

· 实验研究 ·

乙型肝炎患者人类白细胞抗原-DRB1、
-DQA1、-DQB1 等位基因多态性分析

蒋业贵 王宇明

【摘要】 目的 探讨人类白细胞抗原(HLA)-DRB1、-DQA1 和 -DQB1 等位基因多态性与乙型肝炎(乙肝)之间的关系。方法 采用聚合酶链反应/序列特异性引物(PCR/SSP)技术对 52 例慢性乙肝患者、30 例急性乙肝患者和 106 名正常人的 HLA-DRB1、-DQA1 和 -DQB1 等位基因多态性进行了分析。结果 HLA-DRB1 * 0301、-DQA1 * 0501 和 -DQB1 * 0301 在慢性乙肝患者组的等位基因频率(17.31%、25.96%、35.58%)明显高于正常对照组(5.67%、13.36%、18.87%),两者相比差异有显著性($\chi^2_1 = 12.3068, P_{e1} = 0.0074; \chi^2_2 = 9.2002, P_{e2} = 0.0157; \chi^2_3 = 15.5938, P_{e3} = 0.0075$)。HLA-DRB1 * 1101/1104 和 -DQA1 * 0301 在慢性乙肝患者组的等位基因频率(0.96%、14.42%)明显低于急性乙肝患者组(13.33%、30%),两者相比差异有显著性($\chi^2_1 = 11.9206, P_{e1} = 0.0145; \chi^2_2 = 8.7396, P_{e2} = 0.0167$)。结论 HLA-DRB1 * 0301、-DQA1 * 0501 和 -DQB1 * 0301 与慢性乙肝患者的易感性密切相关,HLA-DRB1 * 1101/1104 和 -DQA1 * 0301 与慢性乙肝的抗性密切相关,说明宿主的 HLA-II 类基因是决定乙肝病毒感染转归的重要因素。

【关键词】 乙型肝炎;人类白细胞抗原;遗传易感性

Study on the polymorphism of human leucocyte antigen-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles in patients with hepatitis B JIANG Ye-gui, WANG Yu-ming. Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To investigate the association between the polymorphism of human leucocyte antigen(HLA)-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles and viral hepatitis B. **Methods** HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles in 52 patients with chronic hepatitis B, 30 patients with acute hepatitis B and 106 normal control subjects were analysed, using the polymerase chain reaction/sequence specific primer(PCR/SSP) technique. **Results** The allele frequencies of HLA-DRB1 * 0301, -DQA1 * 0501 and -DQB1 * 0301 in the chronic hepatitis B group(17.31%, 25.96%, 35.58%) were markedly higher than that in the normal control group(5.67%, 13.36%, 18.87%), with statistical significance($\chi^2_1 = 12.3068, P_{e1} = 0.0074; \chi^2_2 = 9.2002, P_{e2} = 0.0157; \chi^2_3 = 15.5938, P_{e3} = 0.0075$). The allele frequencies of HLA-DRB1 * 1101/1104 and -DQA1 * 0301 in the chronic hepatitis B group(0.96%, 14.42%) were markedly lower than that in the acute hepatitis B group(13.33%, 30%), with significant correlation between them($\chi^2_1 = 11.9206, P_{e1} = 0.0145; \chi^2_2 = 8.7396, P_{e2} = 0.0167$). **Conclusion** HLA-DRB1 * 0301, -DQA1 * 0501 and -DQB1 * 0301 were closely associated with the susceptibility to chronic hepatitis B, while HLA-DRB1 * 1101/1104 and -DQA1 * 0301 closely associated with the resistance to chronic hepatitis B. These findings suggested that host HLA class II gene was an important factor determining the outcome of HBV infection.

【Key words】 Hepatitis B; Human leucocyte antigen; Genetic susceptibility

人体在感染乙型肝炎病毒(HBV)后表现不同的临床病程,除了与病毒本身的因素有关外,更重要的是由于不同个体对 HBV 所发生的免疫反应的不同^[1,2],这种易感性的差异与个体的免疫特性有关,而后者主要取决于人类主要组织相容性复合体(MHC)。人类白细胞抗原(HLA)是 MHC 的基因

产物,为目前已知的最复杂的人类基因复合体。HLA 基因最显著的特征是具有明显的多态性,其多态性的差异决定个体免疫应答的不同。HLA 复合体作为调节机体免疫应答的重要基因群,与抗 HBV 免疫反应有着密切的关系,某些特殊的 HLA 基因型可能影响着 HBV 感染的慢性化和免疫反应的强弱^[3-7]。我们利用聚合酶链反应/序列特异性引物(PCR/SSP)技术通过对乙型肝炎(乙肝)患者中

