

• 论著-临床研究 •

自然杀伤细胞免疫球蛋白样受体及其配体 HLA-C 与 HCV 感染的相关性研究*

邵雷¹ 马玲¹ 史丽莉¹ 林红¹

[摘要] 目的:自然杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIRs)是自然杀伤(NK)细胞上介导天然免疫的主要受体,同时 KIRs 也在 T 细胞上表达,与获得性免疫相关。本研究在对 KIRs 及其配体 HLA-C 进行分型的基础上,探讨 KIRs、HLA-Cw 的基因分型及其联合体与 HCV 感染的相关性。**方法:**采用序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)法,对江苏献血人群中 164 例抗-HCV 酶联免疫吸附试验(ELISA)双试剂反应性献血者(抗-HCV 阳性组)和 241 例合格献血者(对照组)的 KIRs 和 HLA-C 的基因型进行检测和分析。**结果:**HLA-Cw 的基因分型在抗-HCV 阳性组和对照组中的分布无统计学意义;KIRs 中与 HLA-C 配对的 KIR 基因分型仅有 KIR2DS2 在 2 组中的表达频率有差异(对照组 21.2% vs 抗-HCV 阳性组 37.8%),差异有统计学意义($P < 0.01$);HLA-C1C1 与 KIR2DS2 的配对组合在 2 组中差异有统计学意义(22.1% vs 42.0%, $P < 0.05$)。**结论:**江苏献血者人群中 KIR2DS2 可能是 HCV 感染的相关基因;HLA-C1C1/KIR2DS2 的配对组合可能激活了 NK 细胞和其他免疫细胞的功能,抑制病毒复制或促进 HCV 清除的功能,有待进一步实验证实。

[关键词] HCV 感染;HLA-C 基因;KIRs 基因;献血者

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.06.001

[中图分类号] R512.6 **[文献标志码]** A

Frequency of killer cell immunoglobulin-like receptors and HLA-C in Jiangsu blood donors with HCV infection

SHAO Lei MA Ling SHI Lili LIN Hong

(Jiangsu Province Blood Center, Nanjing, 210042, China)

Corresponding author: LIN Hong, E-mail: linhong712003@sina.com

Abstract Objective: Killer cell immunoglobulin-like receptors(KIRs) are the primary receptors of NK cells that mediate innate immunity. KIRs are also involved in acquired immunity, because some KIRs are expressed on the surface of certain subsets of T cells. In this study, the frequency of KIR genes, HLA-C allotypes, and combinations of KIR genes with their HLA-C ligands were analyzed in HCV infection blood donors. **Method:** HLA-C and KIR genes in two different groups of the Chinese Jiangsu population; 241 eligible blood donors (the control group) and 164 double ELISA of anti-HCV reaction blood donors (anti-HCV positive group) were evaluated by PCR-SSP. **Result:** The distribution of HLA-Cw genotyping in the anti-HCV positive group and the control group was not statistically significant ($P > 0.05$). The frequency of KIR2DS2 in anti-HCV positive group (37.8%) was higher than that in the control group (21.2%) ($P < 0.01$). In different combinations of KIR genes with their HLA-C ligands, HLA-C1C1/KIR2DS2 had statistical significance between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** This study can Among the blood donors in Jiangsu Province, KIR2DS2 might be associated with HCV infection and the combination of HLA-C1C1/KIR2DS2 may be activate the function of NK cells and other immunity cells.

Key words hepatitis C virus infection; HLA-C gene; KIRs; blood donors

对于 HCV 感染者来说,肝细胞损伤的早期诱因首先来自免疫反应,而不是来自直接的细胞病变^[1]。自然杀伤(natural killer, NK)细胞是在宿主抵御 HCV 感染过程中扮演重要角色的一类淋巴细胞。肝脏中有 30%~50% 的淋巴细胞是 NK 细

胞,而外周血细胞中 NK 细胞仅占 5%~20%^[2]。NK 细胞的功能主要由受体家族的信号网络效应决定,这些受体包括激活性(activating)和抑制性(inhibitory)的杀伤细胞球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs)。KIRs 是在 NK 细胞和部分特定的 T 细胞表面表达的跨膜糖蛋白,在 NK 细胞的发育、耐受和激活等方面起着关键的调节作用^[3]。不同的 KIRs 在不同的个体中形成多样的单倍型和基因型,平衡 NK 细胞的

