

• 临床检验研究论著 •

青海高原汉族人群 HLA-DRB71 等位基因与原发性胆汁性肝硬化的相关性研究

殷 和, 李 军, 王 琼, 刘 彤

(中国人民解放军第四医院检验科, 青海西宁 810007)

摘 要:目的 探讨青海高原汉族人群 HLA-DRB71 等位基因与原发性胆汁性肝硬化(PBC)发生的相关性。方法 选取 2011 年 3 月至 2013 年 3 月于该院就诊的 PBC 患者 95 例(PBC 组), 健康体检且结果合格者 203 例(对照组)。以序列特异性引物 PCR 分析方法对两组的 HLA-DRB71 等位基因进行分析研究。结果 PBC 组和对照组 HLA-DRB71 * 07 基因频率分别为 36.84% 和 13.79%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); PBC 组其他 HLA-DRB71 等位基因的频率低于对照组($P < 0.05$); PBC 组 HLA-DRB71 * 07 阳性率与对照组比较, OR 值为 2.67, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 所有携带有 HLA-DRB71 * 07 等位基因的 PBC 患者均有 HLA-DRB71 * 0701 表达, 但 HLA-DRB71 * 0703、HLA-DRB71 * 0704、HLA-DRB71 * 0705、HLA-DRB71 * 0706 无表达。结论 HLA-DRB71 * 0701 基因的表达与 PBC 的易患性有关, 但不是独立危险因素。

关键词:人类白细胞抗原; 等位基因; 原发性胆汁性肝硬化; 易患性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.014

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)17-2303-02

The correlation between HLA-DRB71 allele and primary biliary cirrhosis of Han population in Qinghai plateau

Yin He, Li Jun, Wang Qiong, Liu Tong

(Department of Clinical Laboratory, the 4th Hospital of PLA, Xining, Qinghai 810007, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between HLA-DRB71 allele and primary biliary cirrhosis(PBC) of Han population in Qinghai plateau. **Methods** 95 PBC patients from March 2011 to March 2013 in the hospital were enrolled in the study (PBC group), 203 cases of healthy individuals were recruited as control group. By using a sequence specific primer PCR method, the HLA-DRB71 alleles in the two groups were analyzed. **Results** HLA-DRB71 * 07 gene frequencies in PBC group and control group were 36.84% and 13.79% respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In PBC group, the other HLA-DRB71 alleles' frequency were lower than that in control group ($P < 0.05$). There was a higher positive rate of HLA-DRB71 * 07 in PBC group than control group, and the OR value is 2.67 ($P < 0.05$). All the PBC patients carrying HLA-DRB71 * 07 alleles were HLA-DRB71 * 0701, but other subtypes such as HLA-DRB71 * 0703, HLA-DRB71 * 0704, HLA-DRB71 * 0705, HLA-DRB71 * 0706 were not found. **Conclusion** PBC Susceptibility might associated with HLA-DRB71 * 0701 alleles, but is not an independent risk factor.

Key words: human leukocyte antigen; allele; primary biliary cirrhosis; liability

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一类自身免疫性多基因疾病, 其临床表现是以肝内小胆管进行性、非化脓性、破坏性炎症为特征。许多证据表明遗传因素在其发病中具有重要作用^[1]。该病与自身免疫有关, 但其病因和确切的发病机制尚不完全清楚。全基因组相关性研究表明 PBC 的易感基因在高加索人、亚洲人、欧美人中的表达并不相同。中国人群 PBC 的遗传背景的研究并不多, 目前仅对 IL-12A、IL12RB2、TNFSF4、TNFSF1A、IRF5、VDR 等基因的相关性进行了初步研究。众所周知, 自身免疫性疾病发生发展过程中, 始终需要人类白细胞抗原(HLA)Ⅱ类分子的参与。HLA 基因在欧美人群中与 PBC 的发病、病情进展密切相关。不同的地区或种族其基因与疾病的相关性不完全一致, 至今尚未见我国西北高原汉族人群的相关报道。为探讨 HLA-DRB71 等位基因与 PBC 患者人群的相关性, 本研究采取了序列特异性引物聚合酶链反应(PCR)方法, 对青海高原汉族人群进行了 HLA-DRB71 等位基因与 PBC 相关性的研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2011 年 3 月至 2013 年 3 月于本院住院治疗的 PBC 患者 95 例, 作为 PBC 组, 其中男 12 例, 女 83

