湖北地区肾综合征出血热与 HLA-DRB 基因多态性关联的研究

魏柏 朱尤庆 侯炜 杨占秋 孙黎 罗凡 汤小燕

【摘要】 目的 探索湖北省汉族人白细胞抗原(HLA)-DRB 基因多态性与肾综合征出血热(HFRS)的相关性。方法 采用 PCR/SSP 方法对湖北省汉族病例组 114 例、对照组 213 例进行 HLA-DRB 基因多态性分析,同时采用 RT-heminested PCR 方法对汉坦病毒(HV)进行病毒分型。结果 HLA- DRB1*0401-0411、*1001、*1101-1105 基因频率在 HFRS 患者组明显升高,分别为 3.1%、2.2%、15.7%,与对照组比较,RR = 13.87、9.72、2.00, $\chi^2 = 10.006、6.324、6.472$, $P < 0.05$; DRB1*1501-1502、DRB4、DRB5 基因频率在对照组分别为 11.0%、19.0%、16.9%,与 HFRS 患者组比较,RR = 0.45、0.58、0.23, $\chi^2 = 6.138、4.583、21.076$, $P < 0.05$,而其他 HLA-DRB 基因频率差异无统计学意义。湖北地区为 HV 混合感染疫区且两型病毒多集中于江汉平原地区,汉滩型(HTNV)略多于汉城型(SEOV),湖北地区 HFRS 患者中具有 HLA-DRB1*1101-1105 等位基因的有 81.8%(27/33)为 HTNV 感染,而 SEOV 感染只有 18.2%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 湖北省汉族人中,HFRS 与 DRB1*0401-0411、*1001、*1101-1105 呈正相关;HFRS 与 DRB1*1501-1502、DRB4、DRB5 呈负相关。HTNV 的 HV 变异株在湖北地区具有一定的地理聚簇性。

【关键词】 肾综合征出血热;人白细胞抗原;聚合酶链反应-序列特异性引物技术

Association of hemorrhagic fever with renal syndrome and HLA-DRB allele polymorphisms in Han nationality, Hubei province WEI Bai, ZHU You-qing, HOU Wei, YANG Zhan-qiu, SUN Li, LUO Fan, TANG Xiao-yan. Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: ZHU You-qing, Email: uqing_zhu@sina.com; HOU Wei, Email: houweidavid@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To understand the association of human leukocyte antigen (HLA)-DRB polymorphism and patients diagnosed as hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). Methods HLA-DR allele polymorphism was detected by PCR-sequence specific primers (PCR-SSP). Hantavirus (HV) typed as Hantaan virus (HTNV) and Seoul virus (SEOV) in patients were detected by RT-heminested PCR. Results The gene frequency of DRB1*0401-0411, *1001 and *1101-1105 in HFRS case group were 3.1%, 2.2% and 15.7% respectively. Compared with control group, it was significant higher in HFRS case group (RR = 13.87, 9.72 and 2.00 respectively with Chi-square value as 10.006, 6.324 and 6.472 respectively, $P < 0.05$). When compared with HFRS case group, the gene frequency of DRB1*1501-1502, DRB4 and DRB5 in control group were 11.0%, 19.0% and 16.9% respectively, markedly lower than in patients (RR = 0.45, 0.58 and 0.23 respectively. Chi-square values were 6.138, 4.583 and 21.076 respectively, $P < 0.05$). There was no significant difference in other HLA-DR gene frequencies. Mixed infection was found in Hubei, with HTNV slightly more than SEOV. Distinct hantaviruses could coexist in either different or the same geographic or ecological zones in Hubei province. Patients with HLA-DRB1*1101-1105 alleles were 81.8%(27/33) infected by HTNV and only 18.2% infected by SEOV, which had significant difference ($P < 0.05$). Conclusion DRB1*0401-0411, *1001 and *1101-1105 were possibly associated with increased susceptibility to HV infection. On the other hand there was an inverse correlation among HFRS, DRB1*1501-1502, DRB4 and DRB5.