*基金项目:江苏省第五期“333 高层次人才培养工程”项目(No:2016-III-3345);2016 年高层次卫生人才“六个一工程”项目(No:LG Y2016045)

¹江苏省血液中心输血研究室(南京,210042)

通信作者:林红, E-mail: linhong712003@sina.com

抑制和激活能力。到目前为止,共有 16 种 KIRs 基因和假基因被证实。

已知的 KIRs 的配体为 HLA-A, B 和 C^[4], 其中 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DS1 和 KIR2DS2 与 HLA-C 的同种异型基因 C1 和 C2 有不同的亲和力。KIR2DL1/HLA-C2 为 NK 细胞提供最强的抑制能力, 其次是 KIR2DL2/HLA-C1 和 KIR2DL3/HLA-C2; KIR2DL3/HLA-C1 的抑制能力最弱, 所以该型 NK 细胞对 HCV 感染的反应能力更强, 尤其对低剂量 HCV 暴露^[5], 而 KIR2DS2/HLA-C1 和 KIR2DS1/HLA-C2 则对 NK 细胞具有激活作用。当抑制性 KIRs 及其 HLA-I 类配体占优势时, NK 细胞的功能可能被抑制, 导致 HCV 感染更容易转变为慢性感染。本研究调查江苏地区献血者中合格献血者和 HCV 感染献血者的 KIRs 的频率、HLA-C 等位基因的分布及其二者联合在这 2 组人群中的分布情况, 探讨献血人群中 KIRs 及其配体 HLA-C 与 HCV 感染的相关性及其转归的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2012-02—2014-07 我中心献血者献血时留取的 EDTA 抗凝血 5 mL, 包括 241 例合格献血者(对照组), 其中男 140 例, 女 101 例; 164 例抗-HCV 双酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂反应性献血者(抗-HCV 阳性组), 其中男 132 例, 女 32 例。2 组献血者的年龄分布为 18~55 岁。

1.2 HLA-Cw 基因型检测

采用序列特异性引物(sequence-specific primers, SSP)的 PCR 方法检测抗-HCV 阳性献血者和合格者的 HLA-Cw 等位基因的表达。HLA-Cw 基因的特异性引物序列来自参考文献[6]。PCR 反应体系 10 μL: 包括 20 ng 的受检基因组 DNA、0.2 mmol/L 的 dNTP、0.25 U 的 Taq DNA 聚合酶、0.4 μmol/L 的引物和 1 × PCR 反应缓冲液。PCR 反应参数 94℃, 120 s; 94℃, 25 s, 70℃, 45 s, 72℃, 30 s, 5 个循环; 94℃, 25 s, 65℃, 45 s, 72℃, 30 s, 21 个循环; 94℃, 25 s, 55℃, 60 s, 72℃, 120 s, 5 个循环; 72℃, 5 min。PCR 产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检查, 凝胶成像分析仪进行结果分析。

1.3 KIRs 基因型检测

采用 PCR-SSP 方法检测 HLA-Cw 的受体 KIR 基因的表达情况, 引物见文献[7], 分别检测抑制性受体(KIR2DL1, KIR2DL2 和 KIR2DL3)和激活性受体(KIR2DS1 和 KIR2DS2), KIR2DL4 为框架基因, 在所有个体中都表达, 用来作为内参基因, 监控 PCR 体系的正常扩增。

1.4 统计学分析

HLA-C 基因型频率(genotypic frequency,

GF)通过直接计数测得。用 SPSS 13.0 统计软件进行 χ^2 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HLA-Cw 等位基因在 2 组中的分布

在检测的全部个体中均存在 HLA-Cw 基因。依据 HLA-C 分子第 80 位氨基酸的差异, 把 HLA-Cw 基因分成 2 个大组: HLA-C1 组和 HLA-C2 组。在 1 个个体中, 若只有 C1 基因表达, 其等位基因型为 HLA-C1C1。若只有 C2 基因表达, 则其基因型为 HLAC2C2; 若既有 C1 又有 C2 基因, 则其基因型为 HLA-C1C2。通过比较 HLA-C 基因型在抗-HCV 阳性组和对照组中的分布, 发现抗-HCV 阳性组的 HLA-C1C2 基因型频率高于对照组, 但差异无统计学意义; 其他 HLA-C 基因型频率在 2 组人群中相比差异也无统计学意义。同样, HLA-Cw 在 HCV 感染后 RNA 阳性和阴性献血者中的基因型分布亦无统计学意义, 见表 1。

