - 须有一年以上相关工作经验
  - 经过仪器生产公司有关仪器操作、保养、维护、质控，软件使用等有关培训
  - 接受CMDP举办的非血缘供者PBSC中CD34+细胞绝对值检测指南培训。
  - 接受本单位有关的岗位职责、标准操作程序（SOP）、管理规程、理论知识等培训，并考试合格后方可进行有关的操作。

### CD34+绝对值计数-对单位要求

- PBSC采集单位须建立
  - 组织结构、岗位职责、检测有关的SOP、质量标准、管理规程与制度
- SOP、质量标准、管理规程的更改须经主要负责人批准后方可执行。
- 实验室须配备流式细胞仪等相关仪器
- 双平台中检测有核细胞技术的实验室、技术人员、仪器设备等须经国家临床检验室间质控评定合格者方可检测正式报告。

### CD34+绝对值计数-对操作的要求

- 操作人员严格遵守SOP、管理规程与制度
- 检测CD34+细胞绝对值中的任何操作须有2人参与。
- 任何操作均须有记录（用铅字笔）、2个操作者的签名。
- 任何SOP、规程、操作记录须由专人保管，记录的更改须签名及日期。

### 相关人员职责、培训内容（1）

- 全部操作人员均须培训生物安全守则，医源性垃圾管理规程。
- 抽样人员：PBSC抽样SOP
- 样本运送人员：PBSC样本运送中的注意事项
- 样本及试剂贮存人员：样本、试剂的特点及保存方法，保存环境的监测。
- 染色人员：染色的理论、SOP及质控规程，实验室常规操作技术，试剂质控及有效性判断，试剂的特点，保存方法及环境的监测。
- 细胞收集人员：FCM仪器的操作、维护、清洁、保养、校准、优化、质控等程序，质量要求，正确与异常质控结果的判定，细胞收集的SOP，软件使用方法，数据的贮存，仪器故障的处理等，有关的理论知识。

### 相关人员职责、培训内容(2)

- 数据分析与报告人员：以上染色与收集人员的全部职责与内容，CD34+细胞绝对值检测方案，结果的分析，结果准确性的判断，问题的分析与处理，报告及标准，PBSC、CD34+细胞等有关的理论知识。
- 小组组长：以上全部人员的职责、内容，质控、质量保证环节，行政管理
- 最终结果报告医生：CD34+细胞绝对值计算方法，CD34+细胞检测、血细胞计数、白细胞分类结果准确性的评估。



## 对仪器的要求

1. 用双平台方案的FCM至少能检测2个荧光参数，用单平台方案的FCM至少能测3个荧光参数。
2. 血液细胞计数仪须按仪器生产厂家的要求及提供的程序定期进行清洁、保养、维护、质控管理，每天用质控物检测合格后方可应用。还要注意不同仪器及配套试剂对样本抗凝剂的敏感性，可比较同一血样用不同抗凝剂后检测的误差。
3. 试剂及标本保存冰箱：温度控制在2-8℃，每天上下午各记录冰箱温度1次，在要求的范围内试剂方可使用。抗体须避光保存。
4. 离心机：洗涤细胞用，最好用低温离心机，离心细胞时选用4℃条件离心。
5. 以上仪器，尤其是FCM均须配置电源稳压器，以避免使用过程中电压不稳的干扰。

## FCM的主要技术指标

- **荧光测量的灵敏度**：是衡量仪器能检测微弱荧光信号的重要指标，以能检测到单个微球上最少标有FITC或PE荧光分子的数目来表示，一般均可达到<600个荧光分子
- **仪器的分辨率**：通常用变异系数来表示。用FCM来检测一群荧光强度及含量完全相等的样本，理想的CV应为0，但样本流速、光照、仪器等的误差，会造成一定的差异，一般最佳状态的CV<2%
- **FSC检测灵敏度**：目的FCM能检测到0.2-0.5um的颗粒
- **仪器的分析速度**：光速每秒可分析的细胞数，当细胞流光速超过FCM仪器的相应速度时，细胞的信号就会丢失。

## FCM的操作、维护、保养、校准

按仪器生产商的要求进行以下：

- 开、关机程序
- 每月清洗系统管路一次
- 鞘液过滤器每3-4月更换一次，如FSC噪音大及时更换
- 空气滤网脏时及时清洗
- 最好每天用标准微球来运行校准软件，保证检测的一致性。可测试仪器的设置及灵敏度；调节PMT电压；多激光时间延迟的校准，保证仪器同时处理不同激光器产生的信号。然后再用正常细胞优化以上校准结果。符合要求方可检测。

## 质控

- 试剂：如用新厂家的试剂或换新批号试剂，须与标准质控物或既往有效性肯定的试剂比较，确认其有效性后方可正式应用。
- FCM的质控：
  - 每次应用时检测：激光、光路校正，光散射、荧光的灵敏度，荧光补偿
  - 每月工程师检测：敏感性、线性（用不同数量荧光分子密度的微球测试）
- 每次染色CD34+检测设两份平行管，两份试管结果相差10%以上，提示操作误差太大。
- 检测有核细胞数时用2、10倍稀释检测，结果相差10%以上，提示操作误差太大。

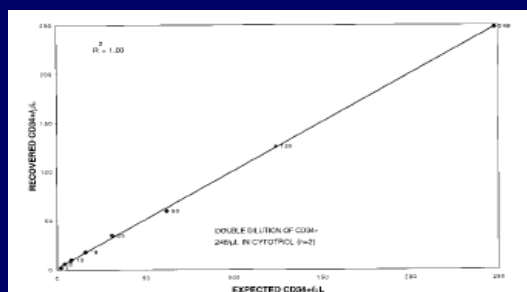


FIG. 3. Linearity of Stem-Trol control cells diluted with Cyto-Trol lyophilised cells over the range of 0-248/CD34+ cells/μL.

是否成立CMDP  
CD34+细胞绝对值计数工作  
组来建立室间质控方案？

谢谢！！

## 非血缘干细胞动员、采集与检测中的问题和对策

北京市道培医院

童春容 张子维

## 管理目标

- 安全性：确保供者无长期或不可逆的不良反应
- 有效性：CD34+细胞数是最根本的要求



## 保证安全性、有效性的环节

- 输入CD34+数与临床疗效
- CD34+ / 单个核细胞数的标准
- G-CSF的用量、方法及时间
- 动员过程中的不良反应及防治
- 采集时间及循环血液量
- 采集中的不良反应及防治
- 长期不良反应的追踪与研究

## CD34+细胞数与临床结果

- 很多研究显示，CD34+细胞数与植活成功率及植活的速度正相关，与恶性血液病复发及移植物被排斥负相关
- 不同疾病对CD34+细胞数要求不同，如AA需要更高；年龄大供者的干细胞增殖功能差，可能需要更多
- 大多数研究认为输入CD34+细胞 $\geq 4 \times 10^6/\text{kg}$ 对绝大多数患者是更安全的剂量
- 多份研究显示，输入CD34+细胞 $< 2 \times 10^6/\text{kg}$ 者死亡率高
- 我院及其它报告都显示：输入CD34+细胞 $< 2.5 \times 10^6/\text{kg}$ 者，植入延迟、感染并发症高、移植费用明显增加、移植物被排斥率高

## CD34+细胞数与临床结果

A Kessinger and JG Sharp

- 6例接受CD34+细胞 $< 1 \times 10^6/\text{kg}$ ，5例植活延迟
- 12例接受CD34+细胞 $< 1 \times 10^6/\text{kg}$ 者，增加输注供者骨髓细胞，仍然有11例患者植入延迟

**2008年北京道培医院患者  
接受CMDP URD的细胞量和临床结果**  
G-CSF 5ug/kg/d, 4-6d n=20

受者每kg体重细胞中位数（范围）

- CD34+: 3.48×10<sup>6</sup>/kg(1.94-9.38)
- MNC: 7.1×10<sup>8</sup>/kg(3-14.87)
- 2例延迟植入或被排斥（10%）：
  - 1例接受CD34+ 2.22 ×10<sup>6</sup>/kg, MNC 3×10<sup>8</sup>/kg
  - 1例接受CD34+ 2.02 ×10<sup>6</sup>/kg, MNC 5.61 ×10<sup>8</sup>/kg
- 同期本单位植活失败、延迟植入或被排斥的比率<1%

**2008年北京道培医院患者  
接受台湾慈济库URD的细胞量和临床结果**  
G-CSF 10ug/kg/d, 4-6d  
n=23

输入的细胞中位数（范围）

- CD34+: 7.78×10<sup>6</sup>/kg(2.73-18.4)
- 无一例植入失败、延迟植入、或被排斥

**CD34+ /单个核细胞数的采集标准  
CMDP**

- 目前执行的标准：
  - CD34+细胞≥2×10<sup>6</sup>/Kg(受者体重)
  - 或有核细胞(NC)≥5×10<sup>8</sup>/Kg(受者体重)
- 准备更改的标准
  - CD34+细胞≥3×10<sup>6</sup>/Kg(受者体重)
  - 及单个核细胞(MNC)≥5×10<sup>8</sup>/Kg(受者体重)

**CD34+ /单个核细胞数的采集标准  
NMDP, EBMT**

CD34+细胞≥4×10<sup>6</sup>/Kg(受者体重)

**G-CSF使用量**

- CMDP:
  - 目前: 5ug/Kg(受者体重) /d, 4-6d
  - 准备更改为: 7.5ug/Kg(受者体重) /d, 4-6d
- NMDP, EBMT: 10ug/Kg(受者体重) /d, 4-6d
- 台湾慈济骨髓库: 8-11ug/Kg(受者体重) /d, 4-6d

**影响CD34+ 细胞采集量的因素**

- G-CSF剂量与CD34+细胞数及不良反应正相关
- 每日G-CSF量分2次用比1次用采集量更高
- 多数研究示G-CSF D5-6时采集获得CD34+细胞比D4-5高
- 男性比女性高
- <38岁比≥38岁高
- 采集速度适中（50-60ml/分）比快速高
- G-CSF动员前PLT及MNC高者与采集量正相关
- 白人比其它人种差
- 静脉通道不顺者采集效果差

**北京道培医院采集  
CMDP URD 的细胞量**  
G-CSF 5ug/kg/d, 4-5d  
n=73

受者每kg体重细胞中位数（范围）

- CD34+: 4.28×10<sup>6</sup>/kg(1.2-12.9)  
<2 ×10<sup>6</sup>/kg 者5例 (7%)  
2008年后均> 2 ×10<sup>6</sup>/kg
- MNC: 6.33 ×10<sup>6</sup>/kg(3.7-13.69)

**G-CSF量与CD34+细胞采集量**  
DF Stroncek, J. Clin.Oncol., 1997, 15:1601  
美国, n=102

G-CSF量(5d)	5ug/kg	10ug/kg
CD34+采集 10 <sup>8</sup>	2.8±1.8× 10 <sup>8</sup>	4.7 ± 3.1 × 10 <sup>8</sup>

**影响CD34+细胞采集量的因素**

Vasu S, et al, J Clin Apher. 2008;23(6):171-7

G-CSF 10-16ug/kg/d, NIH n=639

- 正相关因素
  - G-CSF剂量
  - G-CSF前PLT或MNC的数量
- 负相关因素
  - 年龄
  - 白人
  - 女性

**影响非血缘供者CD34+细胞采集量的因素**

G-CSF 8.3-11ug/kg/d, 5-6d

Biol Blood Marrow Transplant. 08 Nov;14:13  
台湾慈济骨髓库, n=373

第1次采集<10×10<sup>6</sup> CD34+ 细胞/L（循环血量）占16.6%，为采集效果差的供者。多参数回归分析显示与以下因素有关：

- 女性
- 年龄大
- 采集速度过快
- 静脉穿刺不好

**影响非血缘供者CD34+细胞采集量的因素**

G-CSF 5-20ug/kg/d, 4d

Transfusion 2002, 42: 4 - 9

西班牙供者登记组, n=261

40%的供者采集CD34+细胞<4 × 10<sup>6</sup>。多参数分析显示与以下因素有关：

- 年龄>38岁
- G-CSF剂量

**G-CSF注射中不良反应发生的机制**

- 骨髓造血细胞迅速增加：多部位疼痛、胸闷
- 异体蛋白反应：流感样症状、过敏等
- 血白细胞升高引起的血管堵塞、血小板聚集功能增加高凝状态：血栓、栓塞、脾破裂
- 其它：恶心、便秘等

### 健康供者动员采集不良反应调查

- 最常见：多部位疼痛、疲乏；采集中低钙
- 较常见：流感样症状、恶心、失眠、头晕
- 少见：盗汗、浮肿
- 罕见：血栓、栓塞（心肌缺血、一过性脑缺血、失明等），脾破裂、虹膜炎、虹膜外层炎、急性痛风性关节炎、过敏反应、严重化脓感染

### G-CSF动员对血生化的影响

DF Stroncek, J. Clin.Oncol., 1997, 15:1601  
G-CSF 2-10ug/kg/d, 5d; 美国, n=102

- ALP升高
- LDH升高
- ALT升高
- 钠升高
- 糖降低
- 钾降低
- BIL降低
- BUN降低

### 健康供者动员采集不良反应调查

BMT, 2001, 27:689  
IBMTR, EBMT n=1488

- 无1例死亡
- 未见长期不可恢复的不良反应

### 健康供者长期不良反应调查

- Cavallaro 等追踪了95例PBSC供者，中位追踪时间43ms(35-73)，无1例发生白血病或MDS
- MD Anderson 癌症中心追踪了281例PBSC供者>3年，无一例发生恶性血液病

### G-CSF剂量与副作用

Monika E(Germany), J Clin Oncol. 1999, 17:2160

Table 2. Number of Allogeneic Donors With rhG-CSF-Induced Effects

	rhG-CSF Dose (µg/kg BW/d)			
	Group A (2 x 12)		Group B (1 x 10)	
	No.	%	No.	%
Bone pain*				
Mild	44	88	22	88
Moderate to severe	4	8	0	0
Prolonged bone pain (15 days)	1	2		
Headache*				
Grade 1-2	18	36	7	28
Grade 3	2	4		0
Combined bone pain + headache (World Health Organization grade 3)	1	2		0
Flu-like symptoms	10	20	4	16
WBC count increase < 60,000/µL	26	52	10	40
WBC count increase ≥ 60,000/µL and < 70,000/µL	12	24	9	36
WBC count increase ≥ 70,000/µL and < 80,000/µL	9	18	2	8
WBC count increase ≥ 80,000/µL	3	6	4	16
Platelet count ≥ 100,000/µL	9	18	6	24

\*World Health Organization criteria.

### 非血缘供者动员中的副作用

G-CSF 5ug/kg/d, 4-6d, 采集至少3次, 12L/次  
MR Bishop, J Clin Oncol. 1997, USA  
n=41

- 头、腰背、四肢、全身痛 100%
- 发热 27%
- 寒颤 22%

三次采集的CD34+数分别为：1.99, 2.52, 3.13 x 10<sup>6</sup>/kg

### 非血缘供者CD34+细胞采集量及不良反应

G-CSF 5ug/kg/d, 4-6d  
Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 07 15:348  
复旦大学华山医院, n=56

- 采集时间                      D4-5                      D5-6  
   3±1.1×10<sup>6</sup>/kg      7.9 ± 2.5×10<sup>6</sup>/kg
- 不良反应: <11度  
骨痛: 17.9%; 失眠:8.9%; 疲乏: 4.5%

### 非血缘供者动员后脾脏大小

Stroncek D, Transfusion. 2003, 43:609-13.  
G-CSF 10ug/kg/d, d5采集, n=20

- B超观察脾脏长度(平均cm) 19/20 在动员后脾脏增大
- G-CSF前                      采集时                      采集后3-4天  
10.9 ±2.0                      12.3 ± 2.1                      11.3 ± 1.8  
P<0.001

### 北京市道培医院 URD动员中的副作用(一)

G-CSF 5ug/kg/d, 4-5d, n=73

- 头、腰背、四肢、全身痛                      39 (54%)
- 疲乏    10 (14%)
- 失眠    4 (6%)
- 恶心    3 (5%)
- 发热    3 (5%)
- 食欲下降    2 (3%)                      均<=11度
- 心悸    1 (2%)
- 头晕    1 (2%)
- 鼻塞    1 (2%)
- 腹泻    1 (2%)
- 唇部疱疹    1 (2%)

### 采集PBSC的时间及循环血量

- 绝大多数研究显示, 在G-CSF后D5-6采集最好
- 每次采集至少循环供者血容量的2倍
- LVL可循环供者血容量的3-6倍
- CMDP规定每次循环量<15000ml

### 采集PBSC引起不良反应的机制

- 绝大多数为抗凝剂中和血钙引起的低钙, 这在年龄大的女性、户外活动少的供者容易出现: 如畏寒、麻木、抽搐等
- 进食少、G-CSF、再加体外循环血液引起的低血容量、低血糖、低血镁、钾
- 穿刺部位的疼痛, 紧张所致的晕针
- 采集丢失一定的红细胞、血小板, 这在有隐性缺铁、基础血小板在正常低线的供者容易出现临床表现。PLT降低一般在采集后1周恢复至正常

### 北京市道培医院 非血缘供者PBSC采集中的副作用 n=73

- 手足麻木    39 (54%)
- 唇部或面部麻木                                      10 (14%)
- 手抽搐    1 (2%)
- 血小板低于正常                                      27 (37%)  
43-98×10<sup>9</sup>/L
- 畏寒    高于以上各种麻木者

### D6采集PBSC后血小板的变化

J. Clin.Oncol., 1997, 15:1601

; 美国, n=102

- DF Stroncek, 1997, G-CSF 2-10ug/kg/d  
采集前 PLT  $250 \pm 42 \times 10^9/L$   
D5、D6 采集后降低  $32 \pm 13\%$
- MR Bishop, 1997, G-CSF 5ug/kg/d  
采集前 PLT  $242 \times 10^4/ml$   
D4、D5、D6 采集后分别为221、155、119

### 北京市道培医院 URD副作用的防治(一)

- 注射动员剂开始即住院, 需有陪护人员在旁, 以防过敏
- 给供者多个医生的电话, 一旦有任何不适, 立即通知
- 充分讲清楚注射动员剂中可能发生的一过性不良反应, 以及我们解决问题的信心和经验, 缓解供者的紧张情绪
- 给供者备止疼药、安眠药、抗过敏药
- 病房准备抢救车, 需有充分抗过敏的急救药品
- 嘱多饮水、适当活动
- 每天了解CBC, 如血 WBC  $> 70 \times 10^9/L$ , 提前采集PBSC, 并减少G-CSF量, 如仍  $> 70 \times 10^9/L$ , 停止G-CSF

### 北京市道培医院 URD副作用的防治措施

- 如果为女性供者, HB接近低线, MCV接近80或更低, 最好在本地增加检测血铁蛋白, 如低于正常, 嘱在当地开始补铁剂
- 如果为 >38岁的女性供者, 在当地开始口服钙+VitD; 并在注射动员剂的开始, 每天口服葡萄糖酸钙口服液 30ml/d
- 全部患者在采集前口服葡萄糖酸钙口服液20ml/d, 以后每循环1000ml, 口服10ml。如果采集中畏寒, 增加口服量。尽量减少静脉补钙。
- 建立良好的静脉采血通道;
- 如有血容量不足现象, 另建通道补液、钙或电解质
- 采集后密切监测PLT, 如下降明显, 应调整第2次循环血量

### 不适合URD的补充建议

由于一些罕见不良反应报告, 除了CMDP的标准, 建议以下供者不适合捐献PBSC

- CBC在正常低线水平
- 有血栓史者
- 有自身免疫性疾病
- 有慢性炎症性疾病史, 如眼部炎症
- 有恶性疾病
- 有血液病家族史者, 最好检查骨髓形态及染色体

### PBSC保存与运输的最佳温度

Antonenas V, 2006, *Cytotherapy* 158-165(8)

初始CD34+细胞  $7.7 \times 10^6 (0.7-30.3) / kg$  ul

贮存后CD34+活性损失

	2-8C°	18-24C°	37C°
24h	9.4%	21.9%	100%
48h	19.4%	30.7%	
72h	28%	43.3%	

### NC、MNC、CD34+细胞 检测的注意事项(详见规程)

对每个有关的细节都要有严格的SOP及质控管理, 如

- 抽样: 检测样本与采集袋中的样本要充分混匀
- 检测: 上机前要充分混匀
- 对检测的仪器设备及其清洁卫生、保养、校准等
- 试剂的选择、保存; 标本的保存
- 检测过程、结果分析
- 结果的审核与报告

## 第二部分 分组发言

### 分 库

#### 2-1

#### Bone Marrow Donors Worldwide 20 years: status and current practice

*Henk G.M. van der Zanden, MSc, Eurodonor Foundation and Leiden University Medical Centre, Leiden, Netherlands.*

Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) started as an initiative of eight donor registries in 1988, with just 150,000 donors in its first edition. In this early days the registries in the USA and Europe were not yet that big. BMDW developed from an anonymous HLA phenotype “telephone book” to a more advanced internet match program with a lot of options. It still gives the answer to an important question: does my patient has a potential stem cell donor and in which registry can I find the donor.

Today BMDW contains over 13 million HLA phenotypes of volunteer donors and cord blood units from 46 countries around the world. The number of registries involved is 77, where 25 registries have donors as well as cord blood units.

BMDW is used intensively by 690 authorised users: annually about 100,000 match runs are performed, mostly (75%) by the medical doctors of the transplant units who have got an authorisation. So however BMDW is financed by the co-operating registries, the registries authorise also the transplant physicians in their country. These physicians are highly interested in the possibilities for their patients.

An overview will be given of the facilities and use of the BMDW programs.

### 世界骨髓库 20 年发展现状介绍

汉 克

世界骨髓库的成立源于 1988 年 8 名骨髓库捐献者的一项倡议，第一批加入世界骨髓库仅 15 万名捐献者。最初，美国和欧洲的骨髓库都不大。世界骨髓库从一个名不见经传的 HLA 单倍体“电话号簿”，发展成为一个先进的、有多种选择的网络配型程序。它一直致力于解决这样一个重要问题：我的病人有一位潜在的干细胞捐献者，并且在这个骨髓库中可以找到这名捐献者。

今天世界骨髓库包含了世界上 46 个国家的 1300 多万志愿捐献者的 HLA 单倍体和脐血资料。



有 77 个骨髓库参与其中，其中 25 个骨髓库既有捐献者资料也有脐血资料。

大约有 690 家授权机构用世界骨髓库网络进行查询：每年约有 10 万人进行配型，大部分（75%）是通过有资质的移植单位，由临床医生进行申请。因此，合作的骨髓库要共同出资，以支持世界骨髓库的工作，这些骨髓库也可向他们本国的移植医生授权。这些医生对于能给他们病人带来生的希望也非常高兴。

全文概述了世界骨髓库网络程序的运用。

## 2-2

### 非血缘造血干细胞移植的伦理准则

北京大学医学部 李本富

非血缘造血干细胞移植包括非血缘异体的骨髓、外周血和脐带胎盘血的干细胞移植，它是一些疾病的重要的治疗手段之一，尤其是血液系统中一些恶性疾病的根治的唯一方法。为安全、有效和合理的实施移植，要遵守医学伦理学或生命伦理学的不伤害、有利、尊重人、公正的基本原则。为此提出以下具体的行为准则。

1. 非血缘造血干细胞移植可能挽救白血病等患者的生命从而使患者和家庭幸福、社会受益，因而是利国利民的社会工程，国家和社会理应支持和推广。但是，由于移植可能给捐献者或接受者的双方或一方带来一些风险，因此除要加强全程管理外，还要以伦理准则规范相关人员的行为，以使移植受益最大而风险最小。

2. 应用和推广非血缘造血干细胞移植，国家造血干细胞捐献者资料库管理中心和各分库、社会媒体以及医务人员应采取多层次、多渠道和广覆盖的各种形式宣传造血干细胞捐献的意义、解除公众疑惑和树立榜样，鼓励、提升公众发扬“人道、博爱、奉献”的精神和主动、自觉的参与意识以及踊跃捐献造血干细胞，以利于他人和全球华人，促进社会和谐。

3. 捐献脐带胎盘血应由新生儿的父母代理决定，而捐献其它非血缘造血干细胞除了要达到法定年龄（18 岁）和具有完全的民事行为能力外，还必须坚持个体自愿的原则，即只有在知情同意的前提下才能获得捐献者的血样和有关信息资料。然后，将其血样的准确的 HLA 分型和信息资料存入造血干细胞资料库，以备配型检索。同时，要强调在造血干细胞移植之前，捐献者有随时取消捐献的权利，并且不会因此受到歧视或任何惩罚。

4. 当有患者需要造血干细胞移植时，可向造血干细胞资料库提出申请配型检索，对配型成功的潜在捐献者因再次说明和动员，并且采集中心的医生只有在与捐献者签署知情同意后书后才能进行全面体检和采血样进行高分辨检测，对合格者才能进入住院采集造血干细胞。同时，要强调任何人无权诱使、欺骗、强迫他人捐献造血干细胞。

5. 在捐献者与接受者配型成功且接收者较多的情况下，国家造血干细胞资料库分配捐献者必须坚持公正和公开的原则。同时，还要使捐献者造血干细胞得以最佳的利用而尽力减少浪费。为此，国家造血干细胞资料库对各省、自治区、直辖市的分库还负有领导、检查和监督的责任。

6. 造血干细胞的采集与移植一定要在各省、自治区、直辖市卫生行政部门认证的医院进行，以保障其质量。同时，被认证的医院和其中的医务人员应努力创建温馨、安全和优雅的环境，尽力做好并发症的预防，以避免或减少因采集、移植干细胞引起的早、晚期并发症，特别是要预防移植物抗宿主病（GVHD），而一旦发生并发症应及时给予医疗救助。

7. 为确保捐献者的隐私和捐献者与接受者的双方权益，采集与移植的医院要分开。同时，在造血干细胞移植的过程中，涉及的各部门、各环节的有关人员对捐献者与接收者的双方以及申请移植的患者的个人信息、病情资料要保密，包括捐献者与接收者的双方之间以及对接收者的雇主、保险公司、医药厂商不能随意泄露，除非征得他们同意、法律需要等，并且对需要保密的信息和资料也不得用于其它目的。

8. 在造血干细胞移植后，医务人员对捐献者与接受者的双方都要建立不良反应和不良事件的报告制度，以及跟踪和随访制度。在执行上述制度的过程中，一旦发现异常反应及时予以指导或治疗，以周到的服务保障其双方的安全，并在不断总结经验的基础上提高其移植质量。

9. 从事造血干细胞采集、移植的医院和医务人员不能从事有关移植广告宣传；不能接受其移植器械、药品厂家的回扣；担任伦理委员会的医务人员，还应回避自己参与采集、移植的案例的伦理审查，以防利益冲突。

10. 禁止任何组织、个人买卖造血干细胞，医疗机构也不能利用造血干细胞的、移植收取高出合理服务成本而谋取高额利润或暴力。任何介绍、组织、欺骗、胁迫他人买卖造血干细胞的行为都是违反伦理，甚至是违法的。不过，补偿期捐献者的交通、营养和误工是合理的。

11. 在造血干细胞的采集、移植以前，医务人员对存在有明显伦理问题的案例应向伦理委员会咨询；对实验性造血干细胞移植必须经过伦理委员的审查，即使通过伦理审查还必须随时接受伦理委员的检查和监督。

## 2-3

### 佛教慈济骨髓干细胞中心及慈济台湾骨髓数据库的现状及展望

杨国梁

佛教慈济医院骨髓干细胞中心

慈济台湾骨髓数据库于1993年10月在佛教慈济功德会释证严法师的推动及领导之下成立。历经近15年的殷勤耕耘，至今，已经建立将近三十二万多名志愿骨髓干细胞捐赠者，是国际上几个庞大的华人骨髓数据库之一。

慈济台湾骨髓数据库成立的宗旨为「清水之爱」、「守护生命」。秉持证严上人为佛教为众生的理念，让人人以「落地为兄弟、何必骨肉亲」的爱心，发挥清流之爱，期能达到净化人心、祥和社會之境界。

慈济台湾骨髓数据库以公益的模式，在无任何政府经费的支持的状况下汲汲营营发展运作，到目前已提供超过一千八百多例骨髓造血干细胞，捐赠至亚洲、美洲、大洋洲、欧洲及非洲27个国家

家之移植医院，含中国、日本、韩国、香港、新加坡、台湾、菲律宾、泰国、马来西亚、土耳其、以色列、美国、加拿大、英国、瑞士、意大利、德国、挪威、丹麦、瑞典、荷兰、比利时、西班牙、法国、澳洲、纽西兰和南非等，台湾人民的爱心与慈悲是为世界所有目共睹的。

在捐赠骨髓造血干细胞至各国移植医院中，超过三分之一是捐赠给中国大陆四十多家移植医院，遍布浙江、北京、上海、广州、苏州、成都、重庆、湖南、湖北、海南、哈尔滨、黑龙江、广西、陕西、天津、福建等地区，堪称血浓于水、「髓浓于血」。骨髓造血干细胞捐赠者本着慈济的信念，不分族群、肤色、宗教与国界，无怨无悔、无所求的付出，舍我其谁的英勇、仁慈和智慧，祈望病患早日恢复安康，家家快乐。

慈济骨髓干细胞中心由骨髓干细胞捐献源起，进而推展周边血捐赠和脐带血库之建立，在在是为提供捐者最安全的造血干细胞捐献，增加患者比对成功的机缘，完成抢救生命的使命。慈济脐带血库目前已冷冻保存一万多袋脐带血，并已提供 38 例之国内外造血干细胞的移植，脐带血与骨髓干细胞捐献相辅相成，造惠病人。

骨髓干细胞与脐带血捐献是医疗的作用和行动，它们的捐赠理念更重要、更深远的是爱心的升华、为善不欲人知的利他，也是人性超然的发挥。这种无我的境界，来自于启蒙，来自于人与人之间的信心和爱心，也就是证严上人的言行。

本着出发心的虔诚与坚定，慈济骨髓干细胞中心继续发展干细胞的浅能与应用，与同侪互助合作，相互砥砺，一起为大家惜福再造福。

## 2-4

### 以人为本，扎实做好志愿捐献者服务工作

张波

四川省红十字会（610021）

四川分库建立以来，在总会和总库管理中心的帮助指导下，在省政府和各级领导的重视关心下，坚持以人为本的科学发展理念，牢固树立为患者服务的指导思想，扎扎实实地做好捐献志愿者的宣传动员、血样采集、分型检测、资料录入、干细胞移植、咨询等各项服务工作，促进了分库工作的平稳健康发展，保证了总库下达目标的完成。截止 2008 年 4 月，入库资料累计达到 35000 人份，社会募集资金入库资料 141 人份，实现造血干细胞移植 16 人，为传播人道、博爱、奉献的红十字精神，构建和谐四川做出了应有的贡献。基本做法是：

#### 一、真诚沟通，使捐献者从容实现捐髓救人的义举

实现造血干细胞捐献是一项系统的社会爱心工程，具有涉及面广、牵涉家庭人员多、时间跨度周期长、不可控因素多的特点，哪个环节的工作不扎实、不到位，捐髓救人的愿望就难以实现。针对这些特点，我们在加大造血干细胞知识宣传教育普及，把好捐献者登记入口关的同时，注重与初配和精配相合捐献者的交流，真诚的沟通情况信息，做到既不单纯地为了追求实现捐献数量而让捐献者带着疑虑和问题走进捐献室，也不因为捐献者的一时不同意就不乐意或轻易放弃做工作，始终

保持一个平常、真诚的心态，站在中立的原则立场上，积极有效地开展工作，以此赢得捐献者的理解、信任和支持，从而自愿从容地实现捐髓救人的义举。工作中我们注意了三个环节：

一是对再动员犹豫的捐献者给予充分的尊重和理解。四川分库一位志愿者是医务人员，当得知配型成功后，他告诉我们工作很忙，言下之意就是不大愿意捐献。对这种比较犹豫的捐献者，分库工作人员积极沟通弄清情况原委，并建议他多考虑下再说。过了一段时间，分库的同志又打电话给这位捐献者，再次与之交流，捐献者说：“自己身体不好，单位医生劝他不要捐献了。”交谈中，捐献者也问及捐献过程情况如何？工作人员如实告诉了前面的捐献者在捐献过程中的真实感受和反映，同时对身体不好不能捐献的理由也充分理解。交流过程始终是坦诚的，双方表示过后再说。没过几天，该捐献者打电话说愿意捐献帮助患者。分库把采集同意书电邮过去履行了签字手续，最终实现了捐髓救人的目的。

二是按照有关要求，做好造血干细胞采集。四川分库志愿者郑婕同志在救助北京一患者进行干细胞采集时，捐献者出现不适反映，经处理后不见好转，采集医生考虑到捐献者的心理和体质以及采集的情况，与分库商量后，按照卫生部和总库管理中心的有关要求，停止了采集，并通知了移植医院医生，移植医院站在患者的角度，一再要求让捐献者休息一下再采集一次，言语交流过程中还有些过激，我们根据掌握的情况，十分冷静地向患者医生耐心解释说，救助患者也是我们的责任，保护捐献者心理、生理健康更是我们做好工作的前提！主治医生在理解我们的工作后，同意了不再二次采集的要求。第二天，当检查结果表明细胞数达到标准后，捐献者也被我们的负责精神所感动。因为我们深信，只有保护好捐献者才能最好地帮助患者实现挽救生命的愿望。

三是加强与捐献者单位领导的沟通。捐献者再动员工作从注射动员剂到实现捐献，前前后后一般要7天时间，而捐献者的工作岗位常常又不允许这么长的时间离岗，特别是一些生产岗位上的志愿者更是如此。为此，我们制作了向捐献者单位的致信函，主动到捐献者所在单位拜访领导，介绍造血干细胞捐献有关情况，真诚表达公益机构对捐献者及捐献者单位的感谢之情。经过有效沟通，争取到单位领导对捐献者的理解，纷纷表示困难再多也要大力支持这一救助生命的工作，要挤出时间安排捐献者休息，给予多方面的关心。由于我们从初配型到捐献工作的每个环节中，都充分体现了对捐献者的尊重与理解，使捐献者表现出了勇于克服各种困难，捐髓助人的坚定性。截止目前，四川分库未发生捐献过程中捐献者中途放弃捐献意愿等情况。这也是我们在整个捐献工作中需要尽力避免的。

## 二、细心服务，让志愿捐献者在分库有“家”的感觉

四川分库作为一个爱心平台，热情周到、细心服务是我们工作的根本要求。为了让更多的患者寻找到生命的希望，也让更多的捐献者实现捐髓救人的愿望，工作中我们侧重抓了四个方面：

一是开通并对外公布了四川分库的电话号码，每天8:00~22:00有人值守接听，方便公众查询和及时解答问题。

二是在成都天府广场人口密集区常设了造血干细胞采样宣传点，既方便了志愿者的捐献采样，又建立了造血干细胞的宣传阵地；遇有捐献人数较多和相对集中的情况，分库便主动上门服务，组织工作人员深入单位和市（州）开展造血干系胞知识采样活动，把方便让给别人，把困难留给自己。目前，四川分库在成都和8个市（州）设置血样采集站，方便了志愿者的捐献，促进了四川分库的

扩容，保证了总库下达目标任务的完成。

三是切实为再动员捐献者提供更加细致的人文关怀。每位再动员捐献者的工作展开前，分库的同志高度重视，充分准备，适时针对再动员者的个性特点确定细化的服务方案。实际工作中，分库尽管人手少，每次再动员工作一开始，从捐献者的食宿安排到医院的联系，从打动员剂到干细胞采集完成及后续工作的全过程，分库始终坚持落实专人跟踪陪同服务，提前做好方方面面的协调工作；华西医院在门诊病员流量大、医护人员十分繁忙的情况下，给采集工作予以了很好配合，为捐献者开辟了绿色通道，提供了良好的捐髓环境和优质的服务，使捐献者倍感分库的温暖。

四是对捐献者提出的愿望，哪怕是我们工作范围之外的事，都真诚的面对，尽最大努力提供人性化的帮助。例如，四川分库第六位捐髓者刘斌，捐献造血干细胞一年多后，一次打电话到分库说自己想购买一套经济适用的住房，问我们能不能帮忙请开发商优惠点房价。遇到类似问题，分库工作人员不是简单回绝，而是积极帮助沟通牵线搭桥，以实际行动赢得了捐献者对我们的信任和理解，在分库找到了“家”的感觉。

### 三、营造氛围，努力提高捐献者的社会荣誉感

捐献造血干细胞是弘扬中华民族乐善好施、助人为乐的传统美德，助推社会主义精神文明建设的有效载体。在战争年代为民族、为国家勇于牺牲、舍身取义的是英雄，在平时为挽救他人生命勇于捐髓的志愿者同样是新时期最可爱的人。为此，工作中我们注意运用不同时机开展多层次、全方位地宣传报道捐献者方面的典型人和事，努力营造在全社会形成尊重捐献者、学习捐献者的浓厚氛围。

一是加强了与媒体的联系，基本实现分库活动和再动员捐献者的造血干细胞采集活动均有详实深入的媒体报道信息，特别是 2003 年四川分库实现首例造血干细胞时，我们组织了四川电视台、成都晚报、华西都市报和新华社成都记者站等 6 位媒体记者随同分库送髓人员赴河南郑州跟踪报道了大量信息，此次活动也引起河南媒体的互动宣传效果很好。据不完全统计，这些年四川分库通过报纸、网络、电视、电台报道的新闻信息和专题内容达 300 条（次），使分库成为全省红十字会的独特宣传品牌。在中国红十字会总库管理中心首次组织的强生杯新闻宣传评选活动中，四川分库获得优秀组织奖，有 5 名媒体人员获奖，受到总库的表彰奖励。

二是利用重大节日开展了“让爱心回家”活动。2005 年中秋佳节，我们通过媒体提前发布消息，在四川分库配型实验室——中国医学科学院成都输血研究所成功组织了请捐献者回“家”活动，强化志愿者的社会责任意识；2006 年“5·8”博爱宣传周期间，四川分库再次组织了 8 位捐献者与媒体和社会各界人士的爱心交流会，达到了由爱心人士讲爱心、用爱心呵护爱心、用爱心传递爱心的目的，会上一位接受台湾骨髓移植的企业老总当场提出，诚邀实现捐髓的捐献者到青城山他公司的宾馆免费疗养，言之恳切，确实令人感动；今年元旦春节期间，分库向捐献者们邮寄了慰问信和小礼品，以表示对他们新春的祝福。

三是对企业老总褒扬捐献者的举措积极引导。四川分库的一位捐献者是皇冠假日酒店的员工，当酒店老总从报纸上得知本企业员工实现捐髓的消息后非常感动与敬佩，并亲自到医院看望捐献者，送去了 2 万元的慰问金，在捐献者回单位时又组织员工隆重欢迎。对公司领导的爱举，分库领导及时上门致谢，感谢他们对捐献者的理解，对红十字人道工作的支持，但在社会宣传面上我们保

持低调，对公司的物质奖励我们的态度是多做少说，因为红十字倡导的是无偿助人，作为单位、社会来说，给予捐献者再多也不多，但对捐献者个人来说，一张笑脸、一声问候、一句表扬，再少也不少，公司领导认同了我们的观点。

三是省市领导亲临现场看望慰问或适时接见造血干细胞捐献者，充分肯定和高度赞扬他们的爱心行为，从而推动了全社会对造血干细胞捐献者的尊重、理解和关爱，促进了造血干细胞资料库的持续、健康和快速发展。

## 2-5

### 建立健全服务站，不断推进分库建设

单加海 丁玉琴

江苏省分库（210008）

江苏省红十字会在启动中华骨髓库江苏省分库时，充分认识到开展造血干细胞捐献、救助血液病人是一项利国利民的生命工程，是对弱势群体实施人道主义关怀和救助的具体体现，对弘扬“人道、博爱、奉献”的红十字精神，动员和组织群众广泛参与社会公益活动，推进和谐社会建设，具有非常积极的作用。如何保证省级分库的各项工作健康有序、高效运转，应该说建立和完善所辖各市红十字会造血干细胞工作服务站，是一个非常重要的基础环节。因此，我会在建立省级分库管理中心的同时，就决定在所辖各市成立服务站，以延伸分库在各市的工作。实践证明，服务站的建立和健全对分库的发展起到了非常积极的作用，有效地促进了分库工作健康、规范、有序地发展。几年中，我们对服务站的管理也积累了一些经验，主要介绍如下：

**一、思想上高度重视，把建立和健全省辖市红会造血干细胞捐献服务站作为一项重要工作来做。**

江苏省地处东部沿海，有13个地级市、108个县（市、区），7500多万人口。由于经济相对比较发达，流动人口量较大，所以，需要动员的志愿者人群分布地域很广。如果在南京设立分库后，仅靠分库几个工作人员在全省普及骨髓捐献工作，完成如此繁重的工作任务，倘若再没有当地政府的支持，要做好这项工作将会遇到很大的困难。大家经过反复的分析比较，认为必须从江苏的实际情况出发，走出一条具有江苏特色的工作之路。江苏省所辖各市都有较健全的红会组织体系，在这个体系基础上全面开展骨髓捐献工作能起到事半功倍的效果。全会思想统一后，组织召开全省各市红会秘书长会议，强调造血干细胞捐献服务工作是政府委托给红十字会的一项重要任务，是唯一一项由红十字会独立开展的公益活动，是社会主义精神文明建设的重要内容之一。各市红会领导要高度重视，在各市红会全部建立服务站，配备专职干部，专门从事造血干细胞捐献服务工作，把这一项挽救血液病人的生命工程放在突出位置，作为一项重点工作抓实抓好。

为了把建立服务站的工作落到实处，我们在江苏省分库管理规程上明确了服务站的具体职责：

1. 开展捐献造血干细胞科普知识宣传、动员、征集捐献造血干细胞志愿者；2. 负责本市捐献造血干细胞志愿者报名、登记、联络；3. 负责本市捐献造血干细胞志愿者 HLA 组织分型检测的标本采集。

**二、围绕骨髓捐献的核心工作，着力提高专职干部的责任心和业务能力。**

造血干细胞捐献工作在全省各市开展，势必需要各市红会专职干部既要有一个统一的认识和理解，具有高度的责任心，又要牢固树立“质量是骨髓库生命”的观念，掌握一定的业务知识，并能正确地运用于工作实践中。

**1. 举办专业培训班。**分库在启动后，每年都要举办一期由市红会秘书长和专职干部参加的专业培训班，邀请专家讲授相关知识；传达总库的精神；细化宣传、报名采样、再动员、捐献及捐献后随访各步骤的要求，强化质量意识。例如，2005年，分库利用总库管理培训班在南京举行的机会，召集所有服务站的专职干部参加这期培训班，使他们了解国内和境外的造血干细胞移植动态、骨髓库的各项工作进展和各分库的做法，对提高全省造血干细胞捐献者服务站专职干部的业务能力发挥了很好的作用。

**2. 加强工作指导。**针对分库日常工作要求、总库下达的任务、工作发展中的新情况和新问题，我们都及时与各服务站沟通，加强分库与服务站的协调。先后下发了《捐献造血干细胞服务工作规范（试行）》、《关于规范捐献造血干细胞志愿者登记、采样工作的通知》、《关于标本送检安排及完善交接手续的通知》、《关于进一步加强捐献者资料管理的通知》《关于组织参加“强生杯”捐献造血干细胞知识竞赛的通知》、《关于做好志愿者初筛工作的通知》等规定和通知，切实加强了对服务站和专职干部工作的指导，有力地增强了工作的科学性、规范性和可操作性。

**3. 推进交流互动。**省红会领导和分库工作人员经常去各市宣传、采样的现场，了解当地情况，及时把握各地工作的进展；在采样前反复强调一定要选择符合报名条件的志愿者，从源头上控制反悔和流失率。分库与服务站及服务站之间还经常利用电话或其它方式交流各自工作中遇到的新情况，对如何做好这项工作，规范各程序提出新的意见和建议。分库每年都对志愿捐献者的基本信息进行筛选和电话回访，将无法联系、不符合报名条件的志愿者筛除，并将结果通报给各市红会。

**4. 规范操作程序。**2007年分库管理中心编写了《江苏省造血干细胞捐献工作标准操作程序》（试行），把江苏省自报名采样、血样运送、再动员直到捐献后随访各阶段的要求和捐献造血干细胞相关知识编印成册，发给各市和县（市、区）红会作为工作参考。

### 三、注重目标考核，努力构建造血干细胞捐献服务工作的长效机制。

江苏省红十字会每年要对所辖市红十字会的工作情况进行年度目标管理考核。自2003年开始，造血干细胞捐献服务工作被纳入红会目标管理考核内容，重点对完成采样任务的情况，报名表填写完整性及是否符合报名条件，采集标本量是否达到要求、有无凝血、溶血及编号规范情况，再动员期的反悔率和流失率进行评分考核，这对不断提升各服务站工作质量和服务水平产生了积极、长效的作用。例如，苏州市红十字会宣传得力，造血干细胞捐献在苏州地区有很高的知情度，志愿者大多在无偿献血人群中产生，反悔率很低；无锡、徐州市红十字会定时、定点、定人采样，再动员工作细致，志愿者捐献意愿坚决；镇江市红十字会发挥志愿者作用，在采样现场辅导志愿者报名登记、填写表格，志愿者基本信息完整等。在2005年、2006年常州市红十字会、苏州市红十字会、镇江市红十字会等分别介绍了他们在做好志愿者服务方面的工作经验和体会，专职干部共同探讨，为促进全省造血干细胞捐献服务工作的发 展献计献策。为调动服务站的积极性，分库将在目标管理考核评比中获前4名的服务站给予表彰，分别于2005年和2008年各表彰一次，在全省逐步形成了各服务站“你追我赶争先进”的良好工作局面。

总之,在省辖各市红十字会建立造血干细胞捐献者服务站有利于在全省范围内开展造血干细胞捐献服务工作,能解决分库人员少、精力有限的问题,能降低成本,大大提高分库的工作效率,服务站是分库不可或缺的重要组成部分。但要更充分、更好地发挥服务站的作用,必须不断强化对服务站工作人员的业务指导和管理,规范操作程序,提高专职干部的责任心和业务能力。同时,要鼓励他们的工作中勇于开拓,大胆创新,努力探索建立推动服务站工作不断提升的长效机制。

## 2-6

### 把好关口,坚持自愿无偿捐献的原则

张 瑾

上海分库(200002)

上海市分库自1992年始开展造血干细胞捐献志愿者招募工作,截止2008年12月31日,入库人数已达到86508人,造血干细胞采集130例。在总库管理中心和上海市红十字会的领导和关心下,把好关口,实施自愿无偿捐献的原则。每年个人报名的比例不断上升,入库志愿者的流失率逐步下降,造血干细胞捐献志愿者的招募工作逐步实现科学化、多元化、效益化、人性化管理,有力地推动了资料库的协调发展。

#### 一、科学选定造血干细胞捐献血样采集室

上海市分库在全市的13个献血屋中设立了6个血样采集室,分别设置在市区的东、西、南、西南、北、中,全年365天开放,方便市民就近报名。在选址上,我们一是考虑面的均衡布局,二是兼顾点的自然状态:如人流组成、交通便利和商业配套等,其中在交通最为便捷的人民广场献血屋设立一个单间,配备了分库专职人员,除了接受市民报名,还专设捐献者高分辨复检的接待和采血工作,充分利用社会资源,降低采集成本。

在设立血样采集室以前,我们都经过认真调研,按程序规范操作:由献血屋提出申请,与所在地红十字会和献血办协商,报上海市血液中心和上海市分库审批同意。在此基础上对相关人员进行造血干细胞捐献知识和血样采集工作流程的培训,再经过二至三个月的试运行,最后才正式挂牌成为上海市分库指定的血样采集室。血样采集室所有的资料和器材由上海市分库统一配送,血样采集室的工作人员按照规定的工作流程进行操作,上海市分库落实专人负责联系,每月上门了解情况、听取意见,每年召开专题研讨会,不断完善工作机制,为有效地招募造血干细胞捐献志愿者打下了扎实的基础。

#### 二、加强与团市委合作,开展多元化的宣传

上海市红十字会和共青团上海市委自2001年就开展了“为了白血病患者的希望工程——上海青年造血干细胞捐献志愿者行动”,在各级团委和基层团组织大力开展造血干细胞捐献招募工作,广大团员青年踊跃加入资料库,几年来共下发100万份宣传资料,组织专题讲座400余场,组织大型团体血检100余次,招募青年志愿者入库3万多人,为上海市分库源源不断地输送了新鲜血液。2007年上海青年造血干细胞捐献志愿者行动被上海市精神文明办公室评为上海市志愿服务十



大品牌。

上海市分库利用团市委的组织优势和宣传渠道，在闹市街头树立大型宣传广告牌、在地铁沿线播放造血干细胞捐献公益广告、在电视广播报纸上报道捐献者的动人事迹。特别是每年九月份的造血干细胞捐献宣传活动周，通过邀请上海知名人士（好男儿、著名节目主持人、影视歌明星等）参加、不同优秀青年群体（张江青年、楼宇青年、地铁青年等）的报名、造血干细胞捐献者表彰、媒体深度报道等一系列的大型专题活动，在社会引起了热烈的反响，大大提升了上海市分库的公益形象，也加速了造血干细胞捐献志愿者队伍的扩容速度。我们还积极参与团市委组织的一些大型公益活动，如 5.4 青年节、5.20 我公益我快乐、上海青年风尚节、城市爱心传递温情等系列活动。通过活动在青年中传播“捐献无碍健康”的知识、弘扬“人道博爱奉献”的红十字精神，使造血干细胞捐献的知晓度不断得到提高，为团员青年自觉加入造血干细胞捐献志愿者队伍起到了潜移默化的宣传效果。

### 三、献血屋与血样采集室共建，献血和血样采集共赢

上海市分库的志愿者征募分为团体报名和个人报名二种，团体报名由我库组织人员上门采集，个人报名自行到血样采集室采集血样。上海市分库大力倡导个人报名，因为个人报名是他本人意愿的真实反应，捐献的愿望越强烈、流失率就越小，反悔率也最低，确保志愿者队伍的稳定性，2007 年个人报名占入库人数的 48%。

上海市分库的血样采集室都设立在爱心献血屋内，由于献血屋大都在商业繁华地区，积聚了大量的人流，现场宣传效果很显著。献血屋空间较大，环境舒适，既有便于工作人员向市民详细介绍捐献造血干细胞的相关知识，也为志愿者提供休闲的环境、以充足的时间考虑决定和填写表单。尤为重要的是，献血屋每天都有市民来无偿献血，很多献血者看到捐献造血干细胞的介绍会主动报名参加资料库，更有的市民专程前来报名入库，因感受到献血屋的氛围而自愿参加无偿献血和单采血小板。

在献血屋中开展造血干细胞捐献征募工作，使献血和捐献造血干细胞互动，实现了双赢效果；同时在最大程度上节约了分库的经费和人员的投入。分库除了在人民广场采集室安排专职工作人员外，其他采集室志愿者的征募工作都由血液中心的工作人员来承担，大大缓解了分库工作人员较少的状况。利用有限的社会资源，通过规范的运作，实现了征募工作效益的最大化。

### 四、充分发挥志愿者俱乐部作用

上海市分库于 1999 年成立了上海市红十字造血干细胞捐赠志愿者俱乐部，目前俱乐部有正式会员 546 人，每年为上海市分库提供 1600 人次，6800 小时的志愿服务。在造血干细胞捐献志愿者征募工作中，俱乐部的会员们发挥了特别重要的作用。在血样采集室，通过会员们详细耐心的解释，专业正确的介绍，热情积极的鼓励，有很多市民愉快地报名参加了资料库；而在进行高分辨复检时，我们专门安排已经捐献过造血干细胞的会员在场，他们以自己的亲身经历，快乐的感受，健康的身体现场服务，大大减轻了志愿者的担忧，也消除了志愿者家人的顾虑，有效地降低了复检后的反悔率，坚定了他们捐献造血干细胞的信念。在团体体检现场，由于会员们热情周到的态度，即使在天气恶劣、人潮涌动的情况下，也能使志愿者始终保持一个舒畅的心情，保证了我们高效率地完成血样采集任务。会员们为志愿者提供一系列人性化的服务，为我们真正实现“报名时深思熟虑，捐

献时义无反顾”的工作目标起到了积极的推进作用。

志愿者征募工作是造血干细胞捐献工作的基础，是提高造血干细胞移植成功率的关键。血样采集室的合理布局、科学管理，与团市委多方合作、优化志愿者人员结构，与献血工作相互促进、实现双赢，秉承以人为本的服务理念，有效地促进了上海市分库的可持续发展，为更多的患者点燃了生命的希望。

## 2-7

### 加强管理 完善制度 努力为捐献者打造良好的服务平台

张红梅

天津分库（300020）

几年来，我们天津分库始终注重加强管理，完善制度建设，打牢基础工作，从而保障了捐献者工作的质量。

工作中我们体会到造血干细胞捐献工作是一项科技含量很高的事业，必须按照科学的操作程序，实现生命的对接；同时，这项工作又是一项涉及人的工作，需要做大量的思想工作、协调工作和风险管理工作，这些都需要在制度上给予保障。

古语说得好：没有规矩，不成方圆。几年来，结合工作实际，天津分库加强管理，先后建立了“三制”、“四化”、“七协调”等工作制度。

“三制”是：《首问负责制》《专人负责制》和《限时服务制》，要求无论是谁，接到有关捐献的电话、来信、来访、网上咨询或报名登记，都要认真接待处理，填写接待咨询报名受理情况登记表，负责到底，在有效时间内完成任务，绝不能拖延怠慢；

“四化”是：宣传动员科学化、血样采集程序化、人库登记严格化、工作管理规范化。

“七协调”是：协调总库、协调实验室、协调采集医院、协调移植医院、协调家属、协调捐献者单位、协调交通部门、协调快递公司。特别注重与总库间的信息及时反馈。

为了“三制”、“四化”、“七协调”等工作制度的实施和落实，我们又相继出台了：

《工作人员岗位责任制》。使任务分解，公开公示，相互监督。工作人员目标清楚，职责明确。

《捐献工作流程》。在网上和办公场所公示流程中报名登记、采集血样、等待配型、配型成功、同意捐献、高分检测、体格检查、入院捐献、出院回访等 15 个环节，使报名捐献者一目了然，也使我们的工作人员对整个捐献工作更加清清楚楚，避免漏项和失误。

《计算机机房管理制度》。严格操作程序，确保录入志愿者资料准确、安全、及时上报传递。

《实验室定期检查制度》。做到“两个定期”：定期对实验室进行监查，填报“HLA 组织配型实验室任务完成情况月报表”，保证上报质量报告和数据的检测、录入、传输等不出差错；定期检测数据录入、传输系统，确保分库与实验室数据录入、传输的及时性、准确性、完整性。

《捐献者思想再动员工作程序》。再动员工作是整个捐献工作的重点。我们总结的体会是：再动员工作的难点是捐献者家属，尤其是青年人的父母。很多家属虽然认同捐献者的义举，但由于对

捐献造血干细胞知识匮乏和传统观念束缚，使他们对自己的子女捐献后的身体担忧，这是他们阻挠捐献的最重要原因。这就需要我们认真、耐心、细致地向捐献者和家属实事求是、通俗易懂地宣传介绍这方面的科学知识，比如要讲：“当今造血干细胞移植的方法”、“骨髓和外周血采集的区别”、“外周血造血干细胞与脐带血移植的区别”、“捐献造血干细胞对身体有无影响”、“捐献造血干细胞是否安全”、“为什么要打动员剂，对身体有什么影响”等等，再用以往生动的实例解除他们的疑虑。力争让每个志愿者配型成功时初衷不改，捐献时勇往直前。同时，在捐献程序上，除了要求本人签署书面同意书外，还要求家长心悦诚服地签署同意捐献书，以保证捐献过程不出现反悔。

《为捐献者服务的规范》，要求工作人员在捐献者捐献过程中“三个必到”：志愿者体检时必到——用专车接送志愿者到指定的医院体检；志愿者捐献时必到——工作人员 24 小时全程陪护，为捐献者买饭洗衣，采集时端屎端尿，保证捐献者吃好、住好、休息好，以愉快乐观的心情顺利完成捐献；捐献者家属来看望时必到——及时与家属沟通捐献情况，听取家属对捐献工作的意见，针对每个捐献者的不同情况，改进服务工作，取得捐献者家属的配合和支持。

《回访捐献者制度》。定期回访慰问捐献者，关心他们的身体状况，尽力帮助解决他们遇到的实际困难。组织成立了由成功捐献者为主、志愿者为辅的“天津市造血干细胞志愿者爱心之家”，经常组织有益活动，让他们感受到“家的温暖”，感受到社会对他们的尊重。

制度是人制定的，制度的承载者也是人。邓小平同志曾指出，制度带有根本性、全局性、稳定性和长期性。要想让全体工作人员自觉地贯彻执行制度，使制度能够实现预期效果，就必须进一步完善约束和激励机制。这方面，我们逐步健全了三项机制：

**第一，目标责任机制。**围绕全年工作目标，明确分工，分解到人，责任到人，考核到人，形成合力。在此基础上，做到周有安排，月有计划，把握阶段性进度。

**第二，学习培训机制。**通过每周半天学习、集中辅导、座谈交流、参加全国和市举办的培训班等形式，营造部室好学上进氛围，不断提高干部自身的政治理论素养、文化水平和业务能力。努力使干部从只注意做好当前工作，向搞好超前服务转变；从被动完成领导交办的任务，向主动开动脑筋、创造性地推动工作转变。

**第三，评比考核机制。**在全体工作人员中提倡和培养三种风气：艰苦奋斗的风气——坚持深入学校、机关、企事业单位，宣传动员，不怕苦、不怕累，敢于到志愿者家庭，面对面地做思想工作，解决困难，化解矛盾；爱岗敬业的风气——树立强烈的事业心和责任感，恪尽职守，勤奋工作；求真务实的风气——始终保持全心全意为人民服务的宗旨，加强团结，顾全大局，思想上求实，工作上抓实，为供患服务诚实。把每一个人完成任务情况，作为半年小结、年终总结和工作绩效的考核标准，对工作勤奋、成绩突出的给予表扬和奖励。

几年来，我们坚持以抓制度建设为核心的工作思路，使造血干细胞的捐献工作取得了良好社会效益。一位捐献者家属，在事后给我们发来的短信中写道：“这次能拜识你们并了解你们的事业，是我人生中最大乐事，你们所从事的事业太伟大了。我将努力向你们学习，做一个有益于社会的人！”通过实施“三制”，使我们的工作效率进一步提高，自 2003 年建库至今，我们每年都提前超额完成志愿者招募任务。通过执行《捐献者思想再动员工作程序》，我们的再动员成功率始终保持在一个较高的水平，截至到 2007 年底，初配相合的 153 名志愿者中同意捐献的达到 96.7%，从未出现过

高分后的反悔现象。通过落实回访制度，进一步扩大了捐献造血干细胞的影响，全市已建立志愿者队伍 25 支、队员上万人。特别是“造血干细胞志愿者爱心之家”已经成为我们分库工作的得力助手，为分库的发展建言献策，帮助做家属再动员工作，消除家属疑虑，到采集现场讲授亲身感受，为新的“爱心之家”成员加油鼓劲。通过各项规章制度的全面落实，使我们分库的工作迈上了一个新台阶，达到了一个新水平。在总库开展的各项评选活动中，分别荣获三次“最佳组织奖”，2003-2005 年度“优秀省级分库”、2006 年扩容“优秀分库”。

天津市主管我们工作的副市长在一次讲话中，赞扬捐献者时说：“一个平凡的人做出了不平凡的事！”我们分库工作人员决心甘愿做为平凡人做出不平凡事的梯子和台阶，为捐献造血干细胞事业、为奉献爱心、为构建和谐社会竭尽全力，做出贡献！

## 2-8

### 为提高库容使用率，尽心尽责地服务于捐献者

何一平

我们湖南分库在总库管理中心和省红十字会正确指导下，几年来，在努力做到志愿者深思熟虑、捐献者义无反顾工作的同时，要求工作人员在工作中坚定“为提高库容使用率，尽心尽责地服务于捐献者”的理念和工作原则。使分库的库容使用率每年都有所提高。今年 4 月份捐献者达到了 100 例，为患者生命的延续和为中华骨髓库的发展发挥了积极的作用。在提高库容使用率，尽心尽责地服务于捐献者工作上我们主要狠抓了“细致的立体式的动员”和“全方位的贴心服务”

#### 专业细致的立体式动员工作

除了把好招募关，使捐献队伍更成熟外，我们更注重对成功配型者的不放弃。从全面评估进入供着服务工作程序到捐献结束及捐献后随访，全程重质量抓细节。力求做到动员一个成功一个，成功一个捐献一个，除非其他状况，确保不是由于我们的服务或工作责任不到位而使志愿者放弃捐献。

当接到总库初筛通知即日起，我们便坚定一个信念，以能找到的所有方式与志愿者尽快取得联系。在用原始资料的电话、QQ、E-mail、地址及相关人员信息没能找到志愿者的情况下，有时，我们也通过新闻广播和公安部门尽一切可能以最快的速度取得上联系，并将联系信息反馈给总库。

再动员阶段，联系到志愿者本人之后我们尽量会让他们来办公室，或者登门拜访，除了详细全面地向他们介绍整个流程之外，我们尤其注意他们的思想状态和个人想法，与他们真诚的交朋友，鼓励他们与我们工作人员交流，因为只有深入地交流才能促成他们对捐献知识和意义彻底地理解，坚定他们的捐献义举。在使志愿者本人了解之后，我们会联系到他们的家人，与志愿者一道向家人介绍解释。

再动员阶段的工作是否扎实决定了之后的工作能否顺利进行，也将直接影响着另一个生命，因此我们尽可能保证走进高分辨阶段的志愿者们带着义无反顾的决心与信心。而这个决心除了来自志愿者本人的意志之外，他们还需要家庭的支持与鼓励。为了减少反悔率，我们仔细总结工作中每一个细节，以人与人之间最朴素的情感入手与志愿者及他们的家庭建立信任，这也是我们动员工作中

非常重要一步。让他们包括他们的家属和单位在相信现代医学的同时，相信红十字会的精神，相信工作人员所做的不仅仅是为患者服务，也是以供者为本的服务。

建立信任，并不是仅仅一遍遍反复解释专业知识，我们将宣传文字、图片、电视节目当面交给或寄给志愿者，让他们对整个过程中有一个立体的了解之外，若有机会我们会请他们与以前的捐献者见面，遇到正有捐献者在采集的时候会请他们去采集现场，当他们看到捐献者在舒适的细胞采集室用外周血采集的方法安详的采集和无须承受敲骨吸髓的痛苦，与被捐献者聊天后会对捐献更放心、更坚定。而更高层次的信任，是捐献者超出捐献事件本身，对工作人员的信任。记得曾有一位农民志愿者，我们去他家中做再动员时，他……就是这么一位志愿者，毫无半点条件地把自己造血干细胞捐献给了素不相识的新加坡患者，捐献过程顺利完成之后，我们骨髓库的同志没有结束对这位捐献者的关注和关爱，当得知他家有卖不掉农务产品的时候，我们地市红十字会，帮他挨家挨户上门推销，为了更根本地解决他家的生存问题，同志们还四处奔走求人找关系，为他找到了一份合适的工作。当同志们帮他推销完蔬菜和茶油，他看着手里面值不等的钞票，感动得半天说不出一句完整的话。

本着以人为本，以捐献者为本的宗旨，用我们的诚恳与关怀让捐献者融入我们之中，成为我们的亲人、朋友，激发他们博爱的本能。我们相信，对生命的关怀是人最基本也是最伟大的感情，流失的志愿者最大原因是志愿者自身和家人对这项技术的陌生而产生的恐惧和担心，因此，我们用诚恳的心、敏锐的观察、细致的关怀与不断改进的交流技巧将更有效地控制流失和反悔率。

#### 以供者为本全方位贴心服务

对待经过高分辨的志愿者，我们逐渐形成了一套比较成熟的工作模式来保证他们在每一个环节都得到很好的照顾。

第一，我们会提前与捐献者联系，协商一个最方便于他们的时间体检。我们在用捐献者崇尚文明、博爱奉献的善举说服和建立了采集医院为捐献者体检的绿色通道，使繁琐的体检程序能在 2 小时内完成，不管是采集前还是采集后的体检，都以良好舒适的环境和贴心的关怀为捐献者提供最优质的服务。

第二，在采集安排环节上，我们精心把关，协调采集时间、注重质量控制、注重采集计划的每一个环节。比如采集时间尽量不要与捐献者的学习、生活、工作发生冲突，移植医院制定的采集量是否符合标准，有何特殊要求等等，在确保患者移植成功的基础上，尽量为捐献者多想、多做、多服务。

第三，从捐献者入院到采集结束，我们尽全心身全程陪护。不仅注意捐献者在医院和医院外的交通安全，而且精心安排了营养餐和其他食品，保证他们在捐献中能够及时补充营养和注意饮食卫生，并且作为常规在捐献前安排一次欢迎会。（户外运动、看电影、卡拉 OK 因人而异）由捐献者之家负责通知有时间的已捐献者，分库负责通知正在走工作程序的待捐献者。一是让他们自己互相鼓励，使即将捐献的捐献者心理更塌实；二是使正在走工作程序者获得信心。这样不仅能及时解决捐献过程中出现的问题，更为保持零反悔率和让捐献者之间零距离接触提供了有力的保障。我们的细致、耐心、周到的工作效果，得到了捐献者、捐献者家属和单位的赞赏。

第四，以朋友的姿态来面对后期的随访工作。几年的工作中，我们深刻体会到，随访意味的不

仅是一个电话，一声问候，这里面带给捐献者最多的是作为分库对捐献者的人文关怀，在这里没有“人走茶凉”的人言市侩，更多的是一份既作为工作人员又作为朋友的人间真情。更重要的又影响了其他人。

我们不仅认真做好如上所述的工作，还利用网站留言、BBS 等现代、快速、便捷的方式及时了解他们的情况，为他们答疑解惑，消除顾虑，并听取他们对我们工作的意见和建议。网站留言、BBS 成为了监督我们工作的一种新方法，也为捐献者提供了贴心的服务，为患者和捐献者以及其他民众建立了交流平台。我们坚信只要努力做到志愿者深思熟虑、捐献者义无反顾，用我们的爱心、细心、耐心、责任心做好供者服务的每一个工作细节，加快和缩短供者服务的每一个工作细节时间，用捐献者的善举拯救更多的患者，为中华骨髓库增光添彩，实现我们投身到骨髓库工作的人生价值。

## 2-9

### 提高中华骨髓库有效库容率的几点思考

张书环

在中华骨髓库健康发展进程中，在总结以前工作的基础上，以科学发展观为指导，把提高有效库容率，降低流失率和反悔率，做为推动捐献造血干细胞事业更加广泛深入开展的着力点，将有助于提高中华骨髓库的社会效益。

河南省分库自 2003 年正式运行以来，通过外树形象、内抓管理，使捐献志愿者人数、捐献者数量稳步提高，目前库容量 5.4 万人，110 位爱心人士捐献了造血干细胞。通过对 2007 及 2008 年初筛数据的分析，有效库容 71.9%。另外所流失的 28.1% 中，有一多半是联系不上，一小半是意愿改变，或因健康问题、或处于生育过程中，不能捐献。

要使中华骨髓库的社会效益最大化，必须提高其中 HLA 配型成功能够捐献的人员的比例，也就是提高有效库容率，那么如何提高有效库容率呢？比较理想化的状况是：所有的捐献志愿者配上型后都能联系上，联系上后都同意捐献。当然，我们不能左右所有的志愿者从加入骨髓库那天起，到 55 周岁之前，都处于健康状态，这不符合社会规律。

HLA 初配相合联系不上志愿者的原因是什么呢？今年，各分库在 2 月份开展了志愿者回访月活动，联系不上的原因，总结起来，大致有这么几个，一是加入时本人及亲友的资料填写得太简单，电话一变，再动员工作就无从下手；二是志愿者本人流动性大，联系方式更换频繁，分库没有及时跟进更新；三是部分工作人员觉得，即使是费尽周折联系上了，患者也不一定选择移植，所以打一通电话找不到人就说“联系不上”，缺少坚持不懈的精神；

联系上不愿捐献的原因又有那些？一是本人加入时过于草率，缺乏深思熟虑。当我们根据志愿者的第一手资料联系他时，可能经常会发现，有些志愿者对捐献的过程和知识一点都不懂，你跟他反复讲解后，他还是将信将疑。当你进一步追问既然不准备履行承诺为什么当初要加入进来呢？对这个问题的回答更是五花八门，有的说，“那天献血车到我们学校，工作人员喊：献“大”血的到这里来，不想献“大”血想献“小”血的到那里去，我就让抽了点血，想着那就是捐献造血干细胞

了。有的说，“那天，我走在我们医院的路上，他们叫我，过来，就抽几毫升血液，给你化验化验，没啥事”。有的说，“能不去吗？单位集体组织的，不去，奖金还想不想要了”。这反映出了建库之初，我们缺乏管理经验，不了解骨髓库建设的科学规律，在分库工作人员少的情况下，依靠地方红十字会和采血单位招募志愿者，存在着上下思想不统一，宣传不到位，授权不当，过程控制不力的问题。今天，各分库依然存在着不管是人手不够的事实，依然存在着要把志愿者招募的份额授权给地方红十字会，或授权给某医疗机构的情况。当我们进行授权时，一定要问一下自己：他理解并坚持中华骨髓库的志愿者招募原则吗？他是当成一种使命，为患者的利益和中华骨髓库的长远发展着想，还是当成一种行政摊派，一种负担，凑足人数草草应付了事？这些，都是应该事先把握，事后进行结果控制的。二是部分志愿者觉得反正配型成功率蛮低的，“哪就让我配上了呢”？没有心理准备，果然配上了，心里忐忑不安。三是家人不理解，害怕对健康有损害，反对捐献。其实很多时候是志愿者本人对捐献造血干细胞的知识和过程不了解，心里害怕，有很大的心理压力，想逃避责任，自己又碍于面子，只好把“家人反对”做为挡箭牌，自己当逃兵。

针对这些原因，如何通过改进我们的工作，提高中华骨髓库的有效库容呢？

首选，我们还得广泛宣传捐献造血干细胞救人一命无损健康的科学常识，宣传捐献者花一点时间，承受一点一过性不适就能救人一命的事实。目前，还有很多公众不太认识、了解捐献造血干细胞知识，而媒体宣传的新闻性在降低，媒体主动宣传的积极性在下降，要想进行广泛宣传，必须要有新方法，新形式，新思路；其次，一个合格的捐献志愿者，必须具备意愿坚决、健康允许和工作稳定这三个方面的条件。我们认为，在志愿者招募目标人群的选择上，年龄在 20-45 岁之间，城镇固定人口，且有稳定的工作和经济收入，有献血经历，不期望通过捐献造血干细胞得到任何好处的人，是我们宣传和招募的对象。各分库都有与当地血液中心密切配合，招募到了合格志愿者的经历。

今年中华骨髓库管理中心首次提出“有献血经历人群中招募捐献志愿者”，那么，是无偿捐血者都可以成为中华骨髓库的志愿者吗？当然不是，我们还得从“意愿、健康和稳定性”这三个方面把握。目前，捐献造血干细胞，远没有捐血社会认同率高。这有传统观念制约的原因，有宣传不到位的原因，还有实现各自目标的程序不同的原因。无偿捐血者，不管是学生也好，军人也好，打工者也好，不管他捐献时是深思熟虑还是一时冲动，捐了血，临床化验合格就能用到病人身上，就实现了目标。参加造血干细胞捐献，抽了血样，仅仅是表达了一种意愿。实现这个意愿，也就是说实现捐献造血干细胞救助患者生命的目标，可能很快，也可能是 10 年或 20 年后。时间久了，志愿者生存环境，健康状况，思想状态都会发生变化。要提高中华骨髓库有效库容率，需要捐献志愿者持续坚持捐献意愿。

第三，骨髓库管理人员的思想状态、自身素质和工作水平，直接影响到中华骨髓库的有效库容。造血干细胞捐献志愿者来自社会的各方面，各阶层，性别、性格、家庭及工作环境各不相同，让大家认识、了解捐献知识，加入进来，并保持着志愿者的捐献意愿，是一个复杂而又繁重的工作。这需要工作人员有一定的心理学、社会学知识，在进行志愿者招募时，要从自己的知识架构，社会阅历和经验中，准确地判断出，哪些人是能陪骨髓库从头走到尾的人，他会因为配上型有了服务他人的机会而欣喜，他会感谢中华骨髓库为他搭建的这个爱心平台，他会让你品尝到工作的快乐和成功的喜悦。面对形形色色的人，一个具有丰富知识的工作人员，不仅能很快与捐献者寻找到共同的话

题，拉近彼此间的距离，让他对你产生信赖。还能准确地判断出，阻碍志愿者成为捐献者的真正原因是什么，然后针对具体情况进行心理疏导，帮他实现生命的跨越。

总之，提高中华骨髓库有效库容，是一个系统工程，让我们从大处着眼，从小着手，通过科学化、精细化的管理，为中华骨髓库的建设和发展，为拯救更多的血液病患者的生命做出新的更大的贡献。

## 2-10

# 克服困难 积极招募少数民族志愿者

李爱华

云南分库（650106）

云南省地处祖国西南边疆地区，边邻越南、老挝、缅甸3国，常驻人口4000多万，有25个世居少数民族，少数民族人口1433万，占人口总数的三分之一。大力发展少数民族志愿者是中华骨髓库领导及省红十字会领导对云南省分库提出的要求和任务，云南省分库在建库开始就制定了重点发展少数民族志愿者策略。建库6年来，发展入库志愿者9630人，其中有傣、白、纳西、彝、藏、瑶、哈尼族等少数民族志愿者1998人，占入库志愿者比例为21%。已捐造血干细胞的14名志愿者中，有彝族、白族捐献者各1人，占捐献人数的14.28%。

现将云南省省重点发展少数民族志愿者工作情况总结汇报如下：

### 一、建立健全少数民族地区州市工作站，广泛宣传和招募少数民族志愿者

云南省有16个州市，山区多而坝子（平原）少，地理情况复杂，十里不同天，由此交通十分不方便，最远县份单程距昆明市有1000多公里，乘车到达需1天以上。建库初期配合云南第一例捐献者胡玉高在媒体给予高度关注热潮下，云南分库在数千名报名者中，优先筛选少数民族志愿者并在采样过程中进行第二次宣传，坚定他们捐髓救人的爱心和决心。稍后，云南分库开始在文山（壮族、苗族）、普洱（哈尼族、彝族、拉祜族等）等少数民族较多且交通方便、州市红十字会有专职干部的州市建立了第一批工作站，广泛宣传、动员，招募了大批的少数民族志愿者。

借云南省政府187号文件的东风，云南省大部分州市理顺了红十字会体制，云南分库先后在红河（哈尼族）、丽江（纳西族）、楚雄（彝族）、德宏（傣族）等7个州市建立了工作站。至2007年底，云南分库共建立11个州市工作站和1个县级工作站，占16个州市的75%。

### 二、给予经费补贴，提高州市工作站的积极性

云南省少数民族的分布主要集中在少数民族自治州，所以云南分库将募集少数民族志愿者的重点放在少数民族自治州，并对募集少数民族志愿者的工作站给予特殊政策：1. 比如提供大量的宣传用品及宣传折页；2. 按少数民族志愿者的采样人数直接给予经费补贴；3. 少数民族志愿者入库较多的州市在年终给予先进工作站的奖励（普洱、文山、红河工作站曾）。

### 三、云南分库以少数民族白血病患者配型困难为题，广泛开展讨论

云南分库结合著名京剧小演员陆地园患白血病后无法找到合适供者为例（陆地园民族为彝族的一支系，陆地园为云南本土的著名京剧小演员，多次受邀参加中央电视台春节联欢晚会演出，受到



党和国家领导人的称赞。他的患病在云南省引起了社会各界的高度关注)，在全省开展宣传、讨论，让广大的少数民族志愿者认识到他们救人是为了自救。只有大量发展少数民族志愿者，本民族的白血病患者才有更大的生存机会。

#### 四、为少数民族志愿者服务到家门

云南分库为了扩大少数民族志愿者的入库量，分库工作人员及采血护士亲自驱车到偏远的地区，江城县（边邻越南、老挝“一县邻三城”）为少数民族志愿者采集血样，到普洱市一个偏远的傣族村寨为傣族志愿者采集血样并进行二次宣传。2007年底，云南分库工作人员分别到丽江市的宁蒗县摩梭村为云南特有的摩梭族志愿者采样，路途经过山区地带，遭遇大雪，险象环生。

#### 五、云南分库在募集少数民族志愿者中的几点感受

1. 云南分库至建库至今，少数民族血液病患者配型相合人数少，高分辨相合人数更少。扩大少数民族志愿者的募集，不仅是云南分库工作的重点，也应该是各分库应该重视的问题。

2. 少数民族因文化、教育、家庭等因素的影响，对献血、捐献造血干细胞误解较深，宣传发动有一定的难度，需要全社会的支持和参与。

3. 偏远地区少数民族志愿者的再动员联系上有一定难度，费用较高。

以上内容是云南分库在发展少数民族志愿者过程中的一点感受，我们决心克服种种困难，积极招募少数民族志愿者，为中华骨髓库的发展做出应有的贡献。

## 2-11

### 做好涉外捐献 搭建服务新平台

陈泽池 吴梦晴

广东分库（510060）

广东分库于2005年7月经广东省编办批准成立，于2006年1月正式运作。目前广东分库已有25000余名志愿捐献者，有19位志愿者与国境外患者初次配型成功，寄送了9份血样到美国、新加坡、韩国、香港等地，其中有4名志愿者实现跨国（境）捐献造血干细胞，体现了爱心无国界的红十字精神。在涉外捐献工作中，我们遇到许多的问题和困难，在实践中摸索了一些经验和体会。我们的主要做法是：

#### 一、提高认识，做好再动员工作。

耐心细致的再动员工作是保证涉外捐献顺利进行的前提。一接到总库通知，我们首先联系志愿者，对志愿者的捐献意愿再次确认，大部分志愿者得知与自己配型成功的竟是国境外患者时，通常都感到很惊喜和幸运，往往会毫不犹豫的表示愿意履行捐献承诺，这时候我们不能太急于求成，要给志愿者充分考虑的空间，要保证志愿者绝对是能够义无反顾的捐献。大多数志愿者报名时一般没与家人商量，而一旦要捐献，往往是家人这一关不易通过，如果是一般的捐献，有时志愿者强烈要求无须通知家人，我们根据实际情况考虑后，有时会尊重志愿者的意愿，不通知家属。由于涉外捐献意义重大，影响广泛，因此我们要求志愿者一定要与家人商量后再作决定，如家人有疑虑，我们

上门解释，向志愿者及家人详细介绍相关的科学知识、捐献的过程和意义，帮助做通家人的思想工作，消除志愿者的后顾之忧。广东涉外捐献的所有志愿者，每一位都得到家人的理解、支持与配合。广东分库首位跨国捐献者李安，于 2007 年 9 月 18 日赴北京采集造血干细胞，当时太太已有五个月的身孕，家里又没有其他人可以照顾她，当她得知先生捐献救人的善举后，很赞同也很支持，要先生不必担心她，只管上京捐献，后来还是李安放心不下太太，最后让太太陪同前往北京。

## 二、协调各部门工作，建立快捷、安全的高分辨血样速递通道

血样属于特殊物品，出境手续相当复杂，涉及的部门也很多，因此要协调好各方面的工作。血液样品出境涉及严格的法规和程序，必须经过出关审批，在去出入境检验检疫局办理审批申请前得到省卫生厅办理《医用特殊物品准出入境证明》，由于大部分高分辨血样邮寄前都没有经过检验检疫，卫生厅科教处此前没遇到过这类问题，一开始一定要我们提交检疫证明，我们主动、耐心详尽的向他们介绍造血干细胞库的工作性质和血样邮寄的意义和用途，说明所邮寄的血样只用于 HLA 配型检测，不用作其他用途，经过多次的交流与沟通，取得他们的理解和配合，以后每次去申请，只要带齐材料都予以即刻办理。拿到卫生厅的出入境证明后，就可以去出入境检验检疫局办理卫生检疫审批。首先在网上报检，网上审批通过后带齐相关材料去取正本批件。检疫局每周只有两个工作日可以取正本批件，由于我们之前的协调工作比较到位，有时时间紧迫，错过正常工作时间，他们也会给我们办理，从而为患者争取到了宝贵的时间。在确定办妥出境手续所需的时间后，就要联系志愿者采集血样，争取在拿到审批单的当天能寄出血样。韩国、香港等不同地方实验室对样管规格、抗凝剂、数量的要求不同，需根据不同需要采样，采样后交付邮局寄送，由于之前在国内邮寄血样时，我们已与当地邮政部门建立了良好的合作关系，市邮政局指定专人负责造血干细胞库血样寄递工作，一接到我们电话通知，即刻上门收取，优先投递。血样邮件对时限、安全有着特殊要求，为此，在整个运递过程中，各环节都要小心处理，紧密衔接，既要保证血样封装、运送的安全，又要保证血样能尽快发运，血样寄出后还要注意在网上跟踪查询，确保在规定的时限内安全、准确寄至对方实验室。

## 三、以捐献者为本服务于患者，为造血干细胞捐献提供优质服务

按总库惯例，涉外捐献一律得去北京采集，因为去北京捐献的时间较长，因此要先帮志愿者请假，有时为避免志愿者因紧张焦虑而致情绪不稳，可请一名志愿者家属陪同前往，安排好志愿者及家属赴京采集期间的交通、食宿等，使志愿者保持良好的心态，在没有任何压力和负担的情况下，轻装上阵，轻松捐献。捐献时，总库管理中心领导前去慰问，颁发荣誉证书，送上鲜花，称赞捐献者的大爱善举。捐献结束，国境外前来取造血干细胞的人员进行有关核对事宜，总库管理中心领导与取造血干细胞的人员双方进行签字交接后，来人带上总库管理中心事先办理好的造血干细胞出境手续，顺利出关。

几点体会：

一、领导重视是前提，有了领导的重视和支持，涉外捐献各个环节的工作均得到了很好的落实。像邮寄血样出境，与省卫生厅，省出入境检验检疫局的沟通，均是部门领导亲自出面协调解决，才确保通关手续顺利办妥，为以后的工作打下良好的基础。对于每一例涉外捐献，各级红十字会均给予高度重视，捐献者所在市红十字会积极协助分库做好与捐献者单位和家属的联系、沟通工作，

召开欢送大会欢送捐献者赴京采集，成功捐献后省红十字会举行欢迎仪式迎接捐献者凯旋归来，感谢捐献者对红十字公益事业的大力支持和热心参与，并对捐献者无私奉献，挽救他人生命的善举予以肯定和表彰。

## 二、提高认识，精心组织，周密安排是关键

跨国造血干细胞捐献，体现的是血浓于水的同胞之情，是海内外华人患者生命的彼此关怀，是红十字爱心无国界精神的最佳诠释，不仅维系着患者与供者之间的联系，更关系到国家与国家之间的合作。因此，我们要充分认识到从事这项工作的重要性和神圣职责，进一步提高认识，增强责任感和使命感，恪守以捐献者为本服务于患者的原则，精心组织，周密安排，增强服务意识，提高服务质量，以严谨、规范、科学、细致的工作态度认真对待每一例捐献，确保捐献工作的顺利进行。

两年来，我们在涉外工作中，做了一些探索，但还有许多不完善的地方。今后要严格按照总库要求，学习借鉴兄弟分库好的经验和做法，积极探索，努力实践，进一步做好涉外捐献工作，为促进中华骨髓库建设，救助海内外同胞患者作出应有的贡献。

## 2-12

# 动脑 造势 借力 做好捐献造血干细胞宣传工作

赵书平

河北分库（050071）

近年来，河北省分库在总库管理中心和省红十字会的领导下，库容量从2003年底的1230人份增至目前的5.2万人份，提前一年超额完成省政府下达的任务目标。由最初的零捐献到实现年捐献突破16例。全省已实施捐献33例，其中两名供者分别为香港和韩国白血病患者实施了捐献。回顾河北分库的成长历程，我们的主要体会是要充分动脑、充分造势、充分借力，全方位开展造血干细胞志愿者招募和捐献的宣传工作。全面提高社会认知度，优化干细胞志愿捐献环境，推动志愿捐献工作健康发展。

## 一、充分动脑——注重多种形式宣传、营造良好舆论的氛围

捐献造血干细胞工作在社会上是一项新的人道主义救助事业。要想使社会各界人士了解、认识、参与并思想坚定的捐献造血干细胞，拯救患者的生命，首先要开动脑筋，做好多种形式、多措并举的宣传，营造良好舆论的氛围。为保证每位志愿者配型成功后顺利实施捐献，我们利用各种电视、广播、报刊的形式的宣传造血干细胞捐献科学知识和意义。同时，发挥捐献者现身说法作用，成立了我省分库造血干细胞捐献者联谊会，将6名捐献者聘为宣传员，让他们参与到再动员工作中。我省为香港患者实施捐献的志愿者，起初由于家人的顾虑，迟迟不能实施捐献，省分库请捐献者王鸿飞上门现身说法，最终让他的家人打消了疑虑，使我省首例跨境捐献得以实施。在宣传动员工作中，我们注重动之以情，晓之以理，分库每个工作人员和宣传员都充满爱心、带着感情去做艰苦细致的宣传动员工作。这样不但提高了宣传效果，而且有效地提高了我省供者履约率。秦皇岛市红十字会抓住本市连续两例成功捐献造血干细胞的实际案例，在网站上大力宣传普及造血干细胞捐献知识，

以典型事例影响和教育广大市民，引导群众志愿奉献爱心行为。张家口市红十字会以该市下岗再就业女工郭清华身处困境，却毅然捐献造血干细胞、用爱心回报社会的生动事例，进行广泛的社会宣传，唤起广大民众参与捐献造血干细胞的主动性和自觉性，收到了较好的典型引路作用。

### 二、充分造势——注重利用节日和举办大型活动，推动捐献工作的广泛开展

分库在重大节日期间，积极开展宣传动员工作，并以此作为分库的常规工作，常抓不懈。每年“5·8”世界红十字日、“6·14”献血者日等社会公益活动时，分库都会开展全省联动的社会宣传与动员活动，使得造血干细胞捐献工作逐步深入人心，宣传效果及招募志愿者力度逐年增强。2006年，分库接受了紧急招募3万名志愿者的任务，在时间紧，任务急的情况下，我省各级红十字会以高度政治责任感和强烈的使命感，克服困难、上下配合、打造声势、齐心协力，圆满完成了招募3万志愿捐献者的任务，受到了中华骨髓库的表彰。各地红十字会结合本地实际，还主动策划组织捐献造血干细胞大型宣传动员活动。我省邯郸永年县县委、县政府领导高度重视社会公益事业，县红十字会积极争取领导，努力打造捐献事业的声势，争取县委、县政府把组织动员公民志愿捐献造血干细胞作为该县精神文明建设的重要举措。在2006年紧急招募志愿者工作中，取得一次现场采集造血干细胞血样2000多人份的基础上，2007年8月30日，永年县又成功举办了万人捐献造血干细胞、千人捐献眼角膜大型公益活动，创县级志愿捐献造血干细胞和眼角膜人数全国之最。中国红十字会常务副会长江亦曼亲临现场，对活动的开展给予了高度评价。永年县红十字会在做好宣传工作的同时，志愿捐献者思想工作也做得深入、扎实。他们两次大型活动招募的志愿者，在与患者配型成功后，都义无反顾的捐献了造血干细胞。没有反悔的志愿者。

### 三、充分借力——注重与新闻媒体力量的配合，适时进行宣传报道

建库伊始，分库把开展多种形式的宣传工作作为头等工作。一是宣传动员与志愿者招募同步进行，组织志愿者走上街头，发放宣传品，介绍捐献知识和意义，同时进行集中地点的捐献采集。二是在省内电台、电视台及报纸上，大量刊登有关捐献知识，介绍捐献意义。通过宣传，使社会大众对干细胞捐献有了一定的认识，纠正和扭转了一些错误认识。志愿捐献人数得到一定数量的增加。2004年11月26日我省实现第一例非血缘性造血干细胞捐献时，我分库进行了周密的宣传策划，联合中央电视台和省内各大新闻媒体对整个捐献过程进行跟踪报道，捐献第一人周伟年内被评为“2004年度感动河北十大新闻人物”。周伟高尚善举的适时宣传报道，有力推动了全省的志愿捐献造血干细胞工作的开展。此后，在新闻宣传过程中，我们注重挖掘每一例捐献者爱心奉献闪光点，进行深度挖掘报道，在全省范围内不断掀起志愿捐献造血干细胞的新高潮。由于分库积极争取社会新闻媒体和合作与支持，宣传工作到位，有效的推动了志愿者捐献工作的开展，造血干细胞捐献在全省已经成为大家所共同推崇的有利于社会，有利于人类健康的阳光事业，为造血干细胞的捐献工作也营造了健康和谐的人文环境。在红十字会宣传工作中，造血干细胞宣传报道的篇目最多，造血干细胞的捐献工作成为红十字事业良好的[品牌工作]。

我们感到做好宣传工作，主要是会领导高度重视，各级红十字会积极配合、社会新闻单位大力支持。今后我们一定还要加强学习，扎实工作，不断提升我省分库的整体素质。狠抓质量，在积极稳妥地扩大库容的同时，确保高效、快捷服务。为构建和谐社会、加快小康建设步伐做出应有的贡献。

## 认同和激励机制对志愿者组织的重要性

金辉 杨曦

北京分库（100073）

2004年12月30日，北京市红十字会造血干细胞捐献志愿者之家（以下简称志愿者之家）成立了。志愿者之家是依据《北京市红十字会关于红十字志愿者管理办法（试行）》的规定，在中国造血干细胞捐献者资料库北京管理中心领导管理下的志愿服务群众组织。

三年来，在北京分库的带领下，志愿者之家的会员们走进了校园、走进了社区、走进了企业，传播着奉献、真诚、助人为乐的高尚精神；普及造血干细胞捐献知识，传递人间挚爱。用爱燃起他人生命的希望；用欢笑和泪水在生命里刻画出情的髓缘；以彼此的牵系和信任拥有了比自身更重要的人生价值和闪亮精神。

至今为止，志愿者之家已有会员182人，其中公开招募会员104人，捐献者会员74人，特邀会员4人。志愿者之家逐步建立起一个有效的动员机制和组织架构，各种章程制度也日趋完善。在拥有了相对健全的管理机制的基础上，志愿者之家积极的服务于社会各界，得到了社会的广泛关注与好评。

### 一、如何使志愿者认同志愿者之家

要使志愿者之家的志愿者保持积极的工作心态，就要建立一套认同机制，认同机制的实质是通过各种方式激励志愿者工作，满足他们的激励需求。

**（1）认同需求：**志愿者需要别人对他的志愿者之家会员身份给予认同，这需要采取一定方式，比如证件、统一服饰等等。志愿者之家为每一位会员制作了统一样式胸卡式会员证、订制了分别用于夏季和秋冬季志愿服务的T恤和马甲。

**（2）成功认同：**要让志愿者感到他通过努力将能够做成一件事情。志愿者之家为每类志愿服务，如中心服务、供者服务、采血服务、校园行等都制订了非常详细的服务指引，订立明确的工作目标，志愿者很容易获得成功的喜悦。

**（3）控制需求：**这要让志愿者感到他们需要有一定的独立性。志愿者之家的志愿服务在落实到具体志愿者、提出具体的服务目标之后就不再进行过度的干预，而是鼓励志愿者在服务指引的帮助下独立完成。在很多细节上，志愿者需要自己做出决定。

**（4）变换需求：**所有的人都会厌烦不停地做一件事情，志愿服务也是这样，要让志愿者的活动丰富多彩。志愿者之家考虑到这个特点，预防志愿者厌烦他们的工作，设计了不同的志愿服务岗位，让他们不断挑战新目标。

**（5）增长的需求：**要让志愿者感到自己所从事的志愿工作有发展的空间，可以增长知识和才干，丰富自己的人生。志愿者之家邀请专家开办讲座，为大家介绍造血干细胞基本知识、白血病治疗方法、世界骨髓库情况、红十字运动知识等。此外，志愿者之家讲座范围还涉及传播技巧、服饰礼仪、色彩化妆、新闻写作等等。同时，在各种活动的策划、组织、实施、报道、总结的过程中，

所有参与会员的能力都得到了提升。

**(6) 人际需求：**这要求志愿者之家要通过一定方式让志愿者感到有一种归属感，被组织接受，得到大家的关爱，分享集体的忧愁与喜悦。志愿者之家会不定期的组织聚餐、郊游、聚会，联络感情。每月一次固定时间、固定地点、不限主题、不限人员的沙龙，更成为志愿者交流的平台。

**(7) 权力需求：**志愿者之家要创造一定条件让志愿者能够通过自己的努力来影响别人的行为。要赋予他们一定的领导地位，提升在组织中他们的位置。志愿者之家下设办公室、事业规划部、志愿服务部、供者服务部、会员管理部、网络技术部、宣传事务部和4个公开招募会员组、1个捐献者会员组、1个特邀会员组，各部各组都设部长副部长、组长副组长，让志愿者承担更多的责任。志愿者之家欢迎所有会员参加每月一次的例会、在例会上发言、担任具体志愿服务项目的联络人等等。

**(8) 乐趣需求：**千万不要认为这一点可有可无，其实很重要。志愿者之家要满足志愿者乐趣和挑战的需求，要让他们感到志愿活动充满享受。

**(9) 追求独特的需求：**这是一种独特的情感，是自我满足的一部分。

当然，志愿者们不是满足于以上的所有需求，不同的人有不同的需求。而且，同是一个志愿者，在不同的时期会有不同的需求。

## 二、志愿者之家如何激励志愿者

志愿者之家是一个有机体，在这个大的有机体里，每一个志愿者个人好比是一个个小的有机体，只有当会员个人的需求得到满足，志愿者之家这个大的有机体才能有效率的工作。既然需要是人的行为之源，是人积极性的基础和原动力，也是我们面对志愿者时所要考虑的首要因素。那么什么是需求？志愿者之家应该如何满足志愿者在不同层次的需求呢？

马斯洛的需求层次论认为人是有多多种多样需要的，概括为低级需要（也就是缺失需要）和高级需要（也就是发展需要），由低到高依次为：生理需要、安全需要、社交需要、尊重需要、自我实现需要。这个理论认为，人的需要不仅有层次性，还有递升性、主导性，差异性和例外性。一般来说，只有低层次的需求得到了满足，才能产生更高级的需要。个人的价值观、成长环境、生活经验、对行为的认知和期望以及人性本能欲望，都会产生不同层次的需要。

通过这些，我们可以看出，人不仅是一个生物有机体，也是一个心理有机体；不仅具有动物性，更有社会性。人总是通过寻求全面的、成长的发展而竭力满足自己的需求。

这个理论对志愿者之家的意义在于提示我们——志愿者的需求是多层次的。而且，往往是高层次的。

志愿者有三个要素——志愿选择、无偿服务、造福社会。

无偿服务，这不意味着对于志愿者就没有回报可言。志愿者在提供志愿服务的同时，也希望获得自身利益、需求的满足。当然，志愿者的利益诉求不同于经济组织的物质因素，也不同于政治组织的权威因素，而是“事业共同体”中的自我激励，志愿者往往希望在志愿服务过程中不断获得激励，这是一个不断互动和建构的过程。也就是说，志愿者注重服务过程中不断自我激励，以及通过社会评价体系逐渐强化这种激励。

我们必须区分志愿者追求回报和社会提供回报的区别。志愿者应该得到社会的表彰，一方面

可以弘扬志愿服务事业，吸引更多人参与；另一方面让志愿者在志愿服务过程中受到尊重、得到理解，产生长期奉献社会的意愿。

虽然志愿者的服务是源于奉献和爱心，但是平心而论，极少有一项事业仅仅凭着拳拳爱心、满腔热情就能发扬光大；也没有哪个组织仅凭精英领袖或理想旗帜就能长盛不衰。志愿者之家必须通过探索和建立有效的激励模式，保护、维持志愿者的热情，让他们在服务中感受快乐，获得回报。实际上，志愿者之家的活跃程度和志愿服务活动之间有着明显的关系，而志愿者作为志愿者之家志愿服务的主体，承担着体现志愿精神、传播人文关怀、促进社会公平等公益使命。

如何能够激励志愿者在志愿者组织中更有效、更长期的发挥作用，为社会贡献价值，是志愿者之家一直在思考的。同时，这也是志愿者之家提出的“加强服务性”，“更好的为会员参加志愿服务而服务”理念的根源所在。

志愿者提供志愿服务，即使效果再好，如果得不到来自组织的回应，很可能会让他们觉得没有成就感或自己的努力没有得到认可，久而久之，在某种程度上会影响志愿者工作的积极性。

### 三、志愿者之家的激励机制

#### 1. “关怀意识”——志愿者之家激励机制的出发点和立足点

作为志愿者之家，在激励时要注意：

机构激励——志愿者都希望得到组织的认同及激励，比如发放会员证、统一标志、统一服装，都表示组织对志愿者服务的认同及支持。

持续激励——志愿者组织要有持续的激励行动，每天都要保持感激之心对志愿者做出关怀，记下志愿者的成绩和优点，当面对他们进行称赞。

适时激励——激励要尽量贴近行为出现的时间。

公正激励——公平公正的嘉奖所有的志愿者。

针对激励——针对某一成就或者某人提供嘉奖和激励。

进入志愿者之家的志愿者都拥有崇高的利他想法，这使得他们愿意在没有太多实质奖励的情况下提供服务。

志愿者之家与志愿者之间是和谐统一的，正是这种有机整体构建出了志愿者从事志愿服务的施展空间。但是和谐空间是需要组织与其成员共同付出努力的。

志愿者之家对会员激励措施的形式可以多种多样，但始终要突出“关怀意识”——对志愿者的关怀。一份最具诚意的感谢、嘉许，坦诚地面对会员的需求，才是维系会员参与志愿者之家志愿服务的原动力。

#### 2. 志愿者之家的星级评定体系

中国红十字会制定的《中国红十字志愿服务管理办法》和由共青团中央主导的《中国青年志愿者注册管理办法（试行）》都涉及了志愿者星级评定的内容。《中国红十字志愿服务管理办法》规定：根据志愿者服务时间和贡献，设立一星至五星级志愿者奖励和终生志愿者奖励。

根据这些规定，结合志愿者之家实际，从2007年开始，我们建立了细致的志愿服务记录、计时、评价、反馈体系。建立了从青铜一星到钻石五星共五级二十五等的星级志愿者评级体系。

首先，志愿者之家为会员详细的记录志愿服务时长，不论是实际参与志愿服务，还是策划、组

织、联络、安排，还是参与志愿者之家组织建设，还是联络社会各界朋友助力公益事业。只要是志愿者之家出了力，操了心，都会在时长上有所体现。时长的上报通过志愿服务部记录和会员自报两种途径实现。会员自报可以将志愿服务部可能不掌握的时长统计上来，最大程度的尊重志愿者、信任志愿者，通过在论坛上公示，得到大家的认可，记入会员的志愿服务时长中。

在详细、准确记录志愿者志愿服务时长并在志愿者之家论坛公示的前提下，根据志愿者志愿服务总时长评定星级。志愿者之家星级评价体系分为五级，分别是——青铜志愿者、白银志愿者、黄金志愿者、铂金志愿者、钻石志愿者。每个层次都设五星级，如“青铜一星志愿者”、“白银三星志愿者”、“黄金五星志愿者”等。

青铜至铂金为晋升，钻石以上为选升。其中青铜级每 50 小时晋一颗星；白银级每 100 小时晋一颗星；黄金级每 200 小时晋一颗星；铂金级每 300 小时晋一颗星；钻石级以上为选升，不再以时长的增长为唯一标准，而要在具备五星铂金志愿者的基础上为公益事业作出特殊的、更大的贡献。最高等级为钻石五星志愿者。

按照这样的计算方法，达到铂金五星志愿者需要 2950 小时的志愿服务时间，符合志愿者之家打造终生志愿者的理念。

志愿者之家会员管理软件系统专门设有时长统计、汇总并换算星级的功能，通过技术手段降低管理成本、提高工作效率。

在志愿者之家会员证上，准确的标明持证志愿者的服务星级，并及时更新。

到目前为止，志愿者共评定出 33 名星级志愿者，其中白银一星 2 名；青铜五星 3 名；青铜四星 4 名；青铜三星 4 名；青铜二星 8 名；青铜一星 12 名。

### 3. 激励措施像空气一样弥漫在志愿者之家

除了星级评定之外，一些灵活、适时的关怀措施对于志愿者来说也是非常重要的，这代表了志愿者之家对志愿者的重视程度。除了每年一次的年会表彰、每月授予优秀志愿者、优秀干部、优秀组长、服务之星等荣誉称号之外，随时可以进行的网络嘉奖、纪念品的赠予、邀请参加工作会议、真诚的感谢、征求志愿者的意见、信赖志愿者、生日时的祝贺、体谅志愿者的时间和项目安排等等都是关怀的形式和方法。

除了外在的激励措施之外，也要强调志愿者来自于志愿服务本身的内在激励，如更多的责任、更有挑战性的工作、个人成长的机会、参与决策、更多的自主权、多样化的活动等。

在激励的过程中，志愿者之家始终在警惕物化的奖励（包括时长和称号）会使奖励的意义大于志愿服务的意义，会消除志愿者参加志愿者之家的内在动机，使志愿者丧失实际行动的动力，甚至还会因为竞争奖励而伤害志愿者彼此之间的感情。因此，志愿者之家的激励更多强调的是志愿者内在的助人动机及志愿服务体验对于个人的帮助。

志愿者之家始终牢记，激励措施只是手段，奉献精神才是目的所在，绝不能把手段当作目的。

### 四、在激励措施帮助下志愿者之家所取得的成绩

在 2008 年 1 月 8 日北京市红十字会举办的“红十字会与奥运同行——走进 2008 揭幕盛典”上，年度公益团队、红十字博爱奖和年度公益人物都被颁给了志愿者之家或者志愿者之家的会员。给年度公益团队——志愿者之家的颁奖词是这样写道：“这是一个温暖的家，一个能温暖所有人、特别



是白血病等恶性疾病患者和家属的家，拥有 180 多名兄弟姐妹。点点滴滴，日日夜夜，他们将造血干细胞捐献这支生命之烛燃烧的更旺更亮，去照亮更多的人。无穷的远方，无数的人们，都与我有关。”

正是在北京市红十字会、中华骨髓库北京分库的关心鼓励和帮助下，志愿者之家取得了一点点成绩，而我们所取得的一切成绩都归功于可爱、热情、善良、智慧、奉献、无私的志愿者们。

### 1. “青春创意 点亮生命”中华骨髓库北京分库高校海报大赛

为了更好的在北京地区高校推广造血干细胞捐献事业，在北京分库的安排下，从 2007 年 8 月开始，志愿者之家开始策划组织实施“青春创意、点亮生命”——中华骨髓库北京分库高校海报大赛。通过志愿者的努力，海报大赛争取到了北京市红十字会、共青团北京市委、北京市学联的联合主办。志愿者之家作为承办方，完成了从策划、组织、宣传、动员、协调到最后的评审、颁奖礼等一系列的活动。

在长达半年的时间里，志愿者之家深入校园，在北京地区 80 所高校开展了程度不同的造血干细胞捐献宣传活动，举办交流、座谈、讲座七十余场，反响极为热烈。同学们积极参与，踊跃投稿，共征集到来自 51 所高校 709 位同学的 823 幅充满爱心的设计作品。

中央美术学院举行了颁奖仪式。在 2008 年 12 月 23 日举行的大赛闭幕颁奖仪式上，北京市红十字会、共青团北京市委、北京市学联联合发布了由志愿者之家负责起草的《汇聚青春力量传递生命希望——给全市青年的倡议书》。使北京市造血干细胞捐献宣传和推广的力度上了一个新台阶。

### 2. 动员社会力量，为造血干细胞捐献事业提供志愿服务

志愿者之家经过沟通，与一些车友会取得了联系，在车友的论坛上对中华骨髓库北京分库和造血干细胞捐献事业进行了广泛的宣传，取得了车友们的认同。现在北京分库每次采集造血干细胞的时候，如果需要，都由车友会车友出人出车，提供造血干细胞运送服务，不论是送医院还是送机场，车友们都认真、细致、热情、准确、安全的完成。这样的志愿服务既为分库及患者节省了费用，也为更多朋友创造了奉献爱心、近距离的接触造血干细胞捐献的机会，产生了很好的影响。

从 2007 年下半年开始，志愿者之家开始利用会员在航空管理方面的人脉资源，为航空运输造血干细胞提供方便。从地面的安检、贵宾通道，到塔台迅速放飞、重点航班保障等等，得到了民航、空军等多个单位的大力支持。所有这一切，体现了全社会对白血病等恶性疾病患者的关心和同情；体现了造血干细胞捐献事业极大的吸引力、闪烁着志愿者爱心奉献的光辉。

### 3. 发挥会员主动性创造性，积极开展各种宣传活动

志愿者的创造力和志愿者之家的执行力共同成就了一个个丰富多彩的造血干细胞捐献宣传活动。除了常规的供者服务、采血点服务、高校宣传服务、社区宣传服务之外，志愿者之家很多活动很有特色。

2007 年夏天，志愿者之家采用自行车骑行的方式在北京城区宣传造血干细胞捐献知识。骑行队伍一行 30 人，身着统一服装，自行车上绑着统一的旗帜、标语，从积水潭出发，沿二环路、地铁至天安门，再回到北二环，沿途经过商业区、居民点、繁华街道、旅游景点，吸引了很多路人的眼光。在骑行过程中，志愿者分工协作，在骑行队伍后面，还有会员驾驶汽车承担保姆车后勤保

障的工作。骑行总行程达到 30 多公里。

志愿者之家还注意利用互联网这一新兴的、年轻人聚集的交流平台，定期在各大论坛、各大车友会、各社区网站上进行宣传。志愿者之家与“六人行”、“天际”网网友合作，在网上开展造血干细胞捐献宣传活动、招募捐献志愿者。2008 年 4 月，60 多位“六人行”网友留样成为造血干细胞捐献志愿者。在捐献之前，志愿者之家贯彻总库“关口前移”、“深思熟虑、义无反顾”的指导精神，在他们的网站上开展了长达 1 个月的网上宣传、答疑，并组织现场活动讲座、咨询，充分了解网友们的想法和顾虑，对有哪怕一点点犹豫、害怕、不理解的都劝其暂缓留样。

联合国秘书长安南曾经说过：“志愿精神的核心，是服务和团结的理想，是共同使这个世界变得更加美好的信念。”志愿服务作为一种自愿的、不计物质报酬而参与的社会活动，并推动人类发展、社会进步的行为，已经成为人类社会生活的重要组成部分，体现着社会的文明进步。

北京市红十字会造血干细胞捐献志愿者之家的工作才刚刚开始，全体会员都有决心、有信心，在中国造血干细胞捐献者资料库北京管理中心的领导下，为造血干细胞捐献事业出一份力，为构建和谐社会的贡献力量。

## 2-14

### 谈中华骨髓库的志愿者管理问题

刘丹莉

广西分库（530022）

中华骨髓库成立以来，得到了蓬勃发展，在社会福利、人道救助等公共事务管理方面发挥了积极作用，与政府组织相互配合，行使着非营利组织拾遗补缺的功能。同时，由于其非营利组织的公益运行宗旨和特殊需求，大量志愿者参与到中华骨髓库的活动中，甚至成为一些活动实施过程中的中坚力量，直接影响项目活动的正常运行和最终效果。因而志愿者管理问题成为其组织发展生活中的主要部分。

#### 一、志愿服务在非营利组织中的概况

志愿者是非营利组织（NPO）区别于政府组织及企业的一个显著特征。志愿者在社会生活中所涉及的领域也非常广，无论是艺术、慈善、教育还是学术、政治、宗教等方面，志愿者都积极参与到组织活动中，成为活动实施过程中的中坚力量，直接影响项目活动的正常运行和最终效果。因此，志愿者管理就成为非营利组织项目活动的重要环节。

志愿服务在美国可说无处不在，美国红十字会就是一个最大的吸收志愿者的组织，美国人普遍认为，志愿者组织能有效地将民众团结起来，致力于加强公民道德修养和提升人的精神境界，通过为邻里提供充满爱心和乐趣的人性化服务项目，为公民参与社会、体验助人乐趣、满足精神领域的深层次需求创造了机会。

但是在中国，根据中华全国青年联合会委员、广东青年干部学院教授谭建光的调查显示，在中国，仅有 5.8% 的青年受访者表示了解国际通行的志愿服务，绝大部分年轻人还只是把志愿服务视

为单纯的学雷锋做好事。但事实上，志愿服务不仅可以产生可观的社会效益和经济效益，还可以为志愿者提供意义非凡的回报。如欧洲青年论坛副主席詹姆斯多雷所说：“志愿服务将给青年人提供软能力的锻炼机会，这些经验通常都是无法通过教育获得的。在欧洲，几乎所有雇主都喜欢招收有志愿者经历的年轻人。因为这些年轻人更有爱心，更有社会责任感，而且他们在社交能力上也更有优势。”

因此，组织完全可以且应该改变旧有的那种“请志愿者来帮忙”的观念，正确地将组织自身需求定位为向社会提供志愿服务的职位和机会，从而达成志愿者和组织的双赢。同时，在相对有限的志愿者资源的争夺中，非营利组织与组织之间的竞争会让 NPO 更注重自己的管理、透明化运作、高效地组织，人性的服务，向更有作为的境界前进。

## 二、骨髓库志愿者组织的管理实践

志愿者的加入，可以有效地降低骨髓库的运营成本，减轻资金压力，使工作产生更大的效能和活力。随着社会环境的发展和竞争的日益加剧，如何建立一支具有高度责任感和灵活性、专业基础的志愿者队伍，并对其进行有效的管理，是所有非营利组织包括骨髓库面临的一个重要课题。

### 1. 志愿者管理的基础是培训和组织志愿者

志愿者管理是指非营利组织对于参加其志愿活动的人员进行招募、选拔、培训、使用和考核的过程。

### 2. 志愿者参加服务之前应当先接受培训

某些观念认为，平时的工作并不需要志愿者的参与，所以不太注重志愿者资源的培养和积累，一到重大活动或工作繁忙的时候，才手忙脚乱地临时“抓丁”。如在面临重大灾情或紧急任务的时候，才会通过报纸媒体呼吁或从手头上登记的志愿者资料中，找来一些人员帮忙。

要知道，在这种状态下找来的临时志愿者，因为并不具备该组织工作所需的知识和技能，组织方也来不及给他们做最基本的培训，志愿者对组织的宗旨、所做事情的来由及目标，都没有清晰的认识。如果仅仅是简单的救灾衣物分类整理、搬运和打包装箱等任务，他们似乎还能胜任。但如果是相对较为复杂的任务，如志愿者再动员，供者陪护和服务等技术性比较强的工作，临时找来的志愿者由于缺乏相关知识的认识，甚至存在文化或者信仰上的冲突，最后不仅没帮上忙，反而把事情办砸了。这是我们在实际工作中得到的惨痛教训。

而且这样匆忙的组合，一方面非营利组织给志愿者留下了行事草率、不严肃的印象；另一方面志愿者虽然完成了任务，但发挥不出积极性，没有主动参与感，做出来的事情得不到组织方的满意和认可。

### 3. 有计划有目的地招募志愿者

广西造血干细胞捐献者资料库在 2004 年成立之初，招募了大量志愿者，登记的志愿队员一度达到上千人。但是，这上千人的队员却没有发挥出应有的作用，等志愿者怀着满腔热忱递交了申请书并通过考核后，由于没有组织恰当的能够动员起所有志愿队员活动和给予及时的反馈，使得部分队员开始怀疑自己加入的意义何在。所以，在没有合适工作提供的时候，最好不要闲置资源，以免降低组织的信誉。应当首先对组织的宗旨、目标以及对志愿者的需求做一个合理的评估，在此基础上建立起一套行之有效的志愿者招聘、培训和管理体制，才开始招募志愿者。

同时，在招募志愿者的时候首先让他们明确志愿者组织的宗旨非常重要。西方学者研究表明：志愿者必须具备三“P”精神，即：热情（Passion），毅力（Perseverance）和专业（Professionalism）。只有具备了这些基本素质的志愿者才有可能长期稳定地参加志愿服务，从而保证组织向有需要的人提供高质量的服务。同时，多个公益组织与组织之间的良性竞争会让公益组织更注重自己的管理、透明化运作、高效的组织，人性的服务，让公益组织向更有作为的境界前进。

#### 4. 关于报酬

志愿服务的实质是对他人提供服务而不索取报酬。即使某些时候志愿者可能获得一定报酬，然而他们工作的动机也决非金钱，而是个人对人道观念的信仰和奉献。红十字运动的七项基本原则之一就是志愿服务原则——“本运动是志愿救济运动，绝不期望以任何方式得到回报。”

但不追求报酬不等于不应该得到报酬，我们并不鼓励志愿者通过志愿服务来获取利润，但是，尊重志愿者的劳动，并为志愿者考虑报销活动相关的费用，如车费、通讯费、基本食宿乃至最低的生活费用，以及办理保险等，应成为非营利组织考核志愿者管理工作重要指标之一。

如南宁市中心血站的“红色爱心”无偿献血志愿服务组织就规定，全天参加服务的志愿者可以拿到 25 元的交通饮食补助，还有统一的服装、帽子和雨伞发放，极大地鼓励了志愿者们的服务热忱。同时，为鼓励社会公众参与志愿服务，还可以依据志愿工作者的志愿服务时间，为志愿者提供个人所得税减免、同等条件下优先获得其他社会服务等报酬形式。政府可以通过给合法的、有授权证书的免税组织工作的志愿者按照一定标准，如志愿服务的时间提供税收减免，以鼓励人们更多地参与和投入公益部门的志愿行动。

#### 5. 建立层级式志愿者培训制度

志愿者加入组织之后，需要对他们进行知识培训，逐步形成起组织内部的凝聚力和向心力，使加入志愿服务变成自动自觉的行为。

培训既增强了志愿者的技能，也是普及志愿服务文化，促进志愿者和组织以及志愿者之间良好沟通的机会。

培训制度应采取层级培训办法。即上一级志愿者管理者负责对下一级志愿者的培训，在完全了解下一级志愿者队伍对培训内容的理解后，帮助和指导下一级志愿者队伍对再下一级的志愿者队伍的培训。

一般而言，骨髓库志愿者的培训内容大致分为：

志愿文化培训：如红十字运动的七项基本原则，志愿者的职责、权利和义务，相关背景知识的培训

志愿技能培训：如宣传和动员捐献者，供者陪护技能的培训，造血干细胞相关知识的培训

资金募集：如筹集善款拯救白血病患者的活动

领袖精神培训、管理模式和管理技能培训等等

#### 6. 满足志愿者的深层精神需求

著名心理学家马斯洛的五需要层次理论是这样阐述的：

人有五种需求，生理、安全、被尊重、社会价值、自我实现。

当前三种需求被满足后，尤其是第三个层次被尊重实现后，（被尊重感来源于很多方面，比如

工作满意感，家庭满意感等)，人们将发现他们有能力为社会作更多的事情，而且在服务于社会的同时，也得到社会对他们的认可，从而认知自己的社会价值。

作为管理方，组织应当适时向志愿者提供这类精神需求，使他们感到自己的奉献和付出是有价值的，是得到了社会认可的。

如经常在公开场合表扬、表彰志愿者，通过报纸电视等媒体宣传优秀者的事迹，或联合政府部门、团委、妇联等及时给予志愿者一定的精神和物质奖励。这就是认可志愿者。认可志愿者就是对那些为组织做出巨大贡献的志愿者进行奖励和激励。

## 7. 指导志愿者开展网络建设

由于志愿服务的无偿性和自愿性特点，志愿者网络的建设十分必要。

(1) 网络的建设有利于最大限度的沟通和交流。

具体到工作中，如服务活动的通知，一是能保证最大程度地通知到每位志愿者，二是网络能够减少通讯成本。通过网络组织志愿者就近参与本社区的服务，减少了志愿者付出的成本，也容易保证服务的质量和后期服务的回访和监控。

(2) 网络的建设有利于发展和组织志愿者。

网络能让更多人尤其是年轻人，能够便捷地了解到骨髓库的活动和近况，有利于更多的人对骨髓库增进了解，有利于今后发展志愿者。

(3) 网络的建设能促进工作，真正帮助更多需要帮助的人。

完善的网络有利于让需要帮助的人得到信息，让那些希望回馈社会的人知道如何提供资源，根据求助者不同的情况，将更容易地得到和实施帮助。

(4) 网络的建设可以增加资金的募集。

网络建设同时也是一种宣传活动，宣传先行是资金募集的重要铺垫和舆论造势，通过网络的几乎无成本的宣传和推广，能够影响到广泛的社会成员，促进善款的募捐和组织的建设。

## 实 验 室

2-15

### HLA Evolution Parallels with Prometheus or Epimetheus? ---Greek Mythology with Memory of Beijing Olympiad---

*Saji, Hiroh*

*HLA Laboratory, NPO, Kyoto, Japan*

Prometheus is mainly remembered for having stolen fire from the gods, and for the terrible punishment he suffered as a consequence. Prometheus along with his brother Epimetheus, were two of the four sons of the Titan. His name signifies“forethought,”(Pro=fore, metheus=sight or think)while that of his brother Epimetheus denotes“afterthought”(Epi=after). They were cousins of Zeus. Prometheus tricked the gods into eating bare bones instead of good meat. He stole the sacred fire in Olympia from Zeus and the gods to give to mankind on earth. As punishment, Zeus commanded that Prometheus be chained for eternity in the Caucasus. There, an eagle would eat his liver, and each day the liver would be renewed. The punishment was endless, until Heracles finally killed the bird.

Zeus' anger did not stop there. He was afraid that the mortals would become closer to becoming god like. He intended to give the mortals one more gift and undo all the good Prometheus had done. He fashioned a hateful being in the shape of a young girl and called her Pandora. Her name means, ‘giver of all’ or ‘all endowed’. Her body was made by Hephaistos, who he gave her form and voice. Athena gave her dexterity and inventiveness. Aphrodite(goddess of Love) put a spell of enchantment around her head and Hermes put pettiness in her tiny brain. She was ready for the world.

Zeus gave Pandora to Epimetheus(brother of Prometheus). Epimetheus knew better than to trust Zeus and he had been warned by Prometheus never to accept gifts from the Olympians, especially Zeus. However, one look at Pandora and Epimetheus was rendered helpless. He could not resist her and accepted her willingly. Pandora brought a Box which was a gift from Zeus. When the gift was ‘opened’, evil and despair entered into this world. Mistrust and disease spread over the wide earth. After Pandora was emptied of her curse, only Hope was left inside. This unreasonable, groundless hope is what turns the curse of life into a blessing.

