

中国北方汉族人原发性胆汁性肝硬变与 HLA-DRB 基因相关性的初步研究

赵 军¹, 苏海滨², 朱 冰¹, 迟淑萍², 吴贻琛¹, 辛绍杰¹, 李 靖², 舒翠莉², 王业东^{1*}, 程 云^{2*}

(1. 解放军第 302 医院感染三科, 北京 100039; 2. 传染病研究所免疫室, 北京 100039)

[摘要] **目的:**初步探讨中国北方汉族人群原发性胆汁性肝硬变(PBC)患者与人类白细胞抗原(HLA)-DRB 等位基因的相关性。**方法:**利用基因芯片技术对 40 例中国北方汉族 PBC 患者和 67 例健康对照人群进行了 HLA-DRB 等位基因的分型检测。两组年龄构成和男、女比例均无统计学差异。**结果:**本组 PBC 患者中 HLA-DR7 的出现频率为 50%, 远高于健康对照组的 10.4% ($\chi^2=20.77, P=0.000, RR=8.57$), 同时也高于文献报道的两组中国北方健康人群中的出现频率[分别为 23.2% ($N=342, P=0.000$) 和 29% ($N=255, P=0.008$)]。本组 PBC 患者中 HLA-DR8 的检出率为 22.5%, 明显高于健康对照组的 7.5% ($\chi^2=4.980, P=0.026, RR=3.60$), 同时也高于文献报道的两组中国北方健康人群中的出现频率[11.2% ($N=342, P=0.038$) 和 10.2% ($N=255, P=0.025$)]。**结论:**HLA-DR7 和 DR8 基因可能与中国北方人群的 PBC 发病有一定的相关性, 其中 DR7 在国外文献中尚未见报道。

[关键词] 肝硬化, 胆汁性; HLA 抗原; 等位基因; 微阵列分析

[中图分类号] R 575.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1286-04

Relationship between HLA-DRB alleles and primary biliary cirrhosis in patients living in northern China

ZHAO Jun¹, SU Hai-bin², ZHU Bing¹, CHI Shu-ping², WU Yi-chen¹, XIN Shao-jie¹, LI Jing², SHU Cui-li², WANG Ye-dong^{1*}, CHENG Yun^{2*} (1. Third Department of Infectious Diseases, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2. Department of Immunology, Beijing Institute of Infectious Diseases, Beijing 100039)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the relationship between HLA-DRB alleles and primary biliary cirrhosis (PBC) in patients living in northern China. **Methods:** The HLA-DR genes of 40 PBC patients and 67 healthy controls were genotyped by using DNA microarray technique. The subjects in the 2 groups were matchable in their ages and gender ratios. **Results:** The frequency of HLA-DR7 was 50% in PBC patients, which was significantly higher than that of healthy controls (10.4%) ($\chi^2=20.77, P=0.000, RR=8.57$) and those reported in another 2 literatures (23.2%, [$N=342, P=0.000$] and 29%, [$N=255, P=0.008$]). The frequency of HLA-DR8 was 22.5% in PBC patients, which was significantly higher than that of healthy controls (7.5%, [$\chi^2=4.980, P=0.026, RR=3.60$]) and those reported in the other 2 literatures (11.2%, [$N=342, P=0.038$] and 10.2%, [$N=255, P=0.025$]). **Conclusion:** It is suggested that the morbidity of PBC in northern Chinese citizens is associated with HLA-DR7 and DR8. DR7 has not been reported in literatures outside China.

