

· 临床论著 ·

新疆维吾尔族HLA-A、HLA-B基因多态性与
HBV感染结局的相关性

梁军 杨晓筠 张艳君 仲英娜

【摘要】目的 研究HLA-A、HLA-B基因多态性与新疆维吾尔族人群HBV感染结局的相关性。**方法** 临床收集自限HBV感染者50例(RHBS组)、慢性HBV携带者80例(ASC组)、CHB患者100例(CHB组),采用PCR-SSP法检测HLA-A、HLA-B基因型,比较组间基因频率差异。**结果** HLA-A*33在CHB组分布频率(2.50%)显著低于ASC组(8.75%),差异具有统计学意义($\chi^2 = 7.355$, $P = 0.007$, $OR = 0.248$, 95%CI 0.085~0.722)。HLA-A*33在RHBS组分布频率(1.00%)低于ASC组(8.75%) ($\chi^2 = 7.242$, $P = 0.007$, $OR = 0.96$, 95%CI 0.012~0.756),差异具有统计学意义。HLA-B*52在CHB组分布频率(7.50%)高于ASC组(1.88%),差异具有统计学意义($\chi^2 = 8.757$, $P = 0.003$, $OR = 5.634$, 95%CI 1.596~19.887)。HLA-B*52在RHBS组分布频率(11.00%)高于ASC组(1.88%) ($\chi^2 = 10.665$, $P = 0.001$, $OR = 7.239$, 95%CI 1.908~27.467),差异具有统计学意义。**结论** HLA-A、HLA-B基因多态性影响HBV感染临床结局,HLA-A*33基因与病毒携带状态有关。HLA-B*52基因具有较强的抗HBV感染能力,临床上易表现为HBV一过性感染或慢性乙型肝炎。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;人白细胞抗原;维吾尔族

Association of HLA-A, HLA-B polymorphism with the outcomes of hepatitis B virus infection in Uyghur population of Xinjiang LIANG Jun*, YANG Xiao-jun, ZHANG Yan-jun, ZHONG Ying-na. *Xinjiang Clinical College, Anhui Medical University, Urumqi 830001, China
Corresponding author: ZHONG Ying-na, Email: zhongyn2005@126.com

【Abstract】 Objective To invest the associations of human leukocyte antigen (HLA)-A, HLA-B polymorphism with the outcome of HBV infection and the replication of HBV in Uyghur population of Xinjiang. **Methods** Total of 50 patients with resolved from HBV infection, 80 asymptomatic HBV carrier patients and 100 chronic hepatitis B patients were included in our study. HLA-A, HLA-B genotyping was conducted with PCR-SSP. The frequency distributions of genotype were analyzed. **Results** The frequency of HLA-A*33 allele distribution in CHB group (2.50%) was significantly lower than ASC group (8.75%, $\chi^2 = 7.355$, $P = 0.007$, $OR = 0.248$, 95%CI 0.085-0.722). The frequency of HLA-A*33 allele distribution in RHBS group (1.00%) was significantly lower than ASC group (8.75%, $\chi^2 = 7.242$, $P = 0.007$, $OR = 0.96$, 95%CI 0.012-0.756). The frequency of HLA-B*52 allele distribution in CHB group (7.50%) was significantly higher than ASC group (1.88%, $\chi^2 = 8.757$, $P = 0.003$, $OR = 5.634$, 95%CI 1.596-19.887). The frequency of HLA-B*52 allele distribution in RHBS group (11.00%) was significantly higher than ASC group (1.88%, $\chi^2 = 10.665$, $P = 0.001$, $OR = 7.239$, 95%CI 1.908-27.467). **Conclusions** HLA-A, HLA-B gene polymorphism may play an important role in determining the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Uyghur population of Xinjiang. The HLA-A*33 allele could aggravate persistent infection of HBV. HLA-B*52 allele could keep individuals away from HBV infection and was closely related with the outcomes of resolving from HBV infection spontaneously and CHB.

【Key words】 Hepatitis B virus; Human leucocyte antigen; Uyghur

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.05.010

基金项目: 新疆维吾尔自治区人民医院内科科研项目(20120115)

作者单位: 830001 乌鲁木齐市, 安徽医科大学新疆临床学院(梁军); 新疆维吾尔自治区人民医院(杨晓筠、张艳君、仲英娜)

