文章编号:1000-5404(2006)14-1511-03

论著

重庆部分汉族人群 HLA-DQ 与弓形虫易感性研究

欧阳琳[1],李 革[1],贾庆良[2] ([1]重庆医科大学流行病学教研室,重庆 400016;[2]重庆市疾病预防控制中心,重庆 400042)

提 要:目的 了解重庆汉族人群弓形虫易感性与 HLA-DQ 间的相关性。**方法** 首先通过横断面调查筛选弓形虫感染者,按 1:1 配对选取对照,然后利用序列特异性寡核苷酸引物多聚酶链反应(PCR/SSP)对两组的 HLA-DQ1、DQ3 的分布频率进行分析。**结果** 感染组 HLA-DQ3 基因频率明显高于未感染组($P<0.05$),相对危险度为 4,而 HLA-DQ1 的基因频率在两组间无明显差异($P>0.05$)。**结论** 提示 HLA-DQ3 可能与重庆汉族人群感染弓形虫相关。

关键词:弓形虫;易感性;组织相容性抗原
中图法分类号:R195.4;R382.5;R394.5 **文献标识码**:A

Correlation of HLA-DQ in Chongqing Han population to toxoplasma infection

OUYANG Lin[1], LI Ge[1], JIA Qing-liang[2] ([1]Department of Epidemiology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016; [2]Chongqing Municipal Center for Disease Control & Prevention, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the association between HLA-DQ and the susceptibility to toxoplasma among Chongqing Han population. **Methods** Toxoplasma infected subjects were screened out by cross-sectional survey, then the control subjects were selected through pair matching at the ratio of 1:1. Polymerase chain reaction and sequence specific primer(PCR/SSP) were used to determine the frequency distribution of HLA-DQ1 and DQ3 in the two groups. **Results** The gene frequency distribution of DQ3 was increased among the toxoplasma infected individuals as compared with control subjects and the odds ratio (OR) of DQ3 was 4 ($P<0.05$), while the OR of DQ1 was 0.67 ($P>0.05$). **Conclusion** HLA-DQ3 may be associated with toxoplasma infection in Chongqing Han population.

Key words: toxoplasma infection; susceptibility; histocompatibility antigens

MHC 编码基因是脊椎动物体内最复杂且具有高度多态性的基因群。一般认为人控制免疫应答的基因位于 HLA-Ⅱ类基因区内。机体对弓形虫的主要免疫能力来自于 T 细胞介导的细胞免疫,特别是 $CD4^+$ Th1 和 Th2 细胞产生的细胞因子在弓形虫感染的免疫调节中起重要作用。由于 MHC 限制性的存在,$CD4^+$ 细胞的免疫功能受 HLA-Ⅱ类分子制约,这也就意味着Ⅱ类分子为免疫应答基因产物。因此某些特殊的 HLA 基因型可能影响机体对弓形虫感染的抵抗力。国外对弓形虫感染和 HLA 的关系进行过一些动物实验和小样本临床研究,认为主要是 HLA-DQ1 和 HLA-DQ3 基因编码抗原参与调节弓形虫感染的易感性[1]。由于世界上不同种族人群 HLA 的多态性和单元型都有各自的特点,因此对本地区人群 HLA-DQ 各等位基因分布频率及其与弓形虫感染的相关性开展研究,可以为制订本地区弓形虫防治策略提供科学依据。

我们于 2004 年对重庆市部分汉族人群开展了弓形虫感染的横断面调查,进一步将感染者和正常人群进行 HLA-DQ 分型,旨在从免疫遗传学角度分析重庆汉族人群 HLA-DQ 与弓形虫易感性的关系。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 调查对象

以重庆市某两个社区的一般人群 81 人、宠物饲养者 113 人和两农贸市场的肉类加工销售人员 41 人,共 235 人为调查对象,所有调查对象均为无血缘关系的汉族人。

感染组:横断面调查筛选出的相互间无血缘关系的弓形虫感染者。

对照组:在以上调查人群中,以 1:1 的比例按性别(相同)、

作者简介:欧阳琳(1979-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事传染病流行病学方面的研究,现在重庆市疾病预防控制中心。电话:(023)68485228, E-mail:ouyl210@126.com

收稿日期:2005-06-09;修回日期:2005-10-10

居住地区(相同)、年龄(±3岁)、宠物饲养情况(相似)为每个感染者选配1名非感染者为对照。对照组个体间也无血缘关系。

1.2 标本采集

抽取每1位调查对象静脉血约5 ml,分装为3 ml不抗凝(常规离心得血清)和2 ml EDTA抗凝2管,低温保存。

1.3 实验检测

1.3.1 弓形虫感染者筛选 采用ELISA试剂盒(晶美生物工程有限公司提供)定性检测人血清中的特异性弓形虫IgG、IgM抗体。

1.3.2 HLA-DQ1、HLA-DQ3基因频率检测 利用序列特异性寡核苷酸引物多聚酶链反应(PCR/SSP)分析感染组和对照组HLA-DQ1、DQ3的分布频率。

1.3.2.1 引物来源 参照文献[2]获得HLA-DQ3引物;在GenBank和blast上查到DQ1引物合成的模板序列,由北京赛百盛基因技术有限公司设计并提供引物,引物浓度为10 μmol/L;以HLA-DRB1基因的第三内含子DNA序列作为内参照引物。

