

# 云南省昆明市汉族儿童幽门螺杆菌感染 HLA-DRB1、DQB1 免疫遗传学分析

文革新 黄永坤 郝萍 李海林 戚勤 周丽芳

**【摘要】 目的** 探讨昆明市汉族幽门螺杆菌感染儿童 HLA-DRB1、DQB1 免疫遗传学特征。  
**方法** 应用聚合酶链反应-序列特异性引物方法,对 35 例昆明市汉族儿童幽门螺杆菌感染(实验组)和 37 名汉族健康儿童(对照组)进行 HLA-DRB1、DQB1 基因分型。**结果** 实验组幽门螺杆菌感染 HLA-DRB1 \* 0901、DQB1 \* 03032 基因频率明显低于对照组健康儿童(7.14% vs. 31.08%,  $\chi^2 = 13.16, P < 0.012$ ; 5.71% vs. 25.68%,  $\chi^2 = 10.68, P = 0.007$ )。其余等位基因的频率比较均无明显的差异。**结论** HLA-DRB1 \* 0901、DQB1 \* 03032 基因可能是昆明汉族儿童抵抗幽门螺杆菌感染的保护基因。

**【关键词】** 螺杆菌, 幽门; 感染; 免疫遗传特征

**Immunogenetic analysis of human leukocyte antigen DRB1, DQB1 locus among Han ethnic children with *Helicobacter pylori* infection in Kunming** WEN Ge-sheng, HUANG Yong-kun, HAO Ping, LI Hai-lin, QI Qin, ZHOU Li-fang. Department of Pediatrics, The first Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China

**【Abstract】 Objective** To explore the immunogenetic features of human leukocyte antigen DRB1, DQB1 locus and children with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in Han ethnic population in Kunming and its association with digestive diseases and *H. pylori* to better understand the immunogenetic features of the *H. pylori* infection. **Methods** Polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) method was used to study the HLA-DRB1, DQB1 allelic frequency distribution on 35 children with *H. pylori* infection and 37 healthy controls in Han ethnic population in Kunming. **Results** Allelic frequencies of HLA-DRB1 \* 0901, DQB1 \* 03032 in the *H. pylori* infection group were lower than those of the healthy control group (7.14% vs. 31.08%,  $\chi^2 = 13.16, P < 0.012$ ; 5.71% vs. 25.68%,  $\chi^2 = 10.68, P = 0.007$ ) but the rest alleles' frequencies did not show significant differences. **Conclusion** These result suggested that HLA-DRB1 \* 0901, DQB1 \* 03032 might protect the *H. pylori* infection in Han ethnic population in Kunming.

**【Key words】** *Helicobacter pylori*; Infection; Immunogenetic features

人类白细胞抗原(HLA)基因定位于第六号染色体短臂上,占人类整个基因组的 1/3000,是由一系列紧密连锁的基因座位所组成的最具有多态性的复等位遗传系统。迄今为止,已发现 70 多种疾病与 HLA 多态性相关联,其中包括幽门螺杆菌(Hp)感染。本研究应用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)方法对昆明市汉族儿童 Hp 感染与健康儿童对照进行 HLA-DRB1、DQB1 基因分型。探讨汉族 Hp 感染患者 HLA-DRB1、DQB1 免疫遗传特征,为阐述 Hp 感染患者的免疫遗传特征提供

参考资料。

## 对象与方法

1. Hp 感染诊断标准:参照中华儿科杂志编辑委员会、中华儿科学会消化感染组 2002 年广州会议制定的 Hp 感染诊断标准<sup>[1]</sup>及中华消化系病学会 Hp 感染协作组 1999 年三亚共识会制定的 Hp 感染科研诊断标准<sup>[2]</sup>。

2. 研究对象的选择:以云南省昆明市某中心小学 6~14 岁的学龄儿童为研究对象。各研究对象必须符合以下条件:父母以上三代均为汉族且互相间无亲缘关系;在当地出生且在当地生活 4 年以上;无严重心、肺、脑、肝、肾、皮肤、营养、遗传代谢、内分泌

基金项目:云南省教育厅研究基金资助项目(02ZY237)