HLA is the key molecule for adaptive immunity which started to function 400 million years ago, when Gnathifera, fish with jaws, such as shark, diverged from an agnathia animal (lamprey and hagfish). HLA was born at this time and continued to evolve. Jaw animals which could eat solid foods, faced increased chances to contact with parasites (viruses, bacteria, worms and vermin). To prevent the attack of variable

parasites, an adaptive immunity system likely evolved which could deal with many kinds of parasites. Parasites evolved to live in the host, and so the host also had to be evolved to be able to prevent attacks. The cycle was set in place. A host adapts to a parasite attack, resulting in the parasite adapting to the evolution of the host, and so on. As a result, parasites select a resistant host, while conversely hosts select resistant parasites. This endless cycle impacted on HLA directly because HLA is the key molecule of host immunity against parasites. HLA diverged quickly and resulted in large scale polymorphism. In other words, HLA enhanced the rate of parasite evolution, consequently making parasites more variable. Evolution itself is the result of accidental mutation and natural selection, effectively rendering it as a series of afterthoughts and therefore reflective of Epimetheus. 「道常無為而無不為、侯王若能守之、万物将自化」(老子 道經 第 37 章)「上德無為而無不為」(道經 第 38 章)

HLA could however induce adaptive immunity, which led to large anti-parasite activity in animals and humans offering longer and healthier living for mankind. This in mind, it might best be associated with Prometheus. But HLA also made parasites more diverged and induced emergent risks through lethal parasites, such as Bird flu and SARS virus, as modern examples. With this in mind, HLA might better be companioned with Epimetheus and Pandora's Box.

Prometheus



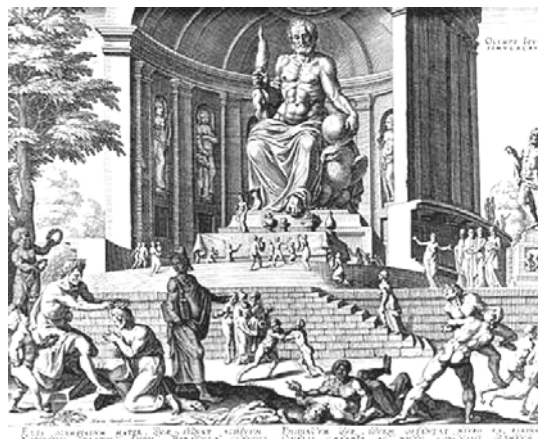
Pandora and Pandora's Box



Epimetheus



Zeus, at Olympia



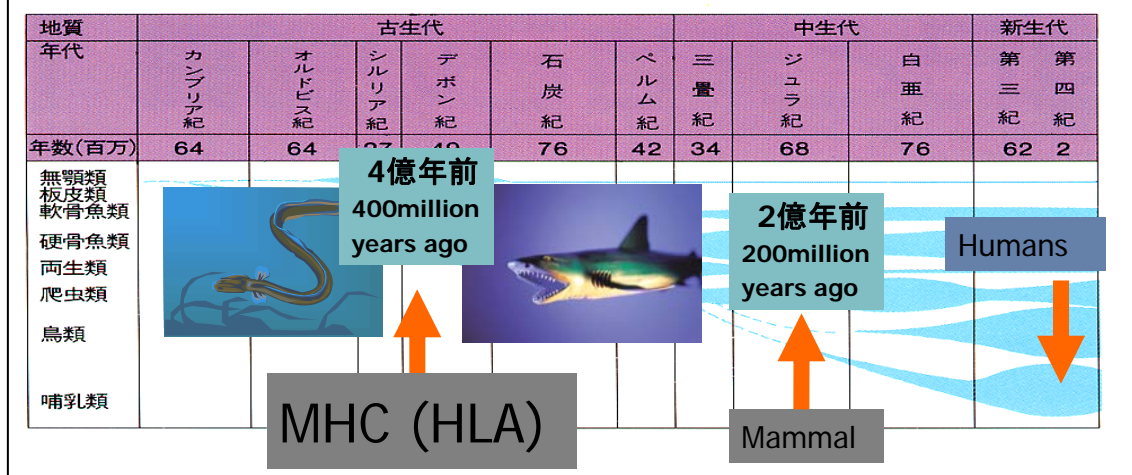
Prometheus chained to a rock having his liver torn out by the eagle.





## When was MHC (HLA) Born?

- HLA was born when 'Gnathifera' was born.
- Jawless Animals → Animal having 'Jaw'.
- Why did Gnanthifera Need MHC (HLA)?



2-16

### 供-受体 HLA 基因分型及错配频率在非亲缘骨髓移植中对选择供体的作用

何 军 鲍晓晶 邱桥成 袁晓妮 李 杨 孙爱宁 吴德沛 陈子兴 阮长耿  
 苏州大学附属第一医院 江苏省血液病研究所

**摘要:** 目的 分析患者在中华骨髓库 (CMDP) 中检索到 HLA-A、B、Cw、DRB1、DQB1 高分辨基因分型全相合 (10/10) 无关供体的机率; 及当供/患者出现等位基因错配时, 如何选择相对合适的供体, 从而充分合理地利用 CMDP 中的供体资源。方法 采用 SBT、SSOP 和 SSP 的实验方法, 对 1092 例正常供体和 931 例待移植病人进行 HLA 高分辨基因分型, 并对检测结果进行统计分析。结果 (1) 在 1092 例正常供体中, 检测 HLA-A\*1101、A\*0201、A\*2402、A\*0207、A\*3303、A\*0206、A\*3001 的基因频率分别为 0.23、0.14、0.14、0.11、0.08、0.06、0.05。检测 HLA-B\*4001、B\*4601、B\*5801、B\*1302、B\*1501、B\*5101、B\*1301 的基因频率分别为 0.13、0.12、0.06、0.06、0.06、0.06、0.05。检测 HLA-Cw\*0102、Cw\*0702、Cw\*0304、Cw\*0801、Cw\*0602、Cw\*0303、Cw\*0302、Cw\*0401 的基因频率分别为 0.18、0.17、0.10、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05。检测 HLA-DRB1\*0901、DRB1\*1501、

DRB1\*1202、DRB1\*0701、DRB1\*0803、DRB1\*0405、DRB1\*0301、DRB1\*1101 的基因频率分别为 0.18、0.11、0.10、0.08、0.07、0.07、0.05、0.05。检测 HLA-DQB1\*0301、DQB1\*0303、DQB1\*0601、DQB1\*0202、DQB1\*0602、DQB1\*0302、DQB1\*0401、DQB1\*0201、DQB1\*0502 的基因频率分别为 0.21、0.19、0.11、0.07、0.07、0.07、0.07、0.05、0.05。(2) A\*0201、A\*0207、A\*0206、A\*0203 这四种基因型共占 A2 的 97.6%，各自比例为 39.1%、29.9%、17.3%、11.4%；A\*1101、A\*1102 共占 A11 的 99.6%，其比例为 89.5%、10.2%；A\*2402 占 A24 的 96.0%；A\*3303 占 A33 的 98.9%。B\*4001 是 B60 的基因型；B\*4006、B\*4002 是 B61 的基因型，比例为 63.6%、33.3%；B\*1501、B\*1527 是 B62 的基因型，比例为 74.4%、11.6%；B\*1502、B\*1511 是 B75 的基因型，比例为 69.5%、30.5%；B13 中 B\*1302、B\*1301 的比例为 56.6%、43.4%；B51 中 B\*5101、B\*5102 的比例为 77.1%、22.9%；B39 中 B\*3901、B\*3905 的比例为 83.3%、13.6%；B27 中 B\*2704、B\*2705 的比例为 66.1%、28.6%。Cw\*0304、Cw\*0302 是 Cw10 的基因型，比例为 60.6%、38.6%；Cw\*0303 是 Cw9 的基因型。DRB1\*0405、DRB1\*0406、DRB1\*0403 共覆盖了 80.1%的 DR4，各自比例为 46.9%、22.1%、11.0%；DRB1\*1401/54、DRB1\*1405、DRB1\*1403 共覆盖了 87.6% 的 DR14，各自比例为 40.3%、32.6%、12.4%。DQB1\*0301 是 DQ7 的基因型，DQB1\*0303 是 DQ9 的基因型，DQB1\*0302 是 DQ8 的基因型；DQ6 中 DQB1\*0601、DQB1\*0602 的比例为 50.4%、32.3%；DQ2 中 DQB1\*0202、DQB1\*0201 的比例为 56.5%、43.5%；DQ5 中 DQB1\*0502、DQB1\*0503、DQB1\*0501 的比例为 47.9%、32.1%、20.1%；DQ4 中 DQB1\*0401、DQB1\*0402 的比例为 82.2%、17.8%。另外 A2、A11、A24、B40、B15、B27、Cw3、DR4、DR14、DQ3、DQ6 都存在罕见基因型。(3) 1092 例正常供体与 931 例患者 HLA 高分辨全相合 (10/10) 的比例为 16.7%；一个位点上有一个等位基因不合 (9/10) 的比例为 17.7%，位点 A、Cw、DRB1、DQB1、B 不合的比例分别为 6.8%、6.3%、2.0%、1.7%、0.8%；两个位点上各有一个等位基因不合 (8/10) 的比例为 18.4%，以 A+Cw(5.0%)、DRB1+DQB1(4.6%)、B+Cw (3.8%) 最常见；一个位点上两个等位基因均不合的比例为 0.8%，以 A+A (0.5%) 最常见。(4) A\*0201 与 A\*0206、A\*0201 与 A\*0207、A\*0206 与 A\*0207 错配分值较低，分别为 1.04、1.83、2.87；A\*0201、A\*0206、A\*0207 与 A\*0203 错配分值均较高，分别为 3.98、5.02、5.81。A\*1101 与 A\*1102 错配分值为 1.21。罕见基因型 A\*0210、A\*1103、A\*2407、A\*2420、A\*3301 分别与 A\*0206、A\*1101、A\*2402、A\*2402、A\*3303 错配分值较低，依次为 2.91、2.76、1.68、1.68、1.74。B\*4006 与 B\*4002、B\*1302 与 B\*1301、B\*1501 与 B\*1527、B\*1502 与 B\*1511 错配分值分别为 2.78、3.97、1.04、7.14。Cw\*0304 与 Cw\*0302 错配分值为 2.48，Cw\*0304 与 Cw\*0303 血清型不同，但错配分值仅 1.52。DRB1\*1501 与 DRB1\*1502、DRB1\*1202 与 DRB1\*1201 错配分值分别为 1.52、1.3。DRB1\*0406 与 DRB1\*0403 错配分值较低 (1.45)；DRB1\*0405 与 DRB1\*0406、DRB1\*0405 与 DRB1\*0403 错配分值较高，分别为 5.47、4.02；罕见基因型 DRB1\*0401、DRB1\*0410 与 DRB1\*0405 错配分值较低，分别为 2.41、1.52，罕见基因型 DRB1\*0404、DRB1\*0407 与 DRB1\*0403 错配分值较低，分别为 1.12、1.52。DRB1\*1401 与 DRB1\*1454 错配分值为 0；DRB1\*1401/54 与 DRB1\*1405、DRB1\*1401/54 与 DRB1\*1403、DRB1\*1405 与 DRB1\*1403 错配分值均较高，分别为 3.92、10.41、7.85。DQB1\*0301、DQB1\*0303、DQB1\*0302 血清型不同，其中 DQB1\*0303 与 DQB1\*0302 错配分值较低 (1.5)；DQB1\*0301 与 DQB1\*0303、DQB1\*0301 与 DQB1\*0302 错配分值较高，分别为

4.19、5.69。DQB1\*0601 与 DQB1\*0602 错配分值相当高，为 10.58，罕见基因型 DQB1\*0603 与 DQB1\*0602 错配分值较低（2.78）。DQB1\*0202 与 DQB1\*0201、DQB1\*0502 与 DQB1\*0503、DQB1\*0502 与 DQB1\*0501、DQB1\*0503 与 DQB1\*0501、DQB1\*0401 与 DQB1\*0402 错配分值分别为 0、1.38、1.11、1.54、0.24。**结论** 当患者为 A\*2402、A\*3303、B\*4001、DRB1\*0901、DRB1\*0701 等基因型容易检索到相应供者；当供患者为 A\*0201 与 A\*0206、A\*0201 与 A\*0207、A\*0206 与 A\*0207、A\*1101 与 A\*1102、B\*4006 与 B\*4002、B\*1501 与 B\*1527、Cw\*0304 与 Cw\*0302、Cw\*0304 与 Cw\*0303、DRB1\*1501 与 DRB1\*1502、DRB1\*1202 与 DRB1\*1201、DRB1\*0406 与 DRB1\*0403、DRB1\*1401 与 DRB1\*1454、DQB1\*0303 与 DQB1\*0302、DQB1\*0202 与 DQB1\*0201、DQB1\*0502 与 DQB1\*0503、DQB1\*0502 与 DQB1\*0501、DQB1\*0503 与 DQB1\*0501、DQB1\*0401 与 DQB1\*0402 时错配分值较低，当供患者仅出现一个以上等位基因错配时，亦可根据错配分值考虑移植；由于检索前没有对 HLA-Cw 位点进行低分辨率分型，因此，供/患者最容易出现 Cw 位点错配。

## Effect on choosing donor of donor/recipient pairs of HLA genotypes and mismatch frequencies in unrelated Allo-HSCT

*Jun He Xiaojing Bao Qiaocheng Qiu Xiaoni Yuan Yang Li Aining Sun Depei Wu  
Zixing Chen Changgeng Ruan*

*The First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Institute of Hematology, Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Ministry of Health., Suzhou 215006, China.*

**Abstract: Objective** To analyze the probability of the high-resolution genotyping matching at HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1 between patients and donors in Chinese Marrow Donor Program (CMDP); and how to choose a better donor. Then resources of CMDP can be fully used. **Method** HLA high-resolution genotypes were determined by SBT, SSOP and SSP on 1092 donors and 931 patients from the data base of CMDP, then the results were analyzed. **Result** (1) Among 1092 donors, allele frequency of HLA-A\*1101, A\*0201, A\*2402, A\*0207, A\*3303, A\*0206, A\*3001 was 0.23, 0.14, 0.14, 0.11, 0.08, 0.06, 0.05 respectively. Allele frequency of HLA-B\*4001, B\*4601, B\*5801, B\*1302, B\*1501, B\*5101, B\*1301 was 0.13, 0.12, 0.06, 0.06, 0.06, 0.06, 0.05 respectively. Allele frequency of HLA-Cw\*0102, Cw\*0702, Cw\*0304, Cw\*0801, Cw\*0602, Cw\*0303, Cw\*0302 and Cw\*0401 was 0.18, 0.17, 0.10, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05 respectively. Allele frequency of HLA-DRB1\*0901, DRB1\*1501, DRB1\*1202, DRB1\*0701, DRB1\*0803, DRB1\*0405, DRB1\*0301, DRB1\*1101 was 0.18, 0.11, 0.10, 0.08, 0.07, 0.07, 0.05, 0.05 respectively. Allele frequency of HLA-DQB1\*0301, DQB1\*0303, DQB1\*0601, DQB1\*0202, DQB1\*0602, DQB1\*0302, DQB1\*0401, DQB1\*0201, DQB1\*0502 was 0.21, 0.19, 0.11, 0.07, 0.07, 0.07, 0.07, 0.05, 0.05 respectively. (2) Alleles of A\*0201, A\*0207, A\*0206 and A\*0203 covered 97.6% of A2 locus, and each proportion was 39.1%, 29.9%,

17.3% and 11.4%. Alleles of A\*1101, A\*1102 covered 99.6% of A11 locus, and each proportion was 89.5%, 10.2%. A\*2402 covered 96.0% of A24. A\*3303 covered 98.9% of A33. B\*4001 was genotype of B60. B\*4006 and B\*4002 were genotypes of B61, which covered 63.6%, 33.3% respectively. B\*1501 and B\*1527 were genotypes of B62, which covered 74.4%, 11.6% respectively. B\*1502, B\*1511 were genotypes of B75, which covered 69.5%, 30.5% respectively. Percentage of allele B\*1302, B\*1301 in B13 was 56.6%, 43.4%. Percentage of allele B\*5101, B\*5102 in B51 was 77.1%, 22.9%. Percentage of allele B\*3901 and B\*3905 in B39 was 83.3%, 13.6%. Percentage of allele B\*2704 and B\*2705 in B27 were 66.1%, 28.6%. Cw\*0304, Cw\*0302 were genotypes of Cw10, which covered 60.6%, 38.6% respectively. Cw\*0303 was the allele of Cw9. DRB1\*0405, DRB1\*0406 and DRB1\*0403 covered 80.1% of DR4, and each proportion was 46.9%, 22.1% and 11.0%. DRB1\*1401/54, DRB1\*1405 and DRB1\*1403 covered 87.6% of DR14, and each proportion was 40.3%, 32.6% and 12.4%. DQB1\*0301 was genotype of DQ7. DQB1\*0303 was genotype of DQ9. DQB1\*0302 was genotype of DQ8. Percentage of allele DQB1\*0601, DQB1\*0602 in DQ6 was 50.4%, 32.3%. Percentage of allele DQB1\*0202, DQB1\*0201 in DQ2 was 56.5%, 43.5%. Percentage of allele DQB1\*0502, DQB1\*0503, DQB1\*0501 in DQ5 was 47.9%, 32.1%, 20.1%. Percentage of allele DQB1\*0401, DQB1\*0402 in DQ4 was 82.2%, 17.8%. In addition, there were some rare genotypes in A2, A11, A24, B40, B15, B27, Cw3, DR4, DR14, DQ3 and DQ6 alleles. (3) The probability of HLA high-resolution genotyping matching between 1092 donors and 931 patients (10/10) was 16.7%. The percentage of single allele mismatch at one locus (9/10) was 17.7%, and each percentage of mismatch for locus A, Cw, DRB1, DQB1, B was 6.8%, 6.3%, 2.0%, 1.7%, 0.8%. The percentage of two alleles mismatch in two loci(8/10) was 18.4%, such as A+ Cw(5.0%), DRB1+DQB1 (4.6%) and B+ Cw (3.8%). The percentage of two alleles mismatch in one locus was 0.8%, such as A+A (0.5%). (4) Each score for A\*0201 and A\*0206, A\*0201 and A\*0207, A\*0206 and A\*0207 mismatch was low, which was 1.04, 1.83, 2.87. Each score for A\*0201, A\*0206, A\*0207 mismatching with A\*0203 was high, which was 3.98, 5.02, 5.81. The score for mismatch between A\*1101 and A\*1102 was 1.21. Each score for rare allele A\*0210, A\*1103, A\*2407, A\*2420, A\*3301 respectively mismatching with A\*0206, A\*1101, A\*2402, A\*2402, A\*3303 was merely 2.91, 2.76, 1.68, 1.68, 1.74. Each score for B\*4006 and B\*4002, B\*1302 and B\*1301, B\*1501 and B\*1527, B\*1502 and B\*1511 mismatch was 2.78, 3.97, 1.04, 7.14. The score for mismatch between Cw\*0304 and Cw\*0302 was 2.48. Even though Cw\*0304 and Cw\*0303 were different at serotypes, the mismatch score was merely 1.52. Each score for DRB1\*1501 and DRB1\*1502, DRB1\*1202 and DRB1\*1201 mismatch was 1.52, 1.3. The score for mismatch between DRB1\*0406 and DRB1\*0403 (1.45) was lower. But the score for mismatch between DRB1\*0405 and DRB1\*0406, DRB1\*0405 and DRB1\*0403 was high, which was 5.47, 4.02. Each score for rare allele DRB1\*0401, DRB1\*0410 mismatching with DRB1\*0405 was 2.41, 1.52. Similarly, each score for rare allele DRB1\*0404, DRB1\*0407 mismatching with DRB1\*0403 was 1.12, 1.52. The score for mismatch between

DRB1\*1401 and DRB1\*1454 was 0. But each score for mismatch between DRB1\*1401/54 and DRB1\*1405, DRB1\*1401/54 and DRB1\*1403 was high, which was 3.92, 10.41, 7.85. DQB1\*0301, DQB1\*0303 and DQB1\*0302 were different at serotypes. The score for mismatch between DQB1\*0303 and DQB1\*0302 was lower (1.5). But the score for mismatch between DQB1\*0301 and DQB1\*0303, DQB1\*0301 and DQB1\*0302 was high, which was 4.19, 5.69. The score for mismatch between DQB1\*0601 and DQB1\*0602 was very high (10.58). The score for DQB1\*0603 mismatching with DQB1\*0602 was merely 2.78. Each score for DQB1\*0202 and DQB1\*0201, DQB1\*0502 and DQB1\*0503, DQB1\*0502 and DQB1\*0501, DQB1\*0503 and DQB1\*0501, DQB1\*0401 and DQB1\*0402 mismatch was merely 0, 1.38, 1.11, 1.54, 0.24. **Conclusion** If the patient has allele such as A\*2402, A\*3303, B\*4001, DRB1\*0901 and DRB1\*0701, etc, then the match donor can be easily found. When donor/patient pairs have mismatch allele of A\*0201 and A\*0206, A\*0201 and A\*0207, A\*0206 and A\*0207, A\*1101 and A\*1102, B\*4006 and B\*4002, B\*1501 and B\*1527, Cw\*0304 and Cw\*0302, Cw\*0304 and Cw\*0303, DRB1\*1501 and DRB1\*1502, DRB1\*1202 and DRB1\*1201, DRB1\*0406 and DRB1\*0403, DRB1\*1401 and DRB1\*1454, DQB1\*0303 and DQB1\*0302, etc, the score is low. If only one mismatch occurs in these alleles, unrelated Allo-HSCT can be considered on basis of score. Due to Cw locus has not been typed before searching of unrelated donor/recipient, thus they are easy to mismatch.

## 2-17

### 黑龙江地区汉族 HLA-A、B、DRB1 基因及单倍型的研究与应用

刘杰 侯玲 李勇 张春燕 张翹

黑龙江省血液中心 (150056)

**摘要:** **目的** 研究中国造血干细胞捐献者资料库黑龙江分库汉族捐献者 HLA-A、B、DRB1 等位基因和单体型频率分布特征,探讨中国广大地区乃至世界其他人种利用黑龙江汉族捐献者进行造血干细胞移植的可能性。**方法** 采用序列特异性引物 (PCR-SSP) 和序列特异性寡核苷酸探针 (PCR-SSOP) 基因分型技术,对黑龙江地区汉族捐献干细胞的 9019 名供者进行 HLA-A、B、DRB1 基因低分辨检测。**结果** 共观察到 77 个 HLA 等位基因,其中频率 >0.1 的 A、B、DRB1 座位特异性分别为 A2、A11、A24、B13、DR15、DR9、DR7、DR12、DR4。432 条 A-B 单体型中,25 条单体型的频率高于 0.01,101 条单体型呈现显著的正连锁不平衡,21 条表现为强连锁不平衡 (RLD >0.40);437 条 B-DRB1 单体型中,22 条单体型的频率高于 0.01,115 条单体型呈现显著的正连锁不平衡,16 条表现为强连锁不平衡;2002 条 A-B-DRB1 单体型中,971 条单体型有意义 (频率  $\geq 1.66 \times 10^{-4}$ ),18 条单体型频率高于 0.005。截止 2007 年 3 月通过中国造血干细胞捐献者资料库管理中心检索,成功移植 20 例。**结论** 黑龙江汉族人群 HLA-A、B、DRB1 等位基因和单体型的分布特征接近北方汉族人群,与中国汉族人总体分布特征相似。未发现群体特有的基因和单体型,但具

有其自身分布特征。提示, 不同地区、不同人群有可能在中国造血干细胞库黑龙江地区汉族捐献者中寻找 HLA 相合的供者。其中中国人群最容易找到 HLA 相合供者, 其次是日本人和韩国人。

**关键词:** HLA-A/B/DRB1; 基因/单体型频率; 黑龙江汉族; 无关供者

**Abstract: Objective** The objective of the study was to research the distribution features of HLA-allele and haplotype in Heilongjiang Han population. And to explore the possibility of finding the donor of HLA matched to perform the hematopoietic stem cell transplantation for more patients from larger region of China even other area of the world. **Method** Use the PCR-SSP and PCR-SSOP method to proceed the HLA-A, B, DRB1 low resolution to the region of Heilongjiang 9019 Han specimen of hematopoietic stem cell donors; frequencies of HLA Allele and haplotype were calculated by power and expectation-maximization method. **Result** A Total of 77 HLA alleles were observed in Heilongjiang Han population and the most frequent were A2, A11, A24, B13, DR15, DR9, DR7, DR12 and DR4. Among 432 kinds of A-B haplotype, there were 25 kinds frequency higher than 0.01, and 101 kinds with statistically significant and positive linkage disequilibrium. Moreover, among 437 kinds of B-DRB1 haplotype, there were 22 haplotypes frequency higher than 0.01, and 115 kinds with statistically significant and positive linkage disequilibrium. 971 kinds of A-B-DR Haplotype were informative with frequency  $\geq 1.66 \times 10^{-4}$  in 2002 haplotypes, and a total of 18 kinds of A-B-DR haplotype frequency higher than 0.005. By March 2007, the management centers of the Chinese hematopoietic stem cell donor database check the information through the network, there are 130 cases HLA consistency, there are 20 cases transplant successfully. **Conclusion** We get the distribution features of HLA allele and haplotype in Heilongjiang Han population, and the information of linkage disequilibrium. Pass the crowd of Heilongjiang with the other human race of the related cultural heritage inside, and with the crowd of the different region of more analyze the manifestation: Distribution of HLA-A, B, DRB1 allele and haplotype in Heilongjiang Chinese Han is relatively closed to Northern Chinese Han population and also showed its own characterization. All of the people in different race and in different area may look for in the province of Heilongjiang built blood fuck cell made a contribution database a different body for ordering mutually matching gene provides. And the Chinese looks for more easier than the other people.

**Key words:** HLA-A/B/DRB1, Gene /Haplotype frequency, Heilongjiang Chinese Han, Irrelative Donor

HLA 系统是由一系列紧密连锁的基因座位组成的、具有高度多态性的遗传复合体, 是人体调控特异性免疫反应和决定疾病易感性个体差异的主要基因系统。是影响移植存活率的主要因素之一。HLA 等位基因和单体型频率以及连锁不平衡类型在不同人种、民族、地域存在明显差异。笔者分析了中国干细胞库黑龙江地区汉族自愿捐献者 HLA 等位基因频率、单体型频率以及连锁不平衡结果, 得到了较大样本量的分型数据及相关遗传参数资料, 可为 HLA 在人类学、免疫遗传学、法医学和别的组织器官移植方面的应用和科学研究提供和积累基础资料。从而探讨我国广大地区甚至世界其他人群利用黑龙江造血干细胞库供者进行移植的可能性。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 9019 份标本全部来自黑龙江地区的汉族造血干细胞志愿捐献者。

**1.2 主要仪器** 分光光度计(德国)、PE9700 扩增仪(美国)、MJ225 扩增仪(美国)、Luminex100 流式细胞仪(美国)、电泳仪及电泳槽(美国)等。

**1.3 试剂** DNA 提取试剂(美国 pel-Freez 公司、德国 BAG 公司和美国 Gentra 公司), HLA-A, B, DRB1 的 SSP 低分辨率试剂(美国 Dynal Biotech 公司、德国 Biotest AG 公司、美国 G&T 公司), HLA-A, B, DRB1 的 SSOP 分型试剂(美国 LifeCode 公司、美国 Dynal Biotech 公司)。

**1.4 DNA 提取** 按照产品说明书操作, 标本 DNA 浓度纯度检测均达到分型试剂要求。

**1.5 基因特异性扩增** HLA-A、B、DRB1 基因扩增反应体系按照各试剂公司的产品使用说明书要求进行配制, PCR-SSP 分型方法使用的 Taq-DNA 聚合酶为 Promega 公司产品。PCR-SSOP 分型方法使用的 Taq-DNA 聚合酶为进口原装 Invitrogen 酶。所有实验均设立阴性对照孔, 用于反应体系的污染检测。

**1.6 PCR 扩增产物的检测** PCR-SSP 方法的扩增产物检测采用凝胶成像方法。PCR-SSOP 方法的扩增产物杂交染色后, 在 Luminex 100 流式细胞分析仪上进行结果判读及分析。

## 2 分型结果判定

**2.1 PCR-SSP 方法** 分型胶图内对照清楚, 阴性对照无非特异性条带。记录阳性条带并输入相应产品的计算机分析系统进行结果判定。

**2.2 PCR-SSOP 方法** 质控探针数据在正常范围内, 且各探针计数正常的情况下, 认可该分型数据有效。将所得数据导入该产品的计算机分析系统进行结果判定。

**2.3 入库数据的质量** 在已知分型结果的样本中随机抽取 3%进行双盲复检, 比较两次分型结果, 得到分型错误率 $<0.1\%$ ; 同时参加 CMDP 的每年两次的室间质量控制。

## 2.4 统计学处理

**2.4.1 Hardy-Weinberg 平衡检验** HLA-A、B、DRB1 三个座位均采用  $\chi^2$  方法进行吻合度检验。

**2.4.2 基因频率** 按惯例将尚未被检测出的未知基因统称为空白基因。采用方根法计算基因频率(GF)。GF =  $(1 - (1 - C/N))^{1/2}$  (N 为调查人数, C 为观察到带有某基因的个体数)。未被检测出的空白基因频率 =  $1 - \text{该座位所有基因频率之和}$ 。由于某种原因取样误差, 空白基因频率有可能出现负值<sup>[1, 2]</sup>。

**2.4.3 单体型频率** 采用最大数学预期值算法(expectation-maximization, EM)估计单体型频率, 具体运算采用 Arlequin 计算机软件<sup>[3]</sup>。

**2.4.4 连锁不平衡参数计算** 两座位 HLA 单体型连锁不平衡参数的计算采用标准表格法, 包括绝对 $\Delta$ 值(ALD)、最大 $\Delta$ 值(MLD)和相对 $\Delta$ 值(RLD), 计算公式:  $\Delta_{ij} = f_{ij} - f_i \times f_j$ ;  $\Delta^{\max} = f_{ij}$  ( $\Delta_{ij} < 0$ ),  $\Delta^{\max} = f_i \times (1 - f_j)$  ( $\Delta_{ij} \geq 0$  且  $f_i < f_j$ ),  $\Delta^{\max} = f_j \times (1 - f_i)$  ( $\Delta_{ij} \geq 0$  且  $f_i \geq f_j$ );  $\Delta^{\text{rel}} = \Delta_{ij} / \Delta^{\max}$  ( $f_{ij}$ 、 $f_i$ 、 $f_j$  分别为单体型频率和组成该单体型的等位基因频率);  $\Delta^{\text{rel}}$  与 0 之间是否存在显著性差异的统计学检验采用四格表  $\chi^2$  检验。

**2.4.5 频率分布的熵值(Entropy)计算** 在 HLA 领域, 熵值是对 1 个或 1 组紧密连锁的 HLA 基因座位多态性高低的度量<sup>[4]</sup>, 计算公式:  $E = -\sum f_i \times \log_2 f_i$  ( $f_i$  为 HLA 基因或单体型的频率)。

### 3 结果与分析

**3.1 HLA-A、B、DRB1 基因频率** 9019 份标本共检测到 HLA-A、B、DRB1 基因座位上 77 种 HLA 编码基因 (见表 1)。其中前五位特异性分别为: A2 (0.3199)、A11 (0.1599)、A24 (0.1560)、A30 (0.0805)、A33 (0.0773); B13 (0.1279)、B61 (0.0752)、B46 (0.0722)、B62 (0.0716)、B51 (0.0694); DR15 (0.1705)、DR9 (0.1356)、DR7 (0.1284)、DR12 (0.1174)、DR4 (0.1058), 未检测到 HLA-A\*43、A\*80, B\*78, DRB1\*0302 (DR18) 等位基因。A、B、DRB1 基因座 HW 吻合度检验结果均为  $P > 0.05$  (见表 2), 表明本研究调查对象来源群体的基因分布符合 Hard-Weinberg 平衡定律。各座位上基因频率的分布情况显示  $E(B) > E(DRB1) > E(A)$ , 表明 HLA 基因座位 B、DRB1、A 的多态性程度依次降低 (见表 3)。

表 1 黑龙江地区 9019 名汉族志愿者 HLA-A、B、DRB1 等位基因频率

HLA-A		HLA-B		HLA-DRB1			
基因	频率	基因	频率	基因	频率		
A2	0.3199	B13	0.1279	B50	0.0091	DR15	0.1705
A11	0.1599	B61	0.0752	B18	0.0048	DR9	0.1356
A24	0.1560	B46	0.0722	B56	0.0035	DR7	0.1284
A30	0.0805	B62	0.0716	B65	0.0032	DR12	0.1174
A33	0.0773	B51	0.0694	B63	0.0026	DR4	0.1058
A3	0.0471	B60	0.0693	B49	0.0021	DR13	0.0622
A1	0.0468	B35	0.0554	B41	0.0018	DR11	0.0611
A31	0.0424	B44	0.0495	B81	0.0018	DR14	0.0605
A26	0.0310	B58	0.0453	B72	0.0011	DR8	0.0575
A32	0.0159	B75	0.0373	B64	0.0010	DR17	0.0421
A68	0.0098	B48	0.0365	B59	0.0009	DR1	0.0269
A29	0.0078	B52	0.0357	B45	0.0008	DR16	0.0182
A23	0.0037	B7	0.0350	B53	0.0008	DR10	0.0137
A66	0.0011	B54	0.0290	B70	0.0008	DR6	0.0001
A69	0.0011	B38	0.0256	B47	0.0006	DR 空白	0.0000
A34	0.0004	B27	0.0195	B76	0.0006		
A74	0.0004	B55	0.0194	B42	0.0005		
A25	0.0003	B39	0.0182	B77	0.0003		
A36	0.0001	B57	0.0179	B40	0.0002		
A 空白	-0.0012	B71	0.0175	B73	0.0002		
		B37	0.0151	B15	0.0001		
		B8	0.0114	B 空白	-0.0006		
		B67	0.0100				

表 2 HLA-A、B、DRB1 座位的 Hardy-Weinberg 平衡检验

	基因数	$\chi^2$	自由度 (df)	P
HLA-A	19	129.50	171	>0.05
HLA-B	44	772.24	946	>0.05
HLA-DRB1	14	85.71	91	>0.05



表3 黑龙江地区 9019 名汉族志愿者 HLA-A、B、DRB1 基因频率分布

频率范围 (每 100)	HLA-A		HLA-B		HLA-DR	
	<i>n</i>	Cum fre (%)	<i>n</i>	Cum fre (%)	<i>n</i>	Cum fre (%)
>10	3	63.58	1	12.79	5	65.77
1~10	7	34.09	22	83.60	8	34.23
0.1~1	5	2.34	10	3.10		
<0.1	4	0.11	11	0.57	1	0.10
总计	19		44		14	
熵值	E=2.99		E=4.44		E=3.41	

表4 HLA-A-B、B-DRB1、A-B-DRB1 单体型频率分布

频率范围 (每 10000)	HLA-A-B		HLA-B-DRB1		HLA-A-B-DRB1	
	<i>n</i>	Cum fre (%)	<i>n</i>	Cum fre (%)	<i>n</i>	Cum fre (%)
100~1000	25	48.71	22	40.88	6	12.83
>10	124	43.25	164	51.33	222	49.35
1~10	199	7.55	180	7.39	1070	33.60
0.1~1	84	0.50	71	0.41	704	4.20
未观察到	404	0.00	179	0.00	9702	0.00
总计	836		616		11704	
熵值	E=6.97		E=7.26		E=9.30	

表5 HLA-A-B、B-DRB1 单体型频率 (×10<sup>-6</sup>)

	A0	A1	A2	A3	A11	A23	A24	A25	A26	A29	A30	A31	A32	A33	A34	A36	A66	A68
B0	7611	421	8408	738	3811	37	4126		574	141	226	1226	403	698				169
B7	2625	1890	3727	7853	3136	291	4825		696	72	433	805	246	2526				104
B8	114	1481	2190	1159	339		1751	55	2346		15	115		1501				298
B13	7561	1887	18173	2142	12376				5893	1541	411	66472	1321	643	1326			
B15								55										
B18	327	408	632	1102	286		915	222	79		95		64	627				68
B27	1199	801	2858	3794	4650	55	3154		944		211	852		259	55			461
B35	5137	1676	11518	7823	7438		10314		2368	318	485	3996	669	877			55	924
B37	455	0102	1578	210	546		762					205	55	308			55	691
B38	2269	139	8920	1123	5172		2109		3783		542	457		264				391
B39	1692	284	3795	42	5368		3740		1371	55	395	1212	71	47				
B40	55	55										55						
B41	55	326	260		120	277			20		291	56	104	98			222	
B42	124											375						
B44	2968	1076	3752	6639	1689	1630	2094		485	163	638	426	5528	19534				1610
B45			56				444				277							
B46	5458	474	47542	401	7107		5167		796	84	496	1336	67	602				47
B47	149	302	102	58														
B48	3650		15062	267	2446		10642		948		451	1345	290	626				87
B49	122	150	416	591		111	139		88	55							333	103
B50	520	342	4916	694	536	531			96	173	757		110	361				
B51	5406	1610	17092	4540	9706		12653		2192	235	982	8634	453	2301				1110
B52	1895	3447	3895	3635	9439		2868		1043	110	654		5774	383				1347
B53	131										313	56		332				
B54	2202	148	6854	251	4978		11236		286		166	1683		464				283

中华骨髓库第二届年会

	A0	A1	A2	A3	A11	A23	A24	A25	A26	A29	A30	A31	A32	A33	A34	A36	A66	A68
B55	1781	752	4742	477	5665		3141		841	56	251	577	214	420				322
B56	469	80	1611		578		256		367	54	78							
B57	1380	12664	890	194	479		1071		228	40	295	159		230		55		56
B58	1854	452	2838	253	1840	59	1191		449		291	288	389	34125				157
B59		52	100		84		609		2114					42				
B60	5902	354	15484	424	22029	55	15894		4687	67	370	2378	77	891			55	656
B61	5853	752	26863	499	7497	76	20350		1649	79	523	3605	64	1464				
B62	6625	798	22460	845	15612		12706		10		523	6543		956				303
B63		1939	70		64		233						111	178				
B64	212				149						637							
B65	56	99	158		143		204			41	51	51	55	1912			222	168
B67	892	106	6162		561		1319				132	493		205				54
B70	128	30	293							104		111		55				55
B71	2084	208	8288	98	2072		1767		328		21	2061	141	35				249
B72	412	51			226				111			198					111	
B73		166	15542															
B75	5205	214	255	132	10644	93	2262		52	29		1277	216	645	333			
B76	76			30	76		129											44
B77					219		59											
B81	280		1266				173			55								

续表 5

	A69	A74	DR0	DR1	DR4	DR6	DR8	DR9	DR10	DR11	DR12	DR13	DR14	DR15	DR16	DR17
B0	55	18	5573	326	2676		1768	2950		1867	5341	781	1027	3693	370	941
B7			1984	4964	1384		1673	1168	1071	1586	286	2367	933	15246	412	278
B8			203		94		23		55	226	117	133	22	504		9506
B13			2627	423	3828		849	2486	11	1705	26107	2147	1705	8022	1433	692
B15												55				
B18			132	53			89	394	56	2359	349	219	174	558		108
B27			186	1591	6327		914	771	105	1560	3350	459	558	2111	105	255
B35	195	92	3861	3993	5563	55	1770	6271		5970	4468	2902	2937	10559	680	1480
B37			177	443	401		266	598	9907	627	1018	248	161	808		
B38		111	1701	2538	1687		3787	1087	175	1155	2235	2067	1876	3777	1419	498
B39			1253	49	1734		4972	1244		1445	800	353	1481	3951	574	
B40								55								
B41			61	166			72			260		383		64		279
B42							25				86	388				
B44			2770	1637	2194		660	560	168	1431	1319	18556	632	968	211	2193
B45		55			59		232						55			
B46			1644	340	3556		14052	33195	145	2148	4630	590	3562	2793	1234	898
B47				55								554				
B48			1712		3838		1132	5500	63	4721	3643	92	6376	7582	430	208
B49				689	36		70		48	110	39	678		386	51	
B50			390	299			271	373		173		178	133	69		1333
B51		111	4515	3174	6942		4099	13780		5374	5629	2782	7010	8730	2264	672
B52	548		1307	1111	1628		721	393		1112	2649	479	4324	20251		267
B53												717	56	59		

	A69	A74	DR0	DR1	DR4	DR6	DR8	DR9	DR10	DR11	DR12	DR13	DR14	DR15	DR16	DR17
B54			1191		12681		1236	2236		1758	1845	287	3176	2670	448	63
B55			1131		2682		1101	3684	136	980	3106	1302	2714	934	1144	69
B56			210		140		142	541	26	600	325	72	517	788	132	
B57			950	226	396		96	361	166	43	545	1651	359	747	59	162
B58	56		1354	1067	1705		306	1053	258	735	406	13850	522	1916	76	20010
B59			39		565					60	222					
B60	108		3108	144	8045		7290	10814	337	8574	7166	559	4537	14217	1087	246
B61	91		5251	249	5253		3906	19301	177	4934	11033	957	5546	14105	798	192
B62			4998		18472		2282	7898	319	4983	7196	783	4539	15643	409	185
B63			45	61	115					82		1992	54	197		
B64			37		320							86		555		
B65			48	2360	94				55	112	50	114	55	85		
B67			261	66	424		498	1246		377	1765	64	141	824	4074	115
B70			127	53	265				55				78	196		
B71			1272	210	5636		718	1096	93	1121	1549	327	756	4277	175	51
B72			18					147	55		167		134	276		109
B73					111					55						
B75			1983	266	1280		806	7132	65	1021	12279	975	2558	6933	434	370
B76									35		222	52		285		15
B77											277					
B81			101					63			270	63		1227		48

表 6 HLA-A-B-DRB1 单体型频率 ( $\times 10^{-6}$ )

A	B	DR	频率	A	B	DR	频率	A	B	DR	频率	A	B	DR	频率
30	13	7	56917	11	54	4	2731	30	13	13	1747	2	35	9	1255
2	46	9	23574	2	0	12	2671	24	46	8	1738	0	62	9	1245
33	58	17	15380	0	0	0	2664	3	35	1	1738	2	60	14	1238
33	44	13	11018	24	62	9	2636	24	35	9	1722	2	0	0	1234
33	58	13	10806	31	62	15	2635	3	52	15	1704	32	44	17	1223
2	13	12	10641	3	27	4	2631	2	51	12	1696	2	7	1	1207
2	46	8	9715	2	35	15	2625	24	54	14	1682	11	60	0	1204
1	57	7	8611	2	48	9	2602	11	39	8	1679	24	13	7	1204
2	61	9	7883	11	60	12	2589	0	61	9	1676	24	61	11	1196
11	62	4	7695	24	51	15	2580	24	8	17	1675	0	58	17	1193
1	37	10	7370	2	54	4	2566	24	52	15	1665	2	35	14	1178
2	62	15	6775	2	61	14	2529	33	58	15	1662	2	37	10	1178
11	75	12	6230	2	71	15	2509	2	62	9	1658	11	60	14	1176
3	7	15	5740	2	51	4	2507	33	65	1	1655	0	51	9	1175
11	13	12	5653	2	51	14	2505	1	63	13	1642	11	62	0	1169
24	61	9	5311	2	48	11	2492	2	35	4	1634	68	44	7	1147
2	75	9	5290	2	46	15	2487	2	75	14	1632	24	61	8	1143
33	44	7	5281	2	51	15	2472	2	44	7	1615	24	54	9	1137
2	61	15	4956	11	7	1	2445	33	7	13	1594	24	54	15	1135
24	54	4	4805	24	61	12	2436	24	48	4	1583	2	62	14	1134
11	52	15	4616	0	46	9	2415	11	51	4	1577	24	35	4	1133
24	61	15	4451	2	60	11	2405	11	51	15	1573	0	0	8	1128
11	60	9	4330	2	62	11	2405	3	13	7	1559	33	44	0	1126
24	62	4	4289	24	46	9	2398	2	58	17	1550	2	35	11	1125

A	B	DR	频率	A	B	DR	频率	A	B	DR	频率	A	B	DR	频率
32	52	15	4272	3	35	7	2378	11	13	7	1542	33	58	0	1122
11	46	9	4012	11	27	12	2338	24	60	12	1542	11	38	12	1120
2	51	9	3962	2	71	4	2331	2	55	9	1539	2	46	16	1115
2	60	15	3933	24	35	15	2278	24	61	14	1535	24	0	12	1107
2	62	4	3846	24	48	14	2277	33	58	4	1528	0	54	4	1105
2	61	12	3701	3	51	1	2259	26	38	1	1514	11	0	15	1104
24	51	9	3694	11	52	12	2252	26	61	15	1492	11	35	4	1103
11	60	15	3683	11	35	15	2251	2	13	4	1481	2	61	0	1102
11	13	15	3640	2	62	0	2183	29	7	8	1477	24	51	0	1096
2	50	7	3476	2	35	12	2146	24	51	14	1475	11	35	9	1093
2	62	12	3370	24	35	12	2090	0	60	8	1466	2	0	4	1089
24	60	15	3344	2	8	17	2089	1	8	17	1462	1	7	15	1087
3	44	13	3286	26	8	17	2062	2	61	8	1455	0	57	7	1086
2	48	15	3270	2	60	9	2042	2	38	15	1454	3	35	11	1079
11	51	9	3165	11	75	15	2030	2	48	4	1448	68	52	15	1074
0	13	12	3095	11	60	11	2017	11	52	14	1436	11	62	12	1069
11	60	8	3081	2	61	4	2014	0	35	15	1434	2	67	12	1062
24	60	11	3067	2	7	15	1983	0	61	12	1420	2	39	15	1058
2	75	12	3054	11	62	15	1963	2	61	11	1404	3	44	1	1056
2	13	7	3021	11	61	12	1938	26	61	9	1403	31	51	11	1049
1	52	15	3007	2	48	14	1937	2	60	8	1392	1	57	13	1046
11	60	4	2930	2	67	16	1931	11	55	12	1356	2	38	0	1041
24	7	15	2923	24	60	4	1926	2	52	14	1349	2	46	11	1040
24	48	15	2882	2	60	4	1889	24	39	8	1342	0	48	14	1036
32	44	7	2882	31	51	12	1886	2	51	11	1332	24	62	14	1036
24	60	9	2872	0	60	15	1878	0	62	4	1289	33	8	17	1033
2	38	8	2865	0	75	12	1850	30	13	12	1287	31	51	8	1027
2	46	12	2842	11	61	9	1817	24	61	4	1277	30	13	11	1023
2	46	4	2825	2	48	12	1811	26	13	12	1273	0	60	12	1020
24	62	15	2821	2	60	12	1769	0	7	15	1270	3	44	4	1018
2	75	15	2769	24	61	0	1763	24	60	14	1265	24	51	11	1017
2	46	14	2762	11	62	9	1759	2	13	15	1264	24	51	12	1012
24	13	12	2751	2	52	15	1757	24	48	9	1259	1	13	7	1001

表 7 20 条最常见 HLA-A、B、DRB1 单体型频率 ( $\times 10^{-6}$ )

A	B	频率	B	DR	频率	A	B	DR	频率
30	13	66472	13	7	67712	30	13	7	56917
2	46	47542	46	9	33195	2	46	9	23574
33	58	34125	13	12	26107	33	58	17	15380
2	61	26863	52	15	20251	33	44	13	11018
2	62	22460	58	17	20010	33	58	13	10806
11	60	22029	61	9	19301	2	13	12	10641
24	61	20350	44	13	18556	2	46	8	9715
33	44	19534	62	4	18472	1	57	7	8611
2	13	18173	62	15	15643	2	61	9	7883
2	51	17092	7	15	15246	11	62	4	7695
24	60	15894	44	7	14934	1	37	10	7370
11	62	15612	60	15	14217	2	62	15	6775

A	B	频率	B	DR	频率	A	B	DR	频率
2	75	15542	61	15	14105	11	75	12	6230
2	60	15484	46	8	14052	3	7	15	5740
2	48	15062	58	13	13850	11	13	12	5653
24	62	12706	51	9	13780	24	61	9	5311
1	57	12664	54	4	12681	2	75	9	5290
24	51	12653	75	12	12279	33	44	7	5281
11	13	12376	57	7	11977	2	61	15	4956
2	35	11518	61	12	11033	24	54	4	4805

**3.2 HLA 单体型频率** 分布情况见表 4，观察到 432 条 HLA-A-B、437 条 HLA-B-DRB1 和 2002 条 HLA-A-B-DRB1 单体型，分别占单体型理论总数的 51.67% (432/836)、70.94% (437/616)、17.11% (2002/11704)；A-B 和 B-DRB1 单体型及其频率数值见表 5 (空白处表示组成该单体型的 2 种等位基因未在本研究群体中同时出现过)。2002 条 A-B-DRB1 单体型中“可靠”的 (频率  $\geq 1.66 \times 10^{-4}$ ) 有 971 条，占单体型总数的 48.50% (971/2002)，但累计频率高达 91.56%，其中频率  $> 0.001$  的 228 条常见 A-B-DRB1 单体型见表 6，频率最高的前 20 条 A-B、B-DRB1 和 A-B-DRB1 单体型及其频率数值见表 7。从中可见，A30-B13 (0.066472)、A2-B46 (0.047542)、A33-B58 (0.034125)、B13-DR7 (0.067712)、B46-DR9 (0.033195)、B13-DR12 (0.026107) 是最常见的两座位 HLA 单体型，A30-B13-DR7 (0.056917)、A2-B46-DR9 (0.023574)、A33-B58-DR17 (0.015380) 是最常见的三座位 HLA 单体型。

**3.3 连锁不平衡参数** 本组资料仅选取频率  $\geq 1.66 \times 10^{-4}$  的有意义单体型计算连锁不平衡参数。结果显示，分别有 101 条 HLA-A-B 单体型和 115 条 HLA-B-DRB1 单体型呈现显著的连锁不平衡 (ALD  $> 0$ , HF  $\geq 1.66 \times 10^{-4}$ ,  $\chi^2 > 3.84$ )，其中 A1-B73、A34-B75、A30-B13 等 21 条 A-B 单体型和 B77-DR12、B53-DR13、B8-DR17 等 16 条 B-DRB1 单体型表现为强连锁不平衡 (RLD  $> 0.40$ ) (见表 8)。

表 8 高度连锁不平衡的 HLA-A-B、B-DRB1 单体型

A	B	DR	频率 ( $\times 10^{-6}$ )	ALD	MLD	RLD	$\chi^2$
1	73		166	0.000158	0.000159	0.997922	29.81
34	75		333	0.000319	0.000374	0.852416	63.37
30	13		66472	0.056178	0.070169	0.800611	3604.71
25	18		222	0.000221	0.000276	0.799808	327.12
11	77		219	0.000175	0.000233	0.749989	6.17
33	58		34125	0.030627	0.041767	0.733295	2820.45
1	63		1939	0.001817	0.002487	0.730575	258.63
30	42		375	0.000335	0.000459	0.729642	49.32
1	57		12664	0.011826	0.017062	0.693091	1634.04
29	7		5272	0.004997	0.007573	0.659877	836.78
1	37		10102	0.009396	0.014376	0.653575	1195.32
24	59		609	0.000471	0.000749	0.628291	16.73
30	64		637	0.000557	0.000918	0.606352	44.52

A	B	DR	频率 ( $\times 10^{-6}$ )	ALD	MLD	RLD	$\chi^2$
2	81		1266	0.000698	0.001208	0.577965	14.71
33	65		1912	0.001667	0.002920	0.570953	105.79
23	45		444	0.000441	0.000829	0.531987	572.29
69	52		548	0.000510	0.001016	0.502222	75.66
2	46		47542	0.024448	0.049086	0.498060	433.97
1	47		302	0.000273	0.000581	0.470265	53.57
2	67		6162	0.002971	0.006782	0.438062	41.96
23	44		1630	0.001449	0.003484	0.415775	115.07
	77	12	277	0.000244	0.000245	0.999056	17.64
	53	13	717	0.000665	0.000780	0.852696	148.97
	8	17	9506	0.009024	0.010949	0.824250	5650.04
	42	13	388	0.000357	0.000468	0.762684	5.54
	63	13	1992	0.001830	0.002447	0.747822	110.58
	65	1	2360	0.002275	0.003080	0.738619	3739.81
	37	10	9907	0.009701	0.013470	0.720190	4173.49
	81	15	1227	0.000924	0.001473	0.627502	989.92
	57	7	11977	0.009679	0.015603	0.620348	21534.89
	59	4	565	0.000471	0.000793	0.593682	20.01
	50	7	5817	0.004652	0.007912	0.587899	52.25
	45	7	485	0.000378	0.000725	0.521567	7.52
	52	15	20251	0.014167	0.029589	0.478786	34.69
	13	7	67712	0.051289	0.111507	0.459961	27398.35
	18	11	2359	0.002063	0.004539	0.454574	243.84
	58	17	20010	0.018103	0.040227	0.450020	17.49

**3.4 黑龙江地区汉族人群与其它地区人群的比较** 将本结果中频率最高的前 10 种（三类型）单体型分别与四川人、湖南人、中国汉族人和天津人以及台湾人、韩国人和德国人进行比较分析，结果见表 9。

表 9 不同人群频率最高的 10 种 HLA-A-B 单体型的比较 (%)

黑龙江人		四川人 <sup>[5]</sup>		湖南人 <sup>[6]</sup>		中国汉族人 <sup>[7]</sup>		天津人 <sup>[8]</sup>		台湾人 <sup>[9]</sup>		德国人 <sup>[10]</sup>	
单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率
A30-B13	6.65	A2-B46	11.71	A2-B46	12.92	A2-B46	8.12	A30-B13	6.21	A2-B46	10.12	A1-B8	8.30
A2-B46	4.75	A11-B60	6.32	A11-B60	9.49	A33-B58	5.71	A2-B46	5.49	A33-B58	8.94	A3-B7	5.73
A33-B58	3.41	A33-B58	5.87	A24-B60	5.24	A30-B13	5.28	A2-B61	2.94	A11-B60	8.91	A2-B44	4.65
A2-B61	2.69	A11-B75	4.19	A2-B60	5.17	A11-B60	4.09	A33-B58	2.63	A24-B60	5.93	A2-B62	4.23
A2-B62	2.25	A11-B13	3.81	A33-B58	4.60	A24-B60	2.65	A2-B62	2.49	A2-B60	4.92	A2-B7	3.67
A11-B60	2.20	A24-B60	3.64	A11-B75	4.43	A2-B60	2.64	A11-B60	2.43	A11-B62	4.91	A3-B35	3.03
A24-B61	2.04	A2-B60	2.87	A11-B13	3.92	A2-B62	2.56	A2-B13	2.26	A11-B13	3.96	A2-B60	2.88
A33-B44	1.95	A11-B46	2.70	A11-B46	3.09	A2-B61	2.28	A2-B51	2.16	A11-B46	2.85	A2-B51	2.04
A2-B13	1.82	A11-B62	2.64	A11-B62	2.15	A24-B62	2.24	A2-B75	2.16	A2-B38	2.48	A2-B27	1.87
A2-B51	1.71	A30-B13	2.24	A11-B51	2.00	A11-B75	2.21	A2-B60	2.04	A2-B51	2.67	A11-B35	1.86

#### 4 讨论

本研究在黑龙江地区汉族人群中检测到 77 个等位基因特异性，基本上涵盖了中国人的 HLA-A、

B 和 DRB1 基因, 包括 A25、A34、B42、B73、DR6 等原来认为在中国人群中不存在或罕见的已知特异性, 以及在本群体中发现的 HLA DRB1\*1216<sup>[16]</sup>和 B\*5621<sup>[17]</sup>新基因, 这表明黑龙江地区汉族人群中 HLA 基因多态性较为丰富。结果中未发现 HLA-A43, A80, B78, DR18 等 4 种基因, 由于抽样误差, 从统计学考虑目前尚不能下结论说在黑龙江地区汉族人群中不存在这些基因, 但如果存在的话, 他们的基因频率将低于 0.0001。实际上 HLA-A43, A80, B78, DR18 都是带有种族特性的基因, 主要存在于黑种人<sup>[13]</sup>。从这些基因的分布特点考虑, 在黑龙江地区汉族人群中未检测到这些基因是完全可能的。

19 种 A 特异性、44 种 B 特异性和 14 种 DR 特异性的编码基因, 理论上可组成 836 种 A-B、616 种 B-DRB1、11704 种 A-B-DRB1 单体型, 但其中有 48% 的 A-B、29% 的 B-DRB1 和 83% 的 A-B-DRB1 单体型 (表 4) 未观察到或频率 < 10<sup>-6</sup>, 提示黑龙江地区汉族人群中 HLA-A, B, DRB1 等位基因间存在连锁不平衡。这与 A-B, B-DRB1 和 A-B-DRB1 单体型的实际熵值低于理论熵值的计算结果 (6.97 < 2.99 + 4.44, 7.26 < 4.44 + 3.41, 9.30 < 2.99 + 4.44 + 3.41) 相符合。黑龙江地区汉族人群中, 常见的 A-B、B-DRB1 单体型分别为 25 条和 22 条, 其中表现为显著连锁不平衡的单体型各 19 条; 在呈现强连锁不平衡的 A-B、B-DRB1 单体型中, 属于常见单体型的分别为 5 和 3 条 (表 5)。由此可见, 高频单体型不一定连锁不平衡, 频率较低的等位基因间也存在显著的连锁不平衡, 如 A34-B75、B77-DR12 等单体型, 频率都 < 0.001, 但在统计学角度上表现为强连锁不平衡, 这是本研究调查样本量大的结果。

表 10 不同人群频率最高的 10 种 HLA-B-DRB1 单体型的比较 (%)

黑龙江人		四川人		湖南人		中国汉族人		韩国人 <sup>[11, 12]</sup>		台湾人		德国人	
单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率
B13-DR7	6.77	B46-DR9	8.45	B46-DR9	9.75	B46-DR9	6.17	B44-DR13	6.9	B46-DR9	6.68	B8-DR3	8.00
B46-DR9	3.32	B58-DR17	4.00	B60-DR9	4.02	B13-DR7	5.44	B62-DR4	4.5	B58-DR3	6.61	B7-DR15	7.88
B13-DR12	2.61	B75-DR12	3.01	B60-DR15	3.44	B58-DR17	4.02	B58-DR13	4.1	B60-DR4	3.70	B35-DR1	3.46
B52-DR15	2.03	B13-DR15	2.54	B60-DR4	3.32	B62-DR4	2.84	B44-DR7	3.4	B60-DR11	3.02	B44-DR7	3.00
B58-DR17	2.00	B13-DR7	2.28	B58-DR17	3.22	B75-DR12	2.32	B61-DR9	3.3	B60-DR9	3.01	B62-DR4	2.92
B61-DR9	1.93	B58-DR13	2.18	B60-DR8	3.17	B13-DR12	2.18	B7-DR1	2.9	B60-DR12	2.90	B13-DR7	2.60
B44-DR13	1.86	B46-DR8	2.08	B75-DR12	2.85	B60-DR9	2.10	B27-DR1	2.6	B60-DR8	2.72	B57-DR7	2.15
B62-DR4	1.85	B62-DR4	2.01	B60-DR12	2.66	B61-DR9	2.07	B46-DR8	2.6	B13-DR15	2.29	B44-DR4	2.10
B62-DR15	1.56	B60-DR9	1.99	B13-DR15	2.52	B51-DR9	2.00	B54-DR4	2.5	B58-DR13	2.04	B44-DR11	2.01
B7-DR15	1.52	B60-DR8	1.91	B46-DR15	2.47	B46-DR8	1.76	B52-DR15	2.5	B46-DR8	2.03	B60-DR13	1.87

表 11 不同人群频率最高的 10 种 HLA-A-B-DRB1 单体型的比较 (%)

黑龙江人		四川人		湖南人		中国汉族人		天津人		德国人	
单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率	单体型	频率
A30-B13-DR7	5.69	A2-B46-DR9	5.86	A2-B46-DR9	7.06	A30-B13-DR7	4.57	A30-B13-DR7	5.06	A1-B8-DR3	6.25
A2-B46-DR9	2.36	A33-B58-DR17	3.08	A33-B58-DR17	2.55	A2-B46-DR9	4.52	A2-B46-DR9	2.26	A3-B7-DR15	3.44
A33-B58-DR17	1.54	A11-B75-DR12	2.05	A11-B75-DR12	2.16	A33-B58-DR17	3.33	A33-B58-DR17	1.38	A2-B7-DR15	2.23
A33-B44-DR13	1.10	A11-B13-DR15	1.78	A11-B60-DR4	2.02	A11-B75-DR12	1.47	A2-B13-DR12	1.37	A2-B62-DR4	1.82
A33-B58-DR13	1.08	A30-B13-DR7	1.78	A11-B13-DR15	2.02	A33-B58-DR13	1.34	A2-B46-DR8	1.19	A3-B35-DR1	1.70
A2-B13-DR12	1.06	A33-B58-DR13	1.72	A2-B46-DR8	1.81	A2-B46-DR8	1.25	A2-B61-DR9	1.08	A2-B44-DR4	1.37
A2-B46-DR8	0.97	A2-B46-DR14	1.62	A11-B46-DR9	1.64	A11-B62-DR4	1.11	A2-B62-DR12	1.01	A2-B60-DR13	1.11
A1-B57-DR7	0.86	A11-B60-DR8	1.06	A11-B75-DR15	1.46	A11-B60-DR9	0.91	A11-B62-DR4	0.95	A2-B13-DR7	0.10
A2-B61-DR9	0.79	A11-B62-DR4	0.97	A11-B60-DR8	1.45	A24-B62-DR4	0.90	A2-B60-DR15	0.91	A1-B57-DR7	0.09
A11-B62-DR4	0.77	A11-B75-DR15	0.97	A30-B13-DR7	1.43	A2-B13-DR12	0.85	A33-B44-DR7	0.87	A29-B44-DR7	0.09

在黑龙江地区汉族人群中观察到 228 条常见的 HLA-A-B-DRB1 单体型, 占单体型总数的 11.39 (228/2002), 其余 1774 条单体型频率均  $<0.001$ , 表明黑龙江地区汉族人群中任意个体间 HLA-A, B, DRB1 全相合的概率非常低。分析本地区 HLA-A, B, DRB1 等位基因多态性、单体型频率及连锁不平衡的特征可为估计捐献者资料的例数对患者查询的满足程度、与患者查询的匹配几率以及移植成活或预后的关系等研究提供依据。也对分析临床非溶血性输血反应原因亦有一定帮助。

黑龙江地区汉族人群频率最高的 10 种 HLA-A-B、HLA-B-DRB1、HLA-A-B-DRB1 三种单体型分别与四川人、湖南人、中国汉族人和天津人相比, 与天津人相同的单体型数目最多, 达到 7~8 种单体型一致, 且次序和频率分布大体一致; 其次是中国汉族人, 均有 6 种单体型相同; 与四川和湖南人相同的单体型数目最少, 仅有 2~4 种单体型一致。四川和湖南属于南方, 而天津属于北方, 说明黑龙江地区汉族人群中各种单体型分布符合中国北方汉族人群的 HLA 单体型分布特征。由于黑龙江省地处中国的最北端, 清代中后期随着“京旗移垦”以及此后的“开禁放垦”与“闯关东”, 大量汉族人拥向黑龙江, 使这里的人群分布与中国汉族人群相类似, 但是长期的北方生活, 又使黑龙江地区的汉族人群 HLA 单体型分布具有北方汉族人群的特征。所以, 与中国汉族人群相比, 有 6 种单体型是相同的, 与北方汉族人(天津人)相比仅有 1~2 种单体型的差异。通过以上比较可见, 各地区汉族人群中频率较高的 HLA 单体型分布虽然存在着南北差异, 但南北地区也存在其共同特点(表 6)。因此可以推论, 中国其他地区人群在中国造血干细胞资料库黑龙江地区捐献者中容易寻找到 HLA-A-B-DRB1 单体型相合的供者。

黑龙江地区汉族人群中常见的三座位 HLA 单体型与西方人相比, 德国人群中常见的 A2-B60-DR13、意大利人群中的 A30-B18-DR3<sup>[14]</sup>、非裔美国人群中的 A2-B45-DR1、A33-B53-DR8、A23-B53-DR11<sup>[15]</sup> 单体型在本组汉族中未观察到。与韩国人相比, 在韩国人群中常见的 HLA-A-B-DRB1 单体型在本组中均有检出, 如 A33-B44-DR13, 这可能是同属黄种人且地域较接近的缘故, 但最常见的 20 个 A-B-DRB1 单体型的累积频率, 黑龙江地区汉族人群为 21.97%, 韩国人为 36.2%, 表明前者的 HLA 等位基因和单体型的多态性更为丰富。与日本人相比, 在日本常见的 A33-B44-DR13、A2-B46-DR8、A2-B46-DR9 单倍型均有检出, 顺序见表 11, 与日本人相接近。与台湾人相比, 在台湾人群中频率最高的 10 种 HLA-A-B 和 HLA-B-DRB1 单体型中分别有 4 条和 2 条单体型与黑龙江地区汉族人群相同, 但与中国南方人(四川人和湖南人)相比, 却有 7~8 条单体型相同, 例如 A2-B46 和 B46-DR9 单体型在台湾人和中国汉族人群中均较为广泛, 而在中国汉族人群中普遍存在的 HLA-A30-B13 单体型在台湾人中并不常见, 说明台湾人 HLA 单体型分布特征与中国南方人相接近, 与黑龙江地区汉族人群相差较大。通过各人群间的对比分析表明: HLA 单体型分布具有显著的种族、地域差异, HLA 单体型在不同种族的人群中有其各自独特的人群分布特征; 在同一民族不同地域的人群中有其独特的地理分布特征。由此证明了在不同地区和不同人群中寻找 HLA 单体型相合的造血干细胞捐献者是困难的。其他国家地区人群在黑龙江地区造血干细胞捐献者资料库中寻找 HLA 单体型相合供者相对于中国地区人群较为困难。但是本研究的群体中含有绝大部分 HLA 基因特异型, 对在所有人群中都表现为高或中频率分布的单体型, 在中国造血干细胞资料库黑龙江地区捐献者中寻找 HLA 单体型相合的供者也是有可能的。

HLA 等位基因频率和单体型频率及连锁不平衡在不同人种、地域存在明显差异。黑龙江省地



处中国的最北端，频率较高的 HLA 单体的分布符合中国北方汉族人群特征，与中国汉族人群有较大的相似性，但又有其自身独特的单体型。例如黑龙江地区汉族人群中常见的单体型 HLA-A1-B57-DR7 在中国其他汉族人群中不是常见的单体型，而在德国人中却是常见的单体型。因此，在这个具有特殊意义的群体建立非亲缘关系的造血干细胞捐献者资料库是对中华民族 HLA 基因分型研究和中国造血干细胞库的重要补充。截止到 2007 年 3 月，本地区捐献者 HLA 数据达 24491 条，通过中国造血干细胞库管理中心对国内外各移植医院的患者开展网络配型信息检索。已有成功移植 20 例。

**结论** 1. 黑龙江地区汉族人群 HLA-A, B, DRB1 等位基因和单体型多态性较为丰富，其中 A2, A11, A24, B13, B61, B46, DR15, DR9, DR7 和 A30-B13-DR7、A2-B46-DR9、A33-B58-DR17 是本地区频率较高的等位基因和单体型。其频率分布数据和相关遗传参数可作为黑龙江汉族人群的参考标准。2. 通过与不同地域的中国汉族人群和其他人种的比较分析，黑龙江地区汉族人群 HLA-A, B, DRB1 等位基因和单体型的分布特征接近北方汉族人群，与中国汉族人群总体分布特征相似，未发现群体特有的基因和单体型，但具有其自身分布特征。3. 根据本研究建立黑龙江地区汉族人群 HLA 基因分型资料库，为临床移植供者的选择、资料库志愿者招募策略的制定提供了重要参考。

#### 参考文献

- [1] 赵桐茂, 主编. HLA 分型原理和应用. 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 126
- [2] 张工梁, 赵桐茂. HLA 人群分布. 见: 谭建明, 主编. 组织配型技术与临床应用. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 112-131
- [3] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. Ver2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva. Available at <http://lgb.unige.ch/arlequin>
- [4] Muller CR, Ehninger G, Goldmann SF. Gene and haplotype frequencies for the loci HLA-A, HLA-B, and HLA-DR based on over 13000 German blood donors [J]. Hum Immunol, 2003, 64 (1): 137
- [5] 曾洁, 王憬惺, 等. 四川造血干细胞捐献者资料库 HLA-A, B, DRB1 基因和单倍型研究[J]. 中国输血杂志, 2005, 18 (5): 384-388
- [6] 谢毓滨, 王赤林, 等. 湖南地区人群 HLA 单倍型的多态性[J]. 研究临床输血与检验, 2006, 8 (2): 108-113
- [7] 孙继丽, 杜可明, 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
- [8] 冯明亮, 季芸, 陆琼. 江浙沪地区人群汉族人群 HLA 单体型研究 (J). 遗传学报, 2003, 30 (6): 584.
- [9] 杨丛林, 梁晓岚, 邱录贵, 等. 天津 3000 份脐带血 HLA 单体型多态性分析[J]. 中国输血杂志, 2005, 18 (2): 110-114
- [10] Shaw CK, Chen LL, Lee A, et al. Distribution of HLA gene and haplotype frequencies in Taiwan: a comparative study among Min-nan, Hakka, Aborigines and Mainland Chinese [J]. Tissue Antigens, 1999, 53 (1): 51-64
- [11] Park MH, Kim HS, Kang SJ. HLA-A, B, DRB1 allele and haplotype frequencies in 510 Koreans [J]. Tissue

Antigens, 1999, 53 (4): 386-390

[12] Park MH, Hwang YS, Park KS, et al. HLA haplotypes in Koreans based on 107 families[J]. Tissue Antigens, 1998, 51 (4Pt1): 347

[13] 赵桐茂, 主编. 人类血型遗传学, 第1版. 北京: 科学技术出版社, 1987, 163-170, 363-364

[14] Rendine S, Borelli I, Barbanti M, et al. HLA polymorphisms in Italian bone marrow donors: a regional analysis[J]. Tissue Antigens, 1998, 52 (2): 135

[15] Zachary AA, Steinberg AG, Bias WB, et al. The frequencies of HLA alleles and haplotypes and their distribution among donors and renal patients in the UNOS registry [J]. Transplantation, 1996, 62 (2): 272

[16] 新等位基因 DRB1\*1216 (申报号 HWS1004777-检索号 EF688603) 2007年7月 WHO 命名委员会正式命名

[17] 新等位基因 B\*5621 (申报号 HWS10004940-检索号 EU079373) 2007年8月 WHO 命名委员会正式命名

## 2-18

### 北方汉族人群 HLA-DRB1\*高分辨多态性

刘孟黎<sup>1</sup> 刘耀堂<sup>2</sup> 刘 晟<sup>1</sup> 张 艳<sup>1</sup> 齐 珺<sup>1</sup> 沈春梅<sup>1</sup>

1 陕西省血液中心 (西安 710061) 2 中国造血干细胞捐献者资料库陕西分库

**摘要:** **目的** 了解北方汉族人群 HLA-DRB1\*基因高分辨多态性分布特点。**方法** 从 11755 例北方汉族造血干细胞捐献者中随机抽取 167 例, 采用 PCR-SSP 方法进行高分辨 HLA-DRB1\*基因分型。**结果** 共检出 36 种等位基因, DRB1\*03、DRB1\*07、DRB1\*09、DRB1\*16 等未检出多态性, DRB1\*03 全部表现为 0301, DRB1\*07 全部表现为 0701, DRB1\*09 全部表现为 090102, DRB1\*16 全部表现为 160201。基因频率最高的前三位是 DRB1\*15 (0.1677)、DRB1\*09 (0.1407) 和 DRB1\*04 (0.1317), 等位基因高度集中, DRB1\*15 多态性以 1501 为主 (87.5%), DRB1\*04 最具多态性, 但很集中, 27.27% 表现为 0405, 36.36% 表现为 0406。**结论** 中国北方汉族人群中 HLA-DRB1\*等位基因分布相对集中, 多态性分布与白种人和黑人存在差异。

**关键词:** 北方汉族; HLA-DRB1\*; 高分辨; 等位基因; 多态性

HLA 复合体编码的抗原参与机体的免疫应答、免疫反应和免疫调节, 并决定组织相容性。器官及造血干细胞移植前供受体 HLA 配型对于临床移植的成败至关重要, 在肾移植中 HLA-DR 抗原的作用较 HLA-A, B 更为重要<sup>[1]</sup>。目前 HLA-DR 基因与骨髓移植、器官移植及疾病相关性成为研究热点, 但多数的研究都处在低分辨水平。HLA 作为遗传标志, 它在地域、种族的分布带有明显的特征, 高分辨的多态性对以上的研究将更有意义。笔者在对中国造血干细胞捐献者资料库陕西分库 11755 北方汉族人群样本进行 HLA-DRB1\*低分辨的基础上, 随机对其中的 167 例进行高分辨多态性研究, 现报告如下。

## 1 资料与方法

**1.1 样本来源** 以北纬 34° 秦岭-淮河一线为中国南北分界线, 籍贯为分界线以北的省份 (包括辽宁, 吉林, 黑龙江, 甘肃, 宁夏, 新疆, 内蒙, 青海, 陕西, 山西, 河南, 河北, 山东, 天津, 北京) 的汉族、健康、无血缘关系的 18~45 岁个体 11755 名, 应用计算机随机抽样 167 人份, 作为高分辨样本。

**1.2 DNA 提取和 HLA-DRB1\* 高分辨** DNA 快速抽提试剂盒和 PCR-SSP 高分辨 HLA-DRB1\* 基因分型试剂盒购自德国 Protrans 公司。取 500 $\mu$ l EDTA 抗凝全血提取 DNA, 分型 DNA 浓度在 40~100ng/ $\mu$ l, OD260/280 比值为 1.7~1.8。将 Taq 酶、DNA、Primer 按一定比例混合后 94 $^{\circ}$ C 2min; 96 $^{\circ}$ C 10s, 65 $^{\circ}$ C 1min, 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 10s, 61 $^{\circ}$ C 50s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 20 个循环; 在 2% 琼脂糖凝胶上点样电泳后, 凝胶成像系统分析结果。

**1.3 基因频率采用直接计数法, 率的比较采用  $\chi^2$  检验法。**

## 2 结果

**2.1 167 份高分辨显示 HLA-DRB1\* 在中国北方有一定的特征 (见表 1)。**共检出 36 种等位基因, 有些等位基因在中国北方汉族人群表现单一。如 15 例 DRB1\*03 都表现为 0301; 22 例 DRB1\*07 都表现为 0701; 47 例 DRB1\*09 都表现为 090102; 10 例 DRB1\*16 都表现为 160201。

**2.2 基因频率最高的前三位依次是 DRB1\*15 (0.1677)、DRB1\*09 (0.147) 和 DRB1\*04 (0.1317), 等位基因分布高度集中。**DRB1\*15 多态性以 1501 为主 (49/56); DRB1\*09 未检出多态性, 47 例全部表现为 090102; DRB1\*04 最具有多态性, 但很集中, 44 例中 12 例表现为 0405, 16 例表现为 0405。

**2.3 HLA-DRB1\* 与白种人和黑人比较** 在中国北方汉族人群中基因频率排在前三位的与白种人和黑人之间存在差异, 本组 DRB1\*15 (0.1677) 与白种人 (0.120) 相比、DRB1\*09 (0.1407) 与白种人 (0.017) 和黑人 (0.028) 相比、DRB1\*04 (0.1317) 与黑人 (0.077) 相比均明显高于对比人群, 存在显著差异,  $P < 0.01$ ; 本组 DRB1\*01 (0.0299) 与白种人 (0.128) 和黑人 (0.098) 相比、DRB1\*03 (0.0449) 与白人 (0.110) 和黑人 (0.113) 相比均明显低于对比人群, 存在显著差异,  $P < 0.01$ 。

表 1 中国北方汉族 DRB1\* 等位基因与白种人和黑人的比较

DRB1* 等位基因	中国北方汉族		基因频率	
	阳性数 $n=167$	基因频率	Caucasian <sup>[2]</sup> ( $n=145$ )	Africa <sup>[3]</sup> ( $n=187$ )
DRB1*01	10	0.0299	0.128	0.098
DRB1*0101	9	0.0269	0.096	0.042
DRB1*0102	1	0.0030	0.021	0.049
DRB1*0103	0	0	0.007	0.007
DRB1*0104	0	0	0.003	0
DRB1*03	15	0.0449	0.110	0.113
DRB1*0301	15	0.0449	0.107	0.070
DRB1*0302	0	0	0.003	0.035
DRB1*04	44	0.1317	0.159	0.077
DRB1*0401	6	0.0180	0.072	0.035
DRB1*0402	1	0.0030	0.003	0
DRB1*0403	2	0.0060	0.017	0.014

DRB1*等位基因	中国北方汉族		基因频率	
	阳性数 $n=167$	基因频率	Caucasian <sup>[2]</sup> ( $n=145$ )	Africa <sup>[3]</sup> ( $n=187$ )
DRB1*0404	2	0.0060	0.045	0.007
DRB1*0405	12	0.0360	0	0.007
DRB1*0406	16	0.0479	0.014	0
DRB1*0407	1	0.0030	0.003	0
DRB1*0408	1	0.0030	0.003	0
DRB1*0409	0	0	0	0
DRB1*0410	3	0.0090	0	0
DRB1*0411	0	0	0	0
DRB1*0412	0	0	0	0
DRB1*0413	0	0	0	0.014
DRB1*07	22	0.0659	0.145	0.063
DRB1*0701	22	0.0659	0.145	0.063
DRB1*08	20	0.0599	0.028	0.035
DRB1*0801	1	0.0030	0.021	0
DRB1*0802	6	0.0180	0.007	0
DRB1*080302	12	0.0360	0	0
DRB1*0804	0	0	0.012	0.035
DRB1*0805	0	0	0	0
DRB1*0806	0	0	0	0
DRB1*0807	0	0	0	0
DRB1*0808	0	0	0	0
DRB1*0809	0	0	0	0
DRB1*0810	1	0.0030	0	0
DRB1*09	47	0.1407	0.017	0.028
DRB1*090102	47	0.1407	0.017	0.028
DRB1*0902	0	0	0	0
DRB1*0903	0	0	0	0
DRB1*10	7	0.0210	0.014	0.035
DRB1*1001	7	0.0210	0.014	0.035
DRB1*11	24	0.0719	0.103	0.169
RB1*1101	20	0.0599	0.052	0.113
DRB1*1102	0	0	0.007	0.042
DRB1*1103	0	0	0.014	0.007
DRB1*1104	4	0.0120	0.028	0.007
DRB1*12	26	0.0778	0.010	0.021
DRB1*120101	17	0.0508	0.007	0.014
DRB1*120201	9	0.0270	0.003	0.007
DRB1*13	20	0.0599	0.121	0.176
DRB1*1301	9	0.0270	0.055	0.035
DRB1*1302	9	0.0270	0.048	0.077
DRB1*1303	0	0	0.003	0.035
DRB1*1304	0	0	0	0.014
DRB1*1305	0	0	0	0
DRB1*1306	0	0	0	0
DRB1*1307	0	0	0	0.007
DRB1*1308	0	0	0	0
DRB1*1309	0	0	0	0
DRB1*1310	0	0	0	0
DRB1*1311	0	0	0	0
DRB1*1312	2	0.0060	0	0
DRB1*1313	0	0	0	0
DRB1*1314	0	0	0	0
DRB1*1315	0	0	0	0
DRB1*1316	0	0	0	0

DRB1*等位基因	中国北方汉族		基因频率	
	阳性数 $n=167$	基因频率	Caucasian <sup>[2]</sup> ( $n=145$ )	Africa <sup>[3]</sup> ( $n=187$ )
DRB1*1317	0	0	0	0
DRB1*1318	0	0	0	0
DRB1*1319	0	0	0	0
DRB1*1320	0	0	0	0
DRB1*1321	0	0	0	0
DRB1*1322	0	0	0	0
DRB1*1323	0	0	0	0
DRB1*1324	0	0	0	0
DRB1*1325	0	0	0	0
DRB1*1326	0	0	0	0
DRB1*1327	0	0	0	0.007
DRB1*14	33	0.0988	0.045	0.021
DRB1*1401	18	0.0539	0.041	0.021
DRB1*1402	0	0	0.003	0
DRB1*1403	1	0.0030	0	0
DRB1*1404	2	0.0060	0	0
DRB1*1405	10	0.0300	0	0
DRB1*1406	0	0	0	0
DRB1*1407	1	0.0030	0	0
DRB1*1408	0	0	0	0
DRB1*1409	0	0	0	0
DRB1*1410	0	0	0	0
DRB1*1411	0	0	0	0
DRB1*1412	1	0.0030	0	0
DRB1*15	56	0.1677	0.093	0.120
DRB1*1501	49	0.1467	0.086	0.014
DRB1*1502	5	0.0150	0.007	0
DRB1*1503	0	0	0	0.092
DRB1*1504	0	0	0	0.007
DRB1*1505	0	0	0	0
DRB1*1506	0	0	0	0
DRB1*1507	2	0.0060	0	0
DRB1*16	10	0.0299	0.028	0.049
DRB1*1601	0	0	0.024	0.007
DRB1*1602	10	0.0299	0.003	0.042

### 3 讨论

HLA 是人体调控特异性免疫应答反应以及决定病原体或疾病易感性个体差异的主要基因系统, 具有高度多态性和显著的人种、民族、地域差异。有关 HLA-DR 抗原在人群的分布频率已有很多报道<sup>[4,5]</sup>, 但主要是低分辨, 高分辨报道相对少见。随着分子生物学方法的建立, 新的等位基因不断的被发现, 目前世界卫生组织命名的 HLA-DRB1\*基因超过 460 种<sup>[6]</sup>, 我们检测到 36 种, 说明中国北方汉族人群 HLA-DRB1\*等位基因相对集中。笔者在对 11755 北方汉族人群 HLA-DRB1\*低分辨分型的基础上, 随机对其中的 167 例进行高分辨基因分型。结果显示 HLA-DRB1\*03, \*07, \*09, \*10, \*16 均未检测出多态性, DRB1\*03 全部表现为 0301; DRB1\*07 全部表现为 0701; DRB1\*09 全部表现为 090102; DRB1\*16 全部表现为 160201。在基因频率最高的前三位 HLA-DRB1\*04, \*09\*15 中, 同样表现为多态性高度集中。87.5%HLA-DRB1\*15 表现为 1501; HLA-DRB1\*09 全部表现为 090102; HLA-DRB1\*04 基因 27.27%为 0405, 36.36%为 0406。

中国北方汉族人群 HLA-DRB1\*分布与白种人和黑人存在差异, 在 167 例中国北方汉族人群中基因频率最高的前三位为 DRB1\*15 (0.1677), DRB1\*09 (0.1407) 和 DRB1\*04 (0.1317)。DRB1\*15 频率明显高于白种人 (0.093),  $P < 0.01$ , 与黑人相比无显著差异; DRB1\*09 在中国北方汉族人群中频率明显高于白人 (0.017) 和黑人 (0.028),  $P < 0.01$ ; DRB1\*04 在中国北方汉族人群频率较高 (0.1317), 与黑人 (0.077) 相比  $P < 0.01$ , 与白种人 (0.159) 相比无显著差异。在中国北方汉族人群的 DRB1\*01 (0.0299)、DRB1\*03 (0.0449) 频率明显低于白种人 (0.128, 0.110 和黑人 (0.098, 0.113), 均存在显著差异 ( $P < 0.01$ )。从等位基因的多态性来看, 中国人人群中 DRB1\*15 以\*1501 为主 (0.1467), 占全部 DRB1\*15 的 87.5%, 在黑人以\*1503 为主, 该等位基因在中国北方汉族人群及白种人中均未检出。另外\*1507 在中国人中频率为 0.0060, 而在白人及黑人中均未检出。DRB1\*09 在中国北方汉族人群中全部为\*090102, 在白种人和黑人虽然也全部为\*0901, 但频率均很低。中国北方汉族 DRB1\*04 的多态性较为复杂, 检测到 9 种等位基因, 以\*0405 和\*0406 为主, 而在白种人和黑人中以\*0401 为主, 值得注意的是\*0413 的频率在黑人\*04 的基因中所占比例近四分之一, 而在中国人及白种人中均未检出,\*0410 仅在中国北方人群检测到。另外, 黑人中频率最高的 DRB1\*13 (0.176) 明显高于中国北方汉族人群 (0.059),  $P < 0.01$ , 但基因分布各有特点, 在黑人中检出 6 种等位基因, 在白种人和中国北方汉族人群中主要为\*1301 和\*1302; DRB1\*14 的频率在三个人群中都不高, 但在中国北方汉族人群中共检出\*1401/03-05/07/12 等 6 种等位基因, 而在白种人中仅检出\*1401 和少量\*1402, 在黑人中仅有\*1401; DRB1\*11 基因在黑人及白种人中不仅频率较高, 而且均检出\*1101-04 几种等位基因, 但在中国北方汉族人群中只检出\*1101 和\*1104, 且频率不高。

HLA 配型是否相合以及相合程度已成为同种异基因造血干细胞移植成功与否的关键因素之一。目前临床上非血缘异基因骨髓移植都要求 HLA-A, B, DR 高分辨匹配, 我们的结果可以为临床移植配型提供参考依据, 在低分辨结果已知的情况下, 可以预测 HLA-DR 高分辨配型的概率, 表现型为不具多态性或多态性集中的患者更容易找到匹配的供者, 而表现型为少见型的患者找到匹配供者的几率相对较低。

HLA 抗原存在除红细胞外所有的有核细胞表面, 并与免疫细胞表达的免疫球蛋白、T 细胞受体共同参与免疫识别和应答, 又由于免疫反应基因与 HLA 复合物紧密连锁并与某些 HLA-A, B, DR 等位基因存在连锁不平衡<sup>[7]</sup>。目前有很多 HLA 与疾病相关性的研究, 尤其是 HLA-DR, 如 HLA-DR 与肺结核、青光眼、肝病等<sup>[8, 9, 10]</sup>, 但都局限于低分辨水平, 如果能在高分辨基础上研究某种等位基因与疾病的相关性将会更有意义, 我们的报告将会为这些研究提供参考。

随着分子生物学方法特别是 DNA 测序技术被用于 HLA 分型以及造血干细胞捐献者数量的增加, 新的等位基因不断被发现, 我们在 11755 样本中发现的 2 个新的等位基因, HLA-DRB1\*0114 和 HLA-DRB1\*1463, 分别于 2006 年 3 月 22 日和 2006 年 10 月 30 日被世界卫生组织 HLA 因子命名委员会确认命名。HLA 新等位基因的出现增加了 HLA 系统多态性, 对临床移植配型提出了更高的要求, 因此无论是在骨髓移植、器官移植或是疾病相关等方面的研究, HLA-DRB1\*高分辨基础上的研究意义将会更大。

## 参考文献

- [1] 谭建明. HLA 与器官移植. 见谭建明, 周永昌, 唐孝达主编. 组织配型技术与临床应用 北京: 人民卫生出版社, 2002, 453-474
- [2] S.J. Chanock, C.B. Foster, F.W. Miller, et al. HLA-A, -B, -C<sub>w</sub>, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA. *Human Immunology*, 65 (9-10): 1211-1223
- [3] S.J. Chanock, C.B. Foster, F.W. Miller, et al. HLA-A, -B, -C<sub>w</sub>, -DQA1 and -DRB1 Alleles in an African American Population from Bethesda, USA. *Human Immunology*, 65 (9-10): 1223-1235
- [4] 肖露露 陈洪涛 叶欣, 等. HLA 多态性在广东汉族人群分布的特殊性. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19 (4): 302
- [5] 曾洁 王憬惺 孙水仙等, 四川省造血干细胞捐献者资料库 HLA-A, B, DRB1 基因和单倍型研究. *中国输血杂志*, 2005, 18 (5): 384
- [6] IMGT/HLA Sequence Database [www.ebi.ac.uk/imgt/hla/](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/)
- [7] 周永昌. HLA 与疾病相关总论. HLA 与器官移植. 见谭建明, 周永昌, 唐孝达主编. 组织配型技术与临床应用 北京: 人民卫生出版社, 2002, 494-511
- [8] 刘志辉 罗一鲁 周琳, 等. HLA-DR 基因与中国南方汉族部分肺结核易感基因的研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27 (6): 390
- [9] 梁晓华 于卫建 胡荣华, 等. HLA-DR 和 DQ 抗原与原发闭角型青光眼的相关性调查. *中国输血杂志*, 2005, 18 (5): 413
- [10] 刘海英 邓安梅 张建等. 原发性胆汁性肝硬化患者人类白细胞抗原等位基因多态性分析. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13 (6): 410

## 2-19

维吾尔族人群 HLA-C<sub>w</sub> 等位基因遗传多态性研究

邓志辉<sup>1</sup> 吴爽<sup>2</sup> 邹红岩<sup>1</sup> 王大明<sup>1</sup> 孙建东<sup>3</sup> 廖朗<sup>4</sup>

1 深圳市血液中心 (518035) 2 大连医科大学

3 新疆哈密地区中心血站 4 新疆哈密红星医院

**摘要:** 目的 研究新疆维吾尔族人群 HLA-C<sub>w</sub> 等位基因的遗传多态性。方法 采用自行建立的 HLA-C<sub>w</sub> 基因测序分型方法, 并辅以 Ariza 商品化测序试剂盒, 对 100 份维吾尔族无关个体血样进行 HLA-C<sub>w</sub> 基因的第 2 和第 3 外显子进行序列测定; 用 ABI Prism™ 3100 检测测序反应产物, Assign3.5 分析软件分析结果。结果 (1) 经 Assign3.5 软件分析, 能直接分析出明确的 HLA-C<sub>w</sub> 等位基因型的样本占 30%; 排除罕见等位基因后, 可指征 HLA-C<sub>w</sub> 等位基因型的样本占 33%; 其余的样本经 PCR-SSP 高分辨分型试剂盒检测后, 可指征出等位基因型; (2) 在 70 份模棱两可的结果中, 共有 41 种 NMDP Allele Code, 出现 120 次, 其中频率在 5% 以上的有 03BPSK 等 7 种, 其频

率之和>50% (61/120); (3) 检出了 27 种 HLA-Cw 等位基因, 频率大于 10%的 2 种常见等位基因为: Cw\*0602>Cw\*0102, 介于 5%~10%的依次为: Cw\*0401>Cw\*0303>Cw\*0701>Cw\*1502, 维吾尔族中 Cw\*02, 04, 05, 06 组与 Cw\*01, 03, 07, 08 组的频率分别为 0.295 和 0.485; (4) 共检出 62 种 HLA-Cw 等位基因型, 基因型频率的分布符合 Hardy-Weinberg 定律。**结论** 本文的结果可为骨髓库和临床无关供/受者样本的 HLA-Cw 高分辨基因分型提供重要参考; 所得到的 HLA-Cw 位点的等位基因频率可为人类学、遗传学等研究提供基础数据。

**关键词:** 人类白细胞抗原 (HLA); 维吾尔族; HLA-Cw 位点; 测序分型; 遗传多态性。

## The genetic polymorphism of Uygur population at HLA-Cw locus by sequence based typing method

DENG Zhihui<sup>1</sup>, Wu Shuang<sup>2</sup>, Zou Hongyan<sup>1</sup> et al.

1. Shen-Zhen Blood Center, ShenZhen 518035, China; 2. Dalian Medical University, Dalian 116027)

**Abstract: Objective** To study the genetic polymorphism of Uygur population at HLA-Cw locus by sequence based typing (SBT). **Methods** A total of 100 no-related blood samples from Uygur population were subjected to sequencing exon 2 and 3 of HLA-Cw gene by the SBT method established by our laboratory, 50 randomly-selected samples in these 100 samples were sequenced as a parallel control by using the Ariza AlleleSEQR commercial kit. The purified products of sequencing reaction were run electrophoresis on the ABI 3100 DNA Sequencer and the designation of HLA-Cw genotype was accomplished by using the Assign3.5 software. **Results** (1) The heterozygous sequence at exon 2 and 3 of HLA-Cw gene for each sample was imported into the Assign3.5 software, 30% of 100 samples could obtain a definite genotype. 33% of these 100 samples with ambiguous results could be assigned allelic genotype by ruling out the rare alleles according to the NMDP Rare Allele List File; however, only when subjected to further confirmatory testing by PCR-SSP or other molecular method, the rest 37% of these 100 samples could be defined the final allelic genotype. (2) A total of 41 type of NMDP allele codes were observed 120 times in 70 samples with ambiguous result, 7 common NMDP codes with a frequency of more than 5% were found 61 times and the total frequency of these 7 common NMDP allele codes were more than 50% (61/120). (3) In this paper, 27 HLA-Cw alleles were identified, the common alleles with a frequency of >10% were Cw\*0602>Cw\*0102, four alleles with a frequency ranged from 5% to 10% were listed in order : Cw\*0401>Cw\*0303>Cw\*0701>Cw\*1502. The gene frequency for Cw\*02, 04, 05, 06 and Cw\*01, 03, 07, 08 were 0.295 and 0.485, respectively. (4) 62 HLA-Cw genotypes at allelic level were determined and the distribution of genotype frequency was in line with Hardy-Weinberg principle. **Conclusion** Our results can provide valuable information for HLA-Cw genotyping by SBT for bone marrow donor and clinical samples. The obtained HLA-Cw allele frequency and its distribution characteristics of Uygur population showed a broad further applications in anthropology and genetics



research work.

**Key words:** Human Leucocyte Antigen (HLA), Uygur population, HLA-Cw locus, Sequence based typing (SBT)

HLA-Cw 抗原为经典的 HLA- I 类分子, 为移植相关的抗原, 与自然杀伤细胞 (NK cell) 相互作用, 在细胞免疫反应中起重要作用<sup>[1]</sup>。HLA-Cw 基因高分辨水平的配型对无关供者骨髓移植的影响, 仍是当前国际移植免疫学、免疫遗传学研究和争论的问题<sup>[2- 3]</sup>。

维吾尔族是新疆维吾尔自治区的主体民族, 人口 800 多万<sup>[4]</sup>。关于维吾尔族 HLA-Cw 基因高分辨水平的遗传多态性研究, 尚未见报道。我们采用本实验室建立的 HLA 测序分型技术, 对 100 份维吾尔族血样进行了 HLA-Cw 基因的第 2 和第 3 外显子测序分型, 探讨维吾尔族人群 HLA-Cw 基因的遗传多态性, 以及在测序分型中出现的模棱两可问题, 现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 样本来源** 随机采了 100 名新疆哈密地区维吾尔族人群血样, 5%EDTA 抗凝。

**1.2 试剂与仪器** DL2000 DNA 分子标记 (Takara, 大连宝生物公司); Ariza AlleleSEQR HLA-Cw 测序分型试剂盒 (美国 Ariza 公司); PUREGENE®DNA 提取试剂盒 (Gentra 公司); Millipore DNA 纯化柱 (Millipore 公司); ABI PRISM BigDye3.1 Terminator (美国 ABI 公司); PE 9700 型基因扩增仪 (美国 ABI 公司); ABI 3100 测序仪 (美国 ABI 公司)。

**1.3 基因组 DNA 的提取方法** 采用 PUREGENE®DNA 提取试剂盒提取, 测定每一样本的浓度和纯度, 使用时将 DNA 终浓度调节至 50 ng/μL。

## 1.4 HLA-Cw 基因测序

**1.4.1 PCR 扩增** 目标序列为 HLA-Cw 基因第 2、第 3 外显子及第 2 内含子, 采用 25μL 反应体系, 包括 2.5 μL 10×PCR Buffer, 0.50 mmol/L dNTP, 1.75 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μmol/L 位点特异性引物 (见表 1), 1.25U 金牌 Taq 酶和 200ng 基因组 DNA。反应条件为: 预变性 (95°C 11min); 扩增 (96°C 20 Sec, 65°C 30 Sec, 72°C 90 Sec, 32 cycles); 保温 (72°C 15 min); 4°C 保存。取 5μL PCR 产物, 经 EB 染色, 于 1%琼脂糖凝胶中电泳; 对照 DL2000 DNA 分子标记, 在凝胶成像系统中观察, 特异性 PCR 产物条带为 1 kb。

**1.4.2 PCR 产物的纯化** 采用 Millipore DNA 纯化柱进行 PCR 产物的纯化。纯化的 PCR 产物用作测序反应 DNA 模板, 溶于 20 μL ddH<sub>2</sub>O 中。

**1.4.3 测序反应** 采用 10μL 反应体系, 内含 ABI PRISM BigDye3.1 Terminator 4μL, 测序引物 3.2μL, ddH<sub>2</sub>O 1.8μL, 测序模板 DNA 1μL。测序反应条件为: 95°C 10min→96°C 10 Sec, 50°C 5 Sec, 60°C 4 min, 25 cycles→4°C 保存。

**1.4.4 测序反应产物的纯化和电泳检测** 在每一测序反应产物中加入 3.0μL 3 M 醋酸钠, 62.5μL 95% 乙醇, 14.5μL ddH<sub>2</sub>O, 共 80μL, 封膜后混匀、离心, 在室温条件下避光放置过夜。然后, 以 2000 rcf 离心 20min, 去除上清液; 在每孔中加入 70%乙醇 180μL, 2000 rcf 离心 5 min, 去除上清液, 晾干, 加入甲酰胺溶液 (Hi-Di Formamide) 10μL, 混匀、离心后, 95°C 变性 2min, 在 ABI 3100 测序仪上进行电泳检测。

**1.5 平行对照** 采用 HLA-Cw 商品化试剂盒 (Atria Genetics, PA, USA) 按试剂盒说明书进行操作, 随机检测 50 人份。

**1.6 结果分析** 采用 Assign 3.5 SBT (Conexio Genomics, Western Australia) 分析软件, 分析受检者 HLA-Cw 位点的等位基因型。

**1.7 模棱两可结果的解决** 出现模棱两可的结果时, 首先是依据美国国家骨髓库 (National Marrow Donor Program, NMDP) 网站 (<http://bioinformatics.nmdp.org/>) 公布的罕见等位基因资料 [Rare Allele List File - Version 2.18.0 (07/2007)], 等位基因频率 < 1/50000 的 HLA-Cw 等位基因及其组合予以排除; 指征常见的等位基因<sup>[5]</sup> (common allele)。排除罕见等位基因后, 出现两种或两种以上常见/少见的等位基因时, 进一步采用 PCR-SSP 高分辨水平的 Olerup HLA-Cw 基因分型试剂盒 (GenoVersion, USA) 检测。

表 1 HLA-Cw 基因测序分型采用的 PCR 引物及 4 条测序引物

类型	碱基序列 (5'-3')
PCR 正向引物	AGC GAG GKG CCC GCC CGG CGC A
PCR 反向引物	GGA GAT GGG GAA GGC TCC CCA CT
Exon 2 正向测序引物	GAG GGT CGG GCG GGT CTC AG
Exon 2 反向测序引物	ATC TCA GAC CGG GAG ACT C
Exon 3 正向测序引物	GTT TCA TTT TCA GTT TAG GCC A
Exon 3 反向测序引物	GGA GAT GGG GAA GGC TCC CCA CT

## 2 结果

**2.1 模棱两可结果的统计** 将受检者 HLA-Cw 基因 Exon 2 和 Exon 3 的碱基序列, 导入 Assign 3.5 SBT 分析软件, 能直接分析出明确的 HLA-Cw 等位基因型的样本为 30 份。出现模棱两可的结果, 但根据 NMDP 的罕见等位基因资料, 排除罕见等位基因及其组合后, 可分析出 HLA-Cw 等位基因型的样本为 33 份; 其余的 37 份样本, 需经 PCR-SSP 高分辨分型试剂盒检测后, 指征出等位基因型。

**2.2 模棱两可结果中等位基因代码(NMDP Allele Code)的统计** 在 70 份模棱两可的结果中, 共检出和发现 41 种等位基因代码, 出现频率在 5% 以上的有: 03BPSK (030301/0320N) 12 次 (占 10%, 12/120), 01DPG (010201/010202/0117) 和 04KBG (0401/0409N) 分别检出 11 次 (占 9.17%, 11/120), 01BBWM (010201/010202/0109/0114)、07ET (070401/0711)、06TNA (0602/0606/0611) 出现 7 次 (占 5.83%, 7/120), 07CFPN (070101/070102/0706/0718/0740) 出现 6 次 (占 5%, 6/120)。

**2.3 检出的等位基因型及基因型频率** 共检出 62 种 HLA-Cw 等位基因型 (表 2), 其中以 (Cw\*0102, 0602) 的基因型频率最高 (0.07, 7/100)。

表 2 检出的等位基因型及频率

序号	基因型	基因型频率	序号	基因型	基因型频率	序号	基因型	基因型频率
1	0102, 0401	0.05	22	0303, 0802	0.01	43	0602, 0704	0.01
2	0102, 0602	0.07	23	0303, 0803	0.01	44	0602, 1202	0.01
3	0102, 0701	0.05	24	0303, 1205	0.01	45	0602, 1203	0.01
4	0102, 0702	0.01	25	0303, 1502	0.01	46	0602, 1402	0.03
5	0102, 0704	0.01	26	0303, 1602	0.01	47	0602, 1502	0.02
6	0102, 0802	0.01	27	0304, 0602	0.01	48	0701, 0702	0.01
7	0102, 1202	0.02	28	0304, 1202	0.01	49	0701, 0704	0.01

序号	基因型	基因型频率	序号	基因型	基因型频率	序号	基因型	基因型频率
8	0102, 1203	0.01	29	0304, 1402	0.03	50	0701, 0802	0.01
9	0102, 1502	0.02	30	0304, 1502	0.02	51	0701, 0803	0.01
10	0102, 1703	0.01	31	0401, 0501	0.01	52	0701, 1502	0.02
11	0103, 1202	0.03	32	0401, 0602	0.03	53	0702, 0801	0.01
12	0202, 0401	0.01	33	0401, 0702	0.01	54	0702, 1203	0.02
13	0202, 0602	0.01	34	0401, 0704	0.01	55	0704, 1505	0.01
14	0302, 0303	0.01	35	0401, 1202	0.01	56	0801, 0802	0.01
15	0302, 0602	0.02	36	0401, 1203	0.01	57	0801, 0803	0.01
16	0302, 0702	0.01	37	0401, 1502	0.01	58	0802, 1402	0.01
17	0302, 1502	0.01	38	0404, 1508	0.01	59	1202, 1203	0.01
18	0303, 0304	0.01	39	0501, 1502	0.01	60	1402, 1602	0.01
19	0303, 0401	0.04	40	0602, 0602	0.04	61	1517, 1701	0.01
20	0303, 0501	0.01	41	0602, 0701	0.02	62	0802,, 1203	0.01
21	0303, 0704	0.02	42	0602, 0702	0.02			

**2.4 检出的等位基因及其频率** 各等位基因的频率见表3。共检出了27种HLA-Cw等位基因，频率大于10%的2种常见等位基因为Cw\*0602、Cw\*0102，介于5%~10%的依次为：Cw\*0401>Cw\*0303>Cw\*0701>Cw\*1502。维吾尔族HLA-Cw等位基因频率的分布，与文献<sup>[6-7]</sup>报道的中国汉族、回族、蒙古族人群基因频率有显著差异。

**2.5 Cw\*02, 04, 05, 06组与Cw\*01, 03, 07, 08组的频率** 维吾尔族中这2组数据分别为0.295和0.485，详见表3。与文献<sup>[8]</sup>报道的广东汉族人群的数据有显著差异。

表3 检出的HLA-Cw等位基因及相关频率的统计

序号	等位基因	等位基因频率	对应的基因	特异性	基因频率
1	Cw*0102	0.130	Cw*01	Cw1	
2	Cw*0103	0.015	Cw*01	Cw1	Cw*01=0.145
3	Cw*0202	0.010	Cw*02	Cw2	Cw*02=0.010
4	Cw*0302	0.025	Cw*03	Cw10 (Cw3)	
5	Cw*0303	0.070	Cw*03	Cw9 (Cw3)	Cw*03=0.135
6	Cw*0304	0.040	Cw*03	Cw10 (Cw3)	
7	Cw*0401	0.095	Cw*04	Cw4	Cw*04=0.100
8	Cw*0404	0.005	Cw*04	-	
9	Cw*0501	0.015	Cw*05	Cw5	Cw*05=0.015
10	Cw*0602	0.170	Cw*06	Cw6	Cw*06=0.170
11	Cw*0701	0.065	Cw*07	Cw7	
12	Cw*0702	0.045	Cw*07	Cw7	Cw*07=0.145
13	Cw*0704	0.035	Cw*07	Cw7	
14	Cw*0801	0.015	Cw*08	Cw8	
15	Cw*0802	0.030	Cw*08	Cw8	Cw*08=0.06
16	Cw*0803	0.015	Cw*08	Cw8	
17	Cw*1202	0.045	Cw*12	-	
18	Cw*1203	0.035	Cw*12	-	Cw*12=0.085
19	Cw*1205	0.005	Cw*12	-	
20	Cw*1402	0.040	Cw*14	-	Cw*14=0.040
21	Cw*1502	0.060	Cw*15	-	
22	Cw*1505	0.005	Cw*15	-	Cw*15=0.075
23	Cw*1508	0.005	Cw*15	-	
24	Cw*1517	0.005	Cw*15	-	
25	Cw*1602	0.010	Cw*16	-	Cw*16=0.010
26	Cw*1701	0.005	Cw*17	-	
27	Cw*1703	0.005	Cw*17	-	Cw*17=0.020

### 3 讨论

HLA 测序分型是当前国际通用的高分辨率分型技术，测序分型过程中出现的模棱两可 (Ambiguity) 问题，是当前免疫遗传学急待解决的难题。Voorter 等<sup>[9]</sup>报道，基于 HLA-Cw 基因的第 2 和第 3 外显子进行测序分型，在 200 份样本中，发现 HLA-Cw 基因分型出现模棱两可的样本占 41%，高于 HLA-A 位点的 37%，接近于 B 基因的 46%；并且随着 HLA-Cw 新等位基因的不断发现，模棱两可的比例不断增加。

我们对 100 份维吾尔族样本 HLA-Cw 基因第 2 和第 3 外显子进行测序，结果显示能直接分析出明确的 HLA-Cw 等位基因型的样本仅占 30%，出现模棱两可结果的样本占所检测样本的比例，高于 Voorter 等<sup>[9]</sup>报道的数据。但出现模棱两可结果中，根据 NMDP 的罕见等位基因资料，排除罕见等位基因及其组合后，可指征出 HLA-Cw 等位基因型的样本占总样本数的 33%；其余的 37 份样本，需加做 PCR-SSP 高分辨分型试剂或其它方法检测后，才能指征出等位基因型，即 HLA-Cw 基因 Exon 2 和 Exon 3 常规测序分型后需要作进一步检测的模棱两可样本占 37%。

在检出的模棱两可的样本中，共有 41 种等位基因代码，出现 120 次，其中频率在 5% 以上的有 7 种，其频率之和 > 50% (61/120)。因此，针对这些常见的等位基因代码，根据每一代码所涵盖的等位基因，设计序列特异性引物 (SSP)，采用简便、快速、低耗的 PCR-SSP 方法，是解决 HLA-Cw 基因测序分型中模棱两可问题的有效方法之一。

关于 HLA-Cw 等位基因及其频率的分布，Hong WG 等<sup>[6, 7]</sup>对 HLA-Cw 基因第 2 和第 3 外显子测序，报道了北方汉族、蒙古族、回族中等位基因频率和分布特征，我们在维吾尔族检出了 27 种 HLA-Cw 等位基因，其中 2 种常见等位基因为 Cw\*0602、Cw\*0102，对比发现：维吾尔族检出频率最高的 HLA-Cw\*0602 (17%)，在北方汉族和蒙古族亦为常见 (频率 > 10%)；Cw\*0102 在维吾尔族、北方汉族、回族均有较高的频率分布。维吾尔族中 Cw\*0701 相关等位因的频率明显高于 Cw\*0702，而在北方汉族、蒙古族、回族群体中 Cw\*0702 的频率显著高于 Cw\*0701；维吾尔族中 Cw\*0303、Cw\*0802 和 Cw\*0704 的频率高于北方汉族、蒙古族、回族群体，但维吾尔族 Cw\*0304 的频率明显低于北方汉族、蒙古族、回族群体。经统计分析，维吾尔族 HLA-Cw 等位基因频率的分布，分别与文献<sup>[6, 7]</sup>报道的中国汉族、回族、蒙古族人群基因频率有显著差异。

HLA-Cw 分子与位于自然杀伤细胞表面的免疫球蛋白的受体 (KIR 分子) 组成的识别、信号传导系统，在调节 NK 细胞的杀伤功能中起重要作用。第一组 KIR 分子中 2DL1/2DS1 特异性识别 HLA-Cw02, 04, 05, 06 分子  $\alpha$  重链上第 80 位赖氨酸，第二组 2DL2/2DL3 及 2DS2/2DS3 特异性识别 HLA-Cw\*01, 03, 07, 08 分子  $\alpha$  重链上第 80 位天冬氨酸<sup>[8]</sup>。在广东汉族中 HLA-Cw02, 04, 05, 06 组及 HLA-Cw\*01, 03, 07, 08 组的频率分别为 0.092 及 0.7411，广东汉族人群 HLA-Cw 分子与 KIR 的识别方式属二组<sup>[8]</sup>；而在维吾尔族中，HLA-Cw02, 04, 05, 06 组及 HLA-Cw\*01, 03, 07, 08 组的频率分别为 0.295 和 0.485，这 2 组 HLA-Cw 分子频率分布不同于广东汉族人群，维吾尔族人群 HLA-Cw 分子与 KIR 的识别方式属混合型。

总之，我们针对 HLA-Cw 基因的第 2、第 3 外显子，建立了 HLA-Cw 基因测序分型方法，并与 Ariza 商品化试剂盒的分型结果进行了平行对照，取得了相一致的结果。并对 100 份维吾尔族血样进行了测序分型，统计和分析了出现的模棱两可样本的比例，以及模棱两可结果中 NMDP 等位

基因代码种类和常见类型，并提出了解决模棱两可问题的策略，可为骨髓库造血干细胞捐献者和临床无关供/受者对样本的 HLA-Cw 高分辨基因分型提供重要参考；所得到的维吾尔族群体 HLA-Cw 位点的基因型频率和等位基因频率，可为免疫学、人类学、法医遗传学等研究提供基础数据。

### 参考文献

- [1] Colonna M, Brooks EG, Ferrara GB, et al. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C[J]. *Science*, 1993, 260 (5111): 1121-1124
- [2] Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome[J]. *Blood*, 2004, 104 (7): 1923-1930
- [3] Takehiko Sasazuki, Takeo Juji, Yasuo Morishima, et al. Impact of donor-recipient HLA matching on survival after Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation from Unrelated Donors[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (5): 809-812
- [4] 中国的少数民族：维吾尔族 [EB/OL]. 中华文化信息网 [2007-11-15]. <http://www.ccnt.com.cn/tradition/minzhu/mz004.htm>
- [5] Cano P, Klitz W, Mack SJ, et al. Common and well-documented HLA alleles: report of the Ad-Hoc committee of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics[J]. *Hum Immunol*, 2007, 68 (5): 392-417
- [6] Hong WG, Fu YG, Chen SW, et al. Distributions of HLA class I alleles and haplotypes in northern Han Chinese[J]. *Tissue Antigens*, 2005, 66 (4): 297-304
- [7] Hong WG, Chen SW, Shao HW, et al. HLA class I polymorphism in Mongolian and Hui ethnic groups from northern China[J]. *Hum Immunol*, 2007, 68 (5): 439-448
- [8] 肖露露, 马红京, 尹晓林, 等. HLA-Cw 在广东汉族人群中的分布频率及其意义的初步分析[J]. *中国免疫学杂志*, 2004, 20 (4): 256-258.
- [9] Voorter CE, Mulkers E, Liebelt P, et al. Reanalysis of sequence-based HLA-A, -B and -Cw typings: how ambiguous is today's SBT typing tomorrow[J]. *Tissue Antigens*, 2007, 70 (5): 383-389.

2-20

## HLA 实验室的质量保证

严力行

全国血液标准委员会副主任委员 中国输血协会副理事长

卫生部血液安全研究重点实验室主任 浙江省血液中心顾问 (310006)

### HLA的分型技术

- HLA分型结果对移植的影响
- 血清学分型方法
  - HLA分型的血清学方法由于存在较大的误差 (25%-30%)，现在已逐步淘汰
- 基因分型 (DNA) 技术
  - HLA的分子生物学技术主要有两类：以PCR为基础的基因分型及以测序为基础的基因分型

### HLA基因分型

- 最常见的方法有PCR-SSOP (序列特异性寡核苷酸探针杂交)、PCR-SSP、PCR-Luminex、PCR-SBT、基因芯片等
- PCR-SSP: 方法简单, 可用于单个样本的检测
- PCR-SSOP: 大批量样本
- PCR-Luminex: 大批量样本
- 基因芯片: 高通量检测
- PCR-SBT (测序方法) 目前最准确方法

### 实验场地的规范性

- 适合基因分型 (PCR实验室)
- 卫生部临床检验中心文件
- PCR实验室验收审核制度
- 如何规范
  - 确保足够的场地面积
  - 合适分区
  - 避免污染

### PCR实验室4个不同区



试剂准备



DNA提取



PCR扩增



电泳分析

### 实验仪器与设备

- 必备的实验设备
- 各区不要混用
- 设备有效标识
- 设备的校准
- 设备的程序

### 专业仪器设备

- Luminex仪器



- ABI测序仪





• PCR洁净  
工作台

### 人员保障

- 专业技术人员
- 取得分子诊断培训合格证书
- 人员自身素质（责任心）
- 培训
  - 连续动态
  - 实时
  - 有效评估

### 试剂与耗材

- 试剂的质量
  - 选择可靠厂家
  - 内部制定标准
  - 按规定贮存
  - 有效期内使用
  - 定期监测
- 实验耗材在使用前需经过消毒灭菌处理
- 带滤芯的Tip头

### 方法的选择

- 实验方法的选定
  - 国家标准
  - 行业推荐
  - 公认的方法
- 最佳的方法
  - 依据实验室自身特点

### 标本的管理

- 标本唯一编号
  - 条形码
  - 不同来源的标记
- 标本验收
  - 不符合要求的标本处理
  - 书面记录
- 标本保存
  - 保存3-5年备查

### 实验过程的动态监测

- 严格执行既定的SOP
- 严格执行<临床基因扩增检验实验室工作规范>
- 记录
  - 全面可靠
  - 具有可追溯性
- 转移步骤严格核对
- 各区域进入更换区域性服装
- 规范操作防止污染

### DNA 抽提

- DNA 浓度和纯度的检测
- PCR 扩增 DNA 抽提时在关键控制点上核对，如 EP 管标记
- PCR 扩增
  - DNA 样本加入 PCR 反应管为关键控制点
  - 冰盒上操作
- 探针杂交、测序上样或电泳核对



### 有效防止污染

- 规范性操作
- 预防性措施
  - 每次实验前后消毒
  - 紫外线照射30分钟
  - 次氯酸消毒
- 定期监测污染
  - Wipe test 实验
  - 出现污染分析原因和改进

### 结果分析及报告发放

- 结果判定
  - 标准规范
  - 依据厂家提供的说明
  - 内部的标准
- 报告方式
  - 符合现行的标准
  - 行业通用
- 报告审核
- 报告追踪
- 报告收回

### 数据管理

- 结果判定
  - 自动软件
  - 减少人为偏差
- 数据转换或录用自动化
  - 记录完整
  - 可追溯性
  - 中间过程或状态
- 有专门的计算机

### 室内质控

- 实验内控标准
- 阴性对照
- 阳性对照
- 定期抽样2-3%样本进行室内质控
  - 随机抽样
  - 尽量考虑到多个等位基因
  - 第二种试剂或方法进行检测分型

### 室内质量评价

- 已知标准品
- 室内能力比对
  - 国际组织
  - UCL/ ASEATTA
  - 参比实验室
- 与日常检测方式完全相同
- 存在问题及时改进



## HLA 分型检测前的质量控制探讨

张德梅

太原市红十字血液中心 (030024)

中国造血干细胞捐献者资料库目前已成为全球最大的华人资料库,成功为多个国家和地区的患者提供了“生命的种子”,使患者获得了新生,而准确可靠的捐献者 HLA 分型数据可以说对于中国造血干细胞捐献者资料库而言堪称是“生命线”,错误的 HLA 分型数据给社会造成的负面影响将会很大。在 HLA 分型检测技术日趋成熟应用的今天,加强实验室内部的质量控制,无疑是提高 HLA 检测质量的有效手段。本文将探讨 HLA 分型检测前的质量控制方法。

**[Abstract]** Hematopoietic stem cell donor registry (China Marrow Donor Program, CMDP) is the best Chinese registry in the world. Many numbers of donors have helped more and more patients all over the world to extend their life with Hematopoietic stem cell transplantation. Accurate HLA typing data is very important to be rated as "Life Line. With the HLA technique is gradually maturing, strengthening the laboratory quality management is the valid means which raises a HLA examination quality. This text focuses on the quality control method in the pre-HLA examine.

### 关键控制点 (ccp):

HLA 分型检测过程由四个子过程:采集标本、处理标本、检测标本、报告结果;采集标本、处理标本属于 HLA 分型检验前过程;检测标本属于检测过程;报告结果属于检测后过程。

本文只探讨包含采集标本、处理标本的 HLA 分型检验前过程。本文将 HLA 分型检验前过程细分为标本采集、标本运送、标本的接受登记、标本的实验室标识、标本分装、标本保存六个部分。

为作好 HLA 分型检测前的质量控制,我们采用识别关键控制点、控制关键控制点的质控方法进行,整个 HLA 分型检测前过程我们选择了四个关键控制点。

一、关键控制点 (CCP): 过程中必要进行控制的地方,对它们不进行控制将导致不良后果。关键控制点可以用指标进行测量和反应。

### CCP1: 标本采集, 测量指标: 标本采集规程的遵循。

为保证被采集的造血干细胞捐献者血样标本具有客观性、代表性和有效性,我们认识到实验室要对正确的标本采集负责任。因此把制定适宜的标本采集规程作为我们的第一个关键控制点。首先由实验室制定采样管理程序,对采样人员、采样器材、选用的抗凝管抗凝剂种类、采样部位、采样前的要求、注意事项、采样前的核对、采样时的标本管标识贴签、采样结束后的再次核查捐献者身份、采样的数量、以及如何将抗凝剂和血样混匀、允许暂时的保存时间和温度以及标本如何运送等都做了详细的规定。其次就制定的采集规程为省分库设立的各工作站的标本采集人员进行充分的讲解和培训,以确保标本采集程序被正确理解和执行,从而确保标本的质量。

### CCP2: 标本的接受, 测量指标: 标本的接受准则

对采集的标本制定接受准则,规定接受标本时要做的检查和记录是我们的第二个关键控制点。

通过这个点的控制，可以检查落实第一个关键控制点的执行完成情况，同时也是实现 HLA 检测可追溯性的第一个环节。我们规定接受标本时要记录标本的数量、标本的接收时间、标本的采集人和接收人；要进行标本的标识检查（采集站编号、姓名）、标本的质量检查（抗凝、溶血、乳糜等）；要核对捐献者登记表的数量与标本的数量是否一致；要进行捐献者的唯一性筛查；对拒收的标本要写明拒收标本的理由等，最后对符合质量要求的标本进行登记汇总，形成捐献者汇总表。

### **CCP3：标本的贴签，测量指标：标本的一一对应**

对符合检测要求的标本进行实验室标识，粘贴唯一性号码标签是我们的第三个关键控制点。我们建立有贴签的管理程序和操作规程，要求贴签双人交互核对，严格按照贴签步骤实施。标本的标签是事先打印好的连续顺序号码，不存在不可用或缺失的号码，标本和号码之间是唯一性的。首先对捐献者汇总表登记的血样姓名进行顺序编号，并根据捐献者汇总表的顺序编号排列对应的标本和捐献者登记表，然后进行贴签。贴签时一次只对一只血样管进行；贴签后再次与捐献者汇总表进行核对；核对时要念出声音。这样繁琐的要求就是为确保同一捐献者的捐献登记表、标本管、汇总记录一一对应，贴签无误。

### **CCP4：标本的分装，测量指标：标本的一一对应**

为节约成本只采集一管标本，既是待测标本又是保存标本，因此要对采集的这一标本进行分装。关键控制点四就是为了确保分装的部份样品可追溯至最初原始标本且能代表最初原始样本，避免分装过程中样品被污染或发生互换等错误。为此我们使用和原始标本标签成套的号码标签作为分装样本管的标签，在分装标本前先贴签、排序、核对最后进行分装。分装时也是一次只对一只标本操作，不允许同时打开两只以上的标本进行分装。

为使分装标本较好代表原始标本，要尽可能早进行分装且分装时要将原始标本充分混匀，分装的量根据 DNA 提取方法的要求确定。分装后的待测标本和长期保存标本分别存放于不同冰箱，同时做好相应的记录。

## **二、讨论：**

HLA 分型检测前过程是整个检测过程关键的方面之一，对检测质量有着至关重要的影响。这个环节是涉及捐献者工作站的标本采集人员和实验室检测人员的一个重要接口，需要双方经常沟通和联络。这个环节如果被忽视实验室将不能获得正确可靠的标本，实验室的检测质量将是空中楼阁，因此笔者认为应把检测前过程识别为链条理论的最薄弱环节加以重点控制。我们采用上述质控方法完成了四万多例标本采集、接收、标识、分装和保存，通过对近两百例初次配型相合再次最高分辩的捐献者血样的追溯性分析以及骨髓库质控实验室连续六次的 2%抽检显示，没有发生一例因标本混淆或错误影响 HLA 分型数据的准确性。因此笔者认为做好以上关键控制点的控制对 HLA 分型检测前的质量控制是有效的。

## **参考文献**

- [1] 血站质量管理规范。中华人民共和国卫生部，2006.
- [2] 血站实验室质量管理规范。中华人民共和国卫生部，2006.

