

鲁西南汉族 HLA-B27 基因亚型分布 与强直性脊柱炎的关联研究

马金平¹

[摘要] 目的:调查鲁西南汉族人群中正常人和强直性脊柱炎(AS)患者的 HLA-B*27 基因亚型的频率分布状况,并分析 HLA-B*27 亚型与 AS 的相关性。方法:对 826 名正常人(对照组)、76 例 AS 患者(AS 组)采用特异性引物聚合酶链反应技术(PCR-SSP)进行 HLA-B*27 基因及亚型检测。结果:在正常组和 AS 组中,共检出了 11 种 HLA-B*27 亚型,2 组均以 B*2704 和 B*2705 亚型为优势亚型,2 亚型分别为 38.8% 和 41.8%。2 组间的 B*2704 和 B*2705 亚型的构成比差异无统计学意义。结论:HLA-B*2704 和 HLA-B*2705 是鲁西南地区汉族人群 AS 的易感基因,与鲁西南地区汉族人群 AS 的发病呈强相关。

[关键词] 强直性脊柱炎;HLA-B27 基因;HLA-B27 亚型

[中图分类号] R593.23 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)10-0631-03

Distribution of HLA-B27 subtypes in Han Chinese population of southwest Shandong and their association with ankylosing spondylitis

MA Jinping

(Department of Blood Transfusion, Heze Municipal Hospital, Heze, 274031, China)

Abstract Objective: To investigate the frequency of HLA-B*27 gene and the distribution of its alleles in healthy individuals and patients with ankylosing spondylitis(AS) in Chinese Han nationality of Shandong region, and to analyze the association between the heterogeneity of HLA-B27 and AS. **Method:** HLA-B*27 alleles in 826 cases of healthy individuals and 76 cases of AS patients were typed by PCR amplification with sequence-specific primers. **Result:** Eleven HLA-B*27 genotypes were determined in healthy individuals and AS patients. HLA-B*2704 and HLA-B*2705 were the two high frequency genotypes, with a genotype frequency of 38.8% and 41.8%. HLA-B*2702 was detected only in one case in the AS patients, and HLA-B*2701, HLA-B*2713 and HLA-B*2721 were detected only in one case in the controls respectively. **Conclusion:** HLA-B*2704 and HLA-B*2705 were the primary genes susceptible to AS in Chinese Han nationality of southwestern Shandong, which were strongly associated with AS.

Key words ankylosing spondylitis; HLA-B27 gene; HLA-B27 genotype

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是以骶髂关节炎和中轴关节病变为特征的慢性炎性脊柱关节病,特征性病理变化为肌腱、韧带附着点炎症,与 HLA-B27 强关联^[1],但关联的机制迄今不明。

HLA-B27 并不是单一性抗原,它是由多种亚型构成的一组抗原的总称。各亚型核苷酸序列存在着个别位点上的差异,在不同地区、不同种族的人群 HLA-B27 亚型基因分布频率不相同。为了解鲁西南地区汉族人群的正常健康人和 AS 患者 HLA-B27 亚型基因分布的情况,分析 B27 各等位基因与 AS 的相关性,探索 AS 与 HLA-B27 的关联机制,我们以序列特异性引物聚合酶链反应方法(polymerase chain reaction with sequence-specific primers, PCR-SSP)调查了鲁西南地区汉族人群正常健康人和 AS 患者 B*27 基因及 B*2701 至 B

*2738 等位基因的分布情况(www.ebi.ac.uk/imgt/hla, 2007-July-09, release 2.18.0.),并对 HLA-B27 亚型与 AS 的相关性作了分析。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

AS 患者 76 例,均为菏泽及周边地区汉族个体,临床均符合 1984 年 AS 纽约修订诊断标准^[2]。男女比例 3:1;年龄 8~69 岁,平均 29.3 岁。正常健康献血员 826 名,均为鲁西南地区汉族健康个体,之间无血缘关系,男女比例 1.09:1.00;年龄 21~37 岁,平均 26.8 岁。所有研究对象均进行 HLA-B27 抗原检测及 HLA-B*27 基因及基因亚型测定。