作者单位:650032 昆明医学院第一附属医院儿科

第一作者现工作单位:313000 浙江省湖州市妇幼保健院儿科

及免疫缺陷病史;近期无抗生素、铋剂、离子泵阻滞剂、激素使用史(4周内)。对该校符合上述条件的153名儿童以整群抽样的方法取静脉血2~3 ml于EDTA抗凝管中,分离血浆并检测各研究对象的血Hp抗体;根据血Hp抗体结果将儿童分为阳性组(58名)和阴性组(95名);从以上两组中各随机抽取40名儿童行<sup>13</sup>C尿素呼吸试验,两者均阳性者诊断为Hp感染,列为实验组(共35例);两者均阴性者则为非Hp感染者(共37名),列为健康对照组;实验组平均年龄(9.6±2.1)岁,健康对照组平均年龄(9.7±2.3)岁,男女比1:1;两组年龄、性别比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 3. 主要试剂及实验方法:

#### (1) 血Hp抗体(IgG)检测及<sup>13</sup>C尿素呼吸试验:

①采用血Hp抗体(IgG)检测试剂盒(福建省三明市蓝波生物技术研究所产品,批号:200304016)。每个试剂盒包括一块包被有Hp固有抗原的试验板,主要成分为TBS缓冲液的A液和为胶体金包被的抗Hp-IgG抗体的B液各50 ml。按试剂盒说明书操作,即:分别从5℃的冰箱取出试验板复温至20~24℃,从-20℃的冰箱取出血浆复温至20~24℃;用生理盐水稀释血浆10倍,同时铺好试验板,加A液100 μl于试验板上的反应孔,待液体充分吸收;用专用样品吸管加稀释血浆200 μl于试验板上的反应孔,待液体充分吸收;去除蓝色过滤盖;加B液150 μl于试验板上的反应孔,待液体充分吸收;加A液100 μl于试验板上的反应孔,待液体充分吸收后观察结果。②采用<sup>13</sup>C尿素呼吸试验诊断试剂盒(<sup>13</sup>C-UBT)(北京嘉汇彬医药有限公司产品,批号:20030401),采集样本按试剂盒说明书操作,把采集的样本寄北京嘉汇彬医药有限公司技术部检测并反馈。

(2)基因组DNA提取:应用全血基因组DNA提取试剂盒在常温下快速提取基因组DNA。每个DNA提取试剂盒(由美国MO BIO Laboratories公司提供)包括含氯化铵的G1液90 ml,含去垢剂的G2液30 ml,含乙酸铵的G3液10 ml,100%的异丙醇30 ml,含70%乙醇的DNA自由水30 ml,含Tris的自由水10 ml,2 ml的微离心管200支;操作按试剂盒说明书进行。取全血300 μl到2 ml微离心管中,同时加入G1液900 μl;扭紧微离心管盖,上下倒转2次,并在室温下温育5 min,在温育过程中再上下倒转2次;13 000 r/min离心30 s,用微量移液器移去上清液,保留管底的小白块(保留20 μl的上清液在

管中);用振荡器振荡使管底小白块完全悬浮;加G2液300 μl,扭紧微离心管盖,用力振荡,使小白块完全溶解于G2液中;加G3液100 μl,扭紧微离心管盖,在振荡器上高速振荡15 s,并13 000 r/min离心3 min,用微量移液器移到上清液另一清洁的2 ml微离心管中;加100%的异丙醇300 μl,扭紧微离心管盖,上下倒转15次,并13 000 r/min离心1 min,小心倒去上清液,保留管底的小白团块,然后倒置离心管在滤纸上,以吸去离心管中的液体;加70%乙醇300 μl,扭紧微离心管盖,上下倒转洗涤5次,并13 000 r/min离心30 s,小心倒去上清液,保留管底的小白团块,然后倒置离心管在滤纸上,以吸去离心管中的液体;再13 000 r/min离心30 s,用微量移液器移去余下的上清液,保留管底的小白团块;加G4液100 μl,扭紧微离心管盖,并轻轻的振荡,使小白团块完全溶解于G4液中。到此,基因组DNA制作完成,将制备的DNA作好标签后放置在-20℃的冰箱中保存备用。注意事项:实验过程中必须严格遵守实验操作规程,带好手套;DNA放置在-20℃的冰箱中保存前用分子生物专用分光光度计检测DNA的浓度和纯度,如DNA的浓度低于60 ng/μl,纯度指标 $A_{260}/A_{280}$ 不在1.6~1.8之间,必须重新制备DNA。