1.3.2.2 实验步骤 ①DNA提取试剂盒(北京天为时代提供)提取基因组DNA。②采用PCR/SSP方法对样本进行HLA-DQ1及DQ3组特异性扩增。在0.5 ml的Eppenorf管中加入:模板DNA 2 μl、10×PCR缓冲液(2.5 mmol/L $MgCl_2$)4 μl、10×脱氧核苷二磷酸腺苷混合液(dNTPs,mmol/L)2 μl、HLA-DQ1或DQ3序列特异性引物1对2 μl、内参照引物1对2 μl、*Taq*酶1.7 U,消毒双蒸水补至30 μl。短暂离心后,94 ℃预变性8 min,94 ℃变性50 s→63 ℃退火30 s→72 ℃延伸1 min,30个循环后72 ℃延伸8 min。③扩增产物的检测:1.5%琼脂糖(加入EB)电泳,电压170 V,电泳30~40 min,凝胶成像分析系统中观察结果,每次结果中均有内参照,扩增产物保存在-20 ℃环境中。

1.4 资料分析及统计学处理

所有实验室数据在EPI info6.0软件中录入,采用SAS8.0软件包对数据进行分析。

计算各组HLA-DQ1及DQ3的表现型频率(f),即具有某等位基因阳性个体占人群的百分率;计算两组人群各等位基因的基因频率(GF),即某个基因座上的某等位基因占该座位上全部等位基因的比率,根据公式 $GF=1-(1-f)^{1/2}$ 推算出来。

计算比值比 $OR=c/b$,作为判定相关性的依据。

式中c代表感染者HLA-DQ1(3)阳性而未感染者阴性的对子数,b代表未感染者HLA-DQ1(3)阳性而感染者阴性的对子数。

均衡性检验采用t检验和χ^2检验,感染组和对照组HLA-DQ1及DQ3阳性率差异用配对χ^2校正公式检验。

2 结果

2.1 弓形虫感染情况

在235个调查对象中,弓形虫近期感染指标IgM检测均为阴性,筛选出的感染者全为IgG阳性者,共43人,总阳性率为18.30%;其中宠物饲养者27人(23.89%),肉类销售人员7人(17.07%),一般人群9人(11.11%)。

2.2 对照组选配及均衡性检验

按1:1比例选出对照组43人,其中男性18人,女性25人。病例组和对照组的年龄分别为(31.05±9.68)岁和(35.52±11.72)岁,两组人群年龄、宠物饲养年限、肉类销售人员工作年限经t检验无显著性差异($P>0.05$);性别、地区的构成经χ^2检验亦无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 用PCR/SSP反应扩增样本

HLA-DQ1组特异性扩增产物为420 bp,HLA-DQ3组特异性扩增产物为122 bp,内参扩增产物为796 bp(图1)。

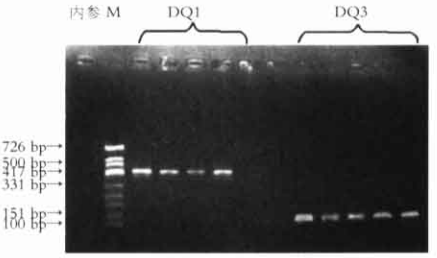


图1 HLA-DQ组特异性扩增产物的1.5%琼脂糖凝胶电泳图

2.4 人群HLA频率分布比较

在受检人群中,HLA-DQ1的表现型频率为45.39%,HLA-DQ3的表现型频率为26.74%。

感染组和对照组各自的表现型频率和基因频率见表1。2组HLA-DQ表现型频率差异分析见表2、3。

表1 2组人群表现型和基因频率分布

等位基因	感染组($n=43$)			对照组($n=43$)		
	阳性例数	f(%)	GF(%)	阳性例数	f(%)	GF(%)
DQ1	17	9.53	22.22	21	48.84	28.48
DQ3	16	37.21	20.76	7	16.28	8.51

表2 感染组和未感染组DQ1 1:1配比分析

对照组	感染组		总数	P	OR
	阳性	阴性			
阳性	9	12	21		
阴性	8	14	22	>0.05	0.67
总数	17	26	43		

表3 感染组和未感染组DQ3 1:1配比分析资料

对照组	感染组		总数	P	OR
	阳性	阴性			
阳性	4	3	7		
阴性	12	24	36	<0.05	4
总数	16	27	43		

3　讨论

弓形虫感染常发生于免疫缺陷的宿主，而弓形虫感染本身又可导致免疫抑制，进一步降低宿主的免疫功能，形成一种恶性循环，导致病情不断发展，甚至导致弓形虫脑炎等严重的并发症。故弓形虫感染的免疫机制和免疫预防方面的研究日益受到重视。