1.2 试剂与仪器

0.5% 的乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂),全血基因组 DNA 提取试剂盒 D9081(大连 Takara 公司),HLA-B27 抗血清(One Lambda 公司),P9700

¹ 菏泽市立医院输血科(山东菏泽,274031)

型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司产品),Taq 酶(美国 Promega 公司),Olerup SSP[®] HLA-B*27 筛查试剂 101.531-48u(批号:Y02),Olerup SSP² HLA-B*27 分型试剂 101.521-24u/04u(批号:X94),2% 琼脂糖,0.5 μg/ml EB。

1.3 血清学检查

HLA-B27 抗原检测采用 NIH 微量淋巴细胞毒试验技术,HLA-B27 抗血清购自 One Lambda 公司。

1.4 DNA 提取

外周全血使用 0.5% EDTA-K₂ 抗凝,用 Takara 公司全血基因组 DNA 提取试剂盒从抗凝全血中抽提 DNA。DNA 浓度为 50 ng/μl,纯度为 1.6~1.8。

1.5 HLA-B27 基因筛查

HLA-B27 基因筛查采用 Olerup SSP[®] HLA-B*27 筛查试剂 101.531-48u,按 Olerup SSP[®] 试剂盒使用说明书操作。

1.6 HLA-B27 基因亚型测定

HLA-B27 基因亚型测定采用 PCR-SSP 方法,使用 Olerup SSP[®] HLA-B*27 分型试剂 101.521-24u/04u。每个反应管中加入 PCR Master Mix 3 μl,DNA 2 μl,纯水 5 μl,Taq 酶(5 U/μl)0.048 μl。加样过程于冰袋上进行,完成后尽快进行扩增。PCR 扩增仪预热 5 min 后,将 96 孔板放入 PCR 仪进行扩增。循环参数为 94℃ 120 s 预变性,94℃ 10 s,65℃ 60 s 共 10 个循环,94℃ 10 s,61℃ 50 s,72℃ 30 s,共 20 个循环。经 2% 琼脂糖(含 0.5 μg/ml EB)在 0.5 × TBE 缓冲液中以 10 V/cm 电压电泳 10~15 min,在紫外灯下观察扩增结果,并拍照记录。

1.7 统计学分析

用 SAS 9.2 软件进行统计学处理。采用 χ^2 检验,并计算相对危险度(RR)。

2 结果

AS 组和正常对照组分别检出 HLA-B27 抗原和 B*27 基因阳性个体 74 例和 24 例,共检出 11 种 HLA-B*27 等位基因。B27 抗原和 B*27 基因的检出率在 AS 组为 97.4%,对照组为 0.03%。HLA-B27 抗原表达率和 HLA-B*27 基因的阳性率在 AS 组明显高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

AS 组和对照组中均出现 B*2704 和 B*2705,AS 组中分别为 36 例、29 例,对照组中分别为 9 例、5 例。2 组均以 B*2704 和 B*2705 亚型为优势亚型,2 亚型分别占 38.8% 和 41.8%。在 AS 患者中还检出 B*2702、B*2706 和 B*2724 三种等位基因型,分别为 3 例(4.00%)、1 例(1.35%)、1 例(1.35%)。在健康人群中还检出 2

例 B*2712,占 8.3%,此 4 种等位基因型在 AS 患者与健康人群之间无交叉。在受检人群的所有个体中均未发现 HLA-B*2715。

鲁西南地区无论 AS 患者还是正常健康人,HLA-B*27 等位基因检出率构成比比较,均以 B*2704、B*2705 为主,正常阳性对照组中分别为 37.5%、20.8%,AS 组中分别为 48.7%、39.2%。2 组比较,B*2704、B*2705 构成比差异无统计学意义($P < 0.05$)。B*2704、B*2705 与 AS 患病的相对危险度均大于 4.1,提示 B*2704、B*2705 与鲁西南地区汉族人群 AS 的发病呈强相关。

