

· 论 著 ·

宁波汉族人群乙肝免疫应答与 HLA DRB1 * 07、DRB1 * 04、DRB1 * 1001、DQB1 * 0401 的相关性

赵晋丰,陈海棠,曹广文* (第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室,上海 200433)

[摘要] 目的:研究乙肝疫苗免疫应答与人 HLA DRB1 * 07、DRB1 * 04、DRB1 * 1001、DQB1 * 0401 的相关性。方法:浙江宁波汉族人群常规程序注射乙肝疫苗后,采其外周静脉血检测乙肝表面抗体,根据检测结果分为 2 组:乙肝免疫应答阳性组(抗-HBs D 值 ≥ 0.1 , $n=120$)和乙肝免疫应答阴性组(抗-HBs D 值 < 0.1 , $n=120$)。采用聚合酶链反应-序列特异性引物法(PCR-SSP)检测其 HLA DRB1 * 07、DRB1 * 04、DRB1 * 1001、DQB1 * 0401 基因分布及频率。结果:两组观察对象性别、年龄差异均无统计学意义,具有可比性。免疫应答阴性组 HLA-DRB1 * 07 基因频率明显高于阳性组,免疫失败与 DRB1 * 07 呈强关联($OR=0.45$, $P<0.05$), HLA DRB1 * 04、DRB1 * 1001、DQB1 * 0401 基因频率在两组研究对象中差异均无统计学意义。结论:浙江宁波地区汉族人群接种乙肝疫苗免疫失败与 HLA-DR 抗原有关,HLA-DRB1 * 07 可能为免疫失败的易感基因。

[关键词] HLA-DR 抗原;肝炎疫苗,乙型;免疫应答

[中图分类号] R 512.62 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2007)08-0843-03

Correlation between immune response to hepatitis B vaccine and HLA DRB1 * 07 DRB1 * 04 DRB1 * 1001, DQB1 * 0401 genes in Han population in Ningbo

ZHAO Jin-feng, CHEN Hai-tang, CAO Guang-wen* (Department of Epidemiology, Faculty of Medical Services, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Objective: To study the correlation between responses to Hepatitis B and HLA DRB1 * 07 DRB1 * 04 DRB1 * 1001, DQB1 * 0401 genes in Han population in Ningbo. Methods: A total of 240 Han people living in Ningbo received the routine vaccination of recombinant hepatitis B vaccine. The serum levels of anti-HBs antibody were examined and the subjects were divided into 2 groups according to the results: negative responses group ($n=120$, anti-HBs $D<0.1$) and positive response group ($n=120$, anti-HBs $D\geq 0.1$). The distribution and frequency of DRB1 * 07, DRB1 * 04, DRB1 * 1001, DQB1 * 0401 genes alleles were determined with PCR using sequence-specific primers (PCR-SSP). Results: The sex and age were compatible between the 2 groups. The frequency of DRB1 * 07 in negative response group was significantly higher than that in positive response group (20.3% vs 10.3% , $P<0.05$); the failure of vaccination was correlated with DRB1 * 07 ($OR=0.45$, $P<0.05$). The frequencies of HLA- DRB1 * 04 DRB1 * 1001, DQB1 * 0401 showed no obvious difference between the 2 groups. Conclusion: Failure or deficiency response to HBV vaccine in the Han people in Ningbo is associated with the HLA-DR antigen; HLA- DRB1 * 07 might be a susceptible gene for failure of HBV vaccination.

[KEY WORDS] HLA-DR antigens; hepatitis B vaccines; immune response

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 843-845]

乙型肝炎(乙肝)疫苗的免疫效果已经得到肯定,接种后可以显著降低人群的 HBV 感染率、HBV 慢性感染率和原发性肝癌发生率。但是在 20 世纪 70 年代开始进行的血源乙肝疫苗人体临床试验观察中发现,约 5%~10% 的乙肝疫苗接种者按常规程序免疫后出现抗体无或低应答。应答水平的高低在排除其他个体差异之外因素的影响后,仍然存在差异。