2-22

## DNA 序列分析鉴定 HLA 新等位基因 B\*4446

李剑平 章旭 李晓丰 曲喆 高景波 黄旭颖 刘显智

辽宁省血液中心 输血医学研究所 (110044)

**摘要:** **目的** 鉴定中国人群的 HLA 新等位基因。**方法** 使用 PCR-SSP 及 PCR-SSO 技术进行 HLA 分型。发现 1 个与 HLA-B\*44 相关的未知基因, 使用 DNA 序列分析技术鉴定并分析该基因与同源性最高的 B\*4409 基因序列的差异。**结果** 新基因外显子 3 区域序列与所有已知的 HLA-B 等位基因序列均不相同, 与同源性最高的 HLA-B\*4409 基因序列相比有 3 个碱基发生替代。第 538 位碱基由 G→C, 第 539 位碱基 A→T 以及第 540 位碱基 C→G, 使编码产物 180 位氨基酸由天冬氨酸 (D) 变成亮氨酸 (L)。**结论** 发现一个新的 HLA-B 等位基因, 于 2005 年 9 月由 WHO HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B\*4446。

**关键词:** 基因分型; HLA-B 新等位基因; HLA-B\*4446

## Identification of a novel HLA allele B\*4446 by sequencing-based typing

LI Jian-ping ZHANG Xu LI Xiao-feng QU Zhe GAO Jing-bo HUANG Xu-ying LIU Xian-zhi.

(Liaoning Blood Center, Shenyang, Liaoning, 110044 P.R.China)

**Abstract: Objective** To identify a novel HLA allele in Chinese population. **Methods** A new HLA-B allele was initially detected by an usual PCR-SSP and PCR-SSO in routine typing HLA allele. Sequence-based typing (SBT) was used to identify and analysis the difference between the new allele and HLA-B\*4409 allele. **Results** The HLA-B exon3 nucleotide sequence of the novel allele was different from all other known alleles. The allele has 3 nucleotides replaced of the closest matching B\*4409 allele at nt538 (G→C), nt539 (A→T) and nt540 (C→G) in exon 3, resulting in an amino acid change from D (GAC) to L (CTG) at codon 180. **Conclusion** A novel HLA allele was confirmed by the sequencing-based typing (SBT) and it was officially designated as HLA-B\*4446 by WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System in September, 2005.

**Key words:** HLA typing; new HLA-B allele; HLA-B\*4446

随着分子生物学分型技术的发展, HLA 新的等位基因不断被发现, 迄今已鉴定 2000 多个等位基因<sup>[1-2]</sup>。目前使用较广泛的基于 DNA 的 HLA 分型技术有 PCR-序列特异性引物 (PCR-SSP)、PCR-序列特异性寡核苷酸探针 (PCR-SSO) 及 HLA 基因测序 (SBT) 等。作者所在的中华骨髓库辽宁分库组织配型实验室应用上述分型技发现一个新的 HLA-B 等位基因, 被世界卫生组织 HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B\*4446。

1 对象与方法

1.1 对象 从中国造血干细胞资料库辽宁分库及辽宁省血液中心血小板捐献者HLA基因分型资料库5089份样本中筛选出先证者。

1.2 血样采集与基因组 DNA 制备 静脉抽取受检者抗凝全血 5mL，其中 0.5 mL 用于 DNA 制备（DNA Isolation kit, Pel-Freez Biotech Lot # 050 WS, USA），其余血液分装每管 1mL 后-80℃ 冷冻保存备用。将制备的 DNA 浓度调为 0.1µg/µL 左右。DNA 纯度 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比率在 1.6~1.9。并用 0.8%琼脂糖凝胶电泳显示无 DNA 降解现象。

1.3 HLA 分型 PCR-SSP 分型试剂盒（ABDR SSP Unitray<sup>®</sup> Lot#002, Pel-Freez 公司 USA）进行 HLA-A、B、DRB1 常规中低分辨的 HLA 基因分型；PCR-SSO 分型试剂盒（Lab-Type<sup>™</sup> SSO, R-SSO-007N, One Lambda Inc., CA, USA）进行 HLA-B 位点复核。

1.4 DNA 序列分析 为了分开杂合 HLA-B 位点的等位基因，采用 HLA-B\*44 位点特异性引物扩增 HLA-B\*44 的 1、2、3 外显子区域。引物序列为：扩增 1~2 外显子正、反向引物分别为 5' -TCCCAGTTCTAAAGTCCCCACGC -3' 和 5' - CAGGATCTGCGGAGCGA-3'。扩增 2~3 外显子正、反向引物分别为 5' - CCCGCGACCTATAGGAGATg-3' 和 5' - CCGAGAGAGCC TGCGGAA-3'。扩增产物纯化后直接被正反两个方向测序。为了避免由于 PCR 扩增或其他人为因素引起的碱基变化，被检样本的基因组 DNA 样本经 3 个独立的 PCR 反应和 6 个测序反应，通过正、反向引物测序，测定 HLA-B\*44 基因的外显子 1、2 和 3 的碱基序列。测序结果用 SigMan II（DNAStar, inc., Madison, WI, USA）分析。

	116		120														130		
B*4409	GG	TCT	CAC	ATC	ATC	CAG	AGG	ATG	TAC	GGC	TGC	GAC	GTG	GGG	CCG	GAC	GGG	CGC	
B*4446	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
					140													150	
B*4409	CTC	CTC	CGC	GGG	TAT	GAC	CAG	GAC	GCC	TAC	GAC	GGC	AAG	GAT	TAC	ATC	GCC	CTG	AAC
B*4446	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
					160														
B*4409	GAG	GAC	CTG	AGC	TCC	TGG	ACC	GCG	GCG	GAC	ACC	GCG	GCT	CAG	ATC	ACC	CAG	CGC	AAG
B*4446	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
					180														
B*4409	TGG	GAG	GCG	GCC	CGT	GTG	GCG	GAG	CAG	GAC	AGA	GCC	TAC	CTG	GAG	GGC	CTG	TGC	GTG
B*4446	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CTG	-	-	-	-	-	-	-	-
					200														
B*4409	GAG	TCG	CTC	CGC	AGA	TAC	CTG	GAG	AAC	GGG	AAG	GAG	ACG	CTG	CAG	CGC	GCG	G	
B*4446	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

图1 HLA-B\*4446 与 HLA-B\*4409 第3 外显子核苷酸序列的比较

注：“-”表示两个序列一致，序列上的数字表示密码子数

Fig1 The nucleotide sequence of exon 3 of HLA-B\*4446 compared with HLA-B\*4409

Dashes (-) indicate identities with HLA-B\*4409, The numbers above the sequence indicate the codon number.

2 结果

2.1 HLA 中低分辨分型结果 该样本 PCR-SSP 分型结果为 HLA-A\*24、24；HLA-DRB1\*13、

15; 但 B 位点出现无法解释的结果。采用 PCR-SSO 技术再次进行 HLA-B 位点, 分析软件提示 46 号探针是假阴性, 如果接受不可信的 46 号假阴性结果, 分型结果为 B\*4409 和 B\*4901。通过 PCR-SSP 和 PCR-SSO 分型结果推断 B 位点一个等位基因为 B\*49, 另一个等位基因可能是一个与 B\*44 有关的未知基因, 须进一步鉴定。

**2.2 SBT 结果** 被检者的基因组 DNA 样品经 3 个独立的 PCR 反应, 获得 6 份扩增片段, 测定 HLA-B\*44 基因第 1、2 和 3 外显子区域的基因序列。DNA 序列分析表明该等位基因为新的等位基因, 与同源性最高等位基因 B\*4409 等位基因在第 3 外显子区域有 3 个碱基被替代。在第 3 外显子区域中的第 538 位碱基由 G→C, 第 539 位碱基 A→T 以及第 540 位碱基 C→G, 其结果使编码相应密码子 180 位的氨基酸由天冬氨酸 (D) 转变成亮氨酸 (L)。(如图 1)。该新等位基因已由 WHO HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B\*4446, 新的基因序列已递交 Gen Bank(DQ185396)。

### 3 讨论

HLA-B 基因座在整个 HLA 系统中最具多态性<sup>[3]</sup>。HLA-B 基因多态性具有明显的民族、人种和地区差异<sup>[4]</sup>。B\*44 基因频率在中国人群约为 1.36-4.18%<sup>[5-6]</sup>。陈阳等<sup>[7]</sup>报道 HLA-B\*44 基因频率呈现由南向北逐渐升高趋势。许铭炎等<sup>[4]</sup>也报告 HLA-B\*44 在四川彝族属低频率等位基因。

新等位基因 HLA-B\*44 是作者对造血干细胞志愿捐献者进行常规 HLA 基因分型时所发现的, 该样本 PCR-SSP 反应格局异常, 经 PCR-SSO 复核证实, 采用 DNA 序列分析, 最终确定 B\*4446 基因序列。常见的 PCR-SSP、PCR-SSO 分型方法均基于已知的 DNA 序列进行设计, 存在一定不足, 可能错误判断罕见或新的等位基因。实际分型中, 有必要对可疑结果用不同试剂复核<sup>[8]</sup>。

作者通过对被检样本 HLA-B\*44 第 1、2 和 3 外显子的特异性引物扩增后直接测序而鉴定 B\*44 新等位基因。作者所在实验室借助 PCR-SSO HLA 分型尚未发现与 B\*4446 反应格局相同的标本, 推测 B\*4446 在北方人群属低频率基因。该新等位基因的血清学特点及其在中国人群中的频率有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens*, 2005, 65: 301-369
- [2] Martinez-Laso J, Moscoso J, Zamora J, et al. Different evolutionary pathway of B\*570101 and B\*5801 (B17group) alleles based in intron sequences. *Immunogenetics*, 2004, 55: 866-872
- [3] Marsh SG, For the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA system, update December 2004. *Tissue Antigens*, 2005, 65: 299-300
- [4] Xu MY, Hong KK, Ma J, et al. Analysis of HLA-B Locus Gene Polymorphism in Sichuan Yi Ethnic Group and Xinjiang Uygur Ethnic Group. *Hereditas*, 2006, 28: 913-917. [许铭炎, 洪坤学, 马军, 等. 四川彝族和新疆维吾尔族 HLA-B 基因座基因多态性分析. *遗传*, 2006, 28: 913-917]
- [5] Zhang GL, Yang Y, Feng Z, et al. Report of HLA distribution of Chinese Bone Marrow Bank (Shanghai). *Chin J Organ Transplant*, 2001, 22: 179-185. [张工梁, 杨颖, 冯喆等. 中华 (上海) 骨髓库的 HLA 分布报告. *中华器官移植杂志*, 2001, 22: 179-185]

[6] Wu GG, Deng ZH, Gao SQ, et al. Study of HLA polymorphism in the 6965 Han bone marrow registry donors. Chin J Hematol, 2004, 25: 473-477.[吴国光, 邓志辉, 高素青, 等. 6965 名汉族骨髓供者 HLA 多态性分析. 中华血液学杂志, 2004, 25: 473-477]

[7] Chen Y, Li JP. Distribution of HLA-B allelepymorphism of 8962 Han population in Liaoning of China. Chin J Med Genet, 2006, 23: 461-462.[陈阳, 李剑平. 辽宁汉族人群 HLA-B 等位基因多态性的分布. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23: 461-462]

[8] Chi LP, Li JP, Liu XZ, et al. Identification of a novel HLA allele HLA-A\*2451. Chin J Blood Transfusion, 2006, 19: 275-276.[迟立平, 李剑平, 刘显智, 等. HLA 新等位基因 HLA-A\*2451 的认定. 中国输血杂志, 2006, 19: 275-276]

## 2-23

# 基因组 DNA 高通量提取技术 及其在骨髓库捐献者样本 HLA 基因分型中的应用

王大明 唐 斯 李 桢 程 曦 高素青 邓志辉

广东省深圳市血液中心 (518035)

**摘要:** **目的** 研究和建立从全血 EDTA 抗凝样本中高通量提取基因组 DNA 的有效方法, 以常规应用于 Luminex rSSO HLA 流式磁珠基因分型。**方法** 使用 2 mL 深孔板和 TECAN DNA 全自动工作站, 从 288 份骨髓捐献者样本中提取基因组 DNA; 提取的 DNA 样本用紫外分光光度仪测定其浓度和纯度, 并采用琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性; DNA 样本用 One lambda rSSO HLA-A、B 和 DRB1 基因分型试剂盒进行 PCR 扩增、分子杂交和 Luminex 流式磁珠分析仪检测, 统计分析每一 DNA 样本 HLA-A、B 和 DRB1 基因扩增产物经 DNA 探针分子杂交后的阳性磁珠和阴性磁珠的荧光信号强度。**结果** 从 400 $\mu$ L 全血中提取基因组 DNA, 288 份样本的 DNA 产量平均为  $3.217 \pm 0.715$  ug,  $A_{260}/A_{280}$  值平均为  $1.710 \pm 0.103$ ,  $A_{260} - A_{320}/A_{280} - A_{320}$  值平均为  $1.761 \pm 0.151$ ; 琼脂糖电泳法测得 DNA 的分子量均大于 15kb; 每一样本 HLA-A、B 和 DRB1 杂交后的阳性磁珠的荧光信号强度均  $> 600$  RFU, 而阴性磁珠的荧光信号强度  $< 50$  RFU。**结论** 本方法适用于从大量全血样本中快速提取基因组 DNA, 所得的基因组 DNA 适用于高通量中华骨髓库捐献者样本的 HLA 流式磁珠基因分型等下游的分子生物学实验。

**关键词:** 高通量; 基因组 DNA; 全血; 中华骨髓库; HLA 基因分型

## Technique of high through-put genomic DNA isolation and its application in HLA genotyping for samples from bone marrow donor program

WANG Da-ming, TANG Si, LI Zhen, CHENG Xi, GAO Su-qing, DENG Zhi-hui.

(Shenzhen Institute of Transfusion Medicine, Shen zhen blood center, Guangdong, Shenzhen 518035, P.R..China)

Corresponding author: DENG Zhi-hui, E-mail: zhihui\_deng@yahoo.com.cn

**Abstract: Objective** To develop and establish a efficient method for high through-put automatically extracting genomic DNA from EDTA anticoagulated whole blood samples and utilize this method in routine rSSO HLA genotyping by luminex flow array assay. **Methods** Genomic DNA was extracted automatically from 400  $\mu$ L blood samples by using TECAN DNA workstation and 96-well-plate with 2mL volume per well. The yield and purity of each DNA sample was tested by UV-spectrophotometer, the integrality of these DNA samples were run electrophoresis on the agarose gel. Each DNA sample was subjected to PCR amplification and hybridization using One lambda rSSO HLA-A, B and DRB1 commercial kit, the fluorescent intensity for positive bead and negative bead hybridized with HLA-A, B and DRB1 PCR products were calculated and analyzed. **Results** The mean yield and purity ( $A_{260}/A_{280}$ ) of genomic DNA extracted from 400  $\mu$ L whole blood samples were  $3.217 \pm 0.715$   $\mu$ g and  $1.710 \pm 0.103$ , respectively. The molecular weight was more than 15kb in size and the fluorescent intensity for positive bead hybridized with HLA-A, B and DRB1 PCR products of each sample was  $>600$  RFU, however, the fluorescent intensity for negative bead for each sample was  $<50$  RFU. **Conclusion** The highly qualified genomic DNA can be extracted automatically from marrow-donor blood samples by using TECAN DNA workstation, and the extracted DNA samples were suitable for high through-put HLA genotyping by luminex flow array assay and other downstream molecular biological experiments.

**Key words:** High through-put; genomic DNA; whole blood; Chinese marrow donor program (CMDP); HLA genotyping

从全血中提取基因组 DNA 为分子生物学实验的基础。造血干细胞捐献者资料库的 HLA 分型工作需要从大批量的全血样本中提取高质量基因组 DNA。检测不同的靶基因及用途的不同,对 DNA 的浓度和纯度要求也不相同。目前多数工作站仍采用手工法抽提基因组 DNA,步骤多、时间长、效率低。为节省人力、物力和提高效率,本单位引进了全自动 DNA 纯化工作站,摸索出针对 HLA 基因分型抽提基因组 DNA 的方法,并对实验过程中遇到的问题逐一进行探索,特别是抗凝不充分的全血样本,针对这些问题笔者研究出一套纯化方法,并稳定地应用于常规骨髓库样本基因组 DNA 纯化等工作中,现报告如下。

## 材料和方法

### 1 标本来源

随机选取深圳地区 288 名骨髓库捐献者样本作为研究对象, 以下简称全血样本。取外周血 5ml, EDTA 抗凝。

### 2 主要仪器

①自动工作站 (Freedom EVO 200, 瑞士 TECAN 公司); ②紫外分光光度仪 (Biophotometer, 德国 Eppendorf 公司); ③9600 扩增仪 (美国 ABI 公司); ④电泳仪 (美国 Embi 公司); ⑤凝胶成像仪; ⑥流式磁珠分析仪 (Luminex 公司)。

### 3 主要试剂

①红细胞裂解液 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  3.9g,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.4g, EDTA 0.9g 溶于双蒸水中, 调节 PH=8.0, 定容 500ml); ②全血基因组 DNA 提取试剂盒 (MagneSil Genomic, large Volume System, A4082, 美国 Promega 公司); ③Onelambda 公司提供的 rSSO HLA-A、B 和 DRB1 位点分型试剂。

### 4 基因组 DNA 提取方法

采用磁珠法。在 1.5ml 的微量离心管中加入 400ul 全血样本和 800ul 实验室配制的红细胞裂解液, 盖上管盖, 略微振荡后 1, 3000g 离心 3min, 弃上清; 加入 470ul Promega 试剂盒的裂解液, 置于 Vortex 上剧烈振荡, 至有形成分完全消失。转移裂解液至 96 孔的 2ml 深孔板, 加入磁珠 80ul。首先加入裂解液 450ul 和洗液 150ul 重复洗涤 3 次; 然后加入裂解液 300ul 和洗液 300ul 重复洗涤 2 次; 最后加入洗液 600ul 重复洗涤 2 次。所有洗涤步骤均按 TECAN DNA 工作站编制的程序进行, 最后一次洗涤结束, 吸去洗涤液, 加入洗脱液 100ul, 65°C 10min, 吸取 40ul DNA 样品至 U 形板中, 用于 PCR 扩增或冷冻保存。

### 5 DNA 检测方法

**5.1 DNA 样本的  $A_{260}/A_{280}$  值和产量** 用紫外分光光度仪测定进行定量分析, 5uL DNA+95 uL 双蒸水稀释。

**5.2 DNA 的完整性** 用 1%琼脂糖凝胶电泳方法检测, 取 10ulDNA 样本加入 1%琼脂糖凝胶中电泳, 用 DNA Marker 初步测定 DNA 分子量。

**5.3 基因组 DNA 进行 PCR 扩增和分子杂交** 均按照 Luminex HLA 流式磁珠基因分型实验说明书操作。每孔加 9ul 的 Dmix/Primer/Taq 混合液, 根据以下 PCR 扩增程序扩增。96°C 03: 00 1 个循环, 96°C 00: 20 60°C 00: 20 72°C 00: 20 5 个循环, 96°C 00: 10 60°C 00: 15 72°C 00: 20 30 个循环, 72°C 10: 00 1 个循环。扩增后可通过电泳确定扩增质量 (2%琼脂电泳)。如扩增产物在 48 小时之内做杂交, 可 4°C 保存; 如扩增产物在 48 小时之后做杂交, 则需 -20°C 保存。而后, 样本杂交, 上机读取扩增产物分子杂交后的荧光信号强度。

### 5.4 扩增产物分子杂交后的荧光信号强度分析

扩增产物用 Luminex 流式磁珠分型仪检测 HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1 位点的荧光值。



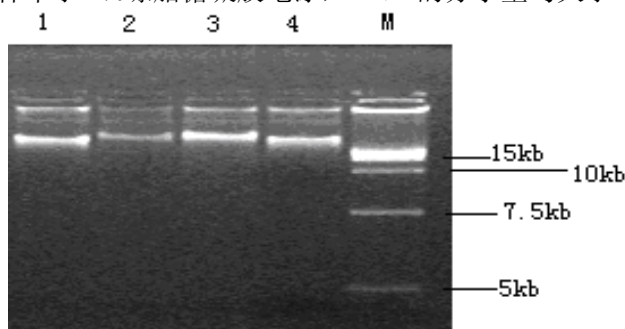
## 结 果

### 1 DNA 样本的 $A_{260}/A_{280}$ 值和产量:

从 288 份 400ul 全血中提取基因组 DNA，产量平均为  $(3.217 \pm 0.715)$  ug，样本的  $A_{260}/A_{280}$  值平均为  $1.710 \pm 0.103$ ， $A_{260} - A_{320}/A_{280} - A_{320}$  值平均为  $1.761 \pm 0.151$ 。

### 2 DNA 的完整性:

随机取 4 份 DNA 样本于 1%琼脂糖凝胶电泳，DNA 的分子量均大于 15kb，详见图 1。



注: 1.DNA1; 2.DNA2; 3.DNA3; 4.DNA4; M.DNA marker

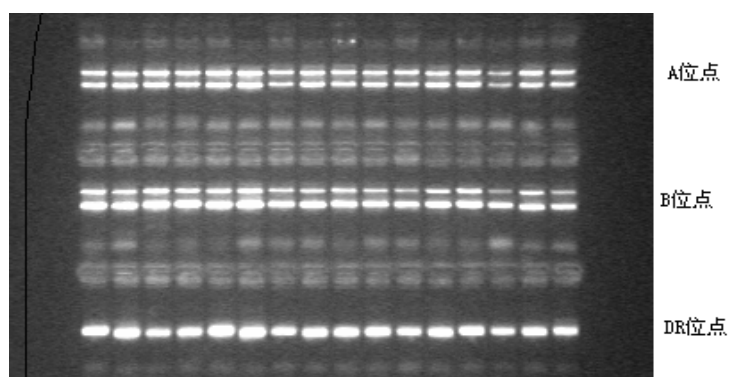
图 1 DNA 1%琼脂糖凝胶电泳图

表 1 4 个 DNA 样本的浓度和纯度测定值

DNA	浓度	$A_{260}/A_{280}$ 值	$A_{260} - A_{320}/A_{280} - A_{320}$ 值
1	80.0	1.62	1.87
2	40.2	1.60	1.79
3	131.8	1.81	1.94
4	116.9	1.75	1.78

### 3 扩增产物分析:

工作站所提取的基因组 DNA 用 One lambda rSSO HLA-A、B 和 DRB1 基因分型试剂盒进行 PCR 扩增，PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳的胶图见图 2，HLA-A、B 和 DRB1 荧光平均值见表 2 和表 3。



注: HLA-A 扩增产物 (有两条特异带); HLA-B 扩增产物 (有两条特异带); HLA-DRB1 扩增产物 (有一条特异带)

图 2 PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳图

表2 HLA-A、B、DRB1 阳性对照珠荧光平均值情况表 ( $\bar{x} \pm s, n=288$ )

位点	HLA-A		HLA-B		HLA-DRB1
	13号珠 (exon2)	32号珠 (exon3)	13号珠 (exon2)	32号珠 (exon3)	34号珠 (exon2)
阳性对照珠	2183.84±478.12	2168.28±338.59	2257.27±397.41	2259.78±283.24	3643.38±327.85
荧光值平均值					
小于600百分比	0	0	0	0	0
小于1000百分比	1.04%	0.69%	0.69%	0.69%	0

表3 HLA-A、B、DRB1 阴性对照珠荧光平均值情况表 ( $\bar{x} \pm s, n=288$ )

位点	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1
阴性对照珠	35号珠	35号珠	35号珠
荧光值平均值	12.53±5.21	10.48±4.63	11.56±4.38

## 讨 论

目前分子生物学试验中常用的基因组DNA提取方法主要有酚-氯仿法、盐析法、过滤法和磁珠法等。如果应用这些方法手工提取大样本全血中的基因组DNA, 需要投入较多的人力和物力。因此, 将DNA提取过程全自动化, 可以极大地提高实验效率<sup>[1]</sup>。近年来, 利用磁性材料作为固相吸附剂提取基因组DNA也是人们研究的热点<sup>[2]</sup>。Taylor<sup>[3]</sup>把二氧化硅与磁性材料结合起来使用, 与传统的酚-氯仿法、盐析法和过滤法提取核酸相比, 磁珠法提取核酸具有显著的优势。

核酸纯化是分子生物学的基础实验, 核酸得率、纯度是评估核酸纯化效果的重要指标, 在DNA提取过程全自动化时主要会遇到以下问题: 1. 血样抗凝不充分, 样管内存在大小不一的凝块是骨髓捐献者基因分型中常常面临的难题, 这类血样难于获取理想的浓度和纯度的DNA, HLA基因分型成功率较低; 2. 血样中的凝块会堵住DNA工作站机械臂的枪头, 难以吸取足量的血样用于DNA的提取。

本研究基于TECAN全自动DNA工作站、DNA磁珠吸附法原理, 采用2ml深孔板, 从400ul全血中提取基因组DNA, 特别是对抗凝效果不理想、有血凝块的样本, 在磁珠提取法的基础上、进行方法上的改进并添加样本前处理程序, 即加入本实验室人工配置红细胞裂解液进行预处理, 然后加入MagneSil Genomic DNA提取试剂盒的裂解液, 充分混匀震荡, 裂解完全后, 再用TECAN全自动DNA工作站进行全自动的洗涤、洗脱等后续实验, 取得了理想的结果: DNA浓度平均达50 ng/ul以上,  $A_{260}/A_{280}$ 和 $A_{260}-A_{320}/A_{280}-A_{320}$ 比值均在1.60~2.00; DNA经PCR扩增后产物在2%琼脂糖凝胶上电泳形成清晰、明亮的特异性条带, 杂交后经流式磁珠分型仪读板每一样本HLA-A、B和DRB1杂交后的阳性磁珠的荧光信号强度均>600 RFU, 而阴性磁珠的荧光信号强度<50 RFU, 可用于中华骨髓库骨髓捐献者样本和临床移植样本的HLA基因分型(成功率达95%以上)。此外, 样本信息采用条码扫描的方式录入, 放入血样后, 在3小时内可一次性完成192个样本的基因组DNA的提取工作, 具有高通量的特点, 不同于以往研究者报道的方法<sup>[1]</sup>, 可常规、稳定地用于骨髓库捐献者样本HLA基因分型工作中。

在用全自动工作站抽提DNA过程中, 有以下注意事项: (1) 虽然Tecan工作站具有凝块探测功能, 能够避免吸到凝块, 但是如此一来, 含有大量有核细胞的凝块就不会被吸取到反应容器中, 从而大大减少了DNA的产量。针对这一问题, 本方案采取了扩大枪头口径的方法实现了较好的解决。用干净且锋利的剪刀剪掉1000ul枪头尖端8mm, 即可使枪头口径由不足0.5mm增加到3mm。

这样以来基本解决了凝块吸不上来的问题，同时也保留了液面探测的功能，且配合 50ul 的空气柱，即可避免血液在高速运动时滴下来的情况；（2）放置血样时，尽量在仪器初始化和冲洗管道后再放置，放得过早，血液里的有效成分可能会沉降到管底，导致 DNA 产量降低；（3）全血样本在加样前需要充分混匀，保证吸取血样中有足够数量的有效成分，混匀时要防止试管中产生大的气泡，以避免加样针在探测液面时出现障碍；（4）将全血吸取至反应容器（微量离心管）中后，加入一定量本实验室配置的红细胞裂解液，振荡，离心后弃上清，加入 MagneSil Genomic DNA 提取试剂盒提供的裂解液振荡，直至有形成分消失。适度延长本步骤裂解的时间（如室温放置 1 天），可提高 HLA 分型成功率；（5）在部分样本的 DNA 中，在管底可能出现磁珠，会影响  $A_{260}/A_{280}$  的比值，但并不影响 HLA 分型结果。

核酸纯度主要根据 DNA 样本的  $A_{260}/A_{280}$  的比值确定，严格来说磁珠法也要将  $A_{320}$  的影响考虑进去，公式为  $A_{260}-A_{320}/A_{280}-A_{320}$ ，此比值在 1.6~2.0 之间适用于高通量 HLA 流式磁珠基因分型等下游的分子生物学实验。

对于自动工作站，可根据需要做很多工作，合理编制程序，提高工作效率。Pourahmadi 等报道，基于同一种核酸纯化工作站使用不同的试剂盒，可以从多种生物材料中提取 DNA 和 RNA<sup>[4]</sup>。到 2007 年 7 月，笔者以自动工作站（瑞士 TECAN 公司）为平台，采用磁珠法从 400  $\mu$ L 全血中提取基因组 DNA，进行了 1000 多份骨髓库捐献者样本的 HLA 基因分型实验，其中设有质控样本，无一例差错。解决了多年来以人工方法提取基因组 DNA，耗时长，效率低的问题。我们研究和建立的基因组 DNA 高通量提取技术，不但大大提高了中华骨髓库 HLA 基因分型的工作效率和质量，也可用于各类分子生物学下游实验，具有广泛的实用价值和应用前景。

（致谢：东胜创新生物科技有限公司的黄志、王振海和覃嘉工程师协助编制程序。）

### 参考文献

- [1] 陈长荣，裴斌，谢金镇，自动提取大样本全血基因组 DNA 方法的建立，中国输血杂志，2005，18（5）：376-377.
- [2] Flagstad O, Roed K, Stacy JE, et al. Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol[J]. Mol-Ecol, 1999, 8: 879-883.
- [3] Taylor J I, Hurst CD, Davies MJ, et al. Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA[J]. J Chromatogr A, 2000, 18: 159-166.
- [4] Pourahmadi F, Taylor M, Kovacs G, et al. Toward a rapid, integrated, and fully automated DNA diagnostic assay for chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae Clin Chem, 2000, 46（9）：1511.

2-24

## 基于 PCR-SSP 技术的 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub> 位点 直接高分辨分型方法的评价

章 旭<sup>1</sup> 李剑平<sup>1</sup> 迟立平<sup>1</sup> 徐玉现<sup>2</sup> 刘显智<sup>1</sup>

1 辽宁省血液中心 (110044) 2 北京戴诺生物技术有限公司 (100176)

**摘要:** **目的** 建立和评价一步获得 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub> 位点高分辨结果的检测方法。**方法** 本方法采用 Dynal Biotech Beijing Ltd 公司生产的 ABCDR HR SSP UniTray-384 试剂盒。在 384 孔 PCR 扩增板上加入设计好的 A、B、C<sub>w</sub> 和 DRB<sub>1</sub> 位点高分辨引物。利用聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-SSP) 法进行 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub> 位点高分辨分型。并用此法进行 20 例随机样本 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub> 位点高分辨等位基因分型检测, 同时将 HLA-A、B、DRB<sub>1</sub> 位点分型结果与以测序为基础的试验 (SBT) 方法所得的分型结果进行比较。**结果** 20 个样本 HLA-A、B、DRB<sub>1</sub> 位点高分辨的分型结果为 3 例样本 B 位点, 1 例样本 DRB<sub>1</sub> 位点出现模棱两可结果, 其余结果与 SBT 结果完全一致。**结论** 本方法方便、快捷, 一步即可准确地获得 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub> 位点高分辨的结果。

**关键词:** HLA; 基因分型; 高分辨; PCR-SSP

## Evaluation of the PCR-SSP based method for HLA-A、B、C<sub>w</sub> and DRB<sub>1</sub> locus specific high resolution typing

Zhang Xu<sup>1</sup>, Li Jian-ping<sup>1</sup>, Chi Li-ping<sup>1</sup>, Xu Yu-xian<sup>2</sup>, Liu Xian-Zhi

1. Liaoning province Blood Center (Shenyang 110044, China)

2. Dynal Biotech Ltd, Beijing 100176, China

**Abstract: Objective** To establish and evaluate a HLA high resolution typing method for HLA-A、B、C<sub>w</sub> and DRB<sub>1</sub> locus with one step PCR amplification and a single 384 tray. **Method** ABCDR HR SSP UniTray-384 kits, provided from Dynal Biotech Beijing Ltd, formulations of allele or group specific primer sets are used to amplify genomic DNA in a 384 well thermal tray. It is a PCR-SSP based method designed to provide specific high resolution typing results of HLA-A、B、C<sub>w</sub> and DRB<sub>1</sub> locus. A total of 20 random samples were typed by the method. We compared the results of A、B and DRB<sub>1</sub> locus with SBT (Sequence based typing) method. **Results** Except three B locus and one DRB<sub>1</sub> locus showed ambiguity results, the rest performed complete concordance in allele assignments with SBT results. **Conclusion** This method is conveniently、rapidly、cost-effectively to obtain accurate HLA-A、B、C<sub>w</sub> and DRB<sub>1</sub> locus high resolution typing results.

**Key words:** HLA DNA typing High resolution PCR-SSP

在骨髓移植过程中,HLA 配型准确与否直接影响骨髓移植的结果<sup>[1]</sup>。随着分子生物学技术的发展,借助 PCR 技术已建立了多种基因分型方法。其中 PCR-SSP 法是近年来发展起来的应用最广、最简便的方法,且结果可靠<sup>[2]</sup>。目前国内进行 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub> 位点高分辨分型都是先检测出受检样品的 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub> 位点低分辨分型结果,再针对每一个等位基因,进行高分辨分型检测,实验耗时长,患者经济压力大。本文建立和评估的方法是应用 PCR-SSP 技术,在 384 孔板上一步即可获得 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub> 位点高分辨的结果。整个试验只需 2~3h 即可完成,且成本低,为患者节约时间,节约检测费用。

## 1 材料与方法

**1.1 检测对象** 20 名中国造血干细胞骨髓捐献志愿者

**1.2 试剂** ABCDR HR SSP UniTray®-384 高分辨试剂盒(戴诺生物技术有限公司); Big Dye™ 末端序列分析 HLA 分型试剂盒 (ABI 公司); v3.0 Big Dye™ 末端循环序列反应试剂 (ABI 公司)。

**1.3 设备** 384 孔扩增仪 (MJ 公司); UniMatch3.2 分析软件 (戴诺生物技术有限公司); 377 测序仪 (ABI 公司); Match Tools 软件和 MT Navigator 软件 (PRISM ABI 公司)。

## 1.4 方法

**1.4.1 PCR-SSP 法** 试剂盒中取出 384 孔 PCR 扩增板,每孔已分别加入设计好的 A 位点 99 对高分辨引物、B 位点 106 对高分辨引物、C<sub>w</sub> 位点 71 对高分辨引物和 DRB<sub>1</sub> 位点 101 对高分辨引物。取 PCR 缓冲液 1440ul、ddH<sub>2</sub>O 1600ul、Buffer Plus B 460ul 和 Taq 酶 18ul,充分混匀,取 8ul 混合液加入阴性对照孔内,再向上述混合液中加入 DNA [75-125ng/ul] 200ul,充分混匀,除阴性对照孔外每孔加入 8ul 混合液,封膜,置于平板离心机离心,1000 转/min,10s。然后放入 384 孔扩增仪扩增,扩增条件为 96℃ 预变性 60s,接着 96℃ 变性 25s、70℃ 退火 50s、72℃ 延伸 45s 5 个循环; 96℃ 变性 25s、65℃ 退火 50s、72℃ 延伸 45 秒 21 个循环; 96℃ 变性 25s、55℃ 退火 60s、72℃ 延伸 120s 4 个循环,最后降温保持在 12℃。产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外拍照成像。利用 UniMatch Plus v3.2 分析软件分析结果。

**1.4.2 SBT 法** 根据受检样品的低分辨 HLA 分型结果,建立 PCR 反应体系和 PCR 扩增反应,使用特异性引物通过 PCR 扩增 HLA-A、B、DRB<sub>1</sub> 基因,然后建立测序反应体系,应用醋酸钠法纯化测序产物。电泳测序,应用 Match Tools 软件和 MT Navigator 软件进行结果分析。

## 2 结果

通过对 20 个样本电泳图谱见图 1 及 UniMatch Plus v3.2 分析软件分析见图 2 和图 3,得出 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub> 位点高分辨分型结果。所有样品 PCR-SSP 高分结果见表 1。

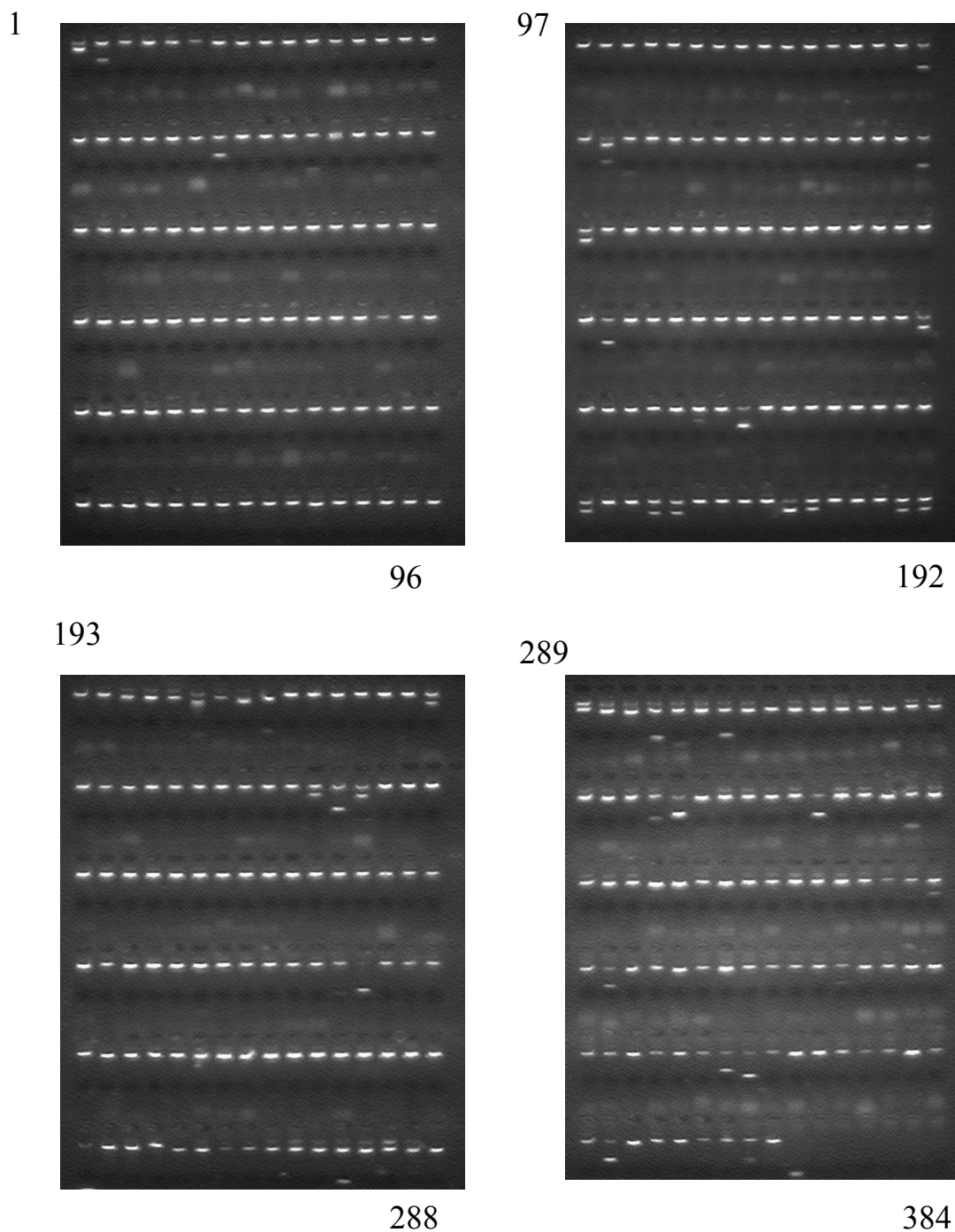


图1 2号样品 PCR-SSP 法 HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB1 位点在 384 孔板电泳图

图中 1-99 孔为 A 位点, 100-205 孔为 B 位点, 206-276 为 C 位点, 277-377 为 DR 位点。1, 2, 23, 28, 112, 114, 128, 129, 146, 160, 168, 177, 180, 181, 186, 187, 191, 192, 198, 200, 208, 219, 220, 221, 252, 253, 284, 292, 295, 308, 315, 335, 336, 338, 348, 359, 360, 370 孔为阳性孔。

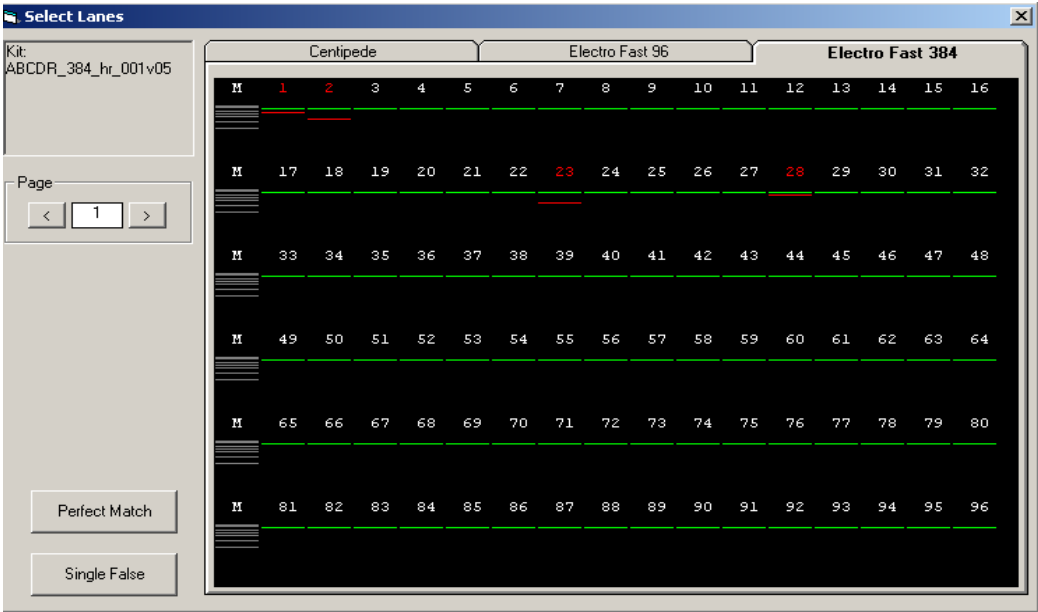


图2 2号样品 UniMatch Plus v3.2 软件阳性带结果输入图。(1孔、2孔、23孔、28孔为阳性带)。

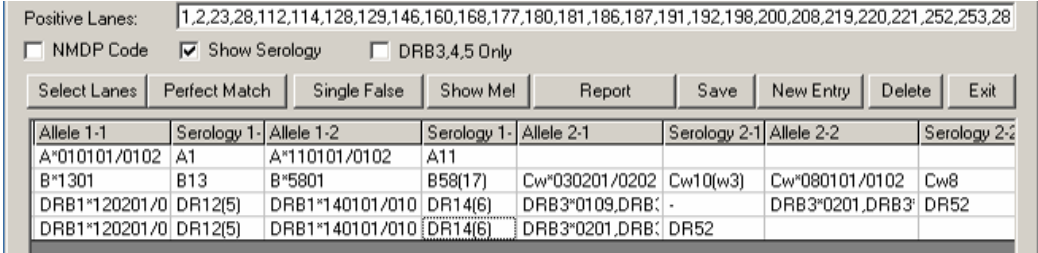


图3 2号样品 UniMatch Plus v3.2 软件分型结果图。

为了验证 PCR-SSP 高分辨结果的准确性，所有样品都做了 HLA-A、B、DR 位点的 SBT 检测。SBT 方法所得结果，在 Match Tools 软件和 MT Navigator 软件分析，即可得出测序结果见图 4。

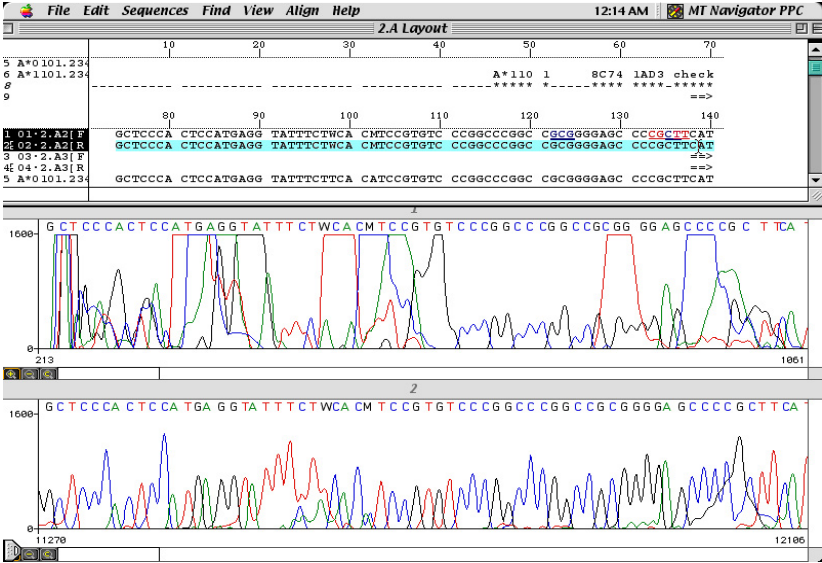




图4 2号样品A位点测序图谱(A位点测序结果是010101/110101)。



PCR-SSP法 384孔板进行20个样本HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB1位点高分辨分型检测,3例样本B位点出现模棱两可结果,DRB1位点有1例样本出现模棱两可结果。目前国内尚无C位点SBT试剂,所以本试验所得结果只能进行A、B、DRB<sub>1</sub>位点与SBT结果比对。其余样本A、B、DRB<sub>1</sub>位点与SBT高分辨等位基因结果全部相同。PCR-SSP高分辨结果与SBT结果比较见表1。

### 3 讨论

目前国内进行HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub>位点高分辨结果的检测都是在已知低分辨结果的基础上,选用所对应位点进行高分辨检测。所用时间比较长,患者花费大,而且如果低分辨结果出现错误,高分辨也会是错误结果或没有结果。本方法方便、快捷,一步即可进行HLA-A、B、C<sub>w</sub>、DRB<sub>1</sub>位点高分辨,不需要进行低分辨分型,节约时间,结果准确。

目前HLA配型主要在血清学或基因水平检测HLA-A、B、DRB<sub>1</sub>、DRB<sub>3</sub>、DRB<sub>5</sub> DRQB16个位点,即使HLA全相合移植后仍有部分患者移植后发生移植物抗宿主病(GVHD)。建立更为精确的配型体系和寻找更为有效防治GVHD具有必要性<sup>[3]</sup>。无关供者骨髓移植配型C位点越来越引起人们重视。研究表明C位点不相合也是造成急性GVHD发生率增高的主要原因<sup>[4]</sup>。因此在无关供者移植前看C位点是否相合是很有必要的。本方法中除了做HLA-A、B、DRB<sub>1</sub>位点高分辨外,加入了C位点的高分辨,可检测出HLA-C<sub>w</sub>等位基因111个,更方便患者移植前进行高分辨的配型。

因试剂处于实验评估阶段,因此偶尔出现模棱两可的结果。通过增加引物的方法,可以减少模棱两可的结果。有些样品电泳出现假阳性带或假阴性带,有些孔阳性带出现非常弱,这样会造成结果判读困难,需要有低分结果做为参考。这些问题可以通过优化引物设计或改变扩增条件加以解决。因本试验试剂涉及HLA位点非常多,为方便判读,应设计好相应位点对应的高分辨结果的读板纸以方便判读。

总之,此方法方便、快捷,临床应用前景广阔。

### 参考文献

- [1] Lazarus HM, Rowe JM. New and experimental therapies for treating for graft-versus-host disease. *Blood Reviews*. 1995, 9: 117
- [2] 周永安, 乔巨, 朱镛等. HLA-I、II类PCR-SSP基因分型在移植配型及亲子鉴定中的应用. *山西临床医药杂志*. 2001, 10(12): 885
- [3] 潘兴华, 王春燕, 段连宇, 等. 造血干细胞移植供者HLA-C分子结构分析. *热带医学杂志*, 2001, 2(2): 139
- [4] HT Greinix, I Fae, B Schneider, et al. Impact of HLA class I high-resolution mismatches on chronic graft-versus-host disease and survival of patients given hematopoietic stem cell grafts from unrelated donors. *Bone Marrow Transplantation*, 2005, 35: 57

## 移植医院

2-25

### 非血缘造血干细胞移植相关的协调工作

张子维 刘溢思 张琳

北京市道培医院 社会服务部

**摘要:** **目的** 分析我院截至 2008 年非血缘配型检索, 配型相合和接受移植的比例, 检索周期, 为其他移植单位的非血缘采集以及为中华骨髓库提供供者体检医学咨询的结果, 以便协助非血缘移植工作的开展。**方法** 回顾研究 2003 年-2008 年在北京市道培医院行非血缘配型检索查询的例数、成功配型移植的例数、成功移植比例、检索平均周期; 非血缘供者采集例数及境内、外例数比较分析; 移植后患者随访以及供者体检审核的例数统计和结果分析。**结果** 1. 检索配型: 检索范围由中华骨髓库扩展到台湾、香港、日本、韩国、新加坡、美国等骨髓库。非血缘配型年检索量从 2004 年的 45 例上升到 2008 年的 335 例, 目前累计 608 例, 其中成功配型移植 132 例, 平均配型成功移植比率达 21.71%, 检索平均周期为 65 天。2. 非血缘供者采集: 共有 72 例非血缘供者在我院进行外周血造血干细胞采集, 33 例 (46%) 捐献给中国大陆, 39 例 (54%) 捐献给其他国家/地区, 其中包括香港 17 例、台湾 4 例、韩国 6 例、新加坡 6 例、美国 5 例、瑞士 1 例。并且均为我国首次向以上国家/地区捐献造血干细胞。3. 随访: 截至 2008 年底已完成中华骨髓库传来的所有随访表共计 163 份。4. 供者体检审核: 2006 年至今, 经我院专家咨询的中华骨髓库供者体检单达 195 份。**结论** 在社会服务部专员的努力工作下, 我院非血缘配型检索查询量逐年显著提高, 配型成功并接受非血缘移植的几率在 2006 年以后已稳定在 25%。为其他移植中心包括中国大陆和其他国家/地区的非血缘造血干细胞采集也呈逐年上升趋势, 所有非血缘移植患者均在随访中, 我院专家为中华骨髓库的供者体检审核提供了快速、优质的医学咨询。

### Coordinate work of unrelated donor stem cell transplantation

Ziwei Zhang, Yisi Liu, Lin Zhang

Department of Social Service, Beijing Daopei Hospital

**Abstract: Purpose** To analyze the data of coordinate work of unrelated donor stem cell transplantation (URDT) such as unrelated donor searching, matching and transplant rate, apheresis for other transplant units, patients' following-up after URDT, and consultation for Chinese Marrow Donor Program (CMDP) on donor's medical examination before transplantation. **Method:** From 2003 to

2008, the above data in Beijing Daopei Hospital were collected and analyzed. Result: The requests of unrelated donor searching have been increasing from 45 cases in 2004 up to 335 cases in 2008. The overall searching requests were 608 cases by now. The searching range has been expanded from CMDP only in 2001 to Taiwan, Hong Kong, Japan, Korea, Singapore and the United States. The matching and transplant rates has been reached up to 25% since 2006. The average searching period was 65 days. Total 72 apheresis from unrelated donors for other transplant units has been done in Beijing Daopei Hospital including 33 (45%) collections for the patients in mainland China, and 39 (55%) donations for the patients in other countries/regions (Hong Kong 17, Taiwan 4, Singapore 6, Korea 6, the United States 5, Switzerland 1). All follow-up forms from CMDP for 163 recipients after URDT in our hospital were completed. Total 195 consultations from CMDP on donor medical examination have been done by the expert in our hospital. Conclusion: Under the efforts of our coordinators, the requests of unrelated donor searching have been increasing significantly each year, the average searching period has been decreased to about 65 days, about 1/4 cases have finally received URDT, the number of apheresis for other transplant units both in mainland China and other counties/regions has also been increasing over time, all patients after URDT have been under following-up, and our expert has provided rapid and excellent consultation for CMDP regarding donor's medical examination.

## 论 文

北京市道培医院是我国首家民营血液病专科医院，目前每年开展造血干细胞移植 170 例以上，异基因移植占 98.8%。2001 年建院至 2008 年底共完成完成造血干细胞移植 835 例，其中非血缘移植 132 例，其中 82 例来自中华骨髓库供者捐献，50 例来自台湾佛教慈济骨髓干细胞中心供者捐献。由于同胞 HLA 相合供者的缺乏，非血缘移植的例数呈逐年上升趋势。为了非血缘移植工作的顺利开展，我院从 2004 年 1 月起成立了社会服务部（简称社服部），设立专职人员负责非血缘移植相关的协调工作，包括为患者查寻非血缘供者，作为医生和骨髓库之间的桥梁协调采集计划（为我院患者），安排干细胞的接送，全程陪同和安排非血缘供者的干细胞采集（为其他移植单位的患者），以及移植后患者的随访等。社服部已从开始的一名兼职人员发展到今天的三名专职人员，从仅与中华骨髓库合作发展到与台湾慈济、日本、韩国、新加坡、香港、美国等骨髓库均开展了合作，其中与中华骨髓库的合作最为广泛和深入。配型检索、干细胞采集与接送、患者移植后随访、供者体检报告专家咨询成为我院与中华骨髓库合作的主要内容。

### 一、检索配型

为了缩短平均检索周期，配合患者最佳移植时期，社服部总结工作经验，形成了以下工作特色：

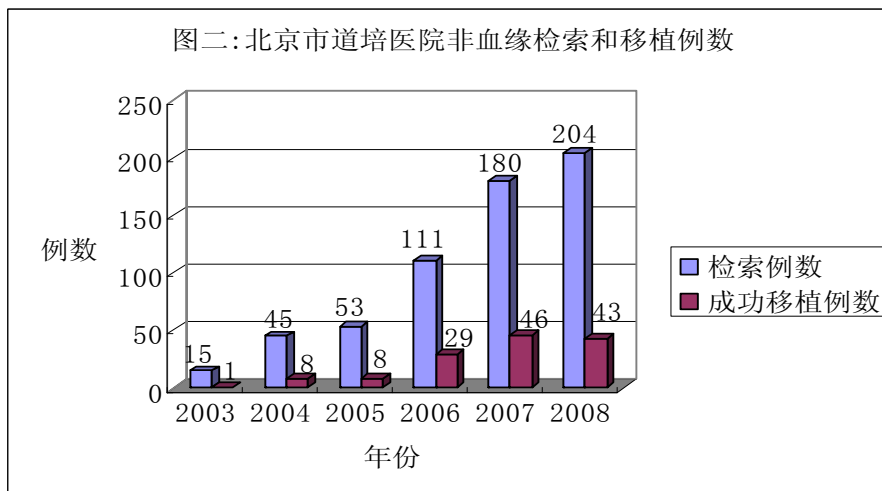
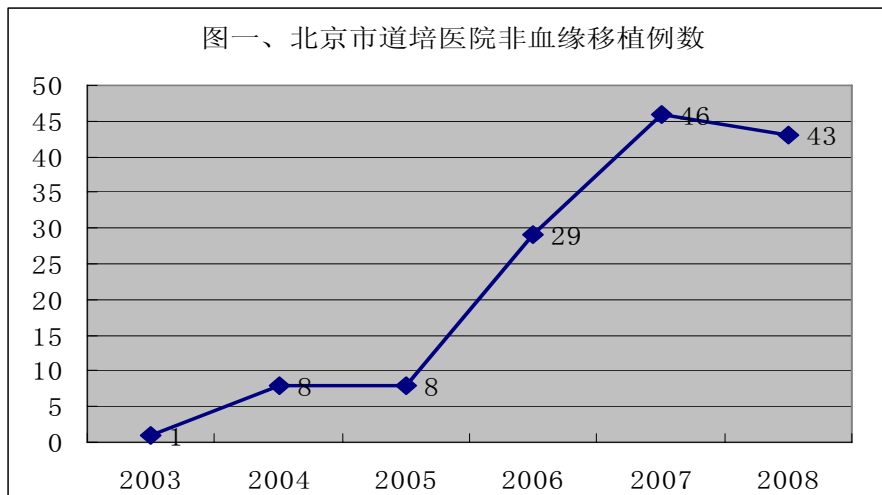
1. 检索进度表：对每一位来社服部检索的患者，都为其制定检索进度表，并对检索的每一步骤和进展都进行详细的记录；
2. 8 小时内回馈：对骨髓库传回的每一份配型相关报告单 8 小时内回馈给患者和其主管医生；
3. 三级审核制度：为了避免检索过程中出现差错，社服部制定了初筛报告单、高分辨结果、

移植计划、采集计划、随访表的三级审核制度；

4. 检索周报表制度：为了及时地跟进每位患者的检索进度，和临床医生更好的互动和衔接，我们制定了检索周报表制度，每周对所有检索患者的检索情况进行梳理并出具书面的报告提交给主管医生，并在次日与主管医生沟通，根据医生的意见及时跟进；

5. 检索月报表制度：我们每月月底出具检索月报表，分析总结本月检索情况以及工作中出现的问题，对工作进行改进。

以上工作制度的建立使我院非血缘检索的平均周期（从开始检索到采集移植）从 100 天缩短到为 65 天，为患者争取了宝贵的治疗时机。全年检索量也从 2003 年的 45 例上升到 2008 年的 335 例，累计检索例数 608 例。全年非血缘成功配型移植例数从 2003 年的 1 例增长到 2008 年的 43 例（供者源于中华骨髓库和台湾骨髓库）（见图一），截止 2008 年累计 132 例。配型成功移植率逐年上升（见图二），达到平均每 4 人检索就有 1 人成功移植。



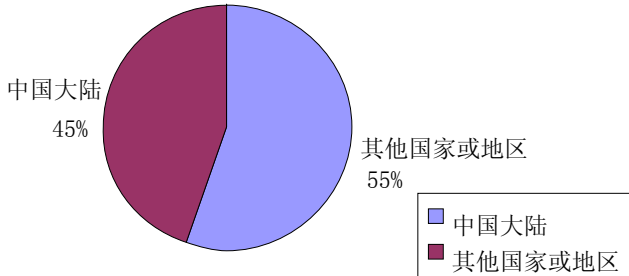
二、非血缘供者采集

我院是中华骨髓库、台湾佛教慈济骨髓干细胞中心、美国骨髓库的非血缘定点移植医院，也是中华骨髓库向境内、外捐献造血干细胞的定点采集医院。中华骨髓库向中国大陆以外的国家和地区捐献的造血干细胞大部分均在我院采集。

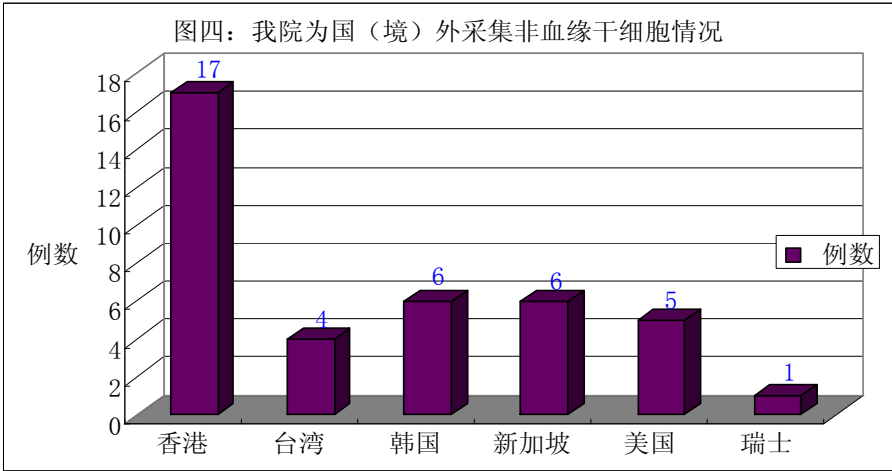
社服部负责安排与协调在我院进行的非血缘供者造血干细胞的采集工作。为了保证采集工作的顺利进行，社服部提供为供者及随行工作人员预定宾馆，派车到火车站/机场接供者，协助供者办理入院手续等服务。每一次供者采集，社服部都会全程跟踪服务，负责协调供者在院期间生活起居和采集相关工作。供者在院期间每天探望一次，对供者提出来的要求及时给予解决，出院时帮助预定火车票机票等。采集结束后建立供者采集档案，进行整理、记录、装订、归档。社服部尽最大努力，为中华骨髓库总库和分库，造血干细胞捐献者提供服务，争取每一次供者都能在一种充满关爱的氛围中结束采集。

为追求工作的尽善尽美，当捐献给台湾地区时，我院会出具简体中文和繁体中文的双份采集计划和细胞计数报告；当捐献给境外时，出具中英文双份的采集计划和细胞计数报告。并在采集结束后 3 小时内出具细胞计数，24 小时内将正式的采集物报告回传给中华骨髓库。在我院与中华骨髓库的共同努力下，共有 72 例非血缘供者在我院进行干细胞采集，其中 33 例捐献给中国大陆，39 例捐献给中国大陆以外的国家或地区（见图三）。我国首次捐献给台湾、香港、韩国、美国、新加坡、瑞士等国家和地区的造血干细胞均在我院进行采集（见图四）。在几次重大的造血干细胞交接仪式中，社服部做为承办方协助中华骨髓库筹办交接仪式（见图五、图六）。

图三：为其他移植单位采集非血缘干细胞



图四：我院为国（境）外采集非血缘干细胞情况





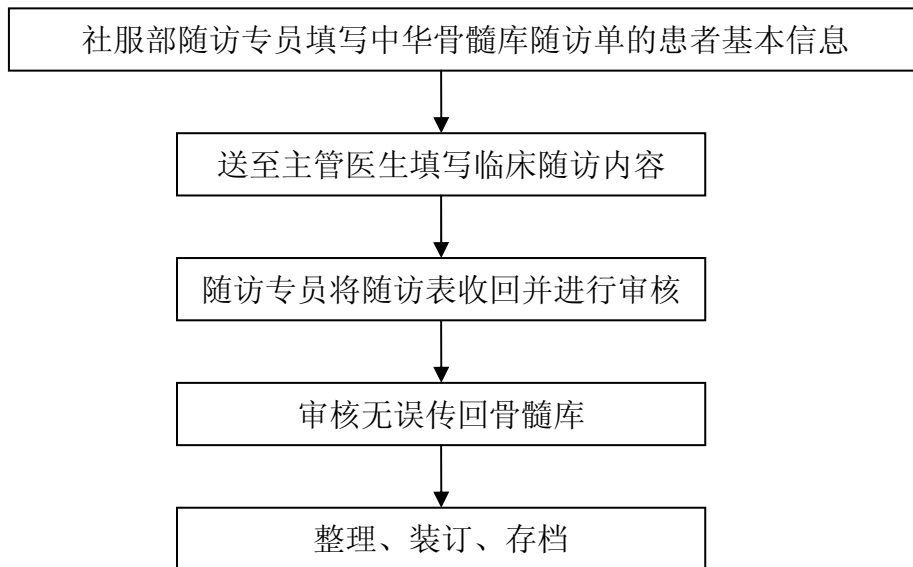
图五：大陆首次向台湾同胞捐献造血干细胞



图六：陆院士看望小凯丽的捐献者汪霖交接仪式

### 三、移植后患者的随访

为减轻医生的工作量，社服部承担了骨髓库随访单的追踪联络工作。具体工作流程如下：

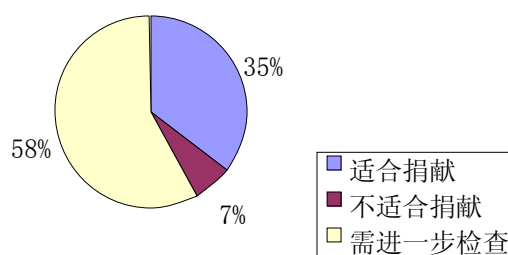


截至 2008 年底，社服部收到骨髓库随访单 163 份，填写完备回传 163 份，回传率 100%。除了极力配合各骨髓库的随访工作，社服部还对我院每一位移植后患者（自体、亲缘、非血缘、脐血移植）进行出院后终身随访管理，提醒患者按随访时间回院检查，帮助患者监控自身健康状况，以提高生存质量。“终身随访制”成为道培医院医疗服务的显著特色，也是社会服务部的重要职责。目前我院移植后患者 2 年随访率达到了 90%。

### 四、供者体检审核

我院童春容主任作为中华骨髓库专家委员会移植专家组成员之一，至今共接收和咨询的供者体检单 195 份。社服部作为中华骨髓库和我院专家之间的协调联络人，负责咨询单接收、核对、递交专家、收回、回传总库、装订、记录并存档。在这项工作中，为了缩短那些等待移植患者的时间，我院童主任在接到意见咨询单后尽快给出意见，协调员也是尽快地将意见单传回总库。

图七：供者体检咨询单专家意见分类



通过以上数据分析显示由于有社服部专员的敬业和高效率的工作，我院配型检索例数逐年上升，检索平均周期大幅缩短，配型成功移植率明显提升，为外单位的非血缘干细胞采集逐年增加，非血缘移植患者的移植后随访率为 100%，且协助我院专家为中华骨髓库提供了快速、优质的供者体检医学咨询。凸显出设立专人负责配型检索，供者采集协调以及随访的优势。“想患者之所想，做患者之所需”是我们社服部的工作信念，希望我们能为更多的白血病患者服务，和临床的专家们一起为挽救血液病患者作出努力。

## 2-26

### 急性移植物抗宿主病的预防

王健民 王利平

第二军医大学长海医院血液内科（200433）

异基因造血干细胞移植是治愈恶性血液肿瘤的主要方法，但移植相关并发症影响了患者长期生存。急性移植物抗宿主病（aGVHD）是移植后的主要并发症，HLA 相合亲缘关系供体移植受体的 GVHD 发病率约为 20~60%，移植并发症相关死亡的患者中，约半数病人与重度 aGVHD 直接或间接相关，是患者死亡的主要原因之一。轻度 GVHD 有利于可能有利于移植物抗肿瘤作用，一旦发生重度 aGVHD，预后恶劣。因此，如何有效预防 GVHD，一直是相关学者研究的重点课题。

#### 1 选择合适的供者

供受者之间 HLA 相合程度是决定 aGVHD 动力学的关键，应尽量选择组织相容性最佳的供者，目前国内多对 HLA-A、B、C、DRB1、DQB1 基因位点进行分析。近年来，很多研究表明其他 HLA 基因位点、KIR 型、某些细胞因子基因的多态性、供者抗宿主混合淋巴细胞反应中供者 T 细胞产生的细胞因子类型等，均与 aGVHD 的发生有一定的关系。例如，Shaw 等发现 HLA-DPB1 错配增加 II~IV 度 aGVHD 发生的风险（OR=1.33， $P<0.001$ ）和 III~IV 度 aGVHD 发生的风险（OR=1.26， $P<0.001$ ），但复发率降低（HR=0.82， $P=0.01$ ）<sup>[1]</sup>。Battiwalla 等发现 HLA-DRB1 位点中 HLA-DR15 均阳性的患者 II~IV 度 aGVHD 的发生率下降<sup>[2]</sup>。KIR 独特型不合能促使供者 NK 细胞产生异源反应活性，清除宿主 APC，降低 aGVHD 的发生<sup>[3]</sup>；Lin 等发现在相合同胞供者移植中存在 IL-10-592A

等位基因能减少 aGVHD 发生<sup>[4]</sup>,受者 IL-10 基因型与供者 IL-10R $\beta$  基因型的关系与 aGVHD 有关<sup>[5]</sup>。根据遗传学差异选取合适的供者是减轻 aGVHD 的重要方法。

## 2 减轻移植前炎性损伤

临床上多年来使用肠道非吸收性抗生素预防肠道感染,并证明能减轻 GVHD。减低移植前预处理强度能减轻宿主组织炎性反应及炎性因子释放从而推迟或减轻 GVHD。某些上皮生长因子,如角质细胞生长因子(KGF)、肝细胞生长因子(HGF)能保护胃肠道黏膜免受预处理损伤从而减轻 GVHD。一项随机对照双盲的 I/II 期临床试验发现,帕利夫明(palifermin,重组 KGF)未能有效预防造血干细胞移植后 aGVHD 发生,但减轻了接受 Cy/TBI 预处理患者粘膜炎的发生及严重程度,用药过程安全<sup>[6]</sup>。

## 3 阻断细胞因子产生

常用的有抗 CD25 单抗。抗 CD25 单抗可选用赛尼哌或舒莱,前者剂量为 1mg/kg,静脉滴注,移植后第 1、4、8、15、22 天给药,后者剂量为 20mg/d,移植后第 1、4 天给药,随后每周 1 次,可连用 4 次。CD25 单抗联合 CsA、MTX、MMF 能有效预防半相合骨髓移植后 aGVHD,13 例病人中无一例发生 II~IV 度 aGVHD<sup>[7]</sup>。也有尝试用 TNF- $\alpha$  中和性抗体、IL-11、IL-1 受体拮抗剂预防 aGVHD 的临床试验,但未能减少 aGVHD 的发生。

## 4 抑制 T 细胞激活

移植后免疫抑制治疗仍是传统的 GVHD 预防策略,至今仍是一线预防方法。主要基于环孢素 A(CsA)或他克莫司(FK506)联合短程甲氨蝶呤(MTX),移植后最初 10 天 CsA 的剂量可能对控制白血病有显著意义:低剂量的 CsA(1mg/kg)较高剂量(3mg/kg 或 5mg/kg)能减少白血病复发。FK506 联合 MTX 预防 aGVHD 的效果优于 CsA 联合 MTX(II~IV 度 aGVHD 的发生率分别为 51%、70%),但慢性 GVHD(cGVHD)发生率、白血病复发、生存率无显著差异<sup>[8]</sup>。

新的免疫抑制剂包括雷帕霉素(sirrolimus)、骁悉(MMF),多用于患者不能耐受 CsA 或 FK506 时。MMF 在标准的 CsA 联合治疗中能取代 MTX,其粘膜炎发生少,病人耐受性好。我中心一直以来联合 CsA、MMF、短程 MTX 预防 GVHD,取得较好疗效<sup>[9]</sup>。雷帕霉素联合 FK506 预防 GVHD 较 MTX 联合 K506 能降低 aGVHD 发生率,减少移植相关毒性,延长生存<sup>[10]</sup>,也有报道雷帕霉素、FK506 联合小剂量 MTX 预防 GVHD,移植后 II、III、IV 度 aGVHD 的发生率分别为 13、8、5%,优于历史对照组<sup>[11]</sup>。

## 5 T 细胞共刺激途径阻断

阻断 T 细胞活化过程的共刺激信号通路,如 CD28/B7,CD40/CD40L 等均可抑制 T 细胞活化或诱导活化的 T 细胞凋亡。本中心研究表明,可诱导性共刺激分子 ICOS 在 GVHD 患者表达增高,应用 ICOS-Ig 融合分子,可预防 GVHD。这方面研究多见动物实验的报道,临床试验报道少见。

## 6 T 细胞去除

### 6.1 非选择性 T 细胞去除

最有效的单一预防 GVHD 的方法是 T 细胞去除,可以通过破坏移植物中 T 细胞或细胞分选技术实现。输注的 T 细胞数量降至  $10^5$  个/kg 受者体重以下,即能预防同胞供者移植后严重 GVHD 的发生,且移植后不需要进行 GVHD 预防;T 细胞去除在无关供者移植中也能显著减少严重 GVHD



的发生。最初的方法是通过大豆植物凝血素凝集和绵羊红玫瑰花结形成,能使 T 细胞数量下降约 2 个对数级。上世纪 80 年代开始用鼠源化抗 CD3 单抗 (OKT3) 进行 T 细胞去除,其他方法包括鸡尾酒法(联合抗 CD3、6、7、8)或单独使用抗 CD6 单抗。近来,开始使用免疫磁珠分选系统,如 CliniMACs 和 Isolex 300i 系统,能使 T 细胞数量降至  $10^4/\text{kg}$  受者体重,即使对成人半相合的移植也足以预防严重 GVHD 的发生。抗胸腺细胞球蛋白/抗淋巴细胞球蛋白(ATG/ALG)在造血干细胞移植中预防 GVHD 主要用于非血缘移植、半相合移植,显示了较好的效果。

然而,非选择性 T 细胞去除延迟了移植后宿主免疫重建,增加了感染的风险,减弱了移植物抗白血病(GVL)效应,增加了原发病的复发率,已被 Meta 分析证实,因而促进了选择性 T 细胞去除的发展。

## 6.2 选择性 T 细胞去除

选择性 T 细胞去除,即去除异基因反应性 T 细胞,而保留特异性抗感染和抗肿瘤细胞。常用的有 CD25 单抗和 CD52 单抗(Alemtuzumab,阿仑单抗)。抗 CD25 的免疫毒素选择性去除供者异基因反应性淋巴细胞能减轻老年患者同胞相合移植后 GVHD 的严重性,II~IV 度和 III~IV 度 aGVHD 发生率分别为 46%、12%<sup>[12]</sup>。但是去除 CD25<sup>+</sup>T 细胞也可能同时去除了 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 调节细胞,反而促进 GVHD 发生。CD52 单抗体内外去除 T 细胞在相合的无关供者移植中避免了严重 aGVHD 的发生,且广泛型 cGVHD 的发生和死亡率均下降<sup>[13]</sup>。其他选择性去除 T 细胞的方法还有 CD69 单抗、Fas 配体、光学净化等。

## 7 细胞治疗

近年来,对一些具有免疫调节作用的细胞亚群和细胞成分及其分泌的细胞因子的研究取得了进展。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 调节细胞在动物试验中证明能减轻 aGVHD 而保留 GVL 效应,临床研究也发现未发生或发生轻度 aGVHD 的病人中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 调节细胞较多,输注体外扩增的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 调节细胞可能预防或治疗 aGVHD。动物试验发现<sup>[14]</sup>KIR 型不合的供者 NK 细胞能杀伤宿主 APC 减轻 aGVHD 发生,杀伤宿主残留的肿瘤细胞减少复发,一项运用异基因反应的 NK 细胞作为预处理的半相合造血干细胞移植的临床试验正在进行<sup>[15]</sup>。

间充质干细胞(MSC)是来源于骨髓的基质细胞,具有多向分化能力,体内外研究发现其具有免疫抑制作用,能促进移植后造血重建。一项多中心临床试验中,同胞相合的造血干细胞移植前 4 小时输注体外培养扩增的 MSC ( $1\sim 5\times 10^6/\text{kg}$ ),II~IV 度 aGVHD 的发生率为 28%,cGVHD 发生率 61%,复发率 24%,输注过程安全,不影响植入<sup>[16]</sup>。但另一随机对照的临床研究比较共输注 MSC ( $0.3\sim 13.5\times 10^5/\text{kg}$ )和不输注 MSC,两组 II~IV 度 aGVHD 的发生率分别为 11.1%和 53.3%,cGVHD 的发生率分别为 14.3%和 28.6%,复发率分别为 60%和 20%,3 年 DFS 分别为 30%和 66.7%<sup>[17]</sup>。我中心在半相合骨髓联合外周血造血干细胞移植中共输注 MSC,结果提示 MSC 可促进造血干细胞的早期植活,由于病例数尚少,aGVHD 发生率有待积累更多病例分析。此外,MSC 的最佳输注时机、输注数量、在移植中的作用有待大规模临床试验证实。

## 无关供者异基因造血干细胞移植进展

黄河

浙江大学医学院附属第一医院骨髓移植中心 (310003)

异基因造血干细胞移植 (Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Allo-SCT) 已广泛应用于血液系统恶性疾病的治疗, 同时也是部分自身免疫性疾病、遗传性疾病、代谢疾病及部分实体瘤的有效治疗方法之一, 目前在全球范围内已有超过 10 万例的病人接受各种类型的异基因造血干细胞移植术。

### 一、无关供者造血干细胞移植概况

Allo-SCT 根据供者的来源可分为同胞供者异基因造血干细胞移植 (Sibling HSCT) 和无关供者异基因造血干细胞移植 (Unrelated Donors HSCT, URD-HSCT), 其中移植物可来自骨髓、外周血及脐血。合适供体的选择困难是制约 Allo-SCT 发展的主要因素, 在欧美国家也仅有 30% 的患者可在兄弟姐妹中找到合适的同胞供者; 而在我国独生子女家庭的日益增多的情况下, 能找到同胞供者的概率更少。因此, 发展无关供者异基因造血干细胞移植、脐血造血干细胞移植是解决问题的有效途径。

无关供者造血干细胞移植主要用于血液系统恶性疾病的治疗, 其中对白血病的治疗占绝大多数。国际骨髓移植登记处 (IBMTR) 和欧洲骨髓移植协作组 (EBMT) 报道, 成人急性淋巴细胞白血病 (ALL) CR1 患者 Allo-SCT 后 3 年 DFS 为 56%, 急性髓性白血病 (AML) CR1 患者 Allo-SCT 后 3 年 DFS 为 62%, 慢性粒细胞白血病慢性期 (CML-CP) 患者 Allo-SCT 3 年 DFS 为 59%。此外, Allo-SCT 也应用于骨髓增生异常综合 (MDS)、多发性骨髓瘤 (MM)、淋巴瘤的治疗。Allo-SCT 对非恶性疾病的治疗以往仅限于重型再生障碍性贫血及某些先天性疾病, 近些年来对一些非恶性疾病, 如骨髓纤维化、高嗜酸细胞综合症、肥大细胞增多症、真性红细胞增多症, 以及纯红再生障碍性贫血、夜间阵发性血红蛋白尿等疾病的治疗也开始尝试进行 Allo-SCT, 并取得了一定的疗效。

尽管无关供者造血干细胞移植的并发症和死亡率均较同胞供者造血干细胞移植要高, 但随着分子生物学配型技术及移植相关技术的进步, 其结果在不断改善, 移植相关死亡率 (TRM) 下降, 移植患者的无病生存率 (DFS) 接近甚至优于同胞供者造血干细胞移植。对移植预处理的研究表明, 临床可采用相对低毒性、小剂量、非清髓性预处理方案降低移植相关并发症的发生, 其通过提供足够的免疫抑制以达到异基因造血干细胞的植入, 形成供受者混合性嵌合体, 由此产生移植物抗白血病 (GVL) 效应而清除恶性病变, 并通过移植后供者淋巴细胞输注 (DLI) 争取持续缓解, 达到完全治愈血液系统恶性疾病的目的; 此外, 非清髓性预处理方案的提出使得年龄较大、或是合并其他脏器功能不全的患者有了移植的机会。

### 二、无关供者异基因造血干细胞移植供体登记中心现状

目前全球范围大约有超过 50 个国家成立造血干细胞捐赠登记中心, 已登记的捐赠志愿者及脐血干细胞资料超过 1200 万份, 从 1998 年起骨髓捐赠全球网 (Bone Marrow Donors Worldwide,

BMDW) 已列出来自全球 43 个国家的 59 个造血干细胞登记中心和 25 个国家的脐血库的 HLA 分型资料, 以利于寻求适合的供者。美国国立骨髓捐赠者登记中心 (National Marrow Donor Program, NMDP) 是全球最大的造血干细胞捐献志愿者登记处, 创立于 1986 年, 目前已登记的志愿捐赠者达 600 万份, 为全球 25, 000 余例 HSCT 提供了移植物, 每天都有超过 8, 000 人在 NMDP 数据库中寻找可以匹配的供者。在华人骨髓库中, 台湾慈济骨髓干细胞中心成立于 1993 年 10 月, 至 2008 年 1 月志愿捐赠者已超过 30 万份, 为全球提供骨髓和外周血干细胞 1, 500 余份。我国大陆地区的造血干细胞捐赠事业始于 1993 年, 2001 年成立了“中国造血干细胞移植捐赠者资料库 (CMDP)”, 截止 2008 年 1 月中华骨髓库入库资料已超过 70 万人份, 已为患者提供造血干细胞 700 余份。相对于成人供者, 脐血干细胞的供应几乎是无限的, 目前全球大约有 25 万份可供移植的脐血储备, 其中开展无关供者脐血移植已超过 8, 000 例次。相信造血干细胞登记中心及脐血库的蓬勃发展必将挽救更多需要移植病患的生命。

### 三、HLA 配型技术

Allo-SCT 同时伴随着宿主抗移植物和移植物抗宿主的免疫反应, 人类白细胞抗原 (HLA) 在免疫反应中起着重要的作用; HLA 具有高度的多态性, 至今在全球人口范围内已鉴定了 2901 个等位基因, 且数量还在不断增加中。HLA 配型的传统方法是血清学分析, 而抗原位点相合的供受者之间仍有 30% 为基因位点不合; 从 1998 年开始, HLA 分子生物学配型方法逐渐应用于临床, 保证了 HLA 配型的精确性, 提高了 URD-HSCT 的疗效。对 Allo-SCT 来说, 影响最大的基因是 HLA I 类基因 (HLA-A、HLA-B、HLA-C) 和 HLA II 类基因 (HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DPB1)。

以往的观点认为, 植入失败的发生主要和 HLA I 类位点不合有关, 而 aGVHD 的发生与 HLA II 类位点不合有关。最近 Lee 等对 NMDP 1988 年至 2003 年间 3857 例无关供者异基因造血干细胞移植进行分析, 结果表明: HLA-A、-B、-C 和 HLA-DRB1 基因位点不合患者的 aGVHD 和移植相关死亡率的发生率明显增加; 患者的长期生存率与 HLA-A、-B、-C 和 -DRB1 基因位点不合有关, 而与 HLA-DQ、-DP 无关。此外, 不同的临床研究表明 HLA-A 基因位点不合和 cGVHD 密切相关, HLA-C 基因位点不合患者植入失败发生率明显增加。一般认为 HLA-DPB1 不相合对移植病人总生存率没有影响, 但增加 aGVHD 的发病率, 降低了恶性疾病患者的移植后复发率, 认为 HLA-DPB1 不相合与移植物抗白血病 (GVL) 效应有关。最近 Shaw 等对 5929 例无关供者造血干细胞移植的研究进一步支持了以上观点, 且 HLA-DPB1 不相合所引起的 GVL 效应在 HLA-A、-B、-C、-DRB1 和 DQB1 均相合的患者中更明显, 但移植时是否考虑选择 HLA-DPB1 不相合的供者, 必须仔细权衡 GVHD 和复发对患者生存率的影响。

全球造血干细胞资料库的建立和完善为寻找适合的供者提供了便利; 随着 HLA 配型精确程度的提高, 每个患者找到 HLA 位点全相合供者的机会也相应减少。病人的原发病和疾病的状态是决定是否进行无关供者造血干细胞移植的重要因素。对于低危组, 常规化疗预期生存时间长的患者, 应该选择 HLA 基因位点完全相合的供者; 对于处于疾病进展期的高危组患者, 常规化疗预期生存时间很短, 原发病带来的风险比移植更大, 因此可以考虑选用 1 个基因位点不合的供者; 对于原发病高度危险的患者, 如 Ph 染色体阳性的 ALL 患者, 甚至可以选用 1 个抗原位点或 2 个基因位点不合的供者, 但此需由经管医生对移植病人进行全面的评估, 并向造血干细胞登记中心进行特殊申请

和详细的说明。高分辨率的分子生物学分型技术为精确配型奠定了基础，通过大样本回顾性研究以鉴定允许和非允许不相合的 HLA 等位基因，让人们有希望从 HLA 不相合的人群中选择出更适合的供者，但单个 HLA 位点不相合对移植疗效的影响尚需从精确设计的前瞻性临床研究中得到进一步的论证。

#### 四、无关供者异基因造血干细胞移植的临床应用

随着 HLA 分子生物学配型方法的临床应用，GVHD 发生机制及防治方法的进步，促进免疫重建机制的研究和应用以及支持治疗的进步，无关供者造血干细胞移植的疗效不断提高。目前无关供者造血干细胞移植较为广泛的应用于血液系统恶性疾病、血液系统非恶性疾病、代谢性疾病、免疫缺陷性疾病和其他恶性疾病，最多的还是在急、慢性白血病中的应用。(1) CML：尽管伊马替尼已成为 CML 治疗的一线用药，但迄今为止 Allo-SCT 仍是已证实的可治愈 CML 的唯一方法，同时 Allo-HSCT 亦是伊马替尼治疗失败及伊马替尼耐药患者的有效治疗方法。无关供者造血干细胞移植是缺乏 HLA 相合同胞供者并有强烈移植指征情况下的有效选择。NMDP 对移植治疗 CML 病例中无关供者造血干细胞移植（2464 例）和同胞供者造血干细胞移植（450 例）的疗效进行比较分析，结果表明在慢性期进行移植，诊断到移植时间小于一年的患者中，年龄 <30 岁、30~40 岁、>40 岁患者接受无关供者移植后 5 年 DFS 分别为 61%、57%、46%，而同胞供者造血干细胞移植组分别为 68%、67%、57%。目前伊马替尼和 Allo-HSCT 联合应用治疗 CML 的尝试取得了优于两者单独应用的疗效。(2) 急性白血病：无关供者造血干细胞移植应用于急性白血病的主要适应证是具有高危染色体特征的 CR<sub>1</sub> 患者、诱导缓解超过 1 个疗程的患者以及残余病变检测阳性的患者。美国亚特兰大 EMORY 大学报告认为与同胞供者造血干细胞移植相比，无关供者造血干细胞移植治疗急性白血病有更强的 GVL 效应，移植后复发率低，其在治疗 ALL 中的疗效随疾病状态的不同而有所区别。一般来说，年龄较轻，处于 CR<sub>1</sub> 的病人长期生存率较高，CR<sub>2</sub> 及复发患者疗效明显下降。高危 ALL 患者可在 CR<sub>1</sub> 及早进行 Allo-SCT，无关供者造血干细胞移植可提高高危 ALL 患者的疗效。无关供者造血干细胞移植并非所有 AL 的一线治疗方案，传统化疗和支持治疗技术的不断提高使相当一部分病人得以长期生存；然而，一些具有不良预后因素的病人，应考虑及早进行移植。(3) MDS：无关供者造血干细胞移植适用于国际预后积分系统（IPSS）界定的高危患者。移植结果和 MDS 类型、患者年龄、病程、CMV 血清学状态、原始细胞比例、中性粒细胞数量有关。用毒性更低的预处理方案可降低 TRM；移植前病程长和移植时中性粒细胞低与患者非复发死亡率有关，其原因可能和多次输血引起的铁负荷过重、自身免疫反应等并发症相关；移植后复发受移植时 MDS 阶段影响，RA 和 RAEB 复发率低，RAEB-T 复发率超过 50%，且复发和移植时 IPSS 分值、是否存在预后不良细胞遗传学改变以及治疗相关 MDS 有关。(4) 其他非肿瘤疾病：目前无关供者造血干细胞移植治疗的其他非肿瘤疾病有再生障碍性贫血、Fanconi 贫血、地中海贫血、严重联合免疫缺陷及代谢性疾病等。

#### 五、脐血造血干细胞移植（UCBT）

尽管全球范围的造血干细胞登记中心日益扩大，但是骨髓及外周血干细胞 HLA 相合的供者仍不能满足异基因移植的需要。1988 年 10 月，Gluckman 和他的同事进行了世界上首例同胞供者 UCBT，在过去 10 年的临床观察中发现，合适的脐带造血干细胞也是一种可供选择的造血干细胞

移植的来源，用于治疗各种恶性肿瘤和非恶性的疾病。

UCBT 相对于无关供者骨髓移植 (BMT) 及外周血干细胞移植 (PBSCT) 有一定的优势：获得脐血的时间较短，患者可耐受相对较高程度的 HLA 配型的不一致，移植后 aGVHD 和 cGVHD 的发生率和严重性可以比配型相合或是不相合的 BMT 低。明尼苏达大学对 102 例无关供者脐血移植进行了回顾性研究，其中 86% 的脐血移植物有 1 至 3 个位点的不相合，研究结果显示 aGVHD 和 cGVHD 的发生率分别为 11% 和 10%，一年生存率为 58%；其中脐血中 CD34<sup>+</sup> 细胞数与移植的植入率、移植相关的死亡率和生存率有明显的关系。在 NMDP 一份关于脐血移植 HLA 配型的报告中指出，只要 HLA 6 个位点有 4 个甚至 3 个位点相合就可以用于移植，有 99% 的病人能够配型成功，且没有种族的差别，所以认为只要有一定数量的合适的脐血就能够解决很大一部分人的移植问题。

UCBT 在儿童 Allo-SCT 中的地位已确立，无论是同胞还是无关供者 UCBT 临床疗效均与相应的同胞和无关供者 BMT 疗效相当。但是 UCBT 的一个主要弊端是单位受者体重的总有核细胞数 (TNC/kg) 较低，导致其在成人和高体重患者移植后植入率偏低，进而限制了其临床应用。在成人 UCBT 中，达到植入所需的最低有核细胞数仍未确定：最初认为  $1 \times 10^7/\text{kg}$ ，但发现移植后 100 天死亡率高达 40% 以上，随后又修订的标准为  $3 \times 10^7/\text{kg}$ 。近年来 UCBT 应用于成人患者的数量有增加趋势，最近欧洲和北美的两个多中心大宗病例报告详细分析了成人急性白血病无关供者 BMT 和无关供者 UCBT 的临床研究结果。欧洲骨髓移植组 (EBMT) 报告了 98 例成人进展期恶性血液病接受无关供者 UCBT 与无关供者 HLA 相合 BMT 的结果，显示 UCBT 组 GVHD 的发生率低于 BMT 组，中性粒细胞植入明显延迟，但两组术后 TRM、复发率、cGVHD 发生率、无 DFS 期无明显差异。IBMTR 报告的 150 例 UCBT 的结果与上述结果类似。这些研究结果表明，对于需要进行无关供者造血干细胞移植但无合适 HLA 配型供者的病人，UCBT 是一种可供考虑的有效的治疗手段。

对 UCBT 中植入失败和造血重建延迟问题的研究，目前在双份脐血移植、非清髓性预处理等方面均取得了一定的进展。在对白血病缓解期患者行双份脐血移植与历史对照的单份脐血移植的分析显示，双份脐血移植可提高植入率且降低 TRM，患者的 1 年 DFS 为 72%；最近明尼苏达大学对 83 例高危及进展期的血液系统恶性疾病患者在清髓性预处理后行双份脐血移植，患者的 3 年 DFS 为 54%；这些数据均提示双份脐血移植有望成为解决 UCBT 中有核细胞数量有限的一种策略。对于有严重合并症及老年的患者，非清髓性 UCBT 可作为一种有效的移植方案。明尼苏达大学采用非清髓性 UCBT 治疗 43 例高危的血液系统恶性肿瘤患者，1 年 DFS 为 41%。随着脐血干细胞扩增技术的研究进展及移植策略的改进，相信在未来 UCBT 临床应用范围会更加广泛。

#### 六、非清髓性造血干细胞移植 (Nonmyeloablative Stem Cell Transplantation, NST)

大量的临床研究表明，Allo-SCT 的疗效主要由于供体细胞植入后产生的 GVL 效应，而非大剂量全身照射 (TBI) 和/或化疗的清髓性预处理。随着高效免疫抑制剂氟啶拉宾 (fludarabine) 的发现，移植物抗肿瘤 (GVT) 效应机理研究的深入，NST 成为研究的热点，其主要机理是减轻预处理方案的放化疗强度，加入强有效的免疫抑制剂以保证移植物植入，通过 DLI 产生 GVL 效应，清除残余病变。初步的研究表明，非清髓性预处理方案能保证移植物成功植入，和传统预处理方案比较，NST 由于其低血液学毒性而降低了 TRM，扩大了 Allo-SCT 的对象，使得一些高龄或有其他并

发症的患者获得了移植机会，近年来备受关注。

非清髓性预处理方案又被进一步区分为减低剂量预处理（Reduced Intensity Conditioning, RIC）和真正的非清髓性预处理（Non-myeloablative Conditioning, NMC），并认为区分这两种方案有一定的临床意义。RIC 方案的原则是在减低预处理相关发病率和死亡率的前提下，保留较强的抗肿瘤药物以进一步杀灭肿瘤细胞，从而获得产生 GVT 效应所需的时间，该方法可能对侵袭性恶性肿瘤如中/高度恶性淋巴瘤、ALL、MM 及未缓解的急性白血病等，GVL 效应不佳或疾病进展较快的患者较为有利；而 NMC 主要通过移植前后的免疫抑制药物来克服宿主抗移植物反应，从而使移植物植入，不清除宿主造血功能，在淋巴细胞输注的帮助下逐渐清除肿瘤细胞和宿主的造血成分，达到完全嵌合，该方法适用于对 GVL 较为敏感的恶性血液病，如 CML、CLL、低度恶性淋巴瘤等，或者无须清除肿瘤细胞的非恶性血液病如再生障碍性贫血、地中海贫血等。另外一些临床研究将靶向治疗药物（如 imatinib、rituximab、alemtuzumab 等）加入到预处理方案中旨在增强 GVL 效应同时并不增加 GVHD 发生的危险性，或者合用特异性过继免疫疗法（如联合 NK 细胞、特异性 T 细胞），来治疗恶性程度较高的血液疾病，其初步结果也是令人鼓舞的。

NST 后必需定期检查受者体内供体造血干细胞的植入状况，混合性嵌合体或残留病存在将是复发的危险因子，DLI 能促使完全供体性嵌合体形成和产生 GVL 效应，但与移植后发生 GVHD 的风险相关。目前 NST 临床研究的重要挑战在于应开展随机研究以比较不同非清髓性移植方案的利弊，寻找在保证 GVL 效应的前提下尽量减少毒性、严重 GVHD、感染的最佳预处理方案；设计前瞻性的随机临床试验以评价非清髓性预处理方案与清髓性预处理方案在年轻人群中的治疗作用。

## 七、小结和展望

异基因造血干细胞移植已成为多种血液系统恶性疾病、自身免疫性疾病、遗传性疾病及部分实体肿瘤等疾病的有效治疗方法，无关供者造血干细胞及脐血是解决供者来源问题的有效途径。随着大型供者登记中心的建立及全球协作的开展、造血干细胞来源的多元化、HLA 分子生物学配型方法的应用、移植并发症防治和支持治疗的进展、以及各种造血干细胞移植的新技术的应用，无关供者造血干细胞移植用于治疗各种疾病的适应症不断扩大且临床疗效日益提高。无关供者已成为造血干细胞移植的主要来源之一，具有广泛的应用前景。

2-28

## 抑制性和激活性 NK 细胞 KIR 受体与 HLA 配体之间的相互作用 对非清髓性外周血造血干细胞移植高风险患者移植预后的影响

### Relevance of Inhibitory and Activating Killer Ig-like Receptors and HLA Ligand on Outcomes in High-Risk Patients Undergoing Non-Myeloablative Haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplants

*Dong-Feng Chen, Ph.D.<sup>1</sup>, Vinod K Prasad, MD<sup>2</sup>, Gloria Broadwater, MS<sup>3</sup>, Adella Clark MS<sup>1</sup>,  
David A Rizzieri, MD<sup>4</sup>, Nelson J Chao, MD<sup>4</sup>, Nancy L Reinsmoen, Ph.D.<sup>5</sup>*

*<sup>1</sup>Clinical Transplantation Immunology Laboratory, <sup>2</sup>Pediatric Blood and Marrow Transplantation Program, <sup>3</sup>Cancer Center Biostatistics, <sup>4</sup>Division of Cellular Therapy, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA; <sup>5</sup>HLA Laboratory, Comprehensive Transplant Center, Cedars-Sinai Health Systems, Los Angeles, CA, USA*

NK cell cytotoxicity is modulated by interaction between killer Ig-like receptors (KIR) and their ligands which may influence the outcomes of transplant through various mechanisms including graft versus leukemia (GVL) effect. The impact of the KIR alloreaactions on leukemia relapse in myeloablative transplantation has been reported. In this study we examined the GVL effect in non-myeloablative transplantation in 46 myeloid malignancy (MM) and 34 lymphoid malignancy (LM) patients receiving peripheral blood hematopoietic stem cell graft from haploidentical family donors. Transplant outcomes were evaluated by using missing ligand, ligand-ligand model and by presence of activating KIR (aKIR). Kaplan-Meier curves were compared using the log-rank test. The impact of NK cell cytotoxicity was assessed by overall survival (OS), time to relapse-related mortality (RRM), and time to acute GvHD (AcGvHD). Within the myeloid subset, OS is significantly higher in patients without HLA C2 (Asn77-Lys80) ligand to donor KIR than those with the HLA C2 ligand ( $P=0.047$ ). RRM was lower if there was an absence of A3/11 ligand in patients for donor KIR ( $P=0.024$ ). Patients with 2 or 3 missing ligands had significantly lower RRM compared those with 0 or 1 missing ligand ( $P=0.033$ ). However, missing ligand to donor KIR did not influence AcGvHD. Within the lymphoid subset, there was no influence of missing ligand to donor KIR as well as ligand-ligand model on OS or RRM. OS was better in the presence of donor aKIR 2DS2 ( $P=0.012$ ), recipient aKIR 2DS1 ( $P=0.017$ ), 2DS5 ( $P=0.049$ ) and 3DS1 ( $P=0.017$ ). RRM was lower with donor aKIR 2DS2 ( $P=0.044$ ). AcGvHD was higher if donor

had missing HLA A3/11 ligand for patient KIR ( $P=0.05$ ) and if patient had missing HLA C1 (Ser77-Asn80) or C2 (Asn77-Lys80) ligand for donor KIR ( $P=0.03$ ).

These results suggest that absence of certain HLA ligands in patient to the KIR in their donors leads to GVL effect without an increase in GvHD in high-risk patients with myeloid malignancy undergoing these transplants. However, such an effect is not seen in lymphoid malignancy patients. Interestingly, activating KIR has impact on the OS and RRM in lymphoid malignancy patients undergoing these transplants.

## 2-29

### CD25 单抗与 ATG 在无关供者造血干细胞移植中疗效分析

胡亮钉 刘启发 孙 竞 李渤涛 江 岷 李欲航 徐 晨 俞志勇 陈 虎  
军事医学科学院附属医院 南方医科大学

**摘要:** **目的** 比较 CD25 单抗与 ATG 在无关供者造血干细胞移植疗效, 并对两组移植后药物反应、总生存率、急性 GVHD 发生率及严重程度和移植后恶性血液病复发进行分析。**方法:** 144 例恶性血液病患者进入这项开放、非随机对照临床研究。其中 CD25 单抗组与 ATG 组各 72 例, CD25 单抗组 CML 24 例、AML 20 例、ALL 19 例和 MDS 10 例。ATG 组 CML 31 例、AML 21 例、ALL 17 例和 MDS 3 例。两组疾病分期早期 (CML-CP 或 CR1) 32 例和 34 例, 晚期 (CML-BC 或 CR1) 分别为 42 例和 38 例。两组男女各 47 例, 45 例和 25 例、27 例。中位年龄分别为 35 岁和 37 岁。CD25 单抗组 PBSCT 60 例, BMT 12 例, ATG 组 PBSCT 58 例, BMT 组 14 例。两组 HLA 完全相合、1 个位点不合和 2 个位点不合分别为 33 例、26 例、13 例和 35 例、24 例、13 例。GVHD 预防在 CSA+短疗程 MTX 的基础上分别加上 CD25 单抗和 ATG, 移植后+1 天和+4 天给予 CD25 单抗 1mg/kg, 移植前-3、-2、-1 天给予 ATG 3mg/kg。**结果** (1) **药物反应:** ATG 组 47 例出现发热和寒战, 发生率 65.2%, 其中 3 例病人出现低血压休克, 7 例病人出现皮疹, CD25 单抗组 5 例出现发热, 3 例出现皮疹。(2) **生存率和复发率:** CD25 单抗组存活 42 例, 死亡 30 例, 其中移植相关死亡 18 例, 复发死亡 14 例, 生存率为 58.3%, 复发率为 19.4%。ATG 组存活 40 例, 死亡 32 例, 移植相关死亡 15 例, 复发死亡 17 例, 生存率 55.5%, 复发率为 23.6%。两组存活率和复发率无差异 ( $P=0.051$  见图 1)。(3) **急性 GVHD:** 急性 GVHD 发生率两组分别为 44.5%和 48.7%, III-IV 急性 GVHD 发生率分别为 19.6%和 20.8%(图 2, 3), 两组统计学均无显著差异 ( $P=0.67$  和  $P=0.95$ , 95%可信区间)。**结论** CD25 单抗组与 ATG 组在无关供者造血干细胞移植对急性 GVHD 的发生率和严重程度以及移植后复发率疗效上无差异。但 CD25 组副作用小, 费用较 ATG 低, 为无关供者造血干细胞移植提供一个可选择的途径。



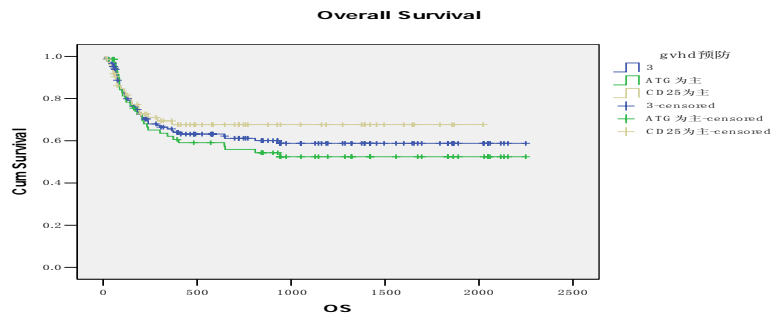


图 1

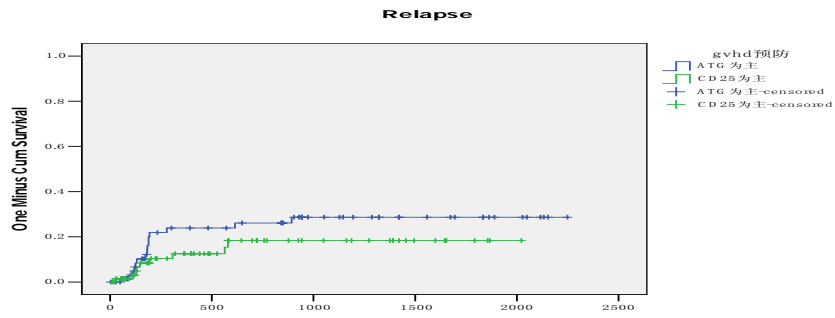


图 2

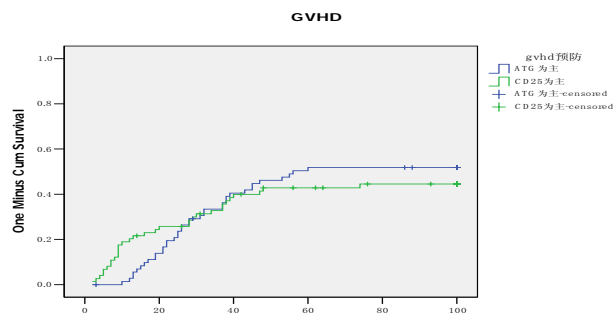


图 3

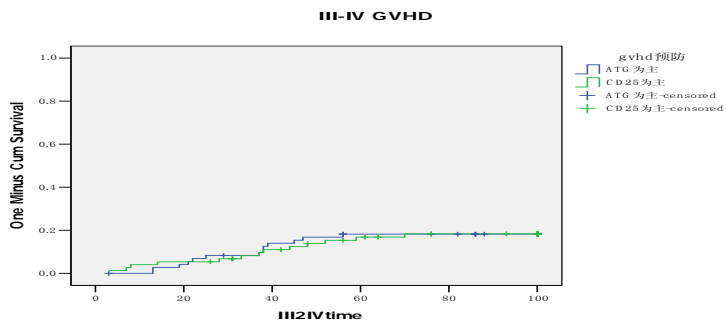


图 4

2-30

## 非血缘异基因造血干细胞移植 91 例分析

王静波 吴彤 曹星玉 殷宇明 赵艳丽 张建平 罗荣壮 孙媛 周葭蕤 刘强  
扬帆 卢岳 高燕群 孙瑞娟 刘芳 费新红 达万明 纪树荃 陆道培  
北京市道培医院造血干细胞移植科 (100049)

**摘要:** **目的** 研究 91 例非血缘造血干细胞移植患者临床疗效。**方法** 84 例患者预处理方案为改良 Bu/Cy/ATG, 3 例患者预处理方案为 TBI/CTX/ATG。采用 Bu/Flu/ATG 和 TBI/Cy/Flu/ATG 方案预处理各 2 例。GVHD 预防为环孢素 A/短程甲氨喋呤/骁悉。**结果** 48 例患者发生急性 GVHD, 其中, II~IV 度 GVHD 为 22 例。通过 Kaplan-Meier 曲线分析 II~IV 度累积发生率为 35.4%, III~IV 度累积发生率为 13.4%。25 例发生慢性 GVHD, 其中广泛型 19 例, 局限型 6 例。慢性 GVHD 的累积发生率为 36.2%。65 例(71.43%)患者发生 CMV 血症, 11 例(12.09%)发生 EBV 血症, 34 例(37.36%)发生出血性膀胱炎, 26 例(28.57%)发生真菌感染, 51 例(56.04%)发生细菌感染。中位随访时间为 14.5 (2~51) 个月, 13 例(14.29%)患者复发, 其中血液学复发 7 例。死亡 15 例(16.48%), Kaplan-meier 生存曲线分析: 标危组 1 年预期总生存率(OS)及无病生存率(DFS)均为  $87.23 \pm 4.87\%$ , 高危组 1 年预期总生存率(OS)及无病生存率(LFS)分别为  $75.41 \pm 7.50\%$  和  $75.26 \pm 7.78\%$ 。**结论** 非血缘造血干细胞移植是治疗血液系统疾病的有效手段。细真菌及病毒感染的预防及治疗应进一步完善。

## Clinical study of 91 patients for unrelated donor hematopoietic cell transplantation

WANG Jing-bo WU Tong CAO Xing-yu YIN Yu-ming ZHAO Yan-li ZHANG Jian-ping  
LUO Rong-mu SUN Yuan ZHOU Jia-rui LIU Qiang YANG Fan LU Yue GAO Yan-qun  
SUN Rui-juan LIU Fang FEI Xin-hong DA Wan-ming JI Shu-quan LU Dao-pei

Department of hematopoietic stem cell transplantation, Beijing Daopei Hospital, Beijing 100049, China.

