

• 论 著 •

原发性胆汁性肝硬化与 HLA-DRB1 等位基因的相关分析

刘海英¹, 周 晔¹, 姚定康², 陈 燕¹, 屠小卿¹, 张 建¹, 范列英¹, 高春芳¹, 邓安梅¹, 仲人前^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 长征医院消化内科)

[摘要] **目的:**探讨原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)患者人群与人类白细胞抗原(HLA)-DRB1 等位基因的相关性, 评估易感基因与一些临床及实验室特征的相互关系。 **方法:**利用序列特异性引物 PCR(SSP-PCR)对 65 例确诊为 PBC 的患者和 431 例健康人进行 HLA-DRB1 等位基因以及有关基因亚型分析。 **结果:**PBC 患者 DRB1 * 07 的频率为 29.2%, 与正常人的 13.9% 相比存在显著性差异($P < 0.05$, 相对危险度 OR 为 2.55, 95%CI: 1.4~4.6), 所有 DRB1 * 07 阳性患者经亚型分析均为 DRB1 * 0701; 其余 DRB1 的等位基因频率与正常人比较无显著性差异。DRB1 * 0701 阳性患者群体与阴性患者在一些临床、实验室指标上无显著差异。 **结论:**中国人群 PBC 与 HLA-DRB1 * 0701 基因相关, 与南美、北美、北欧甚至日本等其他国家 PBC 患者的易感基因明显不同, 为进一步作针对 PBC 患者的免疫治疗提供线索。

[关键词] 肝硬化, 胆汁性; 人类白细胞抗原; 等位基因**[中图分类号]** R 575.22**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1292-03

Correlation analysis of primary biliary cirrhosis with HLA-DRB1 alleles polymorphism

LIU Hai-Ying^{1,2}, ZHOU Ye¹, YAO Ding-Kang³, CHEN Yan¹, TU Xiao-Qing¹, ZHANG Jian¹, FAN Lie-Ying¹, GAO Chun-Fang¹, DENG An-Mei¹, ZHONG Ren-Qian^{1*} (1. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the frequencies of HLA-DRB1 alleles in Chinese patients with primary biliary cirrhosis(PBC) and to assess the role of HLA molecules in clinic and laboratory. **Methods:** Genotyping of HLA-DRB1 was performed in 65 well-characterized PBC patients and 431 healthy controls with polymerase chain reaction-sequence-specific primers. **Results:** The frequency of DRB1 * 0701 was increased by 29.2% compared with 13.9% in controls ($P < 0.05$, OR = 2.55, 95%CI: 1.4-4.6), while frequencies for the other DRB1 alleles were similar in 2 groups. All DRB1 * 07 positive patients were further subtyped as DRB1 * 0701. There was no significant difference between patients with and without DRB1 * 0701 in some clinical and laboratory features. **Conclusion:** Susceptibility to primary biliary cirrhosis in Chinese individuals is associated with DRB1 * 0701 allele, which is different from those in North Americans, South Americans, North Europeans and even Japanese, which provides an important clue for a specific immunotherapy of this disease.

[KEY WORDS] liver cirrhosis, biliary; human leukocyte antigens; alleles

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1292-1294]

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一类以肝内小胆管进行性、非化脓性、破坏性炎症为特征的自身免疫性肝病, 主要累及中老年妇女, 国内外均有发生。随着临床医生对该病认识的逐步深入和实验室检查手段的不断提高, 近年来国内外对 PBC 的报道均明显增加^[1]。PBC 的病因和确切发病机制至今尚不完全清楚, 有许多证据提示该病与自身免疫有关。在自身反应性 T 细胞的成熟、T 细胞活化和免疫识别等整个免疫反应过程始终需要 HLA I、II 类分子的参与, 因此 HLA 在 PBC 致病机制中起着举足轻重的作用。国外研究亦表明, HLA 基因与 PBC 发病、病情进展存在一定的关联性, 不同的地区或种族其基因易感性又不尽一致。但至今尚未见中国患者人群相关报道, 为寻找与 PBC 相关的 HLA 分子, 探讨我国 PBC 的遗传易感

