

# 蒙古族慢性乙型肝炎患者 HLA-DRB1 基因多态性与乙型肝炎病毒高复制状态的相关性研究

安纪红 新燕

人类对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)普遍易感,除病毒本身毒力强、数量和环境因素外,宿主的遗传因素极有可能是影响乙型肝炎进展和预后的重要因素之一<sup>[1-3]</sup>。HBV 感染者的肝细胞损伤并非由病毒本身引起,而是由免疫反应导致。研究发现人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)Ⅱ分子可以增加巨噬细胞对免疫复合物的吞噬作用,这对于 HBV 的清除以及引起肝细胞损害具有极为重要的意义,并可能与 HBV 持续感染的易感性有关<sup>[4-5]</sup>。HLA 基因复合体是首个被发现与疾病有明确关系的遗传系统,在 HBV 感染后慢性化的发病机制中起重要作用,其基因多态性影响着免疫应答和多肽的提呈,从而导致机体免疫功能状态的差异。较弱的免疫反应是造成 HBV 感染慢性化的原因之一。HLA-Ⅱ类基因区的抗原基因多与免疫反应相关,包括 HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP 三个亚区和部分与抗原处理及提呈有关的基因,DR 亚区包含 10 个基因座: DRA、DRB1、DRB2、DRB3、DRB4、DRB5、DRB6、DRB7、DRB8、DRB9,其中仅 DRB1、DRB3 ~ DRB5 为功能基因,以 DRB1 的多态性最为复杂。本研究主要针对 HLA-Ⅱ类分子的 DRB1 等位基因多态性,分析比较其与 HBV 感染结局的相关性。

## 资料与方法

### 一、资料

人外周静脉血采自就诊于内蒙古自治区人民医院感染科门诊及住院患者共 120 例,均无血缘关系,蒙古族。检测 HBV 血清学标志物(HBV-M),包括 HBsAg、抗-HBs、抗-HBc、HBeAg、抗-Hbe,试剂盒购自北京万泰生物有限公司;全血 DNA 提取试剂盒及荧光定量 PCR 酶(深圳凯杰生物公司)、琼脂糖(美国 sigma 公司产品)、自动酶标洗板机、BIORAD450 型酶标仪、Icycler 定量 PCR 仪(美国伯乐公司)。

### 二、方法

1. 研究对象入选:2009 年 1 月至 2010 年 10 月在本院感染科就诊的住院及门诊患者及健康体检中心体检人群,均为蒙古族,无血缘关系。诊断均符合 2005 年中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病学分会联合制定的《慢性乙

型肝炎防治指南》诊断标准,未进行病理组织学分型。

2. 研究对象的排除:排除合并其他病毒性肝炎、自身免疫性疾病、肾脏疾病、糖尿病等疾病的患者。

3. 研究对象的分组:慢性乙型肝炎组 60 例,男女患者各 30 例,平均年龄( $35.6 \pm 12.4$ )岁。HBV DNA  $> 10^5$  拷贝/ml 的患者为高复制组,其中男性 21 例,女性 9 例;HBV DNA  $< 10^5$  拷贝/ml 的患者为低复制组,其中男性 9 例,女性 21 例;正常对照组为同期在本院查体的健康人,无血缘关系,蒙古族,共 60 人,其中男性 30 例、女性 30 例,平均年龄( $35.2 \pm 11.5$ )岁,HBV 血清标志物均为阴性。采用 SSP-PCR 法进行 HBV DNA 复制水平高低与 HLA-DRB1 多态性关系的分析。本文仅就慢性乙型肝炎高复制组与正常对照组进行对比分析。

4. HLA-DRB1 基因位点检测:HLA-DRB1 引物设计先在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 查找 HLA-DRB1 基因序列,再利用 Primer 5.0 软件,根据引物设计原则,设计出 11 种引物序列并送公司合成。设计的引物序列如表 1 所示。另外选用人生长激素(human growth hormone, HGH)基因片段作为内对照,HGH 的引物序列为:上游引物 5'-CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3',下游引物 5'-ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3',扩增片段长度为 439bp。