**Objective** To observe the efficacy of 91 patients for unrelated donor hematopoietic cell transplantation.

**Methods** 84 patients received the conditioning regimen consisted of modified Bu/Cy, and 3 patients received modified total body irradiation (TBI) plus CY, and 2 received fludarabin plus Busulfan, and 2 received TBI/Cy/fludarabin. Antithymocyte globulin (ATG) was administered in all patients. GVHD prophylaxis consisted of cyclosporine A (CsA), mycophenolate mofetil (MMF) and short course methotrexate (MTX). **Results** Acute GVHD occurred in 48 patients, and grade II~IV occurred in 22 patients. The probabilities of grades 2~4 acute GVHD and grades 3-4 GVHD were 35.4% and 13.4%, respectively. chronic GVHD was observed in 25 patients and extensive chronic GVHD occurred in 19

patients . The probabilities of chronic GVHD was 36.2%. cytomegalovirus (CMV) infection was observed in 65 patients (71.43%) . Epstein-Barr virus (EBV) infection was observed in 11 patients (12.09%) . hemorrhagic cystitis was observed in 34 patients (37.36%) . fungous infection occurred in 26 patients (28.57%) and bacterial infection in 51 patients (56.04%) . The median follow-up duration was 14.5 (2~51) months. Relapse occurred in 13 patients and 15 patients died of infection , relapse and aGVHD. The one year probabilities of overall survival and disease-free-survival (DFS) were both (87.23±4.87) % in standard risk group. The one year probabilities of overall survival and disease-free-survival (DFS) were (75.41±7.50) % and (75.26±7.78) % respectively in high risk group. **Conclusion** unrelated donor hematopoietic cell transplantation is a effective treatment for hematologic malignancies. prophylaxis and treatment of Infection including bacteria, fungi and virus should be improved

### 研究目的

分析 91 例非血缘造血干细胞移植患者总存活率 (OS), 无病存活率 (LFS), 移植物抗宿主病 (GVHD) 发生率, 感染发生率, 以及复发率。试图发现影响非血缘造血干细胞移植患者长期存活, 移植后复发以及相关合并症的相关因素, 以便减少移植后相关合并症及复发的发生率, 增加移植后长期存活率。

### 研究方法

**一般资料:** 2003 年 12 月 27 日~2008 年 2 月 26 日在北京市道培医院完成 91 例非血缘造血干细胞移植, 其中, 男 62 例, 女 29 例, 患者年龄 3 岁~46 岁, 中位年龄 28 岁, 供者年龄 20-50 岁, 中位年龄 29 岁。急性髓系白血病 (AML) 27 例, 急性淋巴细胞白血病 (ALL) 30 例 (含 3 例 Ph<sup>+</sup>ALL), 慢性髓系白血病 (CML) 26 例, 重型再生障碍性贫血 (SAA) 2 例, 骨髓增生异常综合症 (MDS) 3 例, 再生障碍性贫血-阵发性血红蛋白尿综合症 (AA-PNH) 2 例, 非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 1 例。标危患者 47 例, 高危患者 44 例。

**标危患者诊断标准:** AML (CR1), ALL (CR1), MDS (RA, RAS, RCMD), CML (CP1), SAA, AA-PNH。

**高危患者诊断标准:** 慢性髓细胞白血病 (AP), 慢性髓细胞白血病急变期经治疗转入加速或慢性期。急性白血病第二次以上缓解, Ph<sup>+</sup>急性淋巴细胞白血病 (CR), 骨髓增生异常综合症 (RAEB), 急性混合性白血病, 非霍奇金淋巴瘤, 急性白血病伴有染色体复杂异常。

**供者来源:** 中华骨髓库 60 例, 中国台湾慈济骨髓库 31 例。供受者性别相同 62 例, 性别不同 29 例, 其中, 男供女 18 例, 女供男 11 例。供受者血型相同 31 例, 血型不同 60 例。HLA 配型采用 PCR-SSP 标准试剂盒, HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 完全相合 31 例 (34.1%), 1 个位点不相合 26 例 (28.6%), 2 个位点不相合 25 例 (27.5%) 3 个位点不相合 7 例 (7.7%), 4 个位点不相合 2 例 (2.2%)。

**预处理:** 改良 Bu/Cy/ATG 84 例, TBI/CTX/ATG 3 例, Bu/Flu/ATG 2 例, TBI/Cy/Flu/ATG 2 例。

**GVHD 预防:** 环孢素 A/短程甲氨喋呤/骁悉。

**移植方式:** 外周血干细胞移植 89 例, 骨髓移植 2 例。

**植活标准:** 外周血白细胞连续 3 天超过  $1 \times 10^9/L$  为白细胞植活。在未输血小板的情况下, 血小板连续 7 天超过  $20 \times 10^9/L$  为血小板植活。

**统计学处理:** 计量资料用  $t$  检验, GVHD 的累计发生率和生存率采用 Kaplan-meier 曲线分析, 生存率的比较进行 Log rank 检验。用 COX 回归模型分析影响 GVHD 及生存率的相关因素。多项 Logistic 回归模型分析感染相关因素。应用 SPSS 10.0 统计学软件进行分析。

## 结 果

**植活情况:** 输入单个核细胞中位数为  $6.12 \times 10^8/kg$  ( $2.40 \sim 10.00 \times 10^8/kg$ ), 输入 CD34 阳性细胞中位数为  $4.04 \times 10^6/kg$  ( $0.36 \sim 11.57 \times 10^6/kg$ ), 输入 CD3 阳性细胞中位数为  $1.89 \times 10^8/kg$  ( $0.61 \sim 4.75 \times 10^8/kg$ )。89 例患者稳定植活, 2 例患者分别于移植后 2 天和移植后 17 天于造血重建前因感染死亡。白细胞植活中位时间为 12 天 (9 天~29 天), 血小板植活中位时间为 14 天 (9 天~85 天)。

**GVHD 发生情况:** 48 例患者发生急性 GVHD, 其中, II~IV 度 GVHD 为 22 例 (II 度 15 例, III 度 4 例, IV 度 3 例)。通过 Kaplan-Meier 曲线分析 II~IV 度累积发生率为 35.4%, III~IV 度累积发生率为 13.4%。82 例可评估的病例中 25 例发生慢性 GVHD, 其中广泛型 19 例, 局限型 6 例。慢性 GVHD 的累积发生率为 36.2%。COX 回归模型分析 II~IV 度急性 GVHD 的高危因素包括输注 CD3<sup>+</sup>细胞数 ( $P=0.001$ ), 含 TBI 预处理方案 ( $P=0.025$ ), 年龄 ( $P=0.025$ )。

**感染发生情况:** 65 例 (71.43%) 发生 CMV 血症, 其中, 1 例发生 CMV 病。11 例 (12.09%) 发生 EBV 血症, 其中 3 例发生 EBV 病, 34 例 (37.36%) 发生病毒性出血性膀胱炎, 26 例 (28.57%) 发生真菌感染。51 例 (56.04%) 发生细菌感染。多项 Logistic 回归模型分析 CMV 感染的高危因素包括: HLA 配型不全相合 ( $P=0.091$ ), 高危患者 ( $P=0.000$ )。

**复发率和生存率:** 中位随访时间为 14.5 个月 (2~51 个月), 13 例 (14.29%) 患者复发, 其中血液学复发 7 例 (3 例经供者淋巴细胞输注达到再次缓解)。髓外复发 5 例, 遗传学复发 1 例。截至 2008 年 4 月 30 日, 死亡 15 例 (16.48%), 其中, 标危患者死亡 6 例, 高危患者死亡 9 例。早期死亡 9 例。死亡原因分析: 7 例死于细菌真菌感染, 4 例死于血液学复发, 3 例死于病毒感染, 1 例死于急性重度 GVHD。Kaplan-meier 生存曲线分析: 标危组 1 年预期总生存率及无病生存率均为  $87.23 \pm 4.87\%$ , 高危组 1 年预期总生存率 (OS) 及无病生存率 (LFS) 分别为  $75.41 \pm 7.50\%$  和  $75.26 \pm 7.78\%$ 。高危组和标危组 1 年预期总生存率及无病生存率通过 Log rank 检验均无显著性差异 ( $P>0.2$ )。COX 回归模型分析提示有无真菌感染是影响 1 年预期总生存率 (OS) 的高危因素 (OS 61.70% vs OS 89.90%,  $P=0.005$ )。

## 结 论

非血缘造血干细胞移植是治疗血液系统疾病的有效手段。真菌及病毒感染的预防及治疗应进一步完善。

## 正常供者外周血造血干细胞动员影响因素的分析

张炜仪 陈 虎 宋一雪 江 岷 胡亮钉 李博涛 李淤航 俞志勇

中国人民解放军 307 医院移植中心 (100071)

### 前 言

外周血造血干细胞移植 (PBSCT) 已成为治疗恶性血液系统肿瘤、恶性实体瘤等疾病的有效手段, 这与外周血造血干/祖细胞移植术简便易行、造血重建速度快有关<sup>[1]</sup>。在正常情况下, 人体外周血中仅含极少量的造血干细胞, 动员和采集到足够的、优质的外周血干细胞是保证移植后造血及免疫功能重建的重要因素。外周血造血干细胞移植根据供、受者亲缘关系主要分为: 自体移植、同胞供者移植和无关供者移植<sup>[2]</sup>。自体移植的适应症有限, 而且受患者自身条件限制, 越来越多的患者需进行异基因造血干细胞移植 (Allo-PBSCT)。本实验回顾性分析我科十年间正常供者外周血干细胞动员效果与可能的影响因素的关系, 主要观测分析性别、年龄、动员剂的种类以及动员天数对动员效果的影响, 为临床上动员方案和供者的选择提供参考。

### 第一部分 实验内容

#### 一、病历调研

1. 时间: 1996 年 1 月~2007 年 6 月

2. 入选条件: 在我科 (解放军三零七医院移植科) 行异基因外周血造血干细胞移植患者的供者及我科收住的中华骨髓库无关供者, 除外行“骨髓移植”、“骨髓+外周血”移植患者的供者和二次移植的供者。

#### 二、采集数据

1. 供者的一般情况: 姓名、性别、年龄、体重;

2. 动员方法: 动员剂、动员天数;

3. 采集次数、每次采集的 MNC 数量、CD34<sup>+</sup>细胞数量。

由于病历时间跨度比较大, 在单因素分析时仅选用数据完整的资料, 尽量确保统计结果的可信度。

#### 三、样本描述

查阅 1996 年 1 月~2007 年 6 月间在我科进行造血干细胞移植的供、受者病历近 700 份, 筛选符合实验条件的供者共 251 名, 剔除主要数据缺失者 2 名, 共 249 名。

1. 性别。筛选出的 251 名供者中, 男性 136 名, 占 57.4%, 女性 101 名, 占 42.6%。

2. 年龄。供者平均年龄 34 岁 (最小年龄 12 岁, 最大年龄 64 岁)。由于临床上经验性选择多名供者中年龄较小的男性, 所以所查得的样本不完全符合统计学上随机性的原则, 利用散点图 (图 1) 分析相应年龄对应的 MNC、CD34<sup>+</sup>细胞采集值, 通过一次、二次曲线的交点作为分组的临界点

预测分析，尽量使所得数据能代表随机状态，并提高组内相似性和组间可比性，将供者按年龄划分为三个组：25 岁以下组、25~45 岁组和 45 岁以上组。

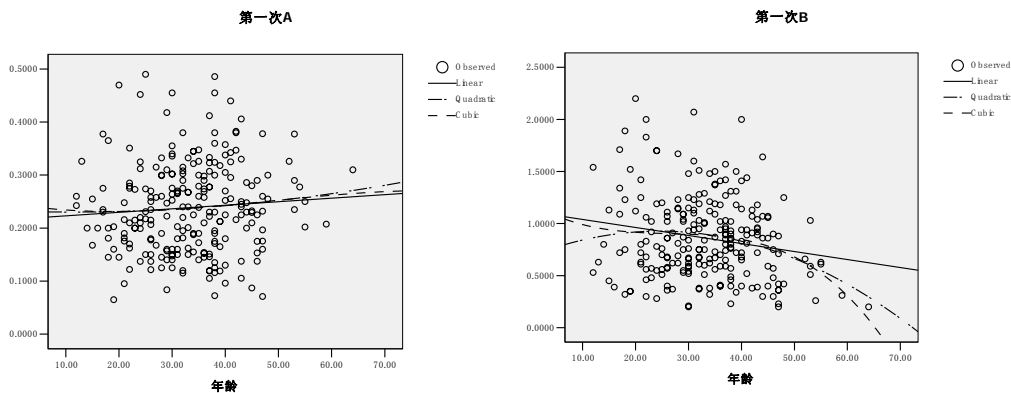


图 1

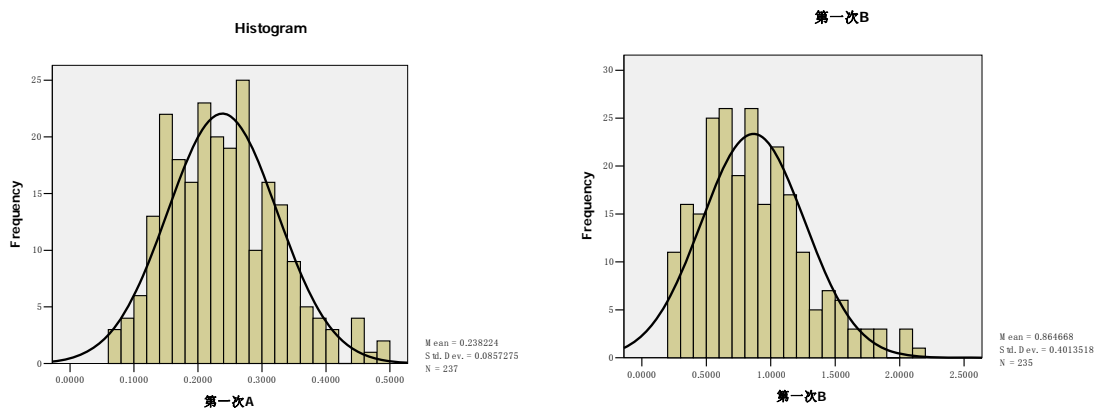
(注：左图为第一次 MNC 采集情况，右图为第一次 CD34<sup>+</sup>细胞采集情况)

**3. 动员剂。**动员剂主要有两种：单独使用 G-CSF（粒细胞集落刺激因子）和联合使用 G-CSF 和 GM-CSF（粒-巨噬细胞集落刺激因子）。G-CSF 剂量为 5 μg/kg 2 次/d，联合使用 G-CSF 和 GM-CSF 者，G-CSF 和 GM-CSF 剂量均为 2.5 μg/kg 2 次/d。其中，使用动员剂 G-CSF 的占大多数，为 92.7%，同时使用 G-CSF 和 GM-CSF 的只有 7.3%。

**4. 采集天数。**有效数据 175 个，缺失 62 个。其中 2 人于用药第 3 天采集，其余在第四天或第五天采集。文献报道，在与本研究相同的动员剂剂量下 CD34<sup>+</sup>高峰多出现在动员第 4~5 天<sup>[3]</sup>。故本研究除外 2 人于用药第 3 天采集者，将余样本按采集时间分为两组：动员第四天开始采集的 58%，动员第五天开始采集的占 42%。

**四、实验结果。**各影响因素与 MNC（单个核细胞）数量和 CD34<sup>+</sup>细胞数量的关系。

**1. 通过 SPSS 的正态概率分布图的绘制得知，MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞在三次采集中的值都符合正态分布（图 2）。并且随着采集次数的增加，二者采集值均呈递减趋势（图 3）。CD34<sup>+</sup>细胞数量的平均值下降速度快于 MNC。**



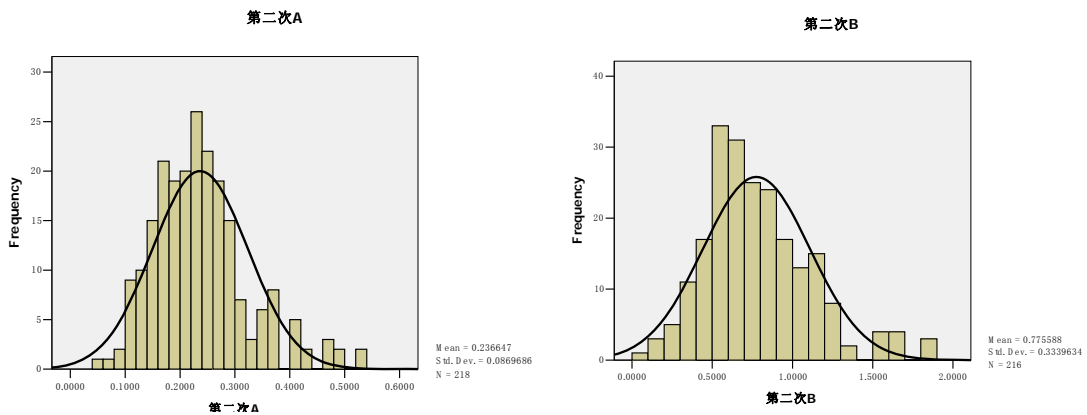


图 2

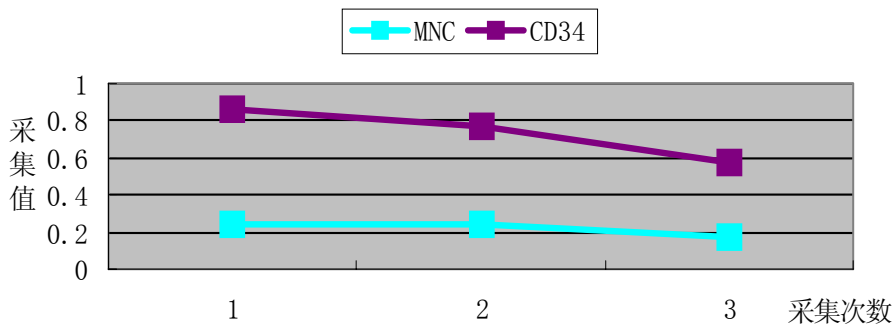


图 3 各次采集均值比较

2. 用独立样本 t 检验，观察总体性别的差异，如图 4 所示，男性 MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞的第一次采集值都显著高于女性 ( $P_1=0.021<0.05$ ,  $P_2=0.32<0.05$ )；CD34<sup>+</sup>细胞第二次采集值极其显著高于女性 ( $P=0.009<0.01$ )。在干细胞计数时，我们通常以 CD34<sup>+</sup>作为主要的表面标志<sup>[4]</sup>，所以我们可以认为男性整体的 MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞采集值高于女性整体。

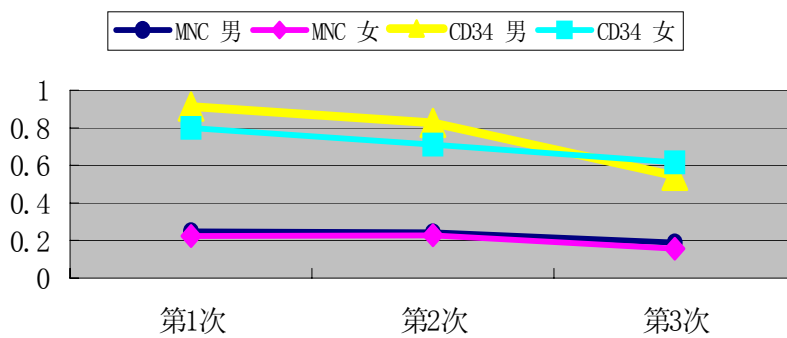


图 4 不同性别供者的采集值差异

3. 按年龄将供者分为三个组：25 岁以下组、25 岁~45 岁组、45 岁以上组，分别进行分析（独立样本 t 检验）：

(1) 第一年龄组：25 岁以下

MNC 数量：女性更为稳定，除在第一次采集时低于男性供者外，后面两次均高于男性；

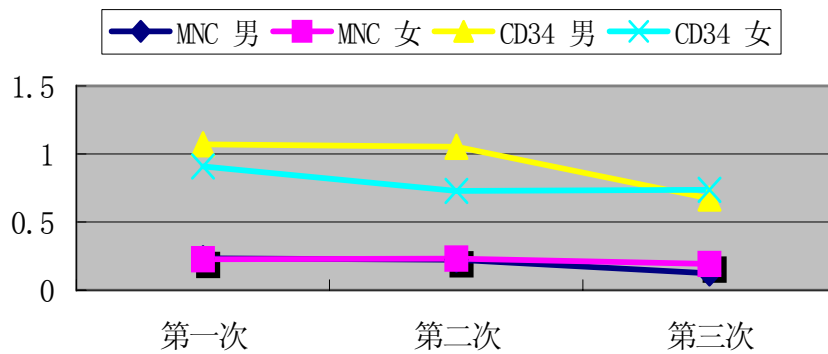


图 5 25 岁以下供者不同性别三次采集值差异

CD34<sup>+</sup>细胞数量：前两次采集值男性高于女性，第三次低于女性。男性第一次到第二次采集值的降低幅度非常小，而女性的降幅较大；男性从第二次到第三次采集值降幅大于女性（实际上女性采集值略微增长了 0.01），以至于第三次采集值女性高于男性。经检验，第二次采集 CD34<sup>+</sup>细胞数量男性显著高于女性（ $P=0.011$ ），其余差异皆不显著。

(2) 第二年龄组：25 岁至 45 岁

MNC 数量：该组男性三次采集值均高于女性。其中第一次和第三次均达到显著性水平（ $P$  值分别为 0.016 和 0.027）；

CD34<sup>+</sup>细胞数量：该组男性前两次采集值高于女性，且达到显著性水平（ $P$  值分别为 0.007 和 0.031）。第三次采集值男性略低于女性，差异不显著。（图 6）

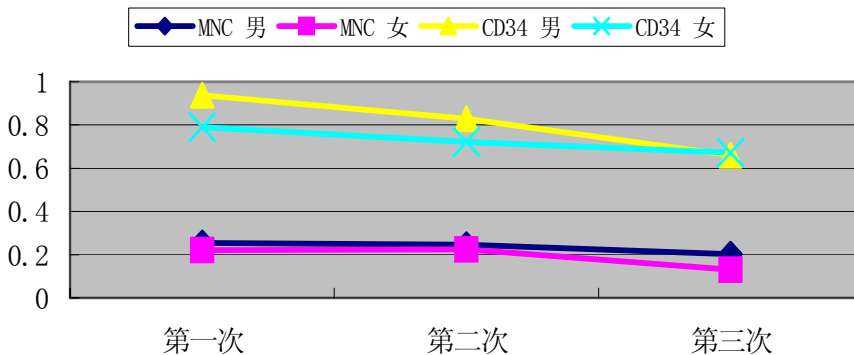


图 6 25 岁至 45 岁供者不同性别三次采集值差异

(3) 第三年龄组：45 岁以上

MNC 数量：男性和女性供者的差异很微小，几乎可以忽略不计。男性前两次采集值均略高于女性，最后一次略低于女性。差异均不显著。

CD34<sup>+</sup>细胞数量：男性三次采集值均高于女性，但差异不显著。（图 7）



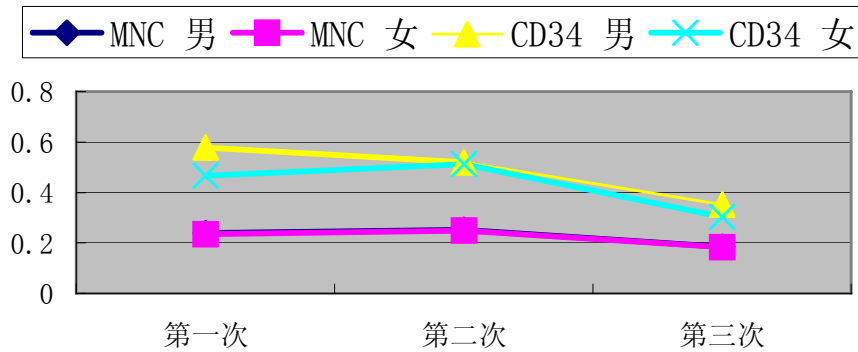


图7 45岁以上供者不同性别三次采集值差异

通过对各年龄组分别分析，我们发现各年龄组均呈现男性 CD34<sup>+</sup>细胞采集值降幅大，女性降幅小且略有升高的趋势。而女性 CD34<sup>+</sup>细胞降幅小且略有上升的原因可能为：①女性 CD34<sup>+</sup>细胞峰值出现晚；②激素协同动员剂效应，增强动员剂的作用效果；③在激素和动员剂的协同效应下，CD34<sup>+</sup>细胞出现了向阳性转化。

**4. 将所有供者忽略性别，按三个年龄组划分的年龄段进行比较。**

第一组：25岁以下

第二组：25岁~45岁

第三组：45岁以上

方差分析结果：

第一次 MNC：第二组 > 第三组 > 第一组，差异不显著

第二次 MNC：第三组 > 第二组 > 第一组，差异不显著

第三次 MNC：第三组 > 第二组 > 第一组，差异不显著

第一次 CD34<sup>+</sup>细胞：第一组 > 第二组 > 第三组，差异极其显著 (P=0.000)

第二次 CD34<sup>+</sup>细胞：第一组 > 第二组 > 第三组，差异极其显著 (P=0.000)

第三次 CD34<sup>+</sup>细胞：第一组 > 第二组 > 第三组，差异极其显著 (P=0.005)

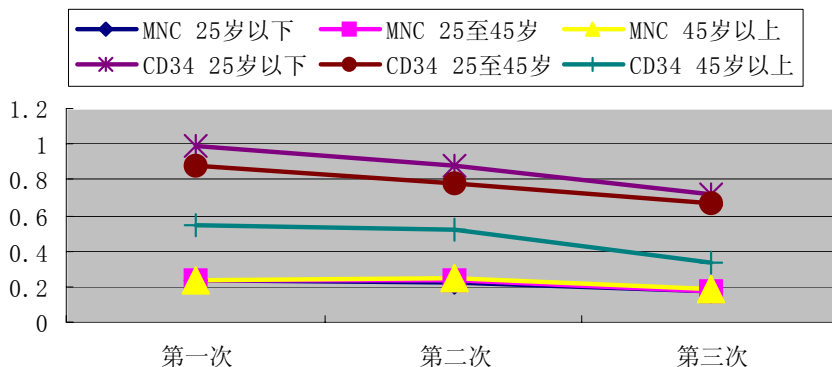


图8 不同年龄组供者采集值差异 (以次数为横坐标)

5. 使用不同的动员剂，MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞采集值的差异。

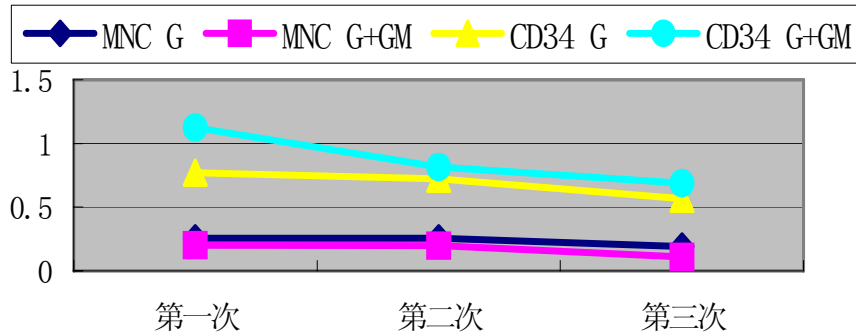


图 9 动员剂不同采集值的差异

由图 9 可见，使用 G-CSF 的供者的三次 MNC 采集值均高于联合使用 G-CSF +GM-CSF 的供者，CD34<sup>+</sup>细胞采集结果则相反，联合使用 G-CSF+GM-CSF 的供者的三次采集值均高于使用 G-CSF。其中，第一、二次 MNC 和第一次 CD34<sup>+</sup>细胞出现了显著性差异，即：使用 G-CSF 的供者第一、二次 MNC 值显著高于使用 G-CSF +GM-CSF 者 ( $P=0.023<0.05$ 、 $P=0.043<0.05$ )，使用 G-CSF +GM-CSF 的供者的第一次 CD34<sup>+</sup>细胞值极其显著高于使用 G-CSF 者 ( $P=0.001<0.01$ )。

6. 动员天数不同的供者 MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞采集值的差异。

由图 10 可见，在动员 4 天采集的供者除第一次 MNC 值略低于动员 5 天进行采集的供者外，后两次采集值皆高于动员 5 天进行采集的供者。而 CD34<sup>+</sup>细胞，动员第 4 天开始采集的供者只有第二次采集值高于动员第 5 天开始采集的供者，第一次和第三次采集值皆低于动员第 5 天开始采集的供者。

经检验，两组供者群体第一次 CD34<sup>+</sup>细胞采集值存在着显著差异，即动员第 5 天进行采集的供者的第一次 CD34<sup>+</sup>细胞值显著高于动员第 4 天进行采集的供者 ( $P=0.02<0.05$ )。

7. 性别、年龄及其交互作用对 MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞的影响

对性别和年龄两个自变量进行对照编码，使之合并为一个变量，各编码变量正交，进行回归分析，得出以下结论：

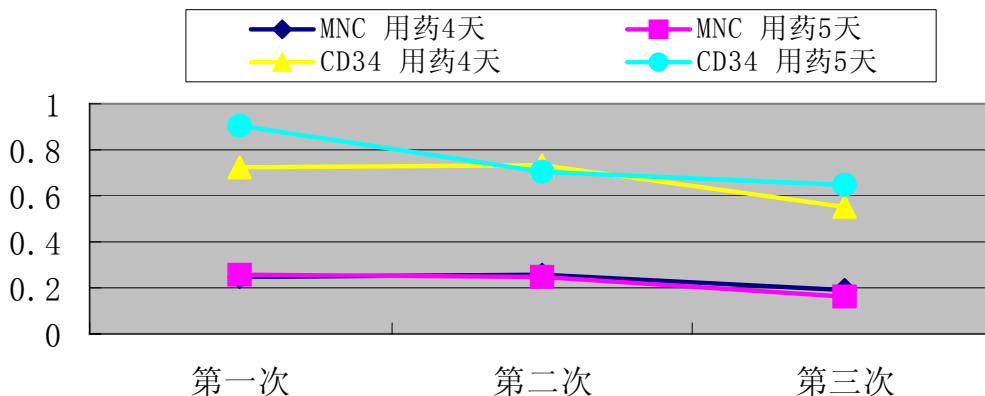


图 10 动员天数不同的采集值差异

第一次 MNC 值：五个编码变量的预测效应皆不显著，但仍可从系数得出一些结论：

(1) 第一次 MNC 值并非随年龄的增长而降低, 正好与之相反, 随着年龄的增长还略有上升的趋势。

(2) 处于中间年龄段, 即 25 至 45 岁的供者的采集平均值并不低于 25 岁以下和 45 岁以上的供者 (可能为高于或相等)。

(3) 男性供者第一次 MNC 值高于女性。

第一次 CD34<sup>+</sup>细胞值: 年龄的线性趋势显著: 随着年龄的增长, 第一次 CD34<sup>+</sup>细胞采集值呈现递减的趋势; 此外, 性别差异显著: 男性高于女性。年龄与采集值的二次关系不显著, 性别与年龄的交互作用不显著。

## 第二部分 结论与讨论

### 一、结论

1. 随着采集次数增加, MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞的采集值均递减, 其中 CD34<sup>+</sup>细胞数量的减幅大于 MNC。

2. 第一次采集时, MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞的数量均为男性 > 女性, 有显著性差异; 第二次采集时, CD34<sup>+</sup>细胞数量男性极其显著高于女性。

3. 三次采集中, MNC 数量三个年龄组无显著性差异。CD34<sup>+</sup>细胞数量, 不仅年龄组之间的差异大, 每次采集值的差异也较大。在三次采集中都体现了年龄小采集值高, 年龄大采集值低的特点。

4. 各年龄组均呈现男性 CD34<sup>+</sup>细胞数量降幅大, 女性降幅小且略呈升高趋势。

5. 动员剂 G-CSF 对 MNC 作用更显著, G-CSF 和 GM-CSF 联合使用对 CD34<sup>+</sup>细胞作用更显著。

6. MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞都表现出动员 5 天开始采集的值高于第 4 天开始者, 其中 CD34<sup>+</sup>细胞差异显著。

7. 同时考虑性别、年龄及其交互作用对 MNC 和 CD34<sup>+</sup>细胞采集值的影响进行分析时, MNC 数量: 年龄、性别差异不显著; CD34<sup>+</sup>细胞数量: 第一次采集值随年龄增长递减, 男性显著高于女性。

### 二、讨论

基于以上实验结果, 我们可以考虑采取以下方法在临床上合理选择供者, 以及选择合适的动员方案:

1. 在多名供者中首选青年男性;

2. 根据性别调整采集方案:

(1) 改变采集时间: 男性仍在动员第五天采集 (一般在上午), 女性可以在第五天下午或者第六天采集。

(2) 改变采集量: 采集时间不变, 每次采集的干细胞悬液量调整, 女性可总量不变, 逐次递增。

3. 在国外文献报道 G-CSF 和 GM-CSF 联合使用, 各 10 $\mu$ g/kg·d, 动员效果明显提高且供者无明显副作用<sup>[5]</sup>。刺激因子 GM-CSF 在祖细胞分化过程中作用位点多<sup>[6]</sup>, 但是副作用大<sup>[7]</sup>, 我们可以在 G-CSF 和 GM-CSF 联合使用时缩短其用药时间; G-CSF 相对副作用小<sup>[7]</sup>, 国外文献报道单独使

用其最长用药 13 天, CD34<sup>+</sup>细胞出现两次峰值, 分别在第 5 天和第 10~13 天<sup>[8]</sup>, 我们可以联合使用 G-CSF 和 GM-CSF, 合理控制二者药量和用药时间, 使动员效果达到最佳, 并尽可能减少副作用。

4. 联合使用其他动员剂, 以提高动员效果。

#### 参考文献

- [1] Watanabe T, et al. *Exp Hematol*, 1998, 26: 10
- [2] 曹履先等, 《临床骨髓移植》军事医学科学出版社 1997, 7
- [3] Stroncek D, Anderlini P. Mobilized PBPC concentrates: a maturing blood component, *Transfusion*, 2001; 41: 168-171
- [4] 唐佩弦, 造血及其调控, 见张之南、杨天楹、郝玉书主编《血液病学》, 人民卫生出版社, 32-52
- [5] A. Bashey; S. Corringham; E. Gilpin; et al. *Cytotherapy*, Volume 2, Issue 3 March 2000, pages 195 - 200
- [6] Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony stimulating factor and granulocyte macrophage colony stimulation factor (2). *N Engl J Med*, 1992, 327 (2): 99-106
- [7] Goodman GA, Ball TW, Nies AS, et al. *The pharmacological Basis Therapeutics*, 1997. 1317
- [8] Bi-phasic CD34<sup>+</sup> cell Mobilization of a Syngenic Donor During Prolonged G-CSF Delivery, *Cytotherapy*, volume 1, Issue 2, 1999, Pages 119-122

## 2-32

### 无关供者异基因造血干细胞移植治疗恶性血液疾病

#### Unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation for hematologic malignancies

GAO Chun-Ji, DA Wan-Ming, LI Hong-Hua, ZHANG Bo-Long, WU Xiao-Xiong, HAN Xiao-Ping, JING Yu, ZHANG Yi-Zhuo, BO Jian, ZHU Hai-Yan, JIN Hai-Jie, WANG Quan-Xun, LI Su-Xia, HUANG Wen-Rong, Yu Li

*Department of Hematology, PLA General Hospital, Beijing 100853, China*

**Objective** To explore feasibility and efficacy of unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation (UD-PBSCT) in treatment of hematologic malignancies. **Methods** Thirty patients with hematologic malignancies underwent high resolution DNA based typing HLA-matched or 1 locus mismatched UD-PBSCT from Oct. 2002 to Dec. 2006. Busulfan, cyclophosphamide, Ara-C, MeCCNU and antithymocyte globulin (ATG) were used for preparative regimen in 25 cases, while TBI, cyclophosphamide and ATG were used in 2 cases, and fludarabine, busulfan and ATG was used in one case. All patients received mycophenolate mofetile, cyclosporin A and short-term methotrexate with or

without CD25 antibody as the graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis. **Results** The results showed that rapid engraftment was observed in all cases who presented full donor chimerism at 28 days post transplantation by STR-PCR. The median time of neutrophil recovery  $>0.5 \times 10^9/L$ , platelet recovery  $>20 \times 10^9/L$  was observed at 15, 16 days respectively post transplantation. The incidence of acute GVHD was 20% (6/30 cases, 3 cases with grade I, 2 cases with grade III, 1 case with grade VI). The incidence of chronic GVHD was 33%. Disease free survival of 3 years is 78% in good prognostic group. **Conclusion** It is concluded that above-mentioned conditioning and GVHD prophylaxis are effective approaches for unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation in treatment of hematopoietic malignancies.

## 2-33

### 异基因造血干细胞移植早期供者来源的 NK 细胞 KIR 受体表达情况与移植预后的关系

鲍晓晶 何 军 陈子兴 吴德沛 孙爱宁 袁晓妮 邱桥成 岑建农 姚 利  
苏州大学附属第一医院 江苏省血液研究所 (215006)

**摘要:** **目的** 研究体外去除 T 细胞的异基因造血干细胞移植 (HSCT) 中供者来源不同活化型 KIR 受体对移植预后的影响, 以及移植早期 NK 细胞重建和供者来源 NK 细胞 KIR 受体表达水平与 aGVHD 发生和 GVL 效应的关系。 **方法** 采用序列特异性引物聚合酶链反应 (PCR-SSP)、序列特异性寡核苷酸探针 (PCR-SSOP) 和流式细胞术 (FCM), 对中国造血干细胞捐献者资料库中提供的 75 对 HLA 全相合供、受者进行 KIR 及 HLA 高分辨分型, 其中 37 例进行了异基因造血干细胞移植, 接受移植的患者 FAB 分型为 ALL18 例、CML9 例、AML10 例; 对 2005 年~2007 年在苏州大学附属第一医院接受移植的 10 例存活患者进行随访, 用四色荧光标记的流式细胞术分别在移植后 30d、60d、90d 检测供者来源的 NK 细胞表面不同 CD158 分子的表达水平。 **结果** 当供者有 1~2 个 aKIR 时, ALL 患者的生存率较差; 而对于 AML/CML 患者来说, 供者有 3 个以上不同的 aKIR 却是预后的有利因素。KIR2DS4 表达于 91.0% 的个体, 其中 51.4% 仅表达 2DS4\*001/002, 23.6% 仅表达 2DS4\*003-007, 25.0% 为两组 2DS4 亚型同时表达; 当供者和受者 KIR2DS4 亚型相同, 都仅有 2DS4\*001/002 时移植预后很差, 而当供者具有 2DS4\*003-007 时预后较好。移植早期 II-IV 度 GVHD 组无 HLA 配体的异源活性 iKIR 表达呈高表达、有配体的 iKIR 表达呈下降趋势, 而无 GVHD 组则情况相反。 **结论** 供者 aKIR 数目不同在移植中的作用与疾病类型有关。KIR2DS4\*003-007 可能是 A 单体型中发挥异源活性的主要 aKIR, 供者具有该亚型有利于移植预后。移植早期有 HLA 配体的 iKIR 较高表达有利于降低 GVHD, 异源活性 iKIR 过高表达则会增加 aGVHD 发生的风险。早期供者来源的 NK 细胞 KIR 受体表达情况在 HSCT 中有着重要的作用, 监测表达水平的变化可以更好地提示造血干细胞移植的预后。

**关键词:** 异基因造血干细胞移植; 杀伤细胞免疫球蛋白样受体; 自然杀伤细胞; CD158 分子

## Study on the expression of donor origin KIRs on NK cells after allo-HSCT and its effect on clinical outcome

*Bao Xiaojing, He Jun, Chen Zixing, Wu Dipei, Sun anning, Yuan Xiaoni, Qiou Qiaochen, Yao Li, Cen Jiannong (Jiangsu Institute of Hematology, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006 China)*

**Abstract: Objective** To explore the effect of different activating KIRs expressed on donors and the reconstitution of NK cells and killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) at the early stage after T cells depleted (TCD) allo-hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) on clinical outcome.

**Methods** HLA /KIR genotype of 75 patients and their respective matched unrelated donors from Database of CMDP was determined by polymerase chain reaction sequence oligonucleotide probes (PCR-SSOP) and sequence specific primers (PCR-SSP). 37 cases received TCD allo-HSCT afterwards (ALL 18; CML 9; AML 10), Meanwhile, the expression of KIRs (CD158a, CD158b, CD158e) on NK cells from 10 patients after TCD HSCT were measured by flow cytometry on day 30, 60 and 90.

**Results** The cumulative risk of mortality was higher after transplants from a donor with one or two activating KIRs in ALL. But for AML/CML, the overall survival was better if the donor had three or more activating KIRs. The frequency of KIR2DS4 expression was 91.0%, 51.4% exhibited 2DS4\*001/002 only while that for 2DS4\*003-007 was 23.6%. 25.0% expressed both. Transplantation with 2DS4\*003-007 on donor has a better outcome. For patients with II-IV aGVHD, the expression of iKIR without HLA ligand was increased gradually while the one that has HLA ligand was decreased. The case is opposite in patients without aGVHD during the same period. **Conclusion** The role of the number of aKIRs in donor is different to the overall survival after transplantation upon the disease. KIR 2DS4\*003-007 may lead to the allo-reactivity of NK cells in haplotype A. The extremely high expression of iKIR without HLA ligand at the early stage after HSCT was positively correlated with increased aGVHD occurrence. The clinical outcome may be predicted by determining the reconstitution of NK cells and CD158 molecules after HSCT.

**Key words:** allo-hematopoietic stem cell transplantation; nature killer cell ; immunoglobulin-like receptor; CD158 molecule

2-34

## 异基因造血干细胞移植 25 例分析

王景文 宁 丰 崔 晶 杨 磊 栗 宇 崔晓丽 李 鑫 刘复强 赵相印  
首都医科大学附属北京同仁医院血液内科 (100730)

**摘要:** **目的** 探讨 25 例血液病患者进行异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 的效果。**方法** 急性白血病 (AL) 患者 14 例, 慢性粒细胞白血病 (CML) 患者 9 例, 其他血液病患者 2 例, 经预处理治疗后, 进行异基因骨髓移植 (allo-BMT) 或异基因外周血干细胞移植 (allo-PBSCT)。**结果** 所有患者达到完全稳定的供者植入。II~IV 度急性 GVHD (aGVHD) 累积发生率为 36% (9/25), 复发率 16% (4/25)。共死亡 8 例, 总生存率为 68% (17/25)。**结论** 提高 allo-HSCT 疗效的关键是控制 aGVHD 的发生和减少疾病复发。

**关键词:** 造血干细胞移植; 移植物抗宿主病; 复发

## Analysis of 25 cases received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

NING Feng, WANG Jing-wen, CUI Jing, YANG Lei, LIU Fu-qiang, ZHAO Xiang-yin.  
Department of Hematology, Beijing Tong Ren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China.

**Abstract: Objective** The outcomes of 25 patients with hematological diseases (14 cases of acute leukemia, 9 chronic myeloid leukemia, and one each myelodysplastic syndrome and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) undergoing HLA-identical sibling ( $n=21$ ) or related HLA-mismatched ( $n=4$ ) hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) were observed. **Methods** Patients received BuCy2 or TBI plus CTX in HLA-identical sibling HSCT or BuCy2+ATG in mismatched HSCT as conditioning regimens, followed by unmanipulated marrow and/or peripheral blood transplantation. **Results** All patients achieved full engraftment. The cumulative incidences of grades II to IV acute graft-versus-host disease (aGVHD) were 36% (9/25). The incidence of relapse was 16% (4/25). The overall survival was 68% (17/25). **Conclusion** The key to improve the outcome of HSCT is to reduce the incidence and severity of aGVHD and the incidence of relapse.

**Key words:** Hematopoietic stem cell transplantation; Graft-versus-host disease; Relapse

异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 可以治疗血液系统恶性疾病和一些遗传性疾病, 随着国家经济稳步发展以及移植技术的提高, allo-HSCT 越来越显得重要。截止到 2007 年 9 月, 我们已经完成 25 例 allo-HSCT, 现报告如下:

## 病例和方法

1 **病例** 1997年7月至2007年9月我们共完成 allo-HSCT 25例, 其中男23例, 女2例, 中位年龄28(16~48)岁。基础疾病分别为急性白血病(AL)14例[急性髓系白血病(AML)9例, 急性淋巴细胞白血病(ALL)5例], 慢性粒细胞白血病(CML)9例, 骨髓增生异常综合征(MDS)和阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)各1例。移植时AL缓解期患者11例(第1次完全缓解期10例, 第2次缓解期1例), 复发3例; CML慢性期(CP)患者7例, 加速期(AP)患者1例, 急变期(BP)患者1例。对供受者的A、B、DR位点均进行分子生物学配型, 其中6个位点全相合者19例, 1个位点亚型不相合者1例, 2个位点亚型不相合者1例, 3个位点亚型不相合者2例。27例次移植中骨髓移植(BMT)8例, 外周血干细胞移植(PBSCT)16例, 骨髓加外周血干细胞混合移植3例。

2 **预处理方案** A方案: 全身照射(TBI)770 cGy, 环磷酰胺(CTX)1.8 g/m<sup>2</sup>, 共2d(10例患者采用此方案)。B方案: 经典BuCy(4例患者采用此方案)。C方案: 改良BuCy<sup>[1]</sup>(10例患者采用此方案)。D方案: CTX 50 mg/kg, 共4d, 抗胸腺细胞球蛋白(ATG)2 mg/kg, 共4d(1例PNH患者采用此方案)。

3 **供者来源及干细胞采集** 25例供者中有22例来自同胞兄弟姐妹, 2例来自父母, 1例来自中华骨髓库。PBSCT供者于移植前第4天(-4天)开始每天皮下注射G-CSF 5μg/kg, 在-1天、0天采集外周血干细胞并输注。骨髓供者于0天在连续硬膜外麻醉下采集骨髓并输注。

4 **移植物抗宿主病(GVHD)的预防** 2005年前采用经典的环孢菌素A(CsA)+短程甲氨蝶呤(MTX)为主的预防方案: CsA 2.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>静脉滴注, -1天开始, 能正常进食后改为口服, 维持血药浓度200~300 mg/L, 以后逐渐减量; MTX于移植后第1天(+1天)15 mg/m<sup>2</sup>, +3、+6、+11天10 mg/m<sup>2</sup>, 静脉壶入, 20例患者采用此方案。2006年后进行allo-HSCT的5例患者改为长程预防方案, 即将CsA提前到预处理开始时应用; 同时加用霉酚酸酯(MMF)0.5g, 每日2次, +30天开始减量。HLA不全相合者预处理阶段均加用ATG(2.5 mg/kg, -4~-1天)(4例患者)。

5 **GVHD的诊断** 急性GVHD(aGVHD)的诊断和分级参照文献<sup>[2]</sup>标准。

6 **植活标准** 连续3d WBC≥1×10<sup>9</sup>/L或单个核细胞≥0.5×10<sup>9</sup>/L为达到临床植活, 其第1天为达到植活时间。不用输血, 连续7d血小板≥20×10<sup>9</sup>/L为血小板植活。

7 **巨细胞病毒(CMV)感染与CMV疾病** 每周采用PCR方法对患者进行CMV的监测, 阳性称为CMV血症。如果同时临床证实有CMV导致的脏器功能的损害, 则为CMV疾病, 如CMV肺炎、CMV肠炎等。

## 结 果

1 **植活情况** 输入细胞中位数为3.76(2.2~9.35)×10<sup>8</sup>/kg。27例次患者达到稳定植活, 白细胞植活中位时间15(11~21)d, 血小板植活中位时间20(11~51)d。

2 **GVHD的发生情况** 共有13例患者发生aGVHD, 累积发生率为48.15%, 其中I~II度患



者 5 例, 累积发生率 18.52%; III~IV 度患者 6 例, 累积发生率 22.22%; II 度及以上的 GVHD 发生率为 33.3%。在可供分析的例患者中有 6 例发生了慢性 GVHD, 其中 1 例为广泛型。

3 **CMV 感染与 CMV 疾病** 发生 CMV 血症 5 例, 其中 CMV 肺炎 3 例。

4 **复发率和生存率** 4 例患者在移植后 4 个半月~3 年 10 个月复发, 2 例 BMT 复发后再行 PBSCT, 其中 1 例半年后再次复发。截止 2007 年 9 月, 死亡 8 例, 总生存 (OS) 率为 68.0%。死亡原因分别为 GVHD 及其相关合并症 5 例, 复发 3 例。

## 讨 论

随着造血干细胞来源的不断增多, 异基因造血干细胞移植的应用已愈加广泛, 并随着移植技术的不断进步, 移植的疗效也明显提高。尽管如此, 移植以后的各种并发症仍是阻碍异基因造血干细胞移植成功的主要因素, 其中 aGVHD 及其相关合并症和疾病复发是导致移植后死亡的主要原因。本研究中 5 例死于 aGVHD 及其相关合并症, 3 例死于复发。从 2006 年采用长程、加强的免疫抑制方案后, aGVHD 发生率似有降低, 因病例数少尚需进一步证实。本组患者 OS 为 68.0%, 与文献报道近似<sup>[3]</sup>。虽然酪氨酸激酶抑制剂 (格列卫) 越来越多地应用于临床, CML 患者对格列卫耐受良好, 尤其是干扰素耐药的慢性期患者疗效显著优于传统治疗, 并发现治疗 3 个月内能获得显著的遗传学缓解, 但其远期疗效并不明确。异基因造血干细胞移植仍是目前根治 CML 的主要手段<sup>[4]</sup>, 本文 1 例患者已无病生存 10 年 4 个月, 生活质量良好。

总之, allo-HSCT 是治疗恶性血液病最主要和最有效的治疗手段, 有效预防并治疗移植后各种并发症, 特别是在移植早期加强免疫抑制的强度可以减少 aGVHD 的发生是 allo-HSCT 成功的关键。

## 2-35

### 异基因造血干细胞移植后全血细胞减少的脾切除治疗四例报告

丁家华 顾 炎 陈宝安 赵 刚 高 冲 孙耘玉 王 骏 程 坚 宋慧慧 鲍 文  
东南大学附属中大医院血液科 (210009)

**摘要:** **目的** 观察行脾切除术治疗外周血造血干细胞移植后血细胞减少、造血恢复缓慢的效果。 **方法** 4 例患者, 患者 2 为女性, 慢粒急变期, 患者 3 为急性淋巴细胞白血病, 其余 2 例为慢粒慢性期。其中 3 例患者在移植前存在脾肿大, 患者 4 移植前无脾肿大。预处理方案前 2 例为 BU/CY2, 后 2 例为改良 BUCY2 方案。四例患者分别在第 +168、+51、+259、+114 天接受了脾切除术。移植前后分别检测患者体内的 Ph 染色体和 bcr-abl 基因。移植后每月用 STR 微卫星检测受者体内的嵌合状态。 **结果** 四例患者均植入成功。4 例患者均出现移植后血细胞减少, 造血恢复缓慢, 糖皮质激素等治疗无效。另外患者 1 的 STR 微卫星检测呈混合嵌合状态、患者 1 和 2 移植后每月骨髓细胞学检查均测到 5% Ph (+) 染色体。脾切除后三例患者血常规均恢复正常。患者 1 转为完全供者型植入。患者 1、2 脾切除后出现 GVHD, 激素治疗效果良好, 且在脾切除 1 个月后 Ph (+) 染色体未检出, bcr-abl 融合基因 (-)。其中患者 3 于 +16 月时 ALL 髓外复发死亡, 其余三例均无病

生存至今（分别为 70 个月、34 个月，11 个月）。**结论** 脾切除能作为治疗造血干细胞移植后血细胞减少的有效方法。

**关键词：**造血干细胞移植；异基因；脾切除；血细胞减少

## Effect of Splenectomy after Allogeneic and Syngeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation on Graft-Versus-Host Disease

*Ding Jiahua, Gu Yan, Chen Bao'an, Zhao Gang, Gao Chong,  
Sun Yunyu, Wang Jun, Cheng Jian, Song Huihui, Bao Wen*

*Department of Hematology, Zhong Da Hospital, Southeast University, Nanjing City, 210009, China*

**Abstract: Objective** To observe the effect of splenectomy on pancytopenia after peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). **Methods** Four patients in our department from 2002~2007 had received splenectomy after PBSCT. Patient 2 was female who was diagnosed as chronic myeloid leukemia advanced phase (CML-AP). Patient 3 was diagnosed as ALL, the others were diagnosed as the chronic myeloid leukemia (CML). The first three patients had splenomegaly before the PBSCT. The conditioning regimen of the first 2 patients was BU-CY2 while that of the last 2 patients was BOCI. They had splenectomy respectively on d+168, d+51, d+259, d+114. The detection of bcr-abl transcripts was done by the polymerase chain reaction (PCR) technique. PCR amplification of a variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism was used to document chimerism. **Results** All the four patients engrafted successfully. All of them had severe pancytopenia after PBSCT. The recovery of the haematogenesis was much slower and the therapy by glucocorticoid had no effect. Meanwhile, patient 1 was MC in the STR-PCR test. Both patient 1 and patient 2 had 5% Ph-positive chromosome. All of the 4 patients acquired rapid hematopoietic recovery after splenectomy. And chromosome analysis of bone marrow cells showed CDC (complete donor chimerism) in patient 1. Ph-positive chromosome were not detected in both first 2 patients. Both patients developed GVHD after the splenectomy while it was controlled with no difficulty. The three patients survived until now (respectively 70, 34, 11 months) while patient 3 died of relapse. **Conclusion** Splenectomy is an effective option for the patients who had pancytopenia after the PBSCT.

**Keywords:** allogeneic peripheral blood stem cell transplantation (allo-PBSCT); splenectomy; pancytopenia;

异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 可能是目前唯一可以治愈恶性血液系统疾病的方法<sup>[1]</sup>。移植后血细胞减少是较常见的并发症。其常见原因有 GVHD、自身免疫性疾病、CMV 感染等，以及疾病复发可能。Banaji<sup>[2]</sup>等报道移植前行脾切除可以获得中性粒细胞和血小板的快速植入以及减少血小板输注。但移植后脾切除对造血恢复、GVHD

的影响及完全嵌合状态（CDC）形成的影响报道少见。我们报告 4 例并结合文献进行复习。

## 资料与方法

### 一、患者特征

2002 年至 2007 年间，我院血液科行异基因造血干细胞移植 50 余例，其中 4 例（还有其他血细胞减少，但用其他方法有效，不考虑脾亢）患者移植后血细胞减少，造血恢复缓慢，糖皮质激素等治疗无效，排除其他因素后，考虑脾亢。行脾切除术。

患者 1，男，42 岁。于 2001 年 12 月 7 日确诊为 CML 慢性期。2002 年 4 月入院用其胞弟作为供者行外周血干细胞移植。移植前骨髓象：增生明显活跃，粒系占 0.540，红系占 0.330，淋巴细胞占 0.100，单核细胞占 0.030。血常规：WBC $6 \times 10^9/L$ ，Hb125g/L，BPC $195 \times 10^9/L$ 。移植前 B 超显示脾脏大小为 16.5cm $\times$ 5.0cm $\times$ 5.0cm。

患者 2，女，28 岁。2003 年在外院确诊为 CML 加速期，给予羟基脲治疗（0.5，p.o. 每日两次），干扰素 300 万 U，肌肉注射，隔日 1 次，血常规恢复正常。2005 年 4 月入我院用其孪生妹妹作为供者行以及异基因外周血干细胞移植。移植前血常规 WBC  $3.0 \times 10^9/L$ ，Hb 89g/L，BPC  $872 \times 10^9/L$ 。移植前 B 超显示脾脏大小为 13.1cm $\times$ 5.1cm $\times$ 5.1cm。

患者 3，男，16 岁，于 2006 年 1 月在外院确诊为急性淋巴细胞白血病，Ph（+）细胞 100%，bcr-abl 融合基因（+）。2006-04-06 日查 bcr-abl 融合基因（-）。2006-06-06 入我院行无关供者外周血干细胞移植。入我院首次血常规示 WBC  $4.2 \times 10^9/L$ ，Hb 118g/L，BPC  $102 \times 10^9/L$ 。骨髓象示增生明显活跃，淋巴细胞占 0.278，粒系统占 0.498，红系统占 0.202。原始淋巴细胞 0.60，幼淋巴细胞 0.20。巨核细胞 17 个，其中产板巨 9 个。脾脏大小为 10.02cm $\times$ 3.9cm $\times$ 3.9cm。

患者 4，男，25 岁，于 2006 年 2 月在外院诊断为慢粒慢性期 2007-04-17 在我院行无关供者外周血干细胞移植。移植前血常规示 WBC  $8.9 \times 10^9/L$ ，Hb 122g/L，BPC  $166 \times 10^9/L$

### 二、干细胞采集和输注

采用低分辨率 DNA 技术检测 HLA-A 和 B，II 类抗原 DRB1 采用高分辨率 DNA 技术检测。动员采用 G-CSF $10\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，分 2 次皮下注射，第 5 天用 CS-3000plus（Bater 公司产品）分离外周血干细胞 1 次，总循环血量为 1.2L。采集后计数 MNC 及 CD34+ 细胞数，造血干细胞不经处理直接经深部静脉输注。4 例患者输注单个核细胞（MNC）数和 CD34+ 细胞数见表 1。

表 1 患者特征和行造血干细胞移植情况

No.	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4
年龄	42	34	16	25
性别	男	女	男	男
疾病所处时期	CML-CP	CML-AP	ALL	CML-CP
年龄（岁）	42	34		
供者 性别	男	女		男
HLA 相合	同胞全相合	孪生姐妹		全相合
单个核细胞数（ $\times 10^8 \cdot \text{kg}^{-1}$ ）	6	5	13.06	26.6
CD34 <sup>+</sup> （ $\times 10^8$ ）	8	9	9.14	25.27
移植时间	30/04/2002	28/04/2005		20/06/2006
脾切除时间	05/11/2002（d+168）	17/06/2005（d+51）		16/04/2007（d +259）
aGVHD	皮疹	无		皮疹
cGVHD	无	皮疹和轻度肝功能损害		无
脾切除后生存时间（months）	70	34	16	11

### 三、预处理方案

患者 1 和 2 采用 BU-CY2 方案: 白消安 (BU)  $1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每 6h 1 次, 共 16 次; 环磷酰胺 (CTX)  $60\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 2\text{d}$ 。患者 3 和 4 采用改良 BUCY2 方案 (BU  $42\text{mg}$ , 每 6h 1 次,  $\text{d}^{-7} \sim \text{d}^{-5}$ ; 阿糖胞苷  $200\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $\text{d}^{-7} \sim \text{d}^{-2}$ ; CTX  $2.1\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $\text{d}^{-3} \sim \text{d}^{-2}$ )。

### 四、GVHD 的预防

患者 1、3 予环孢素 A (CSA)、甲氨喋呤 (MTX) 预防 GVHD。CSA 的剂量为  $3\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.v, 持续 24 小时静脉滴注, 然后改为口服。MTX 的剂量为  $\text{d}1$ ,  $15\text{mg}$ ;  $\text{d}3$ 、 $6$ 、 $11$ ,  $10\text{mg}$ 。患者 3 为无关供者移植, 因此加用 ATG ( $1000\text{mg} \cdot \text{d}^{-1} \times 3\text{d}$ )。患者 4 采用环孢素 A (CSA)、甲氨喋呤 (MTX), ATG 及骁悉 ( $50\text{mg bid}$ ) 预防 GVHD。患者 2 行同基因造血干细胞移植, 因此未进行 GVHD 的预防治疗。急、慢性 GVHD 的诊断均基于典型的临床和生物学标准。

### 五、巨细胞病毒 (CMV) 和肝静脉闭塞征 (VOD) 的预防

阿昔洛韦 ( $5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) 自第-8 天开始静脉滴注。采用 PCR 的方法每周查一次 CMV-DNA。前列腺素 PGE1 ( $20\text{ug}$ , 2/日, i.v.) 从第-8 天至第+28 天预防 VOD。

### 六、植入和嵌合体的检测

以连续三天中性粒细胞绝对值 (ANC)  $>0.5 \times 10^9 / \text{l}$  的第一天为中性粒细胞植入日期。以连续五天血小板  $>20 \times 10^9 / \text{L}$  的第一天为血小板植入日期。移植后第一、二、三个月均采用细胞遗传学方法检查骨髓中 Ph 染色体阳性细胞数。嵌合体检测采用 STR-PCR (短串重复序列)。

### 七、支持治疗

患者均进入层流病房。为了预防粒缺引起细菌感染, 给予复方新诺明口服。口服斯皮仁诺预防真菌感染。输注红细胞悬液和血小板, 维持患者血红蛋白在  $8.0\text{g/dl}$  以上, 血小板在  $20 \times 10^9 / \text{L}$  以上。移植后第 7 天 (+7 天) 开始用 G-CSF ( $300\text{mg} \cdot \text{d}$ ),  $\text{WBC} > 2 \times 10^9 / \text{L}$  停用。

## 结 果

### 一、供者细胞植入及造血功能恢复情况

四例患者中性粒细胞植入时间分别为 +12 天、+13 天、+11 天、+12 天, 血小板植入时间分别为 +46 天、+19 天、+13 天、+13 天。+1 月骨髓细胞学检查结果: 增生明显活跃, 产板巨少见。其中患者 1, 2 每月 1 次骨髓细胞学检查示查 Ph (+) 染色体均在 5% 左右, 患者 1 STR 微卫星检测呈混合嵌合状态。

### 二、移植后血细胞减少

四例患者均出现不同程度血红蛋白或血小板的进行性下降。HB 分别波动在  $40 \sim 60\text{g/L}$ 、 $75 \sim 80\text{g/L}$ 、 $80 \sim 100\text{g/L}$ 、 $48 \sim 60\text{g/L}$ ; BPC 分别波动在  $19 \sim 20 \times 10^9 / \text{L}$ 、 $4 \sim 14 \times 10^9 / \text{L}$ 、 $1 \sim 18 \times 10^9 / \text{L}$ 、 $28 \sim 32 \times 10^9 / \text{L}$ 。骨髓细胞学检查示: 骨髓增生活跃, 巨核细胞减少或未见。其中患者 3 从 +7 月开始出现鼻出血, 全身皮肤粘膜广泛出血点。多次输注血小板, 效果不佳。给予甲泼尼龙无效, 在维持 CsA 有效血药浓度的同时, 加用霉酚酸酯 (MMF) 无改善。后使用大剂量丙种球蛋白  $0.4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5\text{d}$ , 亦无明显改善。前三例患者 B 超示脾大。

### 三、脾切除术及术后造血恢复

四例患者分别于+168、+51、+259、+114天在大量成分输血治疗同时接受脾切除术。手术过程顺利，术后脾脏病理显示为：白髓明显萎缩，红髓髓索及髓窦内见大量分叶杆状核粒细胞，巨核细胞未见。符合脾功能亢进。切脾术后第二天患者血象立即迅速恢复。四例患者第2~3天血常规分别为：WBC $21 \times 10^9/L$ ，Hb113g/L，BPC $169 \times 10^9/L$ ；WBC $20.2 \times 10^9/L$ ，Hb112g/L，BPC $20 \times 10^9/L$ ；WBC $17.2 \times 10^9/L$ ，Hb111g/L，BPC $195 \times 10^9/L$ ；WBC $6.3 \times 10^9/L$ ，Hb3.4g/L，BPC $108 \times 10^9/L$ 。

### 四、ph 染色体、融合基因及演变情况

脾切除术后患者1、2Ph(+)染色体细胞未检出，bcr-abl融合基因(-)，患者1STR微卫星检测提示完全供者型植入。患者3、4每月1次骨髓细胞学检查示Ph(+)染色体为0，STR微卫星检测呈完全嵌合状态。

### 五、GVHD 发生情况

患者1、2为同胞供者，切脾前均无GVHD出现。患者1切脾后一个月出现局限性皮肤损害，伴丙氨酸转氨酶(ALT)，谷氨酰转肽酶(GGT)进行性升高，总胆红素及直接胆红素均正常，在排除病毒性肝炎后，考虑慢性GVHD，用甲泼尼龙 $1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \times 10\text{d}$ 治疗后，ALT、GGT分别升高达1213U/L、1129U/L，遂加用CsA $6\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ，分2次服用，1周后ALT、AST开始下降，2个月后接近正常。患者2于切脾后2天，出现躯干部的皮疹，考虑急性GVHD，左锁骨上皮肤活检支持GVHD的诊断。予地塞米松( $5\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ , i.v.) $\times 10\text{d}$ 治疗后，皮疹完全消退。

患者3、4均于移植后+10天左右出现超急性GVHD，前者为双臂、双侧大腿、腹部、双足大片红色皮疹，后者出现高热，两例患者使用激素治疗后症状明显控制。切脾后，患者3+98天出现腹部、背部、双足红色皮疹，考虑为急性GVHD I度，予地塞米松(5mg，静推，qd $\times 15$ 天)、增加CsA用量，效果佳。患者4出现咳嗽咳痰，考虑肺部慢性GVHD，目前症状控制。

### 六、疗效及随访

目前患者一、二切脾后无病生存58、27个月，一直正常工作，未服用任何免疫抑制剂。患者三切脾后无病生存16个月后因ALL髓外复发死亡。患者四目前无病生存12个月，小剂量免疫抑制剂维持治疗。

## 讨 论

移植后血细胞减少的常见原因为GVHD、自身免疫性疾病、CMV感染等。脾切除对血细胞减少的影响正处于研究中。Banaji<sup>[2]</sup>等报道移植前行脾切除可以获得中性粒细胞和血小板的快速植入。Richard等<sup>[3]</sup>报道4例CML非去T骨髓移植后造血恢复不良的患者，3例患者移植前有脾肿大，1例移植前脾脏正常大小。对该4例患者行脾切除治疗，切脾前骨髓细胞学检查显示3例增生减低，1例极度减低，均无CMV感染及GVHD表现。切脾时3例脾中度肿大，1例正常大小，4例患者均依靠输血。切脾后4例患者造血功能均恢复正常，骨髓细胞学检查亦显示增生活跃。Richard等由此得出结论，CML患者移植后造血功能恢复不良者可通过脾切除加以纠正。其疗效优于第2次移植。

在我科行异基因造血干细胞移植的病人中，移植后发生血细胞减少的病例有近10例。但通过

免疫抑制等治疗后，逐渐恢复。本组 4 例患者血细胞始终无法恢复，最终考虑为脾亢，行切脾治疗。治疗效果显著。

我们的研究结果与 Richard 等一致。本组患者其中 3 例移植前后脾脏一直有肿大，1 例无脾肿大。移植后造血恢复缓慢，并依赖输血，与文献<sup>[3]</sup>报道不同的是本组患者骨髓细胞学检查均显示增生活跃，先后使用糖皮质激素、MMF、大剂量丙种球蛋白无效，其中患者 1 为混合嵌合状态，患者 1，2Ph（+）染色体细胞持续在 5%左右，在除外自身免疫性溶血性贫血、GVHD、CMV 感染等因素后考虑脾功能亢进，脾切除后血常规第 2 天即迅速恢复正常，1 个月后 Ph（+）染色体细胞均未检出，bcr-abl 融合基因（-），STR 微卫星检测提示完全嵌合。进一步说明切脾不仅可以促进造血的恢复还可促进完全嵌合状态的形成及 ph 染色体的转阴，所以我们认为对于移植后仍有脾肿大和 Ph 染色体阳性细胞存在的患者，脾切除可能是治疗血细胞减少的一种新方法。

目前已经知道，GVL 和 GVHD 之间的平衡是异基因造血干细胞移植的关键因素<sup>[4-6]</sup>。白血病异基因造血干细胞移植后生存曲线的回顾性分析显示低复发率出现在发生 GVHD 的患者，提示移植物抗白血病效应的存在。目前许多学者对复发或难治白血病患者采用移植后供者淋巴细胞输注（donor lymphocyte infusion, DLI）的方法来清除白血病细胞和减少免疫抑制剂的使用<sup>[9]</sup>，很多患者从中获益<sup>[10-13]</sup>。但同时 DLI 也给患者带来了严重的 GVHD、感染等。对于进展期的白血病，DLI 似乎也不能降低其复发率<sup>[14]</sup>。因此，许多与 DLI 相关的新方法应运而生<sup>[15-20]</sup>。Kalhs<sup>[7]</sup>等报道脾脏可能参与调节急性 GVHD 的发生和其严重程度。我们的研究结果提示脾切除与 GVHD 发生的危险性呈正相关，该结果与 Michallet<sup>[8]</sup>等一致。但 Michallet 等的研究基于移植前行脾切除。我们的研究中两例患者（患者 1 和患者 2）在脾切除前均无 aGVHD 的发生。脾切除后两天，两例患者均出现了 aGVHD。患者 1 出现了皮疹和肝功能损害。患者 2 出现躯干部的皮疹，左锁骨上皮肤活检支持 GVHD 的诊断。两例患者于脾切除后立即出现 GHVD，症状相对较急，但使用激素及免疫抑制药物后，逐渐得到控制，目前均无病长期生存。因此，我们认为脾切除后出现的 GVHD 并不难于控制。移植后脾切除可能是比 DLI 更有应用前景的治疗白血病的一种新方法，甚至疗效优于二次移植<sup>[3]</sup>。当然，我们还需要更进一步的研究影响移植后脾切除的因素。另外，患者 1 在脾切除前，骨髓的嵌合状态为混合嵌合。脾切除后，骨髓的嵌合状态转为完全嵌合。患者 2 行同基因造血干细胞移植，因此未进行嵌合体的检测。两例患者移植后一月，Ph 染色体阳性细胞数减少至 5%。脾切除后，Ph 染色体阳性细胞消失。因此，综合嵌合体检测结果、Ph 染色体阳性细胞数以及 GVHD 的发生，我们认为移植后脾切除或许可以提高 GVL 效应，促进完全嵌合的形成。我们是国内首次报道移植后脾切除对 GVL 和完全嵌合形成的影响，更多病例有待观察。

脾脏可能是影响异基因造血干细胞移植后造血恢复的重要因素之一，无论患者是否存在脾肿大。移植后脾切除可迅速恢复造血，对移植后血细胞减少疗效显著。减少移植后患者感染、出血的可能性。另外脾脏可以影响移植后完全嵌合的形成和预后。我们认为，对于移植后脾仍大、Ph 染色体阳性细胞持续存在的患者，移植后脾切除可能是降低复发率和延长无病生存率的一个新方法。

## 参考文献

- [1] Martínez C, Carreras E, Rovira M, et al. Allogeneic stem cell transplantation as salvage therapy for patients relapsing after autologous transplantation: experience from a single institution. *Leukemia Res*, 2001, 25 (5): 379-384.
- [2] Banaji M, Bearman SI, Buckner CD, et al. The effects of splenectomy on engraftment and platelet transfusion requirements in patients with chronic myelogenous leukemia undergoing marrow transplantation. *Am J Hematol*, 1986, 22 (3): 275-83..
- [3] Richard C, Romon I, Perez E M. et al. Splenectomy for poor graft function after allogeneic bone marrow transplantation in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*.1996, 10 (10): 1615-1618.
- [4] Deeg HJ and Appelbaum FR. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Res*, 2000, 24 (8): 653-663.
- [5] Lickliter, J.D., McGlave, P.B., DeFor, T.E., et al. Matched-pair analysis of peripheral blood stem cells compared to marrow for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2000; 26: 723-728.
- [6] Garrido SM, Bryant E and Appelbaum FR. Allogeneic stem cell transplantation for relapsed and refractory acute myeloid leukemia patients with 11q23 abnormalities. *Leukemia Res*, 2000, 24 (6): 481-486.
- [7] Kalhs P, Schwarzingler I, Anderson G. A Retrospective Analysis of the Long-Term Effect of Splenectomy on Late Infections, Graft-Versus-Host Disease, Relapse, and Survival After Allogeneic Marrow Transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*, 1995, 86 (5): 2028-2032.
- [8] Michallet M, Corront B, Bosson JL, et al. Role of splenectomy in incidence and severity of acute graft-versus-host disease: a multicenter study of 157 patients. *Bone Marrow Transplant*.1991, 8 (1): 13-17.
- [9] Reid GS, Terrett L, Alessandri AJ, et al. Altered patterns of T cell cytokine production induced by relapsed pre-B ALL cells. *Leukemia Res*, 2003, 27 (12): 1135-1142.
- [10] Lee JH, Lee KH, Kim S, et al. Combination chemotherapy of intermediate-dose cytarabine, idarubicin, plus etoposide and subsequent mobilized donor leukocyte infusion for relapsed acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia Res*, 2001, 25 (4): 305-312
- [11] Guglielmi C, Arcese W, Dazzi F et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: prognostic relevance of the initial cell dose. *Blood*, 2002; 100: 397-405.
- [12] Zeiser R, Bertz H, Spyridonidis A, et al. Donor lymphocyte infusions for multiple myeloma: clinical results and novel perspectives. *Bone Marrow Transplantation*, 2004, 34: 923-928.
- [13] Salama M, Nevill T, Marcellus D, et al. Donor leukocyte infusions for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation*, 2000, 26: 1179-1184.
- [14] Raiola AM, Van Lint MT, Valbonesi M et al. Factors predicting response and graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions: a study on 593 infusions. *Bone Marrow Transplant* 2003, 31: 687-693.
- [15] Bondanza A, Valtolina V, Magnani Z, et al. Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood*, 2006; 107: 1828-1836.
- [16] Yang YG, Qi Jin, Wang MG, et al. Donor-derived interferon  $\gamma$  separates graft-versus-leukemia effects and

graft-versus-host disease induced by donor CD8 T cells. *Blood*, 2002; 99: 4207-4215.

[17] Eom HS, Chakraverty R, Sachs J, et al. Host MHC class II+ antigen-presenting cells and CD4 cells are required for CD8-mediated graft-versus-leukemia responses following delayed donor leukocyte infusions. *Blood*, 2006; 108: 2106-2113.

[18] Yang YG, Sykes I. The role of interleukin-12 in preserving the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells independently of GVHD. *Leuk Lymphoma*, 1999, 33 (5-6): 409-420

[19] Teeshima T, Hill GR, Pan L, et al. IL-11 separates graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease after bone transplantation. *J. Clin. Invest*, 1999; 104 (3): 317-325.

[20] Comoli P, Locatelli F, Ioretta A, et al. Human alloantigen-specific anergic cells induced by a combination of CTLA4-Ig and CSA maintain anti-leukemia and anti-viral cytotoxic responses. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27 (12): 1263-1273.

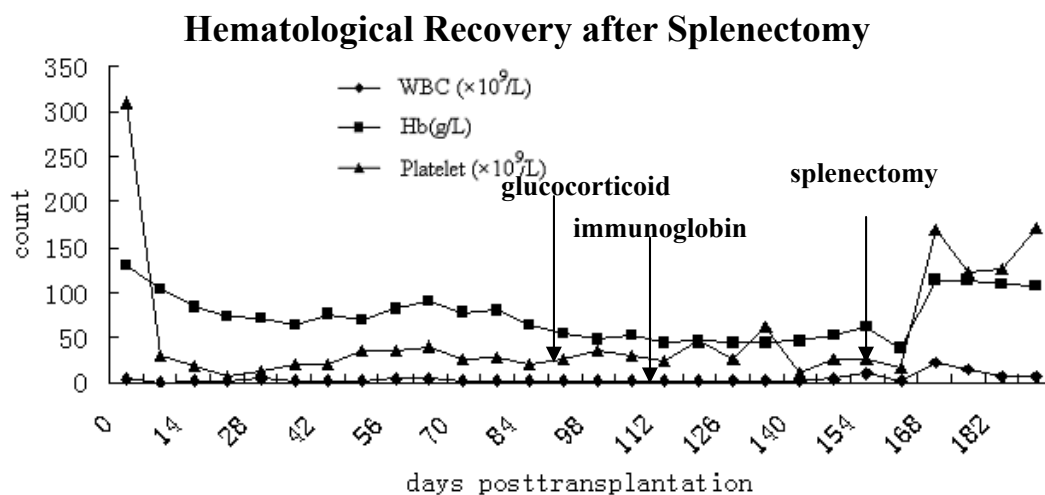


Figure 1 Hematological parameters and splenectomy after allo-PBSCT in Patient 1

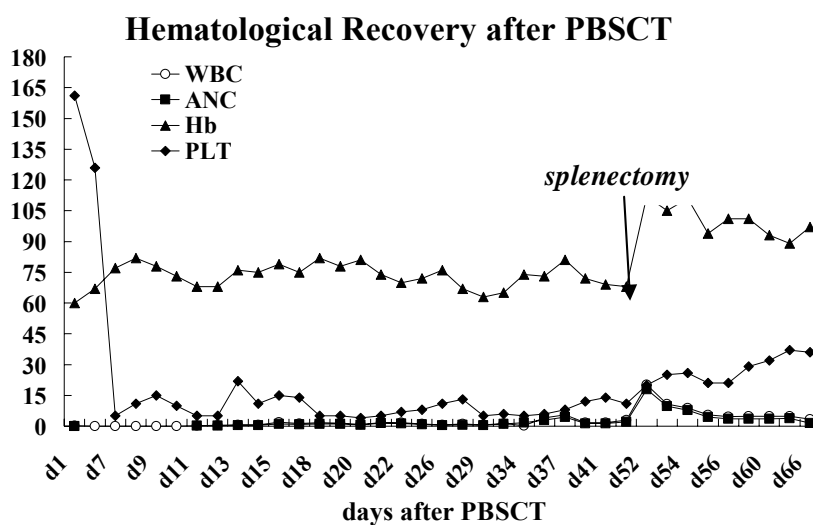


Figure 2 Hematological parameters and splenectomy after allo-PBSCT in Patient 2



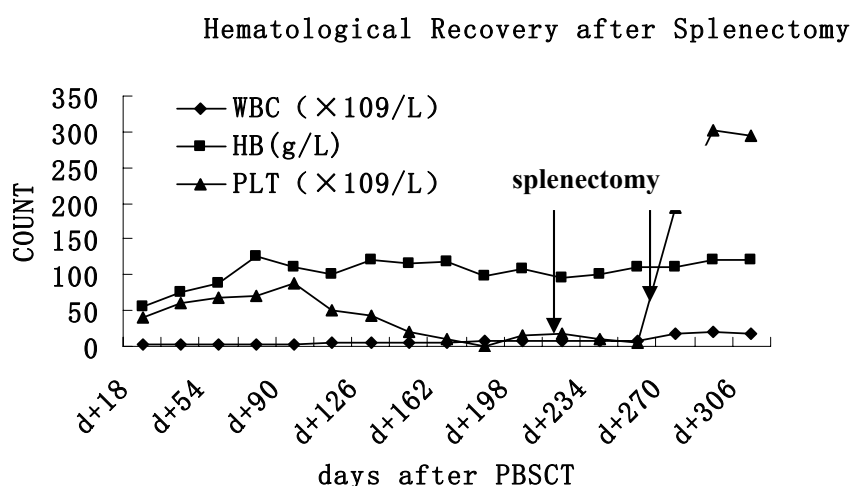


Figure 3 Hematological parameters and splenectomy after allo-PBSCT in Patient 3

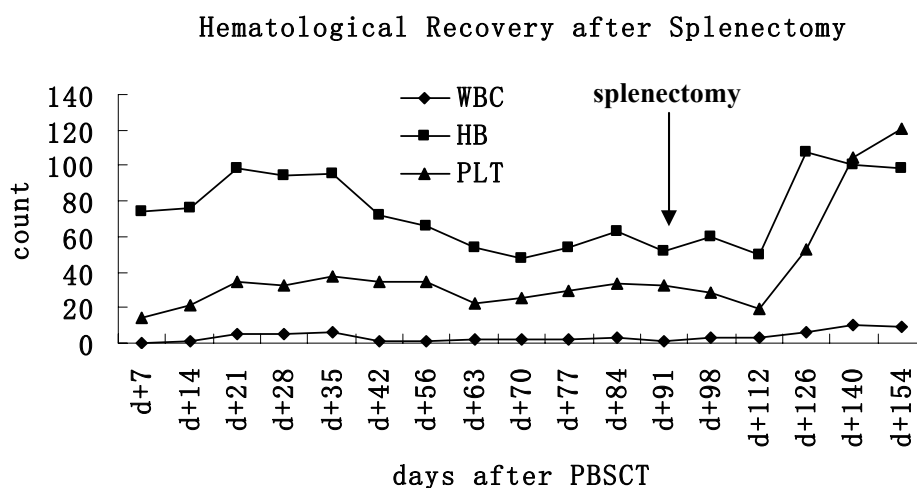


Figure 4 Hematological parameters and splenectomy after allo-PBSCT in Patient 4

2-36

## 53 例无关供体造血干细胞移植生存因素分析

陈 静 罗成娟 江 华 罗长缨 薛惠良 汤静燕 潘 慈  
董 璐 周 敏 叶启东 戴家乐 王耀平 顾龙君  
上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心

**摘要:** **目的** 了解无关供体造血干细胞移植中相关因素对生存率的影响, 评估移植效果。**方法** 对 2002 年 11 月至 2007 年 12 月期间连续在我院接受无关供体造血干细胞移植的 53 例患儿的临床资料进行回顾性分析。急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患儿接受了 TBI 为主的预处理、再生障碍性贫血 (AA) 患儿选择了氟达拉滨为主的非清髓性预处理、其余患儿均应采用白舒菲清髓。**结果** 本组平均年龄 8.4 岁 (1.5~21 岁), 大于 10 岁 ( $n=31$ ) 和小于 10 岁 ( $n=22$ ) 患儿的长期无病生存率 (EFS) 存在显著差异 (52.4% vs 83.9%,  $P=0.014$ ); ALL ( $n=11$ )、急性髓系白血病 (AML) ( $n$

=15)、慢性粒细胞白血病(CML)( $n=13$ )及非恶性疾病( $n=14$ )的EFS分别为:36.4%、78.6%、53.8%和100%;接受外周血( $n=37$ )、骨髓( $n=8$ )和脐带血( $n=8$ )造血干细胞移植患儿的EFS无明显差异( $P=0.46$ ),分别为69.4%、87.5%、62.5%;HLA全相合( $n=15$ )、1位点不合( $n=20$ )、2位点不合( $n=11$ )和 $>2$ 位点( $n=6$ )不合移植患儿EFS分别为80%、80%、55%和50%;无aGVHD、I~II度aGVHD和III-IV度aGVHD患儿的EFS分别为66%、80%和58%。本组中位随访21个月(4~65个月),死亡15例(10例死于移植相关并发症,5例死于白血病复发),目前尚EFS38例(72%);移植过程中23例(43%)患儿出现CMV病毒繁殖,其中2例发生严重的CMV肺炎;12例(23%)患儿出现II~III度出血性膀胱炎;可评估的39例患者中18例(46%)发生慢性GVHD,其中7例(18%)为广泛性GVHD,2例死于慢性GVHD。**结论** 患儿年龄和疾病类型是决定移植后长期生存的主要原因;小于10岁的低年龄儿童、非恶性疾病患儿、AML患者具有较佳的移植效果;脐带血和HLA配型符合率 $\geq 2$ 个位点不合的无关供体干细胞同样适用于儿童患者的造血干细胞移植。

**关键词:** 儿童;造血干细胞移植;无关供体

异基因造血干细胞移植是治疗小儿难治性白血病、造血异常和一些先天遗传缺陷性疾病的有效方法。随着组织相容性抗原(HLA)分型、移植物抗宿主病(GVHD)防治方法的不断完善,无关供体造血干细胞移植愈来愈受到广泛应用。为进一步了解无关供体移植中相关因素对疗效的影响,我们对连续在本中心完成无关供体造血干细胞移植的53例患者的临床资料进行了回顾性分析,就HLA相合状态、干细胞来源、疾病类型、患儿年龄、急性GVHD程度等因素对生存率的影响进行了统计分析。

## 对象与方法

**1 病例资料** 自2002年至2007年连续在我院接受无关供体移植患儿共53例,其中男35例、女18例,平均年龄8.4岁(1.5~21岁),平均体重30.7kg(11.5~79kg),急性淋巴细胞白血病(ALL)11例(CR2 7例、CR33例),急性非淋巴细胞白血病(AML)15例(CR18例、CR26例、未CR 1例,其中tAML2例),慢性粒细胞白血病(CML)13例(CP110例、CP22例、幼年型粒单细胞白血病1例),再生障碍性贫血9例,其它先天遗传缺陷性疾病5例(X-连锁高Ig-M血症1例,地贫2例,WAS1例,MPS-IH1例)。

**2 供体情况** 无关供体外周血干细胞大多来自中华造血干细胞库,骨髓均来自台湾慈济骨髓捐赠中心,脐血多来自广州脐血库。HLA全相合15份、1位点不合20份、2位点不合11份、大于2位点不合6份。

**3 预处理方案** 大于3岁的ALL患儿以12~14GY(分隔成6~7次)的TBI为主的预处理,再生障碍性贫血患儿以150~175mg/m<sup>2</sup>氟达拉滨+环磷酰胺120mg/kg+ATG15mg/kg为预处理,其余患者选择经典的白舒菲16mg/kg+环磷酰胺200mg/kg+ATG15mg/kg清髓方案。

**4 移植方式** 37例进行外周血干细胞移植,8例接受骨髓移植,另8例接受脐带血移植。环孢素A(CSA)+短程甲氨喋呤(MTX)为常规GVHD预防措施,CSA 8~12mg/kg·d口服始于

-1, 维持谷浓度  $150\sim 250\mu\text{g/L}$ , 除脐血移植外常规于+1 天用  $\text{MTX}15\text{mg/m}^2$ , +3 天、+6 天用  $\text{MTX}10\text{mg/m}^2$ , CML 患者加用骁悉  $30\text{mg/kg}\cdot\text{d}$  加强 GVHD 预防。

5 植入证据及随访 所有患儿造血重建后进行 STR-PCR 或 FISH 性染色体测定。随访截止于 2008 年 4 月, 中位随访时间为 21 个月 (4~65 个月)。

6 统计分析 选用 SPSS13.0 软件, 用 kaplan-Meier 方式进行生存分析、 $\chi^2$  检验对各种状态进行统计分析。

## 结 果

1 植活情况 除 2 例脐血移植原发植入失败外, 其余 51 例患儿平均  $12\pm 2$  天中性粒细胞恢复到  $0.5\times 10^9/\text{L}$ ,  $12\pm 15$  天非输血依赖的血小板恢复至  $2.0\times 10^9/\text{L}$  以上。外周血、骨髓、脐血的有核细胞及 CD34+ 细胞数分别为  $10.9\times 10^8/\text{kg}$ 、 $5.8\times 10^8/\text{kg}$ 、 $1.13\times 10^8/\text{kg}$  和  $7.9\times 10^6/\text{kg}$ 、 $3.7\times 10^6/\text{kg}$ 、 $0.9\times 10^6/\text{kg}$ , 中性粒细胞分别于  $11\pm 2$  天、 $13\pm 3$  天、 $14\pm 6$  天, 血小板分别于  $11\pm 10$  天、 $15\pm 11$  天、 $25\pm 24$  天达到造血重建。

2 GVHD 发生情况 本组 6 例无 aGVHD、分别有 14 例、18 例、11 例和 4 例发生 I~IV 度 aGVHD, 可评估的 39 例患儿中 18 例 (46%) 发生 cGVHD, 其中 7 例 (18%) 发生慢性广泛性 GVHD。

3 移植相关其它并发症 移植过程中 23 例 (43%) 于移植后 34 天 (12~76 天) 出现 CMV 病毒繁殖, 其中 2 例发生严重的 CMV 肺炎; 12 例 (23%) 于移植后 39 天 (16 天~68 天) 出现 II-III 度出血性膀胱炎, 经水化、碱化等治疗 21 天 (5~89 天) 逐渐好转; 3 例出现严重抗利尿激素释放异常综合症, 经持续 7~36 天补充 3%NaCl 并限制水分摄入后好转; 5 例于移植后 65 天 (34~12 天) 发生带状疱疹; 2 例合并乙肝、2 例合并丙肝。

4 随访及结果 中位随访 21 个月 (4~65 个月), 15 例死亡, 其中 10 例 (19%) 死于移植相关并发症 (4 例死于 aGVHD, 2 例死于 cGVHD, 2 例死于器官毒性反应, 1 例死于 CMV 肺炎), 5 例死于白血病复发。值得一提的是: 14 例非恶性疾病患儿无 1 例死亡。

5 长期存活的相关因素分析 对 31 例小于 10 岁和 22 例大于 10 岁患儿的分析结果显示两者 EFS 存在显著差异 ( $52.4\%$  vs  $83.9\%$ ,  $P=0.014$ ); 良、恶性疾病移植后 EFS 也存在显著差异 ( $100\%$  vs  $55\%$ ,  $P=0.01\%$ ); 恶性疾病中, AML 患儿较 ALL、CML 具有较好的移植效果; 脐带血、外周血与骨髓具有相似的移植效果; HLA1 个、2 个位点不合并没有增加儿童患者的移植风险。

## 讨 论

异基因造血干细胞移植是目前治愈白血病和其它细胞、酶缺陷性疾病的主要手段, 亲缘相合的造血干细胞是最理想的移植供体来源, 但是我国独生子女政策使多数患儿缺乏 HLA 相合同胞供体, 需要寻找无关供体进行造血干细胞移植。近年来, 由于我国造血干细胞库的不断扩大、HLA 配型技术的不断提高, 使得更多患者能够借助非亲缘供体进行造血干细胞移植。本中心在进行这 53 例无关供体移植的同时, 完成了 22 例亲缘供体的移植, 非血缘移植的比例高达 71%, 远远高于国外及我国成人移植的相关报道。不过, 这将是我国造血干细胞移植的趋势, 将成为临床研究的重点。

本组 12 例 HLA2 位点、6 例大于 2 位点不合的移植结果显示: EFS 分别达到 56% 和 50%, 与

HLA 全相合和 1 位点不相合患者相比生存率并无明显下降，一方面可能因为中国人种较纯，基因型相近，HLA 次要位点相合率较高，另一方面是因为高危白血病患者接受 HLA 相合程度较差供体而增加 GVHD 的同时，因移植物抗白血病（GVL）作用而减少了白血病的复发。当然，各种强烈、高效抗 GVHD 药物的问世，使 GVHD 的控制率不断提高，为选择该类供体进行移植提供了根本保证。

与成人相比，儿童患者因为脏器功能较好、对异体抗原的反应能力较弱、GVHD 较轻，往往移植疗效更佳。我们将患者分成大于 10 岁和小于 10 岁两组后随访发现：小年龄患者具有更佳的移植效果，本组小于 5 岁 16 名患儿中无 1 例因移植相关并发症而死亡。

比较脐血、外周血和骨髓干细胞后发现：虽然本组选择的脐血有核细胞数高达  $1.13 \times 10^8/\text{kg}$ ，但仍远低于骨髓和外周血，从而使得血小板重建明显延迟，且有 2/8 例植入失败。虽然本组脐血移植的长期生存率达到 62.5%，与外周血和骨髓无显著差异，但我们仍然主张只要病情允许花费一定的时间寻找供体，脐血仍将作为次要的干细胞来源。

本临床研究显示：不同的疾病是导致移植产生不同效果的主要原因，我们对 14 例非恶性疾病患者的移植达到了 100% 的长期无病生存率，尤其在国内外首次成功尝试了多种先天遗传缺陷性疾病的非血缘移植，开拓了造血干细胞移植的新天地。与大多移植中心报道的结果一样，各种白血病的移植效果略有不同，AML、CML 具有较好的疗效，ALL 患者的移植效果相对较差。

#### 参考文献

- [1] 杨凯, 刘启发, 孙竞, 范志平, 等. 异基因造血干细胞移植后造血和免疫功能重建及并发症预防, 陈协群, 王文清, 等. 异基因造血干细胞移植治疗白血病的临床研究 临床血液学杂志, 2004, 17 (6) : 321-3
- [2] 的比较. 中国临床康复, 2006, 10 (21) : 22-6
- [3] 范志平, 杨凯, 刘启发, 等. 无关供体外周血干细胞和骨髓移植治疗白血病的比较研究. 南方医科大学学报, 2006, 26 (10) : 1494-7
- [4] 黄河, 林茂芳, 孟海涛, 等. 非血缘异基因骨髓移植治疗急性和慢性白血病 中华医学杂志, 2001, 81 (5) : 263-7
- [5] Gassas A, Sung I Graft-versus-leukemia effect in hematopoietic stem cell transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: significantly lower relapse rate in unrelated transplantations. Bone Marrow Transplant. 2007 Nov; 40 (10) : 951-5.
- [6] Sufliarska S, Horáková J Allogeneic peripheral blood stem cell transplantations in children--a single center experience. Neoplasma. 2004; 51 (2) : 110-6

2-37

## 造血干细胞动员剂（G-CSF） 对健康供者免疫细胞的影响及其安全性

金辉<sup>1</sup> 徐娟<sup>2</sup> 苏力<sup>2</sup> 宋伟<sup>2</sup> 李涛<sup>1</sup> 赵月<sup>2</sup>

1 中国造血干细胞捐献者资料库北京管理中心（100073）

2 首都医科大学宣武医院血液科（100053）

**摘要：**目的 探讨造血干细胞动员剂 G-CSF 对健康供者的活化 T 淋巴细胞、调节 T 淋巴细胞、单核细胞及 NK 细胞的数量及其表面抗原表达的影响。方法 分别在动员前和停用 G-CSF 后采集 30 名健康供者的外周血标本，并于采集后第 7 天和 1 个月随访。应用流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>及 CD8<sup>+</sup> 细胞表面 CD28 荧光强度表达的变化；CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> 及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>T 淋巴细胞在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中百分比变化；单核细胞的数量及其表面 CD14 及 HLA-DR 表达的变化；NK 细胞的数量及其表面 CD16/CD56 表达的变化。结果 动员后 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 CD28 荧光强度表达减弱（ $P=0.037$  及  $P=0.007$ ）；CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>T 细胞在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中百分比降低（ $P=0.018$ ）；CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞百分比升高（ $P=0.000$ ）；单核细胞的绝对数量增高 5.45 倍；其表面 CD14 的抗原表达未发现统计学意义的差异，但 HLA-DR 抗原表达强度明显减弱（ $P=0.010$ ）；动员后 NK 细胞的绝对数量增加 2.16 倍，但 CD16/CD56 抗原表达无统计学意义的变化。上述变化于停用 G-CSF 后第 7 天恢复至动员前水平。结论 G-CSF 作为造血干细胞动员剂可在短期内减弱健康供者 T 淋巴细胞表面活化信号 CD28 的表达，降低活化 T 细胞 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> 的相对比例，增加调节性 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>T 细胞比例。致单核细胞和 NK 细胞数量增加；使单核细胞表面 HLA-DR 抗原表达减弱，但不影响 CD14 抗原的表达。

**关键词：**G-CSF；健康供者；免疫细胞；安全性

## The Effect of Granulocyte Colony Stimulating Factor on Immune cells in Health donor

Jin Hui<sup>1</sup> Xu Juan<sup>2</sup> Su Li<sup>2</sup> Song Wei<sup>1</sup> Li Tao<sup>1</sup> Zhao Yue<sup>2</sup>

1. The Data Bank of Chinese Hematopoietic Stem Cell Donors Beijing Management Center, Beijing 100088

2. The Department of Hematology, Xuan Wu Hospital, Capital University of Medical Science, Beijing, 100053

**Abstract: Objective** To explore the effect of administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the activation T lymphocytes, regulation T lymphocytes, monocytes and NK cells during

mobilization of hematopoietic stem cells and its safety in healthy individuals. **Methods** Peripheral blood samples from 30 health donors were taken pre and post mobilization (the day of stem cell collection) with G-CSF, and the follow up on day 7 and a month after collection of stem cells. Flow cytometry was used for detecting CD28 antigen intensity of expression on CD4 cells and CD8 cells, the percentage CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T lymphocytes, the amounts of monocytes and NK cells, the intensity of CD14 and HLA-DR on monocytes and CD16/CD56 NK cells. **Results** CD28 antigen expression on CD4 cells and CD8 cells was down post mobilization compared to pre mobilization ( $P=0.037$  and  $P=0.007$  respectively). The percentage of activation T lymphocytes (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>) decreased ( $P=0.018$ ) and regulatory T lymphocytes (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) increased ( $P=0.000$ ) after administration G-CSF. The absolute numbers of monocytes and NK cells increased 5.45 and 2.16 folds separately post mobilization compared to pre mobilization and then resumed on the day 7 after stem cell collection. The antigen expression of HLA-DR on monocytes decreased post mobilization ( $P=0.010$ ). But the CD14 expression on monocytes and CD16/CD56 on NK cells was also changed but not statistically significant compared between pre and post mobilization. Those changes resumed on the day 7 after stem cell mobilization. **Conclusions** G-CSF Conclusions rhG-CSF have a role in inducing down-regulation of antigen expression of CD28 on donor T lymphocytes, lower percentage of CD4+CD25<sup>low</sup>, increase regulatory T cells CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, induced the increase of monocytes and NK cells as well as the decrease of HLA-DR expression of monocytes in a short term after the mobilization. No change of antigen expression of CD14 on monocytes and CD16/CD56 on NK cells were found.

**Key words:** G-CSF, health donor, immune cell, safety

随着造血干细胞移植技术的进步及造血干细胞捐献资料库的扩大, 无关供者造血干细胞移植术在国内外广泛开展。因外周造血干细胞移植具有采集方便及造血植入快的特点, 目前多采用外周血造血干细胞捐献的方法。粒系集落刺激因子(G-CSF)作为造血干细胞动员剂具有良好的动员效果。与骨髓造血干细胞移植相比, 虽然外周血移植中增加了免疫细胞的数量, 但并不导致急性移植物抗宿主病(GVHD)的发生率明显增加, 从而提示 G-CSF 具有使免疫细胞免疫应答能力下降的作用。但这种变化是否对健康供者的免疫参与细胞具有影响是全社会非常关注的问题。T 淋巴细胞被活化是其发挥免疫应答作用的第一步, 调节性 T 细胞可以降低急性 GVHD 的发生, 发挥免疫耐受作用。单核细胞参与抗原递呈作用, 而 NK 细胞具有抗体依赖的细胞介导细胞毒作用(ADCC), 起到免疫调节、识别非己和外来入侵微生物的作用。因此, 我们通过系列观察健康供者外周血 T 淋巴细胞表面活化信号(CD4+CD28+细胞及 CD8+CD28+细胞)的变化, 活化 T 淋巴细胞(CD4+CD25<sup>low</sup>)和调节性 T 细胞(CD4+CD25<sup>high</sup>)的比例改变以及对单核细胞和 NK 细胞的数量及抗原表达的影响。确定 G-CSF 减弱供者淋巴细胞对异体抗原反应的免疫学基础, 并随访观察这种变化是否对健康供者产生不良影响。

## 1 材料及方法

**1.1 供者** 进行造血干细胞捐献的健康供者 30 人(来自中国造血干细胞捐献者资料库北京管

理中心), 男性 19 人, 女性 11 人, 中位年龄 28 (14~56) 岁。全部供者常规体检未发现异常, 并签署知情同意书。

**1.2 造血干细胞动员** 惠而血 (G-CSF, Kirin company) 5ug/kg, 皮下注射, 根据外周血 CD34+ 细胞数量, 动员时间为 4~5 天。

**1.3 标本的采集** 分别于 G-CSF 动员前、动员后 (造血干细胞采集当日)、采集后第 7 天及采集后 1 个月收集供者外周血标本 2ml。

**1.4 流式细胞仪分析** 流式细胞仪 (FACScalibur, 美国 BD 公司) 的发射激光为氩离子激光器, 功率为 15Mw, 激发光波长为 488nm。采用 Cell Quest 软件进行分析, 其中 FITC、PE、PE-CY5 荧光分别设在 FL-1、FL-2 及 FL-3 荧光通道上, 测定前以标准校正荧光微球校正仪器, 每测定管收集 10000 个细胞。抗体标记: (1) CD3-PerCP+CD4-FITC+CD25-PE; (2) CD3-PerCP+CD4-FITC+CD28-PE; (3) CD14-PerCP /SSC 设门确定单核细胞群; 选择 Multiset 试剂盒检测 NK 细胞的绝对数量。

**1.5 观察指标**

**1.5.1 CD28 在 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞表面表达** CD3-SSC (side scatter 侧向角) 设门, 显示 CD4/CD28, 计算 CD4+CD28+T 细胞、CD8+CD28+T 细胞 (CD4-CD28+T) 分别占 CD4+T 细胞和 CD8+T (CD4-T) 细胞百分比, 并观察 CD28 分别在 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞表面相对荧光强度 (RMFI) 表达。RMFI 采用美国-加拿大一致推荐的标准<sup>[8]</sup>。

**1.5.2 CD4+CD25low 及 CD4+CD25highT 细胞检测** CD3-SSC 设门, 显示 CD4/CD25, CD4+CD25low 和 CD4+CD25high 细胞群, 分别计算其占 CD4+ 细胞的百分比。CD4+CD25low 细胞为活化 T 淋巴细胞, CD4+CD25high 细胞为调节性 T 细胞。

**1.5.3 细胞绝对数量** 单核细胞: 流式细胞仪收集 10000 个白细胞, CD14+ 单核细胞群的百分数, 与当天血细胞计数仪检测的白细胞总数换算出单核细胞的绝对数量; NK 细胞: Multiset 软件直接获取、分析及打印结果。

**1.5.4 相对荧光强度 (RFI)** 采用美国-加拿大一致推荐的标准<sup>[7]</sup>。

**1.5.5 动员后随访** 分别于动员后 1 周和 1 个月对 30 名健康供者进行随访观察,

**1.6 统计学分析** 在 SPSS11.5 统计软件支持下对上述观察指标进行配对 t 检验, 以  $P < 0.05$  作为显著性检验的标准。

**2 结果**

**2.1 动员后 T 淋巴细胞表面 CD28 表达及 CD4+CD25lowT 细胞的变化**

G-CSF 动员后 CD28 在 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞表面平均荧光强度表达减弱, 同时 CD4+CD25lowT 细胞在 CD4+T 细胞中百分比降低, 在停用 G-CSF 后第 3 天 (T3) 为最低值, 至停药后 7 天基本恢复至动员前水平 (表 1)。

表 1 动员前后 CD4+ 细胞、CD8+ 细胞表面 CD28 表达及 CD4+CD25low 细胞的变化

观察指标	T1	T2	T3	T4	P1	P2	P3
CD4+ 细胞 CD28 RMFI	14.91±6.10	13.41±5.36	11.93±5.39	14.65±6.99	$P=0.037$	$P=0.034$	$P>0.05$
CD8+ 细胞 CD28 RMFI	11.10±3.74	9.53±3.34	8.53±3.74	10.81±4.93	$P=0.007$	$P=0.033$	$P>0.05$
CD4+CD25low (%)	21.40±8.87	18.48±6.95	18.23±5.89	23.00±5.88	$P=0.018$	$P>0.05$	$P>0.05$

注: P1 指 T1 与 T2 比较, P2 指 T1 与 T3 比较, P3 指 T1 与 T4 比较。

## 2.2 CD4+CD25highT 细胞的变化

动员后 CD4+CD25highT 细胞占 CD4+T 细胞百分比升高；在停用 G-CSF 第 3 天下降，7 天后恢复到动员前水平（表 2）。

表 2 动员前后 CD4+CD25highT 细胞占 CD4+T 细胞百分比的变化

观察指标	T1	T2	T3	T4	P1	P2	P3
CD4+CD25high (%)	4.16±1.62	6.43±2.46	4.35±1.85	4.87±1.80	$P=0.000$	$P>0.05$	$P>0.05$

注：P1 指 T1 与 T2 比较，P2 指 T1 与 T3 比较，P3 指 T1 与 T4 比较

**2.3 对细胞绝对数量的影响** 动员后（造血干细胞采集当日）单核细胞和 NK 细胞的绝对数量分别增加 5.45 倍（1.41~10.23， $P=0.000$ ）和 2.16 倍（0.81~3.54， $P=0.000$ ），于采集后 7 天已降至正常范围（见图 1）。

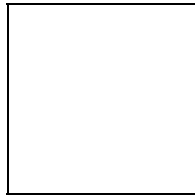


图 1 动员前后单核细胞和 NK 细胞绝对数量的变化

**2.4 对抗原表达强度的影响** 单核细胞：动员后 CD14 的抗原表达强度与动员前相比无统计学意义的改变（ $P=0.120$ ），HLA-DR 表达减弱（ $P=0.010$ ），于动员后 1 月恢复。NK 细胞：动员前后比较 CD16/CD56 的抗原表达强度的改变无统计学意义的差异（ $P=0.928$ ）（见图 2）。

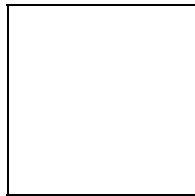


图 2 动员前后单核细胞和 NK 细胞表面相对荧光强度（RFI）的变化。

## 3 讨论

造血干细胞移植涉及到供者与受者两个方面。从受者的角度考虑，应用 G-CSF 后收集的采集物可以减轻 GVHD 的发生减少移植相关风险，这与奉献爱心、捐献造血干细胞的健康供者的心愿是一致的。我们关注的是这种结果是如何发生的以及这种变化是否给健康供者带来不利影响。

在评估对健康供者免疫参与细胞的影响时，观察细胞的数量变化非常重要，具有一定数量的免疫细胞才能保证免疫功能的正常维持。但从抗原与抗体结合能力考虑，监测细胞表面抗原表达强度更为重要。因而，我们从细胞的数量和细胞抗原表达强度两个方面进行评估。

供者 T 淋巴细胞活化、增殖并释放细胞因子发挥生物学效应是 GVHD 发生的主要环节。目前的研究证实 G-CSF 可以使 T 细胞细胞的免疫应答能力减弱，免疫应答的发生需要两个独立且有协同作用的信号，第一信号是通过 APC 上的白细胞抗原及 T 细胞受体（TCR）复合物传递，决定免



疫应答的特异性；第二信号（共刺激信号）是非抗原特异性，通过 T 淋巴细胞表面受体和 APC 上相应配体传递。由 APC 上表达的 B7 分子（B7-1 和 B7-2）及 T 淋巴细胞上的 CD28 受体组成的 B7/CD28 是一条重要的 T 淋巴细胞共刺激通路，启动免疫应答。当 CD4+T 淋巴细胞接受刺激信号被激活后，其表面可表达高亲和力 IL-2R（CD25<sup>low</sup>）并分泌 IL-2，介导 T 细胞增殖和分化。因此，T 细胞表面 CD28 和 CD25<sup>low</sup> 表达情况可反映 T 细胞的功能状态。

我们的观察结果证实：（1）应用造血干细胞动员剂 G-CSF 可以使 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞表面 CD28 表达减弱。（2）CD4+CD25<sup>low</sup>T 细胞占 CD4+T 细胞百分比降低，亦提示在 CD4+T 细胞中活化细胞数量减少。如上结果提示，G-CSF 可以使机体 T 淋巴细胞处理异体抗原的能力降低，有利于减轻受者 GVHD 的发生。这与造血干细胞捐献者的意愿是一致的。我们的问题是这些变化是否对健康供者产生有不良影响？以及这种变化的持续时间？因健康供者不涉及与异体细胞的接触，当完成了造血干细胞捐献过程后，如上变化可以在短期内恢复到用药前水平，在对供者随访的过程中发现，供者在捐献造血干细胞后并未出现感染发病增加的现象。

在移植免疫领域内有多种具有免疫调节功能的 T 细胞存在。我们观察动员后调节性 CD4+CD25<sup>high</sup>T 细胞在 CD4+T 细胞中的百分比升高。近年来陆续有人报道调节性 T 细胞在诱导同种异体移植耐受中起着重要的作用，并认为可以通过细胞接触的方式抑制活化 T 淋巴细胞增殖形成免疫耐受。因此动员后供者外周血中这种调节 T 细胞增多，输入受者体内，可能发挥免疫抑制作用，与 GVHD 降低有关，对于受者是有利的。CD4+CD25<sup>high</sup> 调节性 T 细胞参与免疫反应过程中的负调节作用，在稳定免疫平衡方面发挥着重要作用。应用 G-CSF 后这种细胞在短期内的升高对健康供者及患者均无不利影响。

NK 细胞在抗感染、抗肿瘤及免疫调节方面均具有重要作用并有利于造血干细胞的植入和减轻 GVHD。我们的结果证实，应用 G-CSF 后可以使外周血 NK 细胞的绝对数量在短期内增加，完成造血干细胞采集过程后恢复动员前水平。同时我们的观察发现，参与 ADCC 功能的 CD16（Fc 受体）表达强度不减弱。

单核细胞是另一个参与免疫应答反应的免疫细胞，其功能之一是吞噬功能，清除病原菌；参与清除细菌脂多糖（LSP）的受体为 CD14，其 CD14 分子表达的数量与清除 LSP 的能力有关；对于健康供者而言，抗感染免疫是非常重要的，每天需要防御外来微生物的入侵。然而，单核细胞的数量和 CD14 的表达强度非常重要。应用 G-CSF 动员后，单核细胞的绝对数量在短期内增加以及 CD14 抗原表达不减弱，推测不影响供者单核细胞的对细菌脂多糖的吞噬能力。在对供者随访的过程中发现，健康供者在捐献造血干细胞后并未出现感染发病增加的现象。单核细胞的另一个重要功能是作为抗原递呈细胞（APCs）处理和递呈抗原肽到达 T 淋巴细胞，激活一系列免疫应答反应，其中包括 GVHD。这一免疫应答过程与 APCs 表面的 HLA-DR 表达数量有关。因而当单核细胞表面 HLA-DR 抗原表达减弱时，使移植排异反应发生的第一信号系统的反应减弱，有利于减少 GVHD 的发生。因供者不涉及与异体细胞的接触，当完成了造血干细胞捐献过程后，HLA-DR 的表达可以逐渐恢复到用药前水平。因而对健康供者而言如上变化无长期不利影响。

总之，应用造血干细胞动员剂 rhG-CSF 可以导致血细胞动力学、免疫学及脾脏的改变，但经随访观察均在 1 个月内恢复到移植前水平，并在随访观察期供者无不适感觉，说明 rhG-CSF 作为造血干细胞动员剂对健康供者的如上观察指标无长期不可逆影响。

## 第三部分 大会交流

### 分 库

#### 3-1

### 注重环节是保证工作成效的关键

刘耀堂 苏晓东

陕西分库（710016）

陕西分库自 2003 年成立以来，按照中华骨髓库国家管理中心的工作思路和指导思想，坚持落实科学发展观，坚持以人为本，供患至上，注重工作环节，不断提高工作的质量和效率，经过几年的努力，各项工作取得了长足发展，目前分库已有近 6 万人份的 HLA 分型数据入库，有 48 人成功实施捐献。现结合我分库工作实际，谈几点体会。

#### 一、扩大影响、纵深发展

加大宣传造血干细胞知识的普及率，让更多的人了解造血干细胞知识和捐献知识是基础工作，只有把基础工作搞好了，搞实在了，后面的各项工作才能做好。现在许多群众特别是农村群众对造血干细胞的知识还很贫乏，有些人根本就不知道什么是造血干细胞，至于捐献过程就更不懂了，过去我们只把宣传工作停留在大城市的高校、机关、社区等，显然是很不够的，我们意识到，宣传工作必须向农村基层发展，做法上：一是充分发挥省、市立体、平面及广播电台媒体的广辐射宣传作用；二是人员经常深入基层，到农村面对面的对群众做动员宣传；三是安排让大学生志愿者寒暑假回家时带上宣传材料，回到家乡做宣传动员等。通过一系列的扎实宣传，使宣传工作从城市逐渐向农村纵深发展，效果很好。去年以来，仅西安郊区农村就有数百名农民朋友自发地成为了造血干细胞捐献志愿者。

#### 二、严把入库、宁缺毋滥

在志愿者报名登记时，我分库门槛就较高，要求较严，在血样采集时让志愿者切实了解造血干细胞知识和捐献知识，告知其一定要深思熟虑，考虑清楚，并告诉本人如果加入了就不能有反悔，打牢其思想基础，坚定其捐献信念。一般来说，只对那些通过了解知识后意志坚定的志愿者进行报名登记、采集血样，尤其对年轻人要求其与家人商量沟通，并同意后再做这件事。在实际操作中，我们深深地体会到，只有把住入库关，再动员，实施捐献工作就比较容易了，我们的共识是：宁肯不采集，也绝不能把不坚定捐献的资料录入，不带“病”入库。

#### 三、保持联络、防止丢失

在工作中，我们常常为入库志愿者因变更联系方式而不能联系到人而立之年苦恼万分，为防止

入库志愿者信息的流失，多年以来，我们在志愿者资料入库时，就让其多留联系方式和具体住址，一定要留下家里的固定电话，并告知如果联系方式发生变化及时地通知我们，多年来我们一直想方设法和入库的志愿者保持联系，充分利于网络，电话，信箱等经常和志愿者联系，拉家常，谈工作，论学习，充分了解志愿者的思想和心理状况，拉近距离，这也是为再动员做铺垫的过程，今年我们又开通了手机短信平台，逢年过节都通过短信对志愿者们表示问候和祝福，也常询问其所在位置，联系方式是否变更，及时提醒志愿者变更联系方式时通知我们，几年来，我分库共收到变更联系方式志愿者多达 2000 多人，通过这些办法，我们随时掌握着志愿者的去向，有效防止了与志愿者联系信息的丢失。

#### 四、高分采集、把握细节

几年来，我们十分重视高分采集这一重要环节，因为志愿者往往在报名登记、资料录入之后，就基本上只是通过电话联系，而没有面对面的进行交流的机会，且由于配型时间较长，少则几个月，多则好几年才有少数人有机会进入高分采集阶段，这期间，有些志愿者受外界各种因素的影响，可能会出现思想上的一些波动，所以高分采集就是一个坚定捐献者信心的好机会，我们在和志愿者签定《高分辨检测知情同意书》的时候，一定会和志愿者见面交谈，给捐献者再次讲解造血干细胞捐献知识，赠送我分库的纪念画册，使其了解造血干细胞捐献的过程和捐献者的风采等，动之以情，晓之以理，必要时还陪同志愿者到移植医院听取专家的讲解。事实证明，只有让志愿者亲眼所见，亲耳所闻，全程透明了解事实，才能使志愿者抱定捐献的意愿。

#### 五、捐献过程、全程陪同

捐献过程中人性化的陪护是我们分库总结出来的行之有效，切实可行的好办法，在志愿者入院到出院捐献造血干细胞过程中，我分库工作人员实行全程陪护，不仅安排好志愿捐献者的食宿，还象亲人一样地接待好捐献者的所有亲属，做好亲属的工作，因为我们十分清楚，能够得到其亲属的全力支持，捐献工作就好做了。我们还时常邀请我省已捐献过造血干细胞的志愿者在有捐献时陪同捐献，讲述自己捐献过程和亲身感受，消除正要进行采集造血干细胞的志愿者的心理畏惧，如在采集中志愿者因久卧或缺钙等感到肢体麻木时，我们除及时补钙外，时常的做法是让捐献者听音乐放松和给予轻抚按摩等，以缓解捐献者的心理紧张和身体上的不适感。

#### 六、建议立法、杜绝弃捐

我们深感，为防止志愿者在临捐献时弃捐，有必要在深入研究的基础之上，提请有关上级法律部门设立一个旨在能约束志愿者一旦签署《捐献造血干细胞同意书》之后，再绝不能反悔的法规性文件，因为仅从道德层面上的说教不足以约束捐献志愿者的个人弃捐行为，当患者已进入无菌舱，而突然出现由于捐献者本人拒绝捐献我们通过任何方式都无法说服捐献者或坚决阻挠捐献的家属时，我们便显得十分无奈与进退两难的境地，那么探索出一条行之有效的能够规范捐献者履行承诺的办法，是很有必要的。

## 坚持以人为本 认真做好干细胞捐献服务工作

马俊娥

山东分库（250011）

中国造血干细胞捐献者资料库山东省分库自建立以来，在总库管理中心的领导、关心和支持下，本着“以供者为本，为患者负责”的精神和原则，积极工作，无私奉献，认真做好为干细胞捐献志愿者在捐献前、捐献中、捐献后各个阶段的服务工作，努力提高捐献成功率，确保捐献者的身体健康和待移植患者的生命安全。到目前为止，山东分库未发生过捐献志愿者临阵反悔的情况。我们的具体做法是：

一、认真扎实做好再动员工作。工作中我们注意到，绝大部分志愿者对捐献造血干细胞的意义认识清楚，思想坚定。但也有部分志愿者当时报名时仅凭着一时的热情或处于某些客观因素的影响参加了分型取样，也有一部分人报名时没有征求家长亲属的意见，完全自主报名。这些人中的一部分当初筛、再动员时，便出现了忧郁或是家属不同意的情况。对此情况，我们一般不轻易放弃，一是我们所肩负的挽救白血病患者生命的责任感不容我们轻易放弃，二是我们干细胞捐献者资料库的每一例分型入库资料，一定要最大限度的发挥它的作用，决不能轻易流失。我们对这些思想不稳定的志愿者，坚持做到摸清情况，有针对性的去做再动员工作。如有一位家在农村的大学生，在学校里报了名，并取了血样，没有告诉家长，分型资料初配相合后，他非常坚决，但被农村的父母知道时，由于家长对捐献的知识不了解，坚决反对孩子捐献。为说服家长，支持孩子的行动，我们邀请了医院的血液科主任和这位学生在医院做院长的舅舅，下农村登门如户去给学生家长做工作，耐心讲解血液、干细胞、骨髓与人体生命的关系和捐献造血干细胞挽救白血病患者生命的重要意义，努力消除家长对孩子捐献造血干细胞的恐惧心理。通过做工作和知识的讲解，这位学生的家长同意并积极支持孩子的爱心行动，确保了捐献工作的顺利实施。工作中，我们坚持以供者为本和对患者负责的原则，在认真做好动员工作的前提下，完全尊重捐献者个人意愿。坚持做到鼓励志愿者捐献，但不勉强捐献，只有当志愿者从思想上真正坚定了捐献的决心后我们才进入下一步的捐献服务程序，做到在采集阶段不出问题。

二、制订完善的采集服务计划。每当我们接到总库管理中心的采集通知单以后，我们本着以供者为本的原则，在第一时间，除及时通知供者以外，还立即做出一份书面的造血干细胞采集服务计划，计划中将整个干细胞采集前、中、后不同阶段的服务要求，包括时间、地点、人员、职责以及联系方式等内容进行明确，对参加服务的工作人员实行责任制管理，对各个环节衔接都有明确的要求，明确一名统筹协调管理工作人员，对整个供者服务全过程按计划要求进行全面检查和督导，及时协调和解决捐献工作中出现的问题。这个计划，供者采集入院前就发给包括供者在内的有关人员每人一份，使参与这项工作的每个人都提前做到心中有数。通过这份计划，使供者进一步感受到了捐献干细胞的严肃性和各方面的重视程度，进一步增加了志愿者捐献的决心和安全感，通过捐献采集计划，进一步体现了干细胞捐献服务人员对工作认真负责的精神，提高了供者对我们服务工作的

满意度，同时，也使的供者家属对亲属捐献干细胞更加放心，更加支持。

**三、尽量避免客观因素的干扰。**工作中我们感到，供者捐献的决心和信心是否在最后时刻发生动摇，来自家属的影响是第一位的。我们本着为患者负责的精神，确保供者在干细胞采集期间不发生思想波动甚至悔约，我们的做法是，志愿者住院采集捐献期间，我们派固定的工作人员陪护服务，对所有看望供者的人员，规定集中在捐献的第一天或第二天某一个时间和地点集体看望，一般不提倡供者家属陪同，或有过多过频的人员看望。这样做，最大限度的减少了一些外界因素的干扰，即保证了供者在捐献期间的休息和健康，又控制了捐献者由于来自家属等方面的影响而动摇采集捐献的决心和信心。

**四、谨慎处理捐献服务工作中的突发情况。**在供者采集捐献的不同时期，由于各方面的因素，可能会出现一些突发情况。如志愿者突然身体不适，或是入院后出现检验误差，此时，我们的工作面临着巨大的压力和考验，一方是供者的健康，一方是患者的生命。再处理此种情况时，我们牢牢把握“以供者为本，为患者负责”的原则，积极谨慎的处理有关情况。在发现有可疑情况时，我们以最快的速度、在最短的时间内分别及时报告给总库管理中心和移植医院，同时，与有关专家联系协商，研究确定处置方案和预案，并且把所有的情况和计划一一向供者说明，积极争取志愿者的配合和支持。干细胞捐献工作开展以来，我们曾三次遇到供者在临住院时发生一些突发情况，但由于我们处理的稳妥、及时、得当，即没影响供者的健康按时采集，同时，也确保了患者按时移植。

**五、注意不断总结捐献服务工作经验。**为更好的坚持好“为供者服务，为患者负责”的原则，我们在工作中注意不断总结经验。首先认真学习总库管理中心制订的《中华骨髓库供者服务标准和程序》，学习上级有关文件精神，做到认真按要求、按程序进行工作；二是注意学习兄弟分库的工作经验，做到取长补短，不断修订我们的服务计划；三是注意征求供者的意见，做到每捐献一例，我们都请供者给我们的服务留下感受和对工作的建议，以此不断完善我们的服务；四是积极协调采集医院等有关方面的关系，在征求供者意见的基础上，及时向采集医院反馈供者对医院在服务工作中的建议，以促进供者服务工作整体水平的提高。

非血缘关系造血干细胞捐献工作在我国开展时间还不长，捐献服务工作做的是否到位，这关系到中华骨髓库的声誉，同时更关系到供者、患者的健康和生命。我们一定要在总库管理中心的领导和支持下，通过积极的努力，不断总结经验，完善措施，为中华骨髓库的建设和为供者服务水平的不断提高做出我们应有的贡献。

### 3-3

## 加强志愿者心理辅导 确保再动员成功率

贾伍亮

甘肃分库（730030）

随着库容量不断增加，总库管理中心通知我分库的初筛、再动员、高分辨及体检通知明显增多。2008年1~3月份初筛人数已达15人次、再动员9人次、高分辨1人次，仅进入初筛阶段的人数

就超过前两年的总和。2007年我分库新增入库数据3131人份，已接近过去四年入库总和。

我们在工作实践中体会到，干细胞捐献工作不单纯是供者与患者之间的关系，分库工作人员与志愿捐献者及其家庭成员之间的交流与沟通至关重要。再动员过程中，不仅要求工作人员掌握全面的干细胞移植相关知识，还需要把握人与人之间的沟通技巧和社会心理学知识。细微全面地掌握志愿者及其亲友的心理、情绪等变化，充分运用社会心理学中的心理——行为模式，耐心细致地做好针对性的心理辅导，引导他们正确认识捐献造血干细胞的重大意义，使志愿者做到捐献前深思熟虑，捐献时义无反顾。

### 一、运用社会心理“从众——亲社会”行为，扩大宣传。

从众是指个人的观念与行为由于群体的引导或压力，而向多数人相一致的方向变化的过程。产生从众的原因有行为参照、群体的凝聚力及对偏离的恐惧，基于此种心理而产生的行为有亲社会行为，即指一切符合社会期望而对他人、群体或社会有益的行为，这种行为产生的过程大致可分为四个阶段：1. 注意到事件的发生；2. 如何解释周围的特殊事件，是否把事件当作应急事件；3. 确定自己是否有干预应急事件的责任；4. 在确定设法帮助后，个人还需评价自己是否有能力帮助，用什么方法帮助。采样宣传阶段，我们充分借助志愿者的社会心理从众而产生的亲社会行为，选择人员较为密集的广场、社区、学校等，精心布置宣传场地，大力营造浓厚的宣传氛围，加之以播放公益短片等形式使公众注意到事件的发生，在人数达到一定数量后，适时发放宣传材料，耐心讲解相关知识，以吸引更多的人加入到志愿捐献的行列。

### 二、初步配型成功志愿者再动员的普遍心理现象。

在造血干细胞捐献过程中，真正意义的干细胞移植可能只需要一周左右的时间，但是从初筛到移植前的各项准备工作可能需要几个月甚至更长的时间，从初筛到再动员过程中排除高分辨及体检等客观因素外，遇到的最大阻力是再动员过程中志愿者家属、亲人、朋友的反对。初筛时，往往只考虑志愿者本人的意见和态度，加之在采样时志愿者已经在一定程度上了解了捐献的相关知识，所以初配阶段的志愿者大多都能同意捐献。但在再动员过程中，由于家属和亲友对干细胞捐献知识不是很了解，存在一种恐惧（害怕）心理，他们的意见又往往是左右志愿者意志的重要因素，导致个别志愿者放弃捐献。

干细胞捐献过程中的恐惧心理与首次尝试没吃过的食物一样，大多是基于自我保护的心态，而不愿意接受新鲜事物。我们认真总结以往经验，从心理学角度出发，通过形式多样的宣传和心理辅导，提高他们对事物的认知能力，扩大认知视野，降低他们的恐惧（害怕）感，引导他们积极参与到干细胞知识的普及和捐献的行列。

#### 1. 多层次深入宣传，消除恐惧心理。

针对志愿者心理上存在的恐惧感，我们改变以往边宣传边采集的传统模式为宣传答疑、专家讲座、现场采样三个步骤，使每位志愿者确定了解干细胞捐献过程后再进行血样采集，并建议捐献者广泛向身边的亲属、朋友宣传捐献造血干细胞的意义及安全性，尽可能地使家属和亲友消除恐惧感。

#### 2. 利用亲社会的榜样力量，消除恐惧情绪。

2006年9月，甘肃省第一例非血缘造血干细胞成功捐献，捐献者受到了李膺副省长等领导的热情接见。我们紧紧抓住这一时机，通过甘肃日报、兰州晨报、西部商报等多家媒体对这一事迹从

不同角度、不同层面进行了全方位的跟踪报道，捐献者本人被评为“2006 感动甘肃十大陇人骄子”，被团省委授予“五四青年标兵”，达到了扩大宣传，提高民众认识的目的。同时邀请省血液中心的专家、捐献者及各高校学生组织在省内各大院校举办了 10 余场造血干细胞捐献事迹报告会，使造血干细胞捐献工作在高校这一群体中得到广泛认同，掀起了一个志愿捐献造血干细胞的热潮，使更多爱心人士踊跃加入到了捐髓救人的行列。

### 3. 运用社会心理——服从行为，强化责任意识。

社会心理--服从指个人按照社会需求、群体规范或别人的愿望而做出的行为，这种行为是在外界因素的影响下而发生的。结合我分库大学生志愿者较多的特点，我们加强与各高校团委的密切合作，在再动员阶段通过校团委辅导老师与志愿者交流，增强了志愿者的责任感，较好地降低了捐献的反悔率。

#### 三、加强“环境—认知—行为”模式的运用。

2007 年 6 月 21 日，我分库工作人员接到总库管理中心的通知，我分库一名供者与北京某患者初配成功，当分库工作人员征求她本人意见时，她坚定地答应了志愿捐献要求，并主动配合分库向家人介绍捐献活动过程，取得家人的理解和支持，积极配合分库进行捐献前的各项准备。但是当 10 月 23 日接到总库管理中心关于采集造血干细胞的通知，再次联系到她时，情况与前期有了很大的不同。经过深入的了解，得知这位志愿者近段时间感情上遇到了很大挫折，情绪抑郁，从她的父母处得知，近段时间无端的发脾气、争吵、摔东西。尽管她仍执着答应捐献，父母也非常支持，但我们还是担心她的身体和心理状况能否胜任捐献。

面对这一特殊情况，分库工作人员一方面从捐献者角度出发，从工作、生活、个性等方面认真分析影响她情绪的各种因素，另一方面从心理医生处了解到捐献者目前的状况只是一种心理情绪，就如同心灵的一场小感冒还不构成心理问题。

了解上述情况后，工作人员本着捐髓救人的理念，一方面通过捐献者的父母（环境）为其创造有利于改变其认知方式与行为模式的环境，同时工作人员还动员和她一起长大的一位好朋友引导她尽量多参加一些社会活动改变其失真的认识方式（认知），拓展其精神视野，让供者逐渐接受多元化的观念。另一方面分库工作人员利用精神转移法邀请她到分库参观并使其参与到分库的一些日常工作中（行为），使其尽快走出情绪低谷。经过一段时间的调整，她的情绪有了明显好转，摆脱了心理阴影。虽然此次捐献工作因患者原因最终未能实现移植，但使我们深刻地体会到，再动员工作不仅仅是一项单纯的社会工作，它还需要我们工作人员能敏锐地把握供者的心理变化，帮助供者拥有一个健康的心理状态，在捐髓救人的同时，也能让供者感受到这项工作的崇高和光荣，为以后的配型工作奠定基础。

“十一五”期间，甘肃省分库每年将新增 3000 人份的入库资料，将使更多的患者能在这里找到合适的干细胞配型而获得重生。我分库将不断创新工作方式方法，进一步提高工作效率和质量，积极为构建和谐和谐社会做出新的更大的贡献。

## 注重志愿者心理 全面降低反悔率

左 彤 侯晓俊

山西省分库

山西省分库管理中心自 2005 年 1 月成立以来，得到山西省委、省政府的高度重视，在中华骨髓库管理中心和山西省红十字会及各有关部门、社会各界的大力支持下，工作进展较快。截至 2008 年年底，采集志愿者血样标本并进行 HLA 检测 4.6 万人份，目前，山西省分库有 30 名志愿者为患者捐献了造血干细胞，其中 2 名志愿者分别为新加坡和韩国患者进行了捐献。山西省分库的工作成效赢得了各方面的普遍赞誉，树立了良好的社会形象，2007 年 5 月，山西省分库获得省直机关工作委员会、省直机关劳动竞赛委员会授予的“山西省直机关模范单位”荣誉称号。工作中我们体会到最大限度地做好志愿者动员工作，注重志愿者心理，是全面降低反悔率的重中之重。

### 一、不同情况下志愿者的反悔心理

针对各省都存在志愿者反悔情况，山西省分库对本省志愿者的反悔心理进行了分析，大致有以下几种。

1. 从众心理造成的反悔：在高校、单位等进行集体活动时，一些志愿者具有随大流的从众心理，考虑欠妥，一时冲动，担心不参加活动会被认为态度不端正、表现不积极，同时对造血干细胞相关知识及捐献意义认识模糊，从而导致志愿者盲目入库，当有患者与其配型相合后找各种理由反悔。

2. 侥幸心理形成的反悔：一些志愿者觉得配型相合概率之低就如同彩票中大奖，不可能发生在自己身上，报个名也无所谓，抱有侥幸心理；还有些志愿者报名入库时没有征得家人同意，当有患者与其配型相合时，觉得事关重大，有必要征求家人意见，最终因父母或配偶强烈反对而反悔。

3. 外界压力促使的反悔：个别志愿者在初动员和再动员阶段都是同意的，而在准备进行高分辨、甚至是体检时出现了反悔，究其原因就是家人甚至是整个家庭的反对、干涉和阻挠，志愿者本人在内心矛盾而又无法说服其家人的情况下使捐献行为夭折。

### 二、注重工作技巧，做一名“心理咨询师”

在日常工作中，我们不断加强社会学、心理学的学习，面对不同的人群、不同的知识层面、不同的工作环境及家庭情况，注重工作技巧，针对志愿者的不同心理，努力做一名“心理咨询师”。