[KEY WORDS] liver cirrhosis, biliary; HLA antigens; alleles; microarray analysis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1286-1289]

原发性胆汁性肝硬变(PBC)是一个原因不明的慢性炎症性和胆汁淤积性的肝脏疾病,以免疫介导的小叶内和间隔的小胆管受到渐进性的和不可逆转的损伤为特征,并可进一步导致肝硬变和肝功能衰竭。近年来国内该病的发病率和(或)就诊率呈上升趋势,逐渐引起人们的重视。PBC 病因及发病机制目前尚未明确,其免疫遗传学方面的研究越来越引起人们的兴趣。PBC 患者多见于妇女,有家庭聚集现象,其第一代亲属的发病率高于普通人群近 100 倍^[1,2],提示了基因遗传因素在其发病中所起的重要作用。

人类主要组织相容性复合体(MHC)是目前国外对 PBC 研究中涉及最多的人类基因区段,其与

PBC 发病的相关性在欧美及日本人群中已有较多报道^[3-8],国内仅有两组上海及其周边地区南方人群的研究报道^[9,10],尚无中国北方人群的研究资料。为此,我们利用基因芯片技术,检测了中国北方人群中 40 例 PBC 患者的 HLA-DR 型别,以寻找可能的致病相关基因。

[基金项目] 国家自然科学基金(30300320);军队“十五”医学科研课题(04M013)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30300320) and Medical Science Research Foundation of the PLA(04M013)。

[作者简介] 赵 军,博士,副教授,硕士生导师。E-mail:zhj68@263.net
* Corresponding authors. E-mail:wangyd302@163.com;
yuncheng21@yahoo.com

1 材料和方法

1.1 研究对象 40例PBC患者为2001~2004年解放军第302医院住院患者,均为汉族,籍贯为北京及周围地区(冀、豫、晋、辽、鲁、内蒙等),诊断参照2000年AASLD(美国肝病学会)PBC指导建议^[1],并除外PBC/自身免疫性肝炎重叠综合征的患者。其中女性36例,男性4例,年龄24~72岁,平均(47.7±9.7)岁,37例线粒体抗体(AMA)和(或)AMA-M2阳性,10例行肝穿刺病理检查证实。正常人对照为67例健康献血员,同样选自北京及周围地区,其中女性52例,男性15例,年龄18~44岁,平均(34.2±8.4)岁,均为汉族。本研究除外移居上述北方地区的南方人群。

1.2 自身抗体检测 AMA采用间接荧光法检测(德国Euroimmun公司产品)。AMA-M2同时使用我国中颐瑞康生物技术研究所和德国Euroimmun公司的ELISA试剂盒检测。

1.3 基因组DNA提取 患者和对照人群的冻存外周血淋巴细胞或抗凝全血中DNA提取使用QIAGEN试剂盒。

1.4 HLA-DR区分型 由联合基因集团上海博星基因芯片有限责任公司负责完成。具体方法如下。

1.4.1 引物和分型探针 PCR引物根据HLA-DR的exon2区域设计:sense: 5'-ccc cca agc acg ttt cct g-3'; antisense: 5'-ccg ctg cac tgt gaa gct ct-3'。同时根据HLA-DR不同基因亚型的独特序列设计探针45条,经氨基修饰后,用于芯片的点样。

1.4.2 主要试剂和仪器 PCR所用相关试剂分别购自TaKaRa和上海生工生物技术工程服务有限公司;3-氨基三三甲氧基硅烷(APS)、DMF(Sigma公司);1,4-苯二异硫氰酸盐(1,4-phenylene diisothiocyanate, Aldrich. Chem. Co.); Cy5-dCTP(Pharmacia);2×杂交液(10×SSPE,1% SDS)。其他化学试剂均为分析纯。PCR扩增仪(GeneAmp®PCR System 9600),点样仪(Carteian Pixsys 7500),扫描仪ScanArray4000(General Scanning Inc.)均由博星基因芯片公司提供。

1.4.3 标记PCR反应 在25 μl的反应体系中含引物:荧光引物2 μl,模板DNA 50~100 ng,1×缓冲液,Mg²⁺ 1.5 mmol/L,dNTP 0.2 mmol/L及2.5 U的Taq酶。程序:95℃×5 min;95℃×30 s,

58℃×30 s,72℃×20 s,35个循环;72℃ 5 min。

1.4.4 芯片的制备 用点样液溶解合成好的寡核苷酸探针,终浓度为100 μmol/L,将探针加在384孔板里,启动点样仪点成所要的矩阵;而后30 min水合,1 h室温放置干燥,0.2%的SDS、双蒸水依次冲洗,自然晾干,4℃保存。