HLA(人白细胞抗原)分子作为宿主免疫反应的基本调节因子,提呈外源性抗原到 CD4⁺ T 淋巴细胞。CD4⁺ T 细胞具有 HLA II 类分子限制性,不同个体的抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)有各自的 HLA II 类决定簇,而不同的 HLA II 类分子递呈抗原肽给 CD4⁺ T 细胞的能力也不尽相同。因此,即使针对相同的乙肝病毒株,不同个体

的应答程度也有所不同,T 细胞的这种 HLA 限制性决定对乙肝疫苗的免疫应答,具有宿主遗传的差别。受动物实验的启发,很多学者开展了 HLA 基因多态性与人群免疫乙肝疫苗无或低应答关联的研究。但是发现与免疫应答相关的 HLA 基因却不尽相同。

在目前没有定论的背景下,为了研究与中国汉族人相关的乙肝免疫应答基因,选用 DRB1 * 07、DRB1 * 04、DRB1 * 1001、DQB1 * 0401 等在文献^[1]

[基金项目] 国家“十五”科技攻关计划(2004BA718B01)。Supported by 10th Five-Year Plan for Key Technology R&D Program (2004BA718B01)。

[作者简介] 赵晋丰,硕士。E-mail: zjf0605@126.com

* Corresponding author. E-mail: gcao@smmu.edu.cn

中报道与乙肝免疫应答相关的基因进行研究。

1 材料和方法

1.1 研究对象 240 名浙江宁波的汉族人,正常注射乙肝疫苗后免疫应答阴性的共 120 人,应答阳性的共 120 人。阴性阳性的判别标准为常规途径注射乙肝疫苗后,乙肝表面抗体利用紫外分光光度计测光密度值(*D*),低于 0.1 为免疫应答阴性,高于或等于 0.1 为免疫应答阳性。两组人群年龄差异没有统计学显著性,年龄范围 18~68 岁,平均(38.66±12.15)岁;两组人群性别差异也没有统计学显著性。详见表 1。

表 1 研究对象基本特征
Tab 1 General data of subjects in 2 groups

Group	Sex		Age(year)				Total
	Male	Female	15-30	31-45	46-60	61-	
N	61	58	37	42	36	4	119
P	60	59	35	48	33	3	119

N:Negative response; P:Positive response

1.2 外周血粗白细胞 DNA 抽提 取粗白细胞血 60 μl 置 1.5 ml Eppendorf 离心管中,加入 1 ml 无菌去离子水,轻轻颠倒 5~10 次,5 000 r/min 离心 3 min,弃去上清。加入 6 mol/L 碘化钠 100 μl,混旋 10 s。加入 200 μl 氯仿:异戊醇(24:1),混旋 30 s。10 000 r/min 离心 3 min。取 150 μl 上清液于另一 Eppendorf 离心管中,加入 90 μl 异丙醇,混匀。10 000 r/min 离心 5 min。弃去上清。加入 1 ml 75%无水乙醇洗涤沉淀 2 次。加 1 ml 无水乙醇洗涤沉淀 1 次,沉淀自然晾干。加入 60 μl 超纯水溶解 DNA 沉淀,置-20℃保存。

1.3 HLA DRB1 * 07、DRB1 * 04、DRB1 * 1001、DQB1 * 0401 的检测 引物设计采用序列特异性引物 PCR(PCR-SSP)的方法。引物设计参照文献^[2-3],分别针对 DRB1 * 07、DRB1 * 04、DRB1 * 1001、DQB1 * 0401 共 4 个基因。HPA1 一对引物扩增人血小板抗原基因,作为内对照序列。所用引物序列见表 2,由英俊生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系:每一 PCR 管内加入上述提取的 DNA 模板 2 μl、dNTP 2 μl(2.5 mmol/L)、10×*Taq* 酶缓冲液 2.5 μl(10 mmol/L)、MgCl₂ 1.5 μl(10 mmol/L)、一对分型引物 2 μl(10 μmol/L)、一对内参引物 0.4 μl(10 μmol/L)、*Taq* 酶 0.4 μl(1 U),加超纯水至 25 μl。PCR 扩增参数:94℃预热 3 min;94℃变性 1 min、60℃退火 50 s、72℃延伸 40 s,30 个循环;72℃过延伸 5 min。