例, 年龄 31~66 岁。PBC 患者诊断符合中国中医药出版社肝硬化标准(2008)^[2]。PBC 患者 M2 抗体或者血清抗线粒体抗体阳性; 肝功能异常, 具胆汁淤积生化改变, 主要为 γ -谷氨酰转肽酶以及碱性磷酸酶升高, 且不具其他原因可解释; 排除甲、乙、丙、丁、戊、庚型的病毒性肝炎^[3]。选取本院同期健康体检人群且结果合格者 203 例作对照组, 其中男 20 例、女 183 例, 年龄 30~66 岁。纳入对象均为长期居住在西北地区的汉族人。

1.2 方法

1.2.1 外周血基因组的 DNA 提取方法 入组对象每人抽取 2.5 mL 血液, 添加枸橼酸钠抗凝血后备用。运用柱分离法和固相亲和法提取全血 DNA, 采取 Beckman 紫外分光光度仪测定 DNA 纯度以及浓度。 A_{280}/A_{260} 比值的范围在 1.6~1.8, 浓度为 75~200 $\mu\text{g/mL}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[4]。

1.2.2 序列特异性引物的基因分型 对 HLA-DRB71 等位基因进行分型, 采取低分辨 HLA-AB-DR 分型试剂盒。序列特异性引物的反应条件是: $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s 预变性, 总共 10 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 总共 20 个循环^[5]。选取等位基因具有显著性差异的标本, 使用该

公司高分辨 SSP-PCR 的试剂盒(购自上海迈程医疗器械有限公司)鉴定其亚型。OR 等于 PBC 组等位基因百分比与健康人群组等位基因百分比的比值^[6]。

1.2.3 结果判断 经过序列特异性引物的扩增后,进行琼脂糖凝胶电泳。20 min 后依据扩增阳性 DNA 条带,且参照格局表,对 HLA-DRB71 的等位基因或者亚型结果进行判断^[7]。

1.3 统计学处理 利用统计学软件 SPSS17.0 对实验数据进行统计分析。结果中计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分率表示,组间数据比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究对象一般资料比较 PBC 组和对照组的一般资料如性别、体质量、年龄等比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),表明具有可比性,见表 1。

表 1 PBC 组和对照组一般资料比较

组别	n	性别(n)		体质量 ($\bar{x} \pm s$, kg)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)
		女	男		
对照组	203	183	20	71.3 \pm 12.6	42.7 \pm 10.6
PBC 组	95	83	12	70.4 \pm 9.1	41.9 \pm 8.4

2.2 两组 HLA-DRB71 等位基因分布情况 PBC 组 HLA-DRB71 * 07 基因频率为 36.84%,对照组为 13.79%,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);PBC 组其他基因低于对照组($P < 0.05$);HLA-DRB71 * 07 OR 值为 2.67($P < 0.05$),表明 PBC 组 HLA-DRB71 * 07 阳性率是对照组的 2.67 倍且有统计学意义,见表 2。

表 2 两组 HLA-DRB71 等位基因的分布情况[n(%)]

等位基因	对照组(n=203)	PBC 组(n=95)	OR
HLA-DRB71 * 03	34(16.75)	15(15.79)	0.94
HLA-DRB71 * 07	28(13.79)	35(36.84)	2.67
HLA-DRB71 * 09	71(34.98)	32(33.68)	0.96
HLA-DRB71 * 11	29(14.29)	4(4.21)	0.29
HLA-DRB71 * 13	31(15.27)	4(4.21)	0.28
HLA-DRB71 * 14	31(15.27)	3(3.16)	0.21

2.3 PBC 组 HLA-DRB71 * 07 亚型分析情况 所有携带有 HLA-DRB71 * 07 等位基因的 PBC 患者均有 HLA-DRB71 * 0701 表达,未见 HLA-DRB71 * 0703、HLA-DRB71 * 0704、HLA-DRB71 * 0705、HLA-DRB71 * 0706 表达,DRB71 * 0701 基因与 PBC 易患性有关。