人类 HLA 基因主要分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ 3 类，Ⅱ 类基因主要有 DR、DQ 和 DP 位点。HLA-DQ 位点是 HLA 系统中唯一 α 链和 β 链均有多态性的座位，而其多态性在很大程度上影响着个体免疫应答的差异。文献[3,4]报道，HLA-DQ1 与增强口腔扁平苔癣的抵抗力有关；另有报道显示 DQ3 基因与类风湿关节炎、乙型肝炎和血吸虫病等多种感染性和炎症性疾病的易感性增强有关[5,6]。

在弓形虫方面，Mack 等[7]对美国部分白种人的研究发现，临床上弓形虫脑积水患儿 DQ3 基因出现频率比普通人群高得多，而且患儿母亲 DQ3 基因频率也比一般人群高，提示 DQ3 基因编码抗原启动保护性免疫应答的能力较弱。动物实验显示，人类 HLA-DQ 转基因鼠感染弓形虫后比普通感染鼠的脑包囊数显著减少，进一步从亚型上分析，表达 HLA-DQ1 等位基因的老鼠又比表达 DQ3 的老鼠的脑内包囊数大为减少（$P<0.01$）。另有研究者通过动物实验提出，Ld 基因在弓形虫感染与发病中起关键作用，其机制可能是 H-2D/L 区的 Ld 基因有抑制包囊形成及防止包囊破裂或是杀死从囊内逸出的虫体的功能。同时 Luder 等[8]发现，弓形虫感染人体后，会通过阻碍Ⅱ类分子转化因子 CIITA mRNA 的表达而降低 MHC-Ⅱ类分子的水平，使机体的自动免疫功能发生紊乱，导致弓形虫感染的发生和发展。

以上研究结果均显示 HLA-Ⅱ类基因编码抗原在抵抗原生动物性病原体的侵袭和致病过程中发挥了重要作用，并且 DQ1 主要与免疫力增强有关，而 DQ3 主要与易感性增强有关。在本研究中，感染者 HLA-DQ3 的频率显著高于对照组，$OR=4$，说明表达 DQ3 者感染弓形虫的危险性比 DQ3 表达阴性者高 4 倍，与以上一些研究结果一致。本次调查未发现 HLA-DQ1 基因与弓形虫感染有相关性，可能与种族差异有关，并有待于扩大样本量进一步分析。

一些非 HLA 基因因素如弓形虫的品系和基因表型也是决定弓形虫感染与发病的重要因素[1]；HLA 分子影响弓形虫感染发生、发展的作用机制目前尚未完全阐明。但是随着生物学技术的进步和研究的不断深入，人们终将弄清楚影响弓形虫感染及发病的有关因素及其作用机制，从而更有效地预防与控制弓形虫感染的发生。

此外，我们还从本次调查中得到重庆该部分汉族人群 HLA-DQ1 的表现型频率为 45.4%，低于广东汉族和湖南汉族的 DQ1 频率 77.6% 和 68.1%，也低于日本人 DQ1 的频率 69.0%；该人群 HLA-DQ3 的表现型频率为 26.7%，低于广东汉族的 76.4% 和湖南汉族的 59.6%，高于黑人的 DQ3 频率 7.1%，与白人的频率 21.7% 接近。重庆是我国人口最多、地域最广的直辖市，汉族人口近 3 000 万，目前还无本市人群 HLA-Ⅱ类分子抗原频率分布的资料。随着对 HLA 与疾病相关性的日渐关注，应建立本市更完善丰富的 HLA 资料。

参考文献：

[1] SUZUKI Y. Host resistance in the brain against Toxoplasma gondii [J]. J Infect Dis, 2002, 185 Suppl 1: S58 - S65.

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

[3] SUZUKI Y, JOH K, KWON O C, *et al*. MHC class I gene(s) in the D/L region but not the TNF-alpha gene determines development of toxoplasmic encephalitis in mice [J]. J Immunol, 1994, 153(10): 4649 - 4654.

[4] PORTER K, KLOUDA P, SCULLY C, *et al*. Class I and II HLA antigens in British patients with oral lichen planus[J]. Oral Surg Med Oral Pathol, 1993, 75(2): 176 - 180.

[5] SASAZUKI T, KIKUCHI I, HIRAYAMA K, *et al*. HLA-linked immune suppression in humans[J]. Immunol Suppl, 1989, 2: 21 - 24.

[6] THURSZ M R, KWIATKOWSKI D, ALLSOPP C E, *et al*. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia[J]. N Engl J Med, 1995, 332 (16): 1065 - 1069.

[7] MACK D G, JOHNSON J J, ROBERTS F, *et al*. HLA-class II genes modify outcome of Toxoplasma gondii infection[J]. Int J Parasitol, 1999, 29(9): 1351 - 1358.

[8] LUDER C G K, LANG C, GIRALDO-VELASQUEZ M, *et al*. Toxoplasma gondii inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA[J]. J Neuroimmunol, 2003, 134(1 - 2): 12 - 24.

（编辑　薛国文）