HLA-DRB1、-DQA1 和 -DQB1 基因多态性的分析,为从基因水平研究免疫遗传因素在慢性乙肝发病机制中的作用,以及探索疾病易感基因和/或抗性基因提供参考。

对象与方法

1. 病例组 52 例慢性乙肝患者系我科 2000 年住院患者,男 43 例,女 9 例,平均年龄(33 ± 9)岁;30 例急性乙肝患者系我科 2000 年门诊和住院患者,男 24 例,女 6 例,平均年龄(33 ± 8)岁。符合 2000 年第十次全国传染病与寄生虫学术会议修订的诊断标准,均为重庆地区无血缘关系的汉族人。对照组为无血缘关系的该地区汉族健康人 106 名,男 88 名,女 18 名,平均年龄(31 ± 8)岁。

2. 方法:

(1) 提取基因组 DNA:采用 ReadyPCR™ 全血基因组 DNA 纯化系统快速提取被检者基因组 DNA,试剂盒购自华美生物工程公司。

(2) PCR/SSP 技术测定 HLA-DRB1、-DQA1 和 -DQB1 等位基因多态性:SSP 只能与某一等位基因特异性片段的碱基序列互补性结合,从而通过 PCR 反应特异性地扩增该基因片段。HLA-II 类基因特异性由其第 2 外显子的核苷酸序列所决定的,PCR/SSP 分型技术是扩增 HLA-II 类基因第 2 外显子多态性区域基因片段。参照文献[8,9]方法设计针对 HLA-DRB1、HLA-DQA1 和 HLA-DQB1 第 2 外显子区域多态性的 SSP,分别鉴定 HLA-DRB1 * 1 ~ 10、所有已知有表达的 10 种 HLA-DQA1 和 13 种 HLA-DQB1 等位基因型别。PCR 扩增产物加样至含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中,15 V/cm 凝胶电泳 20 min,经紫外透射下泳道中见明显 DNA 条带为阳性,确定其基因型别。每一 PCR 反应中,都含有一对扩增基因和一个内对照基因(人生长激素基因,其引物序列为:5'-primer 5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3';3'-primer:5'-TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTTC-3')的引物,扩增产物大小为 429 bp。每次扩增后,人生长激素基因作为 PCR 扩增的阳性内对照,均应有阳性条带产物,如这一基因受抑,可能出现假阴性结果,同时还有利于纯合子基因型检测的准确性。

3. 统计学分析:等位基因频率的计算采用直接计算法,两组间等位基因分布的差异用四格表法进行 χ^2 检验,对 $\chi^2 > 3.84$ 者按 Fisher 法计算确切 P

值,并计算校正 P 值(P_c), P_c 等于 P 乘以所比较的等位基因数。

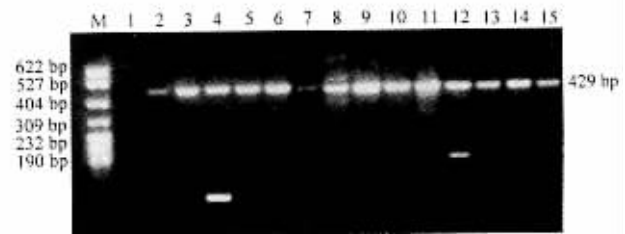
结 果

1. 病例组与对照组的 HLA-DRB1 等位基因检测:重庆地区健康人群以 HLA-DRB1 * 1201/1202、* 1501/1502 和 * 0901 等位基因常见。慢性乙肝患者组的 HLA-DRB1 * 0301 等位基因频率明显高于正常对照组,两者相比差异有显著性($\chi^2 = 12.3068, P_c = 0.0074$ 表 1)。急性乙肝患者组的 HLA-DRB1 * 1101/1104 等基因频率明显高于慢性乙肝患者组,两者相比差异有显著性($\chi^2 = 11.9206, P_c = 0.0145$ 表 1)。HLA-DRB1 等位基因电泳图谱见图 1。

表 1 病例组与对照组的 HLA-DRB1 等位基因频率(%)