背景, 我们利用序列特异性引物 PCR(SSP-PCR)研究一组中国人群 PBC 患者的 HLA-DRB1 等位基因多态性。

1 材料和方法

1.1 研究对象 65 名 PBC 患者来自江、浙、沪, 主要为上海地区, 均符合美国肝病学会 2000 年推荐的 PBC 诊断指南^[2]。男女比例约为 1:8.3(7/58), 年龄 31~87 岁, 平均年龄为(54.6±10.6)岁; 发病时的年龄 31~67 岁, 平均发病年龄是(51.9±9.6)岁;

[基金项目] 国家自然科学基金(30300157); 上海市卫生系统百人跨世纪优秀学科带头人培养基金(沪卫科 9713)。

[作者简介] 刘海英(1970-), 女(苗族), 博士, 主管技师。现在广州军区总医院检验科, 广州 510010。

*Corresponding author. E-mail: rqzhong@guomai.sh.cn

病程为 0.3~12 年,平均病程为(3.4±2.7)年。431 例无亲缘关系的健康献血员为正常对照组。

1.2 基因分型

1.2.1 外周血基因组 DNA 的提取 取受检者枸橼酸钠抗凝血 400 μ l,采用固相亲和柱分离法(Qia-gen, Hilden, Germany)提取外周血 DNA,以 DNA 测量仪测定 DNA 的浓度及纯度。 D_{260}/D_{280} 比值范围为 1.6~1.8,浓度为 75~200 ng/ μ l,置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。

1.2.2 SSP-PCR 基因分型 采用低分辨 HLA-ABDR 分型试剂盒(One Lambda, Canoga Park, USA)进行 HLA-DRB1 等位基因分型,其原理基于编码各种 HLA 抗原表型的等位基因均可用相应的序列特异性引物进行扩增。PCR 反应条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 10 s、63 $^{\circ}$ C 60 s 共 10 个循环;变性 94 $^{\circ}$ C 10 s、退火 59 $^{\circ}$ C 50 s、延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s 共 20 个循环。对于有统计学意义的等位基因,我们继续采用该公司高分辨 SSP-PCR 试剂盒鉴定其亚型。

1.2.3 结果判定 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶中(含溴化乙啶 1 μ g/ml)电泳,根据泳道中扩增的 DNA 条带对照试剂盒提供的格局表判断 DRB1 等位基因或亚型结果。

1.3 肝功能及自身抗体检测 肝功能指标如碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、胆红素、胆汁酸、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)用全自动生化分析仪(ADVIA1650, Bayer)检测。血清总 IgG、IgM 用散射比浊法分析(BN ProSpec, Dade Behring)。抗核抗体(ANA)、AMA 则用间接免疫荧光方法检测,ANA 采用的基质片为猴肝组织切片和 Hep2 细胞,而 AMA 则采用大鼠的胃、肾及肝组织切片和 Hep2 细胞为基质片(Euroimmun, Luebeck, GER);M2 抗体以免疫印迹方法进行检测^[3]。

1.4 统计学处理 患者组与正常对照组之间的基因频率进行 χ^2 检验或 Fisher 精确检验;根据 Bonferroni 不等法则校正 P 值,即校正后的 P_c 值等于 P 值乘以试验系统所检测的抗原数。相对危险度以比值比(OR)表示。均数间的比较则采用 t 检验,所有数据皆以 SPSS 软件系统处理。