【Key words】 Hemorrhagic fever with renal syndrome; Human leukocyte antigen; PCR-sequence specific primers

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.11.013

作者单位: 430071 武汉大学中南医院消化科(魏柏、朱尤庆、汤小燕); 武汉大学医学病毒学研究所 病毒学国家重点实验室(侯炜、杨占秋、孙黎、罗凡)

通信作者: 朱尤庆, Email: uqing_zhu@sina.com; 侯炜, Email: houweidavid@yahoo.com.cn

肾综合征出血热(HFRS)是由汉坦病毒(Hantavirus, HV)引起自然疫源性疾病,目前我国仅存在有汉滩型(Hantaan virus, HTNV)和汉城型(Seoul virus, SEOV)。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是调控免疫应答的一个关键因素,具有高度多态性,含有大量遗传信息。目前国内外关于二者间关系的研究不多^[1]。为了进一步探寻湖北省人群 HFRS 的易感基因,我们利用在临床中收集的湖北地区 HFRS 病例和正常对照人群采用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR/SSP)技术进行 HLA-DRB 分型,探讨不同型别 HV 的感染状况,并与 HLA-DRB 基因的关联性进行分析,从免疫遗传方面探讨其发病机制。

材料与方法

1. 研究对象:采集湖北省武汉、咸宁、钟祥、浠水、洪湖等县市经临床诊断及特异性血清学方法确诊的 HFRS 患者血清 114 例,患者临床资料显示均为无亲缘关系的湖北籍汉族,其中男 75 例,女 39 例,平均年龄(42±10)岁;对照组为随机选择、无亲缘关系、未患过 HFRS 的湖北籍汉族健康体检者,其中男性 138 名,女性 75 名,平均年龄(39±11)岁。用 5% EDTA 抗凝管抽取静脉血 2 ml,置-80℃冻存待检。

2. HLA-DRB 基因多态性分析:

(1)模板 DNA 制备:采用酚氯仿法提取外周血淋巴细胞 DNA,并用紫外分光光度计测定 DNA 含量及纯度, $A_{260-280}$ 应在 1.6~2.0 范围内,否则重新抽提。

(2)引物设计与合成:根据 HLA-DRB 基因文库中的序列,设计 HLA-DRB 等位基因序列特异性引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。HLA-DRB 基因型分别为 HLA-DRB1*0101-0103, *1501-1502, *1601-1602, *0301, *0302, *0302/130X/140/X, *0401-0411, *0701-0702, *0806-0809, *0901, *1001, *1101-1105, *1201-1202, *1301-1302, *1303-1304, *1305, *1401/1404/1405, *1402, DRB3, DRB4 和 DRB5。

(3)PCR-SSP 基因分型:每一 PCR 反应管中含有待测基因组 DNA 60 ng、Taq 聚合酶 0.5 U、dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 各 200 μmol/L、HLA-DRB1 各等位基因的 SSP 2 pmol/L。PCR 反应条件:预变性 94℃ 5 min,变性 94℃ 30 s;退火 55℃ 40 s;延伸 72℃ 1 min,共 30 个循环。最后 72℃ 延伸 2 min。

(4)扩增产物的检测:PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳及紫外透射仪观察并保存结果。

3. HV 分型:用 RT-heminested PCR 方法对本标本中 HV 进行分型。HV 以 HTN 型标准株 76-118、SEO 型中国代表株 R22 作为阳性对照。

(1)抽提 HV RNA:采用异硫氰酸胍-酚-氯仿法(胍酚一步法)抽提。

(2)引物设计:根据 HV 基因文库软件,设计 HV HTN/SEO 型引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。HTN 型和 SEO 型通用引物 PP: 5'-CCG GAT CCT AGT AGT AGA CAC CGC-3'; (HTN 型)P I -1: 5'-CAA TCA GCA ACA TGG GGA TA-3'; P I -2: 5'-AAT ATC AAA GAT CCC ATG-3'; (SEO 型)P II -1: 5'-AGT TGG CCA AGG CTT TGC ATT AAA-3'; P II -2: 5'-TTG CTG ATG TGA TGG CAG TCT CT-3'。