1.4.5 杂交 取10 μl PCR产物,加经48℃预热的杂交液4 μl,混匀离心后置99℃变性3 min,迅速移至冰上,取12 μl点样,加盖玻片,放入杂交舱,48℃水浴1 h。

1.4.6 洗片 从杂交舱取出芯片,放入盛有1×洗脱液的染色缸,室温放置5 min,用ddH₂O冲洗2遍,室温下干燥。

1.4.7 扫描 用ScanArray4000扫描仪在75或80扫描强度扫描。

1.4.8 结果分析 使用HLA-DRB软件分析(自制)或人工分析[注:上述标本由博星公司使用SSP-PCR方法(略)同时检测,结果与芯片检测结果一致]。

1.5 统计学处理 组间比较采用Pearson卡方检验和Fisher's确切概率计算法,均由Stata统计软件完成。

2 结果

2.1 两组患者HLA-DRB等位基因分型检测结果 在本组PBC患者HLA-DRB1区段的各种等位基因中(表1),DR7的出现频率最高,为50%,明显高于健康对照组的10.4%,卡方检验表明两组间差异有统计学意义($\chi^2=20.77, P=0.000, RR=8.57$)。DR8的出现频率为22.5%,也明显高于健康对照组的7.5%,且两组间差异有统计学意义($\chi^2=4.980, P=0.026, RR=3.60$)。PBC患者中DR12的出现频率较低,为15%,与健康对照组的35.8%相比,差异同样有统计学意义($\chi^2=5.382, P=0.020, RR=0.32$)。此外,从表1中还可看出,PBC患者中DR1、DR11及DR53(DRB4)等的出现频率均相对高于健康对照组,而DR9、DR16和DR17等出现频率低于健康对照组,但组间差异均无统计学意义。

2.2 本组结果与既往报道结果的比较 将本组结果与文献报道^[12,13]的中国北方健康人群HLA-DRB1区段的等位基因分布进行比较,可以发现本组PBC患者中DR7、DR8基因的出现频率同样明显高于文献报道的健康人群中的出现频率,统计学分

析表明其与两组间的差异均有统计学意义(表2)。其他 DR 基因的出现频率,包括 DR12、DR1、DR11、DR16、DR17 等,与文献报道的两组健康人群中的频率相比,则无显著性差异(P 值均大于0.05)。

表 1 PBC 和健康对照人群中 HLA-DRB 基因出现频率及统计学分析结果
Tab 1 HLA-DRB allele frequency in PBC patients and healthy controls

DRB allele	Frequency(%)		RR	P value		
	PBC (n=40)	Control (n=67)				
DRB1:	DR1	10.0	03.0	3.61	0.127	
	DR4	17.5	26.9	0.58	0.268	
	DR7	50.0	10.4	8.57	0.000	
	DR8	22.5	7.50	3.60	0.026	
	DR9	17.5	31.3	0.47	0.115	
	DR10	2.50	03.0	0.83	0.883	
	DR11	22.5	9.00	2.95	0.051	
	DR12	15.0	35.8	0.32	0.020	
	DR13	2.50	09.0	0.26	0.191	
	DR14	2.50	7.50	0.32	0.280	
	DR15	25.0	20.9	1.26	0.622	
	DR16	0.00	06.0	0.00	0.115	
	DR17	2.50	11.9	0.19	0.089	
	DR18	2.50	06.0	0.40	0.411	
	DRB3:	* 01	10.0	16.4	0.57	0.355
		* 02/03	40.0	50.7	0.65	0.281
	DRB4:	DR53	77.5	61.2	2.18	0.082
	DRB5:	DR51	25.0	29.9	0.78	0.589

表 2 PBC 患者与文献报道的中国北方健康人群 HLA-DR 基因出现频率(%) 的比较
Tab 2 Frequencies (%) of HLA-DR alleles in PBC patients and those reported in healthy northern Chinese citizens