表 1 HLA-C 等位基因在 2 组中的频率对比

HLA-C 等位基因	例(%)	
	对照组 (n=241)	抗-HCV 阳性组 (n=164)
C1C1	140(58.1)	81(49.4)
C1C2	78(32.4)	71(43.3)
C2C2	23(9.5)	12(7.3)

2.2 KIRs 基因在 2 组中的分布

本研究对与 HLA-C 配对的 KIR2D 基因进行检测, 其中 KIR2DL4 基因在所有样品中均阳性, 其他 KIR 的结果见表 2。比较不同 KIR 基因在抗-HCV 阳性组和对照组中的分布, 结果发现, 除了 KIR2DS2 的分布具有统计学意义, 其他 KIR2D 的表达差异在 2 组中均差异无统计学意义。KIR2DS2 在抗-HCV 阳性组的表达(37.8%)高于对照组(21.2%), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。但比较抗-HCV 阳性组中 RNA 阳性和阴性组, 发现阳性组的表达(46.0%)虽然高于阴性组(32.7%), 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 KIRs 基因在 2 组中的频率对比 例(%)

功能	KIR 基因	例(%)	
		对照组 (n=241)	抗-HCV 阳性组 (n=16)
抑制性	2DL1	236(97.9)	160(97.6)
	2DL2	70(29.0)	60(36.9)
	2DL3	237(98.3)	152(92.7)
活化性	2DS1	70(29.0)	65(39.6)
	2DS2	51(21.2)	62(37.8)

2.3 HLA-C 与 KIRs 受体配体对在 2 组中的频率

比较 HLA-C 与 KIRs 受体配体对在对照组和抗-HCV 阳性组中的表达频率,发现仅有 HLA-

C1C1/KIR2DS2 在 2 组间(22.1% vs 42.0%)差异有统计学意义($P < 0.05$),其他 KIRs 与 HLA-C1 的组合在 2 组间差异均无统计学意义。见表 3。

表 3 HLA-C1/KIRs 在 2 组中的频率对比

例(%)

分组	HLA-C 等位基因	抑制性 KIRs			活化性 KIRs	
		2DL1	2DL2	2DL3	2DS1	2DS2
对照组	C1C1(140)	139(99.3)	38(27.1)	140(100)	50(35.7)	31(22.1)
	C1C2(78)	76(97.4)	25(32.1)	77(98.7)	15(19.2)	16(20.5)
	C2C2(23)	21(91.3)	7(30.4)	20(87.0)	5(21.7)	4(17.4)
抗-HCV 阳性组	C1C1(81)	80(98.8)	29(35.8)	74(91.4)	40(49.4)	34(42.0)
	C1C2(71)	68(95.8)	19(26.8)	67(94.4)	20(28.2)	24(33.8)
	C2C2(12)	12(100)	12(100)	11(91.7)	5(41.7)	4(33.3)

3 讨论

本文的研究对象 KIRs 基因,在不同地区、不同个体中有不同组合表达^[8-9]。部分 KIRs 的配体是 HLA-I^[10],HLA-Bw4 是 KIR3DL1 的配体,HLA-G 是 KIR2DL4 的配体,而 HLA-C1 可分别和 KIR2DL2、2DL3、2DS2 结合,HLA-C2 可分别和 KIR2DL1 和 2DS1 结合并影响 NK 细胞的免疫活性。本研究选取 KIR2D 及其配对的 HLA-C 作为研究对象。KIR2D 包括抑制性受体 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3,框架(结构)基因 KIR2DL4 和活化性受体 KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4 和 KIR2DS5。在本研究中,框架基因 KIR2DL4 在所有个体中都表达,KIR2DL1 和 KIR2DL3 高频表达($> 90\%$),而 KIR2DL2 和 KIR2DS1~5 在不同个体中的表达有不同程度的缺失。