(3)cDNA 合成:20 μl 反应体系中,含 5× 反转录缓冲液 4 μl、引物 PP(2.5 μmol/L) 4 μl、dNTPs (10 mmol/L) 2 μl、AMV 反转录酶 4 U、RNasin 40 U、模板 RNA 6 μl,42℃ 水浴 1 h,后 95℃ 5 min 变性,立即置冰浴。

(4)PCR:50 μl 反应体系包括 10× Taq 酶缓冲液 5 μl、dNTPs (10 mmol/L) 2 μl、引物 PP(2.5 μmol/L) 和 P I -2/P II -2(5.0 μmol/L) 各 4 μl、模板 cDNA 10 μl、Taq 酶 2 U。94℃ 变性 5 min,后按 94℃ 45 s、48℃ 45 s、72℃ 60 s,35 次循环,72℃ 10 min 延伸。

(5)Heminested PCR:50 μl 反应体系包括 10× Taq 酶缓冲液 5 μl、dNTPs (10 mmol/L) 2 μl、引物 P I -1/P II -1 和 P I -2/P II -2(5.0 μmol/L) 各 3 μl、PCR 产物 5 μl、Taq 酶 2 U。循环参数同上,只是循环次数为 15 次。

(6)扩增产物的检测:取 10 μl 上述扩增产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,紫外灯下观察结果并拍照。

4. 统计学分析:采用直接计数法计算等位基因频率。样本分布经过 Hardy-Weinberg 平衡检验, $P > 0.05$, 显示无抽样误差。疾病与 HLA-DR 的等位基因相关性按 Haldane RR 的修正公式计算: $RR = ad/bc$, 式中 a 为群体中携带某一特定 HLA 型别的病例数; b 为不携带某一特定 HLA 型别的病例数; c 为携带某一特定 HLA 型别的对照组人数; d 为不携带某一特定 HLA 型别的对照组人数。 RR 值的显著性检验按 Haldane 公式计算: $\chi^2 = (ad - bc)^2 / N(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)$ 或校正公式。式中 $N =$

$a+b+c+d$ 。

结 果

1. 湖北地区 HFRS 患者 HV 分型及分布特点: 用建立的 HV RT-heminested PCR 分型方法对收集于湖北省不同地区的 114 例 HFRS 患者血浆中 HV 进行分型, 结果 HTN 型 54 例、SEO 型 39 例, 未定型 21 例。以长江为界, 长江以南地区共 45 例(武昌 18 例、咸宁 21 例、鄂州 1 例、江夏 5 例)HFRS, 其中 HTN 型 25 例, SEO 型 13 例, 未分型 7 例; 长江以北地区共 69 例(汉口 17 例; 钟祥 18 例; 蕲春 8 例; 潜江 6 例; 应城、浠水、黄陂各 5 例; 麻城 3 例; 天门和洪湖各 1 例)HFRS, 其中 HTN 型 29 例, SEO 型 26 例, 未定型 14 例。

2. HFRS 患者组与正常对照组的 HLA-DRB 基因多态性分析: HFRS 患者组 HLA-DRB1*0401-0411、*1001 和 *1101-1105 基因频率各为 3.1%、2.2%、15.7%, 与正常对照组比较, $RR = 13.87$ 、 9.72 、 2.00 , $\chi^2 = 10.006$ 、 6.324 、 6.472 , $P < 0.01$ 或 < 0.05 ; 正常对照组 HLA-DRB1*1501-1502、DRB4 和 DRB5 基因频率各为 11.0%、19.0%、16.9%, 与 HFRS 患者组比较, $RR = 0.45$ 、 0.58 、 0.23 , $\chi^2 = 6.138$ 、 4.543 、 21.076 , $P < 0.05$ 或 < 0.01 ; 其他 HLA-DRB 基因频率在 HFRS 患者组与正常对照组间的差异无统计学意义(表 1)。