(3)HLA-DRB1、DQB1基因分型:采用HLA-DR、DQ SSP基因分型试剂盒(由美国PEL-FREEZE CLINICAL SYSTEMS公司提供。批号:019-06201,包括HLA-DRB1 26对、DRB3/4/5 4对、DQB1 12对序列特异性引物和1个污染对照;引物由该公司合成)扩增HLA-DRB1、DQB1 DNA片段。每个PCR反应体系23 μl;循环条件参见表1;操作方法均按所附说明进行。从-20℃的冰箱中取出试剂板一块(两人份)、PCR-SSP buffer 两管、Taq酶、两个DNA样本复温;分别加去离子水110 μl及Taq酶4.4 μl(5 U/μl),充分混匀,并3000 r/min离心30 s;分别加上述混合液8 μl于试剂板上的第43孔中(污染控制孔);将待检的DNA各46 μl分别加于相应的PCR-SSP buffer管,混匀;加上述混合液各8 μl于试剂板上每孔(不包括污染控制孔);用专用封板纸封好试剂板;放入PCR扩增仪,将热平衡板放在试剂顶部,关闭PCR扩增仪盖,开始扩增;扩增后的标本放在4℃的冰箱中保存;用0.5×TBE制备2%的电泳胶,冷却到60℃时,每100 ml胶溶液加2 μl的浓度为10 mg/ml溴化乙锭;在电泳槽中铺好

胶后放置梳子,30 min后使用电泳胶;小心去掉 PCR 试剂板的密封纸,用 8 道移液器上下抽吸每孔的 PCR 产物两次,混均后加 6 μl 于电泳胶孔内;在 130 V 的电压下电泳 13 min;将电泳胶放置在凝胶成像系统中照相,并结合紫外灯下借助专用读板纸判读结果。要求:除污染对照外,所有的电泳道均应见分子量约 796 bp 的内控条带,阳性 DNA 条带应与试剂盒说明书的分子量对应。注意事项:严格遵守实验操作规则,防止样本交叉污染。

4. 统计学处理:等位基因频率用直接算法。实验组和对照组 HLA-DRB1 和 DQB1 等位基因分布均经 Hardy-Weinberg 平衡检验 ( $P > 0.05$ ),样本有代表性。两组各等位基因频率行  $2 \times 2$  四格表  $\chi^2$  检验,  $P$  行等位基因多项比较校正 ( $P_c$ ),以  $P_c < 0.05$  判定差异有统计学意义。

结 果

对实验组 35 例汉族 Hp 儿童及 37 名健康对照组进行了 HLA-DRB1、DQB1 基因分型;两组人群均检出 HLA-DRB1 \* 01、03、04、07、08、0901、10、11、12、13、14、15 等 12 种 HLA-DRB1 等位基因和 HLA-DQB1 \* 0201、0301、0302、03032、04、05、06 等 7 种 HLA-DQB1 等位基因,各等位基因分布见表 2、

表2 实验组与对照组 HLA-DRB1 等位基因分布及频率比较

等位基因	对照组 (n = 74)	基因频率	实验组 (n = 70)	基因频率	$\chi^2$ 值	P 值	$P_c$ 值
DRB1 * 01	1	0.0135	0	0	0.953	0.329	NS
DRB1 * 03	3	0.0405	1	0.0143	0.918	0.338	NS
DRB1 * 04	10	0.1351	16	0.2286	2.123	0.145	NS
DRB1 * 07	1	0.0135	5	0.0714	3.022	0.082	NS
DRB1 * 08	7	0.0946	9	0.1286	0.420	0.517	NS
DRB1 * 0901	23	0.3108	5	0.0714	13.160	<0.001	<0.012
DRB1 * 10	1	0.0135	1	0.1286	0.002	0.968	NS
DRB1 * 11	1	0.0135	3	0.0429	1.147	0.284	NS
DRB1 * 12	14	0.1891	15	0.2143	0.141	0.707	NS
DRB1 * 13	5	0.0676	3	0.0429	0.419	0.518	NS
DRB1 * 14	4	0.0541	1	0.0143	1.697	0.193	NS
DRB1 * 15	9	0.1216	6	0.0857	0.497	0.481	NS

注:  $n$  为该等位基因位点所检测出的等位基因总数,  $P_c$  等于  $P$  乘以该等位基因位点所检测出的等位基因种数。NS 为基因频率比较差异无统计学意义