2 结果

2.1 HLA-DRB1 等位基因在 PBC 及正常对照组中的分布 如表 1 所示,PBC 组中 HLA-DRB1 * 07 和 DRB1 * 03 等位基因出现频率要高于正常对照组。但 P 值经过校正后,PBC 组与对照组之间的

DRB1 * 03 的差异不再具有统计学意义。65 例患者中有 19 例携带 DRB1 * 07 等位基因,出现频率为 29.2%,而对照组中,该基因出现频率仅为 13.9% ($P_c < 0.05$, OR = 2.55, 95%CI: 1.4~4.6),两组经校正 P 值后仍然具有显著性差异。PBC 组 DRB1 * 12(16.9% vs 28.8%)的频率较正常对照组低,校正后则无明显差异,其他等位基因出现频率在两组间无显著性差异。

表 1 HLA-DRB1 等位基因在 PBC 及对照组中的分布
Tab 1 HLA-DRB1 typing in patients with PBC and healthy controls

Alleles	PBC [N=65, n(%)]	Control [N=431, n(%)]	P	P_c	Odds ratio
DRB1 * 01	1(1.5)	21(4.9)	0.371		
DRB1 * 03	12(18.4)	31(7.2)	0.006	NS	
DRB1 * 04	15(23.1)	96(22.3)	0.885		
DRB1 * 07	19(29.2)	60(13.9)	0.002	0.022	2.55
DRB1 * 08	11(16.9)	62(14.4)	0.590		
DRB1 * 09	24(36.9)	138(32.0)	0.432		
DRB1 * 10	1(1.5)	10(2.3)	0.690		
DRB1 * 11	4(6.2)	62(14.4)	0.069		
DRB1 * 12	11(16.9)	124(28.8)	0.045	NS	
DRB1 * 13	5(7.7)	65(15.1)	0.111		
DRB1 * 14	3(4.6)	53(12.3)	0.068		
DRB1 * 15	12(18.5)	65(15.1)	0.483		
DRB1 * 16	5(7.7)	16(3.7)	0.248		

NS: Not significant

2.2 HLA-DRB1 * 07 亚型分析 DRB1 * 07 共有 5 个亚型,分别为 DRB1 * 0701、DRB1 * 0703~0706,我们进一步采用 DR7 高分辨 SSP-PCR 试剂盒对 PBC 组 DRB1 * 07 阳性患者进行亚型分析,结果显示 19 例 DRB1 * 07 阳性 PBC 患者均为 DRB1 * 0701,未检测到其他亚型。

2.3 PBC 患者临床及实验室指标与 HLA-DRB1 * 0701 的关系 80%PBC 患者的总 IgM 水平高于正常参考范围,54 例 ANA 滴度 $\geq 1:100$,所有患者的 AMA 为阳性,其中 M2 抗体为阳性者有 59 例(90.8%)。为了评估易感基因对 PBC 患者的影响,我们同时对 DRB1 * 0701 阳性与 DRB1 * 0701 阴性患者进行比较,发现两组间临床资料(如性别构成、平均年龄、发病年龄、病程)和实验室指标(如 ALP、 γ -GT、胆红素、胆汁酸、ALT、AST、总 IgG、IgM 水平以及自身抗体)均无显著性差异。

3 讨论

本研究发现中国人群 PBC 患者与 HLA-DRB1

* 0701 等位基因相关,DRB1 * 0701 是中国人中较为常见的一个等位基因,在以往的研究中未发现其与 PBC 有关联性。HLA-DRB1 分子高变区内的第 74 位和第 78 位氨基酸是 DRB1 * 0701 的重要抗原结合位点^[4],而 DRB1 * 0701 第 78 位上的氨基酸为疏水的脂肪族氨基酸-缬氨酸(Val),除了 DRB1 * 09 在此位亦是缬氨酸外,其他所有 DRB1 分子均为正电荷的芳香族氨基酸-酪氨酸(Tyr)。HLA-DRB1 第 78 位上的缬氨酸残基可能在 PBC 发病中自身抗原提呈中发挥了重要作用。