表 1 湖北地区 HFRS 患者组与正常对照组的 HLA-DRB 基因频率比较

等位基因	HLA-DRB 基因频率比较						χ^2 值	P值	RR 值
	对照组			患者组					
	阳性例数	表型频率	基因频率	阳性例数	表型频率	基因频率			
DRB1									
1501-1502	47	0.221	0.110	14	0.123	0.063	6.138	<0.05	0.45
0401-0411	1	0.004	0.002	7	0.061	0.031	10.006	<0.01	13.87
1001	1	0.004	0.002	5	0.044	0.022	6.324	<0.05	9.72
1101-1105	36	0.169	0.085	33	0.289	0.157	6.472	<0.05	2.00
DRB4	81	0.380	0.190	30	0.263	0.142	4.593	<0.05	0.58
DRB5	72	0.338	0.169	12	0.105	0.054	21.076	<0.01	0.23

3. 湖北地区 HFRS 患者 HV 分型与 HLA-DRB 的关联: 具有 HLA-DRB1*1101-1105 等位基因的 HFRS 患者有 81.8%(27/33)为 HTN 型感染, 而 SEO 型感染只有 18.2%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 具有 HLA-DRB1*1001 或 DRB5 等位基因的 HFRS 患者被 HTN 型和 SEO 型感染的差异也有统计学意义($P < 0.05$), 但由于样本数偏少, 可忽略; 在患者中其他 HLA-DRB 等位基因与 HV 分型的差异无统计学

意义($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 HFRS 患者 HV 分型与 HLA-DRB 基因多态性的关联

等位基因	病例数	分型		
		HTN	SEO	未定型
DRB1				
0401-0411	7	3(42.9)	2(28.6)	2(28.6)
1001	5	3(60.0)	1(20.0)	1(20.0)
1101-1105	33	27(81.8)	6(18.2)	0
1501-1502	14	6(42.9)	8(57.1)	0
DRB4	30	11(36.7)	14(46.7)	5(16.7)
DRB5	12	6(50.0)	3(25.0)	3(25.0)

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比(%)

讨 论

HLA 是目前人类最复杂的一个遗传多态性系统, 至少可分为 I ~ III 三类基因。HLA-II 类抗原是存在于细胞表面, 具有高度亲和力和低特异性的肽链受体, 在抗原呈递及 T 细胞受体的选择方面影响免疫反应。HLA-II 类基因的多态性可以改变 HLA 分子、抗原、T 细胞之间的相互作用的特性, 并由此控制对外来抗原的免疫应答反应。HFRS 发病的易感性同样有不同的遗传背景决定, HLA 基因多态性就是其中一种。

国外有文献报道 HFRS 患者的 HLA-DR 抗原表达增高^[2,3], 郑丰等^[4]也报道 HFRS 患者肾小管 HLA-DR 抗原表达显著增强。据此可推测, HLA-DR 基因与 HFRS 可能有关联。本实验采用 PCR-SSP 技术从分子水平探讨湖北地区汉族人群 HFRS 与 HLA-DRB 基因的相关性。结果显示, DRB1*0401-0411、*1001、*1101-1105 基因频率在 HFRS 患者组明显升高($P < 0.05$); DRB1*1501-1502、DRB4、DRB5 基因在 HFRS 患者组明显降低($P < 0.05$), 而其他 HLA-DRB 基因频率的差异无统计学意义。提示在湖北汉族人群中, DRB1*0401-0411、*1001、*1101-1105 可能为 HFRS 的易感基因; DRB1*1501-1502、DRB4、DRB5 可能为 HFRS 的保护基因。由此说明, HLA-DRB 参与 HFRS 的发生、发展, HFRS 的发病可能和遗传因素有关。

有研究证实 RT-nested PCR 方法是一种很好的检测 HV 感染的方法^[5]。本实验通过 RT-heminested PCR 方法对收集的湖北地区 HFRS 患者进行病毒分型, 发现 HTN 型略多于 SEO 型, 两型病毒多集中于江汉平原地区; 另外有 21 例不符合国内两种常见 HV 基因, 考虑可能存在基因突变等。李十月等^[6]研究江汉平原鼠间 HFRS 感染时, 认为黑线姬鼠和褐