表3 实验组与健康对照组 HLA-DQB1 等位基因分布及频率比较

等位基因	对照组 (n = 74)	基因频率	实验组 (n = 70)	基因频率	$\chi^2$ 值	P 值	$P_c$ 值
DQB1 * 0201	4	0.1891	7	0.1000	1.076	0.300	NS
DQB1 * 0301	22	0.2973	17	0.2429	0.540	0.462	NS
DQB1 * 0302	3	0.0405	6	0.0857	1.253	0.263	NS
DQB1 * 03032	19	0.2568	4	0.0571	10.680	0.001	0.007
DQB1 * 04	4	0.0541	8	0.1143	1.708	0.191	NS
DQB1 * 05	9	0.1216	10	0.1429	0.142	0.707	NS
DQB1 * 06	13	0.1757	18	0.2571	1.413	0.235	NS

注:同表 2

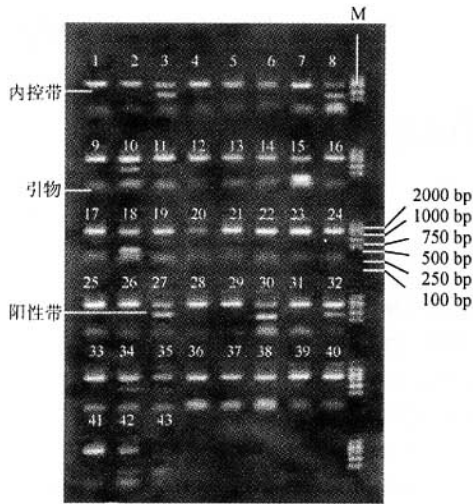
3;各等位基因频率比较经  $2 \times 2$  四格表  $\chi^2$  检验,  $P$  值并行等位基因多项比较校正 ( $P_c$ ),发现实验组 HLA-DRB1 \* 0901 基因频率明显低于对照组 (7.14% vs. 31.08%,  $\chi^2 = 13.16$ ,  $P_c < 0.012$ ), HLA-DQB1 \* 03032 基因频率明显低于健康对照人群 (5.71% vs. 25.68%,  $\chi^2 = 10.68$ ,  $P_c = 0.007$ );其他等位基因频率未发现差异。

表1 HLA-DRB1、DQB1 基因分型 PCR-SSP 扩增条件

循环	步骤	温度(°C)	时间(s)
1	1	96	60
5	1	96	25
	2	70	50
	3	72	45
21	1	96	25
	2	65	50
	3	72	45
4	1	96	25
	2	55	60
	3	72	120
延伸	1	4	∞

讨 论

自 1990 年 Drumm 等<sup>[3]</sup>首次提示了 Hp 感染的家庭聚集以来,有关 Hp 感染的家庭聚集原因的研究日益增多。一些胃肠学家在揭示 Hp 感染家庭聚集的可能原因时,发现免疫遗传因素在 Hp 感染的家庭聚集中起着一定的作用。



注:全图共 43 个泳道,第 43 泳道为污染控制道;内控带分子量为 796 bp;第 3、8、10、27、30、34、35 泳道可见阳性条带

**图 1** 昆明市汉族儿童 HLA-DRB1、DQB1 基因 PCR-SSP 图  
高长明等<sup>[4]</sup>以江苏省汉族胃癌和食道癌为研究对象研究认为,HLA 作为免疫遗传因素与 Hp 感染有关,HLA-DRB1 \* 08 基因阳性可能增加 Hp 的易感性,而 HLA-DRB1 \* 12 基因则可能是抵抗 Hp 感染的保护基因。Dino 等<sup>[5]</sup>以日本 Hp 感染相关性血小板减少性紫癜患者为研究对象研究认为,HLA-DRB1 \* 11、DRB1 \* 14 可能是 Hp 感染的易感基因,而 HLA-DRB1 \* 03 则可能是抵抗 Hp 感染的保护因素。Sakai 等<sup>[6]</sup>对日本 Hp 感染相关性萎缩性胃炎患者进行研究,认为 HLA-DQB1 \* 0401 可能为 Hp 易感性基因。而林军等<sup>[7]</sup>以中国汉族胃腺癌患者为研究对象、Perri 等<sup>[8]</sup>以意大利胃腺癌患者为研究对象则认为在 HLA-DQB1 位点上 Hp 感染与非 Hp 感染患者之间可能不存在免疫遗传学差异。

