DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.022

论著

文章编号:1000-5404(2000)04-0354-03

乙型肝炎病毒感染者HLA-DRB基因分型及其相关性研究

刘建平,林 辉,宋建勇 (第三军医大学预防医学系流行病学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探索乙肝病毒(HBV)感染者HLA-DRB基因频率及其与疾病的相关性。方法 用PCR-SSP对重庆地区汉族乙肝患者40例和正常人120名进行HLA-DRB基因分型,结合临床病型与HBV复制状态作相关性分析。结果 重庆地区汉族正常人以$DR_{2(15)}$、$DR_{5(12)}$、DR_9位点常见,乙肝患者与之比较DR_3基因频率明显增高($P<0.05$),$DR_{5(12)}$、DR_7基因频率也有增高,均见于慢性乙肝和肝硬化,相对危险度DR_3为2.4,DR_7为2.0。DR_7基因多见于HBV高复制状态,相对危险度为2.4。结论 HLA-DR_3基因与重庆地区汉族慢性乙肝和肝硬化相关,DR_7与HBV高复制状态有关;免疫遗传因素参与慢性乙肝的发病机制。

关键词:HBV感染;HLA-DRB;基因分型;聚合酶链反应(PCR)
中图法分类号:R512.62 文献标识码:A

HLA-DRB genotyping and its relation in patients with HBV infection

LIU Jia-ping, LIN Hui, SONG Jian-yong (Department of Epidemiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the frequency of different genotypes of HLA-DRB gene and their relations to HBV infection. **Methods** HLA-DRB genotyping was conducted in 40 cases of HBV infection and 120 healthy subjects with polymerase chian reaction-sequence specific primer (PCR-SSP). All the patients and healthy subjects were residents of chongqing district and belonged to Han Natiionality. The relationship of different genotypes of HLA-DRB with the clinical types of HBV infection was analyzed. **Results** HLA-$DR_{2(15)}$, $DR_{5(12)}$ and DR_9 were the frequent genotypes in the healthy residents of Chongqing with the frequency of 18.3%, 16.7% and 14.2% respectively. The frequency of HLA-DR_3 was increased from 3.3% in healthy subjects to 12.5% in patients with chronic hepatitis B and hepatitis B-associated liver cirrhosis ($P<0.05$). The frequency of HLA-$DR_{5(12)}$ and HLA-DR_7 was also increased in those patients. The relative risk coefficient was 2.4 for HLA-DR_3 and 2.0 for HLA-DR_7. HLA-DR_7 was usually found in high replication condition of HBV with a relative risk coefficient of 2.4. **Conclusion** HLA-DR_3 is related to hepatitis B and liver cirrhosis of the Han Nationality in Chongqing district. HLA-DR_7 is usually found in high replication condition of HBV. And immune and genetic factors participate in the pathogenesis of hepatitis B.

Key words: HBV infection; HLA-DRB gene; genotyping; polymerase chain reaction (PCR)

人体感染乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)后的临床表现形式多样,其预后各不相同。这与机体对HBV免疫应答(Ir)方式不同有关,而机体的Ir基因位于人主要组织相容性复合物(即HLA基因)的D区。研究HLA-DR基因型与HBV不同感染形式之间的相关性,本文用聚合酶链反应(PCR)技术序列特异性引物扩增DNA片段,检测120名重庆地区汉族正常人和40例乙型肝炎(乙肝)患者HLA-DRB基因频率分布,分析其与HBV复制水平的相关性,从免疫遗传角度探讨慢性乙肝的发生机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 HBV感染者 40例乙肝取自本校西南医院感染病科和消化科住院患者,经临床和病原学诊断的病例包括急性黄疸型乙型肝炎3例,慢性乙肝25例,乙肝后肝硬化12例。诊断均符合1995年《病毒性肝炎防治方案》中的标准,未做病理组织学分型。患者均为重庆地区汉族人,其中男29例,女11例,平均年龄40.2岁(23~72岁)。

1.1.2 正常对照 120名对照来源于本校新桥医院输血科,为本地汉族健康献血员,其中,男76名,女44名,平均年龄36.5岁(21~47岁)。

基金项目:第三军医大学科研基金资助项目(X96-1-3)
作者简介:刘建平(1961—),男,山东省菜西市人,博士,副教授,主要从事传染病、流行病学方面的研究,发表论文46篇。电话:(023)68752287
收稿日期:1999-05-17;修回日期:1999-12-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　外周血单个核细胞 DNA 提取

取肝素抗凝血 3 ml，室温下 2 000 r/min 离心 5 min，吸取白细胞层，以 1× TEN（1 mol/L Tris·HCl＋5 mol/L NaCl＋0.5 mol/L EDTA）以及 10%SDS 混合振荡，加入蛋白酶 K（PK 1 mg/ml）30 μl，37℃振荡过夜。加入等量酚氯仿混合液充分混匀，4 000 r/min 离心 5 min，反复 2 次，取上清加二倍无水乙醇混匀，可见 DNA 呈线状析出，离心弃上清后加 70%乙醇洗 2 次，真空干燥 20 min，溶于 200 μl Tris·HCl EDTA 液（PH 8.0），以紫外分光光度计检测 DNA 含量。