HLA-DR allele	PBC (n=40)	Reference 12 (n=342)	P_a value	Reference 13 (n=255)	P_b value
DR1	10	6.4	0.397	3.9	0.093
DR7	50	23.2	0.000	29	0.008
DR8	22.5	11.2	0.038	10.2	0.025
DR9	17.5	28.9	0.126	24.7	0.319
DR11	22.5	35.8	0.097	11.8	0.062
DR12	15	15.2	0.973	16.4	0.815
DR16	0	4.6	0.162	5.1	0.144
DR17	2.5	5.2	0.447	8.6	0.179

P_a : PBC vs Reference 12; P_b : PBC vs Reference 13

3 讨论

由于在不同民族和地理环境中,MHC 基因型别分布差异较大,因此在 MHC 与疾病相关性的研究中,病例组和对照组中研究对象的背景一致性十

分重要。本研究两组人群均选自北京及周围地区,为中国汉族人群,两组之间男女性别比例无统计学差异($P=0.104$)。

从国内外现有的研究结果来看,PBC 与 MHC I 类基因的关系不大^[3,4],MHC II 类基因中报道较多的为 HLA-DR8 分子(DRB1 * 08),它在对德国、北美、英国、美国和意大利等西方人群^[3,5~7]以及日本人群^[8]的调查中均被发现与 PBC 起病有一定相关性。姜小华等^[9]关于一组中国南方人群 PBC 的研究资料也提示 DRB1 * 08 与 PBC 易感性高度相关。本组资料中,DR8 基因的出现频率为22.5%,明显高于健康对照组的 7.5%,同时也明显高于文献报道的其他两组健康人群的 11.2%和 10.2%,且差异均有统计学意义,同样提示 DR8 为可能的 PBC 易感基因。

本组研究中 DR7 基因的出现频率最高,检出率达 50%,远高于健康对照组的 10.4%,同时也明显高于文献报道的其他两组中国北方健康人群中的出现频率(分别为 23.2%和 29%),统计学分析均有显著性差异。提示 DR7 基因在中国人群中可能为潜在的 PBC 易感基因,这与国内刘海英等^[10]关于一组中国南方人群 PBC 的研究报道类似。但在国外其他文献中尚未见报道,其原因在一定程度上可能是因为 DR7 本身在中国汉族人群中分布较多,而在包括日本人群在内的其他种族中分布相对较少^[13],加上检测的样本不够充足,以至于被掩盖。

DR11 的出现频率在本组 PBC 患者中为 22.5%,高于本组健康人群的 9%,卡方检验 P 值为 0.051,接近于 0.05 的检验水准,但 DR11 在文献报道的其他两组健康人群中的出现频率相差较大,分别为 35.8%和 11.8%,无法得出一致的结论。此外,在意大利人群的研究中^[7,14],DR11 甚至被认为是可能的保护性基因,因此其在不同人群的真实分布情况还有待进一步研究,初步考虑其与中国人群 PBC 的相关性不大。

DR12 的出现频率在本组 PBC 患者中为 15%,明显低于本组健康人群的 35.8%,并且两组差异有统计学意义($P=0.020$),提示可能为 PBC 保护性基因,但是在与文献报道的其他两组健康人群中出现频率的比较中未能得到进一步证实。此外,DR13、DR14、DR16、DR17 等在本组 PBC 患者中出现频率均较低,但与健康人群相比无统计学差异。

在本组研究中,我们未发现特殊的 HLA-DRB 的单倍体组成与 PBC 疾病易感性有关。HLA-DRB1 与 DRB3、DRB4 或 DRB5 的单倍体组成均为常见的 5 种单倍体型。DR53 在本组 PBC 患者中的检出率为 77.5%,高于疾病对照组的 57.7%和健康对照组的 41%,考虑主要是由于 DR53 与 DR7 之间存在单倍体连锁不平衡造成,而并非 DR53 单独与 PBC 易感性有关。