表 2 本实验所用引物

Tab 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence(5'→3')	Amplified length (bp)
DRB1 * 04S	GTT TCT TGG AGC GGT TAA ACA	260
AS	CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC	
DRB1 * 07S	CCT GTG GCA GGG TAA GTA TA	232
AS	CCC GTA GTT GTG TCT GCA CAC	
DRB1 * 1001S	CGG TTG CTG GAA AGA CGC G	204
AS	CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC	
DQB1 * 0401S	CAC CAA CGG GAC CGA GCT	200
AS	GGT AGT TGT GTC TGC ATA GG	
HPA1 S	CTT GTC TTC CCA CCC CAT TT	358
AS	GCC ATA GTT CTG ATT GCT G	

PCR 反应产物 8 μl 在 2%琼脂糖(100 ml 加入 5 μl 100 mg/ml EB,终浓度 5 μg/ml)凝胶上电泳,稳压 95 V 50 min。电泳结果在紫外灯下观察,拍照保存。出现目的片段大小的条带判定为该基因型阳性,否则为阴性,出现内对照条带视为 PCR 扩增成功,避免假阴性的可能。

1.4 统计学处理 数据统计使用 SPSS 11.5 统计软件。乙肝免疫应答阴性组和阳性组的基因频率比较用 χ^2 检验。关联强度用比值比(odds ratio,OR)反映($OR=ad/bc$,其中 a 为无或弱应答者携带某一特定 HLA 型别的人数,d 为中、强应答者不携带某一特定 HLA 型别的人数,b 为无或弱应答者不携带某一特定 HLA 型别的人数,c 为中、强应答者携带某一特定 HLA 型别的人数)。

2 结果

两组研究对象在年龄、性别、既往感染病史等可能与乙肝免疫应答相关的因素均均衡可比,接种疫苗的时间、量、部位均按统一标准执行。两组研究对象在所研究的 4 个 HLA 基因中只有 DRB1 * 07 的频率差别有统计学意义。结果见表 3。本实验结果稳定,PCR 扩增目的基因的电泳图片见图 1。

表 3 乙肝免疫应答阳性组与阴性组的基因频率

Tab 3 Gene allele frequency in negative responders and positive responders

Gene allele	Positive responders (% ,n/N)	Negative responders (% ,n/N)	χ^2	OR
DRB1 * 04	12.5(14/112)	13.0(14/108)	0.01	1.04
DRB1 * 07	10.3(12/116) *	20.3(21/103)	4.30	0.45
DRB1 * 1001	3.6(4/110)	3.7(4/108)	0.11	0.97
DQB1 * 0401	1.9(2/108)	3.7(4/109)	0.16	0.50

* $P<0.05$ vs negative responders

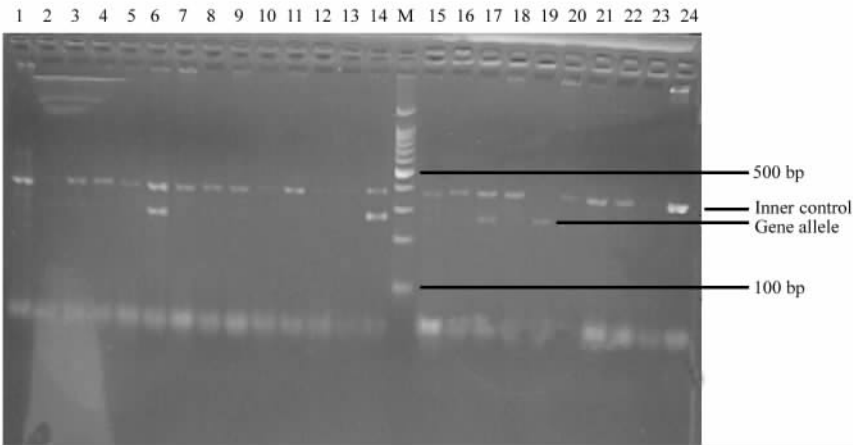


图 1 DRB1 * 07 电泳结果

Fig 1 DRB1 * 07 electrophoresis results

M: DNA marker;1-24 are DRB1 * 07 alleles of 24 members in positive responders group