表 1 HLA-DRB1 引物的特异性、核苷酸序列及其扩增产物长度

靶基因位点	引物序列(上游/下游,5'-3')	引物长度(bp)	退火温度(℃)	靶序列长度(bp)
DRB1 * 01	TTGTGGCAGCTTAAGTTGAAT	22	60	168
	GCTGTTCCAGTACTCGGCAT	20	62	
DRB1 * 15/ * 16	TCCTGTGGCAGCCTAAGAG	19	60	259
	CGCTGCACTGTGAAGCTCTC	20	64	
DRB1 * 03	GTTTCTTGGAGTACTCTAGGTC	22	64	222
	TGCAGTAGTTGTCCACCCG	19	60	
DRB1 * 04	GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA	22	62	262
	CGCTGCACTGTGAAGCTCTC	20	64	
DRB1 * 11	CACGTTTCTTGGAGTACTCTAC	22	64	179
	CTGGCTGTTCAGTACTCCT	20	62	
DRB1 * 12	AGTACTCTACGGGTGAGTGT	21	62	163
	CTGTTCCAGGACTCGGCGA	19	62	
DRB1 * 13/ * 14/11	GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	22	64	234
	CGTAGTTGTGTCTGCA (GA) TAGG	21	64	
DRB1 * 07	CCTGTGGCAGGGAAGTATA	20	60	232
	CCCGTAGTTGTGTCTGCACAC	21	66	
DRB1 * 08	AGTACTCTACGGGTGAGTGT	21	62	227
	CCCGTATTGTGTCTGCAG	19	60	
DRB1 * 09	GTTTCTTGAAGCAGGATAAGTTT	23	62	236
	CCCGTAGTTGTGTCTGCACAC	21	66	
DRB1 * 10	CGGTTGCTGGAAAGACGCG	19	62	204
	CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	20	62	
DRB1 * exon2	TTCGTGTCCCAACAGCAGTTTC	23	72	295
	GCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	22	72	

检测方法按照 SSP-PCR 及琼脂糖凝胶电泳测定:(1)SSP-PCR:将冻存的全血 DNA 室温融化,混匀。取出 1  $\mu$ l DNA,上下游引物各 1  $\mu$ l,  $2 \times$  Taq mix 10  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ l, 总体系为 20  $\mu$ l, 振荡混匀,使液体中不含气泡,放入 PCR 仪中进行 PCR 反应。反应程序为:94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 45 s, 64.5℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 循环 30 次, 72℃ 末端延伸 5 min。(2)琼脂糖凝胶电泳:取 10  $\mu$ l PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约 2 cm 时,停止电泳。最后在波长为 254 nm 的长波长紫外灯下观察电泳胶板。

3. 统计学分析:采用 SPSS 15.0 统计软件分析组间等位基因分布差异,计算  $\chi^2$  值,按 Fisher 法求精确  $P$  值。

## 结 果

统计学分析结果表明慢性乙型肝炎组 HBV 高复制状态的患者群中,携带 HLA-DRB1 \* 07 位点的比例为 26.67%,明显高于健康对照组(8.33%),( $\chi^2 = 5.44, P = 0.02$ )。(见表 2)。

表 2 慢性乙型肝炎高复制组与健康对照组 HLA-DRB1 基因位点数及频率比较

	HLA-DRB1 * 01	HLA-DRB1 * 03	HLA-DRB1 * 04	HLA-DRB1 * 07
慢性乙型肝炎高复制组	1/30(3.33%)	4/30(13.33%)	2/30(6.67%)	8/30(26.67%)
健康对照组	3/60(5.00%)	3/60(5.00%)	9/60(15.00%)	5/60(8.33%)
$\chi^2$ 值		0.949	0.634	5.44
$P$ 值	0.593	0.33	0.426	0.02
	HLA-DRB1 * 08	HLA-DRB1 * 09	HLA-DRB1 * 10	HLA-DRB1 * 11
慢性乙型肝炎高复制组	3/30(10.00%)	3/30(10.00%)	1/30(3.33%)	2/30(6.67%)
健康对照组	6/60(10.00%)	7/60(11.67%)	2/60(3.33%)	5/60(8.33%)
$\chi^2$ 值				
$P$ 值	0.655	0.559	0.743	0.571
	HLA-DRB1 * 12	HLA-DRB1 * 13/14	HLA-DRB1 * 15/16	
慢性乙型肝炎高复制组	2/30(6.67%)	2/30(6.67%)	2/30(6.67%)	
健康对照组	7/60(11.67%)	5/60(8.33%)	8/60(13.33%)	
$\chi^2$ 值	0.139			
$P$ 值	0.709	0.571	0.486	

## 讨 论

HBV 感染者的肝细胞损伤并非由病毒自身引起,而是免疫反应所致。人体感染 HBV 后,HBV 在人体内复制而引起肝脏内慢性炎症性刺激,肝脏在受到病毒损伤时,免疫细胞会杀伤病毒,但同时也会损伤正常肝细胞,因此使肝脏进入反复受损并修复的过程,肝细胞就会不断损害、凋亡,纤维组织不断增生,进而重建肝小叶结构,导致假小叶形成并逐步进展为肝硬化等。众所周知,HBV 的清除、血清学转换等与治疗时肝脏炎症程度有极大的关系,但又不完全取决于肝脏炎症