1.3　HLA-DRB 基因分型

采用中国医学科学院基础所生产的“HLA-DRB 基因分型试剂盒”（批号 981026）序列特异性引物 PCR（PCR-SSP）方法扩增 DR_1、$DR_{2(15)}$、$DR_{2(16)}$、DR_3、DR_4、$DR_{5(11)}$、$DR_{5(12)}$、$DR_{6(13)}$、$DR_{6(14)}$、DR_7、DR_8、DR_9 共计 12 个基因位点。基本原理根据第 11 届国际 HLA Workshop 会议确定的 HLA-DRB 基因核苷酸序列，设计一系列组特异的序列特异性引物。在适宜的反应体系中经 Tag DNA 聚合酶催化，扩增出不同序列的 PCR 产物。经 2%琼脂糖凝胶电泳分离后，与标准型别的阳性对照比较，在紫外灯下直接判断和确定 HLA-DRB 基因型别。

1.4　HBV 检测

标志物用 ELISA 法检测，HBV DNA 用斑点杂交检测。

1.5　统计学方法

所得数据进入 Epi 5.01b 软件，用卡方检验计算 χ^2 值，Yate's 校正 P 值，Fisher 氏精确概率检验 P 值。

2　结果

2.1 重庆地区汉族正常人 HLA-DRB 亚型基因频率分布

提取 DNA 经 PCR 扩增电泳后呈现明显条带。结果表明，本地区正常人群以 $DR_{2(15)}$、$DR_{5(12)}$、DR_9 位点常见，其基因频率分别为 18.3%、16.7%、14.2%。

2.2　乙肝患者 HLA-DRB 亚型基因频率分布

DRB 基因位点连锁亚型分布与正常人群比较，见表 1。乙肝患者 DR_3 基因频率明显增高，统计学处理差异显著（$P<0.05$）；$DR_{5(12)}$、DR_7 基因频率也有升高，但未达到统计学差异；这些基因亚型均出现在慢性乙肝和肝硬化患者。携带 DR_3、DR_7 基因位点发生慢性乙肝或肝硬化的相对危险度（RR）分别为 2.40 和 2.0，见表 2。

2.3　乙肝患者 HBV 复制状态与 DRB 基因的关系

根据 HBV 标志物和 HBV DNA 检测结果将乙肝患者分为 HBV 高复制状态（HBeAg 和/或 HBV DNA 阳性）和低复制状态（抗-HBe 阳性，HBeAg 阴性），比较两者 DRB 基因频率差异，见表 3。

可见，DR_7 基因位点在 HBV 高复制状态多见（$P<0.05$），其 RR 为 2.42，其余各基因位点未发现显著差异。

表 1　慢性乙肝及肝硬化患者 HLA-DRB 基因连锁型分布

Tab 1　HLA-DRB gene linkage in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis

HLA-DRB linkage	Chronic hepatitis B	Hepatitis B-associated cirrhosis
$DR_{2(15)}$-DR_9	–	1
$DR_{2(16)}$-$DR_{5(12)}$	1	1
DR_3-DR_1	1	–
DR_3-DR_9	–	1
$DR_{5(11)}$-DR_7	2	–
$DR_{5(11)}$-$DR_{5(12)}$	–	1
$DR_{5(12)}$-DR_3	–	1
$DR_{5(12)}$-DR_4	1	–
$DR_{5(12)}$-DR_7	1	–
DR_9-DR_4	1	–

表 2　乙肝患者与正常人 HLA-DRB 基因频率比较

Tab 2　Comparison of HLA-DRB gene frequency in patients with hepatitis B and in healthy subjects

HLA-DRB gene	Hepatitis B group（$n=40$）		Control（$n=120$）		Chi square	P_c value	RR(95% CI)
	No.	Frequency(%)	No.	Frequency(%)			
DR_1	1	2.5	2	1.7	0.11	1.00*	1.34(0.26～6.80)
$DR_{2(15)}$	8	20.0	22	18.3	0.05	1.00	1.08(0.56～2.11)
$DR_{2(16)}$	2	5.0	5	4.2	0.05	0.82	1.15(0.35～3.83)
DR_3	5	12.5	4	3.3	4.72	0.04*	2.40(1.25～4.60)
DR_4	2	5.0	10	8.3	0.48	0.73*	0.65(0.18～2.37)
$DR_{5(11)}$	3	7.5	9	7.5	0.00	1.00*	1.00(0.36～2.77)
$DR_{5(12)}$	11	27.5	20	16.7	2.24	0.20	1.58(0.89～2.80)
$DR_{6(13)}$	1	2.5	7	5.8	0.70	0.68*	0.49(0.08～3.11)
$DR_{6(14)}$	0	0	5	4.2	1.71	0.33	0.00
DR_7	6	15.0	7	5.8	3.36	0.13	2.00(1.03～3.85)
DR_8	2	5.0	7	5.8	0.04	1.00*	0.88(0.25～3.09)
DR_9	6	15.0	17	14.2	0.02	1.89	1.05(0.50～2.22)
$DR_{vacancy}$	2	5.0	5	4.2	0.05	1.00*	1.15(0.35～3.83)