PBC 患者易感型别的确定将对 PBC 的病因和发病机制的研究有较大的帮助。MHC 分子对于机体的免疫反应是必不可少的, MHC II 类分子与 CD4⁺ 的 T 细胞免疫密切相关,而有报道在 PBC 患者肝内损伤胆管周围浸润的淋巴细胞以 CD4⁺ 的 T 细胞为主^[15],并且在患者的胆管上皮细胞中有 HLA-DR 分子的异常表达^[16],因此对 PBC 的 MHC II 类易感基因或其抗原分子、自身靶抗原和淋巴效应细胞的相互作用关系的进一步研究,有可能帮助阐明 PBC 患者胆管损伤的具体机制。此外从目前的资料来看,PBC 患者基因易感性可能并不决定于某单一基因,而是依赖于多个基因的相互作用,同时可能存在种族特异性,或者 HLA 基因并不是真正的致病基因,只是与致病基因处于一种连锁不平衡状态,但通过对 HLA 与 PBC 关联的研究,可进一步寻找与 HLA 连锁的其他或真正的致病基因。

由于本组研究中 PBC 患者仅 40 例,其研究结论还有待于进一步扩大检测样本数量来进行验证。总之,对 PBC 易感基因的进一步研究可为 PBC 病因学研究打下基础,并为疾病的预测、诊断和预防提供帮助。

[参考文献]

- [1] Jones DEJ, Watt FE, Metcalf JV, et al. Familial primary biliary cirrhosis reassessed: a geographically based population study[J]. *J Hepatol*, 1999, 30:402-407.
- [2] Tsuji K, Watanabe Y, Van de Water J, et al. Familial primary biliary cirrhosis in Hiroshima[J]. *J Autoimmun*, 1999, 13:171-178.
- [3] Manns MP, Bremm A, Schneider PM, et al. HLA Drw8 and complement C4 deficiency as risk factors in primary biliary cirrhosis[J]. *Gastroenterology*, 1991, 101:1367-1373.
- [4] Morling N, Dalhoff K, Fugger L, et al. DNA polymorphism of HLA class II genes in primary biliary cirrhosis[J]. *Immunogenetics*, 1992, 35:112-116.
- [5] Stone J, Wade JA, Cauch-Dudek K, et al. Human leukocyte antigen class II associations in serum antimitochondrial antibodies (AMA)-positive and AMA-negative primary biliary cirrhosis[J]. *J Hepatol*, 2002, 36:8-13.
- [6] Mullarkey ME, Stevens AM, McDonnell WM, et al. Human leukocyte antigen class II alleles in Caucasian women with primary biliary cirrhosis[J]. *Tissue Antigens*, 2005, 65:199-205.
- [7] Donaldson PT, Baragiotta A, Heneghan MA, et al. HLA class II alleles, genotypes, haplotypes, and amino acids in primary biliary cirrhosis: a large-scale study[J]. *Hepatology*, 2006, 44:667-674.
- [8] Onishi S, Sakamaki T, Maeda 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, 21:1053-1060.
- [9] 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]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12:436.
- [10] 刘海英, 周 晔, 姚定康, 等. 原发性胆汁性肝硬化与 HLA-DRB1 等位基因的相关性分析[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25:1292-1294.
- [11] Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2000, 31:1005-1013.
- [12] 曹孟德, 秦东春, 孙含笑 主编. HLA 分子生物学及临床应用 [M]. 长沙: 湖南医科大学出版社, 1998:40.
- [13] 陈香美, 刘述文, 柏立群, 等. 中国北方汉族人 HLA-DR 的 DNA 分型[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 1993, 13:43-45.
- [14] Invernizzi P, Battezzati PM, Crosignani A, et al. Peculiar HLA polymorphisms in Italian patients with primary biliary cirrhosis[J]. *J Hepatol*, 2003, 38:401-406.
- [15] Shimoda S, Van de Water J, Ansari A, et al. Identification and precursor frequency analysis of a common T cell epitope motif in mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102:1831-1840.
- [16] Van de Water J, Ansari A, Desumer VJ, et al. Expression of MHC products by normal and abnormal bile duct epithelium [J]. *J Hepatol*, 1987, 3:310-317.

[收稿日期] 2006-10-24

[修回日期] 2006-11-30

[本文编辑] 邓晓群