3 讨论

HLA 基因系统是迄今所知最复杂、多态性最高的人类遗传系统,其编码的 HLA 抗原决定着机体的排斥反应,并与免疫应答和免疫调节等有关。研究发现对乙肝疫苗的抗体反应与人类主要组织相容性复合体(HLA)Ⅱ类基因有关,针对我国人群的研究,刘蓬勃等^[4]发现对乙肝疫苗的应答有家族聚集性,说明免疫应答有个体遗传背景差异。

Wang 等^[5]应用 PCR 技术对北美 164 例已接种重组体 HBV 疫苗的青少年进行基因分型分析,发现 HLA DRB1 * 07 的频率在乙肝免疫应答阴性组高于阳性组。此结果与本次实验及钱毅等^[6]在我国广东汉族人中的研究、刘蓬勃等^[4]在我国西安地区汉族人的研究结果相同。但目前也有很多不同的实验结果存在。涂正坤等^[7]在湖北汉族人中的研究结果是 DRB1 * 10 与乙肝疫苗低应答水平相关,而 DRB1 * 07 与乙肝疫苗应答水平无明确相关性。日本人群中对乙肝疫苗免疫的低应答与 HLA. BW54. DR4. DRW53 单倍型有关^[8]。在台湾研究发现低应答者中 DR14 发生频率高(39%),而 DQ3 频率(20%)低于正常,且 DR14-DR52 单倍体与低应答关联程度高^[9]。这些不同的结果可能是由于实验方法、研究对象的选择不同、HLA 型别判定标准不同,更有可能是由于不同民族的人遗传背景不同,说明与乙肝免疫应答相关的基因可能存在种族差别。

以上的研究只是限于寻找 HLA 各等位基因与乙肝免疫应答的关联,并没有从机制上阐明 HLA Ⅱ基因对免疫应答发生影响的过程。不同个体的免疫应答不同,可能由于不同的 HLA 基因识别、携带

抗原的能力不同,但究竟这些 HLA 基因表达的抗原如何作用目前却并不清楚。

[参考文献]

[1] Lindemann M,Barsegian V,Siffert W,et al. Role of G protein beta3 subunit C825T and HLA class Ⅱ polymorphisms in the immune response after HBV vaccination[J]. Virology,2002,297:245-252.

[2] 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 transplantations[J]. Tissue Antigens,1992,39:225-235.

[3] Olerup O,Aldener A,Fogedll A. HLA-DQB1 and-DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours[J]. Tissue Antigens,1993,41:119-134.

[4] 刘蓬勃,徐慧文,王学良,等. 乙肝疫苗接种无、弱应答与遗传因素关系[J]. 第四军医大学学报,2000,21:30-33.

[5] Wang C,Tang J,Song W,et al. HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination[J]. Hepatology,2004,39:978-988.

[6] 钱毅,章廉,梁雪梅,等. 广东汉族人群乙肝疫苗免疫应答水平与 HLA-DRB1 * 02,07,09 的相关性[J]. 第一军医大学学报,2002,22:67-69.

[7] 涂正坤,吴雄文,刘敏,等. 湖北汉族人群对乙肝疫苗免疫应答能力与 HLA-DRB1 等位基因相关性的研究[J]. 免疫学杂志,2000,16:45-47.

[8] Mineta M,Tanimura M,Tana T,et al. Contribution of HLA class I and class Ⅱ alleles to the regulation of antibody production to hepatitis B surface antigen in humans[J]. Int Immunol,1996,8:525-531.

[9] Hsu H Y,Chang M H,Ho H N,et al. Association of HLA-DR14-DR52 with low responsiveness to hepatitis B vaccine in Chinese residents in Taiwan[J]. Vaccine,1993,11:1437-1440.