程度。HBV 感染后,与慢性乙型肝炎出现不同程度的临床表现和发展过程相关联的因素,除 HBV 数量与毒力外,更重要的是不同个体对 HBV 的免疫状况。HLA 决定着机体的排斥反应,并与免疫应答和免疫调节有关,可能参与免疫应答的遗传控制。HLA 复合体作为调节机体免疫应答的重要基因群,在人类免疫应答反应中发挥着十分重要的作用,与抗 HBV 免疫反应有着密切的关系。HLA 复合体为编码 HLA 的基因群,其等位基因多态性是决定宿主免疫应答能力的最重要的遗传因素,也决定着不同个体对抗原免疫应答的差异,在抗原识别、免疫应答以及免疫调控等方面发挥着非常重要的作用,另一方面人类基因组中编码 HLA-Ⅱ类分子的基因具有明显的多态性,是理想的表达宿主遗传标记区域。这些作用的发挥主要由 HLA 在细胞表面表达的水平及其结构的多态性所决定,与疾病发生、发展以及预后等有明确关系。HLA 等位基因的多态性是决定宿主拥有不同免疫应答能力的重要遗传因素,不同 HLA 基因型所介导的免疫识别和激活能力不同,其产物决定不同个体对抗原免疫应答的差异。HLA-Ⅱ类基因与 HBV 易感性和抗性相关,这极大程度影响着 HBV 感染的获得、发展及预后,HLA-Ⅱ类抗原的功能是将外源性抗原肽提呈给  $CD4^+$  T 细胞,进而改变  $CD4^+$  T 细胞的功能,其主要分布于 B 淋巴细胞、巨噬细胞以及活化的 T 细胞表面。现代研究已经表明 HLA-Ⅱ多态性显著影响 HBV 感染免疫应答过程及临床结局,在Ⅱ类区域中又以 DRB1 等位基因多态性最多见<sup>[6-8]</sup>。故本研究主要针对 HLA-Ⅱ类基因主要抗原表达位点(DRB1)的多态性及其与 HBV 感染间的关系进行研究。本研究应用 PCR-SSP 技术,表明携带 HLA-DRB1 \* 07 等位基因的慢性乙型肝炎患者易形成 HBV 高复制状态,与既往研究显示 HLA- DRB1 \* 03、HLA- DRB1 \* 07 与慢性乙型肝炎持续发展相关<sup>[9]</sup>结果一致。HLA-DRB1 \* 07 等位基因可能为蒙古族人群 HBV 感染的易感基因,进一步说明特异性的遗传因素可增加或降低人群对 HBV 感染的发生、发展及预后。临床上也可以 HLA-DRB1 基因多态性为慢性乙型肝炎提供治疗依据。

## 参 考 文 献

- 1 Yeo W, MoFk, Chan SL, et al. Hepatitis B viral load predicts survival of HCC patients undergoing systemic chemotherapy. *Hepatology*, 2007, 45(6): 1382-1389.
- 2 Kao JH, Chen PJ, Lai MY. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2000, 118(3): 554-559.
- 3 Rehermann B. Immune responses in hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis*, 2003, 23(1): 21-38.
- 4 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet infect Dis*, 2002, 2(1): 43-50.
- 5 Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*, 1997, 99(7): 1472-1477.
- 6 程元桥, 林菊生, 黄丽红, 等. 人类白细胞抗原 DRB1 等位基因与乙肝后肝硬化遗传易感性的研究. *中华医学遗传学杂志*, 2003, 20(3): 247-249.
- 7 卢亮平, 李兴旺, 刘英, 等. HLA-DRB1 及 HLA-DQA1 单倍型与乙型肝炎病毒感染结局的关联研究. *中华医学遗传学杂志*, 2006, 23(4): 427-430.
- 8 徐安龙, 吴文言, 陈为民, 等. 南方人群 HBV 感染与 HLA-DQB1 基因的相关性研究. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(9): 45-46.

- 9 Yang G, Liu J, Han S, et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA- DRB1 genotyping in Shanxi Han patients in northwestern China. Tissue Antigens, 2007, 69(2):170-175.

(收稿日期:2011-05-19)

(本文编辑:孙荣华)

安纪红, 新燕. 蒙古族慢性乙型肝炎患者 HLA-DRB1 基因多态性与乙型肝炎病毒高复制状态的相关性研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2011, 5(3):348-352.