维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)04-0477-04

HLA-DQA1 基因多态性与儿童 Graves'病的相关性研究

程昕然,邓蕾丽,熊 丰,朱 岷

(重庆医科大学儿科学院内分泌科,重庆 400014)

【摘 要】目的:分析重庆地区汉族儿童 Graves'病(Graves' disease,GD)与人类白细胞抗原 DQA1 基因(HLA-DQA1)多态性的相关性。方法:用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)及 DNA 测序方法,对已经确诊的重庆汉族 GD 患儿 85 例和正常对照组 50 名儿童的外周血白细胞基因组 DNA 的 HLA-DQA1 基因多态性进行分析。结果:在 GD 组和对照组中检测到 7 种单链构象,分别标为 a b c d e f g 带型。GD 组中 d(HLA-DQA1*0102)、f(HLA-DQA1*0302/0501)两带型频率(分别为 43.5% VS 8.0%;27.0% VS 8.0%)显著高于正常对照组($\chi^2=18.79$, $P=0.001$, RR=8.86; $\chi^2=6.80$, $P=0.009$, RR=4.27),而 b 带型(HLA-DQA1*0101/0301)频率(8.2% VS 52.0%)显著低于正常对照组($\chi^2=29.43$, $P<0.001$, RR=0.08)。结论:HLA-DQA1*0102 和 HLA-DQA1*0302/0501 可能与 GD 易感性相关,而 HLA-DQA1*0101/0301 可能与 GD 的保护性相关。提示上述 3 基因位点可能分别是重庆地区汉族儿童 GD 的易感基因和保护基因。

【关键词】Graves'病;人类白细胞抗原;遗传多态性;聚合酶链反应-单链构象多态性

【中国图书分类法分类号】Q343.1+5;R729 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-11-20

The association between HLA-DQA1 gene polymorphism and Graves' disease of children

CHENG Xinran, et al

(*Department of Endocrinology, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To seek for susceptible and protective gene of GD by analyzing the allele frequency distribution of HLA-DQA1 loci and to evaluate the association of HLA-DQA1 gene polymorphism with GD pathogenesis in Chongqing children of Han race. *Methods*: Eighty-five children with GD [including 21 boys and 64 girls, mean age (8.84±2.51)] and 50 racially matched healthy controls were recruited for the study. Both groups were of Han race. Genomic DNA was extracted from venous blood samples. Genotypes of HLA-DQA1 were detected by polymerase chain reactions with single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). The results were identified by DNA sequence typing. Frequencies of HLA-DQA1 alleles at eath locus were compared between patients and controls using the χ^2-test. *Results*: 7 kinds of HLA-DQA1 conformations were found in 85 GD and 50 healthy controls, respectively marked with a b c d e f g. Compared with control group, the frequencies of d and f conformation increased significantly [43.5% VS 8%, $\chi^2=18.79$, $P=0.001$, relative risk(RR)=8.86; 27% VS 8%, $\chi^2=6.80$, $P=0.009$, RR=4.27], and the frequency of b conformation decreased significantly (8.2% vs 52%, $\chi^2=29.43$, $P=0.001$, RR=0.08) in GD group. DNA sequence analysis showed that d conformation was HLA-DQAl*0102, f conformation was HLA-DQAl*0302/0501, b conformation was HLA-DQA1*0101/0301. *Conclusion*: The polymorphism of HLA-DQA1 loci in Chongqing children of Han race are different from that of Caucasian, American Black, Japanese and Hongkong Chinese. It shows that different race and area have different alleles. GD is significantly associated with HLA-DQA1*0102, HLA-DQA1*0302/0501 and HLA-DQA1*0101/0301. It suggests that the HLA-DQA1*0102 and HLA-DQA1*0302/0501 might be the genetic markers for susceptibility, HLA-DQA1*0101/0301 might be the protective genetic markers for GD in Chongqing children of Han race.

【Key words】Graves' disease; HLA-DQA1 gene; Genetic polymorphism; PCR-SSCP

儿童 Graves'病(Graves' disease GD)是一种器官特异性的自身免疫性疾病,其确切的发病机制迄今未明,现已公认遗传因素尤其人类白细胞抗原(HLA)基因与本病密切相关[1]。本课题运用 PCR-SSCP、DNA 序列测定等现代分子生物学技术对

作者介绍:程昕然(1967-),女,主治医师,主要研究方向:小儿内分泌。

维普资讯 http://www.cqvip.com

HLA－DQA1 等位基因与儿童 GD 的疾病相关关系进行了研究，现报告如下。

1 对象与方法

1.1 病例组

选自 1999 年 12 月至 2000 年 12 月我院内分泌科门诊的 85 例 GD 患儿，随访至少 6 个月以上，平均发病年龄为(8.84 ± 2.51)岁，其临床表现和实验室检查符合儿童 Graves'病的诊断标准[2]。