2.1 跟志愿者通电话时，晓之以情，动之以理，运用文明礼貌用语、和风细雨的语气及娴熟的专业知识进行详细的介绍和讲解，使志愿者很愉悦、很信服，有利于工作进入下一个阶段。

2.2 请志愿者到管理中心座谈时，先聊家常后播放造血干细胞科普知识和本省造血干细胞捐献者采集内容的光盘。通过聊家常“摸清”了志愿者的学习、工作、家庭及社会情况，再让其观看宣传光盘，让其进一步了解捐献造血干细胞知识及相关程序，使志愿者站在科学、理性的角度上认识其重要性，由感性认识上升至理性认识，由模糊认识到思路清晰，从而深思熟虑地做出捐献造血干细胞的决定。



2.3 时刻了解志愿者的心理动态，对志愿者进入不同的阶段进行不同的心理引导，使其具有足够的心理准备。如志愿者初筛同意进入再动员阶段时，我们则强调患者将支付高额的高分辨检测费，强调其不可反悔，如志愿者有不负责任的做法将会使患者造成经济损失及不利治疗的后果；如志愿者体检合格到了等待采集的阶段，我们则着重强调此时患者已进行临床大剂量的放疗、化疗，已没有了造血功能及免疫力，如此时不捐造血干细胞，无异于将患者置于死地，同时让捐献者保持最佳状态，尽量减少外出，不要感冒，力求使“生命火种”最佳的移植给患者。

2.4 我们经常加强山西省分库及造血干细胞工作站工作人员的业务能力及整体素质的培养，举办各种培训班，尤其注重谈话技巧，每个工作人员都要成为行家里手。特别是工作人员在陪护期间，更应注意捐献者的心理动态，减少外界干扰因素，针对性地制定“应急预案”，及时发现问题、解决问题，具备处理突发事件的能力，做到“未雨绸缪，防患未然”。

### 三、加强宣传力度，普及造血干细胞捐献知识是降低反悔率的基础

我国大多数人群对捐献造血干细胞仍然存在较大的抵触心理。事实上，国人是 不乏爱心和奉献精神 的，救人之 心，人皆有之。我们认为，消除志愿者及家人的疑虑和恐惧心理，就是要加大宣传力度，循序渐进、持之以恒地加以广泛、深入的宣传普及造血干细胞捐献知识是降低反悔率的基础。

3.1 充分发挥媒体鼓与呼的宣传作用。近年来，山西省分库及各市红十字会抓住本地区造血干细胞捐献者的宣传契机，在当地举办新闻发布会、表彰会或进行捐献者感人事迹的宣传，大力弘扬捐献者的无私奉献、积极参与公益事业的爱心善举。据不完全统计，三年来，全省各级媒体在电视、电台、报纸、网络等刊（播）消息 1160 余条。

3.2 充分发挥捐献者“现身说法”的宣传。我们发现捐献者的“现身说法”很具有影响力和感染力，志愿者对捐献者的亲身感受和体会十分信服。鉴于此，山西省分库适时举办了造血干细胞志愿者、捐献者联谊会及座谈会，通过省城记者对多名志愿者捐献造血干细胞“无损健康、对己无害”“现身说法”的报道，消除了人们的疑虑，充分展示了捐献者的风采，取得了较好的宣传效果。

3.3 充分挖掘捐献者的“亮点”进行宣传。为使媒体报道不“疲软”，我们在每一位捐献者的身上找“亮点”，诸如：全国煤矿系统第一位造血干细胞捐献者、过一个特殊意义的“三八”、省城爱心“的哥”的别样生日、19 岁阳光女孩捐献干细胞、记全省第 30 例造血干细胞捐献者等“亮点”，都吸引了媒体的广泛关注。我们给媒体提供捐献者入库及采集过程、相关知识介绍及宣传折页和光盘，拟好新闻通稿，统一时间通知记者，避免“独家报道”，使省城电视、电台、报纸、网络等 10 多家新闻媒体给予多方位、多角度、多层次的跟踪报道，达到了预期的宣传效果，取得了较好的社会反响。

### 四、把好入库关是降低反悔率的关键

为降低志愿者的反悔率，把好入库关是关键。

4.1 一些高校、单位搞集体活动进行宣传和志愿者入库时，山西省分库前期先进行造血干细胞知识专题讲座，让大家都充分了解加入资料库对拯救患者生命的重大意义，如果没有考虑成熟可以暂时不进行报名登记，一旦登记入库，就要有和患者配型相合的心理准备。同时加强志愿者的责任心、诚信感，履行承诺，负起责任，不使国家经费浪费、患者失望。

4.2 目前，山西省志愿者报名登记及采集血样工作仍然是依托各市红十字血液中心（红十字中

心血站)完成。山西省分库及造血干细胞工作站的工作人员经常对红十字血液中心(红十字中心血站)献血屋及采集小分队工作人员进行造血干细胞知识及报名登记、入库要求的培训。

4.3 山西省红十字会捐献造血干细胞志愿服务队经常组织志愿者在各献血屋进行造血干细胞知识宣传。在无偿献血者中积极招募捐献造血干细胞志愿者,一是符合捐血条件者,即符合捐造血干细胞条件;二是经历献血会对捐献造血干细胞产生较强的心理支持,利于减轻志愿者的恐惧感。

#### 五、加强人文关怀理念,做好人性化服务

山西省分库认真做好全员全程质量控制工作,加强人文关怀理念,做好人性化服务,对志愿捐献者做到诚心、耐心、精心。

5.1 对高分辨不吻合的志愿者,我们通过电话或短信委婉告之,感谢其无私奉献、积极参与红十字公益事业的爱举。

5.2 在志愿者体检阶段,山西省分库要求采集医院(山医大二院)固定协调员,开辟体检中心及造血干细胞采集室“绿色通道”;与采集医院协调员提前预约体检及采集时间,为志愿者提供方便、快捷的服务。个别志愿者体检不合格终止捐献造血干细胞,我们也请体检中心给志愿者提出饮食注意事项或门诊治疗等人性化的建议等。

5.3 在捐献者采集造血干细胞阶段,山西省分库安排一名专职工作人员全程陪同,负责与采集医院(捐者)、移植医院(患者)及机场(运送干细胞)的联系、沟通与协调,并做好捐献者的服务工作:提前给捐献者缴手机话费,购买洗漱用品及食品、水果等,在采集室摆放鲜花,张贴宣传画,床头悬挂造血干细胞标志,营造温馨、舒适的氛围,使捐献者在采集期间轻松、愉悦地进行造血干细胞捐献,同时还给每位捐献者在采集期间进行照相和录像,并刻录光盘留做纪念。

5.4 为动员和呼吁全社会的人们积极参与到人道救助公益事业中,鼓励更多的志愿者加入到中国造血干细胞捐献者行列,2008年4月16日,山西省红十字会、省卫生厅联合下发《关于造血干细胞捐献者享受无偿献血者待遇的通知》。《通知》决定:对该省每位造血干细胞捐献者等同机采血小板捐献者享受折合800毫升血液的待遇。此次由省级红十字会和卫生行政部门联合发文,对造血干细胞捐献者给予等同捐献800毫升血液的待遇在全国尚属首家。

5.5 为加强和志愿者的联系与沟通,山西省分库在山西省邮政公司及志愿者的支持与帮助下,连续三年在春节期间向35000多名志愿者邮寄节日贺卡,在给志愿捐献者带去节日祝福的同时,也进行了造血干细胞的宣传;为降低志愿捐献者的流失率和反悔率,山西省分库在山西移动公司的大力支持下,于2008年7月采取群发短信方式向志愿捐献者进行温馨提示、节日问候等,进一步加强与志愿捐献者的联系与沟通,坚定志愿捐献者“参与公益,升华自我,拯救生命,奉献爱心”信念,使志愿者义无反顾地加入到造血干细胞捐献者的队伍中来,进一步把造血干细胞工作做好、做细、做扎实。

## 髓缘雪域 秋菊更艳

### ——西藏分库建设经验交流材料

(二〇〇九年五月二十日)

邓珠郎杰

中华骨髓库西藏分库，在西藏自治区党委政府的领导下，在中国造血干细胞捐献者资料库的关心、指导下，于2007年8月4日成立。西藏分库虽然是全国成立最晚的一个分库，但意义非凡，该分库的成立，填补了西藏没有骨髓库的空白，标志着中华骨髓库实现了“全国一片红”，成为能给全球华人提供造血干细胞捐献者资料检索的完整骨髓库，特别是为全球藏族华人提供了造血干细胞检索平台。分库成立以来，我们精心打造“髓缘雪域，秋菊更艳”的理念，积极探索专业化建设、规范化、制度化管理、品牌化培育的工作体系，做了很多卓有成效的工作，受到了社会各界的关注和赞誉。

我们的主要体会是：

#### 一、艰难起步，为西藏分库建设打下了坚实基础。

西藏位于祖国的西南边陲，平均海拔3000余米。由于受地理位置、交通、宗教等因素的影响，人们的文化素质偏低，对卫生医疗知识的了解不多，对“无偿献血、骨髓捐献”恐惧心里严重。加之我会成立时间短，编制人员少，办公地点小，专业人员匮乏。这些问题一直困扰着西藏分库的成立，一直是西藏自治区红十字会领导的一块心病。为使中华骨髓库西藏分库早日在雪域高原落户，我们采取分库未建，宣传先行的工作思路，在全社会大力宣传血液、骨髓捐献的意义，提高了群众对骨髓捐献的认知率，奠定了群众基础。采取在社会聘用人员派人到内地省市参观学习，和体制优化组合，解决了编制人员少，专业人员匮乏和分库办公地点等问题，有效开发了人力等资源。

#### 二、领导重视，使我们增强了建好骨髓库的信心。

自治区副主席、红十字会会长德吉十分关心西藏分库的建设工作，不但作出了重要指示，还经常过问建库的进展情况，亲自与自治区有关部门协商建库的有关项目；中华骨髓库国家管理中心刘静湖副主任于6月份到达拉萨，利用一周的时间具体指导建库工作；中华骨髓库国家管理中心还组织深圳的潘庆伟、黄凯先生进藏，帮助我会建库，进行3个月的志愿服务；中华骨髓库洪俊岭主任又带着国家管理中心的深情厚意、带着援助资金和设备，专程前来我区参加骨髓库成立大会。我会领导把骨髓库建设作为我会的重点工程、品牌工程。2007年年初，我会在确定业务工作项目时，把骨髓库建设列为“123”工程（是指填补一项空白，即建立中国造血干细胞捐献者资料库西藏分库；抓好二个特色，即运用藏医藏药防治大骨节病、组织免费白内障手术；突出三项业务，即抓好救灾、做好救助、搞好救护）的首要任务。自治区和国家管理中心领导的重视与支持、我会领导的重视，给我们鼓了劲、加了油，使我们进一步增强了建好骨髓库的信心。

#### 三、社会支持，为西藏分库的建设提供了有力保障。

西藏分库的建设工作，是一项涉及面广的社会公益事业。需要各部门的配合与支持。自治区发

改委正在考虑骨髓库立项建设问题；自治区编制部门正在考虑骨髓库的人员编制问题；自治区财政厅安排了专门的启动资金；自治区卫生厅积极协调，全力支持；自治区血液中心表示，要把骨髓库当作自身的业务来做，保证把志愿捐献者血样的采集、储存和邮寄工作做好；西藏电视台、西藏日报、西藏商报、拉萨晚报、西藏人民广播电台等新闻媒体积极刊发消息做专题报道，给予了很大的舆论支持；很多单位、团体、企业以及个人也不同程度地给予了关心和帮助，使西藏分库的筹建工作进展顺利。

#### **四、思路明确，使西藏分库筹建工作有序进行。**

从 2007 年年初开始，我会就积极筹备西藏分库的建设工作。先后派人到北京、重庆等地的骨髓库参观学习。接到成立西藏分库的批复后，我会又先后召开了党组会、执委会，调整工作人员，重新明确部门职责，把骨髓库单列为会机关的一个部门，增加了人手，充实了力量。在筹建中，经常召开专题会议，部属每个阶段的工作任务，使整个筹建工作有条不紊，忙而不乱。

我会根据国家管理中心有关文件精神，参照其它省区市的做法，结合我区实际，制定了工作规程、操作流程、人员职责等一批规章制度和运作程序，使西藏分库的工作制度化、科学化、规范化。

#### **五、工作努力，保证了西藏分库建设的速度和质量。**

建设骨髓库，对我会来说，是第一次，许多工作难度很大。为了尽快完成建库任务，会领导经常带头加班加点，亲自起草文件，主动做组织、协调工作。潘庆伟先生是深圳市捐献造血干细胞，骨髓移植成功的第一人。他不顾自己公司的事业，积极应招，志愿来我区帮助建库，工作 3 个月。黄凯先生是深圳的一名工程师，也是捐献造血干细胞志愿者之一。两位先生进藏后，不顾高原缺氧，工作兢兢业业、踏踏实实，为西藏分库的筹建立下了汗马功劳，还主动到自治区血液中心献血一次。深圳市血液中心血源科蓝欲晓主任利用个人假期来藏，在自治区血液中心进行培训，使工作人员明确了有关技术标准和工作要领，掌握了血样采集、储存和邮寄方法。我会新安排的骨髓库工作人员，经常放弃休息和节假日，边学习，边工作，攻克一个个难关，提前完成了建库任务。

#### **六、积极宣传，全社会对骨髓库的工作有了深入了解。**

我们采取边筹建，边宣传的方法，让全社会了解我们的工作。2007 年 6 月 26 日，我会召开了新闻通报会，国家管理中心刘静湖副主任就中华骨髓库概况、发展中华骨髓库的意义、捐献造血干细胞基本知识等内容进行了阐述。我会领导就西藏建立骨髓库的意义、捐献程序、建库目标等问题向区内新闻媒体进行了通报，并回答了记者提问，接受了专题采访。潘庆伟先生讲述了捐献造血干细胞的亲身体会，消除了人们捐献骨髓的思想顾虑，增强了宣传效果。我们公布了捐献报名电话，分别在西藏各大报刊、电视、电台就骨髓捐献的意义和基本知识进行了宣传。我会还编印捐献造血干细胞科普知识宣传单 1 万余份，在社会上发放。自 2007 年 8 月 4 日开始，我会在西藏电视二台播放为期一周的骨髓库建设公益广告。印制骨髓宣传的一次性饮水杯 10 万个，发放到自治区各机关和不同目标人群。制作了位于拉萨繁华街区的灯箱广告。在高等院校多次开展造血干细胞培训。以重大节日为契机宣传造血干细胞知识。通过有效的宣传，全社会对建立骨髓库的意义、基本知识有了比较深入的了解和认识。

#### **七、制度严格，使西藏分库建设沿着规范化轨道运行。**

根据西藏常住人口少、藏族民族居住集中、西藏路途遥远血样邮寄困难等特点，我会把血样采集

的重点定位在藏族同胞之中,把把好志愿者质量关作为招募工作的重中之重,在招募工作中严把年龄关、填表关、审核关以降低盲目入库率和反悔率。通过几个月的工作,我们深深的体会到骨髓库的工作是一项复杂、细致、长期的工作,从血样的采集、储存、邮寄、信息录入、审核到消息处理那一个环节出了问题都会影响入库资料的质量。在实际工作中,工作人员严格操作规程,把好每个环节,截止 2009 年 4 月寄往北京博澳实验室的 340 例血样没出现任何差错,为 13 名患者提供了供者再动员工作,处理了国家管理中心发送的 3 次高分辨通知。我们还在节假日、志愿者生日等时期,采取邮寄贺卡、通过企信通平台发送祝福短信、发送 E-MAIL、打电话等形式同志愿者保持联系,了解他们的情况,掌握他们的思想动态,确保志愿者队伍的稳定。2009 年 4 月,在自治区党委、政府的领导下,在中国造血干细胞捐献者资料库国家管理中心的统一协调下,在西藏自治区红十字会、解放军 307 医院、武警水电第十支队的共同努力下,我区成功地实现了第一例造血干细胞移植,实现了我区捐献造血干细胞捐献史上零的突破。为弘扬熊忠翔同志无私奉献的救人精神,为进一步鼓舞我区广大志愿者积极投身到造血干细胞捐献事业,拯救更多的白血病人,经我会执委会 2009 年 4 月 21 日研究决定,拟授予熊忠翔同志“无私奉献融爱心,西藏捐髓第一人”荣誉称号。目前称号授予手续正在办理之中。

回顾西藏分库成立以来的工作,成绩喜人。这些成绩是总会领导关怀,自治区领导关心,各省市红十字会、社会各界支持以及全区红十字工作者努力的结果。但是我们仍然面临实力不足、人才缺少、经费紧张、物资匮乏、还需要自身的奋斗与外部的援助。我们相信,有国家管理中心和自治区的大力支持,各省区市红十字会的大力帮助,西藏分库一定会有更加美好的发展前景。

### 3-6

## 遴选和回访对提高志愿献髓者资料库有效率的研究

李惠文 周 华 孙 革 杨立新

深圳市血液中心(518035)

**摘要:** **目的** 通过对申请献髓并接受抽取血样者的资格进行审核遴选和确认性回访,以降低志愿献髓者的不合格率、流失率和反悔率,提高库容有效使用率,节约资源、提高社会效益和经济效益。**方法** 由工作站或分库指定专人在申请献髓者填写献髓登记表并留取血样后 1 个月(静思期),对每个申请献髓者的资格及资料进行审核遴选和回访,问答解疑、补充知识、废除改变初衷和血检不合格者,取得未改变初衷之申请献髓者的肯定性承诺,补齐信息、由回访者在经审核遴选和回访合格的受访之申请献髓者的登记表上签字,再将申请登记表上传、血样送检。**结果** HLA 分型检测前废除了 17.45%改变初衷或血检不合格(血检不合格 0.93%)的申请献髓者,有效地提高了库容有效使用率、召回率(再动员反悔率为 9.07%、流失率为 11.99%),达到了提高库容有效率、节约资源、提高社会效益和经济效益的目的。**结论** 在进行 HLA 分型检测前,给所有申请献髓者设置一个静思期,然后,由专人负责对每个申请献髓者的资格及资料进行审核遴选和确认性回访,可大幅度地提高志愿献髓者资料库的有效使用率,降低不合格率、流失率和反悔率,节约资源、提高社会效益和经济效益。

**关键词:** 静思期; 资格遴选; 回访

## Research on the Efficiency Improvement for Bone Marrow Donors' Data by Selection and Return Visit

Huiwen Li

Shenzhen Blood Center, 518035

**Abstract:** **Object** Selection and confirmative return visit are used for bone marrow donors' data to avoid the possible loss of bone marrow donor so that limited voluntary donor' s data could be saved and both social and economic benefits could be achieved. **Methods** One month after the donor' s questionnaires are filled out and blood samples are collected (it is called silent phase), one special person is assigned to evaluate the donors' criteria, select the appropriate donors and do some return visits if necessary. During the selection and return visit, questions from the donors are explained and answered, some additional information are collected as well. Donors whose laboratory testing results are positive are excluded. So are the donors who change their minds finally. After the donors confirm that they will be definitely bone marrow donors, the special person will sign the relevant forms. After the selection and return visit are done, the donors' data and blood samples will be sent to the designated place for further analysis. **Results** By selection and return visit, 17.45% of the primary bone marrow donors were excluded because of their indeterminations or positive test results, including 9.07% who changed their minds and 11.99% whose data were incomplete. Both social and economic benefits are improved. **Conclusions** It is essential to set a silent phase. During this phase, selection and return visit could be done to improve the efficiency of bone marrow donors' data so that both social and economic benefits could be achieved.

**Key words:** Silent Phase Selection Return Visit

非血缘关系造血干细胞(骨髓)移植供者资料库的建立,使白血病、重度再生障碍性贫血及重度地中海贫血等多种恶性顽疾患者有了继续生存的希望。但是,较高比例志愿献髓者的血检不合格、流失和反悔,是长期困扰各地骨髓库的难题。为减少这种困扰的发生,深圳市血液中心在中国造血干细胞捐献者资料库(亦称:中华骨髓库)广东省管理中心深圳工作站组建之初的2000年,就建立了严格的申请献髓者信息初审、资格及资料审核遴选和回访制度,收到了理想的效果,现总结如下,供国内外同仁参考。

### 1 对象与方法

**1.1 志愿献髓者的招募及信息初审** 2000年8月,深圳骨髓库(现以改为:深圳工作站)制定了如下策略:既以符合献髓和捐献机采成分血条件,又对白血病和献髓有一定了解的多次捐血者,为重点招募对象;以符合献髓和捐献机采成分血条件的再次捐血者,为重点宣传和招募对象;以初次捐血者为宣传对象的工作策略。在深圳市血液中心各捐血点设置志愿献髓者招募点,展开献髓宣

传和志愿献髓者的招募工作，随后招募点覆盖全市三个采供血机构的所有捐血点。在各个捐血点工作人员和捐血献髓志愿工作者（简称：志工，亦称：志愿者、志愿服务者，俗称：义工）密切合作共同开展献髓的宣传，招募、指导填表、信息初审、体格检查、血液初筛检查及 HLA 分型用血样的采集等工作。既由体检医生负责，对已填写献髓申请书及登记表的申请献髓者，进行献髓知识知晓情况测评和规范性辅导及信息初审，经信息初审和捐血前体格检查合格后，由体检医生在登记表信息初审者或咨询登记者栏内签名；随后转入采血样（即捐血）前的血液初筛，初筛合格者捐血，并留取用于 HLA 分型及可经输血传播疾病检测的血样。

**1.2 献髓登记表和血样的核对汇总及血液检测** 申请书及献髓登记表和血样从各捐血点按规程转运到工作站后，由专人负责对申请书及登记表和用于 HLA 分型检测的血样进行核对汇总；经核对确认无误后，将血样存入专用冰箱，申请书及登记表按填表先后存放在工作站静思期（ $\geq 1$  个月）登记表存放处，静思期满后转入待审核遴选及回访登记表存放处，待审核遴选和回访；用于可经输血传播疾病检测的血样，送实验室按临床输血血液检测标准进行检测，检测结果输入《献血档案管理系统》。

**1.3 血液筛查结果审核** 通过电脑《献血档案管理系统》对静思期满的每张登记表之申请献髓者的，可对经输血传播疾病血液初复检检测结果和既往入库情况进行审核。对在血检中不合格者的血样和申请登记表剔除进行作废处理，经审核合格者的登记表按程序转入遴选和回访程序。

**1.4 遴选和回访** 对血检合格，并静思期满的申请献髓者进行信息核对遴选和确认性回访。通过回访进一步宣传与捐血献髓相关的医学科普知识和献髓常识，确认申请献髓者对与捐血献髓相关的医学科普知识和常识了解无误、无疑后，郑重地取得申请献髓者对献髓意愿的肯定性承诺、补齐和完善信息资料，告知申请献髓者今后咨询和更新信息的途径和方法等；嘱其牢记 55 周岁<sup>[1]</sup>前，若发生电话号码及通信地址变更，要迅速通知原申请献髓处或中华骨髓库（回访标准用语详见表 1）。

表 1 工作站工作人员电话回访标准用语

---

工作人员：您好！请问您是某某先生/小姐或女士吗？
申请献髓者：是！
工作人员：我是中华骨髓库 XX 工作站的医生 XXX，您于 X 年 X 月 X 日在 XX 血站捐过血是吗？
申请献髓者：是！捐过！
工作人员：您在捐血的过程中填写了一份捐献骨髓申请书还记得吗？
申请献髓者：记得！
工作人员：因为，您捐献的血液检测合格，已经用于救治病人了。因此，说明您的血液是健康的。所以，您填写了捐献骨髓申请书，中华骨髓库还要对您的血液进行捐献骨髓的配型检测。为降低配型相合需要捐献时的反悔率，所以，在做配型检测之前，再给您一次选择的机会，对您进行电话回访，进一步确认、再一次取得您的肯定性承诺、并核对资料。请问您现在对捐献骨髓的想法有没有改变？

申请献髓者：没有改变！

工作人员：没有改变对吗？！那如果以后有病人需要您为他捐献骨髓，您符合捐献的情况下会捐献吗？

申请献髓者：会！

工作人员：会？！肯定会吗？！

申请献髓者：肯定会！

工作人员：肯定？！

申请献髓者：肯定！

工作人员：请问：您申请献骨髓的事，您的家里人知道吗？

申请献髓者：知道！

工作人员：他们支持您捐献骨髓吗？

申请献髓者：支持！

工作人员：好！那请问您对捐献骨髓都了解了吗？

申请献髓者：了解了！

工作人员：了解了？！有没有什么疑问需要我现在解释的？

申请献髓者：没有！

工作人员：没有？！那好！如果以后有新的疑问，可以打深圳市血液中心的捐血热线电话或登录中华骨髓库网站了解，也可以到捐血站向医生询问。随后，逐项审核并补充资料。最后强调：因为，在您 55 周岁之前有病人需要您捐献骨髓，我们都会联系您，为了保证第一时间联系得到您本人，您 55 岁之前如果电话号码或通信地址改变了，请您不要忘记打报名地的捐血热线电话通知中华骨髓库，好吗？

申请献髓者：好！

工作人员：谢谢！祝您身体健康！生活快乐！欢迎再次捐血！再见！

---

经遴选和回访确认该申请献髓者可成为志愿献髓者后，审核、遴选及回访者在由受访者填写的献髓登记表指定区域签名；然后，由专人将经资格审核遴选和回访合格的申请献髓者的血检结果打印出纸件，附于申请书和登记表上，上传存档；血样送 HLA 分型实验室检测，检测数据和志愿献髓者的相关信息一并上传备索。

对既往已经入库，再次填写献髓申请书和登记表的志愿献髓者，本次回访时告知此前已经成功入库，以后不要再申请，并行慰问和保留性回访。

对经遴选和回访确认合格并送检者，在电脑《献血档案》献髓或献造血干细胞栏中注明“已采用”，再次捐血时采供血单位可考虑动员其捐机采成分血，模拟献外周血造血干细胞的感觉，促进保留；对多次致电均联系不上或改变捐献意愿及血检等不合格的申请献髓者做放弃（废除）处理，并在电脑《献血档案》中注明“未采用”及未采用的原因，在其再次捐血时告知未采用的原因或做重点招募对象。



## 2 结果

2004年1月1日至2008年12月31日,五年间深圳工作站共在申请献髓者中招募申请献髓者10090人,通过采取资格审核遴选和回访等措施,在HLA分型检测前废除1761人,废除率17.45%(1761/10090);送检并上传入库8334人,再动员717人,再动员中反悔65人、反悔率为9.07%,再动员中联系不上(流失)86人、流失率为11.99%。累计完成献髓75人(详见表2)。

表2 CMDP 深圳工作站申请献髓者资格审核遴选、回访及捐献情况结果一览表

申请并留血样数 (n)	在资格审核遴选及回访中废除的原因 (n)			检前废除率 (%)	再动员数 (n)	再动员时反悔	流失情况
	改变初衷者	信息不合格	血检不合格			反悔率 (%)	流失率 (%)
10090	102	1565	94	17.45% (1761/10090)	717	9.07% (65/717)	11.99% (86/717)

## 3 讨论

深圳九年的实践证明,建立严格的申请献髓者信息初审、资格及资料审核遴选和回访制度,为所有申请献髓者预留一个适当的静思期和再次选择的机会;并对每个申请献髓者的血液,按临床输血检验标准进行可经输血传播疾病的检测;然后,由专人负责对每一个静思期满,可经输血传播疾病检测合格的申请献髓者的资格进行审核遴选,并电话回访,有效的降低了志愿献髓者的不合格率(血检不合格率为0.93%)和流失率;本组9.07%(65/717)的反悔率明显低于美国2004年在高加索人中调查的结果,即:421名愿意填表捐献骨髓的143人,为34%;确定愿意捐献骨髓的为77人,为18.3%;初步计算其反悔率为46.15%<sup>[2]</sup>;有效地提高了志愿献髓者资料库的库容有效率。

因此,建议:中华骨髓库做出统一规定,①为每个申请献髓并接受抽取血样者在进行HLA分型检测前设置一个静思期,再给申请献髓者一次选择的机会,使其血样在进行HLA分型检测之前有一个深思和反悔的机会,从而达到入库前深思熟虑、配型相合后一无反顾献髓的效果;②建立进行HLA分型检测前,对申请献髓者的资格进行审核遴选和回访制度,由各工作站或分库对在本辖区招募的每个申请献髓并接受抽取血样的申请献髓者进行资格审核遴选和回访,给予申请献髓者增加一次了解献髓相关知识和重新选择的机会,补齐信息资料、取得再次承诺、强化捐献意识。③协调设有工作站的采供血机构在电脑《献血档案》中或工作站在电脑《志愿献髓者档案》中设置“已采用”和“未采用”栏,这样不但可以避免重复采样和检测,还可以提示招募人员将那些符合献髓条件的捐血者招募成志愿献髓者。④在《献髓登记表》中增设“审核回访者”签名栏,做到责任到人。⑤统计中发现,多数于再动员时反悔的原因为家人强烈反对,所以,回访中一定要向申请献髓者询问其家人对其申请骨髓的看法和意见,对家人强烈反对或没有信心取得家人同意者,示其血样暂缓送检,待其征得家人支持后再行送检。⑥调查发现,流失率与在库时间的长短成正向增长,为进一步降低流失率,提高库容有效率,应建立定期对库存志愿献髓者进行普查性回访和慰问制度,以最大限度的减少库存志愿献髓者的流失和反悔,提升库容有效率,节约资源、提高经济效益和社会效益。

### 参考文献

- [1] 王陇德 张春生《中华人民共和国献血法释义》[M].北京: 法律出版社 1998.7, 44
- [2] Onitilo AA, Lin YH, Okonofua EC et al. Race, education, and knowledge of bone marrow registry: indicators of willingness to donate bone marrow among African Americans and Caucasians. *Transplant Proc.* 2004; 36 (10): 3212-9.

3-7

## 献髓志愿工作者在骨髓库建设中作用的研究

李惠文

深圳市血液中心 (518035)

**摘要:** **目的** 挖掘社会资源, 调动社会力量, 引导献髓志愿工作者参与献髓宣传、招募和服务等力所能及的相关工作, 实现全社会共同推动献髓活动发展的愿望, 促进非血缘关系骨髓移植供者资料库建设的健康持续发展。**方法** 以献髓者为主体, 以有多次捐献机采血液成分经历的志愿献髓者为基础, 建立献髓志愿工作者队伍, 为献髓者发挥其身份优势, 现身说法传播献髓救人, 无损己身、奉献爱心、自豪而快乐的感受和理念, 参与志愿献髓的宣传、招募和服务提供合法而有序的平台。**结果** 宣传动员效果好, 召回率高、淘汰率低、流失率低、反悔率低, 采集成功率高、不良反应率低, 预期效果比较满意。多次受到国家相关部门和机构领导的肯定及国内外同行的赞扬。**结论** 建立献髓志愿工作者队伍, 是保障献髓活动持续发展的有效方法, 应大力推广。

**关键词:** 招募; 献髓; 志愿工作者队伍

## Voluntary Workers' Contribution to the Establishment of Bone Marrow Data

Huiwen Li

Shenzhen Blood Center, 518035

**Abstract: Object** In order to promote the development of non-relative bone marrow donation and to get more bone marrow donation, voluntary workers for bone marrow donations are trained to improve their working ability, including the participation in the propaganda, recruitment and how the donors should be served. **Method** Voluntary workers who have donated apheresis many times are the mainstream. A voluntary workers team is organized for them. **Members** of the team can speak out their own feelings during the donations and a platform for the donors is built. By way of this lawful platform, the workers are able to propagandize, recruit and serve the donors more efficiently. **Result** The establishment of voluntary workers team is efficient to improve the bone marrow donation rate and is praised many times

by local and national governments. **Conclusion** The establishment of voluntary workers team is an efficient way for bone marrow donations' continuous improvement. The way should be advocated largely all the country.

**Key Words:** Recruitment Bone Marrow Donation Voluntary Workers Team

造血干细胞输注（骨髓移植）是白血病、重度再生障碍性贫血及重度地中海贫血等多种恶性顽疾的最终治疗方法。随着中国造血干细胞捐献者资料库（亦称：中华骨髓库）库容的不断壮大和骨髓移植技术的广泛应用，献髓的宣传、招募和服务等，已成为骨髓库各级管理中心及其工作站的日常工作。

为建立一支高效的非血缘关系志愿献髓者队伍和保证骨髓库健康持续发展的保障体系，中华骨髓库广东分库深圳工作站在成立之初就建立了献髓志愿服务组织，并有计划的招募和培训献髓志愿工作者（简称：志工，亦称：志愿者、志愿服务者，俗称：义工），引导其参与献髓的宣传、招募和服务等活动，结果是宣传动员效果好，召回率高、反悔率低，采集成功率高、不良反应率低、预期效果好。现将做法总结如下，共境内外同行参考。

## 1 对象与方法

**1.1 组织建设** 2000年初，为保障即将成立的中华骨髓库深圳分库（已更名为：中国造血干细胞捐献者资料库广东省分库深圳工作站，以下简称：深圳工作站）能健康持续发展，深圳工作站筹备组依据“红十字会依法参与、<sup>[1]</sup>推动无偿献血；”<sup>[2]</sup>“开展捐献造血干细胞的宣传动员、组织工作；各级红十字会应积极发展红十字志愿工作者队伍，为志愿工作者提供必要的工作条件，组织其开展人道主义服务工作”<sup>[3]</sup>的规定，以市红十字会无偿献血志愿工作者服务队为依托，组建了志愿献髓者招募分队。

**1.2 志愿献髓者招募分队的组成** 以献过外周血造血干细胞（献髓）者为主体，以有多次捐献机采成分血经历的志愿献髓者为基础，建立献髓志工队伍。有计划的将献髓者培养成献髓志工中的骨干，参与志愿服务的组织和管理。

**1.3 献髓志工及其分类和注册** 献髓志工是经本人申请成为志工的献髓者、多次捐血者、受髓康复者及热爱公益的爱心人士。分注册和非注册两种。申请注册者需先填写《……注册队员/志工登记表》，经过初级培训后方行注册，注册后将有献髓经历者编入志愿献髓者招募分队参加活动。

**1.4 志工的培训** 志工的培训遵循以自学为主，集中培训为辅的原则。培训除由从业人员或资深的志工指导其自学和实践外，还举办初级、中级及队干部培训、值日长培训、座谈会、研讨会、论坛、参观交流等一系列高级培训。

**1.4.1 自学** 对申请成为志工作者配发《献血指南》、《献髓指南》《献血导读》等与捐血献髓相关的科普书籍和宣传资料及《深圳市红十字会捐血献髓志工手册》等供其自学；

**1.4.2 初级培训** 适时举办志工初级培训班，对填写了《深圳市红十字会捐血献髓志工注册登记表》者，依据培训计划和大纲进行3小时的理论培训，课后适时安排带教老师带教实习和交流；培训中要反复强调志愿服务概念和马斯洛需要层次论，培养志工无私奉献的信念和决心（见图1和图2）。

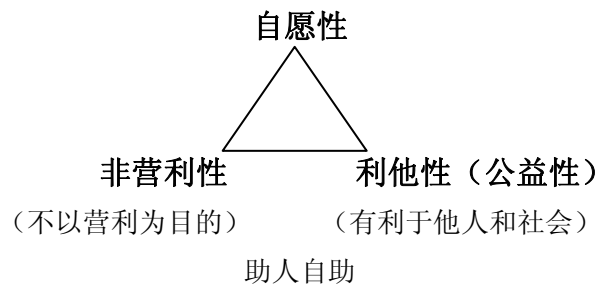


图1 志愿服务概念三大要素

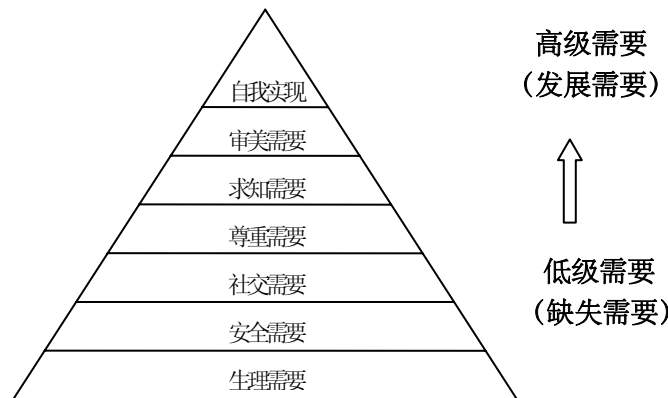


图2 马斯洛需要层次理论金字塔

1.4.3 中级 中级培训是对服务达 100 小时以上者和五星级志工授星前的培训，以提高星级志工的理论水平、思想觉悟、工作技能和辨别事非、处理特殊问题及突发事件的能力；

1.4.4 高级培训 高级培训包括队干部、值班长培训和献髓者座谈会、研讨、论坛和经验交流会等，以促进献髓事业的持续发展；

1.4.5 联谊、联欢和参观交流 适时举办各种联谊、联欢和参观交流活动，通过联谊、联欢和参观交流吸取国内外先进经验，促进自身的完善和提高。

**1.5 支持和指导** 各级政府及其卫生行政等部门、红十字会、骨髓库及其各级管理中心或工作站、献血办公室、采供血机构和各招募点要大力支持捐血献髓志工的志愿服务工作，从业人员要以崇敬、宽容和顾全大局的态度对待捐血献髓志工，真心实意的做好对志工工作的指导、协调、服务和保障工作，以方便志工开展工作。

## 2 献髓志工的作用及工作范围

献髓志工要有意识的在社会活动中视机开展献髓宣传和招募活动；利用闲暇时间到骨髓库的各级管理中心及其工作站、招募点配合从业人员，发挥身份优势、现身说法传播献髓救人、无损己身、自豪而快乐的理念、感受及与献髓相关的科普和法律法规知识、常识，解答到访者、拟填表申请并采血样者、志愿献髓者、献前及捐献过程中提出的问题；参与献髓宣传动员、接待、咨询、志愿献髓者招募、回访、保留、召回、再动员和采前谈话，采前、采中、采后的陪护服务、心理疏导及送髓等力所能及的相关工作。

### 3 考评及表彰

考评和表彰是肯定和鼓励，是志愿服务的助动力，应常抓不懈。要有计划的按服务队制定的《……管理办法》、《……星级志工晋升制度》和《……优秀志愿献髓者及优秀志工评审标准》对志工的捐献及服务业绩予以考评表彰。

### 4 结果

志愿献髓者招募分队的成立，为献髓者、志愿献髓者及其热心公益活动的爱心人士参与献髓宣传、招募和服务等提供了一个既合理，又合法的有序平台。服务队成立九年来，发展并培训注册捐血献髓志工 1250 余名，非注册志工数万名，其中，有献髓经历的注册献髓志工 40 多名，累计志愿服务 36 万多小时，相当于每天有 10 位捐血献髓志工在深圳的各个招募点服务。广大献髓志工与红十字会，骨髓库管理中心及其工作站、招募点、采集点及其从业人员配合默契，共招募入库志愿献髓者 2 万余人，完成外周血造血干细胞采集 75 余例。宣传招募效果好，召回率高、淘汰率低[血检不合格 0.93% (94/10090)]、流失率 (11.99%) 低、反悔率 (9.07%) 低，采集成功率 (100%) 高、不良反应率 (0%) 低，预期效果比较满意。

涌现出文明市民 3 人，市“十大杰出青年” 2 人，市学雷锋标兵 1 人，市首届百名优秀志工 13 人，市红十字会优秀志工千余人次、五星级志工 150 多人次；服务队集体多次获国家和省、市的相关荣誉称号。

### 5 讨论

推动献髓活动的发展需要社会各界的参与，人大、政府及卫生行政等部门在制定了相关政策法规、技术标准及奖励办法之后，直接出面宣传动员和招募志愿献髓者有诸多不便；骨髓库各级管理中心全权包揽，则困难重重，难能达到理想效果。而献髓者及志愿献髓者，以献髓志工的身份与各相关部门及其从业人员配合，发挥其与民众无利害，无界线、可零距离接触、平行交流、现身说法的身份优势，参与献髓宣传、招募和服务等，可达到优势互补，扬利避弊，取得使每一名志愿献髓者申请填表并留样时做到深思熟虑，配型相合后一无反顾的献髓，献髓后既成为传播献髓救人、无损己身、自豪而快乐感受和理念的献髓志工的理想效果。

深圳九年的实践证明：骨髓库管理中心及其工作站建立献髓志工队伍，招募和引导献髓志工参与献髓的宣传、接待、咨询、志愿者招募、回访、保留、召回、再动员和采前谈话，采前、采中、采后的陪护服务、心理疏导及送髓等力所能及的相关工作，是保障献髓活动持续发展的有效方法。达到政府和相关部门、骨髓库各级管理中心、工作站及其从业人员亲历所不能达到的目的，取得其他人员不可替代的效果，弥补了不足。

献髓志工经过培训，更加坚信：献髓救人、无损己身、奉献爱心的理念，更加真重施者得福自豪而快乐的感受，利用自己的亲身感受、经验和才能等资源，在积极为献髓活动发展献计献策的基础上，在社会活动中发挥身份优势，以红十字献髓志工的身份现身说法开展血液科普知识和献髓常识宣传，动员、带动符合献髓条件的再次捐血者填写献髓申请书、留血样、时刻准备献髓；引导或组织已填写献髓申请书并留下血样的志愿献髓者，参加模拟和感受捐献外周血造血干细胞过程的捐献机采成分血，进一步提高献髓的勇气、信心和兴趣，促进保留和召回。鼓励注册志工利用闲暇时间自行安排或按计划、按排班到各招募或采集点配合从业人员开展献髓宣传动员、招募，为服务对

象答问解疑，提供周到的知心服务，按计划参加相关活动等，使献髓活动的发展收到了事半功倍的效果。应大力推广。

#### 参考资料

- [1] 全国人大常委会颁布《中华人民共和国献血法》1997年12月29日
- [2] 全国人大常委会颁布《中华人民共和国红十字会法》1993年10月31日
- [3] 中国红十字会第八届全国代表大会颁布《中国红十字会章程》2004年10月29日

## 实验室

3-8

### HLA-B\*2736 等位基因的序列分析研究

李 桢 邹红岩

深圳市血液中心 (518035)

**摘要:** 使用 FLOW-SSO、PCR-SSP 以及测序等分型技术, 发现一个与 HLA-B\*270401 基因相关的未知基因。设计基因特异性引物单独扩增 B\*27 基因的外显子 2-5, 包括内含子 2-4, 并进行双向测序, 分析与 B\*270401 基因序列的差异。该基因的扩增产物为 1815bp。与 B\*270401 相比在外显子 3 和 4 共有 10 个碱基的改变, 从而使相应氨基酸发生错义或同义突变。碱基 634A→C (密码子 130 丝氨酸→精氨酸); 670A→T (密码子 142 苏氨酸→丝氨酸); 683G→T (密码子 146 色氨酸→亮氨酸); 698A→T (密码子 151 谷氨酸→缬氨酸); 774G→C (密码子 176 谷氨酸→天冬氨酸); 776C→A (密码子 177 苏氨酸→赖氨酸); 781C→G (密码子 179 谷氨酰胺→谷氨酸); 789G→T (密码子 181 丙氨酸同义突变); 1438C→T (密码子 206 甘氨酸同义突变); 1449G→C (密码子 210 甘氨酸→丙氨酸)。在 IMGT/HLA 数据库中 B\*27 组只有 3 个基因 (B\*270502 / 2706 / 2732) 提交了内含子序列。该未知基因的内含子 2 序列与 B\*2706 相同, 显示了与 B\*27 组基因的同源性, 但其同源性在内含子 3、4 均未得到支持, 与 B\*27 组基因相比, 内含子 3 的第 106 个碱基 C→G, 碱基 168 缺失, 碱基 179G→A, 碱基 536G→A; 内含子 4 中碱基 82T→C。但内含子 3、4 序列却与 B\*070201 完全相同。该基因序列已提交 Genbank, 编号为被 DQ915176, 被 WHO 确认为 HLA-B\*2736 等位基因。

**关键词:** 人类白细胞抗原; 基因; 序列; 外显子; 内含子

### Identifying and sequence analysis of HLA-B\*2736

*LI Zhen, ZOU Hong-Yan**Shenzhen Institute of Transfusion Medicine, Shenzhen Blood Center, Shenzhen, Guangdong Province, China 518035*

**Abstract:** An unknown HLA-B allele which was similar to HLA-B\*270401 was detected by FLOW-SSO, PCR-SSP and heterozygous sequence-based typing (SBT) in Chinese Han individual. Its anomalous patterns suggested the possible presence of new allele. Amplifying exon2-5(include intron2-4) of the HLA-B\*27 allele separately by using allele-specific primers and sequencing in both directions.

Identifying the difference between the novel B\*27 allele and B\*270401. The sequence of novel B\*27 from exon2 to partial exon5 is 1815bp. There are 10nt changes from B\*270401 in exon3-4, at nt634 where A->C (codon130 AGC->CGC, 130S->R); nt670 where A->T (codon142 ACC->TCC, 142T->S); nt683 where G->T (codon146 TGG->TTG, 146W->L); nt698 where A->T (codon151 GAG->GTG, 151E->V); nt774 where G->C (codon176 GAG->GAC, 176E->D); nt776 where C->A (codon177 ACG->AAG, 177T->K); nt781 where C->G (codon179 CAG->GAG, 179Q->E); nt789 where G->T (codon181 GCG->GCT) resulting no coding change; nt1438 where C->T (codon206 GGC->GGT) resulting no coding change; nt1449 where G->C (codon210 GGG->GCG, 210G->A). In IMGT/HLA database, only there alleles (B\*270502 /2706/2732) have sequences of introns. The same sequence in intron2 showed homology between the novel HLA-B\*27 allele and B\*2706, but their homology could not be supported in intron3-4. Comparing the sequence of the novel B\*27 allele in intron3 and 4 with B\*27 group, it showed there are three mutations at nt106C->G, nt179G->A, nt536G->A and one deletion at nt168 in intron3 and one mutations at nt 82T->C in intron4, but the sequence of the novel B\*27 allele in intron3 and 4 was all the same to B\*070201. The sequence was submitted to Genbank and the accession number was DQ915176. The allele has been confirmed as an extension of B\*2736 by the WHO Nomenclature committee in November 2006.

**Key words:** HLA-B\*27 allele sequence exon intron

近几年,随着分子生物学的发展及测序技术的推广,大量的新基因被发现。截至目前,人类白细胞抗原(HLA)的B位点已有830个基因<sup>[1]</sup>。我们遇到一份标本,用FLOW-SSO方法做HLA分型,发现其反应格局异常。如果第39和48号珠子为阴性,那么其分型结果可定为HLA-B\*51XX,27XX,此异常格局提示可能存在新等位基因。用商品试剂盒测序外显子2-4,发现B\*510101,270401的杂合结果在外显子3、4共有10个碱基位置与数据库不相符。随后我们用PCR-SSP方法做高分辨分型,其结果为B\*5101,而B\*27格局异常,提示该样本可能存在与B\*27基因相关的碱基突变。我们用基因特异性引物单独扩增了该样本的B\*27基因的外显子2-5(包括内含子2-4),并进行了双向测序,发现该基因与其最接近的HLA-B\*270401相比在外显子3和4共有10个碱基突变。现报告如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

中华造血干细胞捐献者资料库志愿捐献者,男性,汉族,籍贯湖南。

### 1.2 DNA提取

外周全血使用5%EDTA抗凝。用美国Gentra公司DNA快速提取试剂盒从抗凝全血中抽提DNA。

### 1.3 HLA分型

FLOW-SSO方法使用LUMINEX 100液相分析平台,One-Lambda公司HLA-B lot 009分型试剂;PCR-SSP方法使用美国Pel-Freez B high 003分型试剂。商品测序试剂盒使用Atria Genetics



AlleleSEQR HLA-B SBT Pack (Atria Genetics, South San Francisco, CA), 测序分析软件使用 Assign version 3.5 20060714 版本 (Conexio Genomics, Applecross, Western Australia, Australia), 测序仪为美国 ABI 3100 测序仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

#### 1.4 B\*27 基因扩增及序列测定

依据 IMGT/HLA release 2.13 (April 2006) 设计 B\*27 基因特异性引物 (扩增引物见表 1)。使用 TaKaRa LA Taq 酶 (大连宝生物), 25ul 反应体系, 其中 10xbuffer 2.5ul (含  $Mg^{2+}$ ), dNTP 终浓度 0.4 umol/L, LA Taq 酶 1u, 引物浓度为 0.25umol/L, DNA 80ng。PCR 扩增条件: 94℃ 1min→94℃ 30s, 62℃ 30s, 72℃ 3min, 35 个循环→72℃, 5min→4℃。对扩增产物进行双向测序, 测序引物见表 1, 测序仪为美国 ABI 3730 测序仪。

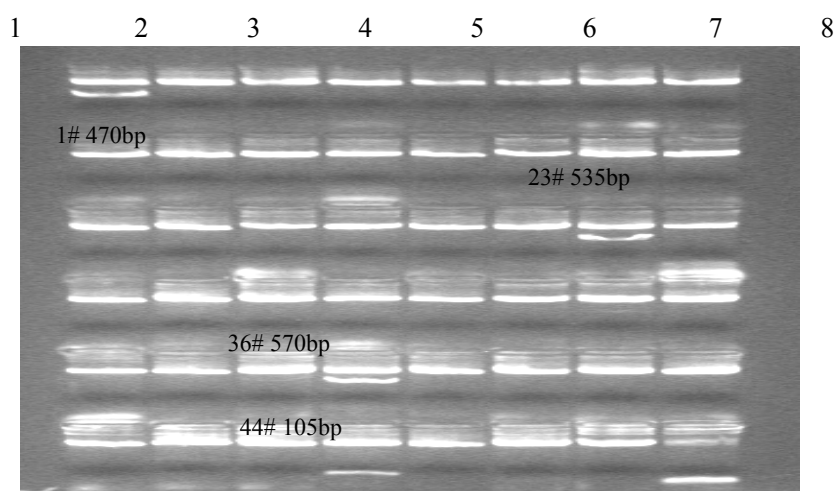
表 1 HLA-B\*27xx 的基因特异性扩增引物和测序引物  
Table 1 The allele-specific primers and sequence primers of HLA-B\*27xx

引物名称	Primer name	序列 Sequence (5' -3')	位置 location
扩增引物 U27	Amplification primer U27	CCACTCCATGAGGTATTTC	外显子 exon2: 1~20
扩增引物 L27	Amplification primer L27	GACCACAGCTCCGATGA	外显子 exon5: 1799~1815
测序引物	Sequence primer F 1	CCACTCCATGAGGTATTTC	1~20
测序引物	Sequence primer R 1	GACCACAGCTCCGATGA	1799~1815
测序引物	Sequence primer F 2	GCGGACACGGCGGCTCAGAT	645~664
测序引物	Sequence primer R 2	CGAGTCTCTGAGCGGGAAC	1166~1185
测序引物	Sequence primer F 3	TGCCCCCTCCCCACCC	1248~1263
测序引物	Sequence primer R 3	CGCCCCGACCAACCC	451~465

## 2 结果:

### 2.1 HLA 分型结果:

FLOW-SSO 分型结果显示, 如果第 39 和 48 号珠子为阴性, 那么其分型结果可定为 HLA-B\*51XX, 27XX。随后我们用 PCR-SSP 方法做高分辨分型, 其结果为 B\*5101, 而 B\*27 格局异常。电泳胶图见图 1。用商品试剂盒测序外显子 2-4, 发现 B\*510101, 270401 的杂合结果在外显子 3、4 共有 10 个碱基位置与数据库不相符, 测序图谱见图 2



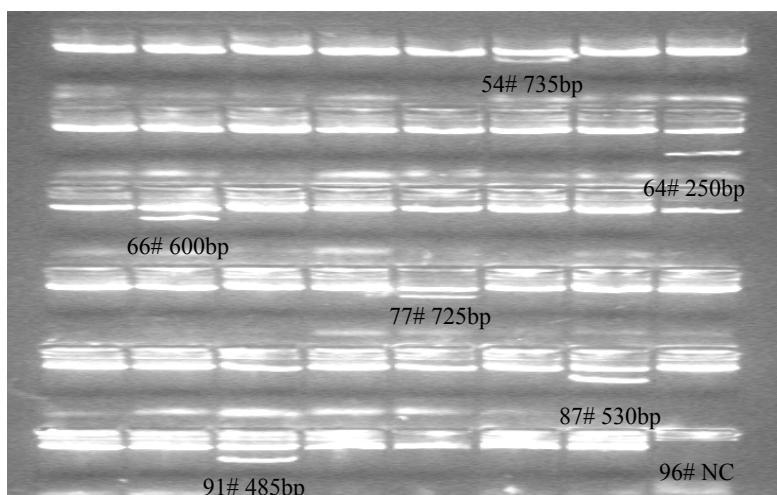


图1 HLA-B\*5101, 27xx PCR-SSP 高分辨率凝胶电泳图 (内对照为 1200bp)

阳性孔为: 1、23、36、44、54、64、66、77、87、91

Fig.1 HLA-B\*5101, 27xx High Resolution SSP Gel Picture (size of internal control PCR fragment: 1200bp)

Positive wells: 1、23、36、44、54、64、66、77、87、91

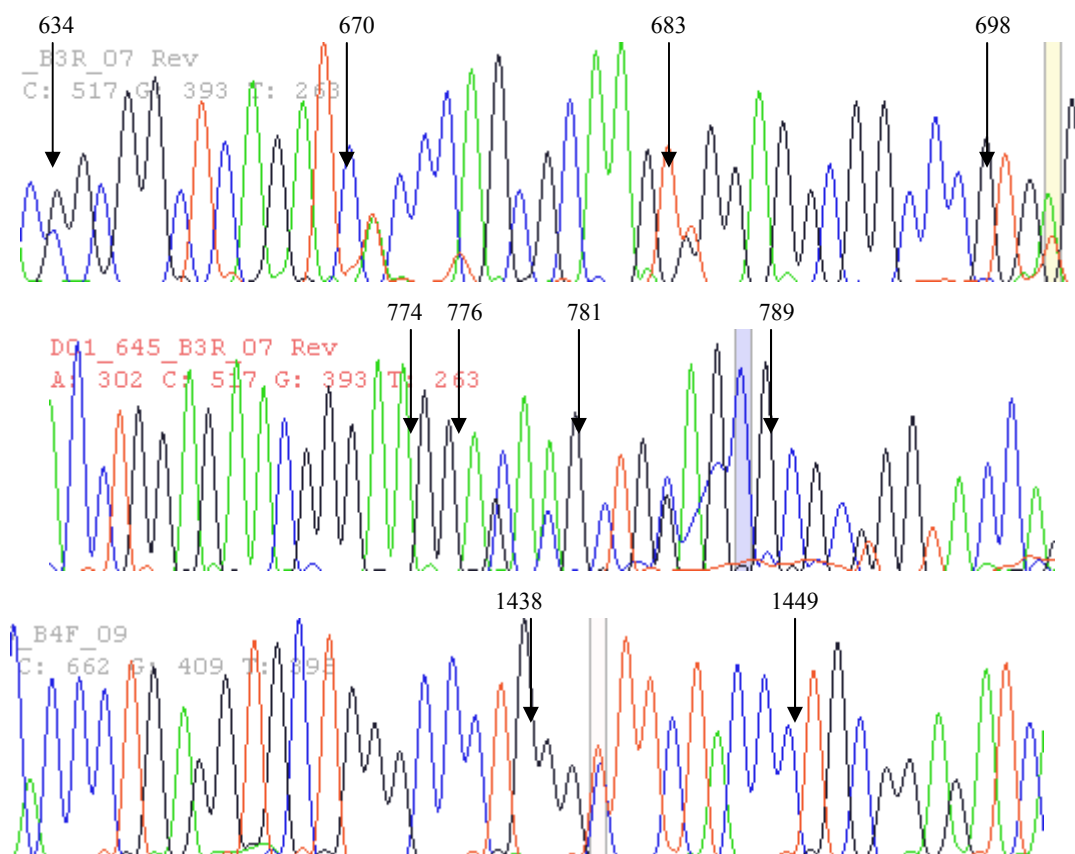


图2 HLA-B\*510101, 27XX 的杂合测序结果

外显子 3-4 有 10 个碱基突变: 碱基 634、670、683、698、774、776、781、789、1438、1449

Fig.2 Results of heterozygous sequencing of HLA- B\*510101, 27XX

Ten nucleotide changes in exon 3-4: nt634、670、683、698、774、776、781、789、1438、1449

## 2.2 B\*27 基因扩增及序列测定结果:

单独扩增 B\*27 基因, 其扩增产物为 1815bp, 包括外显子 2、3、4、部分外显子 5 以及内含子 2、3、4。因该基因上游扩增引物的第 1 个碱基为外显子 2 的第 5 个碱基, 故测序结果外显子 2 只有 266bp。商品试剂盒测序显示外显子 2 的前 4 个碱基没有突变, 故在计算外显子碱基位置时我们将这 4 个碱基加入。测序结果见表 2。

表 2 新 HLA-B\*27XX 基因外显子 2-5、内含子 2-4 的测序结果  
Table 2 The sequence result of the novel HLA-B\*27xx cover exon2-5 and intron2-4

位置 location	序列 Sequence
外显子 2 Exon2 266bp	CCACTCCATGAGGTATTTCCACACCTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTT CATCACCGTGGGCTACGTGGACGACACGCTGTTTCGTGAGGTTTCGACAGCGACGCCGCGA GTCCGAGAGAGGAGCCCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGA CCGGGAGACACAGATCTGCAAGCCAAGGCACAGACTGACCGAGAGAGCCTGCGGACC CTGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCG
内含子 2 Intron2 244bp	GTGAGTGACCCCGGCCCGGGGCGCAGGTCACGACTCCCCATCCCCACGTACGGCCCCGG GTCGCCCCGAGTCTCCGGGTCCGAGATCCGCCCCGAGGCCGCGGGACCCGCCAGACC CTCGACCGGCGAGAGCCCCAGGCGCGTTTACCCGTTTCATTTTCAGTTGAGGCCAAAAT CCCCGCGGGTTGGTCCGGGCGGGGCGGGGCTCGGGGGACGGGGCTGACCGCGGGGCC GGGGCCAG
外显子 3 Exon3 276bp	GGTCTCACACCCTCCAGAATATGTATGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCC GCGGGTACCACCAGGACGCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTG CGTCTTGACCGCCCGGACACGGCGGCTCAGATCTCCAGCGCAAGTTGGAGGCGGC CCGTGTGGCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCGTGGAGTGGCTCCGC AGATACCTGGAGAACGGGAAGGACAAGCTGGAGCGCGCTG
内含子 3 Intron3 574bp	GTACCAGGGGCAGTGGGGAGCCTTCCCCATCTCTATAGGTCGCCGGGGATGGCCTCCCA CGAGAAGAGGAGGAAAATGGGATCAGCGCTAGAATGTCGCCCTCCGTTGAATGGAGAAT GGCATGAGTTTTCCTGAGTTTCTCTGAGGGCCCCCTTCTCTCTAGACAATTAAGGAAT GACGTCTCTGAGGAAATGGAGGGGAAGACAGTCCCTAGAATACTGATCAGGGGTCCCCT TTGACCCCTGCAGCAGCCTTGGGAACCGTGACTTTTCTCTCAGGCCTTGTCTCTGCCT CACTCAGTGTGTTTGGGGCTCTGATTCAGCACTTCTGAGTCACTTTACCTCCACTCA GATCAGGAGCAGAAGTCCCTGTTCCCCGCTCAGAGACTCGAACTTTCCAATGAATAGGA GATTATCCCAGGTGCCTGCGTCCAGGCTGGTGTCTGGGTTCTGTGCCCTTCCCCACCCC AGGTGTCCTGTCCATTCTCAGGCTGGTCACATGGGTGGTCTAGGGTGTCCCATGAAAGA TGCAAAGCGCCTGAATTTCTGACTCTCCCCATCAG
外显子 4 Exon4 276bp	ACCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGG TGCTGGGCCCTGGGTTTCTACCCGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGCGA GGACCAAACCTCAGGACACTGAGCTTGTGGAGACCAGACCAGCAGGAGATAGAACCTTC CAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCCTTGGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATGT ACAGCATGAGGGGCTGCCGAAGCCCCACCCCTGAGATGGG
内含子 4 Intron4 93bp	GTAAGGAGGGGATGAGGGGTCATATCTTCTCAGGGAAAGCAGGAGCCCTTCAGCAG GGTCAGGGCCCCCTCATCTTCCCCCTTTCCAG
部分外显子 5 Partial exon5 86bp	AGCCGTCTCCAGTCCACCGTCCCCATCGTGGGCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCCTAG CAGTTGTGGTCATCGGAGCTGTGGTC

**2.3** 测序发现该基因与其最相近的 HLA-B\*270401 相比, 在 exon3 有 8 个碱基不同, 在 exon4 有 2 个碱基不同, 突变碱基及其所致氨基酸的改变见表 3。

表 3 新 HLA-B\*27XX 与其最相近的 B\*270401 相比的 10 个碱基突变点以及相应氨基酸的改变  
Table 3 The nucleotide changes and amino acid change of the novel HLA-B\*27xx compare with B\*270401

外显子 3 Exon3	外显子 3 Exon3	外显子 3 Exon3	外显子 3 Exon3	外显子 3 Exon3	外显子 3 Exon3	外显子 3 Exon3	外显子 3 Exon3	外显子 4 Exon4	外显子 4 Exon4
nt634	nt670	nt683	nt698	nt774	nt776	nt781	nt789	nt1438	nt1449
A->C	A->T	G->T	A->T	G->C	C->A	C->G	G->T	C->T	G->C
codon130	codon142	codon146	codon151	codon176	codon177	codon179	codon181	codon206	codon210
AGC->CGC,	ACC->TCC,	TGG->TTG,	GAG->GTG,	GAG->GAC,	ACG->AAG,	CAG->GAG,	no change	no change	GGG->GCG,
130S->R	142T->S	146W->L	151E->V	176E->D	177T->K	179Q->E			210G->A

**2.4** 该序列已提交 Genbank, 编号为 DQ915176, 且被世界卫生组织 HLA 因子命名委员会于 2006 年 11 月确认为 HLA-B\*2736 等位基因的扩展 (编号 HWS10004232)。该等位基因已于 2006 年 4 月被命名, 但其首位发现者 (GenBank DQ455019) 只提交了外显子 2 和 3 的序列, 故未发现该等位基因在外显子 4 中的 2 个碱基突变。

**2.5** 在 IMGT/HLA 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla> 2007 年 1 月查询) 中 B\*27 组只有 3 个基因 (B\*270502 / 2706 / 2732) 提交了内含子序列。我们的测序结果其内含子 2 序列与 B\*2706 相同, 与 B\*070201 相比碱基 91、92 缺失, 碱基 96 T→C, 碱基 217 后插入一个 G, 碱基 220T→G。而内含子 3、4 的序列与 B\*27 组已知的 3 个基因均不相同 (此 3 个基因内含子 3、4 的序列完全相同), 却与 B\*070201 完全相同。与 B\*27 组基因相比, 该基因在内含子 3 碱基 106C→G, 碱基 168 缺失, 碱基 179G→A, 碱基 536G→A; 内含子 4 中碱基 82T→C。

### 3 讨论:

人类白细胞抗原是至今所知人类最复杂的免疫遗传多态性系统, 它在不同种族或同一种族不同群体中的分布表现出明显的种族特异性。准确的 HLA 分型以及可靠的 HLA 基因频率数据, 不仅被广泛用于器官移植和造血干细胞移植中寻找 HLA 相匹配的供者, 而且是研究 HLA 与疾病相关、亲子鉴定、个体识别以及群体遗传学研究所必需的基本数据。HLA 系统中 B 座位等位基因最多, 外显子 2、3 具有多态性, 血清学特异性主要由 2、3 外显子决定, 而外显子 4 显示进化上的保守性。这三个外显子编码 HLA-I 类分子重链的 3 个功能区  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  [2]。近年来针对高变区的测序被广泛应用, 新基因频频发现。从众多新基因的报道中可看出, 新基因与它最相近基因往往只有 1~4 个碱基的突变, 多位于 2、3 外显子, 我们实验室发现的其它几个新基因也如此 [3-6]。如 B\*2736 在外显子 3 有 8 个碱基的突变, 在相对保守的外显子 4 亦有 2 个碱基突变, 这实属罕见。相对外显子序列的大量报道, 对其相临非编码区内含子的研究却非常有限。在 IMGT/HLA 数据库中, B\*27 组 42 个等位基因中只有 3 个等位基因提交了内含子 2、3、4 的序列。我们此次提交的序列无疑为内含子序列的欠缺给予了补充。近年来已有学者开始重视内含子的研究。这主要是由于某些内含子序列的改变可能导致不同转录剪接点的产生, 从而形成不同的 HLA 多态性。因而目前 WHO-HLA 因子命名委员会对内含子序列发生改变的 HLA 等位基因也进行命名 [7]。文献报道关于 HLA-B 位点内含子 1 和 2 的研究。内含子 1 同源性较高的基因在内含子 2 却看不出其同源性, 提示 B 位点的多

样性也涉及到内含子在遗传过程中可能由于遗传漂变和基因交换导致的固定点突变<sup>[8]</sup>。我们的研究结果也反映了类似的情况。我们所测的 B\*2736 其内含子 2 序列与 B\*2706 相同, 显示了与 B\*27 组基因的同源性, 但其同源性在内含子 3、4 均没能得到支持, 其内含子 3、4 的序列与 B\*27 组已知内含子序列的 3 个等位基因 (B\*270502 / 2706 / 2732) 均不相同, 却与 B\*070201 完全相同。文献报道 B 位点基因内含子 4 的序列也有较大差别, 可分为两组, B\*07/08/14/27/38/39/40/41/42/44/47/67/81 组的基因与另一组相比, 第 56-66 共有 11 个碱基缺失<sup>[9]</sup>。我们的结果也证实了这点, 内含子 4 只有 93bp, 第 56-66 碱基缺失。内含子序列除了在遗传学中的意义以外, 精确的非编码区序列对于确定相临编码区序列的研究策略也非常重要。许多外显子的测序引物都来源于内含子<sup>[10]</sup>。此外, HLA-B\*27 基因是 HLA 系统中较为特殊的一组基因, 是目前已知的与疾病关联最密切的基因。调查资料表明, 在强直性脊柱炎患者中 B27 阳性率达 79% 以上, 部分人群高达 96%。HLA-B27 携带者强直性脊柱炎相对危险性在 70% 以上<sup>[11]</sup>。B\*27 基因与葡萄膜炎也有一定关联<sup>[12]</sup>。因而 HLA-B\*27 组基因的发现与研究意义就更为深远。B\*27 在中国汉族人群中的基因频率约为 2.2% 左右<sup>[13-14]</sup>, 在南北汉族人群中无显著差异<sup>[13]</sup>。HLA-B\*27 亚型在不同种族分布不均<sup>[11]</sup>, 中国强直性脊柱炎患者中检测到 B\*2704、2705、2706、2724<sup>[11, 13]</sup>, 2706 被证实只存在于东南亚人中<sup>[15]</sup>。B\*2736 在未规模筛查的前提下, 我们已知在中国汉族人群发现 2 例。其在人群中的基因频率以及与疾病的关联有待进一步研究。目前有关 HLA 新等位基因的发现工作在我国呈现出一种蓄势待发争先恐后的态势。截止到 2006 年 6 月, 中国大陆共发现 43 个有籍可查的 HLA 新等位基因<sup>[7]</sup>。2006 年 9 月我们研究室又向 WHO 申报了 2 个新等位基因并获命名。HLA 新等位基因的出现增加了 HLA 系统多态性, 对器官移植、法医学鉴定以及人类迁移和人类遗传学研究具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE. IMGT/HLA-a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*, 2000, 55: 280-287.
- [2] CAO Meng-De, QIN Dong-Chun, SUN Han-Xiao. HLA Molecular Biology and Clinical Application. *Henan Medical University Press*, 1998, 12: 16-17. 曹孟德, 秦东春, 孙含笑. HLA 分子生物学与临床应用. 河南医科大学出版社, 1998 年 12 月第一版: 16-17.
- [3] Wu Guo-Guang, Cheng Liang-Hong, Zhou Dan, Deng Zhi-Hui, Zou Hong-Yan, Wei Tian-Li, Li Zhen, Li Da-Cheng, Gao Su-Qing, Zhao Tong-Mao. Identification of a novel allele HLA-B\*5610 in a Chinese Potential bone marrow donor. *Tissue Antigens*, 2003, 61 (3): 256-258.
- [4] Wu Guo-Guang, Cheng Liang-Hong, Li Zhen, Deng Zhi-Hui, Zou Hong-Yan, Wei Tian-Li, Zhou Dan, Li Da-Cheng, Gao Su-Qing, Zhao Tong-Mao. Identification of a new HLA allele, A\*1114, in a Chinese family. *Tissue Antigens*, 2003, 61 (3): 253-255.
- [5] Wu Guo-Guang, Cheng Liang-Hong, Deng Zhi-Hui, Wang Li-Xin, Wei Tian-Li, Yang Chun-Sen, Zhao Tong-Mao. Cloning and complete sequence of a novel HLA-A null allele, A\*0253N, with a termination codon generated by a C to G mutation in exon2. *Tissue Antigens*, 2002, 59 (4): 328-330.

- [6] Zou Hong-Yan, Li Zhen, Shao Chao-Peng, Cheng Liang-Hong, Jin Shi-Zheng. A new HLA-A\*30 variant, A\*3018, identified by sequence-based typing in the Chinese population. *Tissue Antigens*, 2007, 69 (3): 281-282.
- [7] Sun Yu-Ying, Xi Yong-Zhi. The actualities and problems about the discovery of HLA new allele in Chinese population. *Chinese Medical Journal*, 2006, 86 (32): 2233-2235. 孙玉英, 奚永志. 我国大陆人群 HLA 新等位基因发现的现状及应注意的问题. *中华医学杂志*, 2006: 86 (32): 2233-2235.
- [8] Gomez Casado E, Vargas Alarcon G, Martinez Laso J, Granados J, Varela P, Alegre R, Longas J, Gonzalez Hevilla M, Martin Villa JM, Arnaiz Villena A. Evolutionary relationships between HLA-B alleles as indicated by an analysis of intron sequences. *Tissue Antigens*, 1999, 53 (2): 153-160.
- [9] Swelsen WT, Voorter CE, van den Berg Loonen EM. Polymorphism of intron4 in HLA-A, -B and -C genes. *Tissue Antigens*, 2003, 61 (6): 475-483.
- [10] Christine Voorter, Ella van den Berg-Loonen. Sequence-Based Typing for HLA-B: Amplification and Sequencing of Exon 2 and 3 Separately. *International Histocompatibility Working Group*, Chapter 8-C: TM8C-1~TM8C-7.
- [11] TAO Zan-Ying. HLA—B27 antigen and ankylosing spondylitis. *Acta Medicinæ Sinica*, 2006, 19(2): 352-354. 陶赞英. HLA-B27和强直性脊柱炎. *华夏医学*, 2006, 19 (2) : 352-354.
- [12] Che Xuan-Yi, Ma Yong, Li Yu-Qin, Wang Jian-Ping, Xue Yu-Shun, Wang Li-Feng. Clinical research in HLA-B27 positive or negative patients with acute anterior uveitis. *International Journal of Ophthalmology*, 2006, 6 (2): 404-406. 车选义, 马勇, 李裕钦, 王建萍, 薛雨顺, 王利峰. 急性前葡萄膜炎的HLA-B27阳性与阴性患者的临床比较. *国际眼科杂志*2006, 6 (2): 404-406.
- [13] Ma HJ, Hu FP. Diversity of human leukocyte antigen-B27 alleles in Han population of Hunan province, southern China. *Tissue Antigens*, 2006, 68 (2): 163-166.
- [14] WU Guo-Guang, DENG Zhi-hui, GAO Su-Qing, CHENG Liang-Hong, JIN Shi-Zheng, ZHOU Dan, LI Zhen, ZOU Hong-Yan, ZHANG Xuan, WEI Tian-Li, CHENG Xi, WANG Da-Ming. Study of HLA polymorphism in the 6965 Han bone marrow registry donors. *Chinese Medical Journal*, 2004, 25 (8) : 473-477. 吴国光, 邓志辉, 高素青, 程良红, 金士正, 周丹, 李楨, 邹红岩, 张旋, 魏天莉, 程曦, 王大明. 6965名汉族骨髓供者HLA多态性分析. *中华血液学杂志*, 2004年8月第25卷第8期: 473-477.
- [15] Lopez Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, Chiewsilp P, Isarangkura D, Kanga U, Dominguez O, Coto E, Pena M, Setien F. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis Evidence for new associations. *Tissue Antigens*, 1995, 45 (3): 167-169.

### 3-9

## 长沙血液中心参加 HLA 分型室间质评和质量抽检结果分析

王赤林 谢毓滨

长沙血液中心输血研究室 (410001)

**摘要:** 目的 为不断提高中国造血干细胞捐献者资料库造血干细胞志愿捐献者 HLA 分型质量, 保

证入库 HLA 分型数据的正确性,对本实验室参加 HLA 分型室间质评和质量抽检结果进行分析,总结其中的得与失。**方法** 11 期总计 88 份室间质评样品检测采用 PCR-SSP 低分辨试剂盒作 HLA-A、B、DRB1 分型;质量抽检 9 期总计 463 份抽检样品中 435 份样品的检测结果采用 PCR-SSP 低分辨试剂盒作 HLA-A、B、DRB1 分型,28 份样品的检测结果系采用 PCR-SSOP 中低分辨试剂盒作 HLA-A、B、DRB1 分型。**结果** 前 10 期 80 份中国造血干细胞捐献者资料库质量控制实验室下发的 DNA 样品检测 100%正确;前 8 期总计抽检样品 412 人份,错误数 6 人份,其中样品错误 2 人份,结果录入错误 1 人份,分型结果错误 3 人份,错误率 1.46%。**结论** 错误原因为人为错误和技术错误各占 50%,因此加强实验过程的质量控制和严格核对、任用技术熟练、实验认真严谨的员工和提高员工分析实验结果的能力和和经验、选择高质量的分型试剂、严格控制实验条件是保证中国造血干细胞捐献者资料库造血干细胞志愿捐献者 HLA 分型质量和入库数据正确性的关键因素。

**关键词:** HLA; 室间质评; 质量抽检

长沙血液中心输血研究室下设的 HLA 实验室于 2003 年 3 月通过中国造血干细胞捐献者资料库管理中心的评审验收,正式成为中国造血干细胞捐献者资料库 HLA 分型实验室的一员,至今已有 5 年。5 年来向中国造血干细胞捐献者资料库入库造血干细胞志愿捐献者 HLA 分型数据总计 22712 人份,参加了中国造血干细胞捐献者资料库的 11 期总计 88 份样品的 HLA 分型质量控制室间评价、9 期总计 463 份样品的上传数据 2%的样品质量抽检。为不断提高中国造血干细胞捐献者资料库造血干细胞自愿捐献者 HLA 分型质量,保证入库 HLA 分型数据的正确性,笔者对本实验室参加 HLA 分型室间质评和质量抽检结果进行分析,总结其中的得与失。

## 1 材料与方法

**1.1 质检样品** HLA 分型质量控制室间评价样品系中国造血干细胞捐献者资料库质量控制实验室下发的每期 8 个 DNA 样品,共参加 11 期总计 88 份样品。质量抽检样品系中国造血干细胞捐献者资料库管理中心按本实验室入库 HLA 分型数据 2%的比例随机抽样,本实验室将被抽到的冰冻保存样品邮寄给质量控制实验室,9 期总计 463 份抽检样品中,前 8 期总计 412 份抽检样品系冰冻保存的全血样品,第 9 期 51 份抽检样品系冰冻保存的全血提取的 DNA 样品。

**1.2 方法** 11 期总计 88 份室间质评样品检测采用 Dynal 公司的 PCR-SSP 低分辨试剂盒作 HLA-A、B、DRB1 分型,个别结果难以判定的位点采用其它试剂复核。质量抽检 9 期总计 463 份抽检样品中,435 份样品的检测结果采用 PCR-SSP 低分辨试剂盒作 HLA-A、B、DRB1 分型,其中 90%使用来自 Dynal 公司的试剂盒,10%使用来自 BAG、Biotest 试剂盒,另有 28 份样品的检测结果系采用 Dynal 公司的 PCR-SSOP 中低分辨试剂盒作 HLA-A、B、DRB1 分型。

## 2 结果

**2.1 室间质评结果** 前 10 期 80 份中国造血干细胞捐献者资料库质量控制实验室下发的 DNA 样品检测 100%正确,无一错报。第 11 期 8 份室间质评样品检测尚未见结果回报。

**2.2 质量抽检结果** 前 8 期总计抽检样品 412 人份,错误数 6 人份,其中样品错误 2 人份,结果录入错误 1 人份,分型结果错误 3 人份,错误率 1.46%,详情见附表。第 9 期质量抽检 51 人份样品尚未见结果回报。

附表 质量抽检 412 人份样品结果分析

批次	本室抽检数	本室错误数	错误原因	本室错误率 (%)	同期总错误率 (%)
1	11	0	样品错误	0	8.18
2	34	1	结果录错	2.94	3.84
3	43	1	分型错误	2.33	2.85
4	46	1	分型错误	2.17	1.80
5	82	1	样品错误 1	1.22	1.10
6	49	0	分型错误 1	0	0.84
7	96	2	人为错误 3	2.08	
8	51	0	技术错误 3	0	
合计	412	6		1.46	3.10 (前 6 期)

### 3 讨论

前 10 期 80 份中国造血干细胞捐献者资料库质量控制实验室下发的 DNA 样品检测 100%正确, 且其它实验室室间质评的检测结果也基本上 100%正确, 说明已知的质控标本检测达到 100%正确难度不大, 大家都会选择好的试剂和方法以技术熟练的员工进行操作, 认真核对结果后再发报告, 基本都会取得好的成绩。

2%的样品随机质量抽检因其被抽检样品的不可预知性, 其结果更客观的反应了实验室的管理水平和检测水平。本实验室被抽检的前 8 期总计 412 人份样品出现 6 人份错误, 其中 3 人份属于人为错误, 包括 1 人份结果录入错误和 2 人份样品错误, 占错误的 50%, 提示人为错误占相当重的比例, 不容忽视。HLA 分型无论是 PCR-SSP 或 PCR-SSOP 方法, 其手工操作的环节很多, 容易出现如结果录入错误和样品错误等人为错误, 因此加强实验过程质量控制, 采取多种严格核对手段能有效减少此类错误的发生。然而有些环节的人为错误是无法通过核对发现的, 所以对实验者个人素质提出了较高要求, 任用技术熟练、实验认真严谨的实验者极少出现人为错误。

本实验室被抽检的前 8 期总计 412 人份样品出现 6 人份错误, 其中 3 人份属于技术错误, 也占错误的 50%, 其中 1 人份漏报 DRB1\*08, 1 人份漏报 B\*13, 1 人份将 B\*15 的特异性 B72 错报为 B71。出现技术错误的 3 人份的 HLA 分型均采用同一公司的试剂作 PCR-SSP 方法分型, 都因为电泳图某特异性条带极弱而漏检。分型试剂的质量、实验条件的控制如: DNA 的质量、扩增的条件控制、琼脂糖胶的质量、电泳时的电压及时间等条件的控制都可能引起这种漏检<sup>[1]</sup>。因此选择高质量的分型试剂、严格控制实验条件可以尽可能的减少这类错误的发生, 提高员工分析实验结果的能力和经验的、细致分析实验结果也是减少这类错误发生的重要因素。

本实验室参加前 8 期质量抽检有 3 期错误率为零, 共有 4 期错误率低于 2%, 4 期错误率在 2%~3%之间, 平均错误率 1.46%, 前 6 期质量抽检有 4 期低于中国造血干细胞捐献者资料库质量抽检总错误率, 2 期高于中国造血干细胞捐献者资料库质量抽检总错误率, 前 6 期平均错误率 1.44%, 低于前 6 期中国造血干细胞捐献者资料库质量抽检总错误率 3.10%。结果显示本实验室在 HLA 分型质量控制和保证中国造血干细胞捐献者资料库入库分型数据正确性方面取得一定成绩, 但也显示存在一些质量隐患。通过质量抽检结果分析, 总结成功经验, 找出错误原因采取预防纠正措施, 达到不断提高中国造血干细胞捐献者资料库造血干细胞自愿捐献者 HLA 分型质量之目的。



## 参考文献

- [1] 孙瑛, 傅敏, 金晔等. PCR-SSP 在 HLA 低分辨中常见问题及解决措施, 中国输血杂志, 2007, 20(3): 204-206

## 3-10

## 吉林省朝鲜族造血干细胞捐献者 HLA-A, B, DR 基因 和单倍型分析

林乾飞 鞠瑞青 于江虹 任海波 金成日

长春市中心血站 (130033)

**摘要:** 目的 分析吉林省朝鲜族造血干细胞捐献者 HLA 基因和单倍型分布特征, 预计不同型别的患者找到相同供者的可能性。方法 采用 PCR-SSP、PCR-SSO 对吉林省朝鲜族造血干细胞捐献者 HLA-A, B, DR 分型, 及统计学分析。结果 朝鲜族 HLA-A, B, DR 位点基因频率较高的分别为 A\*2、A\*24、A\*33 ; B\*15 (62)、B\*40 (61)、B\*44; DRB1\*4、DRB1\*15、DRB1\*12。单倍型频率较高的 A\*2-B\*15 (62)、A\*33-B\*44、A\*2-DRB1\*15、A\*2-DRB1\*12、B\*15 (62)-DRB1\*4、B\*13-DRB1\*12 等。结论 吉林朝鲜族 HLA-A、B、DR 基因频率和单倍型频率分布有一定的趋势。**关键词:** HLA; 基因频率; 单倍型; 连锁不平衡; 朝鲜族

人类白细胞抗原是人体调控特异性免疫反应和决定疾病易感性个体差异的主要基因系统, 是目前所知的人类最复杂最具多态性的抗原系统, 也是骨髓移植和器官移植中主要的组织相容性抗原系统, HLA 等位基因频率和连锁不平衡类型在不同的人群、地域存在一定的差异, 这种差异在人类遗传学上形成了极好的群体标志。因此 HLA 的基因频率和单倍型频率在为临床移植寻找相同基因供受对、研究人类的演化和迁移规律以及免疫遗传的临床和基础研究提供宝贵数据。本文对吉林省朝鲜族造血干细胞捐献者作了 HLA-A、B、DR 低分辨基因分型和统计分析。

### 1 材料与方 法

**1.1 样本** 来自吉林省分库的 91 名朝鲜族造血干细胞捐献志愿者

**1.2 DNA 制备** 取 EDTA 抗凝血 0.5ml, 用快速提取试剂盒提取 DNA, 检测 DNA 浓度在 20~100ng/μl, AD260/280 比值为 1.5~1.9。

### 1.3 分型试剂及分型方法

**1.3.1 PEL-FREEZ ABDR SSPUniTray** 分别将 DNA 样本 7μl 及酶、primer 混合, 按照 96℃ 60s; 96℃ 25s, 70℃ 50s, 72℃ 45s, 循环 5 次; 96℃ 25s, 65℃ 50s, 72℃ 45s, 循环 21 次; 96℃ 25s, 55℃ 60s, 72℃ 120s, 循环 4 次进行扩增, 扩增产物在 2%琼脂糖凝胶上点样、电泳后, 凝胶成像系统拍照, 分析结果;

**1.3.2 聚合酶链反应序列特异性寡核苷酸探针 (PCR-SSOP) Dynalplex HLA Typing Kits 分型试剂盒** 96 孔板加入 DNA 样本 1.5μl 及相应引物、MIX、Taq 酶, 按照试剂盒操作方法进行扩增、

杂交、标记、读板并分析结果；One Lambda Inc LAB TypeSSO 分型试剂盒 96 孔板加入 DNA 样本 1.5μl 及相应引物、D-MIX、Taq 酶，按照 96℃ 3min；96℃ 20s，60℃ 20s，72℃ 20s，循环 5 次；96℃ 10s，60℃ 15s，72℃ 20s，循环 30 次；72℃ 10min 进行扩增。另取 96 孔板分别加入 2.5μl 扩增产物，μl 变性液及 μl 中和液进行变性后加入磁珠和杂交液于 60℃ 15min，重复离心、洗涤 3 次用 SAPE 标记后用 Luminex 100ISTM 读板并分析结果。

**1.4 统计分析** 抗原频率、基因频率用直接算法，HLA 单倍型频率、连锁不平衡参数、相对连锁不平衡参数用文献<sup>[1]</sup>方法计算， $\chi^2$  值用 spss 统计分析软件计算。

## 2 结果

吉林省朝鲜族人群中 HLA 基因频率 见表 1~表 3，检出 HLA-A、B、DRB1 座位基因（包括各基因的血清学特异性）分别为 13、24、11 种。HLA-A 位点基因频率较高的为 A\*2 (39.01%)、A\*24 (17.03%)、A\*33 (12.08%)；HLA-B 位点基因频率较高的为 B\*15 (62) (15.38%)、B\*40 (61) (12.09%)、B\*44 (10.43%)；HLA-DRB1 位点基因频率较高的为 DRB1\*4 (15.93%)、DRB1\*15 (12.47%)、DRB1\*12(10.99)。HLA 单倍型频率较高的 A\*2-B\*15(62)、A\*33-B\*44、A\*2-DRB1\*15、A\*2-DRB1\*12、B\*15 (62) -DRB1\*4、B\*13-DRB1\*12、A\*2- B\*15 (62) -DR B1\*4、A\*2- B\*15 (62) -DR B1\*12。

表 1 吉林省朝鲜族捐献者 HLA 基因频率分布 (n=91)

HLA 抗原	阳性数	F	GF	HLA 抗原	阳性数	F	GF
A1	2	0.0110	0.0110	B40 (61)	22	0.2418	0.1209
A2	71	0.6154	0.3901	B44	19	0.1868	0.1044
A3	7	0.0659	0.0385	B46	13	0.1429	0.0714
A11	19	0.1978	0.1044	B48	10	0.1099	0.0549
A23	1	0.0110	0.0055	B49	2	0.0220	0.0110
A24	31	0.3077	0.1703	B51	9	0.0989	0.0495
A26	11	0.1099	0.0604	B52	3	0.0330	0.0165
A29	1	0.0110	0.0055	B54	5	0.0549	0.0275
A30	7	0.0659	0.0385	B55	4	0.0440	0.0220
A31	8	0.0879	0.0440	B57	1	0.0110	0.0055
A32	1	0.0110	0.0055	B58	9	0.0989	0.0495
A33	22	0.2418	0.1209	B59	3	0.0330	0.0165
A68	1	0.0110	0.0055	B67	2	0.0220	0.0110
B7	7	0.0769	0.0385	DR1	11	0.1209	0.0604
B8	2	0.0220	0.0110	DR3 (17)	6	0.0659	0.0330
B13	17	0.1758	0.0934	DR4	29	0.3187	0.1593
B15 (62)	28	0.3077	0.1538	DR7	15	0.1538	0.0824
B15 (71)	3	0.0330	0.0165	DR8	19	0.2088	0.1044
B15 (75)	4	0.0440	0.0220	DR9	19	0.1978	0.1044
B18	1	0.0110	0.0055	DR11	12	0.1209	0.0659
B27	2	0.0220	0.0110	DR12	20	0.2198	0.1099
B35	8	0.0879	0.0440	DR13	18	0.1868	0.0989
B39	3	0.0330	0.0165	DR14	10	0.0989	0.0549
B40 (60)	5	0.0549	0.0275	DR15	23	0.2418	0.1264

表 2 常见的 HLA-A、B、DR 单倍型频率分布

单倍型	频率	连锁不平衡参数	相对不平衡参数	$\chi^2$	rp
A2 B62	0.09590	0.03461	0.34578	2.549	0.16507
A33 B44	0.05951	0.04682	0.54732	18.734	0.41319
A2 B46	0.04701	0.01883	0.40931	1.517	0.12805

单倍型	频率	连锁不平衡参数	相对不平衡参数	$\chi^2$	rp
A2 B61	0.04123	-0.00309	0.06982	0.026	0.01690
A24 B62	0.04030	0.01320	0.09832	0.708	0.08786
A33 B58	0.03803	0.03147	0.71226	15.655	0.38312
A11 B62	0.03605	0.01921	0.21950	2.347	0.15856
A30 B13	0.03353	0.03044	1.00000	30.11	0.49862
A2 B7	0.03031	0.01541	0.63322	1.873	0.14201
A2 B48	0.02937	0.00789	0.22507	0.34	0.06101
A24 B61	0.02590	0.00630	0.06487	0.215	0.04855
A24 B35	0.02491	0.01736	0.46405	4.146	0.20875
A26 B61	0.02487	0.01828	0.36591	5.145	0.23133
A2 B51	0.02356	0.00429	0.13640	0.111	0.03490
A2 B75	0.02222	0.01378	1.00000	2.615	0.16713
A24 B7	0.01918	0.01259	0.38569	2.476	0.16275
A2 B60	0.01894	0.00835	0.48353	0.762	0.09113
A2 B13	0.01669	-0.01831	0.52321	0.092	0.10889
A2 B71	0.01662	0.01031	1.00000	1.939	0.14444
A24 B52	0.01662	0.01383	1.00000	6.98	0.26691
A33 B61	0.01626	0.00118	0.01031	0.009	0.00994
A11 B13	0.01524	0.00562	0.06814	0.333	0.06038
A26 B58	0.01512	0.01225	0.25599	5.098	0.23033
A26 B48	0.01486	0.01166	0.21855	4.151	0.20887
A24 B60	0.01455	0.00987	0.42568	2.122	0.15095
A2 DR15	0.07357	0.02449	0.30557	1.535	0.12880
A2 DR12	0.07070	0.02637	0.36435	1.963	0.14531
A2 DR4	0.06796	0.00165	0.01523	0.005	0.00741
A33 DR1	30.05951	0.04682	0.54732	18.734	0.41319
A2 DR14	0.05074	0.03147	1.00000	6.242	0.25336
A11 DR4	0.04925	0.03104	0.36036	5.799	0.24476
A2 DR9	0.03887	-0.0007	60.01921	0.002	0.00469
A24 DR15	0.03843	0.01672	0.15554	1.4	0.12309
A24 DR4	0.03788	0.00856	0.06176	0.276	0.05499
A2 DR1	0.03521	0.01152	0.29764	0.662	0.08498
A2 DR8	0.03503	-0.00694	0.16533	0.135	0.03849
A30 DR7	0.03353	0.03084	1.00000	35.329	0.52883
A33 DR8	0.03117	0.01689	0.17551	2.102	0.15026
A24 DR1	0.02869	0.01821	0.35077	3.321	0.18764
A24 DR9	0.02822	0.01070	0.12323	0.694	0.08700
A11 DR12	0.02625	0.01407	0.15266	1.687	0.13491
A2 DR11	0.02587	0.00218	0.05625	0.023	0.01590
A33 DR7	0.02136	0.01101	0.15772	1.202	0.11418
A26 DR13	0.01921	0.01366	0.26787	3.361	0.18873
A24 DR70	0.1841	0.00495	0.07430	0.19	0.04565
A3 DR17	0.01632	0.01520	0.46895	19.652	0.42143
A24 DR11	0.01480	0.00432	0.08327	0.184	0.04492
A33 DR4	0.01479	-0.00777	0.34443	0.282	0.05558
A11 DR13	0.01457	0.00432	0.04915	0.185	0.04504
B62 DR4	0.06975	0.04158	0.31215	7.061	0.26834

单倍型	频率	连锁不平衡参数	相对不平衡参数	$\chi^2$	rp
B13 DR12	0.04749	0.03673	0.45122	13.298	0.35707
B61 DR9	0.04646	0.03429	0.37201	10.275	0.31852
B58 DR13	0.04462	0.03964	0.86638	32.407	0.51245
B62 DR12	0.04123	0.02240	0.22891	2.887	0.17536
B13 DR7	0.03673	0.02935	0.40338	11.999	0.34132
B46 DR8	0.03631	0.02811	0.42609	9.978	0.31435
B44 DR13	0.03509	0.02544	0.28720	6.964	0.26662
B7 DR1	0.03335	0.03091	0.84019	38.68	0.54614
B62 DR15	0.03185	0.01100	0.10147	0.623	0.08246
B44 DR7	0.03000	0.02212	0.30616	6.366	0.25570
B51 DR4	0.02367	0.01481	0.35362	2.581	0.16607
B44 DR8	0.02073	0.00988	0.11302	0.921	0.10010
B35 DR15	0.01935	0.01354	0.34578	3.191	0.18406
B61 DR14	0.01907	0.01315	0.29335	2.94	0.17691
B62 DR14	0.01731	0.00913	0.21445	1.045	0.10655
B52 DR15	0.01662	0.01447	1.00000	9.73	0.31080
B59 DR4	0.01662	0.01372	1.00000	6.632	0.26063
B55 DR9	0.01607	0.01375	0.69076	8.04	0.28492
B54 DR13	0.01559	0.01285	0.51164	5.946	0.24766
B75 DR4	0.01554	0.01166	0.63567	3.585	0.19469
B54 DR8	0.01542	0.01234	0.49798	4.901	0.22606
B51 DR14	0.01535	0.01277	0.26524	6.159	0.25178
B35 DR7	0.01460	0.01100	0.26585	3.295	0.18693
B48 DR11	0.01458	0.01106	0.20855	3.392	0.18957

表3 常见的HLA-A、B、DR单倍型频率分布

单倍型	频率	连锁不平衡参数	相对不平衡参数	$\chi^2$	rp
A2 B62 DR4	0.03745	0.00465	0.03613	4.548	0.21817
A2 B62 DR12	0.03638	0.01242	0.13394	2.77	0.17187
A11 B62 DR4	0.03539	0.01975	0.13551	5.951	0.24775
A30 B13 DR7	0.03353	0.02702	1.00000	0	0.00000
A33 B58 DR13	0.03191	0.02068	0.52344	5.238	0.23330
A33 B44 DR7	0.02584	0.01714	0.23991	6.471	0.25766
A2 B7 DR1	0.02443	0.01035	0.41144	26.164	0.47256
A24 B61 DR9	0.02419	0.01448	0.15298	10.73	0.32477
A33 B54 DR13	0.02330	0.01948	0.81021	2.2	0.15364
A24 B62 DR15	0.02306	0.01331	0.11137	2.274	0.15614
A2 B13 DR12	0.02204	0.00371	0.05031	11.063	0.32923
A11 B58 DR13	0.02116	0.01614	0.35310	18	0.40637
A11 B61 DR13	0.02077	0.02095	0.21290	3.445	0.19099
A24 B7 DR1	0.02021	0.01311	0.40807	17.111	0.39783
A11 B46 DR13	0.01995	0.01958	0.26527	1.8	0.13927
A11 B51 DR13	0.01907	0.01798	0.36216	3.445	0.19099
A2 B61 DR14	0.01907	0.00831	0.20786	3.374	0.18908
A2 B44 DR13	0.01845	0.01202	0.13095	14.577	0.37158
A11 B62 DR12	0.01790	0.00909	0.09511	1.8	0.13927
A2 B61 DR12	0.01784	0.01101	0.10021	0.334	0.06047

单倍型	频率	连锁不平衡参数	相对不平衡参数	$x^2$	rp
A2 B61 DR15	0.01776	0.01185	0.10692	0.17	0.04318
A11 B54 DR13	0.01755	0.01518	0.59566	3.445	0.19099
A2 B62 DR14	0.01731	0.00390	0.10457	0.356	0.06242
A24 B52 DR15	0.01662	0.01176	1.00000	7.093	0.26890
A33 B44 DR13	0.01642	0.00269	0.03183	1.636	0.13289
A2 B48 DR9	0.01590	0.01037	0.20325	2.731	0.17069

### 3 讨论

在本次共检出了 HLA-A 等位基因 13 个, HLA-B 等位基因 14 个, HLA-DRB1 等位基因 11 个。结果没有检出 A\*25、34、36、43、66、39、74、80; B\*37、38、41、42、45、47、50、53、56、63、64、65、72、73、76、77、78、81、82、83; DR DRB1\*10、16, 说明这些基因在朝鲜族人群中的频率低于  $1/(2 \times 91)$  或可能不存在。将本次 HLA-A、B、DR 基因频率与长春汉族人基因频率前三位 A\*2、A\*24、A\*11、B\*60、B\*13、B\*62、DR B1\*15、DR B1\*7、DR B1\*9 比较<sup>[2]</sup>, 排序略有不同。HLA 单倍型频率较高的 A\*2-B\*15 (62)、A\*33-B\*44、A\*2-DRB1\*15、A\*2-DRB1\*12、B\*15 (62) -DRB1\*4、B\*13-DRB1\*12, 同样在连锁不平衡中也较高; 但 HLA 单倍型频率较高的 A\*2-B\*15 (62) -DR B1\*4、A\*2-B\*15 (62) -DR B1\*12 的连锁不平衡参数不高, 这些特征对朝鲜族人群 HLA 的分布有一定参考意义。

目前的技术还不能直接测知一个个体的 HLA 单倍型, 需要通过家系遗传分析来获取。而群体样本单倍型的分布要靠公式推导、计算得出 HLA-AB、ABDR 单倍型频率、连锁不平衡参数等数值, 反映群体的单倍型特征。将本次结果与江、浙、沪汉族人群比较<sup>[3]</sup>, 呈北高南低分布的 A30-B13-DR7 单倍型频率朝鲜族与江、浙、沪分别为 0.0335 和 0.0442 表现出低于江、浙、沪, 呈北低南高分布的 A33-B58-DR13 单倍型频率朝鲜族与江、浙、沪分别为 0.0319 和 0.0181 表现出高于江、浙、沪, 结果表明与我国 HLA 单倍型分布存在差异。

基因频率和单倍型频率的分析能帮助估算为需要移植的患者在骨髓库中找到 HLA 匹配供者的概率, 本次统计为朝鲜族 HLA 群体分布及患者在骨髓库中找到相合供者提供重要资料。

本次统计由于受样本量限制, 结果与实际分布会有一定差距, 有待于样本增加后再作进一步分析。

### 参考文献

- [1] 赵桐茂.HLA 遗传学中的统计分析.见: 赵桐茂主编.HLA 分型原理和应用.上海科学技术出版社, 1984, 141-168
- [2] 王卓敏等.长春汉族人 HLA-ABC 及 HLA-DR、DQ 抗原分布.中国输血杂志, 1993, 6 (3): 158
- [3] 冯明亮, 季云, 陆京, 等.江浙沪地区汉族人群 HLA 单体型研究.遗传学报, 20003, 30 (6): 584

3-11

## HLA 新等位基因 HLA-DRB1\*0453 的认定

张坤莲 李剑平 刘显智 章旭 陈阳 李晓丰 曲喆 高景波  
辽宁省血液中心 (110044)

**摘要:** **目的** 鉴定一个 HLA-DRB1\*04 的新等位基因。**方法** 从外周血中提取基因组 DNA, 应用 PCR-SSO 技术进行中低分辨率的 HLA 基因分型, PCR 产物直接测序技术检测基因序列, 通过软件和数据库中的同源等位基因进行序列比对, 对先证者进行家系分析。**结果** 样本 HLA-DRB1 位点的第 2 外显子序列与所有已知 HLA-DRB1 等位基因序列不同, 该基因序列与同源性最高的等位基因 DRB1\*0447 相比有 3 个碱基替代, 在外显子 2 区域中的 286 位碱基发生了 C→A 替代, 导致相应的 67 密码子由亮氨酸 (L) → 异亮氨酸 (I), 344 和 345 位碱基发生了 GT→TG 替代, 并导致相应的 86 密码子由甘氨酸 (G) → 缬氨酸 (V)。家系分析结果显示, 先证者的新等位基因 HLA-DRB1\*0453 遗传自父亲。**结论** 该等位基因是 HLA-DRB1\*04 新的等位基因, 被 WHO HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-DRB1\*0453。

**关键词:** HLA-DRB1\*0453; 新等位基因; 基因分型; 序列分析

## Identification of a novel HLA allele HLA-DRB1\*0453

Zhang Kunlian, Li Jianping, Liu Xianzhi, Zhang Xu Chen Yang Li Xiaofeng, Qu Zhe, Gao Jingbo.  
Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, China

**Abstract: Objective** To identify a new HLA-DRB1\*04 allele in a Chinese donor. **Methods** Genomic DNA was extracted from the whole blood. HLA genotyping methods with PCR-SSO assay and sequencing-based typing (SBT) of PCR products were used. The investigation of pedigree was performed for the new HLA allele. **Results** SBT results indicated the novel DRB1 allele differed from the closest matching allele DRB1\*0447 by three nucleotide substitution in Exon 2; at nt 286 C→A, resulting in an amino acid change from Leu (L) to Ile (I) at codon 67, and nt 344-345 GT→TG, resulting in an amino acid change from Gly (G) to Val (V) at codon 86. The investigation of pedigree showed that the novel allele DRB1\*0453 of the proband was inherited from the father. **Conclusion** A novel HLA allele was identified and was officially designated as HLA-DRB1\*0453 by WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System.

**Key words:** HLA-DRB1\*0453; A novel allele; Genotyping; Sequencing-based typing

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 基因系统是具有最复杂遗传多态性的基因系统, 由于 HLA 基因分型和基因测序技术的引用, 新的 HLA 等位基因不断被发现。本文最近发现并

确认 1 个 HLA-DRB1 新等位基因，该等位基因已被世界卫生组织 HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-DRB1\*0453<sup>[1]</sup>。现报告如下。

## 材料和方法

1 **标本来源** 来自中国造血干细胞资料库辽宁分库及辽宁省血液中心血小板捐献者 HLA 基因分型资料库的志愿者，为辽宁抚顺人，男性，汉族。家系分析对象为其一级亲属。

2 **基因组 DNA 制备** 静脉抽取受检者全血 5ml, EDTA 抗凝, 用商品试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 制备基因组 DNA, 将制备的 DNA 调至适当浓度, 供 PCR-SSO 分型和基因序列分析使用。

3 **HLA 基因分型** 应用 Luminex 流式微珠自动杂交仪做 HLA 基因分型, 采用 PCR-SSO 分型试剂盒 (LABType™ SSO, R-SSO-006N, One Lambda Inc., CA, USA), 参照使用说明书操作。扩增仪为美国 PE 公司的 PE9700 型, 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像分析系统 (UVP8000, 美国) 摄像分析, 结果判断采用 HLA100LS 软件判读。

4 **DNA 序列分析** 为了分开杂合等位基因, 单独测定 DRB1\*04 新等位基因序列, 采用 DRB1\*04 特异性引物扩增被检者 DRB1\*04 第 2 外显子, 所用引物对: 正向引物为 5' -CGGATCGTTCTTGTCC-3', 反向引物 5' CACACTCAGATTCTCC GCTC-3'。经 3 个独立的 PCR 反应获得 3 份扩增片段从 5' 和 3' 两端测定 DRB1\*04 第 2 外显子的碱基顺序。测序结果用 SigMan II (DNASar, inc., Madison, WI, USA) 分析。

## 结 果

1 **HLA 基因分型结果** PCR-SSO 基因分型结果显示, 被检者 A 位点为 HLA-A\*02EK、31KP; B 位点为 HLA-B\*15SUD、5001; HLA-DRB1 位点反应格局见图 1。如图 1 所示, 1 号探针假阴性, 56 号探针假阳性可出结果 DRB1\*1501 和 DRB1\*1607; 或者 23 号探针, 47 号探针假阳性可出结果 DRB1\*0432 和 DRB1\*15GEP。HLA-DRB1 位点反应格局异常不能正确判断出结果。

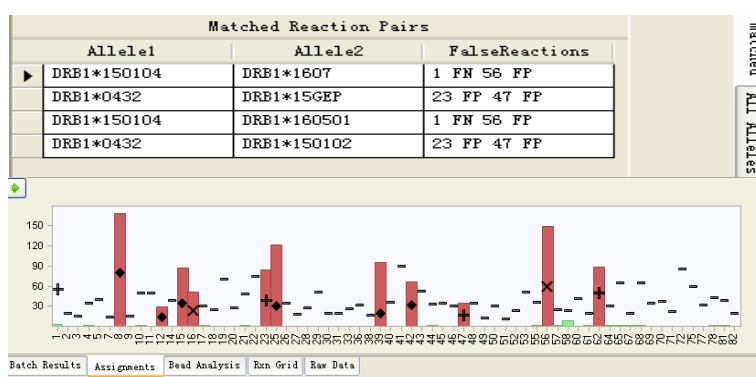


图 1 先证者 PCR-SSO (OneLambda Luminex platform) 反应格局

Fig 1 Reaction pattern of proband PCR-SSO (OneLambda Luminex platform)

Red bars indicate positive hybridization of PCR product to beads with probes and green bars indicate negative. The reaction pattern does not match any known HLA-DRB1 alleles and the false reactions (false positive, FP and false negative, FN) suggested by software is not reasonable, so a novel HLA-DRB1 allele was suspected.

2 **DNA 序列分析** 被检者的基因组 DNA 样品经 3 个独立的 PCR 反应, 获得 3 份扩增片断,

测定 DRB1\*04 第 2 外显子序列。测序结果显示该样品 HLA-DRB1 位点第 2 外显子序列与所有已知 HLA-DRB1 等位基因序列不一致。软件分析表明该基因序列与同源性最高等位基因 DRB1\*0447 相比有 3 个碱基替代。在外显子 2 区域中的 286 位碱基发生了 C→A 碱基替代，并导致相应的 67 密码子由 CTC (L) →ATC (I)，在外显子 2 区域中的 344 和 345 位碱基发生了 GT→TG 碱基替代，并导致相应的 86 密码子由 GGT (G) →GTG (V) (如图 2)。该新等位基因于 2005 年 3 月由 WHO HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-DRB1\*0453，新的基因序列已递交 Gen Bank (AY947537)。

						10								
DRB1*0447	CA	CGT	TTC	TTG	GAG	CAG	GTT	AAA	CAT	GAG	TGT	CAT	TTC	TTC
DRB1*0453	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		20									30			
DRB1*0447	AAC	GGG	ACG	GAG	CGG	GTG	CGG	TTC	CTG	GAC	AGA	TAC	TTC	TAT
DRB1*0453	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
							40							
DRB1*0447	CAC	CAA	GAG	GAG	TAC	GTG	CGC	TTC	GAC	AGC	GAC	GTG	GGG	GAG
DRB1*0453	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
			50											60
DRB1*0447	TAC	CGG	GCG	GTG	ACG	GAG	CTG	GGG	CGG	CCT	GAT	GCC	GAG	TAC
DRB1*0453	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
										70				
DRB1*0447	TGG	AAC	AGC	GAG	AAG	GAC	CTC	CTG	GAA	GAC	AGG	CGC	GCC	GCG
DRB1*0453	---	---	---	---	---	---	A---	---	---	---	---	---	---	---
						80								
DRB1*0447	GTG	GAC	ACC	TAC	TGC	AGA	CAC	AAC	TAC	GGG	GTT	GGT	GAG	AGC
DRB1*0453	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-TG	---	---
		90												
DRB1*0447	TTC	ACA	GTG	CAG	CGG	CGA	G							
DRB1*0453	---	---	---	---	---	---	-							

图 2 新等位基因 DRB1\*0453 与 DRB1\*0447 第 2 外显子的核苷酸序列对比图

Fig 2 The nucleoside acid sequence of exon 2 of DRB1\*0453 compared with the DRB1\*0447

Dashes (-) indicate identities with DRB1\*0447. The numbers above the sequence indicate the codon number.

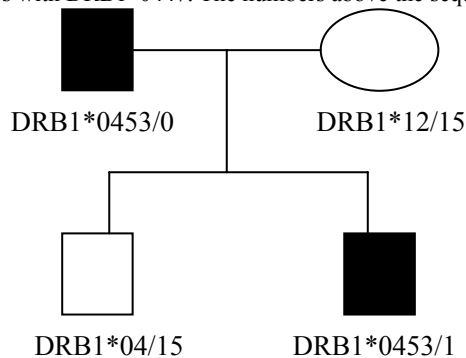


图 3 家系分析图示

Fig3 Family genetic investigation

Black color represents the carriers of new allele HLA-DRB1\*0453.

The result shows that the new allele comes from his father.

3 家系分析结果 (见图 3) 先证者父亲 HLA-DRB1 位点分型结果: HLA- DRB1\*0453、04; 母亲 HLA-DRB1 位点分型结果: HLA- DRB1\*12、15, 表明新等位基因遗传自父亲。



## 讨 论

HLA 是人类主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 产生的抗原, 在不同种族或同一种族的不同群体中基因频率各不相同, 某些抗原又具有人种特异性<sup>[2]</sup>。HLA 配型对于器官或造血干细胞移植 (HSCT) 十分重要, 供受者 HLA 相配可以减少移植物抗宿主病 (GVHD), 提高移植存活率<sup>[3]</sup>。目前常见的 HLA 基因分型方法为 PCR-SSP、PCR-SSO 等, 这些方法均基于已知的 DNA 序列进行设计, 提高了分型结果的可靠性和准确性, 根据杂交格局的改变, 有可能发现新的等位基因<sup>[4]</sup>。本文在对造血干细胞及血小板 HLA 基因分型资料库志愿捐献者进行常规 HLA 分型时, 因为 PCR-SSO 反应格局异常, 应用 DRB1 第 2 外显子 PCR 产物直接测序分析发现和认定了一个新等位基因, 该新等位基因由 WHO HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-DRB1\*0453。

HLA-DRB1 基因在 HLA-II 类基因中最具多态性, 目前 HLA-DRB1 有 459 个等位基因 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>), HLA-DRB1 基因的多态性主要表现在编码  $\beta$  链基因的第 2 外显子, 商用的 HLA-DRB1 分型试剂常用第 2 外显子碱基的差异而设计引物或探针。新等位基因形成的原因大多是由于基因突变或重组<sup>[5]</sup>, 本例 DRB1\*0453 与同源性最高等位基因 DRB1\*0447 相比有 3 个碱基替代, 导致相应的 86 密码子由 GGT (G)  $\rightarrow$  GTG (V)。曲喆等<sup>[6]</sup>统计发现辽宁汉族人群中 HLA-DRB1\*04 基因频率为 0.1052, 笔者实验室在 20000 多血样中发现 1 个 HLA-DRB1\*04 新等位基因, 通过家系调查新等位基因遗传自父亲。由于 HLA 在个体免疫中起重要作用, 而且具有高度的遗传多态性, 被广泛地应用于器官移植、疾病关联以及民族的起源、进化、迁徙等人类遗传学方面的研究<sup>[7]</sup>。本文通过设计双向引物, 对被检者 DRB1\*04 第 2 外显子的特异性引物扩增后直接测序认定 DRB1\*04 新等位基因, DRB1\*0453 的认定增添了已知 DRB1\*04 的等位基因。新等位基因 DRB1\*0453 的血清学特点以及在中国人群中的基因频率还有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] Steven G.E. Marsh for the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA System, update March 2005. *Tissue Antigens*, 2005, 65 (6): 588-589
- [2] 张工梁, 赵桐茂. HLA 的人群分布. 见: 谭建明, 周永昌, 唐孝达主编. 组织配型技术与临床应用. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 110~131.
- [3] 谭建明. HLA 与器官移植. 见: 同上 453~487.
- [4] Maduigal JA, Arguello R, Scott I, et al. Molecular histocompatibility typing in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood Rev*, 1997, 11: 105~117.
- [5] Gaur LK, Nepom GT, Snyder KE, et al. (1997) MHC-DRB allelic sequences incorporate distinct intragenic trans-specific segments. *Tissue antigens*, 1997, 49 (4): 342.
- [6] 曲喆, 李春梅, 李剑平. 辽宁汉族人群 HLA-DRB1 基因多态性分布. *中华医学遗传学杂志*, 2006, 23 (3): 349-351.
- [7] Lee KW, Oh DH, Lee C, et al. Allelic and haplotypic diversity of HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 genes in the Korean population. *Tissue antigens*, 2005, 65: 437~447.

3-12

## 辽宁汉族人群 HLA-B 基因多态性的分布

陈 阳 李剑平

辽宁省血液中心、辽宁省输血医学研究所 (110044)

**摘要:** **目的** 调查辽宁汉族人群 HLA-B 基因座的遗传多态性分布情况。**方法** 用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)方法对辽宁 8962 名健康无关汉族人进行 HLA-B 基因分型,计算 HLA-B 等位基因频率并与不同人群 HLA-B 基因的多态性进行比较。**结果** 共检出 HLA-B 等位基因 34 种,其中 B\*15 (14.42%)、B\*40 (14.33%) 和 B\*13 (11.99%) 基因频率分布较高, B\*82、B\*83 等位基因未检出; HLA-B 座位特异性 49 种。对观察值和期望值进行  $\chi^2$  检验,符合 Hardy-Weinberg 定律 ( $\chi^2=41.92$ ,  $df=365$ ,  $P>0.05$ )。该人群与南北方汉族人群、日本人、黑人和白人分别进行  $\chi^2$  检验差异显著性,  $\chi^2$  值分别为 1584.799、72.145、1393.339、7406.288 和 5311.947。**结论** 辽宁汉族人群 HLA-B 基因多态性分布有其自身特点,它的遗传特征不同于既往的南、北方汉族。

**关键词:** 辽宁汉族人群; 聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-SSP); HLA-B; 基因多态性; 基因频率

## Distribution of HLA-B gene polymorphism of 8962 Han population in Liaoning

Chen Yang, Li Jian-ping

Liaoning Blood Center, Shenyang, Liaoning, P.R (110044)

**Abstract: Objective** To investigate distribution of genetic polymorphism of HLA-B locus in Liaoning Han population. **Methods** The technique of polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) was adopted in genotyping a sample of 8962 unrelated healthy individuals collected from a Chinese Han population in Liaoning area. The allele frequency of HLA-B was calculated and was compared with the results from other population. **Results** 34 HLA-B alleles were detected. The more common HLA-B allele included B\*15 (14.42%)、B\*40 (14.33%) and B\*13 (11.99%) . The B\*82 and B\*83 were absent. 49 HLA-B antigens were detected. The population data accorded with Hardy-Weinberg equilibrium ( $\chi^2=41.92$ ,  $df=365$ ,  $P>0.05$ ) . Comparing with different areas of the world. **Conclusion** The HLA-B gene polymorphism distribution of Liaoning Han population exhibits its own characteristic. Its hereditary character is different from old South and North Han population.