P_c: Corrected P value; *: Fisher exact test; RR: Relative risk; CI: Confidence interval

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表3 HBV不同复制状态HLA-DRB基因亚型比较

Tab 3 Comparison of HLA-DRB subtypes in different replication of HBV

HLA-DRB Subtype	High replication(n = 17)	Low replication(n = 17)	Chi square	Fisher's P value	RR(95%CI)
DR_1	0	1	1.00	1.00	0.00
$DR_{2(15)}$	5	4	0.15	1.00	1.16(0.57~2.36)
$DR_{2(16)}$	1	1	0.00	1.00	1.00
DR_3	0	4	4.40	0.10	0.00
DR_4	0	2	2.06	0.49	0.00
$DR_{5(11)}$	2	1	0.35	1.00	1.38(0.57~3.32)
$DR_{5(12)}$	8	4	2.00	0.28	1.63(0.86~3.10)
DR_7	5	0	5.69	0.04	2.42(1.57~3.73)
DR_9	1	4	2.05	0.34	0.36(0.06~2.16)

3 讨论

HLA是目前所知的最具有高度多态性的遗传系统,作为个体组织细胞的遗传标志,特别是免疫细胞上的HLA具有向抗原特异性T细胞受体传递抗原多肽的生物学特性,在抗原识别、免疫应答和免疫调控,破坏外来抗原靶细胞方面起着重要作用。近年来寻找与疾病相关的HLA基因并探讨其在疾病发生中的作用已成为HLA系统研究的一个热门和重点领域。研究表明,人感染HBV后临床表现的多样性除与病毒本身的变异有关外,另一很重要的因素在于机体对HBV应答的个体遗传差异。国内有关HLA基因分型与HBV感染相关性的研究极少报道。

本文对HLA-DRB基因(表达DR_{1-18},DR_{51-53}位点)的分型表明,DR_3位点与慢性乙肝和乙肝后肝硬化有关,携带DR_3位点的个体感染HBV后易发生慢性感染,其RR为2.4。DR_7、$DR_{5(12)}$位点可能与慢性乙肝有关,其确证需扩大样本进一步研究,DR_7位点与HBV高复制状态有关,推测HBV感染携带DR_7位点者病毒不易清除,呈持续感染状态,因而临床表现为慢性化。这一结果与国外对接种乙肝疫苗后无(弱)应答状态HLA-DR位点分型结果相吻合[1~3],即最多见的位点为DR_7、DR_3以及两者的结合型。Weissman等[2]认为造成无应签状态的原因与携带上述亚型者难以将HBsAg信息提呈给T细胞,并产生抗体有关,其确切机制尚有待深入研究。日本Zeniya等[4]的研究表明,HBV无症状携带者和组织学损害轻微的慢性乙肝DR5基因频率明显升高($P<0.05$),认为免疫遗传背景是决定HBV感染疾病易感性的重要因素之一。Thursz等[5]在西非的研究表明,$DR_{6(13)}$基因位点与儿童和成年人HBV感染自然恢复即免于持续性感染有关。因此,对呈自限性的急性乙肝比较研究将有可能发现对抗HBV慢性感染的抗病基因。由于人种和地域的差异,为阐明HBV感染与HLA基因型的关系,针对我国国情,建议进行全国范围内的协作,扩大HLA基因分型的类别,进行家系研究,并结合临床肝组织病理和肝损害情况深入研究,以探明HBV相关的疾病易感(或抗病)基因及其在发病机制中的作用,为乙肝的防治寻找新的突破口。

参考文献:

[1] Wolfgang J, Schmidt, Deinhardt F. Vaccination against hepatitis B: Comparison of three different vaccination schedules[J]. J Infect Dis, 1989, 160(5): 766—769.

[2] Weissman J Y, Mark M T, Myron J T, et al. Lack of response to recombinant hepatitis B vaccine in nonresponders to the plasma vaccine[J]. JAMA, 1988, 260(12): 1 734—1 738.

[3] Canho R, Grosheide P M, Schalm S W, et al. Failure of neonatal hepatitis B vaccination: The role of HBV DNA levels in hepatitis B carrier mothers and HLA antigens in neonates[J]. J Hepatol, 1994, 20(4): 483—486.

[4] Zeniya M, Watanabe F, Aizawa Y, et al. Immunogenetic background of hepatitis B virus infection and autoimmune hepatitis in Japan[J]. Gastroenterol Jpn, 1993, 28(Suppl 4): 69—75.

[5] Thursz M R, Kwiatkowski D, Allsopp C, et al. Association between and MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia[J]. N Engl J Med, 1995, 232(16): 1 065—1 069.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net