Khakoo 等^[5]研究表明,HLA-C1 纯合子,即表达 C1C1 基因型的 HCV 感染者与 HCV 清除有关,C1C1 对 HCV 感染宿主可能具有保护效应,因为这些分子递呈给细胞毒 T 细胞的抗原具有较强的亲和力。本研究调查了配体 HLA-C 在不同组献血人群中的分布,但未发现 HLA-C 在合格献血者和抗-HCV 阳性献血者中具有差异性。HCV 感染者中有 18%~34% 人群表现为自限清除(spontaneous clearance)^[11],献血人群中抗-HCV ELISA 双试剂检测阳性者核酸阴性的比例更高^[12],因此了解这部分人群的保护性因素具有重要的意义。HLA-C 在本研究的群体中,基因型 HLAC1C1 的表达频率高于 HLA-C1C2 和 HLA-C2C2,但在 HCV 感染人群和合格献血人群之间差异无统计学意义。

本研究中 KIRs 在 HCV 感染献血人群和合格献血人群的表达情况,除了 HCV 感染者的 KIR2DS2 表现出明显的高频率,差异有统计学意义,其他 KIR2D 在 2 组人群中均差异无统计学意

义。这个结果与 Sung 等^[8]对韩国 HCV 感染人群的研究结果相反,在韩国人群中慢性 HCV 感染者 KIR2DS2 的表达频率显著低于对照人群。在广州地区献血者中^[13],HCV 自限清除的人群中,KIR2DL2 和 2DS2 的频率显著高于 HCV 慢性感染组,而中国云南汉族人群中^[14],KIR2DL2 在 HCV 慢性感染者中的频率高于对照组,其余基因型的分布差异无统计学意义,认为 KIR2DL2 可能是 HCV 慢性感染的易感基因。在波兰人群中^[15],无论是 KIRs 和 HLA-C1,还是两者的联合表达,都与 HCV 慢性感染无关,但比较性别发现,男性感染者 KIR2DS2 的表达频率显著高于女性感染者(> 2.5 倍),但在对照组中,男性和女性表达 KIR2DS2 的频率没有差异性。缺乏 KIR2DS5 的情况下,KIR2DS3 的表达与低病毒水平和年龄有关。本研究初步对 HCV 感染献血者 RNA 阴性和阳性组的 KIR2D 的表达情况进行了比较,没有显示差异性,但这个结果还有待下一步通过随访和核酸检测确定 HCV 感染献血者是否慢性感染和自限清除进行重新确认。

由于 KIR 基因为 HLA 的受体,因此 KIR 与 HLA 的相互作用,在先天免疫应答中发挥了重要作用,KIR 受体和 HLA 配体结合的强弱程度反映了机体对病毒感染的免疫能力强弱。本研究分析了 KIRs 和 HLA-C 基因联合表达,发现 HLA-C1C1-KIR2DS2 在对照组和抗-HCV 阳性组中差异有统计学意义。Kulkarni 等^[10]综述了 HLA 及其相应 KIR 受体的相互作用与 HCV 感染相关性,发现 HLA-C1 与 KIR2DL1 结合,HLA-C2 与 KIR2DL2/2DL3 结合,KIR3DL1/3DS1 与 HLA-Bw4 结合,均与 HCV 的感染相关。其后陆续有不同研究报道 HLA-KIR 联合作用与 HCV 感染的关系。Saito 等^[16]研究发现在日本人群中,当把 HCV 相关的肝癌患者按年龄分为 2 组时,KIR2DL2-HLA-C1 和 KIR2DS2-HLA-C1 的频率在年轻组

(<65 岁)中明显高于年长组(≥65 岁),并通过逻辑回归分析得到 KIR2DL2-HLA-C1 在年轻组中与肝癌的进程独立相关,可作为鉴定早发 HCV 相关肝癌的生物标志物。De Re 等^[17]调查了 KIR/HLA 与慢性肝炎(125)、HCV(118)相关肝癌和淋巴组织增生性疾病(153)病例之间的风险关系,发现 KIR2DS3 是与 HCV 慢性感染有关的首要基因,KIR2DS2/KIR2DL2 与 HCV 相关的淋巴组织增生性疾病有关,携带 KIR3DL1/HLA-Bw6 的 HCV 感染个体发展为淋巴瘤的风险大于冷球蛋白血症,而缺少 KIR3DL1/HLA-Bw6 的个体罹患肝癌的风险更大。