1.2 对照组

来自儿保门诊的 50 名健康儿童，平均年龄(7.19 ± 3.24)岁，经过病史问和必要的实验室检查，本人及家族中排除了甲状腺疾病及其它自身免疫性疾病，甲状腺功能及抗体检查正常。

所有研究对象按就诊顺序随机分为病例组和对照组，均为重庆籍、汉族，无血缘关系，两组对象年龄、性别构成无显著性差异。实验均用同一批号试剂，在同一仪器上由同一人进行操作，且重复 3 至 5 次。

1.3 方法

1.3.1 外周血白细胞基因组 DNA 的提取：取受检对象外周静脉血 3ml(EDTA 抗凝)，用饱和盐析法[3]，提取白细胞基因组 DNA. TE 溶解，4℃保存。

1.3.2 PCR 扩增

通过 GENE BANK 查阅 HLA－DQA1 的第 2 外显子全序列，并参照文献[4,5]，设计引物序列为：上游引物 5'－GGT TGT AAA CTT GTA CCA G－3'，下游引物 5'－TGG TAG CAG CGG TAG AGT TG－3'。扩增 HLA－DQA1 基因第二外显子特异性片段长度为 224bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。扩增反应条件：94℃变性 5min，80℃热启动，加 Taq DNA 酶 1U 瞬时离心，94℃ 45s，64℃ 1min 共 30 个循环，72℃延伸 5 min，结束循环。采用 Watson 公司 Gel Extraction Kit 对扩增产物进行纯化处理，以保证 SSCP 和序列测定。

1.3.3 SSCP 分析[6]

PCR 纯化标本 95℃ 10min 变性后，置于冰上骤冷，15min 后，在冰浴状态下，取 5μl 反应液与加样缓冲液 2μl 充分混匀后点样于 10%的聚丙烯酰胺凝胶上，90V、恒压，电泳 14h。硝酸银染色，观察结果并摄影。

1.3.4 DNA 序列测定

根据 SSCP 出现的不同带型分类，选择患儿组和对照组中带型有显著性差异相对应的 PCR 产物纯化标本，进行扩增产物序列测定，结果采用软件 DNA STAR 与原始序列相比对，以确定其扩增的基因位点。

1.3.5 统计学分析

病例组和对照组间基因型频率的比较，采用 χ^2 检验，在 SPSS10.0 软件包中进行，以 $P<0.05$ 代表差异具有显著性，并按 Wolf 公式计算发病相对危险度(RR)。

2 结 果

2.1 HLA－DQA1 基因的多态性检测结果

对 85 例 GD 患儿及 50 名健康儿童 HLA－DQA1 基因位点进行 PCR－SSCP 检测，检出了 7 种 HLA－DQA1 基因带型，分别标为 a、b、c、d、e、f、g 带型(图 1)，提示：重庆地区 GD 病儿和正常儿童均存在 HLA－DQA1 基因位点的多态性。

2.2 HLA－DQA1 基因各 SSCP 带型在 GD 组及健康组中的频率分布

GD 儿童中 d 带型频率最高为 44%，明显高于对照组 8%($\chi^2=18.79$，$P=0.001$，$RR=8.86$)；其次是 f 带型为 27%，也明显高于对照组 8%($\chi^2=6.8$，$P=0.009$，$RR=4.27$)；RR 均大于 4，为显著正相关，提示 d、f 带型可能是 GD 的易感基因带型。而 b 带型频率为 8%，则明显低于正常对照组 52%($\chi^2=29.43$，$P<0.001$，$RR=0.08$)；RR 小于 1，提示 b 带型可能是 GD 的保护基因带型。以上各组与对照组相比较，均有显著性差异(表 1)。

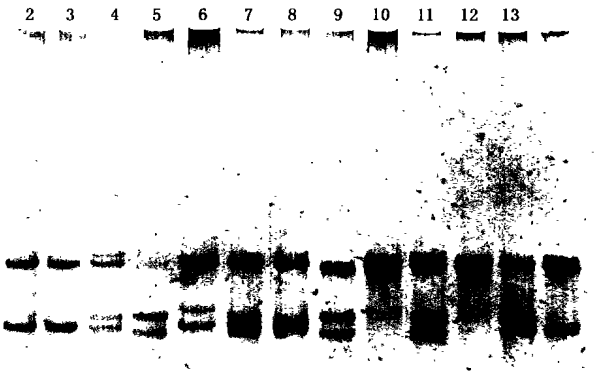


图 1 PCR－SSCP 法分析 HLA－DQA1 基因多态性

5、8、12：a 带型；3、7、10：b 带型；9、11：c 带型；4：d 带型；1、2：e 带型；6：f 带型；13：g 带型

表 1 GD 组及健康组 HLA－DQA1 基因 SSCP 带型的频率分布

组别	例数	基因型频率(%)						
		a	b	c	d	e	f	g
GD 组	85	0.06	0.08◆	0.05	0.44▲	0.08	0.27★	0.02
对照组	50	0.10	0.52	0.10	0.08	0.10	0.08	0.02