3 讨 论

PBC 的确切发病机制目前尚不完全明确。自身反应性 T 细胞通过其受体识别表达在胆管上皮细胞上的 HLA-抗原肽复合物后,向靶细胞释放穿孔素而发挥杀伤效应。HLA 具有多态性,不同 HLA 分子因结构差异,特别是由于 HLA 分子抗原结合部位氨基酸残基的不同,在一定程度上决定了其对自身抗原的亲合性,从而直接决定 HLA 分子抗原提呈并活化特异性 T 细胞的能力。PBC 具有遗传易患性,将自身抗原递呈给抗原特异性 T 细胞的 HLA 分子携带 PBC 的遗传易感基因,并且影响 PBC 的病情进展。已有的研究报道,遗传易患性和环境因素的协同作用导致 PBC 的发生^[8],而遗传因素可能是 PBC 易感的主导因素。目前通过系统基因组 SNP 关联性分析

和微卫星标记连锁分析等方法研究 PBC 的易感基因位点,发现了近 20 个 PBC 易感基因座,提示 PBC 为一多基因参与的复杂疾病。

如果在患者就诊时能完全确定两种因子中的一种或全部,则对 PBC 的预测和诊疗均有重要意义^[9]。现有研究已证实与 PBC 相关的遗传因子在染色体 6p2113 和 2q 上,包括 HLA-DRB1 * 08、CTLA-4 * G,IL-1RN-IL-1B 和 CASP-8 等^[10]。由此可知,PBC 发生是由众多因子一起互相作用的结果,HLA-DRB71 * 07 就是其中最为重要的一种。

本研究显示,PBC 组 HLA-DRB71 * 07 基因频率为 36.84%,与对照组的基因频率 13.79%相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);PBC 组其他基因频率均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);PBC 组 HLA-DRB71 * 07 阳性率是对照组的 2.67 倍;所有携带有 HLA-DRB71 的 PBC 患者均有 HLA-DRB71 * 0701 的表达,却未见 HLA-DRB71 * 0703、HLA-DRB71 * 0704、HLA-DRB71 * 0705、HLA-DRB71 * 0706 的表达,表明 PBC 易患性与 HLA-DRB71 * 0701 高度相关。本研究对 HLA-DRB71 * 0701 阳性以及 HLA-DRB71 * 0701 阴性的患者进行了分析比较,以评价 HLA-DRB71 * 0701 基因能否作为 PBC 的诊断依据,但最终的结果显示两者差异无统计学意义,HLA-DRB71 * 0701 可能是易感基因,但不是决定性的基因。

青海地区 PBC 患者可能具有 HLA-DRB71 * 0701 基因者较易发生 PBC,但这一因素不能确立为独立危险因素,PBC 的发生可能是 HLA-DRB71 * 0701 的表达与其他因素共同作用的结果。

参考文献

[1] 姜小华,仲人前,方晓云,等.原发性胆汁性肝硬化与 HLA-DRB1、DQB1 等位基因的相关性研究[J].中华肝病杂志,2004,12(7):436-436.

[2] 郭涛,鲁重美.原发性胆汁性肝硬化的免疫学进展[J].中华内科杂志,2001,40(11):780-788.

[3] 陈燕,周晔,邓安梅,等.中国东部汉族人群原发性胆汁性肝硬化与 HLA-DRB1 相关性分析[J].中国免疫学杂志,2006,22(12):1143-1145.

[4] Jonesd E,Donaldson PT. Genetic factors in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis[J]. Clin Liver Dis,2003,7(4):841-864.

[5] Selmi C, Mayo MJ, Bach N, et al. Primary biliary cirrhosis in monozy-gotic and dizygotic twins:genetics, epigenetics, and environment[J]. Gastroenterology,2004,127(2):485-492.

[6] 李远军,韩若艺,韩英.原发性胆汁性肝硬化发病相关危险因素研究进展[J].实用肝脏病杂志,2014,17(1):109-112.

[7] 张福奎,贾继东,崔儒涛,等.40 例原发性胆汁性肝硬化的临床特征[J].中华医学杂志:英文版,2002,115(6):904-908.

[8] 段继惠,刘哗华,穆红,等.原发性胆汁性肝硬化患者协同刺激分子程序性细胞死亡分子-1 的检测及意义[J].广东医学,2013,34(2):257-260.

[9] 钱珍,陈孙孝,任传路,等.原发性胆汁性肝硬化患者 miR-let-7b 的异常表达及其意义[J].中华肝病杂志,2013,21(7):533-536.

[10] 伍煜伦,赵青山,陈素文.原发性胆汁性肝硬化 30 例临床分析[J].广东医学,2012,33(24):3781-3782.