KIRs、HLA 及其联合配对与 HCV 感染的相关性及其在 HCV 感染过程中的作用在不同地区和不同人群中的结果不相同,Hydes 等^[18]认为 HCV 感染后的结果不仅与自身基因表达导致的免疫功能的差异有关,还取决于感染的 HCV 的基因型,也就是说宿主和病毒因素决定了 HCV 感染后是否自限清除和持续慢性感染。本研究对正常献血人群、HCV 感染献血人群的 KIRs 基因和 HLA-C 进行了初步研究,希望发现并证明易感基因与保护基因的存在,为 HCV 的预防、诊断、治疗以及未来 HCV 疫苗的研发提供有意义的基础研究数据。以上研究结果显示,HLA-C 等位基因的分布与 HCV 的感染没有相关性,而 KIR2DS2 基因可能与 HCV 感染有关,但在 HCV RNA 阳性持续感染者和阴性自限清除者中的表达差异还需要通过下一步的随访确认。HLA-Cw 与 KIR 配对联合分析表明 HLA-C1C1-KIR2DS2 与 HCV 感染具有相关性,且在感染 HCV 献血者中的表达高于合格献血者,差异有统计学意义。是否 HLA-C1C1-KIR2DS2 的联合配对作用激活了 NK 细胞的功能,发挥了清除 HCV 的作用;是否病毒清除依赖于感染 HCV 的基因型还需要进一步的实验证实。

参考文献

- [1] Irshad M, Gupta P, Irshad K. Immunopathogenesis of Liver Injury During Hepatitis C Virus Infection[J]. *Viral Immunol*, 2019, 32:112-120.
- [2] 蒋瀚信,封波. 慢性丙型肝炎患者外周血 NK 细胞的特点及直接抗病毒药物的影响[J]. *医学综述*, 2019, 25(15):2961-2966.
- [3] Rayan R, Joseph H, Rami A, et al. Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs) and hematopoietic stem cell transplantation outcomes. A review of the literature[J]. *Meta Gene*, 2017, 11.
- [4] Chaisri S, Kitcharoen K, Romphruk AV, et al. Polymorphisms of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) and HLA ligands in northeastern Thais[J]. *Immunogenetics*, 2013, 65:645-653.
- [5] Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection[J]. *Science*, 2004, 305:872-874.
- [6] Hiby SE, Regan L, Lo W, et al. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage[J]. *Hum Reprod*, 2008, 23:972-976.
- [7] Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. KIR genotyping by multiplex PCR-SSP[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 612:365-375.
- [8] Sung PS, Choi HB, Kim SY, et al. Frequency of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) in Korean patients with chronic HCV infection[J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26:1483-1488.
- [9] de Vasconcelos JM, de Jesus Maués Pereira Mória L, Amaral Ido S, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms with chronic hepatitis C and responses to therapy in Brazil[J]. *Genet Mol Biol*, 2013, 36:22-27.
- [10] Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease[J]. *Semin Immunol*, 2008, 20:343-352.
- [11] Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C[J]. *J Hepatol*, 2014, 61:S58-68.
- [12] 朱绍汶,陈显,王金花,等. 2011-2012 年南京地区无偿献血人群丙型肝炎病毒感染情况分析[J]. *临床血液学杂志*, 2013, 26(10):718-720.
- [13] Shan Z, Huang J, Liao Q, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with spontaneous clearance of hepatitis C virus in the Chinese population[J]. *Transfusion*, 2018, 58:1028.
- [14] 刘城秀. HLA/KIR 基因和 CD6 基因多态性与 HCV 慢性感染的相关性研究[D]. 北京:中国医学科学院北京协和医学院清华大学医学部, 2016.
- [15] Kusnierczyk P, Mozer-Lisewska I, Zwolińska K, et al. Contribution of genes for killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) to the susceptibility to chronic hepatitis C virus infection and to viremia[J]. *Hum Immunol*, 2015, 76:102-108.
- [16] Saito H, Umemura T, Joshita S, et al. KIR2DL2 combined with HLA-C1 confers risk of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in younger patients[J]. *Oncotarget*, 2018, 9:19650-19661.
- [17] De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, et al. Genetic diversity of the KIR/HLA system and susceptibility to hepatitis C virus-related diseases [J]. *PLoS One*, 2015, 10:e0117420.
- [18] Hydes TJ, Moesker B, Traherne JA, et al. The interaction of genetic determinants in the outcome of HCV infection: evidence for discrete immunological pathways[J]. *Tissue Antigens*, 2015, 86:267-75.

(收稿日期:2019-11-25)