家鼠为江汉平原地区优势鼠,江汉平原地区为混合型 HFRS 疫区。有研究发现湖北地区的 HTN 型 HV 在多年进化演变后,发生了遗传漂移或遗传变换,并且 HTN 型 HV 变异株在湖北地区具有一定的地理聚族性,HTN 型病毒株的变异性较 SEO 型明显^[7,8]。此外本研究还揭示了湖北地区 HFRS 患者中具有 HLA-DRB1*1101-1105 等位基因的有 81.8% (27/33) 为 HTN 型感染,而 SEO 型感染只有 18.2%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而其他 HLA-DRB 等位基因与 HV 分型的差异无统计学意义,这从分子水平支持了 HFRS 和遗传因素具有相关性。这些遗传信息可解释湖北汉族人群在特殊地理环境下复杂的背景,同时也说明湖北汉族人群 HFRS 的发生可能在遗传背景下通过环境因素而形成,产生对病毒的易感性或改变对病毒的免疫反应,这些 HLA 控制着该人群对 HFRS 的易感性。然而由于 HV 分型后样本数量偏少,对湖北地区人群 HLA 基因多态性和 HV 分型的意义还具有一定限制性,这也有赖于今后的进一步研究。

然而目前关于 HFRS 与 HLA-DR 易感或拮抗的具体机制尚不明, van Epps 等^[9]在 HFRS 疫苗接种后的应答中发现, HFRS 疫苗接种后特异抗体低应答者与 HLA-B46 有显著相关性,疫苗接种后低应答相关基因与 HFRS 易感基因是否有关,这为 HFRS 的免疫防治提供新线索,也为 HFRS 的发病机制研究提供新思路。

总之,本研究基于病例对照研究通过对湖北地区汉族人 HFRS 与 HLA-DRB 基因的相关性进行分析,符合 Hardy-Weinberg 平衡,结果较可靠。探明湖北地区 HFRS 相关的疾病易感基因,有助于了解其

在发病中的作用,可以为解释 HFRS 的免疫损伤提供依据,并为免疫预防控制提供新的线索和思路。

参 考 文 献

- [1] Deter J, Bryja J, Chaval Y, et al. Association between the DQA MHC class II gene and Puumala virus infection in *Myodes glareolus*, the bank vole. *Infect Genet Evol*, 2008, 8:450-458.
- [2] Pablo FC, Pablo AVC, Marcela FG, et al. Genetic susceptibility to Andes Hantavirus: association between severity of disease and HLA alleles in Chilean patients. *Rev Chil Infect*, 2007, 24(5): 351-359.
- [3] Makela S, Mustonen J, Ala-Houhala I, et al. Human leukocyte antigen-B8-DR3 is a more important risk factor for severe Puumala Hantavirus infection than the tumor necrosis factor-alpha (-308)G/A polymorphism. *J Infect Dis*, 2002, 186: 843-846.
- [4] 郑丰,黎磊石,刘志红,等. 流行性出血热患者的免疫性肾小管间质损伤. *中华医学杂志*, 1996, 76(6):411-415.
- [5] Kim EC, Kim I, Choi Y, et al. Rapid differentiation between Hantaan and Seoul viruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Med Virol*, 1994, 43(3):245.
- [6] 李十月,杨明瑞,莫尤美,等. 天门和咸宁肾综合征出血热疫区血清分型. *中国公共卫生*, 1993, 9(5):211.
- [7] 侯炜,杨占秋,曲虹,等. 湖北省不同地区汉坦病毒 M 片段的分析研究. *中国病毒学*, 2002, 17(1):26-29.
- [8] Li Q, Yang ZQ, Qu H, et al. Variability of G1 gene of Hantaviruses occurring in the Hubei province, China. *Acta Virol*, 2005, 49(1):51-57.
- [9] van Epps HL, Terajima M, Mustonen J, et al. Long-lived memory lymphocyte responses after Hantavirus infection. *J Exp Med*, 2002, 196(5):579-588.

(收稿日期:2009-05-27)

(本文编辑:张林东)

· 消息 ·

本刊加入“万方数据——数字化期刊群”的声明

为了实现期刊编辑、出版工作的网络化,我刊现已入网“万方数据——数字化期刊群”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者,请另投它刊或特别声明需另作处理。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

“万方数据——数字化期刊群”是国家“九五”重点科技攻关项目。本刊全文内容按照统一格式制作,读者可上网查询浏览本刊内容,并征订本刊。

本刊编辑部