本研究以昆明汉族 Hp 感染儿童进行研究,结果表明,HLA-DRB1 \* 0901、DQB1 \* 03032 基因可能是抵抗 Hp 感染的保护基因。与目前国内外在 HLA-DRB1、DQB1 位点上的研究结果有差异。许春娣等<sup>[9]</sup>以上海汉族儿童 Hp 感染相关性胃炎及无症状儿童为研究对象研究发现,Hp 阳性无症状儿童及胃炎患儿的 HLA-DQA1 \* 03 等位基因频率均明显低于 Hp 阴性无症状儿童等位基因频率 (35%, 31% vs. 48%,  $P < 0.05$ ),认为在 HLA-DQA1 基因位点上,HLA-DQA1 \* 03 基因对 Hp 感染可能具有抵抗保护作用。从单倍型方向分析,DR9 迄今仅以一个等位基因 (HLA-DRB1 \* 0901) 的形式存在,并和 DQ  $\alpha$  和  $\beta$  链编码的基因构成特定的单倍型形

式 DRB1 \* 0901-DQA1 \* 03-DQB1 \* 0303,使 DRB1 \* 0901 成为了与疾病关联的分子基础<sup>[10]</sup>。因此与许春娣等的研究接近,DRB1 \* 0901-DQA1 \* 03-DQB1 \* 0303 基因可能通过单倍型 DRB1 \* 0901-DQA1 \* 03-DQB1 \* 0303 的形式对汉族人群 Hp 感染起抵抗作用的,其机制可能是通过 DR9 分子递呈并激活 T 细胞的免疫学方式来实现的<sup>[11]</sup>。

昆明汉族在历史上是一个迁移民族,并长期与当地民族以大杂居的形式居住在一起<sup>[12]</sup>。本研究结果与目前国内外 HLA-DRB1、DQB1 等位基因在 Hp 感染人群免疫遗传特征的研究结果有差异的原因除与研究方法、研究对象的选择、样本量大小等因素有关外,还与不同民族、地区所致 HLA 多态性有关。昆明汉族在长期迁移历史中,可能由于南北汉族相互融合及与当地各民族不断基因交流形成了具有独特免疫遗传特征的群体。因此以昆明汉族为研究对象研究 Hp 感染人群的免疫遗传特征,对全面了解中国汉族 Hp 感染人群的免疫遗传学特征有着特殊的意义,同时也为今后昆明汉族人群 Hp 感染免疫防治策略及基因治疗提供重要的参考资料。

#### 参 考 文 献

- 中华儿科杂志编辑委员会,中华儿科学会消化感染组. 小儿慢性胃炎、消化性溃疡道内窥镜诊断标准. 中华儿科杂志, 2003, 41: 168.
- 张万岱,徐智民. 幽门螺杆菌研究现状及共识. 世界华人消化杂志, 2000, 8: 1084-1087.
- Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, et al. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med, 1990, 322: 355-363.
- 高长明,李忠佑,丁建华,等. 人类白细胞抗原 DRB1 等位基因与幽门螺杆菌感染的关系. 中华流行病学杂志, 2000, 21: 417-419.
- Dino V, Michele G, Elisabette G, et al. To the editor: Idiopathic thrombocytopenic purpura, *Helicobacter pylori* infection, and HLA class II alleles. Blood, 2002, 100: 1925-1927.
- Sakai T, Aoyama N, Satonaka K, et al. HLA-DQB1 locus and the development of atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol, 1999, 34(suppl): s1124-s1127.
- 林军,邓长生,孙洁,等. 人类白细胞抗原-DRB1 与胃腺癌及其临床特征和幽门螺杆菌感染的相关性. 中华消化杂志, 2001, 21: 165-167.
- Perri F, Piepoli A, Quitadamo M, et al. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes and *Helicobacter pylori* infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. Tissue Antigens, 2002, 59: 55-57.
- 许春娣,奚容平,陈舜年,等. 幽门螺杆菌感染的患儿人类白细胞抗原 DQA1 的免疫遗传分析. 中华儿科杂志, 2000, 38: 746-749.
- Bodmer JG, Marsb SGE, Albert ED, et al. Nomenclature for factors of the HLA system 1996. Tissue Antigens, 1997, 49: 271-272.
- 孙玮,王颖,张勇,等. T 细胞识别 HLA-DRB1 \* 0901 分子显示 TCR BV 基因取用的高度局限性. 中华微生物和免疫学杂志, 1999, 21: 267-270.
- 云南历史研究所. 云南少数民族. 昆明: 云南人民出版社, 1983. 1-4.

(收稿日期: 2004-04-28)

(本文编辑: 尹廉)