国外就此方面的研究结果不尽一致,DRB1 * 08 是其中报道最多的一种,它被认为是英国、美国、日本以及瑞典人群 PBC 易感基因^[5~8],其他的还有 DRB1 * 0901 和 DRB1 * 14^[5,8];也有研究否定 PBC 发病与 HLA-DRB1 等位基因之间的相关性^[9~11]。实际上,HLA-DRB1 与 PBC 的相关性都不是特别的密切,最多只有 1/3 的患者携带这些易感基因。Southwood 等^[12]新近研究提示,几种常见的 HLA-DR 抗原(DRB1 * 0101、DRB1 * 0401 和 DRB1 * 0701)可以提呈某些相同的抗原肽,其中有些抗原肽还可与包括 DRB1 * 0901、DRB1 * 0802 等在内的 HLA 分子相结合。因此可以推测,PBC 可能是一种多基因疾病,其自身抗原很可能同时为所报道的易感基因 HLA-DRB1 * 08、DRB1 * 0901 和 DRB1 * 0701 等 HLA 分子提呈。

总之,HLA 抗原在发生自身免疫过程中起着重要作用,探讨 HLA 与 PBC 的关联性,对于确定致病基因、明确发病机制和促进 PBC 的免疫治疗都是至关重要的。本研究提示,HLA DRB1 * 0701 与中国 PBC 患者有一定关联,这将为研究 PBC 特异性免疫治疗提供线索,但由于统计例数有限,尚需作进一步的大样本研究。

[参考文献]

- [1] 刘海英,范列英,屠小卿,等.肺炎衣原体感染与原发胆汁性肝硬化的相关性研究[J].中华肝脏病杂志,2004,12(9):546-548.
- [2] Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines[J]. *Hepatology*, 2000, 31(4):1005-1013.
- [3] Jiang XH, Zhong RQ, Tu XQ, et al. Construction and expression of a humanized M2 autoantigens trimer and its application in the diagnosis of primary biliary cirrhosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(6):1352-1355.
- [4] Krieger JI, Karr RW, Grey HM, et al. Single amino acid changes in DR and antigen define residues critical for peptide-MHC binding and T cell recognition[J]. *J Immunol*, 1991, 146(7):2331-2340.
- [5] Begovich AB, Klitz W, Moonsamy PV, et al. Genes within the HLA class II region confer both predisposition and resistance to primary biliary cirrhosis[J]. *Tissue Antigens*, 1994, 43(2):71-77.
- [6] Onishi S, Sakamaki T, Macda T, et al. DNA typing of HLA class II genes: DRB1 * 0803 increases the susceptibility of Japanese to primary biliary cirrhosis[J]. *J Hepatol*, 1994, 21(6):1053-1060.
- [7] Donaldson P, Agarwal K, Craggs A, et al. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility[J]. *Gut*, 2001, 48(3):397-402.
- [8] Wassmuth R, Depner F, Danielsson A, et al. HLA class II markers and clinical heterogeneity in Swedish patients with primary biliary cirrhosis[J]. *Tissue Antigens*, 2002, 59(5):381-387.
- [9] Zhang L, Weetman AP, Bassendine M, et al. Major histocompatibility complex class-II alleles in primary biliary cirrhosis[J]. *Scand J Immunol*, 1994, 39(1):104-106.
- [10] Invernizzi P, Battezzati PM, Crosignani A, et al. Peculiar HLA polymorphisms in Italian patients with primary biliary cirrhosis[J]. *J Hepatol*, 2003, 38(4):401-406.
- [11] Bittencourt PL, Palacios SA, Farias AQ, et al. Analysis of major histocompatibility complex and CTLA-4 alleles in Brazilian patients with primary biliary cirrhosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(9):1061-1066.
- [12] Southwood S, Sidney J, Kondo A, et al. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires[J]. *J Immunol*, 1998, 160(7):3363-3373.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-11-11

[本文编辑] 贾泽军,邓晓群

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN31-1001/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA

ISSN 1000-1948X
CN31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725