3 讨论

AS 是一种主要累及骶髋关节和脊柱的炎症性疾病,1973 年 Brewerton 和 Schlosstein 分别报道了 HLA-B27 与 AS 的强关联。不同种族、不同地区人群的研究结果显示,HLA-B27 抗原与 AS 的相关性是迄今已知 HLA 与疾病相关中最强和最典型的,但其关联机制至今未明。

HLA-B27 基因定位于人类第 6 号染色体短臂上,由 8 个外显子和 7 个内含子组成。由于 HLA-B27 基因具有较高的异质性,不同种族、不同地区的人群,HLA-B27 基因亚型分布有明显的差异;而不同 HLA-B27 基因亚型编码的抗原也存在 1 个或数个氨基酸的差别。因此,研究 HLA-B27 基因亚型与 AS 的相关性对阐明 HLA-B27 基因与 AS 相关的机制,可能提供有益的线索。

HLA-B*27 分为 81 个亚型,分别命名 B*2701 至 B*2782(B*2722 等位基因后被删除)。HLA-B2705 为分布最广的亚型,可能是其他基因的祖基因,即其他基因是由其进化而来^[3]。在世界范围内,除了西非的塞内加尔、冈比亚外,HLA-B*2705 和强直性脊柱炎及相关的脊柱关节病有明显相关性。B*2702 主要存在于白种人,中东犹太人和北非人^[4];中国和日本以 B*2704 最多见,且与慢性脊柱关节病强相关^[3]。由于可能存在非 HLA-B27 易感性因素或地理环境因素的影响,同一亚型在不同人群和 AS 的相关性存在差异,亚型与疾病的相关性不是绝对的。

本文的结果显示在正常阳性组和患者阳性组均以 B*2704 和 B*2705 为主,2 组中 B*2704 和 B*2705 亚型构成比差异无统计学意义($P > 0.05$)。B*2707 亚型在正常阳性组中和患者阳性组均有检出,表明 B*2707 可能也是一种 AS 易感基因,但这需要扩大标本量以便验证此假设。其他亚型仅在正常阳性组或患者阳性组检出 1 例,无法进行统计分析,有待于扩大样本后的进一步研究。

在鲁西南地区汉族人群中,HLA-B*27 亚型分布主要为 B*2704 和 B*2705 亚型,且 B*2704 和

在体外培养的大鼠 HSC;李芙蓉等^[7-8]在体外培养大鼠肾间质细胞,都加入外源性的 ACTA,他们的报道中均观察了胶原及胶原代谢产物等指标,与我们实验结果基本相一致。此外,我们观察中还发现 LN 在刺激早中期表达并不明显,只是在 72h ACTA 为 200 $\mu\text{g/L}$ 时才显示出正常组的差异($P < 0.05$),这可能与试验模型和干预因子不尽相同所致个别数据偏差;也有学者认为 LN 滞后的原因,还可能与肝纤维化病理改变性质有关,当肝窦通透性下降,影响肝细胞间或肝细胞与血液间的物质交换,形成肝内阻力时 LN 才出现表达。但总体都表明,ACTA 能够刺激 HSC 系中 LX-2 细胞分泌 ECM,ACTA 浓度高低直接影响 ECM 表达水平,呈剂量依赖关系(正比),以胶原蛋白为显著,提示 PⅢ NP、Ⅳ-COL、HA 和 LN 等指标可直接反映 ACTA 参与了肝纤维化的发生发展过程,以及肝纤维化的病理程度;ACTA 的主要效应是促进 ECM 的合成和分泌^[9],使胶原产物分解和代谢不平衡造成胶原过度沉积。

李娜等^[10]应用 CCL₄ 制备小鼠肝纤维化模型,加入 ACTA 中和抗体干预,结果显示可抑制 TGF- β 1、 α -SMA 的表达及 ECM 表达。在我们后续研究中可尝试着用拮抗剂来干预 ACTA 的表达,抑制 HSC 功能,使之不能从表型转化为成纤维细胞,降低 ECM 的合成和分泌,达到阻断和逆转肝纤维化效应,这为临床治疗提供了新思路。

参考文献

- [1] SCHULZ R, VOGEL T, DRESSEL R, et al. TGF- β superfamily members, ActivinA and TGF- β 1, induce apoptosis in oligodendrocytes by different pathways

[J]. Cell Tissue Res, 2008, 334: 327-338.