**Key words:** Han population of Liaoning region ; PCR-SSP; HLA-B; Polymorphism; allele frequency

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 又称人类主要组织相容性复合物 (major

histocompatibility complex, MHC), 它是人类最为复杂的遗传性多态性系统。随着研究的不断深入, 人们发现异体 HLA 是引起移植物排斥反应的主要移植抗原; 而自身 HLA 也可作为抗原呈递分子, 激发 T 细胞分化发育和免疫应答。其中 HLA-B 是属于 HLA-I 类抗原中的一族, 其编码基因位于人类第 6 号染色体短臂区域内, 以糖蛋白的形式在大多数有核细胞的膜表面表达。因为 HLA 在不同民族、不同地域和不同人种的分布有一定的差异, 所以笔者所在实验室用聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-SSP) 基因分型方法对 8962 名辽宁地区健康无关汉族个体作 HLA-B 基因座分型, 并统计相关频率数据分析辽宁汉族人群 HLA-B 遗传特性。

## 1 对象与方法

**1.1 调查对象** 辽宁地区 8962 名汉族人群无关健康个体。

**1.2 仪器设备** 美国 PE 公司生产的 PE-9700PCR 基因扩增仪; MJ Research PTC-200 基因扩增仪; GeneQuan 核酸蛋白检测仪; 美国 UVP GD 8000 紫外透射凝胶成像分析仪; 美国 Runone 电泳槽。

**1.3 试剂** GenraDNA 提取试剂盒; Pelfreeze DNA 提取试剂盒; 微量 SSP 试剂盒 (Pelfreeze96、384 孔扩增板; Biotest96 孔扩增板、G&T384 孔扩增板); Taq DNA 聚合酶 (Premage 公司提供);

**1.4 方法** 用 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 并测量 DNA 的浓度和纯度。(浓度: 75~125ng/ul 纯度: 1.6~1.8)。按照不同试剂盒的扩增要求配制反应体系, 并在相对应的扩增条件下扩增。取 5ul 扩增后产物在加有溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上电泳后, 在紫外透射凝胶成像分析仪下观察结果, 根据特异性扩增产物带判断分析判断结果。

**1.5 结果分析** 基因频率和抗原频率通过直接计数法统计出各基因座百分率, 结果应用 Hardy-Weinberg 吻合度测验。

## 2 结果

**2.1 检出 HLA-B 等位基因 (中低分辨率) 34 个, 等位基因频率和抗原频率分布见表 1。** HLA-B\*15 (14.42%)、B\*40 (14.33%) 及 B\*13 (11.99%) 基因频率分布较高。B\*82, B\*83 在辽宁地区未检测出。

**2.2 对 8962 个辽宁汉族人群样本, 34 个基因型的观察值和希望值进行 Hardy-Weinberg 检验 ( $\chi^2=41.92$ ,  $df=365$ ,  $P>0.05$ )**

**2.3 与不同人群 HLA-B 等位基因频率比较见表 2, 3。**

表 1 辽宁地区汉族人群 HLA-B 基因频率和抗原频率分布 ( $n=8962$ )

HLA-B*	基因数	基因频率	HLA-B	抗原数	抗原频率	HLA-B*	基因数	基因频率	HLA-B	抗原数	抗原频率
07A	621	0.0346	7	621	0.0693	15D	8	0.0004	70	8	0.0009
0713	1	0.0001	blank	1	0.0001	15E	317	0.0177	71	317	0.0354
08	153	0.0085	8	153	0.0171	15F	30	0.0017	72	30	0.0033
13	2149	0.1199	13	2149	0.2398	15G	790	0.0441	75	790	0.0881
1401	10	0.0006	64	10	0.0011	15H	12	0.0007	76	12	0.0013
14A	61	0.0034	65	61	0.0068	15I	11	0.0006	77	11	0.0012
15A	14	0.0008	15	14	0.0016	18	101	0.0056	18	101	0.0113
15B	1355	0.0756	62	1355	0.1512	27	317	0.0177	27	317	0.0354
15C	48	0.0027	63	48	0.0054	35	1017	0.0567	35	1017	0.1135

HLA-B*	基因数	基因频率	HLA-B	抗原数	抗原频率	HLA-B*	基因数	基因频率	HLA-B	抗原数	抗原频率
37	288	0.0161	37	288	0.0321	51A	1244	0.0694	51	1244	0.1388
3803	1	0.0001	16	1	0.0001	52	663	0.0370	52	663	0.0740
38A	425	0.0237	38	425	0.0474	53	10	0.0006	53	10	0.0011
39	329	0.0184	39	329	0.0367	54	567	0.0316	54	567	0.0633
40A	6	0.0003	40	6	0.0007	5507	2	0.0001	54	2	0.0002
40B	1177	0.0657	60	1177	0.1313	55A	338	0.0189	55	338	0.0377
40C	1385	0.0773	61	1385	0.1545	56	49	0.0027	56	49	0.0055
41	41	0.0023	41	41	0.0046	57	304	0.0170	57	304	0.0339
42	5	0.0003	42	5	0.0006	58	786	0.0439	58	786	0.0877
44	922	0.0514	44	922	0.1029	59	16	0.0009	59	16	0.0018
45	22	0.0012	45	22	0.0025	67	220	0.0123	67	220	0.0245
46	1213	0.0677	46	1213	0.1353	73	6	0.0003	73	6	0.0007
47	6	0.0003	47	6	0.0007	78	1	0.0001	78	1	0.0001
48	666	0.0372	48	666	0.0743	81	17	0.0009	81	17	0.0019
49	39	0.0022	49	39	0.0044	空白	0	0.0000			
50	160	0.0089	50	160	0.0179	合计	17924	1	17924	2	
5116	1	0.0001	5	1	0.0001						

注: B\*07A 包括: 0702-10, 15-17; B\*14A 包括: 02, 03, 04, 06; B\*15A 组包括: 1529, 1533, 1552, 1555, 1558; B\*15B 组包括: 1501, 04, 05, 06, 07, 15, 20, 24, 25, 27, 28, 30, 32, 35, 39, 45, 48; B\*15C 组包括: 1516, 17; B\*15D 组包括: 1509; B\*15E 组包括: 1510, 18; B\*15F 组包括: 1503, 46; B\*15G 组包括: 1502, 08, 11, 21, 31; B\*15H 组包括: 1512, 14, 19; B\*15I 组包括: 1513; B\*38A 包括: 3801, 02; B\*40A 组包括: 4005, 4047; B\*40B 组包括: 4001, 07, 12, 14, 31, 34; B\*40C 组包括: 4002, 03, 04, 06, 09, 11, 16, 27, 29; B\*51A 包括: 5101-09; B\*55A 包括: 5501, 02, 03, 04, 10。

表 2 与不同人群 HLA-B 基因频率分布的比较<sup>[2, 7]</sup>

HLA-B*	中国						北美洲					
	本组		南方汉族		北方汉族		日本人		黑人		白人	
	(n=8962)	(n=4707)	$\chi^2$	(n=2258)	$\chi^2$	(n=1023)	$\chi^2$	(n=1564)	$\chi^2$	(n=2046)	$\chi^2$	
B*07	0.0347	0.0165	66.47*	0.0416	5.24*	0.0500	12.10*	0.0977	267.98*	0.1225	529.72*	
B*08	0.0085	0.0053	7.15*	0.0082	0.01	0		0.0450	269.75*	0.0865	900.29*	
B*13	0.1199	0.0916	49.83*	0.1139	3.04	0.0180	195.14*	0.0062	361.52*	0.0187	374.50*	
B*14	0.0040	0.0011	16.26*	0.0028	0.94	0.0010	3.70	0.0382	363.67*	0.0740	979.94*	
B*15	0.1442	0.1382	0.76	0.1481	0.31	0.1100	17.75*	0.1072	24.85*	0.0633	193.95*	
B*18	0.0056	0.0022	14.52*	0.0049	0.25	0		0.0307	188.30*	0.0432	378.17*	
B*27	0.0177	0.0217	7.10*	0.0217	3.75*	0.0040	21.75*	0.0152	0.53	0.0317	33.22*	
B*35	0.0567	0.0361	48.72*	0.0479	5.13*	0.0810	19.66*	0.0812	33.04*	0.0920	69.44*	
B*37	0.0161	0.0092	18.64*	0.0158	0.00	0.0070	10.48*	0.0060	17.31*	0.0115	4.67*	
B*38	0.0238	0.0390	55.44*	0.0263	1.23	0.0030	37.64*	0.0035	51.60*	0.0267	1.16	
B*39	0.0183	0.0238	11.41*	0.0208	1.51	0.0450	63.08*	0.0142	2.22	0.0140	3.79	
B*40	0.1433	0.1889	75.98*	0.1438	0.02	0.1630	5.94*	0.0217	345.01*	0.0730	144.96*	
B*41	0.0023	0.0001	18.24*	0.0007	4.61*	0		0.0040	4.02*	0.0102	56.44*	
B*42	0.0003	0		0.0007	1.61	0		0.0610	1099.42*	0		
B*44	0.0514	0.0136	223.44*	0.0418	6.50*	0.0740	18.90*	0.0760	36.08*	0.1277	316.84*	
B*45	0.0012	0.0006	1.82	0.0013	0.05	0		0.0475	734.63*	0.0062	37.27*	
B*46	0.0677	0.1472	399.07*	0.0772	4.04*	0.0440	16.85*	0		0		
B*47	0.0003	0.0002	0.26	0.0004	0.14	0.0010	0.63	0.0005	0.12	0.0010	1.78	
B*48	0.0372	0.0183	65.82*	0.0299	4.83*	0.0320	1.24	0.0027	97.39*	0		
B*49	0.0022	0.0003	13.08*	0.0035	3.09	0		0.0240	243.58*	0.0147	116.04*	

HLA-B*	中国						北美洲				
	本组 (n=8962)	南方汉族		北方汉族		日本人 (n=1023)		黑人 (n=1564)		白人 (n=2046)	
				$\chi^2$		$\chi^2$		$\chi^2$		$\chi^2$	
B*50	0.0089	0.0024	36.10*	0.0069	1.45	0		0.0117	2.96*	0.0112	1.93
B*51	0.0695	0.0598	7.60*	0.0774	2.66	0.0930	15.13*	0.0239	88.13*	0.0517	16.80*
B*52	0.0370	0.0135	101.02*	0.0315	2.66	0.1070	213.66*	0.0170	30.02*	0.0120	66.61*
B*53	0.0006	0.0001	2.93	0.0002	0.78	0		0.1145	2073.12*	0.0045	42.27*
B*54	0.0316	0.0286	0.99	0.0315	0.01	0.0630	53.96*	0		0	
B*55	0.0190	0.0336	61.43*	0.0215	1.54	0.0290	10.06*	0.0057	26.30*	0.0252	6.50*
B*56	0.0027	0.0109	79.29*	0.0029	0.07	0.0160	80.63*	0.0015	1.19	0.0055	8.52*
B*57	0.0170	0.0047	68.59*	0.0116	5.89*	0		0.0665	289.52*	0.0427	104.24*
B*58	0.0438	0.0835	175.54*	0.0553	10.56*	0.0070	63.57*	0.0165	48.31*	0.0087	113.89*
B*59	0.0009	0.0006	0.38	0.0011	0.23	0.0190	220.83*	0		0	
B*67	0.0123	0.0042	39.76*	0.0093	2.23	0.0150	1.23	0		0	
B*73	0.0003	0		0.0002	0.13	0.0030	20.65*	0		0	
B*78	0.0001	0		0		0		-		-	
B*81	0.0009	0.0007	0.20	0.0011	0.13	-		-		-	
B*82	0	0	0	0		-		-		-	
B*83	0	-		-		-		-		-	
B* blank	0	0		0		0.0130		0.0295		0.0210	

注：-为资料空缺，\*为有显著性差异

表3 与不同人群 HLA-B 基因频率分布差异性的比较

人群	$\chi^2$	df	P 值
辽宁汉族-南方汉族	1584.799	33	$P < 0.05$
辽宁汉族-北方汉族	72.145	33	$P < 0.05$
南方汉族-北方汉族	600.396	32	$P < 0.05$
辽宁地区-日本	1393.339	34	$P < 0.05$
辽宁地区-北美洲黑人	7406.288	34	$P < 0.05$
辽宁地区-北美洲白人	5311.947	34	$P < 0.05$

### 3 讨论

笔者所在实验室作为中华骨髓库辽宁分库组织配型实验室，对全省范围采集的血样进行分型工作。因此分型血样具有采集数量大、地区分布广等特点，能够初步代表辽宁汉族人群的 HLA 分布情况，可为研究我国辽宁地区汉族人群 HLA 的分布和遗传结构提供宝贵的资料。

既往有关 HLA 位点的数据统计多采用血清学方法。但 B 位点是 HLA 编码系统中最复杂，多态性最多的区域，其高变区各等位基因差异仅在几个碱基，且只有极少等位基因某个高变区具有独特的碱基序列，因而导致很少有单价抗血清，且交叉反应众多。<sup>[3]</sup>因而血清学 B 位点分型往往出现错检、漏检或定型困难。<sup>[4]</sup>本实验室借助从血液中提取出的含有人类遗传信息的化学性质稳定的 DNA 为检材，通过序列特异性引物聚合酶链反应特异性的扩增目的带，得到位点分型。本实验室使用的 PCR-SSP 方法又被称为照相分型，方法重复性较好，假阴性反应比率约为 1%<sup>[5]</sup>。2000 年美国 MNDP 报告，以 DNA 为基础的 11428 例 HLA-B 分型错误率为 1.9%<sup>[6]</sup>。

本组实验数据经测验符合 Hardy-Weinberg 定律 ( $\chi^2=41.92$ ,  $df=365$ ,  $P>0.05$ ), 证明辽宁汉族人群取样无明显偏差, 群体处于遗传平衡状态。本实验室检测出辽宁汉族人群 HLA-B 基因分型 34 个, 涵盖了汉族人群基因分型的 94.44%。其中 B\*15 (14.42%), B\*40 (14.33%) 和 B\*13 (11.99%) 基因频率分布较高, B\*82 和 B\*83 在本组中未观测到。频率较高的位点与既往报道的相关数据频率相符。B\*82 和 B\*83 是带有种族特性的基因, B\*82 主要存在于黑种人中, 在汉族人群中未检测到这些基因是完全可能的; 但如果存在的话, 基因频率也将低于 0.0001<sup>[7]</sup>。

中华民族在地理位置—北纬 30° 交界线上可分为南北两大群体: 南方包括南方汉族、彝族、苗族、白族等; 北方包括北方汉族、藏族、蒙古族、朝鲜族等。南、北方汉族人群比较有显著性差异 ( $\chi^2=600.396$ ,  $P<0.05$ )。辽宁汉族人群与南、北方汉族人群比较亦有显著性差异 (与北方汉族:  $\chi^2=72.145$ ; 与南方汉族:  $\chi^2=1584.799$ , 两者均  $P<0.05$ ), 更接近于北方汉族。说明南、北方汉族人群的 HLA 基因频率分布存在地域性差异; 而辽宁因是满族的发源地, 由于地理位置和历史进程的特殊性经历了群体漂移, 形成了满族汉化为主的汉族和蒙、回等多民族混居的分布特点, 因而导致与按地理位置—北纬 30° 交界线而分的笼统北方汉族有显著性差异。统计发现 HLA-B\*41、\*44、\*48、\*52、\*57 和\*67 基因频率呈现由南向北逐渐升高趋势; HLA-B\*55、\*56 和\*58 基因频率呈现由南向北逐渐降低趋势。HLA-B\*42、\*73 和\*78 在南方汉族人群中未检测到。这些分布特点是否和地域差异有关尚待进一步证实。

辽宁汉族人群与日本人之间差异具有显著性 ( $\chi^2=1393.399$ ,  $P<0.05$ )。日本人 HLA-B 等位基因频率最高的为 B\*40 (16.30%), 常见的为 B\*15 (11%)、\*52 (10.7%) 和\*51 (9.3%); HLA-B\*52 ( $\chi^2=213.66$ )、\*59 ( $\chi^2=220.83$ ) 和\*13 ( $\chi^2=195.14$ ) 基因显著性差异较为明显。辽宁汉族人群与北美洲黑人 ( $\chi^2=7406.288$ ,  $P<0.05$ ) 和白人 ( $\chi^2=5311.947$ ,  $P<0.05$ ) 组间差别较大。黑人 HLA-B 基因频率最高的为 B\*53 (11.45%), 而本组数据 B\*53 (0.06%), 两者之间差异性显著 ( $\chi^2=2073.12$ ), 且在其它组别中该位点的基因频率亦较低; 黑人 HLA-B \*42 与其它组别中该位点的基因频率亦有显著性差异; 本组数据常见的 B\*13 等位基因在黑人 ( $\chi^2=361.52$ ) 和白人 ( $\chi^2=374.50$ ) 中少见。这些统计学特征是否可以作为种属差异的区分标志有待更多群体资料证实。日本人、北美洲黑人和白人的未检测出基因和空白基因频率较高可能与既往 HLA-B 基因分型多应用血清学有关。

本组数据表明 HLA 基因频率分布在不同地区、不同种族的人群之间存在着差异, 各地区的骨髓供者的基因频率分布都具有地区性的特色, 为了最大限度为不同地区的患者寻找 HLA 相合的异基因造血干细胞供体, 我们有必要在全国南北建立多个地区性骨髓库筛选最合适的骨髓供者。同时统计这些数据对进一步深入探究人类的起源、进化和人群的迁徙有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 赵桐茂主编, HLA 分型原理和应用, 第 1 版, 上海: 上海科学技术出版社, 1984, 146-152.
- [2] 张工梁, 杨颖, 冯喆等. 中华(上海)骨髓库的 HLA 分布报告. 中华器官移植杂志, 2001, 22 (3): 179-185.
- [3] Arnet K L, Purham P. HLA class I nucleotide sequences. Tissue Antigens, 1995; 45: 217.
- [4] 杨颖, 冯哲, 张雁征等. 用 PCR-SSP 分析 HLA-B 位点血清学分型困难标本. 中国医学杂志, 2000; 16: 300-302.

[5] Bunce M, O' Neil CM, Barnardo MC, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5&DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primer (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, 1995, 46: 355-367.

[6] Hurley CK, Maiers M, Ng J, et al. Large scale DNA-based typing for HLA-A and HLA-B at low resolution is highly accurate specific and reliable. *Tissue Antigens*, 2000, 55: 352-358.

[7] 吴国光, 邓志辉, 高素青等. 6965 名汉族骨髓供者 HLA 多态性分析. *中华血液学杂志*, 2003, 25(8): 473-477.

### 3-13

## 新等位基因 HLA-B\*070503 的认定

章 旭 李剑平 高景波 黄旭颖 曲 喆 陈 阳 李晓丰 刘显智  
辽宁省血液中心 (110044)

**摘要:** 目的 发现和鉴定 1 个 HLA 新等位基因。方法 使用 PCR-SSP 及 PCR-SSO 技术筛选可能的 HLA 新等位基因, 通过 DNA 测序技术测定新等位基因的核苷酸序列, 并与同源最高 HLA 基因序列比对分析。结果 检出 1 个样本, HLA-B 位点反应格局异常, DNA 序列分析该基因外显子 3 区域序列与所有已知的 HLA-B 等位基因序列均不相同, 与同源最高的 HLA-B\*070501 基因序列相比有 1 个碱基发生替代。第 435 位碱基由 G→A, 编码相应密码子 145 位氨基酸赖氨酸 (K) 未发生改变。结论 该等位基因为 HLA-B 位点的 1 个新等位基因, 已被 WHO HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B\*070503。

**关键词:** DNA 测序分型; 新等位基因; HLA-B\*070503

## Identification of a novel HLA allele B\*070503 by sequencing-based typing

ZHANG Xu LI Jian-ping CHEN Yang LI Xiao-feng LIU Xian-zhi  
(Liaoning Blood Center, Shenyang, 110044P.R.China)

**Abstract: Objective** To identify a novel HLA allele in Chinese population. **Methods** Genotyping methods with microbeads SSO assay based on Luminex platform and PCR-SSP, Sequence-based typing (SBT) was used to identify and analysis the difference between the new allele and HLA-B\*070501. **Results** HLA genotyping of this sample different results, one SSO pattern did not match any known HLA-B alleles. The HLA-B exon3 nucleotide sequence of the novel allele was different from all other known alleles. The allele has 1 nucleotides replaced of the closest matching B\*070501 allele at nt435 (G→A), resulting in no amino acid change at codon 145K. **Conclusion** A novel HLA allele was identified and was officially designated as HLA-B\*070503 by WHO Nomenclature Committee for Factors of the

HLA System in August, 2005.

**Key words:** DNA sequencing based typing (SBT) ; new allele; HLA-B\*070503

人类白细胞抗原 (HLA) 基因系统是目前所知人类基因组中最富多态性的基因系统, 包括几十个基因座位, 每个基因座位又有数个到数百个数目不等的等位基因<sup>[1]</sup>。HLA 在分布上具有人种、族群及地域上的差异。随着 HLA 基因分型技术的不断进步及分型工作人员经验的增加, 新的等位基因不断被发现和认定。笔者所在的中华骨髓库辽宁分库组织配型实验室, 在 HLA 常规基因分型工作中发现一个新的 HLA-B 等位基因, 被世界卫生组织 HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B\*070503。现报告如下。

### 材料与方法

1. **标本来源:** 从中国造血干细胞资料库辽宁分库及辽宁省血液中心血小板HLA基因分型资料库样本中筛选发现该捐献者, 为辽宁沈阳人, 女性, 汉族。

2. **血样采集与基因组 DNA 制备:** 静脉抽取受检者抗凝全血 5ml, 其中 0.5 ml 用于 DNA 制备 (DNA Isolation kit, Pel-Freez Biotech Lot # 050 WS, USA), 其余血液分装, 每管 1ml 后-80℃ 冷冻保存备用。将制备的 DNA 浓度调为 0.1μg/μl 左右。DNA 纯度 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比率在 1.6~1.9。并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳显示无 DNA 降解现象。

3. **HLA 基因分型:** PCR-SSP 分型试剂盒 (ABDR SSP Unitray<sup>®</sup> Lot#005, Pel-Freez 公司 USA) 进行 HLA-A、B、DRB1 常规中低分辨的 HLA 基因分型。根据中国造血干细胞捐献者资料管理中心 HLA 基因分型要求以及世界骨髓库供者协会 (WMAD) HLA 基因分型标准设计, 可鉴定 2002 年 WHO 正式命名的 HLA-A、B、DRB1 基因, 以及在中国人中发现的 HLA 新基因。按照试剂说明书操作, 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像分析系统 (UVP8000, 美国) 拍照, UniMatch 软件判读分析结果。

PCR-SSO 分型试剂盒 (One Lambda 公司的 Lab-Type<sup>™</sup>和 Dynal 公司的 Dynaplex<sup>™</sup>) 进行 HLA-B 位点复核。严格按照试剂盒说明书进行扩增、杂交, 在 Lunimex100 机器上读取数据。分别在 One Lambda HLA-Tools 软件和 Dynal AccuMatch 软件分析结果。

4. **DNA 序列分析:** 为了分开杂合 HLA-B 位点的等位基因, 采用 HLA-B\*07 等位基因组特异性引物扩增 HLA-B\*07 的 1、2、3 外显子区域。引物序列为: 扩增 1~2 外显子正、反向引物分别为 5' -GTACGTGGGGGATGGGGAGTC -3' 和 5' -CGTCCTCCTGCTGCTCTCGGC -3'。扩增 2~3 外显子正、反向引物分别为 5' -CACAGATCTACAAGGCCAGG-3' 和 5' -CCCGGCGACCTATAGGAGA TG-3'。扩增产物纯化后直接被正反两个方向测序。为了避免由于 PCR 扩增或其他人为因素引起的碱基变化, 被检样本的基因组 DNA 样本经 3 个独立的 PCR 反应和 6 个测序反应, 通过正、反向引物测序, 测定 HLA-B\*07 等位基因的外显子 1、2 和 3 的碱基序列。测序结果用 SigMan II (DNASar, inc., Madison, WI, USA) 分析。



## 结 果

1. HLA 中低分辨率分型结: 该样本 PCR-SSP 分型结果为 HLA-A\*02、29, HLA-DRB1\*10、12; 但 B 位点出现无法解释的结果。见图 1。B 位点阳性带为 49、50、51、53、54、74、79、83、85 孔, 输入 UniMatch 判读, 去掉 74、83 孔结果为 B\*07 和 B\*13。采用 One Lambda 公司 PCR-SSO 技术进行 HLA-B 位点复核, 见图 2。软件分型结果提示 49 号探针是假阳性, 如果接受 49 号探针假阴性, 分型结果为 B\*07EH 和 B\*1301 或 1312。Dynal 公司的 PCR-SSO 的 HLA-B 位点结果 (见图 3) 格局异常, 不能指定任何结果, 但如果接受不可能的 47 号珠子假阳性结果, 结果为 B\*070501/06 和 B\*1301 或 1312。

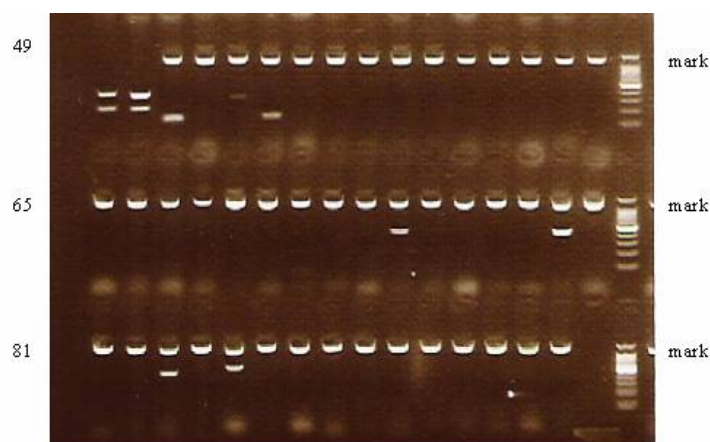


图 1 HLA-B 位点 PCR-SSP 低分辨电泳图

注: 电泳道顺序由左到右, 由上到下; 图中 49、50、51、53、54、74、79、83、85 孔为阳性带, 96 孔为阴性对照, mark 分别为 100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1000bp 和 1500bp

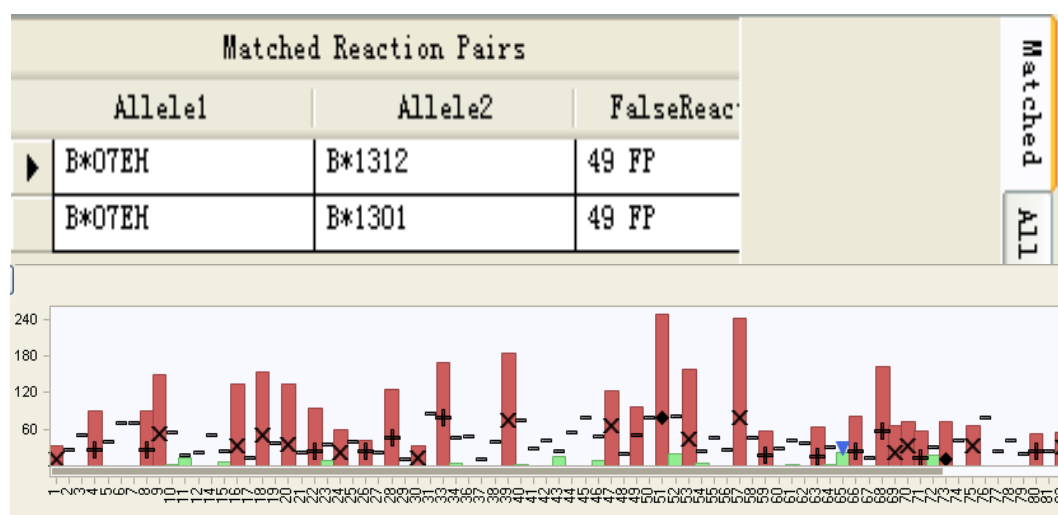


图 2 One Lambda 公司 PCR-SSO HLA-B 位点分型结果及探针格局

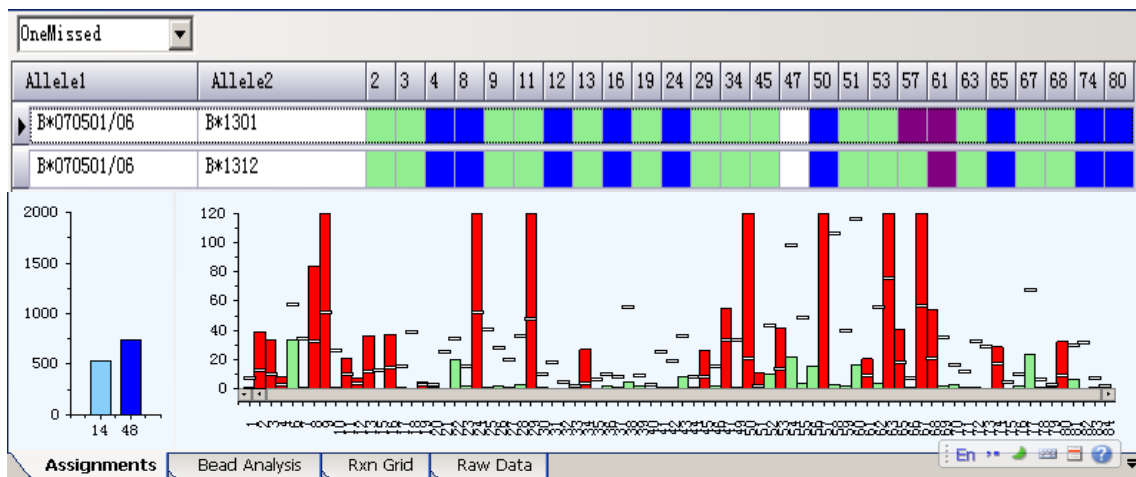


图3 Dynal 公司的 PCR-SSO HLA-B 位点分型结果及探针格局

2. SBT 结果 HLA-B 位点直接测序结果发现碱基替代位置等位基因为 B\*07。特异性引物扩增 B\*07，被检者的基因组 DNA 样品经 3 个独立的 PCR 反应，获得 6 份扩增片断，测定 HLA-B\*07 基因外显子 1、2 和 3 区域的基因序列。DNA 序列分析表明该等位基因为新的等位基因，与同源性最高等位基因 B\*070501 等位基因在外显子 3 区域有 1 个碱基被替代。在外显子 3 区域中的第 435 位碱基由 G→A，编码相应密码子 180 位的氨基酸赖氨酸（K）未发生改变。（如图 4）。该新等位基因已由 WHO HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B\*070503，新的基因序列已递交 GenBank（DQ162803）。

	116	120	130
B*070501	GG TCT CAC ACC CTC CAG AGC ATG TAC GGC TGC GAC GTG GGG CCG GAC		
B*070503	-----		
		140	
B*070501	GGG CGC CTC CTC CGC GGG CAT AAC CAG TAC GCC TAC GAC GGC AAG GAT		
B*070503	-----	A	---
	150	160	
B*070501	TAC ATC GCC CTG AAC GAG GAC CTG CGC TCC TGG ACC GCC GCG GAC ACG		
B*070503	-----		
	170		
B*070501	GCG GCT CAG ATC ACC CAG CGC AAG TGG GAG GCG GCC CGT GAG GCG GAG		
B*070503	-----		
	180	190	
B*070501	CAG CGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC GAG TGC GTG GAG TGG CTC CGC AGA		
B*070503	-----		
	200		
B*070501	TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAC AAG CTG GAG CGC GCT G		
B*070503	-----		

图4 HLA-B\*070503 与 HLA-B\*070501 第 3 外显子核苷酸序列的比较

注：“-”表示两个序列一致，序列上的数字表示密码子数

## 讨 论

中华骨髓库的建立和发展为我国众多白血病患者进行无关供者的器官或造血干细胞移植提供了可能,也为研究中国人群的 HLA 等位基因频率分布特点及发现 HLA 新等位基因提供了机会。笔者所在实验室在 HLA 基因常规分型时发现几个样本反应格局异常,经过 DNA 测序分析结果最终确定了 4 个新等位基因(HLA-A\*2451、HLA-B\*4446、HLA-B\*070503 和 HLA-DRB10453)<sup>[2-5]</sup>的基因序列。

DNA 分型技术能够检测出 HLA 血清学方法不能发现因碱基改变但氨基酸未改变的 HLA 新的等位基因。目前使用较广泛的以 DNA 为基础的 HLA 分型技术有 PCR-序列特异性引物(PCR-SSP), PCR-序列特异性寡核苷酸探针(PCR-SSO)及 DNA 基因测序(SBT)等。DNA 基因测序是鉴定 HLA 新等位基因的主要方法。本文采用 B\*07 基因组特异性引物扩增外显子 1、2、3 区域。扩增产物纯化后直接被正反两个方向测序。通过两次测序,从而证实了新等位基因 HLA-B\*070503 序列的正确性和可靠性。

B\*07 在中国人群中基因频率为 1.65~4.16%<sup>[6-7]</sup>。在辽宁分库 8962 份造血干细胞捐献志愿者 HLA 分型资料中, B\*07 的基因频率为 3.46%<sup>[8]</sup>。B\*070503 与同源最高等位基因 B\*070501 基因序列相比有 1 个碱基发生替代。编码相应密码子的氨基酸赖氨酸未发生改变。表明该新基因血清学特异性与 B\*070501 一样,应为 B7。HLA 等位基因新等位基因的发现和认定,对人类遗传学和进化上的研究具有一定的意义。新等位基因分布频率还不清楚,有待以后进一步确定。

## 参考文献

- [1] Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens*, 2005, 65 (4): 301-369
- [2] Jian-Ping LI, Xian-Zhi Liu, Hua-Fang GAO, et al. Identification of a novel HLA-A allele HLA-A\*2451 in a Chinese donor. *Tissue Antigens*, 2005, 66: 54-55
- [3] Xian-Zhi Liu, Jian-Ping Li, Li-Ping Chi, et al. Identification of a novel HLA-DRB1 allele HLA-DRB1\*0453 in a Chinese donor. *Tissue Antigens*, 2005, 66: 333-335
- [4] Jian-Ping LI, Xiao-Feng LI, Xu Zhang, et al. A novel HLA-B\*44 allele B\*4446 identified by sequence-based typing in a Chinese donor. *Tissue Antigens*, 2006, 68: 345-346
- [5] Jian-Ping LI, Yang Chen, Xu Zhang, et al. A new HLA-B\*07 allele B\*070503, identified in a Chinese bone marrow donor. *Tissue Antigens*, 2006, 68: 454-45
- [6] 张工梁, 杨颖, 冯喆等. 中华(上海)骨髓库的 HLA 分布报告. *中华器官移植杂志*, 2001, 22 (3): 179-185
- [7] 吴国光, 邓志辉, 高素青, 等. 6965 名汉族骨髓供者 HLA 多态性分析. *中华血液学杂志*, 2004, 25 (8): 473-477
- [8] 陈阳, 李剑平. 辽宁汉族人群 HLA-B 等位基因多态性的分布. *中华医学遗传学杂志*, 2006, 23 (4): 461-462

3-14

## HLA 新等位基因 B\*5618 的发现和序列分析

邹红岩 李 桢 程良红

深圳市血液中心 (518035)

**摘要:** **目的** 识别确认中国汉族人群中的 HLA 新等位基因。**方法** 采用聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸探针 (polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probes, PCR-SSOP) 方法、聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-sequence specific primer, PCR-SSP) 方法以及基因测序分型 (sequence-based typing, SBT) 技术, 发现一个与 HLA-B\*5610 等位基因相近的未知等位基因。以基因特异性引物单独扩增 B\*56 基因并对外显子 2、3、4 进行双向测序, 序列经 BLAST 验证并分析该基因与 B\*5610 基因的核苷酸序列差异。**结果** 该基因为新的等位基因, 其序列已被 GenBank 接受 (编号为 EF016753)。新等位基因与最接近的 B\*5610 相比, 在第 3 外显子上有 4 个核苷酸的不同, 即第 379 位 C→G (密码子 127 CTG→GTG, 氨基酸 127Leu→Val); 第 412 位 A→G (密码子 138AAC→GAC, 氨基酸 138Asn→Asp); 第 419 位 T→C、第 420 位 A→C (密码子 140TTA→TCC, 氨基酸 140Leu→Ser)。**结论** 该等位基因为新的 HLA-B 等位基因, 2006 年 9 月已被世界卫生组织 HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B\*5618。

**关键词:** 人类白细胞抗原; 等位基因; 测序; 外显子

## Identification and sequence analysis of a novel HLA allele B\*5618

ZOU Hong-yan, LI Zhen, CHENG Liang-hong

Shenzhen Institute of Transfusion Medicine, Shenzhen Blood Center, Shenzhen,  
Guangdong Province, 518035, China

**Abstract: Objective** To identify HLA novel allele in Chinese Han individual. **Methods** An unknown HLA-B allele which was similar to HLA-B\*5610 was detected by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP)、PCR-sequence specific primer (PCR-SSP) and heterozygous sequence-based typing (SBT) in Chinese Han individual. Its anomalous patterns suggested the possible presence of new allele. Amplifying the HLA-B\*56 allele separately by using allele-specific primers and sequencing exon2-4 in both directions. Identifying the difference between the novel B\*56 allele and B\*5610. **Results** There are 4nt changes from B\*5610 in exon3, at nt379 where C→G (codon 127 CTG→GTG, 127Leu→Val); nt412 where A→G (codon 138AAC→GAC, 138Asn→Asp), nt419 where T→C and nt420 where A→C (codon140 TTA→TCC, 140Leu→Ser). **Conclusion** The sequence was submitted to Genbank and the accession number was EF016753. This allele is a novel HLA-B allele, and has been officially named HLA-B\*5618 by the WHO Nomenclature committee in

September 2006.

**Key words:** human leukocyte antigen; allele; sequencing; exon

人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 是迄今所知人类最复杂的免疫遗传多态性系统, 在移植免疫中起着重要的作用。自 1958 年法国医生 J. Dausset 发现了人类第一个白细胞抗原至今, 在约 50 年的时间里, HLA 等位基因的数量已增至 2500 多个 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>), 尤其是近几年, 随着分子生物学的发展及测序技术的推广, 大量的新等位基因被发现。我们在采用 PCR-SSO 基因分型试剂对造血干细胞捐献者血样进行常规 HLA 分型时, 发现一份异常反应格局的标本, 分析软件不能指定 HLA-B 等位基因; 采用商品测序试剂盒对该样品的 HLA-B 基因外显子 2、3、4 做了测序分析, 发现 B\*5401, 5610 的杂合结果在外显子 3 有 4 个核苷酸位置与当时的 IMGT/HLA 数据库不相符。随后我们用 PCR-SSP 方法做高分辨分型, 其结果为 B\*5401, 而 B\*56 格局异常, 提示该样本可能存在与 B\*56 基因相关的碱基突变。我们用基因特异性引物单独扩增了该样本的 B\*56 基因, 对其外显子 2、3、4 进行了双向测序, 发现该基因与其最接近的 HLA-B\*5610 相比在外显子 3 有 4 个碱基突变。该新等位基因已于 2006 年 9 月被世界卫生组织 HLA 因子命名委员会正式命名为 HLA-B\*5618。现报告如下。

## 材料与方 法

1. **样本来源:** 对造血干细胞捐献者血样进行常规 HLA 分型时, 发现一份异常反应格局的标本需进一步确认。该捐献者为男性, 汉族, 家系调查采集先证者父母的血样, 一并进行血清学检测和测序分析。突变点频率调查随机选用本中心 3000 名造血干细胞捐款者血样。

2. **DNA 提取:** 采集外周全血, 使用 EDTA 抗凝。用美国 Gentra 公司 DNA 快速提取试剂盒从全血中抽提 DNA。

3. **HLA 分型:** HLA 血清学分型采用单抗 HLA-I 类血清分型试剂盒 (One-Lambda Inc USA)。常规 PCR-SSO 分型采用 R-SSO-LUMINEX 基因分型试剂盒 (HLA-B Lot 007 One-Lambda Inc CA USA)。测序 SBT 试剂盒使用 Atria Genetics AlleleSEQR HLA-B SBT Pack (Atria Genetics, South San Francisco, CA), 分析软件使用 Assign version 3.5 20060714 版本 (Conexio Genomics, Applecross, Western Australia, Australia)。PCR-SSP 高分辨使用 Pel-Freez B high 003 分型试剂。均严格按试剂说明书进行操作。

4. **单独扩增 B\*56 基因并进行外显子 2、3、4 序列测定:** 为了将两等位基因分开, 依据 IMGT/HLA-B 基因序列, 采用计算机辅助设计 B\*56 基因特异性扩增引物, 由大连宝生物公司合成: U56 5' -CGACACGCAGTTCGTGA-3' ; L56 5' -GACCACAGCTCCGATGA-3' 。使用 TaKaRa LA Taq 酶 (大连宝生物), 25ul 反应体系, 其中 10xbuffer 2.5ul (含  $Mg^{2+}$ ), dNTP 终浓度 0.4 umol/L, LA Taq 酶 1u, 引物浓度为 250umol/L, DNA 80ng。PCR 扩增条件: 94°C 1min→94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 3min, 35 个循环→72°C, 5min→4°C。使用 Atria Genetics 的测序引物对扩增产物进行外显子 2、3、4 双向测序。序列经 BLAST 验证并分析该等位基因与 B\*5610 基因的核苷酸序列差异。

5. **鉴定 HLA-B\*5618 等位基因的 PCR-SSP 方法:** 用来鉴定 HLA-B\*5618 等位基因的序列特异

性引物分别为：5' -CATGACCAGTCCGCCTAC-3' 和 5' -GAGCCACTCCACGCACGT-3'，该对引物不与 B\*5618 以外的 B\*56 基因反应，但是可以扩增 B\*1550, 1569, 1593, 18, 3535, 3907, 4603, 5514 和 5805 低频率等位基因。使用的 1 对内对照引物是：5' -CCAAGTGGAGCACCCAAGC-3' 和 5' -GCATCTTGCTCTGTGCAGATT-3'。PCR 反应的总体积为 10ul：含 1ul 基因组 DNA (0.1ug~0.2ug)，1ul Taq polymerase (0.25~0.33U)，10mmol/L Tris-HCl (PH8.3)，50mmol/L KCl，1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>，0.2 mmol/L dNTPs，0.5umol/L 正向和反向等位基因特异性引物，0.2umol/L 内对照引物。PCR 扩增反应程序：95℃ 5min→95℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 90s，30 个循环→72℃，5min→4℃。使用 TBE 缓冲液制备 20g/L 琼脂糖凝胶，含溴乙锭 0.125ug/ml。100V 电泳 20 min，紫外照射仪上观察结果。特异性扩增的该基因片段长度为 168bp。

6. 仪器：扩增仪为美国 PE 公司 9700 扩增仪。测序仪为美国 ABI 3100 测序仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

7. 细胞株的建立：采集外周血，用 PBS 对半稀释，按血：淋巴细胞分离液 (上海恒信试剂厂) =2: 1，小心将血加至分离液上层，400g，离心 20min；取白膜层，加 8ml PBS 洗涤，250g，离心 5min，弃上清；用无血清 RPMI1640 洗涤、计数、250g 离心 5min 弃上清。按  $2 \times 10^6$  个细胞/ml EB 病毒液将细胞混匀，37℃，5%CO<sub>2</sub> 放置 2~3 小时，250g 离心 10min 去病毒。按  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 加入含 20%FBS (胎牛血清)、2ug/ml CsA (环孢菌素 A) 的 RPMI1640 培养液，于 24 孔板中 37℃，5%CO<sub>2</sub> 培养，7 天后换半液，以后 3 天换液 1 次，多个增殖灶形成后换瓶培养，将 CsA 减半，细胞呈对数增长后去除 CsA。

## 结 果

1. 常规 PCR-SSO 分型结果 捐献者样本 HLA-A 和 DRB1 位点可明确指定为 HLA-A\*11, 一；DRB\*4, 11。HLA-B 位点反应格局异常，根据判读软件分析在假设 75 号磁珠为阳性、87 号磁珠为阴性时可判断为 B\*5401, 5610，但经重复测试 75 号磁珠仍为阴性、87 号磁珠仍为阳性，故未能最终指定 HLA-B 基因型。

2. 双链 PCR-SBT 分型结果 商品 SBT 试剂盒对外显子 2、3、4 双向测序，分析软件显示与最接近的杂合结果 HLA-B\*5401, 5610 在外显子 3 有 4 个碱基位置不匹配。HLA-B\*5401, 5610 的序列在第 379 位、412 位、419 位和 420 位碱基应分别为 C、A、T 和 A，而本实验结果在这 4 个碱基位置则分别为 S (C+G)、R (A+G)、Y (T+C) 和 M (A+C)，表明在这 4 个碱基位置存在突变。杂合测序结果见图 1。

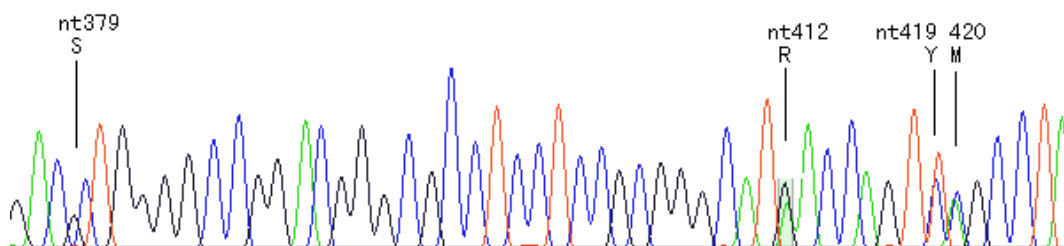


图 1 HLA-B\*5401, 5618 的杂合测序结果

Fig.1 Results of heterozygous sequencing of HLA-B\*5401, 5618

3. PCR-SSP 高分辨分型结果 阳性孔为：10、11、13、17、21、23、32、42、73、78、80、83，显示 B\*5401 格局正常，而 B\*56 基因反应格局异常，若第 13、78 孔为阴性则可判为 B\*5610，说明 B\*56 基因存在突变。电泳胶图见图 2。

4. 单独扩增 B\*56 基因后对产物测序 发现该等位基因与其最相近的 HLA-B\*5610 相比，在 exon 3 有 4 个碱基不同，单基因测序结果见图 3。4 个突变点与商品试剂盒所测位置相符，突变碱基及其所致氨基酸的改变见表 1。

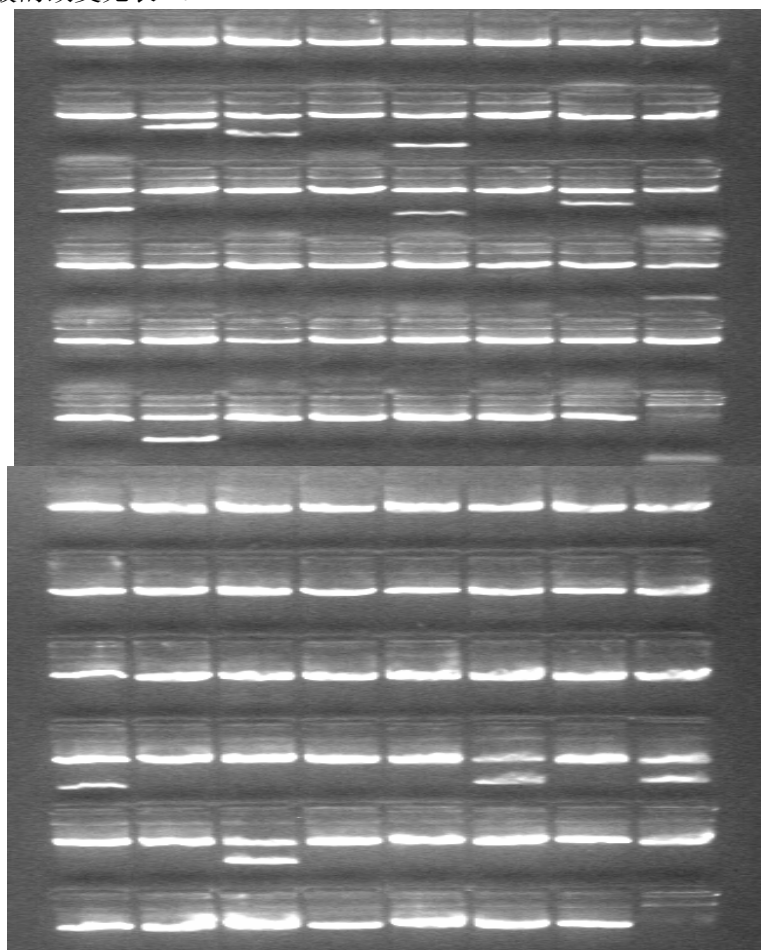


图 2 HLA-B\*5401, 56xx PCR-SSP B 位点高分辨电泳图  
Fig.2 HLA-B\*5401, 56xx High Resolution SSP Gel Picture

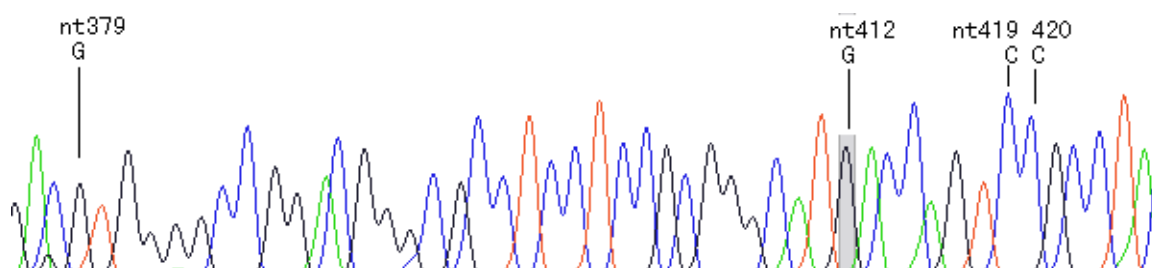


图 3 新等位基因 HLA-B\*5618 的测序结果  
Fig.3 Results of sequencing of HLA-B\*5618 allele

表 1 HLA-B\*5618 与其最相近的 B\*5610 相比的 4 个碱基突变点以及相应 3 个氨基酸的改变  
Table 1 Comparison of HLA-B\*5618 nucleotide acid sequences with B\*5610

Nucleotide (核苷)	Exon3 nt379 C→G	Exon3 nt412 A→G	Exon3 nt419 T→C	Exon3 nt420 A→C
Codon (密码子)	codon127CTG→GTG	codon138AAC→GAC	codon140TTA→TCC	
Amino acid (氨基酸)	127Leu→Val	138Asn→Asp	140Leu→Ser	

5. 血清学结果 按照 One-Lambda 公司血清板的反应格局, 先证者母亲血样可明确指定为 HLA-A11, 24; B54, 60。父亲血样 HLA-A 位点为 HLA-A2, 11; HLA-B 的一个抗原为 B\*46, 另 1 个 HLA-B 抗原 (HLA-B\*5618) 的血清学特异性介于 B55 和 B56 之间, 故暂时指定为宽带 B22 较妥。先证者血样 HLA-A 位点为 HLA-A11, 一; HLA-B 的一个抗原为 B\*54, 另 1 个 HLA-B 抗原 (HLA-B\*5618) 的血清学特异性同父亲的 B22。

6. 家系分析 该家系的 3 个家庭成员 HLA 分型结果见家系遗传图 4, 家系调查结果表明, 先证者带有的 B\*5618 等位基因系来自其父亲, 携带该等位基因的 HLA 单倍型为 A\*1101, B\*5618, DRB1\*0401。

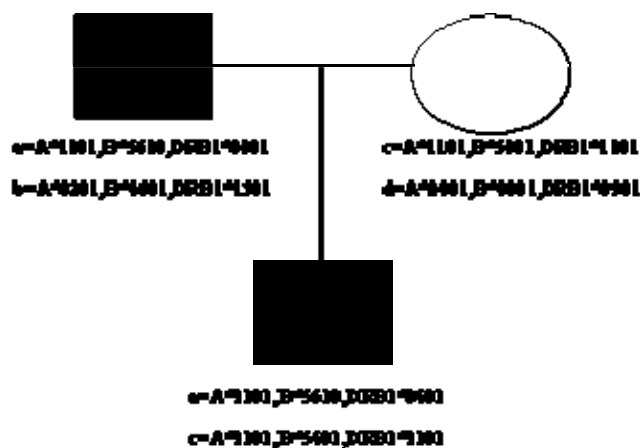


图 4 携带 HLA-B\*5618 等位基因的家系遗传图  
Fig.4 HLA haplotypes of the family carrying the B\*5618

7. 新等位基因的命名及其频率 该新等位基因序列已被 Genbank 接受, 编号为 EF016753。根据世界卫生组织 (WHO) HLA 因子命名委员会命名原则的要求, 将新等位基因有关材料上报给 WHO HLA 因子命名委员会 (上报编号 HWS10004112), 最终该等位基因于 2006 年 9 月被正式命名为 HLA-B\*5618。我们建立的 PCR-SSP 可以将 B\*5618 和其他的 B\*56 等位基因区分开来。在对 3000 名随机造血干细胞捐献者的检测中, 未发现其他带有 B\*5618 等位基因的个体。据此估计 B\*5618 在中国人群中的基因频率小于 0.0002。

8. 成功建立了新等位基因 HLA-B\*5618 的无限增殖化 B 淋巴细胞系, 可大量保存和繁殖新等位基因 HLA-B\*5618 的生物学实验材料。

## 讨 论

人类对白细胞抗原系统的发现、认识与应用已近半个世纪, 对该系统的不断深入研究已极大地推动和改观了基础免疫学、器官移植、骨髓库/脐血库人类遗传学、法医学、肿瘤免疫学、肿瘤疫



苗学、自身免疫疾病和传染性疾病遗传易感性等诸多学科的落后局面<sup>[1]</sup>。HLA 系统中 B 座位等位基因最多,外显子 2、3 具有多态性,血清学特异性主要由 2、3 外显子决定,而外显子 4 显示进化上的保守性。这三个外显子编码 HLA-I 类分子重链的 3 个功能区  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 。近年来针对高变区的测序被广泛应用,新基因频频发现。目前有关 HLA 新等位基因的发现工作在我国呈现出一种蓄势待发争先恐后的态势。自 2002 年我们研究室率先在中国大陆发现 3 个新等位基因<sup>[2-4]</sup>以后,截止到 2006 年 6 月,中国大陆共发现 43 个有籍可查的 HLA 新等位基因<sup>[5]</sup>。2006 年 9 月我们研究室又向 WHO 申报了 2 个新等位基因并获命名<sup>[6]</sup>。

HLA 多态性形成的机制多为碱基突变,有一些碱基突变发生在三联密码子的第 3 位,往往造成同义突变,也就是氨基酸不发生变化;而有一些碱基突变则为有意义突变,会造成氨基酸的改变,从而 HLA 分子结构和功能也将发生相应的改变。我们发现的这例新等位基因与最接近的 B\*5610 序列相比,第 2 和 4 外显子上完全相同,在第 3 外显子上有 4 个碱基突变,均为有意义突变,即第 379 位碱基 C→G,导致第 127 位氨基酸由亮氨酸变为缬氨酸;第 412 位碱基 A→G,导致第 138 位氨基酸由天冬酰胺变为天冬氨酸;第 419 位碱基 T→C、第 420 位碱基 A→C,导致第 140 位氨基酸由亮氨酸变为丝氨酸。由其所引起的生物学功能的变化还有待进一步研究。

人类白细胞抗原(HLA)是至今所知人类最复杂的免疫遗传多态性系统,它在不同种族或同一种族不同群体中的分布表现出明显的种族特性。准确的 HLA 分型以及可靠的 HLA 基因频率数据,不仅被广泛用于器官移植和造血干细胞移植中寻找 HLA 相匹配的供者,而且是研究 HLA 与疾病相关、亲子鉴定、个体识别以及群体遗传学研究所必需的基本数据。HLA-B\*56 等位基因在 1980 年得到 WHO 的正式命名。至今已检测出 17 个与 B\*56 相关的等位基因(HLA-B\*5601~B\*5617),人群中最常见的为 B\*5601,我们发现的是第 18 个 B\*56 等位基因。B\*56 在中国南方汉族人群的基因频率为 0.109,北方人群为 0.029,南北方人群有显著差异<sup>[7]</sup>。而其在韩国人群中的基因频率为 0.0072<sup>[8]</sup>,突尼斯人群为 0.0050<sup>[9]</sup>,伊朗人群未检测到<sup>[10]</sup>,由此可以看出 B\*56 在中国南方汉族人群中的基因频率较高。B\*56 家族中的 B\*5610、B\*5614 以及 B\*5618 均在中国汉族南方人群中发现<sup>[2]</sup>,也证明了这点。

随着我国骨髓库和脐血库的相继建立与完善,无关供者数量的不断增加以及 HLA 分型技术的标准化,具有中国人群特异性的 HLA 新等位基因发现的数量必将进一步增加<sup>[5]</sup>。HLA 新等位基因的发现增加了 HLA 系统多态性,对器官移植、法医学鉴定、人类迁移和人类遗传学研究具有重要意义。无限增殖化 B 淋巴细胞系的建立,可大量保存和繁殖珍贵的生物医学实验材料,为新基因的克隆、序列分析以及对其生物学功能的进一步研究提供了保障。

### 参考文献

- [1] Xi YZ. Some problems in HLA typing in bone marrow register/ cord blood bank in China. *Natl Med J China*, 2003, 83: 443-445.
- [2] G-G Wu, L-H Cheng, D Zhou, et al. Identification of a novel allele HLA-B\*5610 in a Chinese potential bone marrow donor. *Tissue Antigens*, 2003, 61: 256-258.
- [3] G-G Wu, L-H Cheng, Z Li, et al. Identification of a new HLA allele, A\*1114, in a Chinese family. *Tissue*

Antigens, 2003, 61: 253-255.

[4] G-G Wu, L-H Cheng, Z-H Deng, et al. Cloning and complete sequence of a novel HLA-A null allele, A\*0253N, with a termination codon generated by a C to G mutation in exon 2. Tissue Antigens, 2002, 59: 328-330.

[5] Sun YY, Xi YZ. The actualities and problems about the discovery of HLA new allele in Chinese population. Natl Med J China, 2006, 86: 2233-2235

[6] H.-Y. Zou, Z. Li, C.-P. Shao, et al. A new HLA-A\*30 variant, A\*3018, identified by sequence-based typing in the Chinese population. Tissue Antigens, 2007, 69: 281-282.

[7] Wu GG, Deng ZH, Gao SQ, et al. Study of HLA polymorphism in the 6965 Han bone marrow registry donors. Chin J Hematol, 2004, 25: 473-477

[8] K. W. Lee, D. H. Oh, C. Lee, et al. Allelic and haplotypic diversity of HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 genes in the Korean population. Tissue Antigens, 2005, 65: 437-447.

[9] K. Ayed, S. Ayed-Jendoubi, I. Sfar, et al. HLA Class-I and Class-II phenotypic, gene and haplotypic frequencies in Tunisians by using molecular typing data. Tissue Antigens, 2004, 64: 520-532.

[10] S. Farjadian, T. Naruse, H. Kawata, et al. Molecular analysis of HLA allele frequencies and haplotypes in Baloch of Iran compared with related population of Pakistan. Tissue Antigens, 2004, 64: 581-587.

### 3-15

## 杂合性模棱两可引物分离法 在 HLA-SBT 模棱两可分型结果中的应用

程良红<sup>1</sup> 邹红岩<sup>1</sup> 金士正<sup>1</sup> 李 桢<sup>1</sup> 高素青<sup>1</sup> 王大明<sup>1</sup> 程 曦<sup>1</sup> 蒋 妍<sup>2</sup> 王 巍<sup>2</sup>

1 深圳市血液中心组织配型与免疫遗传研究室 (518035) 2 大连医科大学

**摘要:** 目的 筛选适合于解决中国南方汉族人群 HLA-SBT 模棱两可分型结果的杂合性模棱两可引物分离法 (HARPs) 引物并评估其解决能力和应用价值。方法 采用 HARPs 引物对 132 个 HLA-A、131 个 HLA-B 和 89 个 HLA-DRB1 基因测序分型中的模棱两可标本进行测序分型。结果 86.27% 的 HLA-A、73.86% 的 HLA-B 和 38.11% 的 HLA-DRB1 基因模棱两可分型结果可以通过 HARPs 方法有效解决, 2~5 个 HARPs 引物可以解决 90% 以上的模棱两可分型标本。结论 HARPs 方法在中国南方汉族人群 HLA-A、B、DRB1 基因 SBT 模棱两可分型结果中具有很高的解决能力和实际应用价值。

**关键词:** 人类白细胞抗原; 基因测序分型; 模棱两可; 杂合性模棱两可引物分离法 (HARPs)

## Application of Heterozygous Ambiguity Resolution Primers resolving ambiguous results of HLA alleles by Sequence-Based-Typing method

Cheng Lianghong<sup>1</sup>, Zou Hongyan<sup>1</sup>, Jin Shizheng<sup>1</sup>, Li Zhen<sup>1</sup>,  
Gao Suqing<sup>1</sup>, Wang Daming<sup>1</sup>, Cheng Xi<sup>1</sup>, Jiang Yan<sup>2</sup>, Wang Wei<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Immunogenetics and Histocompatibility testing Lab, Shenzhen Blood Center, Shenzhen.

<sup>2</sup>Da Lian Medical University.

**Abstract: Objective** To choose and evaluate the ability and value of some appropriate Heterozygous Ambiguity Resolution Primers (HARPs) to resolve the ambiguities of HLA Sequence-Based Typing in southern Chinese Han population. **Methods** Use some HARPs Primers to resolve the ambiguous typing samples by Sequence-Based-Typing method for 132 HLA-A, 131 HLA-B and 89 HLA-DRB1. **Results** The percentage of ambiguities resolved by HARPs for HLA-A, B and DRB1 locus was 86.27, 73.86 and 38.11 respectively, 2~5 kinds of HARPs can resolve more than 90% ambiguities. **Conclusion** HARPs has high ability and practical value to resolve the ambiguities for HLA-SBT in southern Chinese Han population.

**Key words:** HLA; PCR-SBT; ambiguities; Heterozygous Ambiguity Resolution Primers (HARPs)

聚合酶链式反应-基因测序 (PCR-SBT) 方法是人类白细胞抗原 (HLA) 基因分型的金标准, 目前一般是通过分析 HLA-I 类基因的三个高度多态性外显子 2、3、4 和 HLA-II 类基因的第 2 外显子的碱基序列获得基因型结果的<sup>[1]</sup>。然而杂合等位基因状态下, 不同等位基因组合的碱基序列相同而导致 SBT 方法存在较高比例的模棱两可结果, 从而不能得到完整的高分辨率分型结果。2003 年, 美国 ATRIA 公司开发了一种通过附加测序反应来解决 HLA-SBT 分型中出现的模棱两可结果方法-杂合性模棱两可引物分离法 (HARPs), 比较方便快捷<sup>[2-3]</sup>。本研究根据中国南方汉族人群<sup>[4]</sup>HLA-A、B、DRB1 基因的模棱两可分布情况, 筛选合适的 HARPs 引物并评估其解决效率, 探讨 HARPs 在解决中国南方汉族人群 HLA-SBT 模棱两可分型结果中的应用价值。

### 一、材料与方法

**1.1 标本** 416 名深圳骨髓库南方汉族供者的 EDTA 抗凝血 5ml, 供者民族和籍贯按自述原则予以确定。

**1.2 主要仪器及设备** 瑞士 TECAN 公司全自动 DNA 提取工作站, 美国 ABI 公司 9600、9700 型 PCR 扩增仪, 美国 ABI 公司 3100 型基因测序仪。

**1.3 试剂** DNA 提取试剂由美国 Promega 公司提供, HLA-A、B、DRB1 基因的 SBT 分型试剂和 HARPs 引物由美国 ATRIA 公司提供。

### 1.4 方法

**1.4.1 DNA 提取** 在 1.5ml 的微量离心管中加入 400ul 全血样本, 采用磁珠法提取 DNA<sup>[5]</sup>。

1.4.2 HLA-A、B、DRB1 基因的 SBT 分型 根据试剂盒说明进行相关操作<sup>[6]</sup>。

1.4.3 HARPs 引物选择及分型

以 2007 年 7 月 9 日 HLA 等位基因序列数据库<sup>[7]</sup>为参考序列, 根据模棱两可组合的碱基差异通过 HARPsFinder 软件<sup>[8]</sup>进行 HARPs 引物的初次选择, 所有可用 HARPs 引物的信息列于表 1。

表 1 HARPs 引物信息

引物	序列	起点	终点	引物	序列	起点	终点
A2F98A	GGTATTTCTA	89	98	B2F206C	GTCCGAGGAC	197	206
A2F98T	GGTATTTCTT	89	98	B2R311T	TCGCGCTCC	311	320
A2F144	CTTCATCGCA	135	144	B3F357C	TCACATCATC	348	357
A2F261C	GGACCGGAAC	252	261	B2F106A	ACACCGCCA	98	106
A3F363A	TCCAGATA	356	363	B3F357G	TCACACTTGG	348	357
A3F363G	TCCAGAGG	356	363	B3R559A	ACGTGCGTGG	559	568
A3F414C	CGGGTACCAC	405	414	C3R486G	GGCGGCTCAG	486	495
B2F144C	CTTCATCACC	135	144	C3R539T	TGAGAGCCTA	539	548
B3R603G	GACGCTGCAG	603	612	C3R559A	ACGTGCGTGG	559	568
C2F105T	CTACACCGCT	96	105	C2F142G	CTTCATCG	135	142
C2F176G	GTTCGTGCG	168	176	C3F361T	ACCCTCCAGT	352	361
C3R368C	CTGGCTGCGA	368	377	R2F124C	CAGGTTAAAC	115	124
R2F124T	TACTCTACGT	115	124	R2F197A	AGGAGGAGAA	188	197
R2R256A	AGCGCCGAGT	256	265	R2R286A	ATCCTGGA	286	293
Condon86	GTG	343	345				

1.4.4 HLA-A、B、DRB1 基因的 SBT 和 HARPs 分型结果分析 采用 ASSIGN3.5 分析软件 (Conexio Genomics, Western Australia)<sup>[9]</sup>进行分析, 数据库版本为 2007 年 7 月 9 日。

## 二、结果

### 2.1 HARPs 引物的筛选

416 例 HLA-SBT 分型标本中, 153 例 HLA-A、176 例 HLA-B 和 223 例 HLA-DRB1 出现模棱两可分型结果, 其中 131 例 HLA-A、132 例 HLA-B 和 89 例 HLA-DRB1 标本 (69 个 HLA-DRB1 模棱两可标本已经在首次 SBT 分型中被常规采用的密码子 86 分离) 是由于等位基因差异位于检测区内而形成的模棱两可结果, 理论上全部可以采用 HARPs 方法进行解决。但我们设定 HARPsFinder 软件的“可读测序片段长度”和“HARPs 引物结合点与模棱两可分离点的间隙”分别为 270bp 和 20bp 时, 发现模棱两可组合为 B\*1302/5101 ( $N=1$ )、DRB1\*0802/1602 ( $N=1$ )、DRB\*0901/1602 ( $N=3$ ) 的 5 例标本无合适 HARPs 引物, 可改用高分辨 PCR-SSP 解决; 模棱两可组合为 B\*4001/4006 ( $N=1$ )、B\*1501/4801 ( $N=1$ )、B\*1501/1502 ( $N=4$ ) 的 6 个标本更改“可读测序片段长度”为 540bp 时, 可选出相应 HARPs 引物。

### 2.2 HARPs 解决 HLA-A、B、DRB1 基因的 SBT 模棱两可分型结果的总体效能

132 个 HLA-A、131 个 HLA-B 和 85 个 HLA-DRB1 标本可用现有 HARPs 解决, 解决能力超过 95%; 而占模棱两可结果总数的解决比例分别为 86.27%、73.86%和 38.11% (表 2)。

表2 HAPRs 解决 HLA-A、B、DRB1 基因模棱两可分型结果的比例

	检测范围内的 模棱两可结果	可用 HAPRS 解决样本数	模棱两可 总数	HAPRS 解决 比例 (%)
HLA-A	132	132	153	86.27
HLA-B	131	130	176	73.86
HLA-DRB1	89	85	223	38.11

### 2.3 HAPRs 引物的评价

HLA-I 类基因的 HAPRs 中, HLA-A、HLA-B 的可用引物分别有 7 种和 8 种, 其中引物 A2F98A、A2F144A、A2F261C、A2R311T、A3F363G、C3R539T、B3R559A 和 C3R486G 可在 HLA-A、B 中通用; HLA-A 中, A3F414C 应用频率最高, 使用 A3F414C、A2F98A、A2F98T、A2F144A 和 A2F261C 五种引物可以解 90% 以上的模棱两可结果; B3F357G 为 HLA-B 中应用最广泛的 HAPRs, 使用 B3F357G、B3F357C、A2F98A、B2F106A、B3R603G、A3F363G 可以解决 90% 以上的模棱两可结果。各种 HAPRs 引物的解决效能 (表 3)。

HLA-DRB1 基因中, 密码子 86 可以解决 77.53% (69/89) 的模棱两可结果, R2F124T/C 和 R2F197A、R2R286A 可以解决剩余 90% 以上的模棱两可标本。

表3 HAPRs 引物的解决效率

HLA-A			HLA-B			HLA-DRB1		
Primer	可解决数	比例	Primer	可解决数	比例	Primer	可解决数	比例
A2F98A	60	45.45	A2F144A	36	27.69	R2F124T	11	12.94
A2F98T	58	43.93	C2F142G	36	37.69	R2F124C	4	4.70
A3F414C	86	65.15	B3F357C	26	20.00	R2F197A	10	11.76
C3R486G	12	9.09	B3F357G	49	37.69	R2R286A	4	4.70
A2F144A	44	33.33	B2R311T	16	12.30	R2R256A	2	2.35
A2F261C	21	15.90	B2F206C	17	13.07			
A2R311T	53	40.15	A2F98A	36	27.69			
A3F363A	57	43.18	B3R559A	22	16.92			
A3F363G	24	18.18	A3F363G	38	29.23			
C3R539T	6	4.54	B2F106A	22	16.92			
C3R559A	29	21.96	B3R603G	15	11.53			
			A2F261C	12	9.23			
			C3R486G	12	9.23			
			C3R539T	8	6.15			
			B2F144C	21	16.15			
			B3R603G	3	2.30			
			C2F176G	1	0.76			

由于不同模棱两可组合等位基因的分离点数量以及间隔距离的差异, 不同模棱两可组合所需 HAPRs 的数量和种类存在差异。3 种 HLA-A (14/132)、11 种 HLA-B (24/130)、4 种 (4/85) HLA-DRB1 模棱两可组合只有一种 HAPRs (表 4)。

表4 只有一种 HAPRs 的模棱两可组合

模棱两可组合	HAPRS	模棱两可组合	HAPRS	模棱两可组合	HAPRS
A*0101/3101	A3F363A	B*1302/5001	A2F98A	B*4001/4006	B2F106A
A*0201/3001	A2F98T	B*1501/4001	B3R603G	B*4001/5502	A2F98A
A*2402/3101	A3F414C	B*1501/4403	B3F357C	DR*0403/1501	R2F124C
B*0702/3503	B3F357C	B*1518/4001	B3R603G	DR*0803/1312	R2F124T
B*1302/4001	A2F98A	B*3505/4601	A3F363G	DR*1301/1405	R2F197A
B*1302/4006	B2F106A	B*3901/4403	B3F357C	DR*1405/1501	R2F124T

从所需 HAPRs 的数量上看 (表 5), 近 50% 的 HLA-A 和 80% HLA-B、100% 的 HLA-DRB1 的模棱两可结果只需要一种 HAPRs 就可以解决相应模棱两可结果, 但尚有一部分的标本需要同时使用两种 HAPRs 才能得到分离结果, 甚至 A\*0301/2402 ( $N=5$ ) 需要三种 HAPRs 才能区分所有模棱两可等位基因组合。

表 5 HAPRs 引物的应用分布

	HLA-A		HLA-B		HLA-DRB1	
	解决例数	比例 (%)	解决例数	比例 (%)	解决例数	比例 (%)
单独	64	48.48	104	80.00	85	100
联合两种	63	47.72	26	20.00	0	0.00
联合三种	5	3.78	0	0.00	0	0.00
合计	132	100	130	100	85	100

#### 2.4 HAPRs 分离结果:

我们对 132 个 HLA-A、130 个 HLA-B 和 85 个 HLA-DRB1 模棱两可标本随机选择能解决的 HAPRs 引物进行后续测序反应, 均可得到清晰的分离结果。但发现部分长片段标本的 HAPRs 序列质量不高, 如 C3R486G 区分 B\*4001/4006 模棱两可等位基因组合 (标本号 75002956)。

#### 三、讨论

人类白细胞抗原 (HLA) -A、B、DRB1 基因是目前公认的与骨髓移植密切相关的三个最重要功能基因, 具有高度多态性和种群、地理分布差异的遗传特点<sup>[4]</sup>。大量临床研究表明, 精确的 HLA 基因分型方法可以为患者获得良好的骨髓移植效果提供可靠保证<sup>[10]</sup>。PCR-SBT 分型方法由于其高精度而在骨髓移植配型的确认试验中得到广泛应用, 但较高比例的模棱两可结果为最后获得精确 HLA 基因分型结果带来不便<sup>[2, 3, 11-14]</sup>。

HAPRs 方法在 HLA-SBT 分型基础上, 选择模棱两可等位基因组合具有组间序列差异处的碱基序列作为测序引物, 根据该附加测序反应所获得的被分离等位基因的序列来解决模棱两可分型结果。与其他试验方法相比, 不仅减少了 DNA 用量, 而且无须再次 PCR 扩增, 因而更加便捷省时同时结果也更加可靠。我们的研究表明, 416 个南方汉族个体中, HAPRs 方法可以成功解决 95% 以上位于检测区内的模棱两可结果, 说明了 HAPRs 具有很高的解决效率; 而从总体上看, 86.27% 的 HLA-A 和、73.86% 的 HLA-B 模棱两可结果可以通过 HAPRs 得到解决; 但仅有 38.11% 的 HLA-DRB1 的模棱两可分型结果可以采用 HAPRs 解决, 这是由于 HLA-DRB1 基因 SBT 测序范围仅在第 2 外显子, 而且该方法 PCR 扩增和测序引物位于第 2 外显子的第 1 高变区<sup>[14]</sup>, 一方面缩小了 HAPRs 引物的可选区域, 另一方面增加了测序范围外的模棱两可比例, 事实上 HLA-DRB1 模棱两可结果中 60.09% (134/223) 是测序范围外的。

近 400 次 HAPRs 试验结果表明, 所有可用 HAPRs 均可以得到清晰的等位基因分离结果, 但受基因测序仪自身条件的限制, 如 ABI3100 型基因测序仪采用 36 厘米毛细管只能获得 350bp 左右的优质序列, 故部分需要长片段分离的 HAPRs 引物的序列质量稍差, 如 C3R486G。从单个基因座来说, A3F414C、B3F357G 分别为 HLA-A、B 基因中应用最广泛的 HAPRs, A3F414C、A2F98A、A2F98T、A2F144A 和 A2F261C 这五种可以解决 90% 以上的 HLA-A 模棱两可结果, 而 B3F357G、B3F357C、A2F98A、B2F106A、B3R603G、A3F363G 可以解决 90% 以上的 HLA-B 模棱两可结果。

密码子 86 是 HLA-DRB1 基因最常用 HAPRs, 目前已经常规纳入 HLA-DRB1 的 SBT 分型中。另一方面, 不同模棱两可等位基因组合所需 HAPRs 的数量不同, 近 50% 的 HLA-A 和 80% 的 HLA-B、100% 的 HLA-DRB1 的模棱两可结果只需要一种 HAPRs 就可以解决相应模棱两可结果, 但 67.72% 的 HLA-A 的模棱两可结果需要同时使用两种 HAPRs 才能得到分离结果。

我们根据 HAPRs 引物的筛选结果和分型结果, 提出在选择 HAPRs 引物解决模棱两可分型结果时应注意以下几个原则:

(1) 优先选择外显子头部 (正向) 或末端 (反向) 的 HAPRs 引物, 使可读序列长度最大化, 提高检测新等位基因突变点的能力。如 A\*0207/2402 可用引物有 A2F98T、A2F144A、A2R311T 和 B2R311T, 优先选择 A2F98T 和 A2R311T。

(2) 优先选择可以获得跨外显子序列的 HAPRs, 如 B\*4001/4006、B\*1501/4801、B\*1501/1502 分别选择 B2F106A、C3R539T、A2F261C, 但需要注意可读序列长度不能超过 550bp, 且需要高质量的 DNA 和熟练的 SBT 操作技能。

(3) 现有 HAPRs 不能解决的模棱两可组合, 符合以下条件可以重新设计引物: ①有适当的引物结合点; ②引物结合点和唯一分离点间隔距离介于 20bp-550bp 之间。如图 1 所示, B\*1302/5101、B\*1315/5102、B\*1316/5109 这组模棱两可组合, 密码子 116 可以区分 B\*13 和 B\*51 这两组等位基因家族, 而密码子 152 和 171 则可以进一步区分 B\*1302、B\*1315 和 B\*1316, 而且密码子 152 和 171 与密码子 116 之间的序列长度不足 200bp, 符合上述设计条件, 因而可以选择 116 密码子处作为引物结合点, 引物序列为 AAC CAG TAA。

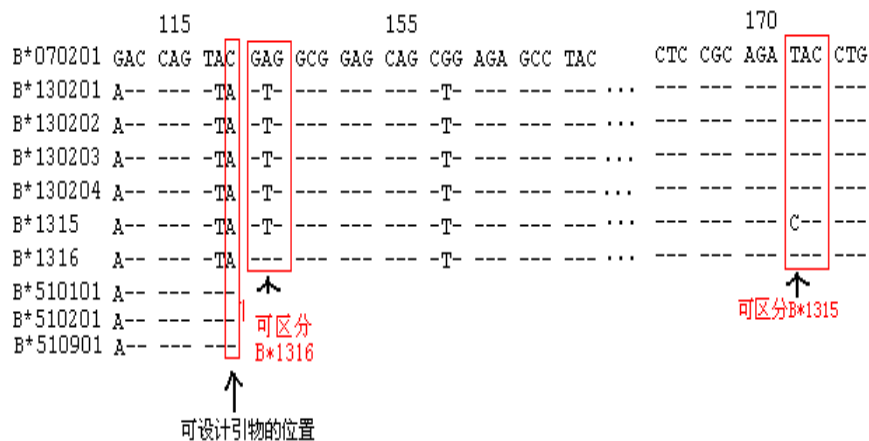


图 1 B\*1302/5101 B\*1315/5102 B\*1316/5109 的碱基差异

综上所述, HAPRs 方法在解决中国南方汉族人群 HLA-A、B、DRB1 基因模棱两可分型结果中具有较高的解决能力和实际应用价值, 本研究通过分析中国南方汉族人群 HLA-A、B、DRB1 基因 SBT 模棱两可分型结果, 筛选出了一整套合适 HAPRs 引物并建立了相应的 HAPRs 解决方法, 有利于推动 HLA-SBT 方法在中华骨髓库大规模供者 HLA 分型中的应用。

#### 参考文献

- [1] 赵桐茂.骨髓移植 HLA 基因分型程度探讨. 中国输血杂志 2002; 15 (4): 286-288.

- [2] Jason S, Damian G, David S, et al. A single direction plus HARPs sequencing strategy for unambiguous high resolution HLA typing, 2007, 68 (S1) : 83.
- [3] Jason S, Malcolm M, Jan C, et al. Unambiguous high resolution HLA typing results using Heterozygous Ambiguity Resolution Primers (HARPs) . Human Immunology, 2006, 67 (S1) : S55.
- [4] 赵桐茂. 人类血型遗传学. 北京: 科学出版社, 1987: 252-257.
- [5] 唐斯, 王大明, 李楨, 等. 两种从陈旧血中抽提基因组 DNA 方法的比较. 江西医学检验 2002; 15 (4): 28-30
- [6] 吴国光, 程良红, 赵桐茂, 等. 新的 HLA 等位基因 B\*5610 的发现和序列分析. 中国输血杂志. 2002; 15 (5): 304-306.
- [7] IMGT HLA Database. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/subs/submit.html>.
- [8] HARPsFinder. <http://www.harpsfinder.conexio-genomics.com/index.html>.
- [9] Sayer DC, Goodridge DM, Christiansen FT. Assign 2.0: software for the analysis of Phred quality values for quality control of HLA sequencing-based typing. 2004, 64: 556-565.
- [10] 赵桐茂. 骨髓库和脐血库中的 HLA 分型技术和策略. 中国输血杂志 2001; 14 (6): 382-385.
- [11] Sharon DA, Kathleen CB, Deborah C, et al. Ambiguous allele combinations in HLA class1 and class2 sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. J Trans Med, 2004; 2: 30.
- [12] Nagy M, Entz P, Otremba P, et al. Haplotype-specific extraction: a universal method to resolve ambiguous genotypes and detect new alleles-demonstrated on HLA-B. Tissue Antigens 2007; 69: 176-180.
- [13] Sharon DA, Kathleen CB, Deborah C, et al. Ambiguous Allele Combinations in Sequence-based Typing .ASHI Quarterly 2003; 4: 144-6.
- [14] Tilanus M. 13th IWHG Technical Manual. Genomic Analysis of the Human MHC, Chapter 6, SBT Resolution and Ambiguities.

### 3-16

## 岳阳地区造血干细胞捐献者 HLA 等位基因多态性调查

代 敏 粟玉萍 苏湘晖 刘 锋 李肖雄

湖南岳阳市中心血站 (414000)

**摘要:** **目的** 了解岳阳市造血干细胞捐献者人类白细胞抗原 HLA-A、B、DRB1 位点等位基因多态性。**方法** 对岳阳市 HLA 配型实验室接收的造血干细胞捐献者 HLA 分型标本采用 PCR-SSP 及 PCR-SSO 方法实施 HLA 分型, 从已完成的合格的分型结果中挑选岳阳籍的捐献者的分型结果 21152 份, 计算 HLA-A、B、DRB1 等位基因的频率。**结果** 在岳阳市组织配型实验室的分型数据内, HLA-A 位点等位基因(含血清学特异性)检出 19 种, 基因频率较高的有 A11/0.3195, A2/0.3088, A24/0.1755; B 位点等位基因(含血清学特异性)检出 41 种, 基因频率较高的有 B60/0.1797, B46/0.1626, B13/0.0896, B75/0.0661, B58/0.0617, B62/0.0596, B51/0.0578; DRB1 位点等位基因(含血清学



特异性) 检出 13 种, 基因频率较高的有 DR9/0.1894, DR15/0.1373, DR4/0.1206, DR12/0.1198; 未检出的等位基因有, A80, B15 (70), B78, B82, B83。结论 岳阳地区造血干细胞捐献者 HLA 基因分布符合其种族和地域特点。

**关键词:** 基因; HLA 分型; 干细胞; 造血; 多态性; 基因; 频率; HLA 基因; 岳阳

人类白细胞抗原 (Human Leukocyte Antigen HLA) 是目前所知的人类最为复杂, 最具多态性的抗原系统。这些等位基因在群体中不是以相同的频率出现, 相反, 某一座位的各种等位基因在群体中出现的机会往往相差很大, 且具有明显的人种和地域差异。HLA 抗原受控于主要组织相容性基因, 并认为该基因与同种异体组织器官移植以及移植物急性排斥有关。笔者采用 PCR-SSP 及 PCR-SSOP 方法对造血干细胞捐献者进行 HLA-A、B、DRB1 等位基因低分辨分型, 选择岳阳籍的捐献者做等位基因分析, 现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 样本** 21152 份均来自 2002 年 9 月~2008 年 2 月岳阳 HLA 配型实验室接收到的造血干细胞捐献者血样。其中男性 49.10%, 女性 50.90%; 汉族 98.78%, 土家族 0.37%, 苗族 0.25%, 其他民族 (白、侗、瑶、藏、回、满、蒙古、壮、布依) 0.60%。

**1.2 试剂与仪器** ABDR SSP UNITRAY 试剂盒 (美国 PEL-FREEZL 公司, LOT001, 002, 003, 004, 005, 007); HISTO TYPE/DNA-ABDR 384 试剂盒 (德国 BAG 公司, LOT 0405CH, 0606CH, 0607CH, 0608CH, 0609CH); Dynal Accuplex HLA Typing Kits 试剂盒 (美国 Dynal 公司, LOT2006001, 2006007, 2006009, 2006010, 2006011, 2007003); Quicktype for Lifematch 试剂盒 (德国 Tepnel Lifecodes Corporation, LOT A 位点 01106R, B 位点 12136C, DR 位点 05086B)。琼脂糖 (Agarose, 西班牙生产, 上海分装); 溴化乙锭 (EB, 美国 Promega 公司); 电泳液为 0.5%TBE 液, 按文献[1]自行配制; MJR PCR 扩增仪 PTC-100 型, PTC-220 型, PTC-225 型, ABIPCR 扩增仪 PE9700 型; Syngene 凝胶成像系统 (美国); GeneQuant Pro 核酸蛋白测定仪 (英国); AB-gene 192 孔电泳槽 (英国)。

**1.3 血样采集及 DNA 制备** 采集捐献者静脉血 5ml, EDTA 抗凝, 快速 DNA 抽提试剂盒提取 DNA, 检测 DNA 浓度在 50~200ng/ $\mu$ l, A260/A280 比值为 1.5~1.9。DNA 在 7 天内使用的置 4℃ 保存, 大于 7 天使用置 -20℃ 保存。

**1.4 HLA 分型** 根据不同的试剂和方法, 严格按照试剂操作说明书操作, 不能不结果的标本采用另一种试剂重复检测。

**1.5 数据分析** 本实验室选用的所有 HLA 分型试剂均经过质控实验室发放的室间质评标本检测, 符合率 100%, 证明 HLA 分型试剂可靠; 所有标本分型结果通过国家质控实验室 2% 抽样检查, 准确率均高于由中国造血干细胞捐献者资料库管理中心专家委员会颁发的《HLA 配型质量控制办法 (暂行)》的相关规定, 证明实验数据准确可靠。基因频率计算采用计数法:  $P_i = \text{基因数} / 2N$  ( $P_i$  为基因频率,  $N$  为观察数) [2]。

## 2 结果

表1 造血干细胞捐献者 HLA-A 位点基因频率 ( $n=21152$ )

等位基因	基因数	基因频率	等位基因	基因数	基因频率
A11	13516	0.3195	A68	165	0.0039
A2	13064	0.3088	A23	72	0.0017
A24	7423	0.1755	A74	42	0.0010
A33	2921	0.0690	A34	26	0.0006
A30	1114	0.0263	A69	19	0.0005
A26	1037	0.0245	A66	12	0.0003
A31	1024	0.0242	A25	2	0.0001
A1	798	0.0189	A43	1	0.0000
A3	590	0.0140	A36	1	0.0000
A32	260	0.0061	A80	0	0.0000
A29	217	0.0051	合计	42304	1.0000

表2 造血干细胞捐献者 HLA-B 位点基因频率 ( $n=21152$ )

等位基因	基因数	基因频率	等位基因	基因数	基因频率
B40 (60)	7604	0.1797	B08	187	0.0044
B46	6878	0.1626	B18	136	0.0032
B13	3792	0.0896	B15 (76)	124	0.0029
B15 (75)	2798	0.0661	B50	123	0.0029
B58	2610	0.0617	B14 (65)	46	0.0011
B15 (62)	2522	0.0596	B53	46	0.0011
B51	2444	0.0578	B15 (63)	39	0.0009
B55	1653	0.0391	B45	39	0.0009
B40 (61)	1536	0.0363	B41	28	0.0007
B54	1282	0.0303	B49	26	0.0006
B35	1274	0.0301	B59	21	0.0005
B38	1261	0.0298	B81	15	0.0004
B39	1046	0.0247	B15 (72)	14	0.0003
B44	706	0.0167	B15 (77)	14	0.0003
B27	671	0.0159	B47	6	0.0001
B52	612	0.0145	B14 (64)	5	0.0001
B07	574	0.0136	B73	2	0.0001
B48	562	0.0133	B42	2	0.0000
B37	418	0.0099	B15 (70)	0	0.0000
B15 (71)	345	0.0082	B78	0	0.0000
B56	337	0.0080	B82	0	0.0000
B57	263	0.0062	B83	0	0.0000
B67	245	0.0058	合计	42304	1.0000

表3 造血干细胞捐献者 HLA-DRB1 位点基因频率 ( $n=21152$ )

等位基因	基因数	基因频率	等位基因	基因数	基因频率
DR9	8013	0.1894	DR13	2053	0.0485
DR15	5806	0.1373	DR7	1951	0.0461
DR4	5100	0.1206	DR17	1861	0.0440
DR12	5070	0.1198	DR16	1677	0.0396
DR8	4134	0.0977	DR10	569	0.0134
DR14	2889	0.0683	DR1	521	0.0123
DR11	2661	0.0629	合计	42304	1.0000

表4 不同地区民族 HLA 等位基因频率比较

等位基因	本组 (n=21152)	四川 <sup>[3]</sup> (n=11134)	河南 <sup>[4]</sup> (n=1626)	西安 <sup>[5]</sup> (n=7016)	日本人 <sup>[6]</sup> (n=1023)	台湾 <sup>[6]</sup> (n=*)
A11	0.3159	0.3165	0.1539	0.1876	0.1040	0.3320
A2	0.3088	0.2913	0.2947	0.3003	0.2440	0.3010
A24	0.1755	0.1716	0.1544	0.1625	0.3510	0.1760
A33	0.0690	0.0814	0.0613	0.0763	0.0770	0.1110
B60	0.1797	0.1364	0.0741	0.0767	0.0560	0.1880
B46	0.1626	0.1667	0.0632	0.0792	0.0440	0.1280
B13	0.0896	0.0898	0.1004	0.1125	0.0180	0.0780
B75	0.0661	0.0654	0.0370	0.0454	0.0110	0.0430
B58	0.0617	0.0755	0.0319	0.0445	0.0070	0.0990
B62	0.0596	0.0607	0.0694	0.0771	0.0830	0.0580
DR9	0.1894	0.1802	0.1270	0.1365	0.1300	0.1590
DR15	0.1373	0.1210	0.1715	0.1633	0.1740	0.0990
DR4	0.1206	0.1031	0.1076	0.1171	0.2280	0.1660
DR12	0.1198	0.1237	0.1038	0.1117	0.0700	0.1430

\*A 位点 n=79863, B 位点 n=80353, DRB1 位点 n=18217

### 3 讨论

HLA-A 位点共检出等位基因 19 个, 较高基因频率的 ( $P_i > 0.1000$ ) 的有 A11, A2, A24; 低频率等位基因 ( $P_i < 0.0010$ ) 有 A74, A34, A69, A66, A25, A36, A43; 未检出的等位基因有 A80。B 位点共检出等位基因 41 个, 较高基因频率的 ( $P_i > 0.0500$ ) 的有 B60, B46, B13, B75, B58, B62, B51; 低频率等位基因 ( $P_i < 0.0010$ ) 有 B63, B45, B41, B49, B59, B81, B72, B77, B47, B64, B73, B42; 未检出的等位基因有 B70, B78, B82, B83。DRB1 位点共检出等位基因 13 个, 较高基因频率的 ( $P_i > 0.1000$ ) 的有 DR9, DR15, DR4, DR12。

笔者此次统计数据量比较大 ( $n=21152$ ), 能够比较真实的反应湖南地区 HLA 等位基因频率的分布情况。本组数据与四川骨髓库的数据相比较, 基因频率比较接近。四川骨髓库未检出的 A25 和 A43, 在本组数据中有检出, 但检出量仅为 2 个和 1 个, 查其民族, 均为汉族。与河南骨髓库、西安骨髓库的高频基因存在差异, 证明我国南北地域差异导致了基因频率变化。与日本人的高频基因相比较, 则存在较大差异。湖南骨髓库的建立提高了湖南地区患者造血干细胞检索配型成功的几率, 同时也有助于了解湖南地区 HLA 等位基因多态性, 为人类学、群体遗传学研究提供了参考依据。

### 参考文献

- [1] 曹孟德, 秦东春, 孙含笑主编.HLA 分子生物学及临床应用[M], 郑州: 河南医科大学出版社, 1998, 103-104.
- [2] 谭建明, 周永昌, 唐孝达主编.组织配型技术与临床应用[M], 北京: 人民卫生出版社, 2002.86-89.
- [3] 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 基因和单倍型研究[J].中国输血杂志, 2005, (18) 5: 384-388.
- [4] 张伯伟, 邢培清, 郭如华, 等.河南省造血干细胞资料库汉族捐献者 HLA 基因多态性调查[J]. 中国输血杂志, 2006, (19) 2: 115-117.
- [5] 刘梦黎, 张艳, 刘晟, 等.西安地区造血干细胞捐献者 HLA-A、B、DR 等位基因多态性分析[J]. 中国输血杂志, 2005, (18) 6: 470-473.
- [6] 谭建明, 周永昌, 唐孝达主编.组织配型技术与临床应用[M], 北京: 人民卫生出版社, 2002.115~118.

## PCR-SSP 检测 ABO 疑难血型在临床上的应用

粟玉萍 代敏 刘锋 苏湘晖 李肖雄

湖南省岳阳市中心血站(414000)

PCR-SSP 技术(PCR-序列特异性引物)这是一项针对 ABO 基因突变位点的不同核苷酸分别设计一系列特异性引物,直接扩增 ABO 等位基因片段的检测技术。这种方法简单、易操作、结果直观。血清学检测技术简单快速,但有局限性,受生理、病理等因素的影响可导致正反定型不符,而 ABO 血型基因的检测可解决上述问题。笔者采用 PCR-SSP 技术对 32 例正反定型不符的临床患者标本作 ABO 基因分型,现报告如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 样品来源及基本情况** 为 2005 年~2007 年本市市内医院 32 例因 ABO 血型正反定型不符的患者标本,其中癌症病人 7 例、白血病患者 13 例、自身溶血病患者 4 例、老年患者 3 例、其他患者 5 例。32 例患者血样送我实验室作进一步检测。本实验室再次用血清学方法检测,仍表现为正反定型不符,故对 32 例患者的标本做 ABO 基因分型,并另做 A、B、O、AB 型正常标本各 1 例,提取 DNA 扩增 ABO 基因作为对照。

**1.2 血清学检测试剂与方法** 抗 A、抗 B、抗 A<sub>1</sub>、抗 AB、抗 H、抗 D 标准血清和 A、B、O 试剂红细胞均为上海血液中心生产。采用久保田(KUBOTA)KA-2200 型专用离心机进行试管法检测<sup>[1]</sup>。

**1.3 血清学检测** 我室对 32 例患者的血样标本再次进行了 ABO 血型血清学实验,反应结果仍是正反定型不符。

**1.4 DNA 的抽提** 用快速盐析法提取 DNA(德国 BAG 公司),取 0.5ml EDTA 抗凝全血,加入细胞裂解液 0.8ml,充分振荡,使红细胞裂解,8000rpm 离心 1min,弃去上清液,加 0.8ml 细胞裂解液,重复上述步骤一次,弃去上清液,加 300 $\mu$ l 细胞裂解液,振荡,8000rpm 离心 1min,弃去上清液,加 240 $\mu$ l 双蒸馏水重悬沉淀,充分振荡,加入 120 $\mu$ l 核蛋白裂解液,充分振荡,使其混合液变清,加入 120 $\mu$ l 蛋白沉淀液,充分混匀,室温下静置 5min,13000rpm 离心 5min,将上清液转入新的 EP 管,再加入 120 $\mu$ l 蛋白沉淀液,充分混匀,室温下静置 5min,13000rpm 离心 5min,再将上清液转入另一新的 EP 管中,加 1ml 无水乙醇,轻柔混匀,13000rpm 离心 2min,小心去掉上清液,加入 1ml 70%乙醇,充分振荡,13000rpm 离心 2min,小心去掉上清液,倒扣 EP 管使其自然风干后,用适量消毒蒸馏水溶解 DNA 沉淀。

**1.5 扩增引物** ABO 血型基因 4 对分型引物由美国 G&T 公司设计合成、鉴定,用于 PCR 特异性扩增 A、A<sub>201</sub>、B、O 基因(见表 1)。内对照 PCR 扩增产物片段长度为 207bp。

表 1 PCR 产物及检测的等位基因

PCRMix	PCR 产物 (bp)	检测的等位基因 <sup>[2]</sup>
A	75	A101, A102, A103, A113; A201, A202, A203, A205, A206; A301, A302; Ax01, Ax03, Ax04; Ael01, Ael02; cis-AB01; B108; O301, O302, O304
A201	117	A201, A205; A302; O108, O111, O112, O304
B	90	B101, B102, B103, B104, B105, B106, B107, B108; B301, B302; Bx01; Bel01, Bel02; B(A)01, B(A)02; cis-ABO1, cis-ABO2
O	127	O101, O102, O103, O104, O105, O106, O107, O108, O109, O110, O111, O112, O113, O114, O115, O116, O117, O118, O119; O201, O202, O203, O204, O205, O206, O207, O208, O209, O210, O211, O212, O213, O214

**1.6 总反应体系 9 $\mu$ l** 7 $\mu$ l 引物混合液, 1 $\mu$ l 待检 DNA 溶液 (含 DNA100~300ng), 1 $\mu$ l Taq 酶 (0.33~0.5 单位)。

**1.7 PCR 扩增** 使用美国 Perkin-Elmer 公司 PE 9700 型 PCR 扩增仪, 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.8 PCR 扩增产物的检测** 取扩增后标本 4 $\mu$ l 在含 0.5 $\mu$ g 的溴化乙锭 (EB) 的 2% 琼脂糖凝胶中以 10V/cm 电泳约 15~18min, 观察结果, 在紫外光下拍照记录。根据是否产生扩增片段以及片段的长度确定 ABO 基因型。

## 2 结果

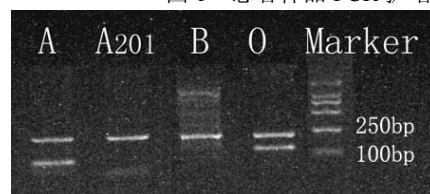
**2.1** 32 例患者样品根据 PCR 扩增产物电泳分析 ABO 血型结果见下表 2。

表 2 32 例患者血型结果

病 因	例数	ABO 血型			
		A 型	B 型	O 型	AB 型
癌症患者	7	2	1	3	1
白血病患者	13	4	3	5	1
自身溶血病患者	4	1	1	2	
老年病患者	3	1	1	1	
其他患者	5	1	1	2	1

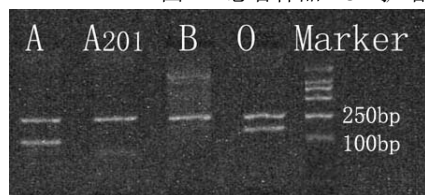
**2.2** 下列 PCR 扩增产物电泳图, 图 1 为一例胃出血患者、图 2 为一例急性淋巴细胞白血病患者、图 3 为一例自身免疫溶血性贫血患者。

图 1 患者样品 PCR 扩增产物电泳图



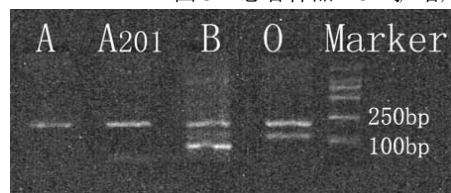
根据胶图判定为 A 型。

图2 患者样品 PCR 扩增产物电泳图



根据胶图判定为 A 型。

图3 患者样品 PCR 扩增产物电泳图



根据胶图判定为 B 型。

### 3 讨论

血清学方法鉴定 ABO 血型是通过检测血型抗原和抗体来确定，抗原、抗体在不同亚型或某些疾病会产生强弱变化，影响血型的判断；ABO 亚型的鉴定是根据红细胞（血型抗原）与标准血清凝集强度、唾液血型物质的检测来判断。红细胞凝集强度的判断因实验室条件不同和判断标准的掌握不一致会漏检或误判<sup>[3]</sup>。近几年来，ABO 基因分型技术克服了血型血清学方法的限制，已是一种比较独立简便的分型方法，为临床解决了一些疑难血型鉴定问题，得到广泛应用。ABO 亚型、血型抗原减弱反应、抗体消失、获得性 B 的鉴定、Cis-AB、类孟买型、血型嵌合体等正反定型不符的样本，使用 DNA 分型技术，迎刃而解，在一些情况下可以不必做繁杂的一系列血清学试验<sup>[4]</sup>。

这 32 例患者基本上都是因送检的血样量较少（因患者自身血红蛋白量较低），进行吸收、放散实验较为困难。故我们采用 PCR-SSP ABO 血型分型技术进行检测。根据 32 例患者基因分型结果，我站分别向患者提供了同型血的血液制品，均获得较为满意的治疗效果。并得到了临床医院及医生的认可。因此笔者认为 ABO 基因分型试验通过 PCR 特异性扩增相应基因片段，与血清学方法相比较该方法用量较少、时间较短、易操作等特点，所以在 ABO 疑难血型鉴定时可考虑采用该方法解决。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中国输血技术操作规程. 天津科学技术出版社, 1997, 60
- [2] 基因命名见 Yip SP: Sequence variation at the human ABO locus. *Ann.Hum.Genet.* (2002), 66: 1-27
- [3] 郭如华. PCR-SSP 方法用于 ABO 疑难血型鉴定. *中国输血杂志*, 2003 年, 第 16 卷, 第 3 期, 188
- [4] 喻琼. ABO 血型基因研究进展. *中国输血杂志*, 2006 年, 第 19 卷, 第一期, 78

3-18

## 倡导自主创新 坚持科学管理

李 荔 张 亮 刘彦华 刘 湘 兰更欣

博奥生物有限公司 HLA 分型检测实验室 (102206)

**摘要:** **目的** 中华骨髓库自从 2001 年重新启动以来已成为亚洲最有价值的骨髓库, 为拯救患者的生命发挥了积极的作用。但分型成本高和样品量大成为影响骨髓库快速发展的两大难题。需要找到一种低成本高通量检测手段解决骨髓库所面临的问题。**方法** 博奥生物公司独创性建立了基于 SSOP 原理的正向杂交 HLA 基因分型芯片技术体系, 使 HLA 分型检测真正实现了低成本高通量检测。**结果** 截至到 2007 年底共完成 4 万多份中华骨髓库样品检测, 质控合格率达到 100%。这一成绩的取得, 是该独创性的平台技术与相配套的管理系统的完美结合。2005 年 12 月, 博奥生物 HLA 分型检测实验室顺利通过了国家 CNAL/AC01: 2003《检测和校准实验室认可准则》认可。**结论** 技术创新是根本, 科学管理是保证, 这是博奥公司 HLA 分型检测实验室不断开拓发展的依靠, 也是今后继续努力的方向。

**关键词:** 技术创新; 科学管理

**Abstract: Objective** Chinese Marrow Donor Program (CMDP) has become the most valuable marrow donor program in Asia since its re-startup in 2001 and CMDP has played a significantly positive role in marrow transplant. However, the two major problems that CMDP encountered is high cost and low-throughput when detecting the human leukocyte antigen (HLA) genotyping in a large amount of samples. Thus, CMDP is very eager to apply for a cost-effective and a high-throughput HLA-genotyping strategy. **Methods** CapitalBio Corporation (Beijing, China) has developed a cost-effective and high-throughput method to detect the HLA genotyping based on sequence specific oligonucleotide probes (SSOP) microarray. **Results** Up to the end of 2007 year, about forty thousand samples from CMDP have successfully been detected using CapitalBio Corporation SSOP microarray. Each batch of the quality-control samples from the SSOP microarray get a hundred percent consistency with the results from CMDP's quality control laboratory. The advantage of the CapitalBio's HLA genotyping technology can be contributed to the integration of the original technical innovation and scientific management system. In December 2005, HLA typing laboratory of CapitalBio Corporation has been assessed and proved to be in compliance with CNAL/AC01: 2003 *Accreditation Criteria for Testing and Calibration Laboratories*. **Conclusion** It is well known that technical innovation is fundament and scientific management is guarantee. This is successful fundation and the persistent aim of HLA typing detection laboratories in CapitalBio Corporation.

**Key words:** technical innovation scientific management

“中华骨髓库”的前身是 1992 年经卫生部批准建立的“中国非血缘关系骨髓移植供者资料检索库”。2001 年，在政府有关部门的支持下，中国红十字会重新启动了建设资料库的工作。中华骨髓库是亚洲拥有最多 HLA 单倍体的骨髓库，也是亚洲最有价值的骨髓库，为拯救患者的生命发挥了积极的作用。在 2003 年，以生物芯片为核心技术的博奥公司开始组建 HLA 分型检测实验室。2006 年 8 月，中华骨髓库正式决定将博奥生物“HLA 基因芯片分型检测服务体系”纳入中华骨髓库 HLA 检测试剂（技术）选用范围。目前博奥生物“HLA 基因芯片分型检测服务体系”已经连续两年参加中华骨髓库的分型工作，并且保持了 100%的准确率。这其中既包括了 HLA 基因芯片本身的技术优势，也得益于在实验室管理建设方面的不断进步。

### 一、积极倡导技术创新

博奥生物从创立伊始就致力于以生物芯片为平台、药物开发为主线的系统生物学的开拓性研究，力争形成一系列具有自主知识产权的关键技术和创新工艺。博奥生物“HLA 基因芯片分型检测服务体系”更是其中的代表。

中华骨髓库成立初期，国内 HLA 分型市场产品几乎为外国公司所垄断，不仅分型技术复杂，配套人力物力资源需求庞大，而且价格昂贵，特别是每年仅检测费用就需要几千万元，极大制约了中华骨髓库的发展。另一方面，骨髓库自 2001 年重新启动以来，短短 7 年的时间里招募捐献志愿者数量达到 70 万名，并保持每年 10 万人份的数量递增，与日剧增的样品量也是骨髓库面临的另一个问题。而生物芯片技术高通量低成本的特点，恰恰可以很好的解决骨髓库所面临的成本高和样品量大两方面难题。2003 年，博奥生物 HLA 分型检测实验室开始着手研究利用生物芯片技术进行 HLA 分型检测。与以往生物芯片技术多为反向杂交所不同的是，博奥公司独创性的在 HLA 基因芯片中使用了基于 SSOP 原理的正向杂交芯片技术，使 HLA 分型检测真正实现了高通量检测。博奥不仅在芯片技术上努力创新，而且在仪器软件等方面也实现了自主开发设计，为 HLA 分型检测研制了配套的仪器和软件，大大提高了实验效率和准确性。通过 3 年多的努力，在经历了分型结果质控标准从按位点计到按样品计、从 97%的符合率要求到 98%的符合率要求的过程中，博奥人攻克了一个个技术难关，终于开发出适用于大规模样品分型检测的 HLA 基因芯片分型检测服务系统。2004 年，博奥参加了 1000 多份样品的盲测实验，分型结果的符合率高于 99%；从 2006 年开始承担骨髓库分型检测工作，到 2007 年底共完成 4 万多份样品检测，质控合格率达到 100%。大量实验证明了该技术服务体系在高通量、高精度、高效率 and 低成本方面具有突出优势，其操作过程的质量控制及分型结果的准确率都达到或超过 HLA 分型领域国内及国际标准。博奥 HLA 基因芯片分型检测服务体系的成功，既填补了国内 HLA 分型检测技术的空白，打破了外国公司对分型市场的垄断局面，也降低了中华骨髓库的分型成本，节省了国家的财政支出。同时，该服务体系也是博奥将生物芯片这个新兴技术在检测领域的成功应用。博奥生物“系统化生物芯片和相关仪器设备的研制及应用”获得了 2007 年度国家技术发明奖二等奖，更证明了社会对包括 HLA 基因芯片分型检测服务体系在内的一系列生物芯片技术应用的认可。

### 二、坚持科学的管理制度

技术创新是博奥一直所追求的目标，从 HLA 基因芯片设计、仪器软件的开发以及国家技术发明二等奖的获得都可以反映出这一点；同时，博奥也深深的认识到，没有科学的实验室管理，技术



创新将无法得到保证。

### 1. 建立完善的实验室管理体系

没有规矩不能成方圆，实验室管理离不开规章制度，实施有效的质量管理是确保实验室管理水平和技术水平的重要手段。2005年12月，博奥生物 HLA 分型检测实验室依据 CNAL/AC01: 2003《检测和校准实验室认可准则》，顺利通过了实验室国家认可委员会（现中国合格评定委员会）的认可，成为中国第一家拥有认可证书的 HLA 分型检测实验室。这意味着博奥生物 HLA 分型检测实验室的质量管理进入规范化管理的轨道，为 HLA 分型检测质量打下了坚实的基础。根据实验室建立的质量管理体系的要求，实验室每年有计划地对工作人员进行技能及管理要求方面的培训、定期参加美国 UCLA 主办的 HLA 分型检测能力验证实验、加强重要仪器设备设施的监督与验证、加强重要试剂的质量控制及相关环境的监控，确保 HLA 分型检测工作顺畅进行，从而使实验室始终保持较高的检测能力，确保向客户提供满意的、符合法律法规的、满足认可标准和认可机构要求的检测服务。按照中国合格评定委员会的相关要求，实验室于 2006 年 12 月通过了认可委的第一次监督审核，对实验室的分型检测工作及管理给予了充分的肯定。

### 2. 制定完善的规章制度

博奥生物 HLA 分型检测实验室通过 5 年多的发展，经过大量的优化实验工作，已经对高通量的 HLA 分型检测芯片实验形成了一套成熟的操作流程，特别是贯彻 ISO/IEC 17025 标准后，实验室建立了一套完整的管理体系文件，包括质量手册、程序文件、作业指导书和记录文件等，从而使各项质量活动能够更好的协调和配合，使可能影响结果的各种因素和环节都处于受控状态，保证了检测结果的准确可靠。

### 3. 检测过程完全受控（见检测实验质量受控体系流程图）

#### 3.1 重视样本的接收

样本质量将直接影响样品最后分型结果的准确性和可靠性。为此，实验室设立了专门的样品接收岗位，由专门的人员对客户样品进行核查验收。核查内容包括：是否有样品清单、样品清单与实际样品的唯一性标识是否一致、样品数量、样品种类、运输条件、样品状况等。对问题样品要记录处理方式，并及时与客户进行沟通，要求重新寄送样品。

#### 3.2 加强对试剂和仪器的管理

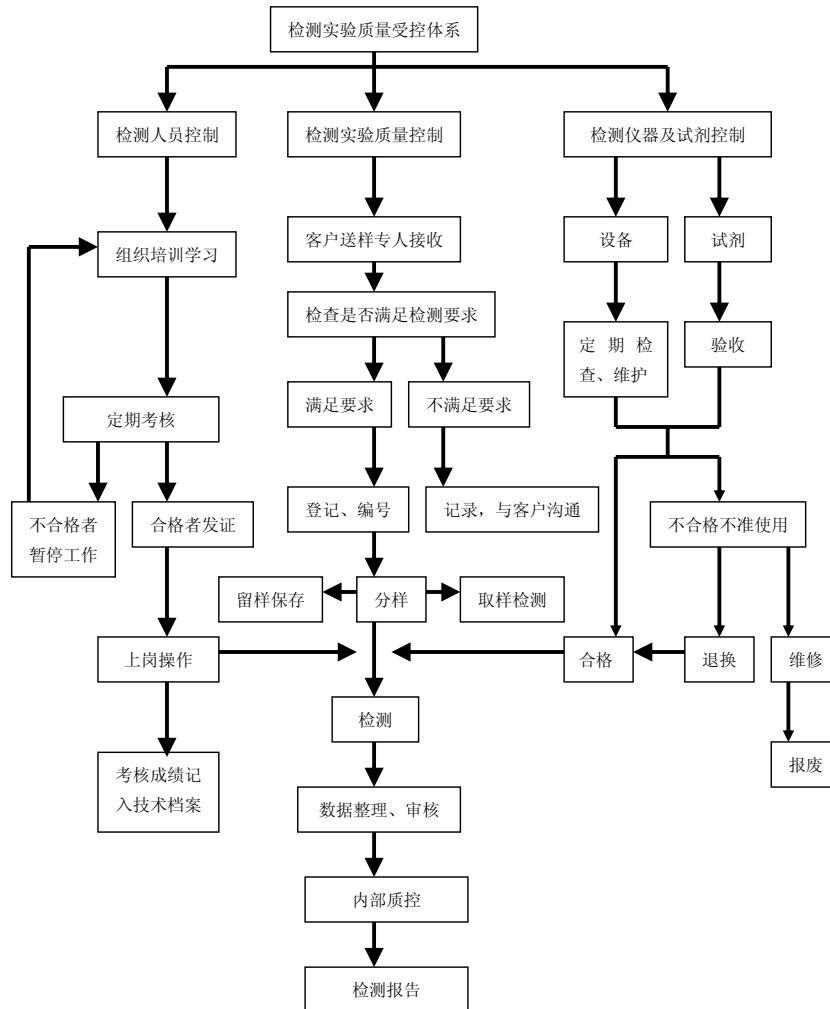
合格的试剂和仪器是保证检测质量的前提。实验室对试剂供应商的选择、评价和管理、试剂采购及出入库、保存条件、试剂的使用记录等方面进行严格的控制，例如定购的酶等试剂要求供应商提供质量合格证明，决不允许不合格试剂进入实验室，更不允许不合格试剂应用于检测工作。在检测仪器方面，也制定了设备管理的标准化文件，建立仪器设备档案，对仪器设备考察、购买、使用、校准、保养、维护等方面进行规范化的管理，并确保仪器设备的运行条件与 SOP 要求一致，例如冰箱温度，PCR 仪运行状态，扫描仪信号参数等。对于检测不合格的仪器要立即停止使用，及时维修或报废。

#### 3.3 建立严格的实验标准操作规程

实验室对所有的检测流程和仪器设备使用编写标准操作规程。内容包括样本接收与保存的要求、实验检测各流程的操作步骤、试剂和仪器的要求、仪器校准方法、室内卫生消毒安全管理制度

等。实验操作过程要严格执行标准操作规程，使操作过程标准化、程序化，减少操作误差，保障了实验的稳定性。

检测实验质量受控体系流程图



### 3.4 做好实验室内质控

通过室内质控可及时发现试剂质量差、仪器不稳定、人员操作失误等各种问题，并及时采取纠正措施，从而保证检测结果的准确性。例如合成的引物进入实验室后要要进行实验室内部验证，PCR仪定期维护，扫描仪定期校准，在检测样品中加入质控品质控实验中的操作失误，抽取检测样品的3%进行重新验证等，确保了分型结果的可靠。

### 3.5 仔细审核检测结果

为了确保结果的准确可靠，对样品的检测结果进行反复核对，必要时还进行双人核对。如发现漏检、错检、样品资料不符合等情况，及时查对给予纠正。对有疑问或较异常的结果要经过复查后方可确定结果。

## 4. 积极参加实验室间比对活动

参加实验室之间比对和能力验证活动，是对实验室检测结果准确性进行考核的重要依据。优秀

的室间比对成绩,既是对实验室检测水平和检测能力的认可,也是对实验室检测结果准确性的保证。博奥生物 HLA 分型检测实验室参加的 5 次 UCLA 举办的室间比对,分型结果准确率均达 100%。

### 5. 加强实验技术队伍的建设

人才培养是实验室管理工作的核心。博奥生物 HLA 基因芯片分型检测技术从研发之初,就集中了一批生物领域优秀的人才,之后每年都要从有关院校和人才市场引进优秀的毕业生和专业技术人才,使人才结构一直保持较合理的状态。实验室对每位上岗的人员进行严格的上岗资格认定,并定期考核,以确保实验操作的准确。实验室不定期举办各种管理培训和技术培训,以提高人员素质和技能。通过对实验室认可文件的学习,增强每个人的质量意识,使质量控制的每个细节在工作中得到彻底的贯彻落实。

博奥生物 HLA 分型检测实验室通过多年的发展,在力争形成一系列具有自主知识产权的关键技术和创新工艺的同时,也认识到管理可以创效益、创质量、创水平。技术创新是根本,科学管理是保证,这是 HLA 分型检测实验室以及博奥生物公司不断开拓发展的依靠,也是今后继续努力的方向。

3-19

## 新等位基因 HLA-B\*5413 的发现和确认

张德梅 冯国强 李 莉 万艳红 张 欣 李润霞

太原市红十字血液中心(030024)

**摘要:** **目的** 研究一例新的等位基因 HLA-B\*5413 的发现和确认。**方法** 应用 PCR-SSP 技术进行 HLA 分型检测;PCR-SSO 技术进行 HLA 分型复核;DNA 测序技术进行新等位基因的核苷酸序列测定,在 NCBI 和 EBI 基因数据库上进行基因序列比对分析验证,最后提交。**结果** 新等位基因与所有已知的 HLA-B 座位的等位基因的序列均不相同,与同源性最高的 HLA-B\*5401 相比,在第二外显子上有 6 个核苷酸差异:第 229 位置上 G→A,导致第 77 位丝氨酸→天冬酰胺(Ser→Asn),第 238 位置上 A→T,导致第 80 位天冬酰胺→异亮氨酸(Asn→Ile),第 240、241 位置上 C→G、T→C 导致第 81 位亮氨酸→丙氨酸(Leu→Ala),第 244 位置上 G→T,导致第 82 位精氨酸→亮氨酸(Arg→Leu),第 246 位置上 G-C 导致第 83 位甘氨酸→精氨酸(Gly→Arg)。**结论** 2007 年 4 月世界卫生组织 HLA 新基因命名委员会正式将这例新基因命名为 HLA—B\*5413。

**关键词:** 新等位基因; HLA-B\*5413; DNA 测序; Identification of a novel HLA allele B\*5413

**Abstract: Objective** To identify a novel HLA-B allele from a potential donor in Chinese Narrow Donor Program (CMDP) **Methods** DNA sequencing based typing was used to analysis the sequence of the new HLA-B allele, that sequence was inputted to NCBI and EBI. **Results** The HLA-B exon 2 nucleotide sequence of the novel allele was different from all other known alleles. It differs from B\*5401 by nucleotide substitution at position 229 where G→A (codon77 AGC→AAC), resulting in an amino

acid change from Ser→Asn; at nt 238 where A→T (codon80 AAC→ATC), resulting in an amino acid change from Asn →Ile; 240 and 241 where C→G, T→C (codon81 CTG→GCG), resulting in an amino acid change from Leu→Ala; 244 where G→T (codon82 CGC→CTC), resulting in an amino acid change from Arg→Leu; and 246 where G→C (codon83 GGC→CGC), resulting in an amino acid change from Gly→Arg. **Conclusion** This new allele was confirmed as a new HLA-B allele, It was officially designated as HLA-B\*5413 by WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System in Apr.2007.

**Key words:** New allele HLA-B\* 5413 DNA Sequencing based typing

人类白细胞抗原 (HLA) 是人类的主要组织相容性复合体的编码产物, 在器官移植、骨髓移植中有着十分重要的作用。HLA 是迄今所知的人类最复杂的遗传多态性系统, 目前已报道的 HLA-A、B、DRB1 座位的等位基因达到 2000 多个<sup>[1]</sup>, 新的等位基因还在不断被发现, 但是由中国人发现的 HLA 新等位基因不到现有基因总数的 1%<sup>[2]</sup>。现报告笔者在中国造血干细胞捐献者标本检测是发现的 1 例新的 HLA-B 等位基因。

## 材料与amp;方法

**1.1 标本来源:** 先证者为中国造血干细胞捐献者资料库志愿捐献者, 男性, 汉族, 河南南阳籍人。

**1.2 低分辨 PCR-SSP 分型检测:** PCR-SSP 为聚合酶链反应—序列特异性引物的方法(sequence specific primer, SSP)。基因组 DNA 提取应用美国 Pel-Freez 公司的 DNA 提取试剂盒, HLA 低分辨分型应用美国 Pel-Freez 公司 lot#003 HLA-A、B、DRB1 分型检测试剂盒, 按照说明书进行。

**1.3 低分辨 PCR-SSO 分型复合:** PCR-SSO 是序列特异的寡核苷酸探针的方法(sequence specific oligonucleotide probe, SSO)。基因组 DNA 提取应用美国 Tiangen 公司的 DNA 提取试剂盒, HLA 低分辨分型复合应用美国 Onelambda 公司 HLA-A、B、DRB1 R-SSO-Luminex 分型检测试剂, 按照说明书进行。

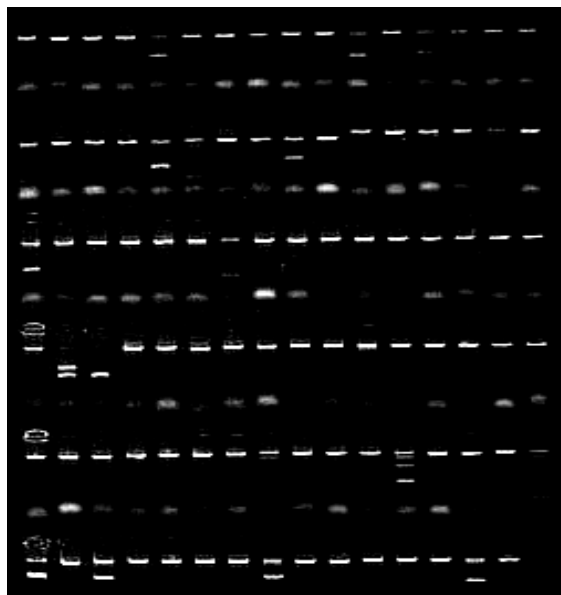
**1.4 DNA 序列分析** 采用经典的盐酸胍方法提取基因组 DNA,  $A_{260}/A_{280}$  测定值在 1.70-1.90 之间, 浓度为 56.3ng/ul, 使用 HLA class I 和 class II sequencing kits 试剂(HLA Genetic, Lot# B 57B06, PA, 美国), ABI PRISM 3100 DNA 序列分析仪进行序列分析。采用同时进行位点特异性扩增 (LSA) 和组别特异性扩增 (GSA) 的测序策略, 通过 LSA 使 B 座位的所有等位基因获得扩增; 组别特异性扩增采用 14 个组群的 PCR 反应, 使两个等位基因分离然后进行单链序列分析, 如 GSA 没有分离出两条单链, 则对 LSA 进行测序, 确保在所有情况下识别两个等位基因。14 个组群的特异性引物混合物、位点特异性引物和阴性对照包被在 16 个 PCR 反应板孔中进行, 引物混合物反应格局详见附表 1。

附表 1 引物混合物反应格局

反应孔序号	产物大小	扩增	未扩增	
1	S4B1	950	*07, *48, *8101	*4802
2	S4B2	1300	*08, *42	
3	S4B3	1000	*13	
4	S4B4	1800	*15, *45, *46, *49, *50, *4427	
5	S4B5	1200	*18, *37	
6	S4B6	1200	*27, *3542, *4002-Group, *47, *82	*270504
7	S4B7	1400	*35, *4802, *51, *52, *53, *5606, *58, *78	
8	S4B8	1100	*14, *38, *39, *6701	
9	S4B9	900	*4001-Group, *41	
10	S4B10	1300	*41	
11	S4B11	1300	*42	*4202
12	S4B12	950	*44, *8301	*4415, *4418
13	S4B13	1500	*54, *55, *56, *5901	*5606
14	S4B14	950	*57	
15	S4B15	2100	All HLA-B 等位基因	
16	S4B16	220	阴性对照	

## 结 果

**2.1 HLA 低分辨分型结果** 先证者 PCR-SSP 低分辨结果为: A\*24XX, 32XX, DRB1\*14XX, 17XX, B 位反应格局与标准反应格局不同, 一个等位基因可指定为 B\*44XX, 另一个与 B\*54 的反应格局比较类似, 但多一条阳性反应带。



注: 电泳道顺序由左至右、由上而下。电泳道 1-25 为 DR 位点分型结果: DRB1 14XX, 17XX; 电泳道 26-48 为 A 位点分型结果: 24XX, 32XX, 电泳道 49-95 为 B 位点分型结果: 44X, 由于多一条 81 道阳性带无法指定为 54XX, 96 为阴性对照。

**2.2 PCR-SSO 复合结果** 为确定该样本的结果, 使用 R-SSO-Luminex 技术再次进行 HLA 分型, 结果 A、DRB1 与 SSP 结果一致, B 位一个等位基因可指定为 44XX, 另一个无法确定。

**2.3 SBT 结果** GSA PCR 反应显示 12、13 孔为阳性,提示一个等位基因在 44 组,另一个在 54 组,根据附表 1 选用测序引物 S4B12, S4B13 进行 PCR 产物的 2, 3 外显子的正反向测序。结果表明:在 44 组的等位基因序列为已知序列 (B\*4401),在 54 组的等位基因与现有已知的 HLA-B 座位的等位基因的序列均不同,提示为尚未发现的人类 HLA 新等位基因。经在美国 NCBI 和欧洲 EBI 基因数据库上进行基因序列比对分析,显示该等位基因与同源性最高的 HLA-B\*5401 相比,在第二外显子上有 6 个核苷酸差异:第 229 位置上 G→A,导致第 77 位氨基酸 Ser→Asn;第 238 位置上 A→T,导致第 80 位氨基酸 Asn→Ile,第 240、241 位置上 C→G、T→C 导致第 81 位氨基酸 Leu→Ala,第 244 位置上 G→T 导致第 82 位氨基酸 Arg→Leu,第 246 位置上 G→C 导致第 83 位氨基酸 Gly→Arg。

## 结 论

先证者 HLA-B 座位存在新等位基因,2007 年 4 月 28 日已被世界卫生组织 HLA 命名委员会正式命名为 HLA-B\*5413。

## 讨 论

目前 HLA 的 DNA 分型技术常见为聚合酶链反应—序列特异性引物的方法 (sequence specific primer, SSP) 和序列特异性的寡核苷酸探针的方法 (sequence specific oligonucleotide probe, SSO)。<sup>[3]</sup>由于这两种方法均基于已知的 DNA 序列进行设计的,可鉴定任何已知的 HLA 等位基因。新的等位基因在常用的 PCR-SSP 和 PCR-SSO 方法中可能出现一些不确定的分型结果,难以定型,表现为依照试剂的标准格局可能出现多条带或少条带、探针的多余或缺少、Bw4 或 Bw6 关联不一致等,这些都强烈提示可能是新的等位基因,在实际工作中应引起重视,需要进一步加以研究。DNA 序列分析是目前鉴定 HLA 新的等位基因的主要手段,可以提供最可靠、最准确的信息。先证者的 HLA-B 位点的 PCR-SSP 反应格局与标准反应格局相比,出现多阳性条带的现象,无法指定结果,更换不同批号试剂重复实验,仍与原结果相同;PCR-SSO 分型中无论如何调整探针均只出现一个等位基因;采用 SBT 技术进一步测序确定为新的等位基因。

HLA-B 座位属于经典的 HLA-I 类基因,I 类基因编码 I 类抗原的  $\alpha$  链,第 2, 3, 4 外显子分别表达  $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  和  $\alpha_3$  区域,基因的多态性主要表现在第 2, 3 外显子,少数在第 4 外显子,主要源于碱基的突变和基因重组所致<sup>[4]</sup>。至今已经检出 12 个 B\*54 的等位基因,我们发现的是第 13 个 B\*54 的等位基因。HLA-B\*54 在中国汉族人群中的基因频率南方为 2.86%,北方为 3.15%<sup>[5]</sup>在山西资料库中为 3.25%<sup>[6]</sup>,在河南资料库中为 3.03%<sup>[7]</sup>,B\*5413 在本实验室 33160 份标本中未发现其他个体。

B\*5413 等位基因与 B\*5401 序列相比,第 3、4 外显子上完全相同,只在第 2 外显子上有 6 个核苷酸的差异,第 229 位置上 G→A;第 238 位置上 A→T;第 240、241 位置上 C→G、T→C;第 244 位置上 G→T;第 246 位置上 G→C,这些碱基的分布非常集中,推测最有可能是基因重组所致,有待进一步家系分析证实。B\*5413 等位基因所决定的氨基酸序列与 B\*5401 相比 5 处发生了改变,但由于未获得先证者的新鲜血样,未能做血清学特性检测。

(本项目受中国造血干细胞捐献者资料库资助,特此致谢!)