HLA-DRB1 等位基因	对照组 (n = 106)		慢性乙肝患者 (n = 52)		急性乙肝患者 (n = 30)	
	阳性例数	等位基因频率	阳性例数	等位基因频率	阳性例数	等位基因频率
0101/0103	1	0.47	1	0.96	1	1.67
0301*	12	5.66	18	17.31	6	10.00
0401/0411	24	11.32	13	12.50	7	11.67
0701/0702	11	5.19	8	7.69	4	6.67
0801/0804	9	4.25	6	5.77	3	5.00
0901	32	15.09	16	15.39	8	13.33
1001	2	0.94	2	1.92	1	1.67
1101/1104#	13	6.13	1	0.96	8	13.33
1201/1202	34	16.04	15	14.42	8	13.33
1301/1302	4	1.89	1	0.96	1	1.67
1303/1304	1	0.47	1	0.96	1	1.67
1401,1404	14	6.60	6	5.77	4	6.67
1402,1403	0	0.00	0	0.00	0	0.00
1501/1502	34	16.04	11	10.58	5	8.33
1601/1602	13	6.13	2	1.92	1	1.67

* $\chi^2 = 12.3068, P_c = 0.0074$; # $\chi^2 = 11.9206, P_c = 0.0145$



M: ϕ BR322DNA/MSP I marker; 1: negative control; 2: 0101/0103; 3: 0301; 4: 0401/0411; 5: 0701/0702; 6: 0801/0804; 7: 0901; 8: 1001; 9: 1101/1104; 10: 1201/1202; 11: 1301/1302; 12: 1303/1304; 13: 1401, 1404; 14: 1402, 1403; 15: 1501/1502; 16: 1601/1602

图 1 PCR/SSP 测定 HLA-DRB1 等位基因特异性扩增产物电泳图

2. 病例组与对照组的 HLA-DQA1 等位基因检

测 重庆地区健康人群以 HLA-DQA1 * 0301、* 0102 和 * 0501 等位基因常见。慢性乙肝组的 HLA-DQA1 * 0501 等位基因频率明显高于对照组,两者相比差异有显著性($\chi^2 = 9.2002, P_c = 0.0157$,表 2)。急性乙肝组的 HLA-DQA1 * 0301 等位基因频率明显高于慢性乙肝组,两者相比差异有显著性($\chi^2 = 7.6781, P_c = 0.0388$,表 2)。HLA-DQA1 等位基因电泳图谱见图 2。

表 2 病例组与对照组的 HLA-DQA1 等位基因频率(%)

HLA-DQA1 等位基因	对照组 (n = 106)		慢性乙肝患者 (n = 52)		急性乙肝患者 (n = 30)	
	阳性例数	等位基因频率	阳性例数	等位基因频率	阳性例数	等位基因频率
0101	17	8.02	9	8.65	4	6.67
0102	45	21.23	22	21.15	12	20.00
0103	9	4.25	5	4.81	2	3.33
0104	3	1.42	1	0.96	1	1.67
0201	7	3.30	3	2.88	1	1.67
0301*	57	26.89	15	14.42	18	30.00
0302	1	0.47	0	0.00	0	0.00
0401	2	0.49	1	0.96	1	1.67
0501#	29	13.68	27	25.96	10	16.67
0601	23	10.85	12	11.54	6	10.00

* $\chi^2 = 7.6781, P_c = 0.0388$; # $\chi^2 = 9.2002, P_c = 0.0157$

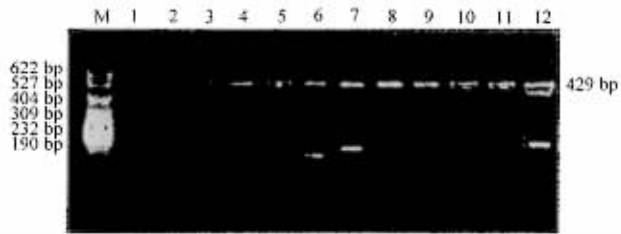


图 2 PCR/SSP 测定 HLA-DQA1 等位基因特异性扩增产物电泳图

表 3 病例组与对照组的 HLA-DQB1 等位基因频率(%)

HLA-DQB1 等位基因	对照组 (n = 106)		慢性乙肝患者 (n = 52)		急性乙肝患者 (n = 30)	
	阳性例数	等位基因频率	阳性例数	等位基因频率	阳性例数	等位基因频率
0201	23	10.85	10	9.62	6	10.00
0301*	40	18.87	37	35.58	16	26.67
0302	14	6.61	6	5.77	3	5.00
0303	35	16.51	15	14.42	10	16.67
0401	11	5.19	5	4.81	3	5.00
0402	2	0.94	1	0.96	1	1.67
0501	9	4.25	3	2.88	2	3.33
0502	20	9.43	7	6.73	3	5.00
0503	6	2.83	2	1.92	1	1.67
0601	20	9.43	7	6.73	7	11.67
0602	12	5.66	4	3.85	3	5.00
0603	5	2.36	2	1.92	1	1.67
0604	7	3.30	2	1.92	2	3.33