注：GD 组与对照组相比较：◆$P<0.001$ $RR=0.08$；▲$P=0.001$ $RR=8.86$；★$P=0.009$ $RR=4.27$

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 DNA 测序

经上海生工生物工程有限公司 DNA 测序,结果如下:

```
          10          20          30          40          50
b:ATT ACC GTT CC TCT GGC CAG TAC ACC CAT GAA TTT GAT GGA GAC GAG CAG TTC TAT GTG
f:----------N--------------------------G----------
d:----------------------------T----C----C------
  60          70          80          90          100         110
b:GAC CTG GGG AGG AA G GAG ACT GTC TGG CGN TTG CCT GTG NTC CGA CAA TTT AGA NNN ATN
f:-----A----------AG--------C---T--NC AG--N-----
d:----------C-----AG---G----GA---AG--AAT--G--GGT T-T
  120         130         140         150         160         170
b:CCN CCN GNA NNN ACT NCN NAN NAN CAT TGN TNC NNN ANA ANA TNA NTN NAN CAT GTA NAN
f:--NN--C--NTT NNN A-TG--A-----TG--T----C--A--C-----N----
d:GAC--G CAG GG-GCA CTG AGA A--C ATG GCT GTG-CA-A-CAC A-CT-GA-C ATC A-GATT
  180         190         200         210
b:NNA NNN CTN CNA TTC TAC NGC TNC TAC CAA N
f:----C------N------G--------
d:AA—CGC TAC AAC—CT AC—GCT GCT AC—N---
```

通过与已发表的 HLA-DQA1 基因核苷酸序列及 Genebank 已收集的 HLA-DQA1 基因第二外显子序列相比较,确定:f 带型为 HLA-DQA1 * 0302/0501,d 带型为 HLA-DQA1 * 0102,b 带型为 HLA-DQA1 * 0101/0301。

3 讨 论

3.1 HLA-DQA1 基因的多态性

HLA 位于第 6 号染色体短臂上(6p21.3),全长约 4000kb,由一群密切连锁的基因组成,包括 100 多个基因座共 554 个等位基因系统,是目前所知人类基因组中最复杂、最具多态性的遗传体系。Ⅱ类(D)基因区长约 1100Kb,分为 DR、DQ、DP、DO、DN、DM 等亚区,各亚区均含有数个编码 α 链和 β 链的 A、B 基因位点,分别构成相应的 HLA 分子。Ⅱ类抗原分子是由 α 链和 β 链构成的异二聚体,两链均由胞内区、跨膜区、胞外区组成。胞外区又分为:①近侧功能域(α2β2):相当于免疫球蛋白的不变区,是 CD4 分子的识别部位。②远侧功能域(α1β1):由 α-螺旋为边、β-片层为底形成的槽沟状结构,是抗原结合槽(groove),沟槽内氨基酸变化大,是Ⅱ类抗原多态性的基础,这种多态性随人种、地域及群体的不同而不同。国外学者研究表明:日本人群中 HLA-DQA1 * 0301 基因频率最高达 51%,其次是 DQA * 0103(21.4%);高加索人 DQA1 * 0301 频率最高(23.7%),其次是 DQA1 * 0501(22%);黑人是 DQA1 * 0102(26.8%)基因频率最高。我国汉族人中大多检出 8 个 HLA-DQA1 等位基因位点,高频率的 DQA1 * 0301 和低频率 DQA1 * 0401 是中国汉族人群 HLA-DQA1 基因中最显著特点,不同地区频率有所差异[7]。

本研究结果显示:在重庆地区汉族儿童中检出 7 种 HLA-DQA1 基因型,符合南方群体 HLA-Ⅱ类抗原系统差异较大,遗传背景较复杂[8]的特点。在 HLA-DQA1 的 7 种基因型中,b 带型(DQA1 * 0101/0301)频率在健康儿童中最高,占 52%。提示:重庆地区汉族儿童具有中国南方人的 HLA-DA1 特点即高频率的 DQA1 * 0301,但也具有本身的特点,即杂合子较多,估计是由于湖北湖南和两广人群的迁入而造成。