## 参考文献

- [1] Marsh SGE. Full List of HLA class I HLA and class II alleles as of July 2007. Available at <http://www.Anthonynolan.com/HIG/lists/>
- [2] 潘芹芹 缪扣荣 薛敏等 DNA 测序鉴定新等位基因 HLA-DRB1\*1609. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26 (1): 52-55
- [3] Powis SH, Vaughan RW. MHC protocols. Humana Press, 2003: 143-172
- [4] Gaur KL, Nepom, GT, et al. MHC-DRB allelic sequences incorporate distinct intragenic trans-specific segments. Tissue Antigens, 1977, 49 (4): 342
- [5] 吴国光 邓志辉 高素青等 6965 名汉族骨髓供者 HLA 多态性分析. 中华血液学杂志, 2004, 25 (8): 473-477
- [6] 张德梅 山西地区汉族人群人类白细胞基因多态性分析. 中国药物与临床, 2005, 5 (4): 292-293
- [7] 赵磊 张伯伟 马如 河南、甘肃及新疆造血干细胞捐献者 HLA 基因频率. 中国输血杂志, 2007, 20 (1): 26-29

## 3-20

## 四川分库汉族人群 HLA-DRB1\*14 等位基因分布

王 珏<sup>1,2</sup> 罗 玫<sup>1</sup> 陈雪黎<sup>1</sup> 黄 淑<sup>1</sup> 田素华<sup>1,2</sup> 邹 海<sup>2</sup> 郑忠伟<sup>1</sup> 陈静娴<sup>1</sup> 陈强<sup>1,2</sup>

1 中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所 (610081)

2 四川省脐带血造血干细胞库 (610036)

**摘要:** 目的 研究四川骨髓库中四川籍汉族人群 HLA-DRB1\*14 等位基因分布。方法 在四川骨髓库 8934 名四川汉族造血干细胞捐献志愿者中随机筛选 107 例中低分辨为 DRB1\*14 的样本, 以 PCR-SBT 分型技术检测 DRB1 位点的第二外显子以鉴定 HLA-DRB1\*14 等位基因。结果 共检出 6 种 DRB1\*14 等位基因, 包括 DRB1\*140101/1454(56.0%), DRB1\*1403(1.8%), DRB1\*1404(11.0%), DRB1\*140501(27.5%), DRB1\*140701(1.8%) 和 DRB1\*1425(1.8%); 其中最主要的 DRB1\*140101/1454 频率与美国亚太岛民接近, 而与高加索人、非洲裔美国人、西班牙裔及韩国人和中国北方汉族中的分布有显著性差异; DRB1\*140501 和 DRB1\*1404 则与中国北方汉族分布类似; 本研究未检到的等位基因在四川汉族 DRB1\*14 阳性个体中的频率低于 3%。结论 四川汉族人群 HLA-DRB1\*14 等位基因呈现多样性并存在自身特点。

**关键词:** 骨髓库; HLA-DRB1\*14; 基因频率 PCR-SBT

## Drb1\*14 diversity in sichuan han population in china

J. Wang<sup>1, 2</sup>, M. Luo<sup>1</sup>, X. L. Chen<sup>1</sup>, S. Huang<sup>1</sup>, S. H. Tian<sup>1, 2</sup>,  
H. Zou<sup>2</sup>, Z.W. Zheng<sup>1</sup>, J. X. Chen<sup>1</sup>, Q. Chen<sup>\*1, 2</sup>

1 Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences, Chengdu, China

2 Sichuan Umbilical Cord Blood Bank, Chengdu, China

**Abstract: Object** To investigate the diversity of HLA- DRB1\*14 alleles family in Sichuan Han population **Methods** 107 DRB1\*14 positive individuals were randomly selected from 8934 Sichuan Han individuals (CMDP) based on their HLA-DRB1 low resolution results. DRB1\*14 alleles were identified by sequencing exon 2 using commercial kit or intron-specific primers. **Results** Only 6 of the known DRB1\*14 alleles were detected, including DRB1\*140101/1454 (56.0%), DRB1\*1403 (1.8%), DRB1\*1404 (11.0%), DRB1\*140501 (27.5%), DRB1\*140701 (1.8%) and DRB1\*1425 (1.8%) . DRB1\*1401/1454 was found at a high frequency in Sichuan Han populations as in Asians/Pacific Islander, the frequencies of DRB1\*1404 and DRB1\*140501 were similar to the Han population in Northern China. Approximately 93% of the known DRB1\*14 alleles were not observed and are probably found at frequencies of less than 3% in DRB1\*14 positive populations. **Conclusion** The diversity of HLA-DRB1\*14 alleles in Sichuan Han population was unique.

**Key words:** CMDP, HLA- DRB1\*14, Allele Frequency, PCR-SBT

HLA 基因位于人类第 6 号染色体短臂 6p21.3 区, 由一系列紧密连锁的基因座组成, 是至今所知的人类最复杂的遗传多态系统。截止 2008 年 1 月, 所发现的编码 HLA-I、II 类抗原的等位基因数分别达到 2047 和 944, 其中 HLA-DRB1 位点的等位基因 549 个, HLA-DRB1\*14 组的等位基因数 84 个<sup>[1]</sup>。在造血干细胞移植中, 供受者间 HLA 匹配情况是影响移植预后的关键因素之一。但是, 通过对 NMDP 1874 例非亲缘性骨髓移植进行回顾性分析发现, 在 HLA-A, -B, -DR 低分辨 6/6 相合的配型中只有 56%为 HLA-A, B, -C, DR 高分辨相合, 其余供受者对中至少有一个位点高分辨不匹配。而即使 HLA-A、B、C、DRB1 座位上有一个位点的高分辨错配都会显著降低非亲缘性 BMT 后患者的存活率, 多个位点的错配效果更差<sup>[2]</sup>。最近通过对 JMDP 5210 个供受者对的研究表明, HLA-DR1403-DQ0301 (供者) 和 HLA-DR1401- DQ0502 (受者) 的错配可导致严重的急性 GVHD, 属于禁忌错配<sup>[3]</sup>。本文以 PCR-SBT 技术研究四川骨髓库中汉族人群的 DRB1\*14 等位基因分布, 提供基础数据以预测待移植患者在四川骨髓库中查询时, 寻找到匹配等位基因的可能性及可能的错配情况。

### 1 材料与方法

**1.1 样本来源** 在中华骨髓库四川分库 (以下简称四川骨髓库) 2004 年 9 月至 2006 年 5 月入库的 8934 个样本中, 筛选出籍贯为四川, 民族为汉族、HLA 中低分辨结果含有 DRB1\*14 等位基



因的样本共计 1449 例, 其中 DRB1\*14 的纯合子 62 例。按最小样本量计算公式  $(1-f)^N \leq p$ , 为保证频率 (f) 高于 3% 的等位基因被检测到的可能性 (p) 不小于 95%, 得出抽样样本量 (N) 不小于 99 个。故在此 1449 例样本中以 Excel 随机选择 107 例无血缘关系的个体。

**1.2 主要试剂与仪器** Domino stone 试剂盒 (德国 Protrans), BigDye 测序试剂盒 (美国 ABI); 9700 PCR 仪 (美国 ABI), PTC240 PCR 仪 (美国 MJ), 3130/3730 测序仪 (美国 ABI);

### 1.3 实验方法

**1.3.1 DNA 提取** 取 -20℃ 保存的血样 300ul, 以 G&T DNA 抽提试剂盒提取 DNA, DNA 浓度为 30~150ng/ul, 260/280 OD 值为 1.7~2.0

**1.3.2 组特异性测序** 针对 HLA-DRB1 位点的第二外显子, 分别采用三种不同的测序方案进行组特异性测序, 包括 Domino stone 试剂盒和两套合成引物。Domino stone 试剂盒采用的引物对 S4R5 扩增特异性为: DRB1\*03, \*11, \*13, \*14<sup>[4]</sup>; 扩增条件为: 95℃ 2min; 96℃ 40s, 64℃ 1min, 72℃ 2min, 15 个循环; 96℃ 20s, 60℃ 1min, 72℃ 2min, 15 个循环; 96℃ 20s, 56℃ 1min, 72℃ 2min, 10 个循环后冷却至 4℃。PCR 产物以 2% 的琼脂糖电泳检测, 阳性产物经 ExoSAP-IT™ 酶法纯化, 用 BigDye V1.1 体系对外显子 2 进行正向测序反应。测序产物以 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶过滤纯化后, 取 2ul 加入 18~28ul 超纯水变性、稀释, 上测序仪 (ABI 3130) 进行毛细管电泳。等位基因的确认采用 Sequence Pilot 软件。

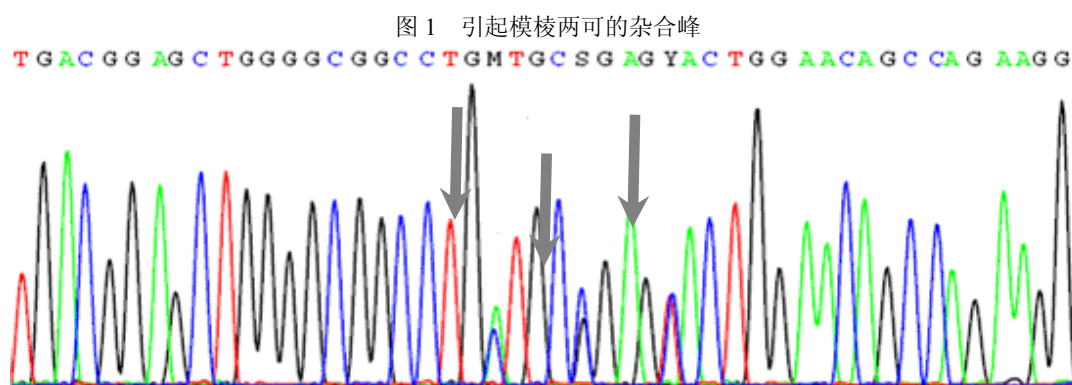
第二种测序方案中, 扩增引物 5DR\*2PCR6、3DR\*2PCR2, M13 测序引物由 Invitrogen 公司合成, 其扩增特异性包括: DRB1\*03, \*11, \*12, \*13, \*14, 扩增反应体系为 25ul, 其中含 10×PCR 缓冲液 2.5ul, 样本 DNA 80~300ng, LA Taq DNA 聚合酶 1U, dNTP、MgCl<sub>2</sub> 终浓度均为 2mmol/L, 引物终浓度为 mol/L。PCR 扩增条件为: 95℃ 预变性 5min; 95℃ 30s, 65℃ 50s, 10 个循环; 95℃ 30s, 62℃ 30s, 72℃ 2min, 20 个循环; 72℃ 延伸 10min 后冷却至 12℃。经 2% 琼脂糖电泳检测, 阳性反应孔中加入 Exon I 5~10U 和 SAP 2U, 经 37℃ 30min, 80℃ 15min 孵育纯化, 冷却至 12℃, 纯化 PCR 产物以 BigDye Sequencing kit 试剂盒 (V3.1) 进行测序反应。测序产物经乙醇/醋酸钠纯化, 以甲酰胺热变性后速冷, 再上测序仪 (ABI 3730) 进行毛细管电泳, 最后采用软件 Assign-SBT 3.5 进行等位基因确认。

同时根据文献<sup>[5]</sup>由 Invitrogen 公司合成扩增引物对 I1-RB11 和 I2-RB28 及测序引物 SEQ3 进行测序。

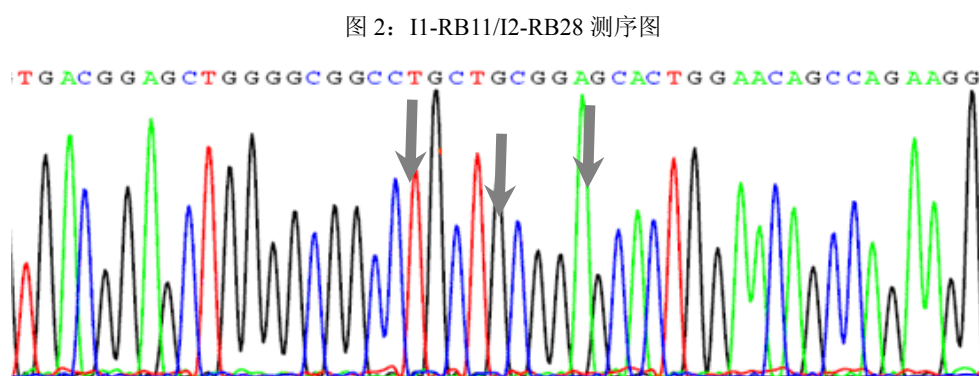
**1.4 统计分析** 等位基因频率以直接计数法计算, 与其他人群结果对比以 Excel 进行卡方检验。

## 2 结果

**2.1 测序结果** 以 Domino stone 试剂盒进行的 25 例测序中, 有 3 例分别因为 DRB1\*03, \*11 的杂合, 不能确认 DRB1\*14 结果; 以 5DR\*2PCR6/3DR\*2PCR2 进行的 84 例测序中, 有 15 例分别因为 DRB1\*03, \*11, \*12, \*13 引起的杂合峰不能确认 DRB1\*14 等位基因 (见图 1); 这些样本通过采用 I1-RB11/I2-RB28 引物对解决了因杂合引起的模棱两可 (见图 2)。此三种测序体系都针对 HLA-DRB1 位点的第二外显子, 无法区分第二外显子完全相同的等位基因 HLA-DRB1\*140101 和 HLA-DRB1\*1454 (以下由 HLA-DRB1\*140101/1454 表示)。



箭头所示为导致 DRB1\*030101+DRB1\*140101/1454 和 DRB1\*0310+DRB1\*142301 无法区分的杂合峰。



箭头所示为图 1 中导致模棱两可的位点，本图中可清楚的确定相应位点的碱基从而排除 DRB1\*142301。

**2.2 等位基因频率** 107 份样本中包括两例 DRB1\*14 的纯合子，共检出 109 个 HLA-DRB1\*14 等位基因。其中主要的等位基因是 DRB1\*140101/1454，其次为 DRB1\*140501，DRB1\*1404，这几种等位基因频率之和约占 DRB1\*14 阳性个体总数的 95%。此外 DRB1\*140301，DRB1\*140701，DRB1\*1425 在四川汉族人群中均检出两个。具体分布如表 1 所示。

表 1 HLA-DRB1\*14 等位基因分布

等位基因	等位基因数	基因频率
140101/1454	61	0.5596
140301	2	0.0183
1404	12	0.1101
140501	30	0.2752
140701	2	0.0183
1425	2	0.0183

**2.3 分布特征** 通过与美国四个人群<sup>[6]</sup>及韩国人群<sup>[7]</sup>、中国北方汉族人群<sup>[8]</sup>资料（见表 2）的对比可以发现，其中 DRB1\*140101/1454 的比例与美国亚太岛民最为接近，无显著性差异（见表 3）；与其它五个人群的比例均有显著性差异。DRB1\*140501 在四川汉族、中国北方汉族及韩国人群 DRB1\*14 阳性个体中比例均超过四分之一，但美国人群中除亚太岛民外都没有检出此等位基因。在四川汉族 DRB1\*14 个体中比例超过 10%的 DRB1\*1404，在西班牙裔中未检出。而西班牙裔中主要的 DRB1\*1402、1406 均未能在四川人群中检出。四川汉族中检出的 DRB1\*1425 是比较特殊的，目前仅在中国云南的纳西族中有此等位基因的频率报告<sup>[9]</sup>。从检出的等位基因种类来看，在四川汉

族人群中检出了 6 种等位基因, 与中国北方人群的资料相差较大 (在 618 名中国北方个体中检出的 86 个 DRB1\*14 组等位基因种共包括 17 种等位基因), 而与其他人群资料类似。

表 2 文献报道的其他一些人群中 DRB1\*14 等位基因分布\*

等位基因	高加索人 <i>n</i> =61, (%)	非洲裔美国人 <i>n</i> =61, (%)	亚太岛民 <i>n</i> =64, (%)	西班牙裔 <i>n</i> =64, (%)	韩国人 <i>n</i> =132, (%)	中国北方汉族 <sup>△</sup> <i>n</i> =86, (%)
DRB1*1401	55, (90)	57, (93)	35, (55)	15, (23)	47, (36)	27, (31)
DRB1*1402	1, (2)	1, (2)		28, (44)	1, (1)	2, (2)
DRB1*1403			2, (3)		13, (10)	6, (7)
DRB1*1404	3, (5)	2, (3)	12, (19)		1, (1)	8, (9)
DRB1*1405			8, (12)		51, (39)	22, (26)
DRB1*1406			4, (6)	19, (30)	13, (10)	
DRB1*1407	2, (3)		1, (2)	2, (3)	3, (2)	4, (5)
DRB1*1408			2, (2)			2, (3)
DRB1*1412					3, (2)	
DRB1*1442		1, (2)				

\* 空白表示该等位基因未检出

<sup>△</sup>文献报道中国北方汉族中检出的 DRB1\*14 等位基因还包括 DRB1\*1409/12/13/14/17/21/30/34/44/48 未在表中列出。

表 3 四川汉族人群中主要 HLA-DRB1\*14 等位基因频率与其他人群分布比较

等位基因	高加索人 $\chi^2, P$	非洲裔美国人 $\chi^2, P$	亚太岛民 $\chi^2, P$	西班牙裔 $\chi^2, P$	韩国人 $\chi^2, P$	中国北方汉族 <sup>△</sup> $\chi^2, P$
DRB1*1401	21.1, $P < 0.01$	25.9, $P < 0.01$	0.02, $P > 0.05$	17.3, $P < 0.01$	10.0, $P < 0.01$	11.7, $P < 0.01$
DRB1*1404	1.8, $P > 0.05$	3.1, $P > 0.05$	2.0, $P > 0.05$	7.6, $P < 0.01$	12.3, $P < 0.01$	0.15, $P > 0.05$
DRB1*1405	20.4, $P < 0.01$	20.4, $P < 0.01$	5.3, $0.01 < P < 0.05$	21.3, $P < 0.01$	3.3, $P > 0.05$	0.1, $P > 0.05$

### 3 讨论

和文献报道的多数人群资料类似, DRB1\*140101/1454 是四川汉族 DRB1\*14 阳性个体中最主要的等位基因; 此外, 同样在亚太岛民、韩国人、中国北方汉族中高比例检出的 DRB1\*140501 似乎是亚太地区人群的特征。美国人群中, 亚太岛民的 DRB1\*14 分布与四川汉族相对比较接近, 西班牙裔差别最为明显。在 107 个 DRB1\*14 阳性的四川汉族个体中检出的 109 个等位基因仅包括 6 种等位基因, 约占目前已知 DRB1\*14 组等位基因数的 7%, 其中三种主要的等位基因频率之和约占 DRB1\*14 阳性个体总数的 95%, 未检到的 70 多种等位基因在四川汉族 DRB1\*14 个体中的比例很可能都小于 3%; 这说明四川人群中的 DRB1\*14 组等位基因分布比较集中。这与北方汉族的情况差别较大, 可能是因为该文选取的北京人群流动性大, 融合的外来人口较多的缘故。四川骨髓库中汉族人群的 DRB1\*140301 的比例较低, 从而出现供者为 DR140301-DQ0301, 受者为 DR1401-DQ0502 禁忌配对的可能也相应较低。但由于禁忌错配预后差, 严重急性 GVHD 的发生率显著上升, 引起死亡率大幅提高<sup>[3]</sup>, 因此当供受者对 DRB1\*14 位点为阳性时, 同时进行 DR 和 DQ 位点的高分辨分型是必要的。

本文采用 PCR-SBT 分型技术是组特异性测序。目前常用的 HLA 直接测序分型技术主要是基于 ddNTP 终止法的通用测序和组特异性测序。通用测序是针对 HLA 某一座位设计引物, PCR 扩增时可得到该座位两条等位基因的扩增产物, 测序结果是两个等位基因的杂合图谱。与组特异性测序相

比, 通用测序操作较为简单, 但是由于同时扩增两个等位基因用于测序, 因而存在一些缺陷, 如: 某一等位基因优势扩增可导致另一等位基因漏检; 背景噪声较高时可能难以区分杂合峰和干扰峰; 可导致模棱两可的结果。模棱两可的测序结果是 HLA 测序中的一种特殊现象, 其原因在于 HLA 的高度多态性主要不是由点突变, 而是由许多模体的不同组合造成的<sup>[10]</sup>。两条等位基因测序结果叠加在一起时, 如果不能确认这些模体的组合方式, 即顺反连锁, 就会造成模棱两可的结果。组特异性测序是针对某一座位上一簇特定的等位基因设计一组引物进行扩增, 不同组的引物可扩增不同的等位基因组合, 只有相近的同源序列可同时扩增, 从而达到在测序前将多数等位基因分离, 得到单个等位基因测序结果的目的。组特异性测序的主要优点是可减少优势扩增的几率; 同时由于测序图多是单链的测序峰图, 不仅可使结果易于判断, 减少人为的影响, 而且可确定顺反连锁, 大大降低了模棱两可结果的可能<sup>[10]</sup>。但是, 若样本两个等位基因可被同一组引物扩增, 此时的组特异性测序结果就等同于通用测序结果。

本文中组特异性测序的引物均设计在第一、二内含子中, 其中 Domino stones 试剂盒中的 S4R5 组引物可同时扩增 DRB1\*03,\*11,\*13,\*14 组等位基因的第二外显子; 引物 DR\*2PCR6、3DR\*2PCR2 可同时扩增 DRB1\*03,\*11,\*12,\*13,\*14 组等位基因的第二外显子; 引物 I1-RB11 和 I2-RB28 仅扩增 DRB1\*14 的第二外显子。由于和低频等位基因 DRB1\*09,\*15,\*04 都不在同一组, 因此避免了可能出现的大量的模棱两可的结果<sup>[11]</sup>如: DRB1\*090102+DRB1\*140101/1454 和 DRB1\*0906 + DRB1\*140701/140702; DRB1\*140101/1454+DRB1\*150101 和 DRB1\*140102+DRB1\*150103 及 DRB1\*1435+DRB1\*1507; DRB1\*0405G1+DRB1\*140101/1454 和 DRB1\*0410+DRB1\*140701/140702 及 DRB1\*0417+DRB1\*1466 等。对于这两组引物中可同时扩增的 DRB1\*03,\*11,\*13 等位基因, 仍然有模棱两可的结果出现, 如: DRB1\*030101+DRB1\*140101/1454; DRB1\*0306+DRB1\*1435; DRB1\*0310+DRB1\*142301 几种等位基因组合的测序图完全相同。这些模棱两可的测序结果通过引物 I1-RB11 和 I2-RB28 扩增测序后均得到了明确的结果。

以前一般认为 HLA II 类等位基因的多态性多集中于第二外显子, 其他区域的多态性有限, 如 HLA-DRB1\*14 组中的多态性位点有 34 个, 其中 31 个集中于第二外显子中<sup>[1]</sup>。因此目前常规的分型工作中, HLA-DR 位点仅检测第二外显子。但是最近的研究表明, HLA II 类等位基因第三外显子的多态性超出了以前的预料, 现已发现其中的多个多态性位点<sup>[12]</sup>。如 HLA-DRB1\*14 组中新发现的 DRB1\*1454, 其第二外显子就和 DRB1\*140101 完全相同, 两者的区别仅在于 DRB1\*1454 第三外显子中的第 51 位核苷酸一个 T→C 的突变, 从而导致的第 112 位氨基酸从 Tyr 到 His 的改变, 如果仅检测第二外显子无法区分这两个等位基因; 本文中以 DRB1\*140101/1454 表示。有研究表明以前所报道的 DRB1\*140101 中其实很可能大部分是 DRB1\*1454<sup>[13]</sup>, 但尚未有大规模的人群资料报道, 国内也没有 DRB1\*1454 频率的报道。我们下一步将对第三外显子检测, 区分 DRB1\*140101/1454, 填补这方面的空白。

致谢: 感谢陕西省血液中心、浙江省血液中心对本实验的大力支持。

#### 参考文献

[1] IMGT/HLA Database [OL]. [2008-3-5] <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>

- [2] Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Cofer D, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome [J]. *Blood*, 2004, 104: 1923-1930.
- [3] Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism [J]. *Blood*, 2007, 110 (7): 2235-2241.
- [4] Protrans HLA SBT User Manual[M]. 2008 01 28
- [5] K.Kotsch, J.Webling, R.Blasczyk. Sequencing of HLA class II genes based on the conserved diversity of the non-coding regions: sequencing based typing of HLADRB genes [J]. *Tissue Antigens*, 1999, 53: 486-497.
- [6] C.P.Gans, T.F.Tang, R.Slack, et al. DRB1\*14 diversity and DRB3 associations in four major population groups in the United States [J]. *Tissue Antigens*, 2002, 59: 364-369.
- [7] Song EY, Park H, Roh EY, et al. HLA-DRB1 and -DRB3 Allele Frequencies and Haplotypic Associations in Koreans [J]. *Human Immunology*, 2004, 65: 270-276.
- [8] Yang G, Deng Y-J, Hu S-N, 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: 146-152.
- [9] <http://www.allelefreqencies.net/> [OL]. [2008-3-5]
- [10] R.Blasczyk. HLA Diagnostic Sequencing - Conception, Application and Automation, Diagnostische HLA-Sequenzierung - Konzept, Anwendung und Automatisierung [J]. *J Lab Med*, 2003, 27: 359-368.
- [11] Exon Identities And Ambiguous Typing Combinations[M]. Anthony Nolan Research Institute, April 2007
- [12] Horn PA, Albis-Camps M, Verboom M, et al. The nature of diversity of HLA-DRB1 exon 3 [J]. *Tissue Antigens*, 2007, 70: 335-337.
- [13] Albis-Camps M, Bunce M, Blasczyk R, et al. DRB1\*1454 is the most frequent DRB1\*14 allele [J]. *Human Immunology*, 2006, 67, (supplement1): s114.

## 3-21

## 四川分库汉族人群 HLA-B\*15 组的多态性研究

罗 玫<sup>1</sup> 陈雪黎<sup>1</sup> 王 珏<sup>1</sup> 邹 海<sup>2</sup> 徐晓红<sup>1,2</sup> 陈静娴<sup>1</sup> 陈 强<sup>1,2△</sup> 郑忠伟<sup>1</sup>

1 中国医学科学院输血研究所 (610081) 2 四川省脐血干细胞库 (610000)

**摘要:** 目的 采用聚合酶链反应-序列分析基础上的 HLA 分型 (polymerase chain reaction-sequence based typing, PCR-SBT) 方法, 研究中国造血干细胞捐献者资料库 (以下简称为中华骨髓库, CMDP) 四川分库中四川籍汉族人群 HLA-B\*15 组等位基因的分布特点。方法 从四川骨髓分库中汉族人群中/低分辨分型 HLA-B\*15 阳性样本中按不同血清学特异性分层抽取 107 例样本, 应用 PCR-SBT 技术进行测序分型, 获得四川籍汉族人群 B\*15 组高分辨分型结果。应用方根法计算 HLA-B\*15 各等位基因频率, 同时与其他人群资料进行比较。结果 共检测到 16 种已知 HLA-B\*15 等位基因和 1 例未知等位基因。本研究中检出的 16 种等位基因有: B\*15010101 (B62), B\*1502 (B75), B\*1503

(B72), B\*1505 (B62), B\*1507 (B62), B\*151101 (B75), B\*1512 (B76), B\*1513 (B77), B\*1517 (B63), B\*1518 (B71), B\*1525 (B62), B\*1527 (B62), B\*1529 (B15), B\*1532 (B62), B\*1546 (B72), B\*1558 (B62)。其中以 B\*1502 (36.2%) 最常见, 其次为 B\*15010101 (21.6%), B\*151101 (9.5%), B\*1518 (6.9%), B\*1525 (6.0%), 这五种等位基因占 B\*15 等位基因家族的 80%。在 B\*15 等位基因家族中, 表达 B75 抗原的等位基因 B\*1502 和 B\*151101 共占 45.7%, 但表达 B62 抗原的 B\*15 等位基因多态性最强, 共检出 7 种等位基因。此外, 本研究发现 1 例未知等位基因, 该等基因序列与目前所有已知的 B\*15 或 B\*46 等位基因序列均不相同, 在外显子 3 的 116 位处存在一个点突变 C->T。**结论** 研究表明在四川籍汉族人群中 HLA-B\*15 等位基因水平表现出丰富的多态性和特有的分布特征。

**关键词:** HLA; 等位基因; SBT; 高分辨分型; 基因多态性

## Allele-specific HLA-B\*15 typing by PCR-SBT and its application to Sichuan Han population

**Abstract: Objective** To investigate the allele distribution of HLA-B\*15 gene family in Sichuan Han population and to study its influence on the selection of clinical transplantation donor. **Methods** One hundred and seven B\*15-positive samples were selected from 8934 Sichuan Han individuals (CMDP) based on their HLA-B types determined by PCR-SSP or PCR-SSO using commercial typing kits. The PCR-SBT method was applied to determine HLA-B\*15 allele typing. Allele frequencies were assessed by square root method. Chi-square values of allele frequencies from different populations were calculated to test statistical significance. **Results** A total of 16 different HLA-B\*15 alleles and a novel or unknown HLA-B\*15 allele were identified. B\*1502 (36.2%) was the most frequent allele followed by B\*15010101 (21.6%), B\*151101 (9.5%), B\*1518 (6.9%), B\*1525 (6.0%) comprising more than 80% of B\*15-positive samples. In the B62 serologic group, seven alleles were identified, including B\*15010101, B\*1505, B\*1507, B\*1525, B\*1527, B\*1532, B\*1558. In the B75 serologic group, two alleles: B\*1502 and B\*151101 were identified in the study samples and B\*1502 was predominant. In addition, there is a novel or unknown HLA-B\*15 or B\*46 in our study. Its sequence differs from all known HLA-B\*15 or B\*46 allele sequences by a single 116 C->T substitution in exon 3. Further research is required to identify this unknown allele. **Conclusion** This study demonstrated the high diversity of the B\*15 in the Sichuan Han population.

**Key words:** HLA gene; HLA-B\*15 gene; high resolution typing; gene polymorphism

人类主要组织相容性系统又称人类白细胞抗原系统 (human leukocyte antigen, HLA) 是人类免疫系统的重要组成部分, 是迄今为止所知的人类最复杂的遗传多态系统。截止 2008 年 1 月, 被 WHO 正式命名的 HLA I 类等位基因数为 2047 个, HLA II 类等位基因数为 944 个。其中 B 位点的多态性最为复杂, 尤以 B\*15 组表现突出。据 IMGT/HLA 最新数据, HLA-B\*15 等位基因数已达

145 个<sup>[1]</sup>。HLA-B\*15 等位基因所编码的分子具有不同的血清学特异性, 包括 B62、B63、B70、B71、B72、B75、B76、B77、B15。HLA-B\*15 等位基因高度的多态性和同源性使 HLA-B\*15 的分型变得异常复杂和困难, 传统的血清学方法经常错判和漏判此组抗原<sup>[2]</sup>。近年来, 越来越多的研究表明非血缘造血干细胞移植供受者对 HLA-A、B、Cw 和 DRB1 等位基因水平匹配与更好的移植存活相关<sup>[3][4][5]</sup>。加之目前我国骨髓库 HLA 分型工作多采用 PCR-SSP 和 PCR-SSO 方法, 所用试剂多来自于欧美厂家, 引物和探针设计大都参照高加索人群高分辨分型资料, 应用在中国人群中常存在无法区分 B\*15 多种反应格局、B\*15 纯合子和中国人群所特有的新的 B\*15 等位基因等问题。因此, 探讨中国造血干细胞捐献人群 HLA-B\*15 等位基因的分布特征, 对了解非血缘造血干细胞移植供受者间 HLA-B\*15 等位基因水平可能的错配, 指导四川骨髓库容量建设, 为患者寻找最适供者, 改善移植存活具有重要意义。同时也可改进目前 HLA 中/低分辨率分型试剂, 提高分型准确率。

本文旨在采用直接测序分型技术对四川骨髓分库中四川籍汉族人群 HLA-B\*15 组进行高分辨分型研究, 获得四川籍汉族人群 HLA-B\*15 组等位基因水平的群体资料, 并与其他人群进行比较, 探讨该群体 HLA-B\*15 等位基因水平的分布特征, 为临床非血缘造血干细胞移植供者选择提供一定的基础数据。现报告如下:

## 1 材料及方法

**1.1 样本来源** 从四川骨髓分库中已分型的 8001-20000 号段标本中获得中/低分辨率分型 B\*15 阳性标本 2234 例, 计算 B15 组内各血清学特异性在四川分库 B\*15 中的构成比, 以此为参考, 按照不同的血清学特异性 (B62, 63, 70, 71, 72, 75, 76, 77) 的构成比从 2234 例样本中随机抽样 104 例进行 B\*15 测序分型。

因按照构成比进行抽样, 可能漏检血清学特异性构成比率低的等位基因, 故补充 B71, 72 样本各 2 例。此外, 由于在四川骨髓分库中血清学特异性为 B15 的数据均未录入, 故补充 1 例 B15 样本进行个例分析。两次抽样共获得 107 例标本, 见表 1。

表 1 HLA-B15 组各抗原构成比

血清学特异性	计数	构成比 (%)	抽样数
B62	991	42.53	43
B63	22	0.94	1
B71	123	5.28	5+2 <sup>a</sup>
B72	13	0.56	1+2 <sup>b</sup>
B75	1096	47.04	48
B76	72	3.09	3
B77	13	0.56	1
B15			1 <sup>c</sup>
总计	2330 <sup>*</sup>	100	107

注: B15 总计为 2234, 其中包括 B15 纯合子 B62, 75 69 例, B62, 71 6 例, B62, 63 1 例, B62, 72 2 例, B62, 76 4 例, B63, 75 1 例, B71, 75 8 例, B72, 75 1 例, B75, 76 4 例。<sup>a</sup>、<sup>b</sup>: 个例分析时各抽取 2 例样本。<sup>c</sup>: 由于在四川骨髓分库中血清学特异性为 B15 的数据均未录入, 故对血清学特异性为 B15 的样本进行个例分析。

**1.2 主要试剂** DNA 快速提取试剂盒由美国 G&T 公司提供; 测序分型试剂使用德国 Protrans 公司 HLA-B SBT Domino Stones 54204。

**1.3 主要仪器** 9700 型 PCR 扩增仪 (美国 PE 公司), MJ-120 型 PCR 扩增仪, MJ PTC-225 型 PCR 扩增仪, 电泳仪 (美国 PELFREEZ 公司), 3130 型全自动核酸测序仪 (美国 ABI 公司)。

**1.4 实验方法** 采用快速抽提法从外周血中提取基因组DNA,然后用PCR-SBT方法对HLA-B位点2、3外显子进行序列测定。对第一次测序得到模棱两可结果的样本进行了外显子4的测序。

**1.5 统计学处理** 采用方根法计算基因频率:基因频率(GF) =  $1 - (1 - C/N)^{1/2}$  公式中N为调查人数,C为携带某抗原的个体数。B\*15组各等位基因的频率(AF) =  $GF_{B*15} \times$  构成比。如果高分辨率分型结果只观察到1个HLA-B\*15等位基因,则认为该等位基因是纯合子,计数2次。采用 $\chi^2$ 检验法对不同人群间HLA-B\*15等位基因频率分布进行比较。

## 2 结果

**2.1 四川骨髓分库中汉族人群 HLA-B15 基因频率** 从四川骨髓分库四川籍汉族人群已分型的8934例供者中获得中/低分辨率结果为HLA-B\*15的样本2234例,B\*15的基因频率为0.1340。

**2.2 检出的 HLA-B\*15 等位基因及其频率** 本研究采用PCR-SBT方法对107例HLA-B\*15阳性样本进行测序分析,共检测到16种已知等位基因和1种未知或新的等位基因,各等位基因计数和等位基因频率见表2。16种已知等位基因分别为B\*15010101, B\*1502, B\*1503, B\*1505, B\*1507, B\*151101, B\*1512, B\*1513, B\*1517, B\*1518, B\*1525, B\*1527, B\*1529, B\*1532, B\*1546, B\*1558。

B62组共检测出7种等位基因,分别是B\*15010101, B\*1505, B\*1507, B\*1525, B\*1527, B\*1532, B\*1558,其中B\*15010101最常见(25/45),其次是B\*1525(7/45)和B\*1527(7/45)(见表3)。B75组共检测出2种等位基因,分别是B\*1502(41/52), B\*151101(11/52),其中以B\*1502为主,未检测到B\*1508(见表4)。B72组共检测到2种等位基因,分别是B\*1503(2/3), B\*1546(1/3)。B71组只检测到B\*1518(8/8),未检测到B\*1510。B63组只检测到B\*15170101(1/1)。B76组只检测到B\*1512(3/3),未检测到B\*1519。

HLA-B\*15等位基因频率排在前五位的是B\*1502(0.0485), B\*15010101(0.0289), B\*151101(0.013), B\*1518(0.0092), B\*1525(0.0080)。将等位基因型转换成相应的血清学特异性后,HLA-B\*15(B75)基因频率为0.0612,HLA-B\*15(B62)基因频率为0.0520,HLA-B\*15(B75)基因频率高于HLA-B\*15(B62)的基因频率。

两次抽样所得107例样本中共获取9例B\*15,-样本,测序分型结果见表5:6例B62,75高分辨分型结果分别为3例B\*15010101, B\*1502,1例B\*15010101, B\*151101,1例B\*1525, B\*1502,1例B\*1527, B\*1502。2例B62,71高分辨分型结果均为B\*1527, B\*1518。1例B75,-高分辨分型结果为B\*1502,-。

本研究中检出的1例未知等位基因,其中/低分辨分型结果为B46,62,在对该样本进行测序分析时发现外显子3的116位与目前所有已命名的B\*15或B\*46等位基因序列均不相同(见图1)。由于我们选用的Protrans HLA-SBT Domino Stones 54204试剂盒特异性包括B\*15和B\*46,在测序前未能将两个等位基因分离开,所以我们尚无法判断该突变位于哪一个等位基因上。



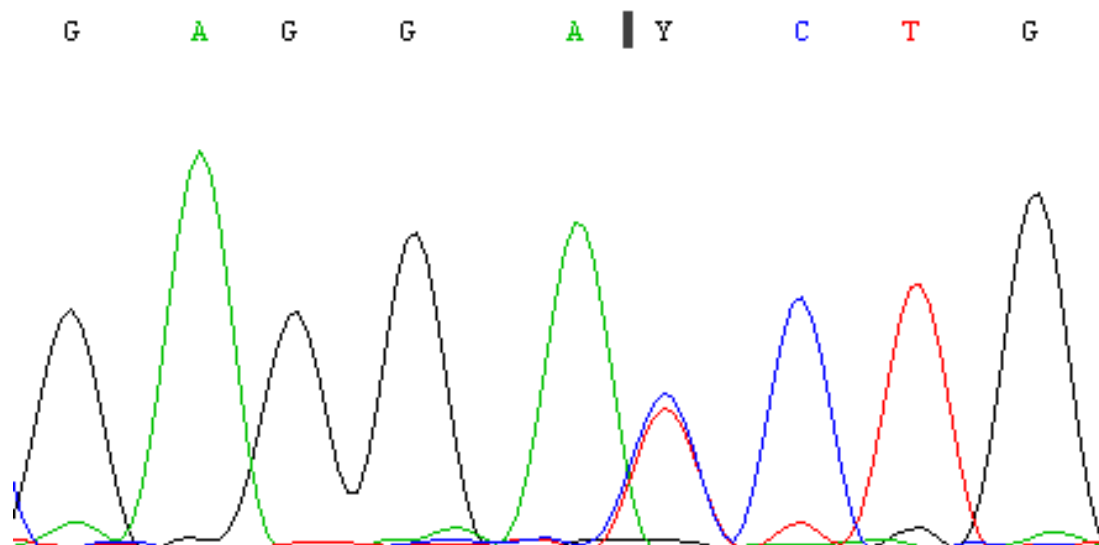


图1 未知等位基因外显子3的点突变C-&gt;T, 推测可能为新的等位基因

表2 HLA-B\*15 等位基因频率分布 (n=107)

等位基因	对应的血清学特异性	计数	构成比 (%)	等位基因频率
B*15010101	B62	25	21.55	0.0289
B*1502	B75	42	36.21	0.0485
B*1503	B72	2	1.72	0.0023
B*1505	B62	2	1.72	0.0023
B*1507	B62	2	1.72	0.0023
B*151101	B75	11	9.48	0.013
B*1512	B76	3	2.59	0.0035
B*1513	B77	1	0.86	0.0012
B*1517	B63	1	0.86	0.0012
B*1518	B71	8	6.89	0.0092
B*1525	B62	7	6.03	0.0080
B*1527	B62	7	6.03	0.0080
B*1529	B15	1	0.86	0.0012
B*1532	B62	1	0.86	0.0012
B*1546	B72	1	0.86	0.0012
B*1558	B62	1	0.86	0.0012
B*15XX	?	1	0.86	0.0012
合计		116*	100	

注: 计数总和为 116, 包括 9 例 HLA-B\*15 纯合, 分别为 B\*15 (B62), B\*15 (B75) 6 例; B\*15 (B75), - 1 例; B\*15 (B62), B\*15 (B71) 2 例。

表3 表达 B62 抗原的 B\*15 等位基因构成比

表达 B62 抗原的 B*15 等位基因	计数	构成比 (%)
B*15010101	25	54.35
B*1505	2	4.35
B*1507	2	4.35
B*1525	7	15.22
B*1527	7	15.22

表达 B62 抗原的 B*15 等位基因	计数	构成比 (%)
B*1532	1	2.17
B*1558	1	2.17
B*15XX	1	2.17
总计	46	100

表 4 表达 B75 抗原的 B\*15 等位基因构成比

表达 B75 抗原的 B*15 等位基因	计数	构成比 (%)
B*1502	41	78.85
B*151101	11	21.15
总计	52	100

表 5 9 例 B\*15 纯合子高分辨分型结果

中/低分辨分型结果	样本数	测序分型结果	样本数
B62, 75	6	B*15010101, B*1502	3
		B*1525, B*1502	1
		B*1527, B*1502	1
		B*15010101, B*151101	1
B62, 71	2	B*1527, B*1518	2
B75, -	1	B*1502, -	1

**2.4 四川分库中汉族人群 HLA-B\*15 等位基因频率与其他人群资料比较** 如表 6 所示, 在四川籍汉族人群 HLA-B\*15 组等位基因中最常见的 B\*1502、B\*151101, 在高加索人群中均未检测到。四川籍汉族人群中前三位最常见的 B\*15 等位基因为 B\*1502、B\*15010101、B\*151101, 而韩国人群前三位最常见的 B\*15 等位基因分别为 B\*15010101、B\*151101、B\*1518。与北京地区人群比较, 四川籍汉族人群 HLA-B\*15010101, HLA-B\*1502 等位基因频率差异均有统计学意义 ( $\chi^2=11.38$ ,  $df=1$ ,  $P<0.01$ ;  $\chi^2=25.29$ ,  $df=1$ ,  $P<0.01$ ); 与广东汉族人群比较, HLA-B\*15010101 等位基因频率差异无统计学意义 ( $\chi^2=3.40$ ,  $df=1$ ,  $P>0.01$ ), 但 HLA-B\*1502 等位基因频率差异有统计学意义 ( $\chi^2=19.87$ ,  $df=1$ ,  $P<0.01$ ); 与韩国人群比较, 四川籍汉族人群 HLA-B\*15010101, HLA-B\*1502 等位基因频率差异均有统计学意义 ( $\chi^2=58.98$ ,  $df=1$ ,  $P<0.01$ ;  $\chi^2=60.99$ ,  $df=1$ ,  $P<0.01$ )

表 6 不同人群 HLA-B\*15 等位基因频率比较

等位基因	对应血清学特异性	四川汉族人 ( $n=107$ )	北京地区人群 ( $n=618$ ) <sup>[6]</sup>	广东汉族人群 ( $n=562$ ) <sup>[7]</sup>	高加索人群 ( $n=265$ ) <sup>[8]</sup>	韩国人群 ( $n=485$ ) <sup>[9]</sup>
B*15010101	B62	0.0289	0.0704	0.023	0.0604	0.1052
B*1502	B75	0.0485	0.0243	0.115		0.0021
B*1503	B72	0.0023	0.0008			
B*1505	B62	0.0023	0.0008			
B*1507	B62	0.0023	0.0032		0.0019	0.0062
B*1510	B71		0.0008		0.0057	
B*151101	B75	0.013	0.0169	0.002		0.0196

等位基因	对应血清学特异性	四川汉族人 (n=107)	北京地区人群 (n=618) [6]	广东汉族人群 (n=562) [7]	高加索人群 (n=265) [8]	韩国人群 (n=485) [9]
B*1512	B76	0.0035	0.0008	0.003		
B*1513	B77	0.0012	0.0008			
B*15170101	B63	0.0012	0.0024		0.0075	
B*1518	B71	0.0092	0.0113	0.004	0.0038	0.0093
B*1519	B76			0.001		
B*1521	B75		0.0016	0.001		
B*1525	B62	0.0080	0.0032	0.014		
B*1527	B62	0.0080	0.0024	0.006		0.0021
B*1529	B15	0.0012	0.0008			
B*1532	B62	0.0012	0.0008			
B*1538	-					0.001
B*1546	B72	0.0012	0.0016			
B*1558	B62	0.0012	0.0016			

### 3 讨论

1991年, Kaneoka 等<sup>[10]</sup>第一次利用等位基因特异性扩增技术发展了 HLA II 类等位基因的 PCR-SBT 技术。随着通用引物的应用和测序反应自动化程度的提高, 以及人类基因组计划的实施, 使得 DNA 测序方法有了很大的改进和提高, 逐渐用于临床和实验室 HLA 高分辨分型。本研究中采用组特异性测序分型方法, 选用的是德国 Protrans HLA-SBT Domino Stones 商品化试剂盒。其优点在于首先对样本进行组特异性扩增, 将两个等位基因进行分离, 然后再对分离后的单个等位基因进行测序, 测序所得峰图为一个等位基因的单一序列, 不仅减少了人为和主观因素对结果判断的影响, 更为重要的是确定了顺/反式连锁, 这样大大减少了模棱两可的结果。在对 107 例中/低分辨分型 B\*15 阳性的样本进行测序分析时共获得 103 份结果。未获得结果的 4 例样本中, 3 例样本为模棱两可的结果, 1 例因其序列与所有已知 HLA 等位基因序列均不同, 推测可能为新的等位基因, 有待进一步研究确认。分析 3 例模棱两可结果的原因是无法区分 B\*1512/B\*1519。我们在对血清学特异性为 B76 的样本进行测序时发现, 软件分析所得结果为 HLA\*1512 或 HLA-B\*1519。分析这两个等位基因的序列发现它们外显子 2、3 的序列完全相同, 唯一一个不相同的核苷酸位于外显子 4 的 821 位。于是我们对该样本的外显子 4 进行测序, 结果均为 B\*1512。类似的还有 HLA-B\*15010101/15010102N/9502/9504 这四个等位基因, 它们外显子 2、3 的序列完全相同, 如要对它们进行区分, 必须扩大测序范围到外显子 1 和 4 才可。由于 HLA I 类基因多态性信息集中于 I 类的外显子 2、3, 故 HLA-B 常规测序只针对外显子 2、3 进行。然而, 一些 HLA I 类等位基因外显子 2、3 序列相同, 其他外显子存在一定程度的多态性。对于这种因多态性信息位于测序范围外而产生的模棱两可, 可以通过扩大测序范围加以解决。另一方面, 我们使用的试剂盒的设计主要是参考高加索人群 HLA 分布特点, 在测定序列之前, 能将大多数的高加索人群的两个等位基因分离, 但当应用于中国汉族人群时, 其特异性除 B\*15 外还有 B\*45, \*46, \*49, \*50。HLA-B\*1502 和 B\*4601 的基因频率在高加索人和亚洲人中存在很大差异。Cao K<sup>[8]</sup>对 265 名高加索人进行分型研究, 未检测到 B\*1502 和 B\*4601, 而对 358 名亚裔美国人进行分型研究时, 检测到的 B\*1502 和 B\*4601 的基因频率分别为 0.049 和 0.066。我们应用 Protrans 试剂盒进行中国人群 HLA-B\*15 测序

分型研究发现, 当 B 位点为 B\*1502 和 B\*4601 的组合或者 B\*1525 和 B\*4601 的组合时, 2 个等位基因同时被扩增, 在测序反应前未能分离, 所得序列为两个等位基因序列的组合序列, 在外显子 2 范围内 195 位以及 225 位出现杂合子峰影响结果的判读, 尤其是存在一定背景噪音或者测序峰存在漂移时, 不容易区分背景峰和测序峰。而且当测序所得序列存在突变时, 无法判断突变发生在哪一个等位基因上, 如本研究中发现的未知等位基因, 测序峰的位置和高度都很好, 但仍无法确定该突变是发生在 B\*15 上还是 B\*46 上, 必须通过设计等位基因特异性引物或者克隆将两个等位基因进行分离, 获得单个等位基因的序列。值得注意的是该例未知等位基因, 其 PCR-SSP 中/低分辨分型格局并无异常, 但测序分析却发现外显子 3 的 116 位存在突变。由此可见 PCR-SBT 方法可直接获得等位基因序列。该未知等位基因(新等位基因)有待进一步研究确定。

本研究共检测到 16 种已知 HLA-B\*15 等位基因, 其中等位基因频率大于 1% 的有 B\*1502, B\*15010101, B\*151101, 其等位基因频率分别为 0.0498, 0.0285 和 0.0130。广东汉族人群中检测到 9 种 HLA-B\*15 等位基因, 其中 HLA-B\*1502 等位基因频率为 0.1150, 其他 8 种 HLA-B\*15 等位基因频率合计只有 0.054。美国高加索人群中检测 5 种 HLA-B\*15 等位基因, 其中 HLA-B\*1501 基因频率为 0.0604, 占绝对优势, 其他 4 种等位基因分别为 HLA-B\*1507, B\*1510, B\*1517, B\*1518, 基因频率均小于 1%。将测序分型结果转换成对应的血清学特异性可以发现, 四川骨髓分库中四川籍汉族人群 B62 组表现出丰富的多态性, 共检测到 7 种等位基因, 即 B\*15010101, B\*1505, B\*1507, B\*1525, B\*1527, B\*1532, B\*1558, 而 B75 组只检测到 2 种等位基因, 即 B\*1502 和 B\*151101, 其中 B\*1502 占 79.25%。

在四川骨髓库中检测到的 B\*1513, B\*1529, B\*1532, 在广东汉族人、美国高加索人和韩国人中均未检测到。B\*1513 在新加坡印度尼西亚人中等位基因频率为 0.1330<sup>[11]</sup>, 在泰国人中也有检出<sup>[12]</sup>。B\*1529 只存在于亚洲人中, 曾在印度人和亚裔美国人中被检测到。B\*1532 在云南傣族和怒族的等位基因频率分别为 0.0580、0.0640, 是所见文献中最高的。在本研究中也检测到 B\*1532, 可能是因为四川地处中国西南部, 毗邻云南。本研究中未检测到 B\*1508, B\*1510, B\*1519, B\*1538。B\*1508 在印度泰米尔人中的基因频率为 0.0330<sup>[13]</sup>, 在墨西哥的西班牙印度混血儿中的基因频率为 0.024<sup>[14]</sup>, 在北京地区人群中的基因频率为 0.005<sup>[6]</sup>。B\*1510 首次发现于西班牙人, 在高加索人、非洲裔美国人、北美印第安人及巴西<sup>[15]</sup>等中也被检测到, 而在华人中除了北京报道的 1 例外未见其它报道。B\*1519 在华人中除广东汉族人群曾有 1 例报道外未见有其它报道<sup>[7]</sup>。B\*1538 首次发现于韩国人<sup>[16]</sup>, 在巴西人中被检测到。B\*151101 可以说是亚洲人特有的等位基因, 美国国内除了亚裔美国人以外的高加索人、西班牙裔美国人、非洲裔美国人、北美印第安人等均无此等位基因。B\*1546 是亚洲人特有的一个等位基因, 约旦安曼人该等位基因频率为 0.028<sup>[17]</sup>, 是所见文献中最高的。B\*1558 见于台湾客家人<sup>[18]</sup>, 北京地区华人也有 1 例报道。

本研究中 B63 组只检测了 1 例样本, 结果为 B\*15170101。早在 2001 年我实验室首次证实了中国人群中 HLA-B63 的存在, 否定了中国人群中不存在 HLA-B63 的认识。随后我们在对中国人群 HLA-B\*15 多态性的初步研究中也检测到 B\*1517 (编码 B63)。这从侧面反映出 HLA-B\*15 组在四川人群中的丰富多态性。

从中/低分辨分型 HLA-B\*15 阳性样本中随机抽取的 100 例样本和 5 例个例分析样本中, 共获

得 9 例 HLA-B\*15, -样本, 分别为 6 例 B62, 75, 1 例 B75, -, 2 例 B62, 71。经过测序分型得到高分辨分型结果发现, 9 例 HLA-B\*15, -样本中的 B75 其中 8 例都是 B\*1502, 1 例是 B\*151101。2 例 B62, 71 都是 B\*1527/B\*1518。该结果反映出高分辨率水平等位基因分布的规律性, 即纯合子主要为群体的常见型, 杂合子则表现为相应优势基因的组合, 这与李楨等<sup>[19]</sup>人在研究中国汉族人群 HLA-B\*40 组多态性时得出的结论一致。

截止目前为止, 我们在四川籍汉族人中已发现 1 个 B\*15 组新等位基因, 并已于 2006 年 2 月被 WHO HLA 命名委员会命名为 B\*9512。本研究中发现的 1 例未知等位基因, 尚不能确定该突变是存在于 B\*15XX 还是 B\*46XX 上, 需进一步研究确认。

总之 HLA-B\*15 组等位基因在不同种族人群中分布具有种族特异性, 种族间的分布又存在明显的差异。四川汉族人群中 HLA-B\*15 具有高度的多态性, 这提示在为骨髓库捐献者和患者 HLA 分型时, 特别是为 HLA-B\*15 阳性的患者寻找最适供者时, 都应参照以上相关数据, 对具体样本进行认真分析。

#### 参考文献

- [1] <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>
- [2] Lorentzen DF, Iwanaga KK, Meuer KJ, et al. A 25% error rate in serologic typing of HLA-B homozygotes[J]. *Tissue Antigens*, 1997, 50 (4): 359-65.
- [3] Hurley CK, Fernandez-Vina M, Hildebrand WH, et al. A high degree of HLA disparity arises from limited allelic diversity: analysis of 1775 unrelated bone marrow transplant donor-recipient pairs[J]. *Hum Immunol*, 2007, 68 (1): 30-40.
- [4] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation[J]. *Blood*, 2007, 110 (13): 4576-83.
- [5] Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism[J]. *Blood*, 2007, 110 (7): 2235-41.
- [6] 邓亚军, 杨光, 吴东颖等。北京地区人群 HLA-A、B、DRB1 的聚合酶链反应-直接测序分型研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2006, 23 (1): 103-106.
- [7] 李焱, 汤雪薇, 吴洁莹等。广东汉族人群 HLA-B 基因多态性研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2006, 23 (1): 50-54.
- [8] Cao K, Hollenbach J, Shi X, et al. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations[J]. *Hum Immunol*, 2001, 62 (9): 1009-30.
- [9] Lee KW, Oh DH, Lee C, et al. Allelic and haplotypic diversity of HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 genes in the Korean population[J]. *Tissue Antigens*, 2005, 65 (5): 437-47.
- [10] Kaneoka H, Lee DR, Hsu KC, et al. Solid-phase direct DNA sequencing of allele-specific polymerase chain reaction-amplified HLA-DR genes[J]. *Biotechniques*, 1991, 10 (1): 30, 32, 34.
- [11] Leffell MS, Fallin MD, Erlich HA, et al. HLA antigens, alleles and haplotypes among the Yup'ik Alaska natives: report of the ASHI Minority Workshops, Part II[J]. *Hum Immunol*, 2002, 63 (7): 614-25.

- [12] Chandanayingyong D. HLA-A, -B, -Cw, -DQB1 and -DRB1 allele in a population from Bangkok, Thailand[J]. Hum Immunol, 2004, 65 (9-10): 1181-1183.
- [13] Shankarkumar U, Sridharan B, Pitchappan RM. HLA diversity among Nadars, a primitive Dravidian caste of South India[J]. Tissue Antigens, 2003, 62 (6): 542-7.
- [14] Gorodezky C, Alaez C, Vazquez-Garcia MN, et al. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites[J]. Hum Immunol, 2001, 62 (9): 979-91.
- [15] Williams F, Nascimento E, Middleton D. HLA-A and -B alleles in a population from Belo Horizonte, Brazil[J]. Hum Immunol, 2004, 65 (9-10): 866-870.
- [16] Lee KW, Jeon H, Park JY. HLA-B\*15 diversity in the Korean population[J]. Tissue Antigens, 2000, 56 (5): 428-35.
- [17] Sanchez-Velasco P, Karadsheh NS, Garcia-Martin A, et al. Molecular analysis of HLA allelic frequencies and haplotypes in Jordanians and comparison with other related populations[J]. Hum Immunol, 2001, 62 (9): 901-9.
- [18] Chu CC, Lee HL, Trejaut J, et al. HLA-A, -B, -Cw and -DRB1 allele frequencies in a hakka population from Taiwan[J]. Hum Immunol, 2004, 65 (9-10): 1118-1123.
- [19] 李楨, 金士正, 程良红等. 中国汉族人群 HLA-B\*40 组的多态性研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13 (2): 215-218.

### 3-22

## 3 例带有 HLA-DR\*0114 新基因的家系调查

刘孟黎 齐君 张艳

陕西省血液中心 (710060)

**摘要:** 目的 调查 3 例带有 HLA-DR\*0114 新基因的家系遗传状况。方法 HLA 低分辨率型 采用 PCR-SSO 流式分型技术, DNA 测序采用等位基因特异性技术。结果 新基因 HLA-DR\*0114 序列与 DRB1\*010101 相比, 第 2 外显子区域有 3 个碱基发生突变, 造成 2 个氨基酸发生改变。257 位碱基 A>C, 导致 86 编码子的氨基酸由天冬氨酸 (Asp) 变成丙氨酸 (Ala)。265 位碱基 T>C, 89 编码子的氨基酸由酪氨酸 (Tyr) 变成组氨酸 (His)。3 个带有 HLA-DR\*0114 新基因家系都是陕西籍, HLA-DR\*0114 等位基因携带者都有单配型 A\*26-B\*37-DR\*0114。A\*26-B\*37-DR\*0114 单倍型在亲代中都由父亲携带, 并且都遗传给子代的所有成员。结论 A\*26-B\*37-DR\*0114 是紧密连锁的单倍型, 可以稳定遗传。它是否只出现在陕西籍或者说是否有一定的区域标志性的有待进一步研究的有价值的课题。

**关键词:** HLA-DRB1\*0114; 单倍型; DNA 测序; 家系调查

## Investigation and analysis of three pedigrees with a novel allele HLA-DRB1\*0114

Liu Mengli, Qi Jun, Zhang Yan Shannxi Blood Center Shannxi Xi'an 710061

**Abstract: Objective** To investigate the family genetic characteristics of three unrelated individuals which present the same novel allele HLA-DRB1\*0114. **Method** Low-resolution typing was carried out for the HLA-A/B/DRB1 genes using the commercially available microbeads sequence-specific oligonucleotide (SSO) assay based on Luminex platform from One Lambda™. The novel allele was defined by polymerase chain reaction sequence-based typing (PCR-SBT) method at high-resolution level. **Results** The sequencing results showed the variant allele was different from the closest matching allele DRB1\*010101 by three nucleotide substitutions at Exon 2, which resulted two amino acids changes. An "A" is substituted by a "C" in position 257, which results in Asp substituted by Ala (GAT→GCT) at codon 86; a "T" is instead of a "C" in position 265, which results in Tyr substituted by His (TAC→CAC) at codon 89. The three unrelated individuals' families are all from Shaanxi Province. Of them, each HLA-DRB1\*0114 allele taker has characterized as the haplotype of A\*26-B\*37-DRB1\*0114. In the three families, A\*26-B\*37-DRB1\*0114 is all from the father and passed down to all descendents. **Conclusion** HLA-A\*26-B\*37-DRB1\*0114 is a closely linked haplotype and capable of steadily inheritance. It is valuable to study further whether HLA-A\*26-B\*37-DRB1\*0114 shows indication of regional distribution and exists only in Shaanxi Province.

**Key words:** HLA-DRB1\*0114 Haplotype DNA sequence Family survey

人类白细胞抗原 (HLA) 作为人类的一个遗传标记, 具有多样性和种族特异性<sup>[1]</sup>。自 1958 年第一个 HLA 抗原被检测出来至今, 全世界已检测出的 HLA-A, B, DRB1 座位上的等位基因数有 2714 个<sup>[2]</sup>。随着中华骨髓库志愿捐献者日益增多, 不断有新的等位基因被发现<sup>[3,4,5]</sup>。HLA-DR\*0114 是在我们对陕西的志愿捐献者的常规 HLA 分型中发现的, 2006 年 3 月 22 日被世界卫生组织白细胞因子委员会命名 (ID 号: HWS10003587.DQ412558)<sup>[6]</sup>。随后在捐献者中相继又发现 2 例类似情况, 经 DNA 测序确认为 HLA-DR\*0114。这 3 例捐献者有 2 个共同的特点 ① 3 例都是陕西籍人 ② 低分辨结果都带有一个 A\*26 和 B\*37。我们认为 A\*26-B\*37-DR\*0114 可能紧密连锁的单倍型, 随即采集 3 人的家系进行分析, 现报告如下。

## 材料与amp;方法

1. 样本来源: 3 例带有 HLA-DR\*0114 基因的样本均来自中华骨髓库陕西分库的造血干细胞自愿捐献者, 均为陕西籍, 家系分别来源于 3 个家庭的一级亲属。

2. 血样采集和基因组 DNA 制备 经脉抽取受检者全血 5ml (EDT 抗凝), 使用商品 DNA 抽提试剂盒 (美国 Pel-Freez 公司) 提取基因组 DNA , 检测 DNA 浓度在 40~100ng/μl, AD260/280 比值为 1.5~1.8。

3. HLA 低分辨分型 PCR-SSO 流式分型技术采用美国 One Lambda 公司 Luminex 100IS™ PCR-SSO 技术: 96 孔板加入相应引物、D-MIX、Taq 酶、DNA 样本 1.5μL, 按照 96℃ 3min, 96℃ 15s, 60℃ 20s, 72℃ 20s, 5 个循环; 96℃ 10s, 60℃ 15s, 72℃ 20s, 30 个循环; 72℃ 10min 程序进行扩增; 另取 96 孔板, 每孔分别加入 2.5μL 扩增产物, 1.5μL 变性液及 2.5μL 中和液进行变性后加入磁珠及杂交液, 于 60℃ 孵育 15min; 重复洗涤 3 次, SAPE 标记后用 Luminex 100IS™ 读板并分析结果。

4. DNA 测序分析: 采用组特异性和等位基因特异性引物直接扩增, 然后进行 2 外显子 DNA 序列测定 (sequencing-based typing, SBT)。商品试剂盒及分析软件德国 Protrans 公司。序列经 GeneBank 比对后, 提交 WHO HLA 因子命名委员会申请认可及正式命名。

## 结 果

1. 先证者 Luminex 100IS™ PCR-SSO 技术低分辨结果为 HLA-A\*02XX, 26XX; B\*37XX, 46XX; DRB1\*13XX, DRB1\*01XX 不能确定, 有无法解释的探针修改提示。随后采用 PCR-SSP 低分辨试剂检测 DR 位点, 结果显示 DRB1\*13XX, DRB1\*01XX 有一条不能解释的阳性带。HLA-DRB1\*01 第 2 外显子测序结果显示, 序列与 DRB1\*010101 相比, 第 2 外显子区域的 257 位碱基 A>C, 导致 86 编码子 GAT>GCT, 编码的氨基酸由天冬氨酸 (Asp) 变成丙氨酸 (Ala)。261 位碱基 C>G, 导致 86 编码子 GCC>GCG, 氨基酸没有改变。265 位碱基 T>C, 89 编码子 TAC>GAC, 编码的氨基酸由酪氨酸 (Tyr) 变成组氨酸 (His)。

	84					90	
DRB1*010101	CGG	CCT	GAT	GCC	GAG	TAC	TGG
	—	—	Asp	—	—	Tyr	—
DRB1*0114	CGG	CCT	GCT	GCG	GAG	CAC	TGG
	—	—	Ala	—	—	His	—

图 1 先证者第 2 外显子碱基突变及氨基酸变化



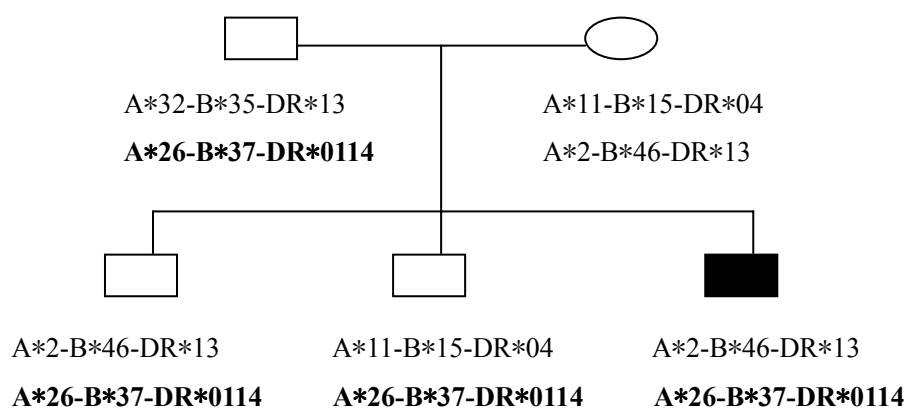


图2 先证者5位家庭成员的分型结果。图黑色为先证者

2. 另外两例 HLA-DR\*0114 携带者也是在对造血干细胞自愿捐献者采用 Luminex 100IS™ PCR-SSO 技术进行 HLA-A、B、DR 低分辨时发现的, 反应格局与先证者完全相同, PCR-SSP 低分辨复试 DR 位点也出现与先证者现同的情况。2 外显子 DNA 测序得到与先证者相同序列。家系调查结果如下 (图 3、图 4)

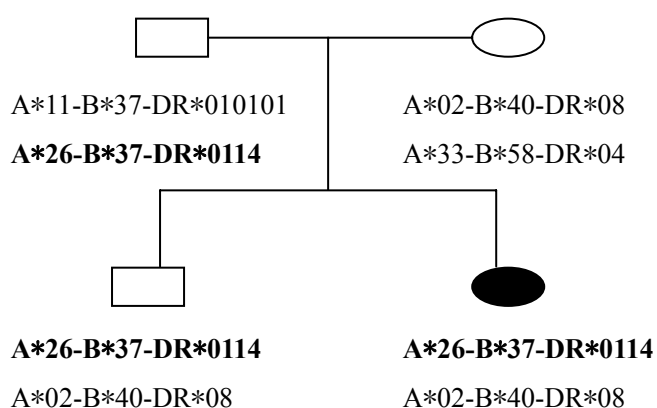


图3 第2例 DR\*0114 携带者及其它3位家庭成员的分型结果。黑色为第2例 DR\*0114 携带者

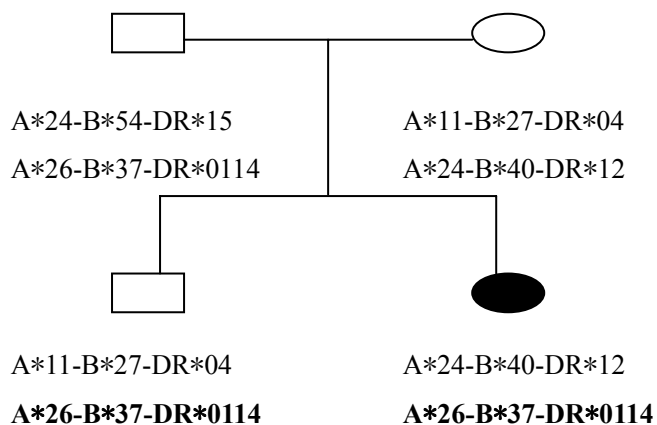


图4 第3例 DR\*0114 携带者及其3位家庭成员的分型结果。黑色为第2例 DR\*0114 携带者

3. 个家系 HLA 低分辨家系的结果显示, HLA-DR\*0114 等位基因携带者都有共同的单配型 A\*26-B\*37-DR\*0114。

## 讨 论

HLA 复合体是人体最复杂和最具多态性的遗传系统, 其多态性形成的机制主要是碱基突变、链间转换以及基因重组<sup>[7]</sup>。新等位基因 HLA-DR\*0114 是由碱基突变所致, 3 个家系调查结果没有重组情况发生。先证者 HLA-DR\*0114 序列与 DRB1\*010101 相比, 第 2 外显子区域有 3 个碱基发生突变, 造成 2 个氨基酸发生改变。257 位碱基 A>C, 导致 86 编码子的氨基酸由天冬氨酸 (Asp) 变成丙氨酸 (Ala)。265 位碱基 T>C, 89 编码子的氨基酸由酪氨酸 (Tyr) 变成组氨酸 (His)。另外两名志愿捐献者进行 HLA 低分辨发现 HLA-DR 位点与先证者的情况相同, DNA 测序得到完全相同的结果, 证实为 DR\*0114。我们在分析 3 例报告是发现他们都是陕西籍人, 低分辨结果都带有 A\*26 和 B\*37, 我们认为 A\*26-B\*37-DR\*0114 可能是紧密连锁的单倍型, 随即采集 3 个家庭的一级亲属的血样进行家系调查。对 3 例携带 DR\*0114 新基因家系的综合分析, 可以清晰的看到, 在 3 个家系中所有的 DR\*0114 携带者都以一条同样的单倍体 A\*26-B\*37-DR\*0114, 这说明 A\*26-B\*37-DR\*0114 有紧密连锁关系, 并能够稳定遗传。虽然不能得知 A\*26-B\*37-DR\*0114 起源于哪一代, 但可以肯定 3 个家系都为世代居住在陕西农村的农民, 没有流动史和来自其它省份的婚配史。我们知道等位基因是按单体型的形式遗传给下一代, 找出各民族单体型特征比单纯的等位基因频率更能反映出不同民族的区别<sup>[8]</sup>。A\*26-B\*37-DR\*0114 是否只出现在陕西籍或者说是否有一定的区域标志性是还有待进一步研究的有价值的课题。另外, 第 2 例 DR\*0114 携带者的父亲的另一条单倍体 A\*11-B\*37-DRB1\*0101, 是否可以推理 HLA-A\*11-B\*37-DRB1\*01 同样有连锁关系, 或者 HLA-B\*37-DRB1\*01 有更紧密连锁关系都是值得探讨的。

笔者所在的实验室共有 31410 名志愿捐献者 HLA-A、B、DR 分型资料, 其中陕西籍 18695 名。分别分析 A\*26、B\*37 和 DRB1\*01 在陕西分库中的比例都不高 (0.0342、0.0187、0.0405)<sup>[9]</sup>, 在其它报道中的比例也很低, 如四川 (0.0238、0.0122、0.0203)<sup>[10]</sup>、江西 (0.0266、0.0107、0.0091)<sup>[11]</sup>, 它们之间的单倍型连锁未见报道。一般来说新的等位基因在人群非常罕见<sup>[12]</sup>, 而 DRB1\*0114 在陕西籍中似乎并不罕见, 而且单倍型连锁很固定, 都以 A\*26-B\*37-DR\*011 的形式遗传。我们将在陕西籍人中做进一步的频率和单倍型调查, 相信会很有意义。

## 参考文献

- [1] 张工梁 赵桐茂 HLA 的人群分布 见谭建明 周永昌 唐孝达主编 组织配型技术与临床应用 北京: 人民卫生出版社 2002, 110-132
- [2] <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>
- [3] M-L Liu, S-H Ye, J Qi et al. Identification of an HLA-A\*02 allele variant (A\*0290) in a Chinese donor. *Tissue Antigens*, 2006, 67 (4): 338-339
- [4] M-L Liu, J Qi, S-H Ye et al. Identification of a novel HLA-B\*48 allele, B\*4814, in a Chinese marrow donor of Han descent. *Tissue Antigens*, 2006, 67 (4): 342-343

- [5] X Shan, G Gao, X He et al. Identification of a novel HLA-B allele, HLA-B \*4059, in Chinese bone marrow donors. *Tissue Antigens*, 2006, 67 (4): 339-340
- [6] Liu ML, Qi J, Zhang Y, Ye SH. Identification of a novel allele HLA-DRB1\*0114 in two Chinese marrow donors by sequence-based typing *Tissue Antigens*. 2007, 69 (6): 622-623
- [7] 孙玉英 溪永志 我国大陆人群 HLA 新等位基因发现的现状及应注意的问题 *中华医学杂志* 2006, 86(32) 2233-2235
- [8] 杨丛林 梁晓岚 邱录贵等 天津 3000 份脐带血 HLA 单体型多态性分析 *中国输血杂志* 2005, 18(2)111-114
- [9] 吴强驹 刘孟黎 齐珺等 11755 名中国北方汉族造血干细胞供者 HLA-A、B、DRB1 基因和单倍型研究 *中国实验血液学杂志* 2007, 15 (2) 357-363
- [10] 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 基因和单倍型研究 *中国输血杂志* 2005, 18 (5) 384-388
- [11] 程良红 吴国光 李兴茂等 2210 例江西籍汉族骨髓供者的 HLA-A、B、DRB1 等位基因和单倍型频率 *临床输血与检验* 2006, 8 (1) 5-11
- [12] 赵桐茂 骨髓库和脐血库中的 HLA 分型技术和策略 *中国输血杂志* 2001, 14 (6) 382-385

### 3-23

## 吉林省满族造血干细胞捐献者 HLA-A, B, DR 基因 和单倍型分析

于江虹 林乾飞

吉林省血液中心 (130033)

### Analysis of HLA-A, B, DR alleles and haplotypes in Man ethnic group PBSC donors in Jilin province

*Yu jianghong Lin qianfei (JiLin province Blood Center, 130033)*

**Abstract:** HLA class I and II antigen distribution of Man ethnic population from Jilin province is presented. A total of 334 samples of PBSC donors were tested. HLA antigens (A, B and DR) were identified using PCR-SSP or PCR-SSO assay. The phenotypic frequencies of A2 (36.19%), A11 (19.03%), B7 (4.44%), B62 (9.76%), B71 (3.66%), DR10 (1.97%), DR15 (17.4%), DR16 (1.81%) were found to be higher than Han ethnic group. The two-locus haplotype analysis revealed that frequencies of A11-B62, A2-B44, A24-B60, B13-DR13, B71-DR4, B48-DR15, B51-DR12, A11-DR13, A2-DR1, A33-DR7, A24-DR12, A24-DR13 were higher than Han ethnic population.

**Keywords:** HLA-A, B, DR allele frequency; HLA-A, B, DR two-locus haplotype frequency; Man

## ethnic group

满族分布在全国各地，吉林省是满族聚集地之一，吉林骨髓库中已经积累了很多满族造血干细胞捐献者的分型数据，分析这些数据将有助于帮助估算为需要移植的患者在骨髓库中找到 HLA 匹配供者，了解吉林地区满族人群的遗传特征。本文对吉林省满族造血干细胞捐献者作了 HLA-A、B、DR 低分辨基因分型和统计分析。

## 1 材料与方法

**1.1 样本** 来自吉林省分库的 334 名满族造血干细胞捐献志愿者。

**1.2 DNA 制备** 取 EDTA 抗凝血 0.5ml，用快速提取试剂盒提取 DNA，检测 DNA 浓度在 20~100ng/ $\mu$ l，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值为 1.5~1.9。

**1.3 分型试剂及分型方法：**同前（见第一、二部分）。

**1.4 统计分析** 抗原频率用直接计算法，基因频率采用方根法；

HLA 单倍型频率、连锁不平衡参数、相对连锁不平衡参数用 Excel 软件计算(方法见第一部分)。

## 2 结果

## 2.1 吉林省满族人群中 HLA 基因频率（见表 1、表 2）

检出 HLA-A、B、DRB1 座位基因（包括各基因的血清学特异性）分别为 14、33、13 种。HLA-A 位点基因频率较汉族高的为 A2（36.19%）、A11（19.03%）；HLA-B 位点基因频率较汉族高的为 B7（4.44%）、B62（9.76%）、B71（3.66%）；HLA-DRB1 位点基因频率较高汉族高的是 DR10（1.97%）、DR15（17.4%）、DR16（1.81%）。

表 1 汉族与满族 HLA-A 基因频率对比

基因型	特异型	表型频率 (F)		基因频率 (GF)	
		汉 族	满 族	汉 族	满 族
A*02	A2	0.5401	0.5928	<b>0.3219</b>	0.3619
A*24	A24	0.2996	0.2725	0.1631	0.1470
A*11	A11	0.2831	0.3443	0.1533	0.1903
A*30	A30	0.1554	0.1257	0.0810	0.0650
A*33	A33	0.1345	0.1078	0.0697	0.0554
A*03	A3	0.0946	0.1018	0.0485	0.0523
A*01	A1	0.0924	0.0928	0.0473	0.0475
A*31	A31	0.0830	0.0749	0.0424	0.0382
A*26	A26	0.0619	0.0389	0.0314	0.0197
A*32	A32	0.0302	0.0329	0.0152	0.0166
A*68	A68	0.0170	0.0180	0.0085	0.0090
A*29	A29	0.0163	0.0150	0.0082	0.0075
A*23	A23	0.0059	0.0030	0.0030	0.0015
A*66	A66	0.0023	0.0090	0.0011	0.0045
A*69	A69	0.0016	—	0.0008	
A*36	A36	0.0012	—	0.0006	
A*34	A34	0.0008	—	0.0004	
A*74	A74	0.0007	—	0.0003	
A*43	A43	0.0002	—	0.0001	
A*25	A25	0.0001	—	0.0000	
A*80	A80	0.0001	—	0.0000	
A 空白		0.1788	—	0.0938	
合 计		2.0000	2	1.0000	1.0000

注：F：抗原频率；CF：基因频率

表2 汉族与满族 HLA-B 基因频率对比

基因型	特异型	表型频率 (F)		基因频率 (GF)	
		汉 族	满 族	汉 族	满 族
B*07	B7	0.0736	0.0868	0.0375	0.0444
B*08	B8	0.0196	0.0180	0.0098	0.0090
B*13	B13	0.2491	0.2335	0.1335	0.1245
B*14	B64	0.0016	0.0000	0.0008	0.0000
B*14	B65	0.0064	0.0030	0.0032	0.0015
B*15	B62	0.1441	0.1856	0.0748	0.0976
B*15	B63	0.0046	0.0030	0.0023	0.0015
B*15	B70	0.0002	—	0.0001	
B*15	B71	0.0419	0.0719	0.0212	0.0366
B*15	B72	0.0031	0.0000	0.0015	0.0000
B*15	B75	0.0894	0.0868	0.0458	0.0444
B*15	B76	0.0013	0.0030	0.0006	0.0015
B*15	B77	0.0008	0.0030	0.0004	0.0015
B*18	B18	0.0110	0.0120	0.0055	0.0060
B*27	B27	0.0348	0.0269	0.0175	0.0136
B*35	B35	0.1045	0.0868	0.0537	0.0444
B*37	B37	0.0318	0.0419	0.0160	0.0212
B*38	B38	0.0382	0.0389	0.0193	0.0197
B*39	B39	0.0344	0.0210	0.0173	0.0105
B*40	B60	0.1165	0.1257	0.0601	0.0650
B*40	B61	0.1553	0.1707	0.0809	0.0893
B*41	B41	0.0040	—	0.0020	—
B*42	B42	0.0013	—	0.0006	—
B*44	B44	0.0960	0.0868	0.0492	0.0444
B*44	B45	0.0001	—	0.0000	—
B*45	B45	0.0019	—	0.0009	—
B*46	B46	0.1251	0.1347	0.0646	0.0698
B*47	B47	0.0007	—	0.0003	—
B*48	B48	0.0766	0.0778	0.0391	0.0397
B*49	B49	0.0040	0.0120	0.0020	0.0060
B*50	B50	0.0158	0.0240	0.0079	0.0120
B*51	B51	0.1363	0.1407	0.0706	0.0730
B*52	B52	0.0692	0.0599	0.0352	0.0304
B*53	B53	0.0009	0.0000	0.0004	—
B*54	B54				
B*55	B54	0.0641	0.0599	0.0326	0.0304
B*55	B55				
B*56	B55	0.0341	0.0150	0.0171	0.0075
B*56	B56	0.0046	0.0030	0.0023	0.0015
B*57	B57	0.0317	0.0210	0.0160	0.0105
B*58	B58	0.0832	0.0778	0.0425	0.0397
B*59	B59	0.0021	—	0.0010	—
B*67	B67	0.0229	0.0210	0.0115	0.0105
B*73	B73	0.0006	—	0.0003	—
B*81	B81	0.0038	0.0030	0.0019	0.0015
B 空白		0.0590		0.0299	
合 计		2.0000	2.0000	1.0000	1.0000

表3 汉族与满族 HLA-DR 基因频率对比

基因型	特异型	表型频率 (F)		基因频率 (GF)	
		汉 族	满 族	汉 族	满 族
DRB1*01	DR1	0.0552	0.0479	0.0280	0.0242
DRB1*17	DR3	0.0699	0.0629	0.0356	0.0319
DRB1*04	DR4	0.1987	0.1826	0.1049	0.0959
DRB1*07	DR7	0.2359	0.2305	0.1259	0.1228
DRB1*08	DR8	0.1101	0.1257	0.0566	0.0650
DRB1*09	DR9	0.2456	0.2515	0.1314	0.1348
DRB1*10	DR10	0.0313	0.0389	0.0158	0.0197
DRB1*11	DR11	0.1245	0.1198	0.0643	0.0618
DRB1*12	DR12	0.2339	0.2545	0.1247	0.1366
DRB1*13	DR13	0.1214	0.1287	0.0627	0.0666
DRB1*14	DR14	0.1264	0.1317	0.0653	0.0682
DRB1*15	DR15	0.3122	0.3174	0.1706	0.1738
DRB1*16	DR16	0.0298	0.0359	0.0150	0.0181
DRB1 空白		0.1051	0.0719	0.0540	
合 计		2.0000	2.0000	1.0000	1.0000

2.2 吉林省满族人群中两座位单倍型频率（见表 4、5、6）

从表 4 中可以看出排在前几位的单倍型如 A30 B13、A2 B46、A2 B61 等在满、汉人群中频率相近，A11 B62 、A2 B44、A24 B60、A11 B35 的频率在满族人群中明显高于汉族人群；表 5 显示 B13 DR13、B71 DR4 B48 DR15、B51DR12 的频率在满族人群中明显偏高；表 6 显示满族人群中 A11 DR13、A2 DR1、A33 DR7、A24 DR12、A24 DR13 频率高于汉族人群。

表 4 吉林骨髓库汉族满族造血干细胞捐献者 HLA-A-B 单倍型比较

单倍型	汉 族		满 族		Delta (x10 <sup>-4</sup> )
	HF (%)	Delta (x10 <sup>-4</sup> )	单倍型	HF (%)	
<b>A30 B13</b>	6.94	572.10	<b>A30 B13</b>	5.64	483.02
<b>A2 B46</b>	4.41	233.37	<b>A2 B46</b>	4.83	230.66
<b>A2 B61</b>	3.67	106.73	<b>A2 B62</b>	4.11	58.08
<b>A33 B58</b>	3.07	277.31	<b>A2 B61</b>	4.05	82.10
<b>A2 B13</b>	2.93	-136.90	<b>A11 B62</b>	4.01	215.07
<b>A2 B62</b>	2.66	24.65	<b>A24 B61</b>	2.74	142.65
<b>A2 B75</b>	2.50	103.10	<b>A11 B60</b>	2.71	147.62
<b>A24 B61</b>	2.16	84.34	<b>A2 B13</b>	2.53	-197.49
<b>A2 B51</b>	2.06	-21.20	<b>A2 B51</b>	2.42	-21.86
<b>A33 B44</b>	2.02	168.36	A2 B48	2.31	87.01
<b>A11 B60</b>	1.94	102.34	<b>A2 B75</b>	2.05	44.24
A24 B62	1.78	56.06	A11 B13	1.98	-39.31
<b>A11 B62</b>	1.77	62.09	<b>A33 B58</b>	1.89	166.77
<b>A2 B60</b>	1.76	-17.00	A24 B51	1.68	60.25
A2 B48	1.75	49.35	A2 B60	1.62	-73.17
A11 B13	1.64	-40.20	A2 B52	1.62	51.65
A24 B60	1.63	64.91	A11 B71	1.60	90.37

汉 族			满 族		
单倍型	HF (%)	Delta ( $\times 10^{-4}$ )	单倍型	HF (%)	Delta ( $\times 10^{-4}$ )
A24 B51	1.37	22.10	A3 B7	1.55	132.06
A24 B54	1.34	81.91	<b>A33 B44</b>	1.54	129.66
A11 B51	1.28	20.19	A2 B71	1.51	18.78
A24 B13	1.25	-92.80	A24 B54	1.45	99.87
A1 B37	1.22	114.84	A11 B75	1.43	58.11
A2 B35	1.20	-52.20	A11 B51	1.35	-3.64
A2 B71	1.18	49.65	A1 B37	1.33	122.84
A24 B48	1.16	52.54	A2 B35	1.31	-29.32
A11 B75	1.14	44.24	A24 B48	1.30	71.26
A1 B57	1.14	106.55	A11 B46	1.23	-9.82
A24 B35	1.09	21.82	A31 B51	1.19	91.57
A11 B61	1.08	-15.60	A2 B58	1.09	-34.62
			A2 B44	1.07	-54.04
			A24 B60	1.06	10.45
			A11 B35	1.04	19.61
A2 B38	1.06	43.65	A2 B38	1.02	30.88

表5 吉林骨髓库汉族满族造血干细胞捐献者 HLA-B-DR 单倍型比较

汉 族			满 族		
单倍型	频率 (%)	Delta ( $\times 10^{-4}$ )	单倍型	频率 (%)	Delta ( $\times 10^{-4}$ )
B13 DR 7	7.13	545.46	B13 DR7	6.26	473.11
B13 DR12	3.27	160.73	B13 DR13	5.28	445.09
B46 DR 9	3.18	232.70	B13 DR 12	4.64	294.29
B61 DR9	2.21	114.90	B46 DR 9	3.45	250.62
B44 DR13	2.03	172.39	B61 DR 9	3.21	200.09
B52 DR15	2.01	140.47	B62 DR15	3.15	145.62
B62 DR15	2.00	72.34	B7 DR 15	1.86	109.15
B62 DR4	1.87	108.04	B71 DR 4	1.82	146.86
B54 DR15	1.76	120.91	B51 DR 9	1.76	77.64
B61 DR15	1.73	35.11	B46 DR 8	1.71	125.45
B58 DR17	1.73	157.65	B58 DR 13	1.70	143.36
B51 DR14	1.72	126.33	B60 DR 11	1.58	118.15
B7 DR15	1.69	104.81	B52 DR 15	1.58	104.94
B46 DR8	1.49	112.19	B61 DR 14	1.57	96.32
B54 DR4	1.47	113.11	B62 DR 14	1.52	85.59
B58 DR13	1.47	120.17	B44 DR 7	1.49	94.38
B51 DR9	1.43	50.27	B62 DR 4	1.43	48.97
B61 DR12	1.39	38.19	B35 DR 13	1.34	104.56
B44 DR7	1.38	75.59	B60 DR 9	1.33	44.98
B75 DR12	1.37	80.26	B60 DR 12	1.31	42.75
B60 DR15	1.36	33.50	B58 DR 17	1.31	117.86
B35 DR15	1.31	39.40	B51 DR 15	1.29	1.64
B57 DR7	1.19	98.40	B51 DR 11	1.20	74.92
B37 DR10	1.18	115.08	B54 DR 4	1.20	90.85

汉 族			满 族		
单倍型	频率 (%)	Delta (x10 <sup>-4</sup> )	单倍型	频率 (%)	Delta (x10 <sup>-4</sup> )
B51 DR11	1.17	72.03	B48 DR 9	1.16	62.13
B13 DR10	1.12	91.06	B61 DR 15	1.14	-41.69
B62 DR12	1.08	14.62	B44 DR 15	1.11	33.99
B75 DR9	1.08	47.42	B75 DR 12	1.08	47.40
B62 DR9	1.04	6.14	B37 DR 10	1.04	100.18
			B48 DR 15	1.02	32.92
			B44 DR 13	1.01	71.32
			B51 DR 12	1.00	0.73

表 6 吉林骨髓库汉族满族造血干细胞捐献者 HLA-A-DR 单倍型比较

汉 族			满 族		
单倍型	频 率	Delta (x10 <sup>-4</sup> )	单倍型	频 率	Delta (x10 <sup>-4</sup> )
A2 DR 9	6.47	224.37	A2 DR15	7.18	89.02
A30 DR7	5.83	480.81	A2 DR12	6.71	176.78
A2 DR12	5.55	153.93	A2 DR9	6.27	139.34
A2 DR15	5.41	-8.39	A11 DR13	4.98	371.06
A24 DR15	3.42	63.45	A30 DR7	4.25	345.31
A2 DR4	3.41	3.76	A2 DR14	3.69	122.51
A11 DR17	3.39	284.11	A11 DR15	3.64	33.55
A11 DR12	3.11	119.85	A11 DR12	3.60	100.63
A11 DR15	2.98	35.62	A11 DR9	3.43	86.60
A2 DR 8	2.58	75.40	A2 DR8	3.13	77.32
A33 DR13	2.56	212.55	A24 DR9	3.01	103.02
A2 DR14	2.39	28.83	A2 DR1	2.89	201.47
A24 DR 9	2.37	22.72	A24 DR15	2.79	23.75
A11 DR4	2.31	70.15	A11 DR4	2.44	61.03
A24 DR4	2.23	52.25	A2 DR7	2.36	-208.39
A11 DR9	2.20	17.95	A2 DR11	1.81	-42.98
A2 DR11	2.03	-4.42	A33 DR 7	1.80	145.57
A2 DR7	1.54	-250.78	A3 DR15	1.71	80.07
A24 DR14	1.35	28.88	A24 DR 4	1.68	26.75
A1 DR 7	1.32	72.20	A11 DR 11	1.61	43.77
A24 DR11	1.30	25.51	A2 DR4	1.58	-188.93
A24 DR11	1.30	24.88	A24 DR12	1.57	-44.01
A33 DR17	1.28	102.89	A2 DR13	1.53	-88.40
A3 DR15	1.17	33.90	A33 DR7	1.53	84.50
A11 DR14	1.14	13.43	A24 DR14	1.38	37.81
			A11 DR7	1.17	-117.13
			A11 DR8	1.15	-9.12
			A33 DR13	1.11	73.81
			A2 DR16	1.11	44.91
			A24 DR8	1.06	10.45
			A24 DR8	1.06	10.45
			A3 DR7	1.03	38.83
			A1 DR10	1.02	92.42



### 2.3 吉林省满族人群中三座位单倍型频率（见表7）

从表7中可以看出排在前几位的A-B-DR单倍型如A2 B46 DR9、A2 B13 DR12、A2 B61 DR9、A2 B46 DR8、A2 B62 DR15、A11 B13 DR12在满、汉族人群中均有较高频率分布。

表7 吉林骨髓库汉族满族造血干细胞捐献者HLA-A-B-DR三座位单倍型分布比较

汉 族			满 族		
单倍型	频 率	Delta ( $\times 10^{-4}$ )	单倍型	频 率	Delta ( $\times 10^{-4}$ )
A30 B13 DR 7	5.70	375.16	A1 B57 DR 15	44.54	443.85
<b>A2 B46 DR9</b>	2.21	73.72	A1 B57 DR12	40.79	406.68
<b>A2 B13 DR12</b>	1.99	90.67	A1 B57 DR 13	35.00	349.39
<b>A2 B61 DR9</b>	1.27	23.39	A23 B7 DR15	19.26	192.31
A33 B44 DR13	1.19	83.73	A23 B49 DR 15	18.60	185.70
A33 B58 DR17	1.17	91.20	A3 B57 DR 15	17.61	175.86
A33 B58 DR13	1.11	74.85	A3 B58 DR 7	17.36	173.87
<b>A2 B46 DR8</b>	1.07	41.01	A3 B58DR 13	15.48	153.97
A1 B37 DR10	0.92	82.96	A23 B49 DR 1	15.19	151.83
A1 B57 DR7	0.88	67.90	A29 B48DR 15	7.49	74.62
A2 B75 DR9	0.76	17.38	A29 B50 DR 15	7.25	72.21
A11 B62 DR4	0.75	34.28	A29 B50 DR 7	6.79	67.67
A2 B61 DR12	0.74	3.25	A32 B81 DR15	4.89	48.60
A2 B61 DR15	0.71	-1.94	A32 B58 DR 16	4.26	42.44
A24 B54 DR4	0.70	35.34	A32 B81 DR 17	4.16	41.56
<b>A2 B62 DR15</b>	0.65	-2.97	A30 B13DR 7	4.13	27.00
A3 B7 DR15	0.65	42.25	<b>A2 B46 DR 9</b>	2.37	7.12
<b>A11 B13 DR12</b>	0.64	3.09	A2 B13 DR 12	2.04	4.07
A11 B75 DR12	0.63	30.70	A2 B46 DR 8	1.58	7.54
A2 B75 DR15	0.60	11.19	A11 B13 DR 12	1.51	5.59
A2 B13 DR7	0.59	-119.91	A2 B61 DR 9	1.32	-0.80
A24 B61 DR15	0.54	6.19	A11 B62 DR 15	1.30	2.93
A24 B13 DR12	0.54	10.03	A2 B51 DR 9	1.29	5.76
A2 B62 DR12	0.53	3.88	A2 B62 DR 15	1.27	-0.60
A33 B44 DR7	0.53	22.16	A2 B44 DR 7	1.26	8.83
A11 B52 DR15	0.52	13.42	A11 B71 DR 4	1.19	7.38
A24 B62 DR4	0.51	11.05	A11 B46 DR 9	1.16	4.56
			A2 B48DR15	1.06	5.02

2.4 本研究中满族人群没有检出的基因型：A\*69、36、34、74、43、25、80；B\*15、41、42、44、45、59、73。

2.5 与汉族人基因频率前几位比较结果：与长春汉族人基因频率前三位的等位基因A\*02、A\*24、A\*11；B\*15、B\*13、B\*40、B\*46；DR B1\*07、DR B1\*09、DR B1\*15、DR B1\*12在满族人群中也占有较高比率。

### 3 讨论

在本次共检出了HLA-A等位基因14个，HLA-B等位基因32个，HLA-DRB1等位基因13个。

结果没有检出 A\*69、36、34、74、43、25、80; B\*15、41、42、44、45、59、73, 说明这些基因在满族人群中的频率低于  $1/(2 \times 91)$  或可能不存在。将本次 HLA-A、B、DR 基因频率与长春汉族人基因频率前三位 A\*2、A\*24、A\*11; B\*15、B\*13、B\*40、B\*46; DRB1\*15、DRB1\*12、DRB1\*09 比较, 排序接近。从各表中分析虽然满族与汉族 HLA 各等位出现频率较高的位点大致相同, 但是组合成单倍型时出现频率明显不同, 尤其是三位点单倍型频率相近的单倍型很少, 说明两个民族之间的连锁不平衡规律不同, 有各自的倾向性。

我国是个多民族国家, 各民族有自己的语言、文化和群居地, 形成了特有的民俗、风情和生活习惯, 在民族演化过程中有很强的群体遗传特征。本研究在对吉林满族群体进行相应 HLA 基因分析基础上, 参考吉林骨髓库汉族 HLA 分型数据资料, 为该民族的法医学鉴定、遗传关系分析、寻找 HLA 相合的供者提供了遗传背景资料。基因频率和单倍型频率的分析能帮助估算为需要移植的患者在骨髓库中找到 HLA 匹配供者的概率, 本次统计为满族 HLA 群体分布及患者在骨髓库中找到相合供者提供重要资料, 同时也提示适当增加骨髓库中少数民族志愿者数量将有助于扩大单倍型种类, 为骨髓移植患者提供更多配型成功的机会。

### 3-24

## 吉林地区 HLA-DRB1 基因与慢性 HBV 感染的相关性研究

韩瑜 林乾飞 杨帆

长春市中心血站 (130033)

**摘要:** **目的** 通过对 HLA-II 类分子中的 DRB1 等位基因的多态性研究, 分析比较该位点的多态性与慢性 HBV 感染及慢性 HBV 感染后肝硬化的相关性。**方法** 395 例慢性乙型肝炎患者、57 例乙型肝炎肝硬化患者, 选用 PCR-SSO 方法进行 HLA 分型。**结果** HLA-DRB1\*01、HLA-DRB1\*03 和 HLA-DRB1\*09 与吉林地区汉族人乙型肝炎慢性化有密切相关性, HLA-DRB1\*08 和 HLA-DRB1\*11 与吉林地区汉族人慢性 HBV 感染后肝硬化密切相关。**结论** 研究 HLA 基因型与 HBV 慢性感染的相关性, 对于不仅能够找到 HBV 感染后个体间差异性的关键线索, 也能为抗病毒治疗和疾病的预防提供新的思路。

**关键词:** HLA-DRB1; 慢性乙型肝炎

## Studies of Correlation between HLA-DRB1 gene and Chronic HBV infection in JiLin

HanYu Lin qianfei YangFan (JiLin province Blood Center, 130033)

**Abstract: Objective** By means of polymorphism studies about DRB1 allelic gene in HLA-II molecule to analyse the correlation of site polymorphism and chronic HBV infection, postinfectious cirrhosis. **Method** with PCR-SSO method we finish HLA type of 395 chronic HBV infection and 57

postinfectious cirrhotoses Patients. **Result** HLA-DRB 1 \* 01、 HLA-DRB 1 \* 03 and HLA-DRB 1 \* 09 are closely related to chronic HBV; HLA-DRB 1 \* 08 and HLA-DRB 1 \* 11 are closely related to postinfectious cirrhosis in JiLin. **Conclusion** Studies of correlation between HLA genotype and chronic HBV infection, not only can we find out the key clue of individual difference in HBV infection, but also can provide new thought for antiviral therapy and prevention of disease.

**Keywords:** HLA-DRB1 Chronic HBV infection

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是一个重要的全球性问题。人体感染 HBV 后, 出现不同临床结果的机制尚不清楚<sup>[1]</sup>。有研究显示 HBV 复制并不直接损伤肝细胞, 其引发疾病并出现不同的临床过程和表现主要决定于个体的免疫状况<sup>[1]</sup>, 不同个体的免疫特性可能是 HBV 感染慢性化后出现不同临床结果的根本原因。人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 在人类的免疫应答反应中起着十分重要的作用, 其等位基因的多态性是决定宿主免疫应答能力的最重要的遗传因素, 也决定着不同个体对抗原的免疫应答的差异, 因此, 引发了有关 HLA 与 HBV 易感性的相关研究。本研究主要针对 HLA- II 类分子中的 DRB1 等位基因的多态性, 分析比较该位点的多态性与慢性 HBV 感染及慢性 HBV 感染后肝硬化的相关性。

## 1 研究对象

### 1.1 慢性乙型肝炎病毒感染组 (HBV patients)

包括 395 例慢性乙型肝炎患者、57 例乙型肝炎肝硬化患者。均按照 2005 年中华医学会肝病学会和传染病学<sup>[2]</sup>分会联合制订的《慢性乙型肝炎防治指南》中的诊断标准进行诊断和分类。

### 1.2 正常对照组 (HBV controls)

系中国造血干细胞捐献者库吉林分库中志愿捐献者, 无血缘关系, 汉族, 吉林籍, 共 400 人, 其中男性 256 人, 女性 144 人, 平均年龄 (36±10) 岁。

## 2 方法

**2.1 实验步骤及方法:** 参照试剂说明书。

**2.2 统计学处理** 统计过程均通过 SPSS11.5 统计软件完成。

## 3 结果

### 3.1 HLA- DRB1 各等位基因表型频率在慢性乙型肝炎病毒感染组和健康对照组间的比较:

从表 3-1 可见, 慢性乙肝病毒感染组与健康对照组比较, 基因频率较高的位点有 HLA-DRB1 \*12 ( $\chi^2=0.005$ ,  $P>0.05$ ), HLA-DRB1\*15 ( $\chi^2=0.016$ ,  $P>0.05$ ), HLA-DRB1\*14 ( $\chi^2=0.722$ ,  $P>0.05$ ), 而基因频率较低的位点有 HLA-DRB1\*08 ( $\chi^2=3.585$ ,  $P>0.05$ ), 但差异无显著性。

### 3.2 HLA-DQB1 各等位基因表型频率在肝硬化组和健康组间的比较

从表 3-2 可见, 慢性乙肝病毒感染后肝硬化组与健康对照组比较, 基因频率较高的位点有 HLA-DRB1 \*09 ( $\chi^2=2.570$ ,  $P>0.05$ )、HLA-DRB1\*12 ( $\chi^2=1.085$ ,  $P>0.05$ ), 而基因频率较低的位点有 HLA-DRB1\*01 ( $\chi^2=2.754$ ,  $P>0.05$ )、HLA-DRB1\*10 ( $\chi^2=0.944$ ,  $P>0.05$ ), 但差异无显著性。

表 3-1 吉林省慢性乙型肝炎、健康组 HLA-DR 等位基因关系

等位基因 HLA-DR	病人组		对照组		$\chi^2$	P	OR
	频 数	频率 (%)	频 数	频率 (%)			
01	12	1.53	31	3.95	8.625	0.003*	0.373
03	45	5.87	24	3.05	7.291	0.007*	2.014
04	63	8.32	71	9.31	0.460	0.498	0.879
07	75	9.99	105	14.12	5.985	0.014*	0.658
08	39	5.06	57	7.40	3.585	0.058	0.659
09	135	18.87	88	11.68	14.602	0.000*	1.841
10	6	0.76	18	2.28	6.032	0.014*	0.327
11	41	5.33	46	5.93	0.256	0.613	0.891
12	92	12.42	94	12.54	0.005	0.945	0.988
13	29	3.74	59	7.67	11.080	0.001*	0.458
14	68	9.01	60	7.80	0.722	0.396	1.178
15	134	18.71	134	18.45	0.016	0.899	1.019

\* $P < 0.05$ 

表 3-2 吉林省慢性乙型肝炎肝硬化、健康组 HLA-DR 等位基因关系

等位基因 HLA-DR	病人组		对照组		$\chi^2$	P	OR
	频 数	频率 (%)	频 数	频率 (%)			
01	1	0.88	31	3.95	2.754	0.071	0.213
03	3	2.67	24	3.05	0.049	0.558	0.870
04	8	7.28	71	9.31	0.482	0.488	0.757
07	16	15.19	105	14.12	0.085	0.771	1.096
08	19	18.35	57	7.40	13.105	0.000*	3.009
09	18	17.28	88	11.68	2.570	0.109	1.636
10	1	0.88	18	2.28	0.944	0.289	0.379
11	14	13.14	46	5.93	7.463	0.006*	2.506
12	17	16.23	94	12.54	1.085	0.298	1.384
13	3	2.67	59	7.67	3.829	0.050	0.321
14	6	5.41	60	7.80	0.808	0.369	0.667
15	15	14.16	134	18.45	1.172	0.279	0.709

### 3 讨论

目前众多流行病学调查资料表明:单纯用传染病的环境因素和病原学因素不足以解释受感染者疾病谱的多样性,宿主的遗传因素对乙型病毒性肝炎的转归起关键作用<sup>[3]</sup>。HBV 感染具有宿主易感性,目前关于 HBV 的易感基因和抗性基因的研究大多集中在 HLA 复合体。并经 Hohler<sup>[4]</sup>等通过双胞胎的疫苗免疫研究,量化了环境因素和宿主遗传因素的作用,其结论为宿主对 HBsAg 是否产生免疫反应的 60%是由宿主遗传因素决定的,且主要是由 HLA 复合体的基因多态性决定的。

本研究主要针对 HLA-II 类基因 DR 亚区多态性最多见的 DRB 1 等位基因的多态性及其与慢性 HBV 感染及慢性 HBV 感染后肝硬化的相关性进行研究。结果显示:HLA-DRB 1 \* 01、HLA-DRB 1 \* 03 和 HLA-DRB 1 \* 09 与吉林地区汉族人乙型肝炎慢性化有密切相关性,HLA-DRB 1 \* 08 和

HLA-DRB1\*11 与吉林地区汉族人慢性 HBV 感染后肝硬化密切相关。

此外,从健康对照组各等位基因的检出频率看,吉林籍汉族健康人中分布频率较高的 HLA-DRB1 等位基因有 DRB1\*04 (20.4%), DRB1\*09 (25.3%), DRB1\*12 (27%), DRB1\*15 (38.5%)。该结果与国内对 HLA-DRB1 位点的调查结果基本一致<sup>[5, 6, 7]</sup>。高频率的 HLA-DRB1\*09, HLA-DRB1\*04 和 HLA-DRB1\*12 和低频率的 HLA-DRB1\*01, HLA-DRB1\*03, HLA-DRB1\*10 是中国人 DRB1 位点的一个共同特点<sup>[8]</sup>,也与国内 HLA-DRB1 与疾病相关性研究中的正常对照组中的分布基本一致<sup>[9, 10]</sup>。

本研究表明 HLA-DRB1\*01、HLA-DRB1\*03 和 HLA-DRB1\*09 可能为吉林地区汉族人 HBV 感染的易感基因,HLA-DRB1\*13 为保护基因,进一步说明特异性的遗传因素可增加或降低人群对 HBV 感染的危险性。

由于受条件所限,本实验研究的样本例数不够多,病例来源大都为在长春居住的吉林人,代表性有一定欠缺。因此需要进一步的扩大样本的深入研究。在此基础上利用分子生物学等研究方法,进一步探明不同 HLA 基因型与 HBV 感染的关系,使得 HLA 复合体在 HBV 感染的预测、预防与治疗中的作用进一步明确。

#### 参考文献

- [1] Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection[J]. Lancet infect Dis. 2002, (1): 43-50.
- [2] 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13 (12): 881-891.
- [3] Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection[J]. Lancet infect Dis. 2002, (1): 43-50.
- [4] Hohler T, Reuss E, Evers N, Dietrich E, Rittner C, Freitag CM, et al. Differential genetic determination of immune responsiveness to hepatitis B surface antigen and to hepatitis A virus: a vaccination study in twins. Lancet. 2002, 360: 991-995.
- [5] 陈仁彪, 叶根耀, 庚镇城, 等. 我国大陆主要少数民族 HLA 多态性聚类分析和频数分布对中华民族起源的启示. 遗传学报, 1993, 20: 389-398.
- [6] 孙逸平, 高晓江, 秋季南, 等. 中国人南北群体 HLA Class II 基因的变异性. 中国免疫学杂志, 1992, 8 (5): 283-285.
- [7] 于桂兰, 孙逸平, 徐林敏, 等. 沈阳汉族人群 HLA-DR、DQ、DP 的 DNA 分型研究. 中国免疫学杂志, 1995, 11 (2): 142-144.
- [8] Sanchez VP, Leyva CF. The HLA class I and HLA class II allele frequencies studied at the DNA level in the Svanetian population (Upper Caucasus) and their relationship to Western European population. Tissue Antigens, 2001, 58 (4): 223-233.
- [9] 蒋业贵, 王宇明. 人类白细胞抗原-DRB1\*1001 与慢性乙型肝炎重型化密切相关[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11 (4): 256-259.
- [10] 刘志辉, 罗一鲁, 周琳等. HLA-DR 基因与中国南方汉族部分人群肺结核易感基因的研究. 中华结核和呼吸杂志, 2004; 27: 390-393.

3-25

## 吉林骨髓库造血干细胞捐献者 HLA-A、B、DR 基因分布和单倍型分析

陈琳 焦立新 鞠瑞青  
吉林省血液中心 (130033)

**摘要:** 目的 了解中国造血干细胞捐献者资料库吉林分库HLA 基因及单倍型分布特征。方法 采用PCR-SSP、PCR-SSO、PCR-SBT 对吉林分库内10120 名吉林籍捐献者HLA-A、B、DRB1基因低分辨率分型,用Excel软件计算HLA基因频率、单倍型频率及其连锁不平衡参数。结果 在吉林分库内, HLA-A、B、DRB1基因(含血清学特异性) 分别有21、45、13 种,频率高的基因是: A\*02 , A\*24, A\*11, A\*30; B\*13、B\*40 (61)、B\*51; DRB\*15, DRB\*09、DRB\*07 、DRB\*12 。在HLA单倍型分布中,两座位连锁频率较高的有: A30-B13、A2-B46、A2-B61、A2-B58; B13-DR7 、B13-DR12、B46-DR9、B61-DR9; A2-DR9、A30-DR7、A2-DR12、A2-DR15; 三座位连锁频率较高的是: A30-B13-DR7、A2-B46-DR9、A2-B13-DR12、A2-B61-DR9。结论 此研究有助于为临床移植寻找合适匹配的供受对,并为吉林地区健康人群HLA 基因多态性以及HLA相关疾病的研究提供有意义的参照数据。

**关键词:** HLA; 基因频率; 连锁不平衡; HLA单倍型频率

## Jilin marrow library haemopoietic stem cell volunteer gene distribution of HLA-A 、 B、 DR and haplotype analysis

Chen lin Jiao lixin Ju ruiqing (JiLin province Blood Center, 130033)

**Abstract: objective** To understand gene distribution HLA-A 、 B、 DR and haplotype analysis in Jilin marrow library character. **Methods** With PCR-SSP、PCR-SSO、PCR-SBT to do low resolution of 10120 volunteer and calculate HLA gene frequency , haplotype analysis and linkage disequilibrium parameter. **Results** In Jilin marrow library, HLA-A、B、DRB1 gene individually Is 21, 45, 13 species, high frequency genes are : A\*02 , A\*24, A\*11, A\*30; B\*13、B\*40 (61)、B\*51; DRB\*15, DRB\*09、DRB\*07 、DRB\*12. In haplotype distribution the higher frequency two seat linkages are A30-B13、A2-B46、A2-B61、A2-B58; B13-DR7 、B13-DR12、B46-DR9、B61-DR9; A2-DR9、A30-DR7、A2-DR12、A2-DR15; three seat linkages are A30-B13-DR7、A2-B46-DR9、A2-B13-DR12、A2-B61-DR9. **Conclusions** This investigation will conduce to find suitable match supply-reception couple and provide significant reference data for HLA related disease.