* $\chi^2 = 15.5938, P_c = 0.0075$

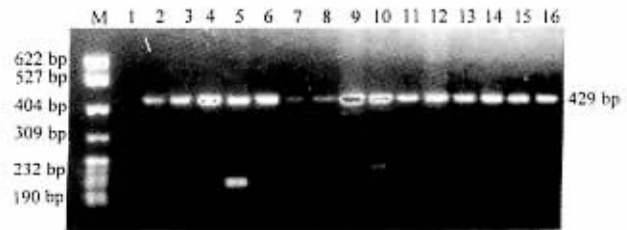


图 3 PCR/SSP 测定 HLA-DQB1 等位基因特异性扩增产物电泳图

图 3 PCR/SSP 测定 HLA-DQB1 等位基因特异性扩增产物电泳图

讨 论

3. 病例组与对照组的 HLA-DQB1 等位基因检测 重庆地区健康人群以 HLA-DQB1 * 0301、* 0303 和 * 0201 等位基因常见。慢性乙肝组的 HLA-DQB1 * 0301 等位基因频率明显高于对照组,两者相比差异有显著性($\chi^2 = 15.5938, P_c = 0.0075$,表 3)。HLA-DQB1 等位基因频率在急性乙肝和慢性乙肝组差异无显著性(表 3)。HLA-DQB1 等位基因电泳图谱见图 3。

HLA-II 类基因分型常用技术有以 PCR 为基础的寡核苷酸探针杂交法(PCR/SSO)、限制性片段长度多态性分析(PCR/RFLP)、序列特异性引物分析法(PCR/SSP)、单链构象多态性分析(PCR/SSCP)、异源性双体分析(PCR/HD)、指纹法(PCR-finger printing)和 DNA 序列测定法(DNA sequencing)等。但前 3 种方法操作复杂、成本高,而 PCR/SSP 操作简单,可靠性已被公认。多数实验室采用该方法作 HLA-II 类基因分型取代血清学方法。我们利用 PCR/SSP 法共检出 HLA-DRB1 等位基因 14 个、HLA-DQA1 等位基因 10 个、HLA-DQB1 等位基因 13 个,正常健康人中检出率较高的 HLA-DRB1 等位基因有 HLA-DRB1 * 1201/1202、* 1501/1502、* 0901,HLA-DQA1 等位基因有 HLA-DQA1 * 0301、* 0102、* 0501,HLA-DQB1 等位基因有 HLA-DQB1 * 0301、* 0303、* 0201。

Chen 等^[10]研究发现 HBV 持续感染者中 HLA-B8、-DR3、-A30、-DQA1 * 0501 基因频率明显增高,提示这些基因与乙肝慢性化有关。Thio 等^[3]发现 HBV 持续感染与 DQA1 * 0501 (OR = 2.6) 和 DQB * 0301 (OR = 3.9) 有重要关联,由上述两个等位基因组成的单体型 (OR = 3), 以及 DQA1 * 0501、DQB1 * 0301 与 DQB1 * 1102 组成的单体型 (OR = 10.7) 和 HBV 持续感染也有关。沈晶等^[11]发现 HLA-DRB1 * 10 基因与慢性乙肝关联。我们研究发现 HLA-DRB1 * 0301、HLA-DQA1 * 0501、HLA-DQB1 * 0301 在慢性乙肝组的等位基因频率明显高于正常对照组,两者相比差异有显著性,与慢性乙肝的易感性密切相关,可能是慢性乙肝的易感基因。Diepolder 等^[12]对慢性乙肝和急性自限性乙肝患者的 HLA-DRB1 基因型进行分析,进一步证实 HLA-DRB1 * 1301/* 1302 与清除 HBV 感染有关,对防止 HBV 感染后慢性化起保护作用。我们研究发现 HLA-DRB1 * 1101/1104 和 HLA-DQA1 * 0301 在慢性乙肝组的等位基因频率明显低于急性肝炎组,两者相比差异有显著性,与慢性乙肝的抗性密切相关,可能是慢性乙肝的抗性基因。这与国外报道不同,可能与种族有关,至于其机理需进一步研究。