3.2 HLA-DQA1 基因的多态性与儿童 GD 发病的相关性

由于 HLA 等位基因频率分布存在种族特异性,不同人群 GD 发病与某些特定的 HLA 基因型相关。Yanagawa 等首先在高加索人中发现:GD 病人中 DQA1 * 0501 的频率显著增高,故认为 HLA-DQA1 * 0501 对 GD 具有易感性[5];在日本人的研究中发现 DQA1 * 0103 的频率在 GD 患者中显著增高[9];而在香港人的研究中发现:中国人的易感和

维普资讯 http://www.cqvip.com

拮抗基因都与白人不同,DQA1 * 0401 是保护基因,DQA1 * 0501 及其它 DQA1 基因与 GD 无关,而 QB1 * 0303 才是中国人种族特异性的易感基因[10]。此外,有作者在其它人种的研究中发现 DQA1 * 0301、DQA1 * 0101 与 GD 易感相关,而 DQA1 * 0201 与 GD 的保护相关。

我们采用 PCR - SSCP 方法对 85 例 GD 患儿进行了 HLA - DQA1 基因分型并与健康对照组比较,结果发现:重庆地区 GD 患儿 HLA - DQA1 基因也存在多态性,检出 7 种 HLA - DQA1 基因型,其中 d 带型(DQA1 * 0102)和 f 带型(DQA1 * 0302/0501)的频率最高,与对照组相比有极显著性差异,提示与 GD 的易感性相关。与欧美高加索人群中 DQA1 * 0501 为 GD 的易感基因相一致,与香港人的结论相反。而 b 带型(DQA1 * 0101/0301)频率较健康对照组显著减少,提示与 GD 的保护有关,与欧美高加索人研究的结论相反。导致这种不同结论可能由于:(1)在不同人种、地区中 HLA 基因型的分布不同或 HLA 分子与环境因素复杂的交互作用发动了疾病的不同致病过程。(2)非 HLA 基因如:TSH 受体基因、T 细胞受体 β 链(TCRβ)基因、杀伤性 T 细胞抗原(CTLA - 4)基因、细胞因子基因、补体(C_4)基因等也与 GD 的发病有关。(3)研究例数的差异。而本研究还提示 DQA1 * 0102、DQA1 * 0302 也可能是 GD 易感基因位点,且重庆地区儿童 HLA - DQA1 基因型以杂合子居多,说明 HLA 杂合子基因,连锁不平衡也影响发病。总之,我们的研究结果表明:HLA - DQA1 * 0102、DQA1 * 0302/0501 可能是 GD 的易感基因,而 DQA1 * 0101/0301 可能是 GD 的保护基因。HLA 上存在 GD 的易感和保护基因,二者的共同作用失衡导致 GD 的发生。

参 考 文 献

[1] Stenszky V, Kozma l, Balazs C, et al. The genetics of Graves' disease: HLA and disease susceptibility[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1985; Oct; 61(4): 735 - 740.

[2] 颜 纯,李永昶. 小儿内分泌学[M]. 北京:人民卫生出版社,1991;111 - 112.

[3] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版,北京:科学出版社,1992:464 - 465.

[4] Marsh SGE, Bodmer JG. HLA class region nucleotide sequences[J]. Tissue Antigens, 1995; 46: 2802 - 2805.

[5] Yanagawa T, Mangklabruks A, Chang YB, et al. Hum Histocompatibility antigen DQA1 * 0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasion population[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1993; 76: 1569 - 1574.

[6] Garl W, Dieffenbach, Gabriela S. Bveksler. 黄培堂等译, PCR 技术实验指南[M]. 科学出版社,北京:1998;226 - 228.

[7] 倪小燕,周津东,方佩华,等. 用 PCR - RFLP 方法检测天津地区汉族人群 HLA - DQA1 等位基因多态性[J]. 天津医药,2000;28:156 - 158.

[8] 孙逸平,高小红,秋季南,等. 中国人南北群体的 HLA Class Ⅱ 基因的变异性[J]. 中国免疫学杂志,1992;8:283 - 285.

[9] Katsuren F, Awata T, Matsumoto C, et al. HLA class Ⅱ alleles in Japanese patients with Graves' disease: weak association of HLA - DR and DQ[J]. Endocr J, 1994; 41: 599 - 603.

[10] Gavan DA, Penny MA, Jacobs KH, et al. The HLA association with Graves' disease is sex - specific in Hong Kong Chinese subjects[J]. Clin Endcrinol, 1994; 63 - 66.

(上接第 472 页)

[9] Bolli R, Shinmura K, Tang X, et al. Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX) - 2: COX - 2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of reconditioning[J]. Cardiovasc Res, 2002; 55(3): 506.

[10] Ping P, Zhang J, Zheng YT, et al. Demonstration of selective protein kinase C - dependent activation of Src and Lck tyrosine kinase during ischemic preconditioning in conscious rabbits[J]. Circ Res, 1999; 85: 542 - 550.