- [2] WERNER S, ALZHEIMER C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease[J]. Cytokine Growth Factor, 2006, 17: 157-171.
- [3] SAREM M, ZNAIDAK R, MACIAS M, et al. Hepatic stellate cell: it's role in normal and pathological conditions[J]. Gastroenterol Hepatol, 2006, 29: 93-101.
- [4] MANNING D S, AFDHAL N H. Diagnosis and quantitation of fibrosis[J]. Gastroenterology, 2008, 134: 1670-1681.
- [5] GUHA I N, ROSENBERG W M. Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis: Serum Markers, Imaging, and Other Modalities[J]. Clinics in Liver Disease, 2008, 12: 883-900.
- [6] WADA W, KUWANO H, HASEGAWA Y, et al. The Dependence of Transforming Growth Factor- β -Induced Collagen Production on Autocrine Factor Activin A in Hepatic Stellate Cells[J]. Endocrinology, 2004, 145: 2753-2759.
- [7] 李芙蓉, 杨成, 张莹. 激活素 A 及卵泡抑素对大鼠肾间质成纤维细胞分泌羟脯氨酸及Ⅳ型胶原的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 238-240.
- [8] 李芙蓉, 程悦, 张莹, 等. 激活素 A 及卵泡抑素对大鼠肾间质成纤维细胞 I 型胶原的影响[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(7): 861-864.
- [9] 沈健, 李光明. 激活素 A 与肝脏疾病[J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(4): 210-213.
- [10] 李娜, 李定国, 陈源文等. 激活素 A 中和抗体对小鼠肝组织细胞因子表达影响[J]. 胃肠病和肝病学杂志, 2005, 14(2): 153-155.

(收稿日期: 2012-6-26)

(上接第 632 页)

B*2705 亚型是鲁西南地区 AS 患者的主要易感基因,与鲁西南地区汉族人群 AS 的发病呈强相关,与国内其他研究的结论相一致^[5-7]。B*27 亚型的分布呈高度偏态且有明显的种族差异,除 B*2704 和 B*2705 亚型外,其他亚型检出数偏少,受到样本数量的限制,尚需进行更大样本和多人群的调查分析。

参考文献

- [1] BREWERTON D A, HART F D, NICHOLLS A, et al. Ankylosing spondylitis and HL-A 27[J]. Lancet, 1973, 1: 904-907.
- [2] VAN DER LINDEN S, VALKENBURG H A, CATS A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria[J]. Arth Rheu, 1984, 27: 361-368.
- [3] KHAN M A. HLA-B27 polymorphism and associa-

tion with disease[J]. J rheumatol, 2000, 27: 1110-1114.

- [4] GONZALEZ-ROCES S, ALVAREZ M, GONZALEZ S, et al. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis[J]. Tissue Antigens, 1997, 49: 116-123.
- [5] 林剑浩, 吕厚山. 中国汉族正常人群 HLA-B27 亚型的分布调查[J]. 中华医学遗传学杂志, 1995, 12(4): 212-214.
- [6] 黄霞, 毛伟, 王芳, 等. 重庆造血干细胞资料分库汉族人群 HLA-B27 亚型分布调查[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(4): 321-322.
- [7] 周峰, 郁超, 张克霞. 南通地区 HLA-B27 基因亚型分布及其与 AS 相关性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 14(4): 135-136.

(收稿日期: 2012-03-21)