近来的研究表明,HLA-II 类分子的 α 链与 β 链在细胞膜表面共同构成一个与抗原肽结合的槽,Base 等^[13]将其分为 9 个肽结合基序 (peptide binding motifs) P1 ~ P9,而在 P1、P4、P5、P6、P7、P9 均有 HLA-DQA1 * 0301 等位基因参与的肽片段。因此,HLA-DQA1 * 0301 等位基因出现频率极高,在抗原提呈细胞参与的免疫过程中具有重要意义。HLA-DQA1 * 0301 等位基因产物在肽结合基序中具有不同的多态特异性,如在 P1、P7,HLA-DQA1 * 0301 可以和 HLA-DQB1 * 0301、* 0302、* 0303,在 P5 可以和 HLA-DQB1 * 0301,在 P9 可以和 HLA-DQB1 * 0302 构成不同的多态性结合。因此,HLA-DQA1 * 0301 的多态性能影响 HLA 分子、抗原、T 细胞受体之间的相互作用,从而控制对外来抗原的免疫应答,这可能是 DQA1 * 0301 成为抗性基因的基础。

本研究表明 HLA-DRB1 * 0301、-DQA1 * 0501 和 DQB1 * 0301 可能为慢性乙肝的易感基因,HLA-DRB1 * 1101/1102 和 -DQA1 * 0301 可能为慢性乙肝的抗性基因,进一步说明特异性遗传背景可增加或

降低人群患慢性乙肝的危险性。然而,HLA-II 类基因对疾病的易感性并不是绝对的,同样的基因型既有患者,也有正常人,这些基因可能是易感基因或抗性基因,也可能是与易感基因或抗性基因相连锁。这种 HLA 与慢性乙肝连锁不平衡关联性受 HLA 基因的极其高度的多态性的影响,因此在加大样本的基础上还需进行慢性乙肝家系的 HLA 基因的调查研究,从而为探讨和揭示慢性乙肝发病机制提供更有价值的科学依据。

参 考 文 献

- 1 Chen WN, Oen CJ. Mutation "hot spot" in HLA class I - restricted T cell epitope on hepatitis B surface antigen in chronic carriers and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262: 757-761.
- 2 Sing G, Butterworth L, Chen X, et al. Composition of peripheral blood lymphocyte populations during different stages of chronic infection with hepatitis B virus. *J Viral Hepatol*, 1998, 5:83-93.
- 3 Thio CL, Carrington M, Marti D, et al. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis*, 1999, 179:1004-1006.
- 4 Sobao Y, Sugi K, Tomiyama H, et al. Identification of hepatitis B virus-specific CTL epitopes presented by HLA-A * 2402, the most common HLA class I allele in East Asia. *J Hepatol* 2001, 34:922-929.
- 5 Bhimma R, Coovadia M, Hammond MG, et al. HLA associations with HBV carriage and proteinuria. *Pediatr Nephrol* 2002, 17:724-729.
- 6 Cao T, Desombere I, Vanlandschoot P, et al. Characterization of HLA DR13-restricted CD4(+) T cell epitopes of hepatitis B core antigen associated with self-limited, acute hepatitis B. *J Gen Virol*, 2002, 83 (Pt 12): 3023-3033.
- 7 Akcam Z, Sunbul M, Durupinar B, et al. Tissue types as prognostic risk factor in hepatitis B virus infection. *Indian J Gastroenterol*, 2002, 21: 139-141.
- 8 Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigen*, 1992, 39: 225-235.
- 9 Olerup O, Aldener A, fogdell A, et al. HLA-DQA1 and DQB1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, 1993, 43:119-134.
- 10 Chen DF, Kliem V, Endres W, et al. Relationship between human leukocyte antigen determinants and courses of hepatitis B virus infection in Caucasian patients with end-stage renal disease. *Scan J Gastroenterol*, 1996, 31:1211-1215.
- 11 沈晶, 翼英, 关晓蕾, 等. HLA-DRB1 * 10 与中国人慢性乙肝关联. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19:58-59.
- 12 Diepolder HM, Jung MC, Keller E, et al. A vigorous virus-specific CD4+ T cell response may contribute to the association of HLA-DR13 with viral clearance in hepatitis B. *Clin Exp Immunol*, 1998, 113:244-251.
- 13 Base A, Gao XJ, Chelvanayagam G. Peptide binding motifs and specificities for HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*, 1999, 50:8-15.

(收稿日期 2003-02-07)

(本文编辑 尹廉)