**Key Words:** HLA gene frequency linkage disequilibrium HLA haplotype frequency

HLA 系统是人体调控特异性免疫反应和决定疾病易感性个体差异的主要基因系统, 是由一系列紧密连锁的基因座位组成的、具有高度多态性的遗传复合体。HLA 等位基因频率以及连锁不平衡类型在不同人种、民族、地域存在明显差异。HLA 基因的多态性及其分布差异是自然选择造成的, 它保证了种群能显示对各种病原体合适的免疫应答, 以维持群体的稳定性。因此 HLA 系统在人类遗传学上形成了极好的群体标志, 其基因频率与单倍型频率在为临床移植寻找相同 HLA 基因供受对、研究人种和地理种族的演化和迁移规律以及疾病在某一人种或地区高发的原因方面具有重要意义。为临床骨髓移植而建立的造血干细胞捐献者资料库由具有地域、种族信息的随机个体的 HLA 分型资料组成, 它不仅能为患者找到 HLA 匹配的无关供者, 而且也能为 HLA 群体研究提供宝贵数据。我们采用序列特异性引物聚合酶链反应 (polymerase chain reaction sequence specific primer, PCR-SSP) 以及序列特异性寡核苷酸探针 (polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotideprobe, PCR-SSO) 流式细胞检测技术、直接测序分型方法 (sequence based typing, SBT)对中国造血干细胞捐献者资料库吉林省分库(以下简称吉林分库)内志愿捐献者作了 HLA-A、B、DRB 1 座位的等位基因低分辨分型, 对其中吉林捐献者的 HLA 分型资料作了分析, 现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 分型对象

2003~2007 年在吉林分库随机报名, 其籍贯为吉林省的10120名汉族健康人, 其中男性占 52.84%, 女性占47.16%。

### 1.2 分型试剂

DNA快速抽提试剂盒由美国Pel2Freez公司提供。

PCR2SSP基因分型试剂由美国Pel2Freez公司提供。

PCR2SSO Luminex分型试剂由美国One Lambda公司提供。

### 1.3 主要仪器

核酸检测仪为Biochrom公司产品, 9700 PCR扩增仪为PE公司产品, 电泳仪为英国ABgene公司产品, 凝胶成像系统 (UVP), 流式微磁珠分析仪为Luminex公司产品。

### 1.4 分型方法

所有样本取500 $\mu$ l EDTA 抗凝全血提取DNA, 检测DNA 浓度为40 - 100 ng/ $\mu$ l, AD260 /280比值为1.6-1.8。采用PCR-SSP和PCR-SSO流式磁珠分型方法, PCR反应扩增条件、HLA分型结果判读按照试剂盒说明书操作, 对分型结果有疑问的样本, 用与原分型试剂不同批号或不同厂家的试剂进行重复或使用直接测序法进行验证, HLA分型质控试验由随机抽取的5%样品复试。

### 1.5 HLA基因命名

HLA基因命名均按WHO正式认可的命名, 为了便于估计群体资料的单倍型频率, 以及今后根据群体资料估算临床受者HLA匹配概率和骨髓库最小群体数量, HLA基因分型结果均依照2004年HLA命名字典翻译为HLA 抗原特异性。

### 1.6 数据分析方法

HLA表型频率采用直接记数法计算, 基因频率(GF) 采用方根法<sup>[1]</sup>计算; 用 $\chi^2$ 检验验证HLA-A、

B、DRB1座位上的等位基因分布是否吻合H-W定律，以确定资料为孟德尔式群体资料的可靠性。双座位单倍型频率（haplotype frequency，HF）的计算按文献<sup>[1]</sup>公式；三座位HF的计算由表1推导，其 $\chi^2$ 检验采用组内分组方法<sup>[2]</sup>。由于连锁不平衡参数（Delta，D）受组成单倍型各基因的基因频率的影响，因此用相对连锁不平衡参数（RD）比较各种单倍型连锁不平衡强度；用 $\chi^2$ 检验推断构成HF列联表的变量间（即基因间）有无相关关系（ $\alpha=0.05$ ），并计算Pearson's列联系数（ $rp$ ， $rp=[\chi^2/(N+\chi^2)]^{0.5}$ ），说明相关的密切程度<sup>[1]</sup>。所有计算均在Excel中完成。

## 2 结果

2.1 吉林分库吉林籍志愿捐献者HLA基因频率（见表2）：在吉林分库内，HLA-A、B、DRB1基因（含血清学特异性）分别有21、45、13种，频率高的基因是：A\*02，A\*24，A\*11，A\*30；B\*13、B\*40（61）、B\*51；DRB1\*15，DRB1\*09、DRB1\*07、DRB1\*12。10120名吉林汉族骨髓供者中，总共检测出80种HLA特异性，每种特异性对应的HLA-A、B、DRB1等位基因频率均已列出。

2.2 HLA-A与HLA-B与HLA-DR抗原组成的两座位单倍型频率（见表3.4.5）其中HLA-A与HLA-B单倍型频率较高的为A30-B13（6.94%）、A2-B46（4.41%）、A2-B61（3.67%）、A2-B58（3.07%）；HLA-B与HLA-DR单倍型频率较高的为B13-DR7（7.13%）、B13-DR12（3.27%）、B46-DR9（3.18%）、B61-DR9（2.21%）；HLA-A与HLA-DR单倍型频率较高的为A2-DR9（6.47%）、A30-DR7（5.83%）、A2-DR12（5.55%）、A2-DR15（5.41%）。

2.3 HLA-A与HLA-B与HLA-DR抗原组成的三座位单倍型频率（见表6）：A30-B13-DR7（5.70%）、A2-B46-DR9（2.21%）、A2-B13-DR12（1.99%）、A2-B61-DR9（1.27%）频率较高。

2.4 HLA-A、B、DRB1基因分布符合H-W平衡定律（ $P>0.05$ ），确保了研究结果的可靠性。如：单倍型A30B13、A2B46、A33B58、A1B57；B13DR7、B58DR17、B37DR10、B57DR7、B13DR10；A30DR7、A11DR17、A2DR7、A33DR13；A30B13DR7、A1B37DR10、A1B57DR7、A2B13DR7存在强连锁不平衡。

表2 吉林骨髓库汉族造血干细胞捐献者HLA基因频率分布（ $n=10120$ ）

	n	GF		n	GF		n	GF
A2	5467	0.3219	B65	65	0.0032	B51	1379	0.0706
A24	3032	0.1631	B62	1458	0.0748	B52	700	0.0352
A11	2868	0.1533	B63	47	0.0023	B53	9	0.0004
A30	1572	0.0810	B70	2	0.0001	B54	649	0.0326
A33	1361	0.0697	B71	424	0.0212	B55	345	0.0171
A3	957	0.0485	B72	31	0.0015	B56	47	0.0023
A1	936	0.0473	B75	905	0.0458	B57	321	0.0160
A31	841	0.0424	B76	13	0.0006	B58	842	0.0425
A26	627	0.0314	B77	8	0.0004	B59	21	0.0010
A32	304	0.0152	B18	111	0.0055	B67	232	0.0115
A68	172	0.0085	B27	352	0.0175	B73	6	0.0003
A29	162	0.0082	B35	1058	0.0537	B81	38	0.0019
A23	60	0.0030	B37	322	0.0160	空	597	0.0299
A66	23	0.0011	B38	387	0.0193			
A69	16	0.0008	B39	348	0.0173	DR1	559	0.0280



	n	GF		n	GF		n	GF
A36	12	0.0006	B60	1179	0.0601	DR3	707	0.0356
A34	8	0.0004	B61	1572	0.0809	DR4	2011	0.1049
A74	7	0.0003	B41	40	0.0020	DR7	2387	0.1259
A43	2	0.0001	B42	13	0.0006	DR8	1114	0.0566
A25	1	0.0000	B44	972	0.0492	DR9	2485	0.1314
A80	1	0.0000	B45	1	0.0000	DR10	317	0.0158
空	1811	0.0938	B45	18	0.0009	DR11	1260	0.0643
			B46	1266	0.0646	DR12	2367	0.1247
B7	745	0.0375	B47	7	0.0003	DR13	1229	0.0627
B8	198	0.0098	B48	775	0.0391	DR14	1279	0.0653
B13	2521	0.1335	B49	40	0.0020	DR15	3159	0.1706
B64	16	0.0008	B50	160	0.0079	DR16	302	0.0150
						空白	1064	0.0494

表3 吉林骨髓库汉族造血干细胞捐献者常见 HLA-A-B 双座位单倍型分布

单倍型	HF (%)	Delta ( $\times 10^{-4}$ )	RD ( $\times 10^{-2}$ )	$\chi^2$	rp
A30 B13	6.94	572.10	82.1	3729.10	0.52
A2 B46	4.41	233.37	53.2	338.31	0.18
A2 B61	3.67	106.73	19.4	55.89	0.07
A33 B58	3.07	277.31	70.1	2869.35	0.47
A2 B13	2.93	-136.90	31.8	55.05	0.07
A2 B62	2.66	24.65	4.8	3.17	0.018
A2 B75	2.50	103.10	33.2	90.50	0.09
A24 B61	2.16	84.34	12.4	62.55	0.08
A2 B51	2.06	-21.20	9.3	2.45	0.01
A33 B44	2.02	168.36	36.7	905.27	0.28
A11 B60	1.94	102.34	20.1	130.06	0.11
A24 B62	1.78	56.06	8.9	29.69	0.05
A11 B62	1.77	62.09	9.8	38.52	0.06
A2 B60	1.76	-17.00	8.8	1.85	0.01
A2 B48	1.75	49.35	18.6	24.01	0.05
A11 B13	1.64	-40.20	19.6	9.19	0.03
A24 B60	1.63	64.91	12.9	49.26	0.07
A24 B51	1.37	22.10	3.7	4.85	0.02
A24 B54	1.34	81.91	30.4	144.55	0.12
A11 B51	1.28	20.19	3.4	4.28	0.02
A24 B13	1.25	-92.80	42.6	46.08	0.07
A1 B37	1.22	114.84	75.2	1836.51	0.39
A2 B35	1.20	-52.20	30.2	19.39	0.04
A2 B71	1.18	49.65	34.6	44.42	0.06
A24 B48	1.16	52.54	16.1	49.03	0.07
A11 B75	1.14	44.24	11.4	31.43	0.05
A1 B57	1.14	106.55	69.9	1584.41	0.37
A24 B35	1.09	21.82	4.8	6.17	0.02
A11 B61	1.08	-15.60	12.5	2.23	0.01
A2 B38	1.06	43.65	33.3	37.57	0.06

表 4 吉林骨髓库汉族造血干细胞捐献者常见 HLA-B-DR 双座位单倍型分布

单倍型	频率 (%)	Delta ( $\times 10^{-4}$ )	RD ( $\times 10^{-2}$ )	$\chi^2$	<i>rp</i>
B13 DR 7	7.13	545.46	50.02	2199.99	0.42
B13 DR12	3.27	160.73	14.87	183.31	0.13
B46 DR 9	3.18	232.70	41.45	734.15	0.26
B61 DR9	2.21	114.90	16.34	142.14	0.12
B44 DR13	2.03	172.39	37.36	1051.45	0.31
B52 DR15	2.01	140.47	48.11	376.45	0.19
B62 DR15	2.00	72.34	11.66	47.55	0.07
B62 DR4	1.87	108.04	16.13	167.20	0.13
B54 DR15	1.76	120.91	45.29	303.83	0.17
B61 DR15	1.73	35.11	5.23	10.34	0.03
B58 DR17	1.73	157.65	46.30	1760.58	0.38
B51 DR14	1.72	126.33	20.81	380.58	0.19
B7 DR15	1.69	104.81	33.69	196.05	0.14
B46 DR8	1.49	112.19	21.18	374.72	0.19
B54 DR4	1.47	113.11	39.26	416.84	0.20
B58 DR13	1.47	120.17	30.16	586.29	0.23
B51 DR9	1.43	50.27	8.19	30.76	0.06
B61 DR12	1.39	38.19	5.39	16.32	0.04
B44 DR7	1.38	75.59	17.56	103.03	0.10
B75 DR12	1.37	80.26	20.04	125.86	0.11
B60 DR15	1.36	33.50	6.73	12.55	0.04
B35 DR15	1.31	39.40	8.84	19.35	0.04
B57 DR7	1.19	98.40	70.41	529.85	0.22
B37 DR10	1.18	115.08	74.09	5443.16	0.59
B51 DR11	1.17	72.03	12.05	124.83	0.11
B13 DR10	1.12	91.06	66.57	434.79	0.20
B62 DR12	1.08	14.62	2.23	2.57	0.02
B75 DR9	1.08	47.42	11.93	41.69	0.06
B62 DR9	1.04	6.14	0.94	0.43	0.01

表 5 吉林骨髓库汉族造血干细胞捐献者常见 HLA-A-DR 双座位单倍型分布

单倍型	频率	Delta ( $\times 10^{-4}$ )	RD ( $\times 10^{-2}$ )	$\chi^2$	<i>rp</i>
A2 DR 9	6.47	224.37	25.18	159.53	0.12
A30 DR7	5.83	480.81	67.95	2709.23	0.46
A2 DR12	5.55	153.93	18.20	77.89	0.09
A2 DR15	5.41	-8.39	1.53	0.17	0.00
A24 DR15	3.42	63.45	4.69	17.59	0.04
A2 DR4	3.41	3.76	0.53	0.05	0.00
A11 DR17	3.39	284.11	94.37	1708.25	0.38
A11 DR12	3.11	119.85	11.35	89.15	0.09
A11 DR15	2.98	35.62	2.80	5.83	0.02
A2 DR 8	2.58	75.40	19.63	39.16	0.06
A33 DR13	2.56	212.55	36.45	1147.22	0.32

单倍型	频率	Delta ( $\times 10^{-4}$ )	RD ( $\times 10^{-2}$ )	$\chi^2$	<i>rp</i>
A2 DR14	2.39	28.83	6.51	4.95	0.02
A24 DR 9	2.37	22.72	2.07	2.85	0.02
A11 DR4	2.31	70.15	7.90	35.70	0.06
A24 DR4	2.23	52.25	5.95	18.69	0.04
A11 DR9	2.20	17.95	1.61	1.88	0.01
A2 DR11	2.03	-4.42	2.13	0.12	0.00
A2 DR7	1.54	-250.78	61.90	191.44	0.14
A24 DR14	1.35	28.88	5.28	8.95	0.03
A1 DR 7	1.32	72.20	17.44	97.58	0.10
A24 DR11	1.30	25.51	4.74	7.09	0.03
A24 DR11	1.30	24.88	4.62	6.74	0.03
A33 DR17	1.28	102.89	31.10	461.34	0.21
A3 DR15	1.17	33.90	8.44	15.83	0.04
A11 DR14	1.14	13.43	2.43	2.04	0.01

表 6 吉林骨髓库汉族造血干细胞捐献者常见 HLA-A-B-DR 三座位单倍型分布

单倍型	频率	Delta ( $\times 10^{-4}$ )	RD ( $\times 10^{-2}$ )	$\chi^2$	<i>rp</i>
A30 B13 DR 7	5.70	375.16	61.00	4148.20	0.54
A2 B46 DR9	2.21	73.72	14.78	1002.85	0.30
A2 B13 DR12	1.99	90.67	7.96	343.24	0.18
A2 B61 DR9	1.27	23.39	3.31	179.28	0.13
A33 B44 DR13	1.19	83.73	18.32	1476.61	0.36
A33 B58 DR17	1.17	91.20	27.69	4018.94	0.53
A33 B58 DR13	1.11	74.85	19.27	2931.72	0.47
A2 B46 DR8	1.07	41.01	8.19	709.26	0.26
A1 B37 DR10	0.92	82.96	55.63	6450.03	0.62
A1 B57 DR7	0.88	67.90	48.60	3138.11	0.49
A2 B75 DR9	0.76	17.38	4.35	122.21	0.11
A11 B62 DR4	0.75	34.28	4.84	230.03	0.15
A2 B61 DR12	0.74	3.25	0.44	67.53	0.08
A2 B61 DR15	0.71	-1.94	2.64	66.51	0.08
A24 B54 DR4	0.70	35.34	12.29	627.09	0.24
A2 B62 DR15	0.65	-2.97	4.37	50.97	0.07
A3 B7 DR15	0.65	42.25	11.99	750.70	0.26
A11 B13 DR12	0.64	3.09	0.26	202.72	0.14
A11 B75 DR12	0.63	30.70	7.21	180.20	0.13
A2 B75 DR15	0.60	11.19	2.73	99.37	0.10
A2 B13 DR7	0.59	-119.91	67.00	2214.12	0.42
A24 B61 DR15	0.54	6.19	0.81	71.11	0.08
A24 B13 DR12	0.54	10.03	0.83	234.13	0.15
A2 B62 DR12	0.53	3.88	0.56	5.40	0.02
A33 B44 DR7	0.53	22.16	4.80	1075.09	0.31
A11 B52 DR15	0.52	13.42	4.28	411.08	0.20
A24 B62 DR4	0.51	11.05	1.56	192.33	0.14

### 3 讨论

HLA多态性不仅在不同地区、不同种族的HLA基因频率分布有较大差异,还表现在单倍型方面具有显著性连锁不平衡的特点。吉林分库HLA-A、B、DR的单倍型频率和连锁不平衡有其自身特点:最常见的A-B单倍型是:A30-B13、A2-B46、A2-B61;最常见的B-DR单倍型是B13-DR7、B13-DR12、B46-DR9;最常见的A-DR单倍型是A2-DR9、A30-DR7、A2-DR12;与湖南、广东、四川等地骨髓库相比<sup>[3,4,5,6]</sup>,基因型和单倍型存在明显差异;与陕西、大连等地<sup>[7,8,9]</sup>相比则常见基因型和单倍型大致相同,南北方均常见的基因型有A02、A24、A11; B13; DR15、DR12;最常见单倍型是A30-B13-DR7,存在强连锁不平衡,提示如果需要造血干细胞移植的患者携带这些单倍型,将很容易从非血缘关系供者库中检索到HLA相合的供者。HLA基因间的这种连锁不平衡关系对于HLA与疾病的关联研究中的结果分析也非常重要,是HLA相关研究和应用的重要背景资料。

通过单倍型研究,可以从一个侧面分析不同人群HLA分布情况,为群体遗传、人类进化演变、疾病关联和法医学亲子鉴定研究提供一些基础资料,同时也可以为患者找到HLA相合供者提供信息。对已从家系分析得知其单倍型的患者,在常见单倍型与患者相同的资料库内,相同表型的供者与患者单倍型匹配的可能性更大,而单倍型匹配比表型匹配在临床移植中有更高的成活率。

准确的HLA三座位单倍型频率是由受者HLA表型资料估计其找到HLA匹配供者的机率以及评价骨髓库最适大小的核心数据,同时也被广泛用于种族地域间遗传学差异以及亲子关系的研究中。本研究取得了目前中国吉林声汉族人群样本量最大的HLA分型资料,采用了可靠的基因分型技术进行HLA分型,使用了Excel软件计算HLA双/三座位单倍型频率,这三方面因素确保了本研究获得的HLA单倍型频率资料的可靠性和科学性。

我们在HLA基因分型中鉴定了80种HLA特异性,但是组合成单倍型时其频率与基因型不完全一致,根据计算结果(RD、*rp*值)分析发现,某些频率较低的等位基因构成的三座位单倍型较高,这种现象也恰好说明了HLA不同座位等位基因之间的连锁不平衡关系。在自然选择作用下,连锁不平衡现象在HLA区内各座位等位基因之间普遍存在。如:单倍型A30B13、A2B46、A33B58、A1B57; B13DR7、B58DR17、B37DR10、B57DR7、B13DR10; A30DR7、A11DR17、A2DR7、A33DR13; A30B13DR7、A1B37DR10、A1B57DR7、A2B13DR7就存在强连锁不平衡。

总之,随着造血干细胞移植和器官移植技术的快速发展更新,越来越多的资料显示供受者HLA匹配对于降低移植物抗宿主病(GVHD)及移植相关毒性(TRM)、提高受者长期存活率等有着不可低估的作用<sup>[10,11]</sup>。本研究分析了吉林省汉族最大样本量的HLA-A/B/DRB1等位基因多态性、单倍型频率分布及连锁不平衡的特征,为评价骨髓库容量对患者查询的满足程度、骨髓库最适大小、与患者匹配几率以及HLA多态性与移植免疫相关性等研究提供了重要依据。

### 参考文献

- [1] 赵桐茂.HLA分型原理和应用.上海:科学技术出版社出版,1984,141-168.
- [2] 杨颖,张工梁.HLA遗传学中的统计分析:谭建明主编.组织配型技术与临床应用.北京:人民卫生出版社,2002,82~109.
- [3] 裴冀,德永和夫,荒木千枝子,等.四川地区汉族人群HLA多态性:HLA-DR、DQ抗原分布.中华血

液学杂志, 1985, 6 (10) : 602.

[4] 张工梁, 杨颖, 等. 中华(上海)骨髓库的HLA 分布报告.中华器官移植杂志, 2001, 22 (5) : 179.

[5] 谢毓滨; 王赤林; 彭骅.湖南地区人群 HLA 单倍型的多态性研究.临床输血与检验, 2006, 8 (2): 108~113.

[6] 金士正, 吴国光, 蓝欲晓.广东汉族人群人类白细胞抗原 A, B 及DRB1 基因多态性和单倍型分布.广东医学, 2006, 27 (9) : 1289~1291.

[7] 吴强驹, 刘孟黎. 11755名中国北方汉族造血干细胞供者 HLA-A、B、DRB1基因和单倍型研究.中国实验血液学杂志, 2007, 15 (2) : 357-363.

[8] 刘孟黎, 张艳, 刘晟.西安地区造血干细胞捐献者HLA-A、B、DR等位基因多态性分析.中国输血杂志, 2005, 18 (6) : 470~473.

[9] 孟庆丽, 于卫健, 梁小华, 等.辽南地区造血干细胞捐献者 HLA 基因分布和单倍型分布分析. 中国输血杂志, 2007, 20 (1) : 30~32.

[10] Zacharg AA, Steinberg AG, Bias WB, *et al.* The frequencies of HLA alleles and haplotypes and their distribution among donors and renal patients in the UNOS Registry. Transplantation, 1996, 62 (2): 272.

[11] 张工梁, 杨颖, 冯喆.中华(上海)骨髓库的 HLA 分布报告.中华器官移植杂志, 2001, 22 (5): 179.

## 移植医院

3-26

### 血细胞分离机的临床应用观察

符祥俊 吴从明

海南省人民医院血液内科(570311)

今年我科购进美国 COBE 公司生产的 COBE Spectra 血细胞分离机, 已经开展白细胞去除术治疗白血病, 红细胞单采术治疗真性红细胞增多症, 血小板去除术治疗血小板增多症等治疗技术, 取得满意的疗效。本文主要介绍我科应用血细胞分离机进行治疗性血细胞分离术的临床应用情况。

#### 1 临床资料

**1.1 一般资料** 我科自 2007 年 1 月~2007 年 8 月用 COBE Spectra 血细胞分离机进行血细胞分离术共 20 例患者, 年龄 16~65 岁, 男性 15 例, 女性 5 例, 均为急性白血病和骨髓增殖性疾病, 其诊断符合白血病及骨髓增殖性疾病的诊断标准<sup>[1]</sup>。细胞成分分离后配合内科的常规治疗。分离术后均做分离物血常规及患者血常规检查。

**1.2 血小板分离术** 应用血细胞分离机进行血小板分离术 2 例, 共 3 例次, 均诊断为原发性血小板增多症, 疗程 1~2 次, 每次处理血量 5630~6580ml, 清除前外周血的血小板  $(1335\sim1652)\times 10^9/L$ , 清除后达  $(563\sim675)\times 10^9/L$ , 去除的血小板量为  $(1531\sim1830)\times 10^9/L$ , 分离后患者症状明显减轻, 而后以羟基脲治疗。

**1.3 红细胞分离术** 应用血细胞分离机进行红细胞分离术共 3 例, 5 例次, 均诊断为真性红细胞增多症, 疗程 1~2 次, 每次去除红细胞量 550~780ml, 处理血量为 1850~2530ml, 清除前血红蛋白 189~215g/L, 清除后血红蛋白 145~165g/L。分离后患者症状明显减轻, 而后以羟基脲等药物治疗。

**1.4 白细胞分离术** 共 15 例 20 例次, 疗程 1~2 次, 诊断为急性非淋巴细胞白血病或急性非淋巴细胞白血病, 每次处理血量 6750~9135ml, 术前 WBC  $(126\sim241)\times 10^9/L$ , 清除后 WBC  $(61\sim76)\times 10^9/L$ , 分离产品 WBC  $(1131\sim1425)\times 10^9/L$ , 分离后按标准方案给予化疗。

#### 2 结果

应用 COBE Spectra 血细胞分离机进行血细胞分离术, 分离过程较安全, 副作用轻, 多为头晕, 四周麻木等症状, 偶有恶心呕吐, 给予葡萄糖酸钙静脉推注后症状均可好转。对高白细胞的白血病患者实施单采白细胞治疗 1~2 次, 白细胞下降率达 48~76%, 单采后白细胞均降至  $100\times 10^9/L$  以下才给予标准方案化疗, 化疗中无患者出现脏器功能衰竭如心衰, 呼衰, 肾衰及弥漫性血管内凝血。为原发性血小板增多症分离 1~2 次, 血小板下降率 39~60%, 为真性红细胞增多症做分离, 红细胞下降率 25~31%, 头晕, 颜面潮红, 肢体麻木症状迅速好转, 而后以羟基脲等药物治疗, 疗效较

好。应用 COBE Spectra 血细胞分离机对高白细胞的白血病及其他骨髓增生性疾病进行细胞成分的清除,可以迅速去除血液内大量病理性血细胞,缓解临床症状和体征,缩短达到缓解的时间,减少化疗副作用,是一种安全有效的辅助治疗手段。

### 3 讨论

高白细胞急性白血病 (HLAL) 约占急性白血病的 5%~20%<sup>[2]</sup>,病情进展快。由于外周血白细胞异常增高,致使血液黏稠度增加,易在小血管内形成血栓,导致脑、肺、肾等重要器官损伤,甚至发生脑出血、呼吸窘迫综合征和弥漫性血管内凝血等危及患者生命的并发症。日前,对此类白血病的治疗仍以化疗为主,但初治时化疗杀伤大量白血病细胞后易发生弥散性血管内凝血、颅内出血、高血钾,高尿酸血症,急性肾功能衰竭等严重并发症,早期死亡率高。血细胞分离机的临床应用,明显改善了白血病患者的预后,避免了并发症的发生,对已发生并发症的患者,也能够给予及时的治疗,使其顺利渡过危险期,延长了患者的生命。大大减少了化疗过程中出现的副作用。另外,化疗药物只对增殖期细胞有杀伤作用,而对静止期细胞无效。单采白细胞,能选择性的去除血液中的异常成分,促使病变细胞克隆进入增殖期,从而充分发挥化疗药物的治疗作用。对于真性红细胞增多症及原发性血小板增多症的患者,给予分离治疗,使红细胞及血小板负荷明显减少后再给予细胞毒类药物,减少了血管栓塞及肾功能衰竭的发生率。在治疗性红细胞单采术后,配合口服羟基脲治疗真性红细胞增多症,效果显著<sup>[3]</sup>。对于病理性血细胞负荷较大的患者,做 1 次血细胞分离,常不能使血细胞明显下降,甚至稍有升高,是因为储存于肝脾及骨髓中的血细胞在分离后大量释放进入血循环所致,连续做 2 至 3 次分离可取得满意效果。

### 参考文献

- [1] 浦权,唐超生,莫东华,等.高白细胞急性白血病 15 例报告[J].中华血液杂志,1998,9(1):37-38.
- [2] 张之南,主编.血液病诊断及疗效标准[M].第 2 版,北京:科学出版社,1998:171-183,214-218.
- [3] 谢毅.治疗性红细胞单采术和羟基脲联合治疗真性红细胞增多症[J].中华血液学杂志,1993,14(11):598.

3-27

## 21 例造血干细胞移植术后医院感染临床分析

尚振川 刘阳阳 范方毅 孙浩平 邓涛

成都军区总医院血液科(610083)

**摘要:**目的 分析我院造血干细胞移植术后医院感染的发病率和高危因素,探讨其防治策略。方法 回顾分析我院 21 例造血干细胞移植术后医院感染的临床资料。结果 21 例患者中 15 例发生感染,感染率为 71.4%;检查分离出细菌 15 株,真菌 4 株;高危因素为各种侵入性操作、激素和抗生素的不合理应用等。结论 造血干细胞移植术后医院感染发生率高,预后差,除减少各种侵入性操作、合理应用激素和抗生素外,关键在于早期发现和治疗,更重要的是注重全环境保护。

**关键词:**造血干细胞移植术;医院感染;病原菌;全环境保护

## Hospital Infection after Haemopoietic Stem Cell Transplantation: 21 Cases Clinical Analysis

ZHANG-Ling<sup>1</sup>, SHANG Zhen-chuan<sup>2</sup>, SUN Chun-rong<sup>1</sup>, SUN Hao-ping<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Infection Control Department,

<sup>2</sup> Hematology Department, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, P.R. China

**Abstract: Objective** To study the rate and the risk factors of hospital infection after haemopoietic stem cell transplantation and improve treatment strategy. **Methods** The clinical data of 21 cases of haemopoietic stem cell transplantation were analyzed respectively in our hospital. **Results** Hospital infection was found in 15 cases, the infection rate was 71.4%. 15 kind of bacterium and 4 kind of fungi were observed. The risk factors were virulent operation, the abuse of glucocorticoid and antibiotics. **Conclusion** The patients have a high rate of hospital infection after haemopoietic stem cell transplantation and a poor prognosis because of hospital infection. To decrease the rate of hospital infection after haemopoietic stem cell transplantation, the whole environmental protection should be carried out except decreased virulent operation, the correct use of glucocorticoid and antibiotics.

**Key words:** Haemopoietic stem cell transplantation; Hospital infection; Pathogenic microorganism; Total environment protection

造血干细胞移植作为一种治疗恶性血液病的手段已日趋成熟<sup>[1]</sup>,但由于新的耐药菌株的不断出现,医院感染成为造血干细胞移植术后患者死亡的主要原因之一<sup>[2]</sup>。医院感染是临床医学各科的共同课题,其发生发展取决于病原菌、宿主的免疫功能状态及抗生素三者之间的动态平衡。造血干细胞移植术后患者合并感染有其特殊性:(1)进展迅速,病情危重;(2)症状和体征不典型,有时发热为感染的唯一症状;(3)病原学检查和血清学检查阳性率低;(4)多种病原菌同时存在,容易形成混合感染。国内外很多学者试图通过控制医院感染来提高干细胞移植的成功率,但效果并不理想。通过对我院 21 例患者造血干细胞移植术后医院感染的回顾研究和流行病学调查,分析造血干细胞移植术后医院感染的高危因素,探讨其防治策略,现总结报道如下。

### 1 材料和方法

**1.1 一般资料** 采用回顾性调查方法,调查我院行造血干细胞移植的 21 例患者,其中男 13 例,女 8 例,年龄 12~56 岁,平均年龄 31.3 岁,男女比例为 1.6:1。

**1.2 病例资料** 21 例患者中慢性粒细胞白血病(CML)4 例,急性粒细胞白血病(M1)2 例,急性早幼粒细胞白血病(M3b)1 例,急性粒单细胞白血病(M4a)1 例,急性粒单细胞白血病(M4c)1 例,急性单细胞白血病(M5a)1 例,急性淋巴细胞白血病(L1)3 例,急性淋巴细胞白血病(L2)1 例,急性淋巴细胞白血病(L3)1 例,多发性骨髓瘤 3 例和恶性淋巴瘤 3 例。

**1.3 诊断标准** 21 例患者均经 MICM 分类证实为恶性白血病,诊断标准参考张之南等主编的



第二版《血液病诊断及疗效标准》<sup>[3]</sup>。医院感染按美国疾病控制中心（CDC）诊断标准，入院时不存在也不处于潜伏期而 48h 后发生的感染确认为医院感染。

**1.4 病原菌分离培养** 标本送检验科，按常规方法对病原菌进行分离培养。

**1.5 统计学处理** 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。医院感染危险因素用 Logistic 多元回归方程分析。

## 2 结果

**2.1 术后医院感染发生率及死亡率** 21 例患者中 15 例发生感染，感染率为 71.4%。因医院感染引起直接死亡者 1 例，占 4.8%；引起间接死亡者 1 例，占 4.8%。

**2.2 术后医院感染部位** 15 例感染者中，肺部感染最多，占 40.0%；血液感染次之，占 20.0%，具体见表 1

**2.3 术后医院感染病原菌检查** 15 例感染者中共培养分离出病原微生物 19 株，其中肺炎克雷伯菌 5 株，占首位；其次为曲霉菌（表 2）。12 例患者为单一菌株感染；3 例为混合感染，其中一例培养出肺炎克雷伯菌、表皮葡萄球菌和白色念珠菌，一例培养出表皮葡萄球菌和阴沟肠杆菌，另一例培养出大肠埃希菌和热带念珠菌。

表 1 医院感染部位分布

感染部位	感染例数	构成比 (%)
肺 部	6	40.0
血 液	3	20.0
胃肠道	2	13.3
泌尿道	1	6.7
腹 腔	1	6.7
皮 肤	1	6.7
其 他	1	6.7

表 2 病原微生物培养种属分布

种类	菌株数	构成比 (%)
肺炎克雷伯菌	5	26.3
曲霉菌	3	15.8
大肠埃希菌	2	10.5
白色念珠菌	2	10.5
铜绿假单胞菌	2	10.5
阴沟肠杆菌	1	5.3
酵母样真菌	1	5.3
肺炎球菌	1	5.3
表皮葡萄球菌	1	5.3
奈色球菌	1	5.3

**2.4 术后医院感染的高危因素** 21 例患者造血干细胞移植术后均使用抗生素，6 例没有医院感染的任何临床表现，多次血培养也未查出病原微生物，提示未发生医院感染。其余 15 例均先经验使用抗生素，待病原微生物培养回报后，根据药敏结果及时调整抗生素，1 例因肺部严重感染多种抗生素治疗无效死亡，1 例血液感染合并出血死亡，其余 13 例均经正确使用抗生素后，感染得以控制。综合分析 15 例患者引起医院感染的高危因素，引入 Logistic 多元回归方程，经过多次拟和，最终筛选出 5 个因素具有统计学意义，按相对危险大小依次为：各种侵入性操作如静脉插管、术后留置导尿管等、激素、抗生素的种类、造血干细胞移植的类型和患者一般状况评分。

### 3 讨论

造血干细胞移植术后机体免疫功能低下是感染增加的重要因素, 病因包括: (1) 细胞毒化疗药物、放疗及免疫抑制剂; (2) 糖皮质及类固醇激素; (3) 各种侵入性诊治操作, 如长期插入导管等。其中粒细胞缺乏是最重要的单一危险因素, 中性粒细胞绝对值 $\leq 0.5 \times 10^9/L$ , 持续时间大于 2 周是易发感染的重要参数。本组 21 例恶性血液病中 15 例发生医院感染, 感染率为 71.4%。因医院感染引起直接死亡者 1 例, 占 4.8%; 引起间接死亡者 1 例, 占 4.8%。

本研究发现的医院感染部位以肺部和血液居多, 感染的病原微生物以肺炎克雷伯菌为主, 因为该细菌为条件致病菌, 在人体抵抗力低下和免疫防御功能障碍时, 就可能成为致病性强而又耐药的菌种<sup>[4]</sup>, 当它们侵入肺脏和血液时就会引起严重的肺部感染和败血症。真菌感染也占较大的比例, 这与细菌的防治进展有一定的关系, 真菌最容易侵犯肺脏和消化道。造血干细胞移植术后机体免疫力低下, 更利于真菌生长并形成病灶, 真菌感染越来越来成为主要的致病及死亡原因<sup>[5]</sup>, 不过由于应用氟康唑进行有效的预防和治疗, 致死性念珠菌感染已不多见, 死于深部真菌病的患者绝大多数是曲霉菌感染所致, 曲霉菌的主要侵犯部位是肺脏。本研究发现有 3 例患者发生曲霉菌感染, 占有感染的 15.8%。

皮肤粘膜破损、鼻咽及呼吸道是病原微生物入侵的主要途径; 长期应用激素和光谱抗生素, 为病原微生物感染的高危因素。本研究发现, 静脉插管时间越长越容易合并医院感染。激素使用剂量越大、时间越长, 易导致医院感染。同样, 抗生素应用种类越多或频繁更换抗生素, 亦易导致二重感染, 故抗生素的应用要严格掌握适应症。

抗生素的治疗分为经验性治疗和针对性治疗。由于目前国内造血干细胞移植术后医院感染的病原微生物仍以革蓝氏阴性菌为主, 如肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和鲍氏不动杆菌等<sup>[6]</sup>, 所以经验性治疗除应考虑到致病菌外, 还要依据以下原则: 尽量选择杀菌性抗生素而非抑菌性药物、考虑药物的协同作用、足量足疗程、为针对性治疗做好准备。在对患者进行经验性治疗的同时, 应积极寻找病原菌, 并根据病原调整治疗方案, 这就是所谓的针对性治疗。在早期和合理应用抗生素的同时, 应加强基础疾病的治疗、提高机体免疫功能、预防并发症、注重全环境保护, 以减少造血干细胞移植术后医院感染的发生率, 提高患者的生存率。

### 参考文献

[1] Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, et-al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* 2006 ; 37 (5): 439-449.

[2] Vaidya SJ, Ortin M, Lopez-Duarte M, et-al. Haemopoietic progenitor cell transplantation in patients with previous history of invasive fungal infection. *Leuk Lymphoma.* 2005 ; 46 (8): 1143-1150.

[3] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 1998.

[4] 付志军, 刘厚钰. 克雷伯氏肺炎杆菌败血症 33 例临床分析[J]. *中华传染病杂志*, 1992, 10 (4): 240-241.

[5] 朱莉萍, 桂希恩. 医院深部真菌感染调查及其危险因素分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 1998, 8 (1): 28-30.

[6] 徐玲, 罗永艾. 鲍氏不动杆菌肺部感染及药物敏感性测定[J]. *中华医院感染学杂志*, 2000, 10 (3): 234-235.

3-28

## 血管通路方式的选择对健康供者外周血造血干细胞 单采产量影响的研究

陈惠珍 邹外一 张祥忠 陈运贤

中山大学附属第一医院血液内科 (510080)

**摘要:** 目的 探讨不同的血管通路方式对健康供者外周血造血干细胞 (peripheral blood stem cell, PBSC) 单采产量的影响。方法 应用血细胞分离机进行 PBSC 单采需建立两条血管通路, 一条作引血用的出路, 一条作回血用的回路。对 2000 年 1 月~2007 年 12 月在我院进行 PBSC 单采的 118 例健康供者根据两条血管通路方式组合不同分为四组: 肘静脉 (V)-肘 V 组 (40 例), 肘 V-前臂 V 组 (36 例), 前臂 V-前臂 V 组 (20 例), 肘 V-桡 V 组 (22 例)。观察各组 PBSC 采集的产量 (包括单个核细胞数 (MNC) 及 CD34<sup>+</sup> 细胞数)。结果 每例 PBSC 的产量分别为: 肘 V-肘 V 组, MNC  $5.31 \pm 2.29 \times 10^8/\text{kg}$ , CD34<sup>+</sup> 细胞数  $4.78 \pm 2.06 \times 10^6/\text{kg}$ ; 肘 V-前臂 V 组, MNC  $5.11 \pm 2.34 \times 10^8/\text{kg}$ , CD34<sup>+</sup> 细胞数  $4.34 \pm 1.99 \times 10^6/\text{kg}$ ; 前臂 V-前臂 V 组, MNC  $5.61 \pm 1.73 \times 10^8/\text{kg}$ , CD34<sup>+</sup> 细胞数  $4.60 \pm 1.42 \times 10^6/\text{kg}$ ; 肘 V-桡 V 组, MNC  $4.60 \pm 1.70 \times 10^8/\text{kg}$ , CD34<sup>+</sup> 细胞数  $4.05 \pm 1.50 \times 10^6/\text{kg}$ 。四组的 PBSC 产量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。结论 不同的血管通路方式不影响 PBSC 单采的产量。

**关键词:** 外周血造血干细胞; 单采; 产量; 血管通路方式

## The influence of the PBSC collection yield by choosing the different venous accesses in the healthy donors

CHEN Hui-zhen<sup>1</sup>, ZOU Wai-yi<sup>1</sup>, ZHANG Xiang-zhong<sup>1</sup>, CHEN Yun-xian<sup>1, 2</sup>

Hematology Department of the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China.

**Abstract: Objective** To investigate the influence of the PBSC collection yield by choosing the different venous accesses in the healthy donors. **Methods** Collection of PBSC by blood cell separator requires two venous accesses, one for outflow, one for inflow. 118 healthy PBSC donors performing PBSC collection between January 2000 and December 2007 in our hospital were divided into four groups according to the different venous accesses: ulnar vein (V)-ulnar V group ( $n=40$ ), ulnar V- antecubital V group ( $n=36$ ), antecubital V- antecubital V group ( $n=20$ ), ulnar V- radial V group ( $n=22$ ). The PBSC collection yield of four groups (including mononuclear cells (MNC) count and CD34<sup>+</sup> cells count) were observed. **Results** the ulnar V-ulnar V group, MNC  $5.31 \pm 2.29 \times 10^8/\text{kg}$ , CD34<sup>+</sup> cells  $4.78 \pm 2.06 \times 10^6/\text{kg}$ ; ulnar V- antecubital V group, MNC  $5.11 \pm 2.34 \times 10^8/\text{kg}$ , CD34<sup>+</sup> cells  $4.34 \pm 1.99 \times$

$10^6/\text{kg}$ ; antecubital V- antecubital V group,  $\text{MNC } 5.61 \pm 1.73 \times 10^8/\text{kg}$ ,  $\text{CD34}^+\text{cells } 4.60 \pm 1.42 \times 10^6/\text{kg}$ ; ulnar V- radial V group,  $\text{MNC } 4.6 \pm 1.7 \times 10^8/\text{kg}$ ,  $\text{CD34}^+\text{cells } 4.05 \pm 1.50 \times 10^6/\text{kg}$ . There' s no statistical difference of the PBSC collection yeild between four groups ( $P > 0.05$ ) . **Conclusion** Different venous accesses don' t affect the PBSC collection yeild in the PBSC healthy donors.

**Key Words:** Peripheral blood stem cell (PBSC); Collection; Yeild; Venous access

外周血造血干细胞 (peripheral blood stem cell, PBSC) 单采必须建立良好的血管通路。目前最简便易行且常规采用的血管通路方式是静脉穿刺<sup>[1]</sup>。根据 PBSC 健康供者的血管部位、充盈程度、弹性及血管固定程度, 静脉穿刺的方式一般可分为以下四种组合: 肘 V-肘 V, 肘 V-前臂 V, 前臂 V-前臂 V, 肘 V-桡 V。为探讨不同的血管通路方式是否对 PBSC 单采的产量产生影响, 我院 2000 年 1 月~2007 年 12 月对 118 例异基因 PBSC 健康供者 141 次 PBSC 单采进行分析, 报道如下。

### 资料与方法

1 一般资料 118 例均为我院 2000 年 1 月~2007 年 12 月进行 PBSC 单采的人类白细胞抗原 (HLA) 全相合的健康供者, 均为患者的同胞兄弟、姐妹。118 例中男 65 例, 女 53 例; 年龄 13 岁~52 岁; 体重 31.5kg~82kg。健康供者的干细胞动员采用粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)  $5\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  皮下注射, 在用药后第 5 天进行 PBSC 单采, 一次单采后细胞数未达到异基因造血干细胞移植 (allo-PBSCT) 成功阈值者 (allo-PBSCT 成功阈值为  $\text{MNC} > 4 \times 10^8/\text{kg}$ ,  $\text{CD34}^+\text{细胞数} > 2 \times 10^6/\text{kg}$ <sup>[2]</sup>) 于次日继续单采, 直至细胞数达标为止。118 例细胞数均达到 allo-PBSCT 成功阈值, 均获 PBSC 植入成功。

2 方法 (1) PBSC 单采方法。采用美国 Baxter 公司的 CS 3000 plus 血细胞分离机, 选择程序 8-干细胞单采程序进行单采。血流量  $40\text{mL} \sim 60\text{mL}/\text{min}$ ; 单次处理血量为供者的 2.0~3.0 个循环血量 ( $7500\text{mL} \sim 16000\text{mL}$ ); 单次单采时间为  $150\text{min} \sim 270\text{min}$ ; 每例单采次数 1~3 次, 其中 1 次单采细胞数达标者有 96 例, 2 次的 21 例, 3 次的 1 例。(2) 血管通路方式。分为以下四种组合方式: 肘 V-肘 V, 肘 V-前臂 V, 前臂 V-前臂 V, 肘 V-桡 V。单采前一天对供者的血管情况进行评估, 并拟定所要选择的血管通路方式。血管通路方式选择的原则是确保 PBSC 单采中有足够的血流量、尽可能增加供者肢体的可活动度。(3) 研究方法。观察、记录每组 PBSC 单采的产量, 包括 MNC 数、 $\text{CD34}^+$ 细胞数。(4) 统计学方法。应用 SPSS12.0 统计软件, 计量资料符合正态分布的数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间的 PBSC 产量的比较用单因素方差分析,  $\alpha = 0.05$ 。

### 结 果

四组不同血管通路方式 PBSC 单采的产量见表 1。

表1 四组不同血管通路方式 PBSC 单采的产量

血管通路方式	例数 (n)	单采前 WBC 数 ( $\times 10^9/L$ )	MNC 总数 ( $\times 10^8$ )	MNC/kg ( $\times 10^8/kg$ )	CD34 <sup>+</sup> 总数 ( $\times 10^6$ )	CD34 <sup>+</sup> /kg ( $\times 10^6/kg$ )
肘 V-肘 V	40	38.16 $\pm$ 8.96	307.38 $\pm$ 125.83	5.31 $\pm$ 2.29	276.64 $\pm$ 113.25	4.78 $\pm$ 2.06
肘 V-前臂 V	36	42.78 $\pm$ 14.43	303.36 $\pm$ 131.75	5.11 $\pm$ 2.34	257.86 $\pm$ 111.99	4.34 $\pm$ 1.99
前臂 V-前臂 V	20	36.76 $\pm$ 8.39	275.48 $\pm$ 97.67	5.61 $\pm$ 1.73	225.89 $\pm$ 80.09	4.60 $\pm$ 1.42
肘 V-桡 V	22	35.64 $\pm$ 12.18	245.89 $\pm$ 87.46	4.60 $\pm$ 1.70	216.38 $\pm$ 77.09	4.05 $\pm$ 1.50

四组间 PBSC 产量单因素方差分析结果  $P > 0.05$ , 无明显统计学差异。

## 讨 论

造血干细胞移植 (HSCT) 广泛应用于恶性与非恶性疾病的治疗, 尤其是 allo-PBSCT 由于其造血和免疫功能重建快, 移植物抗肿瘤作用 (GVTR) 能清除受体体内微小残余病灶、降低肿瘤复发, 被认为是治愈某些疾病的唯一方法<sup>[2-4]</sup>。PBSC 单采时要求建立两条血管通路, 一条引血用的出路, 一条回血用的回路。建立良好的静脉通路是 PBSC 单采顺利进行的关键。常用的血管通路有 4 种: 静脉穿刺、静脉切开、静脉插管及动静脉直接穿刺<sup>[1]</sup>。静脉切开由于损伤大, 导管管径细, 易至血流量不足, 现已很少应用。静脉插管的并发症除出血、心律失常、空气栓塞、中心静脉或心房穿孔、血流量不足外, 尚可引起感染、管路堵塞、血液动力学改变等<sup>[4-5]</sup>, 一般只适用于外周静脉条件非常差的患者。直接动静脉穿刺技术要求高, 容易形成局部血肿, 单采后需加压包扎, 压迫时间较长, 部分患者可形成假性动脉瘤, 并有破裂的危险, 仅在紧急情况下应用<sup>[5]</sup>。作为 PBSC 健康供者, 一般情况下外周静脉条件较好, 静脉穿刺是最常用、最安全、损伤最少的血管通路方式。常用的组合方式有 4 种: 肘 V-肘 V, 肘 V-前臂 V, 前臂 V-前臂 V, 肘 V-桡 V。

我们对 118 例 PBSC 健康供者按血管通路方式不同分为 4 组: 肘 V-肘 V 组, 肘 V-前臂 V 组, 前臂 V-前臂 V 组, 肘 V-桡 V 组。对 4 组 PBSC 单采产量进行比较, 结果发现 4 组的 MNC 数、CD34<sup>+</sup>细胞数均无明显差异。表明不同的血管通路方式不影响 PBSC 单采的产量。

在血管通路方式不影响 PBSC 单采产量的前提下, 临床上血管通路方式的选择应遵循舒适、穿刺侧肢体活动度尽可能大的原则。如, 供者 (尤其是男性供者) 前臂 V 条件好者, 可优先选择前臂 V-前臂 V 方式, 以避免肘 V 穿刺所致的肘关节制动情况。供者在 PBSC 单采过程中可适当活动肢体, 减轻肢体长时间制动所引起的麻木、胀痛不适感。如估计两条前臂 V 穿刺可能导致血流量不足的情况下, 也可选择肘 V-前臂 V 方式, 以此类推。

总之, 选择理想的血管通路方式对 PBSC 单采的顺利进行至关重要, 而单采前对供者的血管情况进行准确的评估, 拟定所要采用的方式, 是选择理想血管通路方式必不可少的步骤。

## 参考文献

- [1] 田兆嵩. 临床输血学. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 102
- [2] 陈运贤. 现代造血干细胞移植. 广东: 广东科技出版社, 2004: 52, 169-170
- [3] 王志国, 张伟杰, 范艳玲, 等. 异基因造血干细胞移植治疗白血病 20 例临床观察. 中国实用内科杂志. 2007;

27 (20): 163-1632

[4] Carausu L, Clapisson G, Philip I, et al. Use of totally implantable catheters for peripheral blood stem cell apheresis. *Bone Marrow Transplant*. 2007, 4 (5): 417-422

[5] Grifols JR, Ferra C, Sancho JM, et al. A case of non-lethal pulmonary air embolism after leukapheresis catheter removal. *J Clin Apher*. 2005, 20 (2): 93-94

[6] 赵卫红. 血液透析患者血管通路的选择、监测及其相关并发症的治疗—临时性血管通路选择制作、维护及并发症处理. *中国血液净化*. 2007, 6 (7): 358-360

### 3-29

## 非清髓异基因造血干细胞移植 治疗难治性阵发性睡眠性血红蛋白尿

许多荣<sup>1</sup> 李庆山<sup>2</sup> 朱康尔<sup>3</sup> 李娟<sup>1</sup> 邹外一<sup>1</sup> 童秀珍<sup>1</sup> 罗绍凯<sup>1</sup> 汪廷生<sup>1</sup> 黄珊<sup>1</sup>

1 中山大学附属第一医院血液科 (510080) 2 广州市第一人民医院血液科 (510180)

3 暨南大学附属华侨医院血液科 (510632)

**摘要:** 目的 探讨异基因造血干细胞移植 (allo-genetic haemopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT) 治疗难治性阵发性睡眠性血红蛋白尿 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 的近期疗效及其并发症。方法 4例经常规治疗无效的难治性 PNH 患者接受了 HLA 抗原位点全相合的外周造血干细胞 (peripheral blood stem cell, PBSC) 移植, 其中骨髓增生活跃的 3 例预处理方案为: 白舒菲 (Busulfan  $3.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -6 天~-5 天) + 氟达拉滨 (Fludarabine  $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -10 天~-5 天) + 兔抗人胸腺免疫球蛋白 (ATG, 即复宁  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -3 天~-1 天); 骨髓增生低下的 1 例预处理方案为: 环磷酰胺 (cyclophosphamide  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -6 天~-3 天) + 即复宁 ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -3 天~-1 天)。动态检测 STR (short tandem repeats)、酸溶血试验和红细胞 CD55/CD59 抗原表达分析移植后的近期疗效及其并发症。结果 4 例患者移植后中性粒细胞升至  $0.5 \times 10^9/\text{L}$  的时间平均为 19 天、血小板升至  $20 \times 10^9/\text{L}$  的时间平均为 52 天; 移植后 +40 天、+100 天 STR 显示 4 例均表现为完全嵌合体 (full donor chimaerism, FDC), 1 例患者 (病例 3) +140 天时 STR 显示为混合嵌合体 (mixed chimaerism, MC)、+190 天证实为植入失败 (graft failure, GF)。其余 3 例 +180 天时, 仍为 DC; +40 天时 4 例患者酸溶血试验均阳性, 到 +100 天均转变为阴性。+180 天时, 除 STR 显示为混合嵌合体的 1 例病人酸溶血试验再次转变为阳性外, 其余 3 例仍为阴性。红细胞 CD55/CD59 抗原的表达出现了与酸溶血试验一致的变化; 4 例患者均未发生急性移植物抗宿主病 (graft vs. host disease, GVHD) 及肝静脉闭塞病 (hepatic veno-occlusive disease, HOVD), 2 例发生局限性肝脏慢性 GVHD, 1 例发生右背部带状疱疹感染、1 例死于真菌性肺炎 (病例 1)。结论 Allo-HSCT 是治愈难治性 PNH 的有效手段, 但感染和植入失败是其主要的并发症。

**关键词:** 阵发性睡眠性血红蛋白尿; 异基因造血干细胞移植; 疗效; 并发症

## Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for refractory paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

XU Duo-rong, LI Qin-shang, ZHU Kan-er, LI Juan, ZOU Wai-yi, TONG Xiu-zhen, LUO Shao-kai, WANG Yan-sheng, HUANG Shan. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080. Department of Hematology, The First Municipal Hospital of Guangzhou 510180. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, JiNan University, Guangzhou 510632, China

**Abstract: Objective** To investigate the recent treatment effect and complications of allo-genetic haemopoietic stem cell transplantation (Allo-HSCT) for refractory paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). **Methods** Four patients with refractory PNH underwent HLA antigen-sites matched allo-genetic peripheral blood stem cell (Allo-PBSC): three patients with hypercellular marrow received Bu-Fludara-ATG (busulfan 3.2mg/kg/d for 2d, fludarabine 30mg/m<sup>2</sup>/d for 6d, and ATG 2.5mg/kg/d for 4d) for conditioning therapy and one patient with hypocellular marrow was conditioned with Cy-ATG (cyclophosphamide 50mg/kg/d for 4d and ATG 2.5mg/kg/d for 4d). Short tandem repeats (STR) and Ham's test and expression of CD55 and CD59 antigens in red blood cell were detected for analysis for the recent treatment effect and complications at post-transplant. **Results** The mean times of post-transplant to absolute neutrophil count over  $0.5 \times 10^9/L$  and platelets over  $20 \times 10^9/L$  in four patients were 19 days and 52 days respectively. Full donor chimerism was observed in all four patients at post-transplant day 40 and 100. One patient (case3) was confirmed mixed donor chimera by STR at post-transplant day 140 and engraft failure at post-transplant day 190 and the other three patients were still full donor chimerism at post-transplant day 180. Ham's test was observed positive at post-transplant day 40 and negative at post-transplant day 100 in all patients. At post-transplant day 180, Ham's test was still negative in three patients except positive in case3 with mixed chimerism. The expression of CD55 and CD59 antigens in red blood cell had the same alteration as Ham's test. No acute graft vs. host disease (aGVHD) and hepatic veno-occlusive disease (HOVD) was found in all patients. The hepatic limited chronic GVHD was observed in two patients. Herpes simplex virus infection happened in one patient and one patient (case1) died of fungal pneumonitis. **Conclusion** Allo-HSCT could eradicate refractory PNH clones and may cure the disease, but engraft failure and infection are its main complications.

**Key words:** paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, allo-genetic haemopoietic stem cell transplantation, treatment effect, complication

阵发性睡眠性血红蛋白尿 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 是一种获得性克隆性疾病, 主要发生机制是 PIG-A 基因发生了突变, 导致 PIG-A 蛋白生成减少或缺失, 进而导致 GPI

锚连蛋白（如补体调节蛋白 CD55、CD59）减少或缺失，从而使红细胞膜对补体异常敏感而被破坏<sup>[1-2]</sup>。临床表现以睡眠有关的、间歇发作的血红蛋白尿为特征，可伴有全血细胞减少或反复血栓形成。PNH 的治疗原则是急性期控制溶血发作、慢性期加强免疫抑制治疗。目前常规治疗尚不能对 PNH 提供根治性的治疗，尤其对反复治疗无效或严重贫血伴骨髓增生不良的 PNH 患者。基于 PNH 是一种克隆性疾病，近年来国外对一些有适应症的 PNH 患者采用了造血干细胞移植，并取得了很大的进展<sup>[3]</sup>，但国内少有报道。本文对 4 例难治性 PNH 患者进行了异基因造血干细胞移植（allo-genetic haemopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT），并观察了近期疗效和并发症，现报道如下：

## 资料与方法

### 一、病例资料

4 例经酸溶血试验（Ham' test）试验、糖水试验、蛇毒因子溶血试验和/或 CD55、CD59 抗原检测而确诊 PNH 的病例，经糖皮质激素、雄激素、环孢素多年反复治疗无效，并于 2001~2006 年在中山大学附属第一医院血液科、广州市第一人民医院血液科、暨南大学附属华侨医院血液科接受了 Allo-HSCT，患者的一般情况见表 1。

表 1 4 对供、受者一般情况及 HLA 配型

患者	性别	年龄 (岁)	骨髓增生 程度	诊断至移植 的时间(年)	移植前治疗	供者	年龄 (岁)	HLA 抗原位 点相合状况
1	男	35	活跃	11	CsA, PD, AN	无关供者	26	全相合 (一个基因位点不合)
2	男	21	活跃	6	PD, AN	胞姐	24	全相合
3	男	50	活跃	28	CsA, PD, AN	胞弟	43	全相合
4	男	38	低下	7	CsA, PD, AN	胞弟	32	全相合

CsA: 环孢素 A (Cycloporine A); P: 泼尼松 (prednisone); E: 雄激素 (androgen)

### 二、供者来源

供者既往均无结核、肝炎等其它传染病病史，移植前常规体格检查和实验室检查未发现特殊异常。1 例患者的 PBSC 来源于无关供者，HLA 抗原位点为全相合，有一个基因位点不合（HLA-B: 4403, 4413），其余 3 例患者的 PBSC 均来源于 HLA 全相合的同胞供者（见表 1）。

### 三、供者外周干细胞（PBSC）动员、采集与回输

供者用 G-CSF（惠尔血）300 μg/天皮下注射，-4 天开始，连续 5 天。第 5 天用 CS3000plus 血细胞分离机采集供者 PBSC。预处理后 48 小时，静脉输注供者 PBSC。+3 天左右、中性粒细胞  $< 0.5 \times 10^9/L$  时，开始予 G-CSF  $5 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  皮下注射。

### 四、预处理方案

病例 1、2、3 移植前骨髓穿刺检查提示骨髓增生活跃，其预处理方案为：氟达拉滨 (Fludarabine)  $30 mg \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$  静滴，-10 天~-5 天；白舒菲 (Busulfan)  $3.2 mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  静滴，-6 天~-5 天；



兔抗人胸腺免疫球蛋白 (ATG, 即复宁)  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -4 天~-1 天。病例 4 移植前骨髓增生低下, 其预处理方案为: 环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cy)  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -6 天~-3 天, ATG (即复宁)  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -3 天~-1 天。

### 五、移植常见并发症预防

急性 GVHD 预防: CsA  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -7 天开始, 无胃肠道反应后改  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  口服, 使 CsA 血浆浓度维持在  $200 \sim 300 \mu\text{g/L}$ , 若无 GVHD 发生, +50 天后开始减量; 甲氨碟呤 (MTX) +1 天  $15 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  静注、+3 天  $10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  静注、+6 天  $10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  静注; 霉酚酸酯 (MMF) 0.25 每日两次, +30 天停药。肝静脉闭塞病 (HOVD) 预防: 前列腺素 E2 (PGE2)  $20 \mu\text{g}$  静滴, 每日两次, +1 天开始, 共 28 天。巨细胞病毒感染预防: -7 天开始予更昔洛韦  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, 每日两次, +1 天开始改用阿昔洛韦 (ACV)  $200 \text{ mg}$  口服, 每日两次。

### 六、移植后近期疗效及并发症观察

在移植后+40 天、+100 天和+180 天分别检测①植入证据: 用短小片段重复序列 (short tandem repeats, STR) 多聚酶链反应 (PCR) 法分析 13 个位点 (Amelogenin, D5S818, FGA, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D8S-1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D19S433, vWA, TPOX, D18S51), 来判断供受者嵌合状态。②溶血标志: Ham's test 和红细胞 CD55、CD59 抗原检测。③移植后常见并发症: 从移植后第一天开始观察患者有无急慢性移植物抗宿主病 (graft vs. host disease, GVHD)、肝静脉闭塞病 (hepatic veno-occlusive disease, HOVD)、出血性膀胱炎 (haemorrhagic cystitis, HC)、口腔炎和感染等并发症。

## 结 果

一、移植后造血重建 以停用 G-CSF 情况下中性粒细胞 (ANC)  $>0.5 \times 10^9/\text{L}$  维持 3 天以上和血小板 (PLT) 在无输注情况下  $>20 \times 10^9/\text{L}$  维持 5 天以上作为标准来判断临床造血重建。病例 1、2、3、4 接受供者外周 MNC 的细胞数和  $\text{CD}34^+$  细胞计数见表 2。中性粒细胞升至  $0.5 \times 10^9/\text{L}$  的时间分别为+13 天、+29 天、+15 天、+19 天, 平均为 19 天; 血小板升至  $20 \times 10^9/\text{L}$  的时间分别为+41 天、+28 天、+92 天、+48 天。平均为 52.3 天。

表 2 4 例 PNH 患者接收供者 PBSC 的数量及移植后造血重建时间

病例	患者接受供者细胞数 ( $\times 10^6/\text{kg}$ )		造血重建时间 (天)	
	MNC	$\text{CD}34^+$	$\text{ANC} > 0.5 \times 10^9/\text{L}$	$\text{PLT} > 2.0 \times 10^9/\text{L}$
1	5.2	3.6	+13	+41
2	3.7	3.1	+29	+28
3	5.0	3.0	+15	+92
4	7.4	5.5	+19	+48
平均值	5.33	3.8	19.0	52.3

二、近期效果观察 根据患者移植后血象改变及时检测 STR 及溶血标志。结果显示: +40 天、+100 天 STR 显示 4 例患者均表现为完全嵌合体 (full donor chimaerism, FDC)。病例 3 患者 +140 天 STR 显示为混合嵌合体 (mixed chimaerism, MC)、+190 天证实为植入失败 (graft failure, GF)。其余 3 例+180 天时, 仍为 DC (其中 1 例在+195 天时死于真菌性肺炎, 另外 2 例仍在随访中)。

+40 天时 4 例患者酸溶血试验均阳性，到+100 天均转变为阴性，表明患者体内的红细胞均转变为供者来源；+180 天时，病例 3（STR 表现 MC）酸溶血试验再次转变为阳性，提示移植物有被排斥的可能。红细胞 CD55/CD59 表达出现了与酸溶血试验一致的变化。

表 3 4 例患者移植后近期效果指标变化情况

病例	STR			酸溶血试验			红细胞 CD55/CD59 表达		
	+40 天	+100 天	+180 天	+40 天	+100 天	+180 天	+40 天	+90 天	+180 天
1	FDC	FDC	FDC (+195 天死亡)	+	-	-	下降	正常	正常
2	FDC	FDC	FDC	+	-	-	下降	正常	正常
3	FDC	FDC	+140 天 MC, +190 天 GF	+	-	+	下降	正常	下降
4	FDC	FDC	FDC	+	-	-	下降	正常	正常

DC: donor chimaerism, MC: mixed chimaerism, GF: graft failure

三、移植后并发症及存活状况 4 例患者均未发生 aGVHD、HOVD 及 HC；2 例发生局限性肝脏 cGVHD；2 例出现轻度口腔炎；2 例患者发生真菌性肺炎（其中病例 1 死亡）、1 例发生右背部带状疱疹感染。除 1 例患者死亡外，其余均在随访中。

表 4 4 例患者移植后并发症及存活状况

病例	主要并发症						目前生存情况
	aGVHD	cGVHD	HOVD	感染	HC	口腔炎	
1	无	肝（局限性）	无	肺部真菌	无	轻度	+195 天死于肺部感染
2	无	肝（局限性）	无	背部带状疱疹	无	轻度	40 个月（存活）
3	无	无	无	肺部真菌	无	无	8 个月（存活）
4	无	无	无	无	无	无	67 个月（存活）

## 讨 论

PNH 是一种慢性克隆性疾病，糖皮质激素、雄激素和免疫调节剂等常规治疗只能使部分患者得到控制，仍有部分患者对常规治疗无效或复发而发展成为难治性 PNH。对于难治性 PNH 除行异基因造血干细胞移植外，目前尚无较好的方法。由于 PNH 经常规治疗 5 年的总生存率可达 78%<sup>[4]</sup>，以及早期预处理方案不成熟导致较多的移植并发症，所以到 2000 年为止，全世界接受异基因造血干细胞移植的 PNH 病例尚未超过 100 例<sup>[5]</sup>，在此方面积累的经验也不充足。但近几年来，随着移植技术的提高，国外越来越多的移植中心进行了 PNH 的移植治疗，并取得了明显的结果 Lee<sup>[6]</sup>，这为难治性 PNH 的根治性治疗提供了希望。

由于接受异基因 HCST 的 PNH 总例数不多，到目前为止，对供者的选择和预处理方案尚无统一的标准。国际骨髓移植登记处的最大宗研究报道<sup>[7]</sup>：48 例供者来源于同胞全相合的患者其 5 年的生存率为 56%，7 例来源于父母单倍体移植患者只有 1 例存活。本文病例 1 的 PBSC 来源于无关供者且有一个基因位点不合，因为治疗 cGVHD 长期应用了免疫抑制剂，最终导致真菌感染而死亡，所以对 PNH 患者最好采用同胞全相合移植。PNH 预处理方案主要有清髓性方案<sup>[7]</sup>（Cy 联合 TBI 或 Busulfan）和清髓性方案<sup>[6]</sup>（Busulfan 联合 Fludarabin 和 ATG）两种，但目前尚无这两种方案疗效的比较。考虑到清髓性方案的毒副作用和 PNH 慢性自然病程，采用非清髓性方案具有一定的优点<sup>[6]</sup>，但对 PNH 合并再生障碍性贫血的患者（PNH-AA 综合症）患者最好采用非清髓性方案<sup>[6, 8]</sup>。

本文中 4 例患者均采用了非清髓性方案，早期均获得了植入成功而且没有出现严重的毒副反应。结合其它移植病种的结果，我们建议对 40 岁以下、身体状况较好患者采用清髓性方案，对 40 岁以上、身体状况较差的患者采用非清髓性方案。

PNH 移植的常见并发症和其它恶性血液病移植一样，主要表现为感染、GVHD、出血性膀胱炎，但又有些区别：植入失败和感染发生率的较高，而 GVHD 发生率较低。本文 4 个病例中就有 1 例发生植入失败，Saso<sup>[7]</sup>也曾报道此现象，尤其发生在单倍体移植的患者中，此机理尚不清楚，可能与骨髓微环境中粘附分子表达异常有关。为了防止植入失败，我们曾在对 1 例骨髓纤维化合并巨脾的患者行异基因外周造血干细胞移植的过程中，采用了细胞因子序贯治疗（G-CSF+TPO+IL-11，）取得稳定的植入成功（资料另报道），对 PNH 患者也可尝试此方法；较高的感染发生率可能与预处理方案中 ATG 应用有关，因为 ATG 具有较强的免疫抑制作用。为了预防感染，定期应用丙种球蛋白，尤其在移植后 4~6 个月期间显得非常必要。本文 4 个病例中，无 aGVHD 发生，只有 2 例发生局限性 cGVHD，这与 ATG 和 Fludarabin 免疫抑制密切相关。而血性膀胱炎、口腔炎等其它并发症发生率较低主要与非清髓性方案的毒副反应降低有关。

总之，异基因造血干细胞移植能彻底清除 PNH 克隆，是治疗 PNH 有效的手段，尤其适合常规治疗无效的难治性 PNH 患者。但移植过程中要注意植入失败和感染等并发症。

#### 参考文献

- [1] Kinoshita T, Inoue N, Takeda J. Role of phosphatidy-linositol-linked proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria pathogenesis. *Annu Rev Med*, 1996; 47: 1-10
- [2] Rosse WF, Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 1995, 86: 3277-3286
- [3] Suenaga K, Kanda Y, Niiya H, et al. Successful application of nonmyeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol*, 2001, 29: 639-642
- [4] Socie G, Mary JY, Gramont H, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term follow up and prognostic factors. *Lancet* 1996, 348: 573-578.
- [5] Anna MR, Maria TVL, Teresa L, et al. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*, 2000, 85: 59-62.
- [6] Lee JL, Lee JH, Lee JH, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J haematol*, 2003, 71: 114-118.
- [7] Saso R, Marsh J, Cevreska L, et al. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*, 1999, 104: 392-396.
- [8] Suenaga K, Kanda Y, Niiya H, et al. Successful application of nonmyeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*, 2001, 29: 639-642.

3-30

## 异基因骨髓移植成功治疗原发性骨髓纤维化伴巨脾一例 并文献复习

许多荣 邹外一 陈惠珍 汪延生 黄珊 李娟 罗绍凯  
中山大学附属第一医院血液科 (510080)

**摘要:** 目的 观察异基因骨髓移植 (allogenic bone marrow transplantation, Allo-BMT) 治疗原发性骨髓纤维化 (primary myelofibrosis, PMF) 伴巨脾的效果及并发症。方法 1 例经干扰素治疗无法耐受的原发性骨髓纤维化合并巨脾的患者接受了同胞 HLA 全相合骨髓移植, 预处理方案为 Bu/Cy: 白舒菲 (Busulfan)  $3.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -7 天~-4 天, 环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cy)  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴, -3 天~-2 天, 移植后长期采用细胞因子联合治疗 (G-CSF+TPO+IL-11)。动态检测 STR (short tandem repeats) 分析其近期疗效并观察其并发症。结果 移植后+19 天中性粒细胞升至  $0.5 \times 10^9/\text{L}$ 、+92 天血小板升至  $20 \times 10^9/\text{L}$ , 但此期间白细胞和血小板一直不稳定, 需细胞因子联合治疗长期维持到+180 天, 血红蛋白从+20 天起一直能维持在  $70\text{g/L}$  以上; 骨髓增生度+60 天时显示低下、+120 天以后显示活跃; 脾脏自+40 天开始逐渐缩小, 至+270 天时脾脏由巨脾转变为轻度肿大 (甲乙线缩短 94%、甲丙线缩短 90%、丁戊线缩短 100%); STR 在+60 天、+120 天、+270 天时均显示为完全嵌合体 (full donor chimaerism, FDC)。移植后+22 天出现左下肺部真菌感染、抗真菌治疗有效。+290 天出现慢性广泛性移植物抗宿主病 (cGVHD), 抗 cGVHD 治疗后好转。移植过程中无 aGVHD、肝静脉闭塞病、出血性膀胱炎等其它并发症, 患者目前仍在随访中。**结论** 异基因骨髓移植是治疗原发性骨髓纤维化伴巨脾的有效手段, 细胞因子联合治疗对促进骨髓造血重建和维持长期植入有重要作用。

**关键词:** 原发性骨髓纤维化; 巨脾; 异基因骨髓移植; 细胞因子

## A Successful Case of Allogenic Bone Marrow Transplantation for Primary Myelofibrosis Complicating Megalosplenia and Literature Review

*Xu Duorong, Zou Waiyi, Wang Yansheng, Huang Shang, Li Juan, Luo Shaokai*  
*Department of hematology and nephrology, the first affiliated hospital of Zhongshan university,*  
*Guangzhou, Guangdong, 510080 China*

**Abstract: Objective** To observe the effect and complication of allogenic bone marrow transplantation (Allo-BMT) for primary myelofibrosis (PMF) with megalosplenia. **Methods** One PMF patient with megalosplenia who was impossible to tolerate the treatment of interferon underwent sibling's HLA

antigen-sites matched Allo-BMT with the conditioning regiment of Bu/Cy: busulfan  $3.2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  for 4d and cyclophosphamide  $50\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$  for 2d and a long-term application of G-CSF combined TPO and IL-11 was performed. Short tandem repeats (STR) was periodically detected for the recent treatment effect and the complications of transplantation were also observed in detail at post-transplant. **Results** The neutrophils rose to  $0.5\times 10^9/\text{L}$  at post-transplant day 19 and platelets to  $20\times 10^9/\text{L}$  at post-transplant day 92. The number of neutrophils and platelets kept unstable and cytokines of G-CSF combined TPO and IL-11 were needed until at post-transplant day 180, but the hemoglobine could keep up to the lever of  $70\text{g}/\text{L}$ . Bone marrow hyperplasia showed inactive at post-transplant day 60 and active after post-transplant day 120. Spleen began to minificate since post-transplant day 40 and was almost normal at post-transplant day 270: A line 90% shorted, B line 94% shorted, C line 100% shorted. STR revealed full donor chimaerism (FDC) at post-transplant day 60, day 120 and day 270. A left lower pulmonary fungous infection happened at post-transplant day 22 and anti-eumycete treatment was effective. A chronic extensive graft versus host disease (cGVHD) was showed at post-transplant day 290 and it improved after counter-cGVHD treatment. There was no complications of aGVHD, hepatic veno-occlusive disease (HOVD), haemorrhagic cystitis (HC) and others. The patient is still being followed-up at present. **Conclusion** Allo-BMT is an effective means to cure PMF with megalosplenina and combined cytokines therapy is crucial for the maintenance of long-tem implantation.

**Keywords:** Primary myelofibrosis; Megalosplenina; Allogenic bone marrow transplantation; Cytokine

原发性骨髓纤维化 (primary myelofibrosis, PMF) 是骨髓中成纤维细胞增生、胶原纤维沉积伴有肝脾等器官髓外造血 (髓外化生) 为特征的疾病。目前主要使用干扰素、雄激素、羟基脲以及脾切除等治疗以改善骨髓造血功能、纠正贫血、出血及巨脾引起的压迫症状为目的, 尚不能对原发性骨髓纤维化提供根治性的治疗措施。近年来国外有异基因骨髓移植 (allogenic bone marrow transplantation, Allo-BMT) 治疗骨髓纤维化的报道<sup>[1]</sup>, 但尚未见伴有巨脾的 PMF 患者行异基因骨髓移植的报道。本文对 1 例 PMF 伴巨脾的患者进行了异基因骨髓移植, 取得了明显的疗效, 现报道如下:

## 1 对象和方法

**1.1 病例资料** 患者女性, 45 岁, 因“纳差乏力一年伴身目黄染两月”于 2006 年 12 月 25 日住入我院, 入院时查体: 发育正常, 营养较差, 体形消瘦, 神志清楚, 全身皮肤粘膜黄染, 无瘀斑出血, 浅表淋巴结未触及肿大, 心肺未见异常, 腹部膨隆, 全腹无压痛反跳痛, 肝肋下未及, 脾重度增大 (甲乙线  $17\text{cm}$ 、甲丙线  $21\text{cm}$ 、丁戊线  $+4\text{cm}$ )、质硬、边缘钝、无触痛, 腹水征阴性。既往史: 92 年行剖腹产时发现为乙型肝炎病毒携带者, 2006 年 12 月 17 日腹部 CT 示肝硬化、脾大, 2006 年 12 月 26 日血象:  $\text{WBC } 2.96\times 10^9/\text{L}$ 、 $\text{Hb } 77\text{g}/\text{L}$ 、 $\text{PLT } 102\times 10^9/\text{L}$ , 2007 年 1 月 4 日骨髓活检诊断为慢性特发性骨髓纤维化 (纤维化前期)。遂诊断为“原发性骨髓纤维化, 乙型肝炎肝硬化”, 予干扰素治疗, 但患者难以耐受, 于 2007 年 3 月在我院行同胞异基因骨髓移植。

**1.2 供者** 供者为患者胞弟, 40 岁, 既往无结核、肝炎等其它传染病病史, 移植前常规体格

检查和实验室检查未发现特殊异常。供、受者血型及 HLA 配型结果（见表 1）。

表 1 供、受者血型及 HLA 配型结果

	ABO	Rh (D)	HLA-A	HLA-B	-Bw	HLA-DRB1	DRw
供者	A	D	*11xx, *33xx	*35xx, *55xx	6	*13xx, *14xx	DRB3*
受者	A	D	*11xx, *33xx	*35xx, *55xx	6	*13xx, *14xx	DRB3*

**1.3 预处理方案及干细胞的采集与输注** 预处理采用 Bu/Cy 方案，白舒菲（Busulfan） $3.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴，-7 天~-4 天，环磷酰胺（cyclophosphamide, Cy） $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴，-3 天~-2 天。供者于 2007 年 3 月 23 日采集骨髓液共 1580ml 并输注患者，单个核细胞计数（MNC） $6.2 \times 10^8/\text{kg}$  患者体重， $\text{CD}34^+$  细胞数  $4.1 \times 10^8/\text{kg}$  患者体重。预处理后 48 小时，静脉输注供者骨髓液。

**1.4 常见并发症预防** 急慢性移植物抗宿主病（graft vs. host disease, GVHD）预防：CsA  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴，-7 天开始，+50 天后改  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  口服，CsA 血浆浓度维持在 200~300  $\mu\text{g}/\text{L}$ ；甲氨碟呤（MTX） $10 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  静注+1, +3, +6, +11 天；肝静脉闭塞病（hepatic veno-occlusive disease, HOVD）预防：前列腺素 E2（PGE2） $20 \mu\text{g}$  静滴，每日两次，-7 天开始，共 28 天。巨细胞病毒（CMV）感染预防：-7 天开始予更昔洛韦  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  静滴，每日两次，+1 天开始改用阿昔洛韦（ACV） $200 \text{ mg}$  口服，每日两次，移植后每周输丙种球蛋白 10 克/次。

**1.5 移植后细胞因子联合治疗** +3 天左右、中性粒细胞  $< 0.5 \times 10^9/\text{L}$  时，开始予 G-CSF  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  皮下注射，粒细胞造血重建后，间断使用 G-CSF  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  皮下注射，使中性粒细胞一直维持在  $1.8 \times 10^9/\text{L}$  以上；移植后 20 天（中性粒细胞恢复至  $0.5 \times 10^9/\text{L}$ ）开始使用促血小板生长素（TPO）和 IL-11 交替治疗（第一天 TPO  $1.5 \text{ 万 u} \cdot \text{d}^{-1}$ ，第二天 IL-11  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ），14 天为一个疗程。观察血小板变化情况，若血小板仍低于  $20 \times 10^9/\text{L}$ ，间隔两周后，可进行第二个疗程。

**1.6 移植后近期疗效及并发症观察** ①定期检测血常规、骨髓观察临床造血和骨髓增生程度。②在移植后+60 天、+120 天和+270 天分别检测植入情况：用短小片段重复序列（short tandem repeats, STR）多聚酶链反应（PCR）法分析 13 个位点（Amelogenin, D5S818, FGA, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D8S-1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D19S433, vWA, TPOX, D18S51），来判断供受者嵌合状态。③脾脏大小：在移植后+20 天、+60 天、+120 天、+180 天、和+270 天分别记录患者脾脏的甲乙线、甲丙线、丁戊线。④移植后常见并发症：从移植后第一天开始观察患者有无 aGVHD 或 cGVHD、HOVD、出血性膀胱炎（haemorrhagic cystitis, HC）、口腔炎和感染等并发症。

## 2 结果

### 2.1 临床造血重建

以停用 G-CSF 情况下中性粒细胞（ANC） $> 0.5 \times 10^9/\text{L}$  维持 3 天以上和血小板（PLT）在无输注情况下  $> 20 \times 10^9/\text{L}$  维持 5 天以上作为标准来判断临床造血重建。此患者中性粒细胞造血时间为+19 天，血小板造血时间为+92 天。此后一直采用细胞因子联合治疗，中性粒细胞计数维持稳定，

血小板稳定并能逐步上升（见表 2）。

表 2 移植后患者血象与骨髓象的变化

移植后时间（天）	血红蛋白（g/L）	中性粒细胞（ $\times 10^9/L$ ）	血小板（ $\times 10^9/L$ ）	骨髓增生度
+20	71	0.84	14	减低
+60	86	2.42	18	减低
+120	73	1.32	24	活跃
+180	84	2.48	29	活跃
+270	92	1.97	47	活跃

## 2.2 移植后患者脾脏大小的改变

移植后 20 天内，中性粒细胞虽已获得重建，但脾大小无任何变化；移植后 40 天时脾脏开始缩小，但在 40~120 天内缩小的速度较缓慢；120 天后脾脏缩小速度加快，至+140 左右，脾脏由高度肿大（巨脾）转变为中度肿大，但这一阶段，中性粒细胞和血小板仍不稳定，需细胞因子联合治疗；+270 天左右，脾脏由中度肿大脾脏由轻度肿大，中性粒细胞和血小板已较为稳定，已完全脱离细胞因子治疗。

表 3 移植后患者脾脏大小的变化

移植后时间（天）	脾脏大小（cm）		
	甲乙线	甲丙线	丁戊线
移植前	17	21	4
+20	17	21	4
+60	16	20	3
+120	14	17	1
+180	7	11	0
+270	1	2	0

## 2.3 移植后植入情况

移植后采用 STR 密切监测了患者的植入情况。结果显示：在细胞因子联合治疗的基础上，即使外周血象有所波动，但+60 天、+120 天和+270 天的 STR 结果均显示患者表现为完全嵌合体（full donor chimaerism, FDC）。（见表 4）

表 4 移植后 STR 检测结果

检测位点	供者	患者移植前	+60 天	+120 天	+270 天
Amelogenin	X, Y	X, X	X, Y	X, Y	X, Y
D5S818	10, 10	10, 10	10, 10	10, 10	10, 10
FGA	19, 22	19, 24	19, 22	19, 22	19, 22
D3S1358	15, 15	15, 15	15, 15	15, 15	15, 15
TH01	9, 9	9, 9	9, 9	9, 9	9, 9
D13S317	9, 9	9, 10	9, 9	9, 9	9, 9
D16S539	12, 14	10, 14	12, 14	12, 14	12, 14
D2S1338	19, 19	18, 19	19, 19	19, 19	19, 19
D8S1179	14, 14	14, 14	14, 14	14, 14	14, 14
D21S11	30, 32.2	30, 32.2	30, 32.2	30, 32.2	30, 32.2
D7S820	9, 11	11, 12	9, 11	9, 11	9, 11
CSF1PO	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12
D19S433	13, 13	13, 13	13, 13	13, 13	13, 13
vWA	14, 18	14, 14	14, 18	14, 18	14, 18
TPOX	8, 11	8, 10	8, 11	8, 11	8, 11
D18S51	15, 17	13, 14	15, 17	15, 17	15, 17
结果			FDC	FDC	FDC

FDC: full donor chimaerism

## 2.4 移植后并发症

患者未发生 aGVHD、HOVD 及 HC。移植后第 20 天发生左下肺真菌性肺炎，经抗真菌治疗 4 个月后得到控制。第 136 天发生肝脏的局限性 cGVHD，经治疗后也很快得到控制。患者目前身体状况良好，正在随访中。

## 3 讨论

PMF 的发病机制目前尚未完全阐明，近年倾向于认为是骨髓成纤维细胞异常克隆增殖的结果，属于一种反应性改变，与血小板衍生生长因子（PDGF）、巨核细胞衍生生长因子（MKDGF）、上皮生长因子（EGF）和转化生长因子（TGF-beta）等多种生长因子有关<sup>[2]</sup>。而最近的研究<sup>[3]</sup>提示 JAK2V617F 基因突变在慢性骨髓增殖性疾病中起重要作用。临床上以骨髓内胶原的异常沉积伴纤维化、脾肿大、髓外造血以及幼红幼粒细胞贫血为特征，起病缓慢，可无自觉症状或仅有乏力、多汗、体重减轻和脾脏肿大引起的压迫症状，平均生存期 3~5 年，引起死亡的主要原因为严重感染、出血、骨髓衰竭以及向白血病转化等。

五年以前，临床上用异基因干细胞移植（allogeneic haemopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT）治疗骨髓纤维化的资料非常有限，因为 Rajantie 等<sup>[4]</sup>曾认为 PMF 患者稠密的纤维化骨髓腔是骨髓移植的禁忌症，但随着移植技术的提高和减低剂量预处理方案的出现，愈来愈多的 PMF 患者开始接受 Allo-HSCT 治疗并取得了一定的疗效<sup>[5-6]</sup>，所以目前多数学者认为骨髓纤维化并不是干细胞移植的禁忌。Li 等<sup>[7]</sup>对一些 PMF 患者进行了 Allo-HSCT 治疗，并报道骨髓纤维化合并轻-中度脾肿大的患者移植前行脾切除者 3 年无病生存率 73%，未行脾切除者为 64%，统计学上两者无显著差异，但行脾切除者移植后中性粒细胞及血红蛋白恢复较快。Daniella 等<sup>[8]</sup>通过分析指出不支持为了提高移植后效果而在移植前常规行脾切除术。对合并巨脾的 PMF 患者是否能行 Allo-HSCT 治疗，目前存在争议而且报道的资料极少，本例患者移植前脾脏达到盆腔、表现为巨脾，未行脾切除术，而脾脏在移植后逐渐缩小到肋下 2CM，所以我们认为巨脾和移植前是否行脾切除不是关键问题，最重要的是要保持长期稳定的植入状态。植入失败是 PMF 患者移植的主要并发症，这与骨髓腔被严重纤维化以至骨髓微环境遭破坏有关。近年来研究表明，G-CSF 能调节黏附分子、趋化因子、蛋白水解酶等多种细胞因子的分泌以及骨髓基质细胞和造血细胞之间的相互作用，有利于造血干细胞顺利归巢和植入<sup>[9]</sup>；促血小板生成素（TPO）是体内调节血小板生成的首要调节因子，且具有显著的早期造血调控作用，与 G-CSF 合用具有协同作用<sup>[10]</sup>；而 IL-11 是一种血小板生长因子，可促进造血干细胞和巨核细胞的增殖，诱导巨核细胞的成熟分化，促进巨核细胞和血小板的生成，增加体内血小板计数并保持其功能。根据上述研究结果，我们对此例患者采用了细胞因子长期联合治疗，尽管患者存在重度脾肿大，但移植后粒细胞和血红蛋白造血重建未见明显延迟，而且也保持长期稳定的植入。

综上所述，异基因骨髓移植是治疗合并巨脾的 PMF 患者行之有效的有效手段，而采用细胞因子长期联合治疗更有利于移植后骨髓造血重建和长期植入。但进一步的疗效观察还需要大宗临床病例证实。



## 参考文献

- [1] Mats M, Vladimir L, Hareth N, et al. Different outcome of allogeneic transplantation in myelofibrosis using conventional or reduced-intensity conditioning regimens. *British Journal of haematology*, 2006, 135, 367-373.
- [2] Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, et al. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, 2000, 96 (10) : 3374-3380.
- [3] Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 2005, 7: 387-397.
- [4] Rajantie J, Sale GE, Deeg HJ, et al. Adverse effect of severe marrow fibrosis on hematologic recovery after chemoradiotherapy and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 1986, 67 (5) : 1693.
- [5] Nicolaus K, Tatjana Z, Heike S, et al. Pilot study of reduced-intensity conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelofibrosis. *British Journal of haematology*, 2005, 128, 690-697.
- [6] Damiano R, Giovanni B, Andrea B, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in intermediate- or high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, 2005, 105 (10) : 4115-4119.
- [7] Li ZH, Gooley T, Appelbaum FR, et al. Splenectomy and hemopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood*, 2001, 97 (7) : 2180-2181.
- [8] Daniella M.B.Kerbaux, Theodore A.Gooley, George E. Sale, et al, Hematopoietic Cell Transplantation as Curative Therapy for Idiopathic Myelofibrosis, Advanced Polycythemia Vera, and Essential Thrombocythemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2007, 13: 355-365.
- [9] Papayannopoulou T. Mechanisms of stem-/progenitor-cell mobilization: the anti-VLA-4 paradigm. *Semin Hematol*, 2000, 371 (Suppl 2) : 11-18.
- [10] Drachman JG. Role of thrombopoietin in hematopoietic stem cell and progenitor regulation. *Curt Opin Hematol*, 2000, 7 (3) : 183-190.

3-31

## 异基因造血干细胞移植 与免疫抑制治疗重型再生障碍性贫血的疗效比较

许多荣 刘俊茹 王荷花 邹外一 黄珊 李娟  
广州市中山大学附属第一医院血液科 (510080)

**摘要:** 目的 比较异基因外周造血干细胞移植 (allo-genenic peripheral stem cell transplantation, Allo-PBSCT) 与免疫抑制治疗 (immunosuppressive treatment, IST) 治疗重型再生障碍性贫血 (severe

aplastic anemia, SAA) 的疗效与并发症。方法 1993 年至 2008 年我科确诊的 25 例 SAA 患者接受了两种方案治疗: PBSCT 组 12 例接受了同胞 HLA 全相合的 PBSCT, 预处理方案为 Cy/ATG: 环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cy 50 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 静滴, -5 天~-2 天), 兔抗人胸腺免疫球蛋白 (ATG, 即复宁 2.5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 静滴, -5 天~-3 天); IST 组 13 例治疗方案为 ATG/CSA: ATG (即复宁 3.5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 静滴, 共 5 天), 环孢素 A (cyclosporine A 5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 口服, 从 ATG 应用结束后开始应用)。观察两种治疗方案的近期疗效、远期疗效与并发症。结果 PBSCT 组中性粒细胞升至 0.5 × 10<sup>9</sup>/L 的时间平均为 13.5 天、血小板升至 20 × 10<sup>9</sup>/L 的时间平均为 23.5 天; IST 组中性粒细胞升至 0.5 × 10<sup>9</sup>/L 的时间平均为 32.6 天、血小板升至 20 × 10<sup>9</sup>/L 的时间平均为 73.8 天, 两组之间中性粒细胞和血小板的造血恢复时间比较均有显著差异 ( $P < 0.05$ )。3 年生存率、总复发率和总生存率, PBSCT 组分别为 83.3%、0 和 83.3%, IST 组分别为 92.9%、38.5%和 48.6%, 两组之间的 3 年生存率和总生存率比较均无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但总复发率比较却有差异 ( $P < 0.05$ )。两种治疗方案的共同并发症主要是感染且以病毒感染为主, 包括巨细胞病毒 (CMV) 和带状疱疹病毒, 但这两种病毒感染的发生率比较无统计学差异 ( $P < 0.05$ )。不同的并发症是, 在 PBSCT 组主要表现为移植物抗宿主病 (graft vs. host disease, GVHD) 和口腔溃疡, 在 IST 组主要表现为过敏反应。结论 Allo-PBSCT 和 IST 都是治疗 SAA 的有效手段, 但 Allo-PBSCT 具有造血重建快、复发率低等优势, 可作为优先考虑。

关键词: 重型再生障碍性贫血; 异基因造血干细胞移植; 免疫抑制治疗; 疗效; 并发症

## 前言

重型再生障碍性贫血 (severe aplastic anemia, SAA) 是获得性骨髓造血功能衰竭, 目前发病机制尚不十分明确。以前由于缺乏有效的治疗方法, 死亡率极高。近年来, 异基因造血干细胞移植 (allo-genetic haemopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT) 与免疫抑制治疗 (immunosuppressive treatment, IST) 的应用, 使 SAA 患者的生存率明显提高, 部分患者已成为治愈可能。但对两种治疗方法远期疗效和并发症的比较, 目前报道的不多。本文追踪观察了 25 例自 1993 年至 2008 年接受了上述两种方法治疗 SAA 患者的疗效和并发症, 现报道如下:

### 1 病例资料和方法

#### 1.1 病例资料

25 名均经骨髓穿刺、骨髓活检、外周血象及临床症状而确诊的 SAA 患者, 于 1993 年 5 月至 2008 年 1 月在中山大学附属第一医院血液科接受了同胞异基因外周造血干细胞移植 (allo-genetic peripheral stem cell transplantation, Allo-PBSCT) 或免疫抑制治疗 (immunosuppressive treatment, IST)。其中移植 (PBSCT) 组 12 例, 免疫治疗 (IST) 组 13 例。两组患者治疗前常规体格检查和实验室检查未发现其它特殊异常, 乙肝病毒阳性患者治疗前需使 HBV-DNA 血清浓度降至  $1 \times 10^3$ /L 以下。两组病例的详细情况见表 1 和表 2。

#### 1.2 治疗方法

1.2.1 PBSCT 治疗方案: ①供者外周造血干细胞 (PBSC) 动员、采集与回输: 供者用 G-CSF (惠尔血) 300 μg/天皮下注射, -4 天开始, 连续 5 天。第 5 天用 CS3000plus 血细胞分离机采集供

者 PBSC, 移植组 12 名供者采集到的外周单核细胞(MNC)平均数为  $7.3 \times 10^9/L$  ( $5.0 \sim 12.5 \times 10^9/L$ )、 $CD34^+$  细胞平均计数  $5.4 \times 10^6/L$  ( $3.2 \sim 7.4 \times 10^6/L$ )。预处理后 48 小时, 静脉输注供者 PBSC。移植后 +3 天左右、中性粒细胞  $< 0.5 \times 10^9/L$  时, 开始予 G-CSF  $5 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  皮下注射。②预处理方案: 所有病例的预处理方案相同均为 Cy/ATG: 环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cy)  $50 mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  静滴, -5 天~-2 天, 兔抗人胸腺免疫球蛋白 (ATG 即复宁)  $2.5 mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  静滴, -5 天~-3 天。③移植常见并发症预防, 急性移植物抗宿主病 (graft vs. host disease, GVHD) 预防: 环孢素 A (cyclosporine A, CsA)  $2.5 mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  静滴, -7 天开始, 无胃肠道反应后改  $5 mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  口服, 使 CsA 血浆浓度维持在  $200 \sim 300 \mu g/L$ , 若无 GVHD 发生, +50 天后开始减量; 甲氨碟呤 (MTX) +1 天  $15 mg \cdot m^{-2}$  静注、+3 天  $10 mg \cdot m^{-2}$  静注、+6 天  $10 mg \cdot m^{-2}$  静注; 霉酚酸酯 (MMF) 0.25 每日两次, +30 天停药。肝静脉闭塞病 (hepatic veno-occlusive disease, HOVD) 预防: 前列腺素 E2 (PGE2)  $20 \mu g$  静滴, 每日两次, +1 天开始, 共 28 天。巨细胞病毒 (CMV) 感染预防: -7 天开始予更昔洛韦  $5 mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  静滴, 每日两次, +1 天开始改用阿昔洛韦 (ACV) 200 mg 口服, 每日两次。

1.2.2 IST 治疗方案: IST 组 13 例均采用同一方案 ATG/CSA: ATG (即复宁)  $3.5 mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  静滴, 共 5 天。ATG 结束后开始应用 CSA  $5 mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  口服, 至外周血象恢复到一定程度后逐渐减量, 在用 CSA 的同时, 可加用雄激素 (安特尔) 40mg 每日三次。CMV 感染预防: 移植前 7 天开始予更昔洛韦  $5 mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  静滴, 每日两次, ATG 结束后开始改用 ACV 200 mg 口服, 每日两次。

### 1.2.3 PBCST 和 IST 近期疗效和远期疗效观察

①近期疗效主要观察外周血象恢复时间: 对 PBSC 组病例从干细胞回输后第一天开始, IST 组病例从 ATG 应用结束后第一天开始, 观察两组病例外周血象的变化。对 PBSC 组病例在移植后第 40 天和 360 天分别用短小片段重复序列 (short tandem repeats, STR) 分析 13 个位点 (Amelogenin, D5S818, FGA, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D8S-1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D19S433, vWA, TPOX, D18S51) 来动态判断患者的植入情况。②用 3 年生存率、总复发率和总生存率评价两组病例的远期疗效。

### 1.2.4 PBCST 和 IST 并发症观察

对 PBSC 组病例, 从移植后第一天开始观察患者有无急性 GVHD、HOVD、出血性膀胱炎 (haemorrhagic cystitis, HC)、口腔炎和感染等并发症。对 IST 组病例, 主要观察即刻过敏反应、血清病和感染等并发症。

1.2.5 统计学分析: PBCST 和 IST 的①外周血象恢复时间采用 t 检验, ②3 年生存率和总复发率、CMV 和带状疱疹病毒感染发生率采用  $\chi^2$  检验, ③总生存率采用 Log-rank 检验和 Breslow 检验。

## 2 结果

### 2.1 PBSC 和 IST 组患者的一般情况和生存情况

PBSC 组 12 例病例中, 有 2 名患者发生死亡 (病例 2 于移植后第 5 个月死于肺部真菌感染、病例 8 于移植后 24 天死于脑出血), 其余 10 例无一例复发、均健康存活。IST 组 13 例病例中, 有 5 名患者出现病情变化: 病例 2 在免疫治疗后第 2 年 (第 31 个月) 出现复发、第 4 年死亡; 病例 8

在第 6 年出现复发、第 7 年死亡；病例 12 在第 9 年出现复发、第 11 年死亡、病例 6 和 9 分别在第 5 年和第 10 年出现复发、目前均采用环孢素 A 和雄激素维持治疗，其余 8 例目前健康良好（见表 1 和表 2）。

表 1 12 例行造血干细胞移植的 SAA 患者一般情况

患者	性别	年龄 (岁)	移植前治疗	HBs-Ag	供者	年龄 (岁)	HLA	随访时间 (月)
1	男	16	CsA, AN		胞兄	19	全相合	74 (存活)
2	男	24	CsA, AN	+	胞姐	26	全相合	5 (死亡)
3	男	29	CsA, AN, PD		胞兄	32	全相合	54 (存活)
4	男	16	CsA, AN		胞兄	18	全相合	87 (存活)
5	女	21	CSA, IVIG		胞妹	20	全相合	66 (存活)
6	男	18	CsA, AN		胞兄	23	全相合	118 (存活)
7	男	31	CsA, AN	+	胞姐	24	全相合	144 (存活)
8	男	38	CsA, IVIG		胞兄	29	全相合	1 (死亡)
9	男	22	CsA, AN, PD		胞兄	35	全相合	168 (存活)
10	女	47	CSA, AN		胞妹	39	全相合	112 (存活)
11	女	18	CsA, AN, IVIG		胞兄	24	全相合	156 (存活)
12	女	22	CsA, AN	+	胞姐	31	全相合	9 (存活)

CsA: 环孢素 A; P: 泼尼松 (prednisone); E: 雄激素 (androgen); IVIG: 静脉用丙种球蛋白

表 2 13 例行免疫抑制治疗的 SAA 患者一般情况

患者	性别	年龄 (岁)	移植前治疗	HBs-Ag	随访时间 (月)
1	女	23	CsA, AN, PD		38 (存活)
2	男	40	CsA, AN		43 (复发后死亡)
3	女	47	CsA, AN, PD		29 (存活)
4	女	13	CsA, AN	+	51 (存活)
5	男	19	CSA, AN, IVIG		114 (存活)
6	男	38	CsA, AN		76 (复发尚存活)
7	男	21	CsA, AN		14 (存活)
8	男	26	CsA, AN, IVIG		75 (复发后死亡)
9	男	24	CsA, AN	+	131 (复发尚存活)
10	女	21	CSA, AN, PD		146 (存活)
11	男	22	CsA, AN, IVIG		19 (存活)
12	男	33	CsA, AN, IVIG	+	127 (复发后死亡)
13	女	26	CsA, AN	+	11 (存活)

CsA: 环孢素 A; P: 泼尼松 (prednisone); E: 雄激素 (androgen); IVIG: 静脉用丙种球蛋白

## 2.2 PBSCT 和 IST 两种治疗方法的近期疗效比较

以停用 G-CSF 情况下中性粒细胞 (ANC)  $\geq 0.5 \times 10^9/L$  维持 3 天以上、血小板 (PLT) 在无输血情况下  $\geq 20 \times 10^9/L$  维持 5 天以上作为标准来判断外周血象恢复时间。结果发现: PBSCT 组中性粒细胞升至  $0.5 \times 10^9/L$  的时间平均为 13.5 天、血小板升至  $20 \times 10^9/L$  的时间平均为 23.5 天; IST 组中性粒细胞升至  $0.5 \times 10^9/L$  的时间平均为 32.6 天、血小板升至  $20 \times 10^9/L$  的时间平均为 73.8 天, 两组之间中性粒细胞和血小板的造血时间比较均有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 移植组和免疫治疗组病例治疗后外周血象恢复情况

分组	例数	ANC $\geq 0.5 \times 10^9/L$ 所需时间 (天)	PLT $\geq 2.0 \times 10^9/L$ 所需时间 (天)
PBSCT 组	12	13.5 $\pm$ 2.3	23.5 $\pm$ 4.1
IST 组	13	32.6 $\pm$ 3.5*	73.8 $\pm$ 6.2**

\* $P < 0.05$ : 表示两组之间 ANC  $\geq 0.5 \times 10^9/L$  所需时间的比较, \*\* $P < 0.05$ : 表示两组之间 PLT  $\geq 2.0 \times 10^9/L$  所需时间。

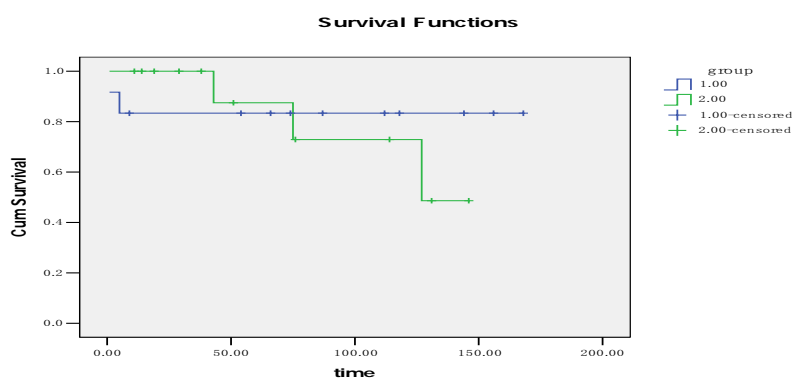
### 2.3 PBSCT 和 IST 两种治疗方法的远期疗效比较

3 年生存率、总复发率和总生存率, PBSCT 组分别为 83.3%、0 和 83.3%, IST 组分别为 92.9%、38.5%和 48.6%, 进一步比较两组资料发现: ① 3 年生存率经  $\chi^2$  检验, 两组之间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。②总生存率经 Log-rank 检验和 Breslow 检验分析发现: Log-Rank:  $P = 0.675 > 0.05$ 、Breslow:  $P = 0.695 > 0.05$ , 表明两组之间总生存率比较也无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。③两组之间总复发率经  $\chi^2$  检验有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。两组患者生存曲线见图 1。

表 4 移植组和免疫治疗组病例治远期疗效比较

分组	例数	3 年生存率 (%)	总复发率 (%)	总生存率 (%)
PBSCT 组	12	83.3 (10/12)	0 (0/10)	0.833 ± 0.108
IST 组	13	92.91 (2/13) **	38.5 (5/13) *	0.486 ± 0.227**

\* $P < 0.05$ : 表示两组之间总复发率的比较, \*\*  $P > 0.05$ : 分别表示两组之间 3 年生存率和 5 年生存率的比较。



(1: 移植组, 2: 免疫治疗组, 横坐标: 治疗后时间 (月), 纵坐标: 生存率)

图 1 移植组和免疫抑制治疗组治疗后的生存曲线 (K-M 估计)

### 2.4 PBSCT 和 IST 两种治疗方法的主要并发症

在两种治疗方法中感染发生率均较高, 且主要以病毒感染为主, 包括 CMV 和带状疱疹病毒, 但这两种病毒发生率在两种治疗方法中, 无明显统计学差异 ( $p < 0.05$ )。PBSCT 组其它并发症主要有: 2 例 (I 度 1 例、II 度 1 例) aGVHD、1 例局限性 cGVHD、1 例 HC、4 例口腔溃疡、未出现 HOVD。IST 组中有 4 例出现过敏反应, 均由 ATG 引起, 抗过敏治疗有效, 见表 5。

表 5 干细胞移植和免疫抑制治疗的常见并发症

分组	总例数	aGVHD	cGVHD	HC	口腔溃疡	HOVD	过敏反应	感染			
								CMV 血症	疱疹病毒	细菌	真菌
移植组	12	2	1	1	4	0	0	7	3	2	1
免疫组	13	0	0	0	2	0	4	5*	2*	1	0

\* $P < 0.05$ : 分别表示两组之间 CMV 血症 疱疹病毒感染发生率的比较

## 3 讨论

再生障碍性贫血是获得性骨髓造血功能衰竭, 主要表现为全血细胞减少和贫血、出血、感染等

症状。SAA 发生机制虽然目前尚不十分明确,但对其进行的研究却越来越多。有研究报道: DKC1 基因突变可导致端粒缩短,骨髓祖细胞衰老加速,导致骨髓衰竭<sup>[1]</sup>;对部分 SAA 患者的基因检测也发现了 TERC (telomerase RNA template gene, 端粒酶 RNA 模板) 或 TERT (Telomerase reverse transcriptase gene, 端粒酶逆转录酶) 基因的突变<sup>[2]</sup>;临床上也经常见到, AA 可与其它一些克隆性疾病(如 MDS、PNH 或白血病等)相互转化。可见,骨髓干细胞自身缺陷也可能是 SAA 发生的重要原因。同时也有学者认为:通过 I 型杀伤 T 细胞介导的免疫激活是 SAA 发生的重要环节,而且部分效应细胞(T 淋巴细胞)和靶细胞(造血干细胞)上相关的分子作用通路已被阐明<sup>[3]</sup>。总之,干细胞本身异常和机体免疫功能异常是 SAA 发生的两个重要因素。

针对干细胞异常和免疫功能异常这两个重要的致病因素,近年来造血干细胞移植及免疫抑制治疗的应用愈来愈广泛,使患者的生存率明显提高,部分患者已成为治愈可能,但两种治疗方法各有优势和不足之处。在理论方面:免疫抑制治疗只能中断免疫介导的损伤,但不能治疗骨髓造血干细胞本身的异常,所以仍有部分患者发生克隆性疾病(PNH、MDS、白血病)的可能。而通过造血干细胞移植,患者的造血干细胞和免疫相关细胞都被正常供者的细胞所取代,同时打断上述两个病理生理机制,从而治疗比较彻底。在临床方面:①干细胞移植组造血恢复时间明显低于免疫治疗组,尤其在血小板恢复方面表现更为显著。免疫抑制治疗通常不能使三系细胞在近期内完全恢复正常,约 12%患者到第 3 年仍需输注血制品。本文中血小板升至  $20 \times 10^9/L$  移植组只需 23.5 天,而免疫抑制则需 73.8 天,这就相应减少了出血的可能和降低了医疗费用。②两者总生存率无明显差异(移植组总生存率为 83.3%,免疫组总生存率为 76.9%,与文献报道的 94%<sup>[4]</sup>和 75%<sup>[5]</sup>相近),但在本文中,我们发现生存率与时间存在一定关系:在治疗后 5 年内,移植相关死亡率相对较高(2 例死亡),免疫治疗组死亡率则较低(1 例死亡);5 年以后,移植组死亡率极低(无死亡),而免疫治疗组有 3 例因复发而死亡,这从临床上证实了移植治疗的彻底性。③与移植治疗相比,免疫抑制治疗的近期并发症相对较少,但也存在远期并发症。两者近期共同的、主要并发症就是感染,其中以 CMV 血症和疱疹病毒感染发生率较高(本文的发生率分别为 58.3%、38.5%和 25.0%、15.4%),但经抗病毒治疗均能得到很好控制。不同的并发症就是干细胞移植可出现 aGVHD、cGVHD、HC、口腔溃疡和 HOVD 等多种并发症,而免疫抑制治疗的主要的并发症是即刻过敏反应,发生率可达 30.8%,如果及时处理,一般不会产生严重后果。但由于免疫抑制治疗的不彻底性,因而就需要长期性。欧洲多个中心的研究发现对免疫抑制治疗有效的患者中约 30%~40%需要额外的免疫抑制治疗<sup>[6]</sup>,而 CSA 长期应用可引起肾毒性(间质纤维化、肾小管萎缩)和高血压等并发症。④移植治疗也存在一定局限性,其中找到合适的供者成为最大的关键。一方面,由于独生子女的增加,同胞全相合供者明显减少。另一方面,SAA 患者病情往往较重,不能给我们提供足够的时间来寻找无关供者。这就使部分患者得不到移植治疗的机会。

综上所述,干细胞移植和免疫抑制治疗都是治疗 SAA 行之有效的方法,但移植治疗具有一定的优越性。若能找到合适供者,可优先考虑。

#### 参考文献

- [1] Fogarty PF, Yamaguchi H, Wlesten A, et al. Late presentation of dyskeratosis congenital as apparently acquired

aplastic anemia due to mutations in telomerase RNA. Lancet. 2003; 362: 1628-1630

[2] Yamaguchi H, Baerlocher GM, Lansdorp PL, et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. Blood. 2003; 102: 916-918

[3] Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. Blood, 2006; 108 (8): 2509-2517

[4] Locatelli F, Bruno B, Zecca M, et al. Cyclosporin and short-term methotrexate versus cyclosporine A as graft versus host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia given allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling: Results of a GITMO/EBMT randomized trial. Blood, 2000, 96: 1690-1697.

[5] Frickhofen N, Heimpel H, Kaltwasser JP, et al. Antithymocyte globulin with or without cyclosporine A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. Blood, 2003, 101: 1236-1242.

[6] Rosenfeld S, Follman D, Nunez O, Young NS. Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome. JAMA. 2003; 289: 1130-1135.

### 3-32

## 在非亲缘异基因造血干细胞移植中 KIR/HLA 受配体错配模式和 iKIR 表达的研究

何 军 鲍晓晶 陈子兴 吴德沛 孙爱宁 袁晓妮 邱桥成 姚 利 岑建农  
苏州大学附属第一医院 江苏省血液研究所 (215006)

**摘要:** **目的** 研究 KIR/HLA 的受配体模式和抑制性 KIR 的表达对非亲缘异基因造血干细胞移植的影响。**方法** 对 36 对供/受者移植前 (受者为 ALL18 例、AML10 例、CML8 例) 采用 PCR-SSP 方法进行 KIR 和 HLA 高分辨基因分型, 并同时分析 KIR/HLA 的受配体模式。对 3 例患者在移植后应用流式细胞术检测抑制性 KIR 的表达。所有病例随访至 2007 年 7 月。**结果** 36 对供/受者 KIR 受体错配模式中 KIR 基因单体完全相同 15 对; 供者 KIR 基因型包含受者 (GVH 方向) KIR13 对; 受者 KIR 基因型包含供者 (HVG 方向) KIR8 对。KIR-HLA 的受配体错配模式: 36 对供/受者中有 26 对供者的 iKIR/2DL1 无受者 HLA-C2 组配体; 35 对供者的 iKIR/2DL2/L3 均有受者 HLA-C1 组配体; 9 对供者的 iKIR/3DL1 无受者 HLA-Bw4 配体; 24 对供者的 iKIR/3D2 无受者 HLA-A3, A11。36 例移植患者中除 1 例移植失败外, 35 例均完全植入, 7 例死亡, 存活率 80.0%, 死亡原因为急性或慢性 GVHD 和移植后复发。无 KIR 受配体错配, aGVHD 发生率最高 (9/15), 死亡率为 (4/15); 在 GVH 方向, aGVHD 发生率为 (4/13), 死亡率为 (3/13); 在 HVG 方向, cGVHD 发生率高为 (3/8), 无死亡。在移植后 1~4 个月, ALL 患者 2DL1 的表达为 13.0%~16.6%; CML 患者 2DL1 表达为 1.8~6.2%; 另 1 例 CML 患者移植后 1~3 个月 2DL1 和 2DL2 表达为 4%和 12%, 4 个月由感染引发 cGVHD, 2DL1 和 2DL2 表达上升至 33.4%和 32.6%, 移植后 1 年下降至 7.6%和 10.3%。**结论** 由于在无 KIR 受配体错配模式中, 缺乏 KIR2DL1 这主要的 iKIR 异源反应活性, 而在 GVH 方向的供

者存在数目不同的 aKIR, 增加了移植后 GVHD、复发和死亡的危险性, CML 和 AML 移植后的生存率高于 ALL。因此, 移植前供/受者的 KIR/HLA 的受配体模式分析和移植后供者 NK 细胞的 iKIR 异源反应活性, 可预示无关供体造血干细胞移植时 GVHD 的发生, 对提高移植后的总生存率、无病生存率、降低移植后复发率具有重要意义。

**关键词:** 抑制性 KIR; 受配体模式; 移植; 造血干细胞

## Impact of the KIR receptor ligand model and inhibitory KIR on outcome following in HLA matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation with leukemia

*He Jun, Chen Zixing, Bao Xiaojing, Wu Dipei, Sun anning, Yuan Xiaoni, Qiou Qiaochen, Yao Li, Cen Jiannong (Jiangsu Institute of Hematology, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006 China)*

**Abstract: Objective** This study investigated the effect of KIR-HLA receptor-ligand mismatching and the expression of inhibitory KIR (iKIR) on the unrelated Allo-HSCT of leukemia. **Methods** The KIR genotypes of 36 patients of ALL ( $n=18$ ), AML ( $n=10$ ), and CML ( $n=8$ ) as well as their unrelated donors were obtained from the Database of China Marrow Donor Program. KIR genotyping was performed with PCR-SSP. The KIR and HLA mismatching status (receptor-ligand mismatch model) between recipients and donors was analyzed thereafter. The expression of iKIR was determined by flow cytometry analysis on recipients after HSCT. All the cases were followed up closely until July, 2007. **Results** Among all the donor/recipient pairs analyzed, there were 15 pairs manifesting the matched pattern with respect to the KIR genotyping though, graft-versus-host (GVH) KIR ligand-mismatched, 13 pairs, and host-versus-graft (HVG) KIR ligand-mismatched, 8 pairs. 26 recipients were lack of HLA-Cw2, 4, 5, 6, 15 ligand although iKIR/2DL1 was expressed on their corresponding donors. Similarly, 35 donors with iKIR/2DL2/L3 could recognized HLA-Cw1, 3, 7, 8, 12, 14 ligands in their recipients. iKIR/3DL1 was expressed on 9 donors although the correlated HLA-Bw4 ligand was absent on the recipients. iKIR/3DL2 was expressed on 24 donors although the correlated HLA-A11 ligand was absent on the recipients. Except of one case, 35 patients were successfully transplanted, in which seven patients were died, giving the survival rate of 80.0%. The cause of death was either acute/chronic GVHD or relapse. The frequency of acute GVHD (60.0%, 9/15), leading to death (26.7%, 4/15), was the highest in KIR receptor-ligand matched model. The incidence rate of acute GVHD and death was 30.8% (4/13) and 23.1% (3/13) in the GVH KIR ligand-mismatching, respectively. The incidence rate of chronic GVHD was 37.5% (3/8) and no death happened in the HVG KIR ligand-mismatching pattern. The expression of iKIR/2DL1 could be detected on ALL (13.0%~16.6%) and CML (1.8~6.2%) patients four month after HSCT. The expression of both iKIR/2DL1 (4%) and iKIR/2DL2 (12%) was found only in one



patient with CML three month after HSCT, increased to 33.4% and 32.6% accompanied by cGVHD, and dropped to 7.6% and 10.3% one year after HSCT. **Conclusions** The deficiency in iKIR/2DL1 according to the KIR-HLA receptor-ligand mismatching pattern together with the expression of a number of activating KIR in recipients increases the occurrence of GVHD, relapse, and death in unrelated HSCT. Analyses on KIR-HLA gene expression profiling provide could be useful in predicting the clinical outcome of unrelated Allo-HSCT in leukemia patients. Moreover, the overall and disease-free survival after HSCT could be improved due to preventing the development of GVHD.

**Key word:** inhibitory KIR, receptor-ligand model, transplantation, hematopoietic stem cell

### 3-33

## 输血相关急性移植物抗宿主病 3 例报告附文献复习

董秀娟 赵晓武 马红霞

郑州市第三人民医院血液科 (450000)

**摘要:** **目的** 探讨输血相关性移植物抗宿主病 (TA-GVHD) 的临床特征及防治措施。**方法** 总结 3 例 TA-GVHD 的临床特点, 并复习有关文献。**结果** 3 例 TA-GVHD 1 例死亡, 2 例经治疗痊愈。TA-GVHD 典型症状包括皮疹、肝功异常和全血细胞减少, 确诊需做皮肤活检。**结论** TA-GVHD 死亡率极高。90% 以上的患者死于难治性感染。糖皮质激素和 CsA 的及时应用有可能改善预后。γ 射线对血制品的辐照是目前预防 TA-GVHD 的有效方法, 可望改善预后。

**关键词:** 输血相关性移植物抗宿主病; 临床特征; 预防

**Abstract: Objective** To evaluate the clinical trait and prevention and cure of TA-GVHD. **Method** To summarize the clinical trait about three TA-GVHD patients and review relevant articles. **Result** The typical symptom includes rash, hepatic dysfunction and decrease of the whole blood cells; Dermal biopsy is needed to make a definite diagnosis. In our recording, one patient died, while the other two cured and recovered. The articles imply the TA-GVHD case fatality rate account to 80-90% and 90% patients died of infractable infections. **Conclusion** The mortality of TA-GVHD patients is extremely high, prompt use of glucocorticoid and CsA possibly improve patients' prognosis, nowadays r-ray treatment is the sole method recommended to prevent TA-GVHD. prompt diagnosis and treatment includes high dose of immunodepressant and feasible self-PBPC may improve the patients' prognosis.

**Key words:** TA-GVHD clinical trait prevention

输血相关性移植物抗宿主病 (Transfusion-associated graft-versus-host disease, TA-GVHD) 是由于输入含有活性淋巴细胞的异体血液所造成的疾病, 由于供者血中的 T 淋巴细胞进入受者体内不能被受体识别, 而攻击和破坏宿主器官和组织, 造成致死性输血并发症<sup>[1]</sup>。现将我院自 1998 年至 2006

年3例TA-GVHD病例资料及该病文献复习报告如下。

#### 病历资料

例1, 女, 30岁, 急性再生障碍性贫血合并颌面部感染。输注未经照射压积红细胞4u, 手工血小板8u支持治疗, 第3天颌面部感染症状加重, 出现高热、皮疹、腹泻、黄疸, 肝功能异常。给予“盐酸异丙嗪”肌肉注射、“扑尔敏”口服等抗过敏治疗, 后给予“泼尼松20mg/d”口服仍无效, 因多脏器功能衰竭死亡, 尸检皮肤病理检查诊断提示为GVHD。

例2, 男, 38岁, 急性粒细胞白血病。强化化疗结束第7天输注机采血小板(未经照射)后出现四肢皮肤瘙痒, 随后皮疹出现, 给予“地塞米松针15mg静注”无效; 第3天出现发热、黄疸并伴有腹泻, 遂给予“甲基泼尼松龙160mg/d”, 皮疹数目减少, 肝功能改善。

例3, 女, 42岁, 系统性红斑狼疮, CD34阳性细胞移植后3月。因月经来潮, 出血量较多, 有血块, 输注机采血小板(未经照射), 输注后第6天出现发热、皮疹、黄疸、腹泻、肝功能异常伴全血细胞减少, 取皮肤病理诊断为GVHD。给予“甲基泼尼松龙250mg”, 症状即明显好转, 甲基泼尼松龙渐减量, 35天后停药。

三例综合临床分析列于表1。

表1 3例TA-GVHD临床特征

序号	起病时间		发热	皮疹	腹泻	肝功能异常	全血细胞减少	皮肤病理	嵌合检测	抗GVHD治疗(起病第几天)	维持治疗(天)	转归
	(末次输血成分输血后天)	(末次输血成分输血后天)										
1	3	RBC+PLT	+/-	+	+	+	+/-	证实	染色体	5	-	死亡
2	5	PLT	+	+	+	+	+	未做	-	2	40	治愈
3	6	PLT	+	+	+	+	+	未做	-	1	35	治愈

注: RBC, 红细胞; PLT, 血小板; +, 有; -, 无

#### 讨论

输血相关性移植物抗宿主病(TA-GVHD)是输血最严重的不良反应之一<sup>[2]</sup>。TA-GVHD的发生须具备三个条件: 输注血液或血液成分中(移植物)具有免疫活性的淋巴细胞; 受者存在免疫缺陷不能排斥移植物等; 供、受者HLA相容或亲属供血<sup>[3]</sup>。

患者的发病风险主要取决于输入的异体淋巴细胞的数量和活性、患者免疫系统的易感性以及供血者与受血者组织相容性抗原的相合程度<sup>[4]</sup>。已确认的TA-GVHD高危人群有同种(异体)或自体骨髓移植受血者、先天性免疫缺陷综合症、子宫内输血、供者与受者HLA单倍型相同的受血者、霍奇金淋巴瘤。目前尚在观察的高危人群: 恶性血液病和实体瘤患者、器官移植受血者<sup>[3]</sup>。具有B细胞恶性疾病的病人发生的危险度尤高<sup>[5]</sup>。

目前对TA-GVHD认识有限, 据Wagner等采用数学模型结合HLA多态性估计, 无关供者输血发生TA-GVHD的风险率为1/17700~1/39000<sup>[6]</sup>。现今的观察统计表明TA-GVHD发病率为0.01%~0.1%。有关研究报道, HLA匹配的同胞之间骨髓移植, 移植物中T淋巴细胞 $10^5/\text{kg}$ , 不发生GVHD。

TA-GVHD临床表现较为复杂, 多数在输血后1~2周出现, 尤其是输注血小板后发生率高<sup>[5]</sup>。

主要受损的靶器官是皮肤、骨髓细胞、肠和肝<sup>[3]</sup>。表现为以皮肤、肝脏、消化道和骨髓功能障碍为特点的急性综合症<sup>[4]</sup>。确诊 TA-GVHD 需做皮肤活检。

TA-GVHD 至今仍无有效的治疗手段<sup>[3]</sup>。Aoun E 等报告 10 例病人全部死亡<sup>[1]</sup>。该病的病死率极高, 可达 80~90%, 90% 以上的患者死于难治性感染<sup>[7]</sup>。因此预防此病的发生显得极为重要。

防范 TA-GVHD 唯一有效的方法是灭活 T 淋巴细胞, 可以通过  $\gamma$  射线或 X 射线照射来进行。 $\gamma$  射线对血制品辐照是目前推荐使用的预防 TA-GVHD 的方法<sup>[7]</sup>。其机制在于抑制血制品中所含的淋巴细胞的增殖能力。Moriyama S 等研究证明 15Gy 的吸收剂量可以在直线加速器和  $\gamma$  射线仪中任何一点获得。在对已包装的血制品进行照射时要进行剂量校准, 以保证最低的受照射点的强度能达到 15Gy<sup>[8]</sup>。目前还没有该方法能造成细胞恶变和胞内病毒激活的证据。新的 T 细胞灭活方法还在实验阶段<sup>[5]</sup>。

本文 3 例患者, 均为 TA-GVHD 的易感人群, 于输注成分血后发生 TA-GVHD, 临床特征与文献报道相似。除例 1 因多脏器功能衰竭并严重感染死亡外, 余 2 例经甲基泼尼松龙冲击治疗痊愈。死亡的一例因当时对 TA-GVHD 认识有限, 体温再度上升判断为继发多重感染, 皮疹误诊为药物过敏, 腹泻误诊为应用广谱抗生素后合并肠道菌群失调, 黄疸误诊为高热、药物因素等多重因素所致。本组病例提示 TA-GVHD 的及时诊断, 糖皮质激素及时足量应用对此类患者至关重要, 有可能改善预后。

#### 参考文献

- [1] Aoun E, Shamseddine A, Transfusion-associated GVHD: 10 years' experience at the American University of Beirut-Medical Center. *Transfusion*.2003 Dec; 43 (12): 1672-62
- [2] Oto OA, Pavdas S, Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Eur J Intern Med*.2006 May; 17 (3): 151-63
- [3] 田兆嵩主编, 临床输血学, 人民卫生出版社, 2002 年第二版, 255-257
- [4] Bojanic I, Cepulic BG. Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Lijec Vjesn*.2004 Jan-Feb; 126 (1-2): 39-475
- [5] Anwar M, Bhatti FA. Transfusion associated graft versus host disease. *J Ayub Med Coll Abbottabad*.2003 Jul-Sep; 15 (3): 56-86
- [6] Wagner FF, Transfusion-associated graft-versus-host disease: risk due to homozygous HLA haplotypes. *Transfusion* . 1995 Apr; 35 (4): 284-91
- [7] Gupta A, Bansal D, Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Indian Pediatr*.2004 Dec; 41 (12): 1260-48
- [8] Moriyama S, Kurihara K, Evaluation of absorbed dose-distribution in the X-ray or gamma-irradiator for blood products. *Yakugaku Zasshi*.2001 Apr; 121 (4): 283-8