通讯作者: 仲英娜, Email: zhongyn2005@126.com

HBV感染后的临床转归与机体免疫力、病毒逃避免疫攻击的能力、宿主所处的环境状况密切相关^[1]。人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)复合体基因负责调节机体的免疫应答,对HBV感染后清除起重要作用^[2]。van den Oord等^[3]应用双重免疫组化染色方法观察HBV抗原与HLA分子分布的关系,发现HBcAg(+)肝细胞表面均有HLA-I类分子存在,且HLA-I类分子密度与肝组织坏死等炎症改变区域相平行。HLA-I类分子负责提呈内源性抗原(如肿瘤抗原或病毒蛋白),此类抗原在细胞内经过一系列加工处理后最终呈递给CD8⁺T, CD8⁺T清除病毒同时造成肝细胞的破坏,这一机制不仅决定了宿主能否清除肝细胞内的病毒,也决定是否引起肝细胞损伤及损伤程度^[4-7]。因此HLA-I类基因的多态性影像HBV感染后的临床转归。新疆维吾尔族拥有高加索人血统,遗传背景有别于我国其他民族,既往研究其HLA-I类基因不同于汉族^[8],且其HBV易感性普遍小于同地区汉族人群^[9]。因此有必要将HBV感染后形成不同临床结局的新疆地区维吾尔族患者作为研究对象,本研究采用实验性研究方法,通过PCR-SSP从分子生物学角度识别HLA-A、B基因多态性在其中的作用,属前瞻性研究。

资料与方法

一、研究对象

收集2010年7月至2012年4月在新疆维吾尔自治区人民医院住院无血缘关系的维吾尔族慢性HBV携带(asymptomatic HBV carrier, ASC)者80例(ASC组),包括男性50例,年龄20~59岁,平均年龄(36.14 ± 10.16)岁,女性30例,22~60岁,平均年龄(36.34 ± 10.10)岁;CHB患者100例(CHB组),包括男性55例,年龄19~58岁,平均年龄(36.24 ± 10.22)岁,女性45例,21~60岁,平均年龄(36.52 ± 10.17)岁;自限性HBV感染(resolved from HBV infection spontaneously, RHBS)者70例(RHBS组),包括男性42例,年龄20~56岁,平均年龄(35.76 ± 10.32)岁,女性28例,20~60岁,平均年龄(35.14 ± 10.45)岁。所有患者诊断均符合2000年西安制定《病毒性肝炎防治方案》^[10]相关诊断标准,均排除HBV、HCV、HIV、梅毒螺旋体等感染。3组间年龄及性别构成比较差异无统计学意义。全部患者签署知情同意书并符合医学伦理,经本院伦理委员会同意。

二、主要试剂及仪器

ELISA试剂盒由上海荣盛生物技术有限公司提供;全血DNA小剂量提取试剂盒由上海由上海生物工程技术有限公司提供;引物由上海生物工程技术有限公司合成;PCR仪(型号580BR11774)、电泳仪、凝胶图像分析仪均为美国Bio-Rad公司产品。

三、方法

1. 标本收集:抽取入组者禁食12 h后静脉血10 ml,其中5 ml分离血清,用于HBV标志物及肝功能检测;另外5 ml置于EDTA(Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA Acid, EDTA)抗凝管-80℃保存,集中进行DNA提取和HLA-A、HLA-B基因型的测定。

2. HLA基因组检测:HLA基因组DNA提取按照试剂盒说明书从外周血白细胞提取基因组DNA,并采用紫外线分光光度计检测,且 $A_{260} > 0.2$, $1.7 < A_{260}/A_{280} < 2.0$,用于检测的基因组tet浓度 $< 2000/A_2$ 。

3. PCR-SSP检测HLA-A、HLA-B基因型

(1)引物设计:根据Bunce等^[11]的报道设计HLA-A*3、HLA-A*11、HLA-A*24、HLA-A*30、HLA-A*33、HLA-B*8、HLA-B*13、HLA-B*14、HLA-B*27、HLA-B*52特异性引物,为消除假阴性结果反应体系以β异性引物,为基因扩增产物作为内参照物。

(2)PCR扩增体系含100 ng基因组DNA 2 μl、2 μmol/L上下游引物各2 μl、10 × PCR Buffer 2 μl、2.5 mmol/L dNTP 1.5 μl、内对照引物2 μmol/L 0.4 μl。PCR扩增条件:预变性94℃ 4 min,变性94℃ 50 s,退火66℃ 30 s,延伸72℃ 45 s,循环35次,最后延伸72℃ 10 min。

(3)PCR扩增产物鉴定:将4 μl的PCR法产物经1 μl溴酚蓝染色在1%琼脂糖凝胶中电泳30 min,电压140 V,经紫外线投射,在相应泳道出现清晰条带即为阳性。

4. 统计学分析:采用SPSS 13.0统计软件进行处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;组间频率的比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法。

结 果

一、HLA-A、HLA-B区10个等位基因在3组研究对象的电泳图

HLA-A、HLA-B区10个等位基因扩增引物与理论片段大小相符合,见图1。

表1 HLA-A基因在3组人群中的分布频率

HLA-A等位基因	CHB组		RHBS组		ASC组	
	例数	AF (%)	例数	AF (%)	例数	AF (%)
HLA-A*03	27	13.50	17	17.00	23	14.38
HLA-A*11	20	10.00	10	10.00	12	7.50
HLA-A*24	35	17.50	18	18.00	19	11.88
HLA-A*30	7	3.50	3	3.00	6	3.75
HLA-A*33	5	2.50	1	1.00	14	8.75

表2 HLA-B基因在3组人群中的分布频率

HLA-B等位基因	CHB组		RHBS组		ASC组	
	例数	AF (%)	例数	AF (%)	例数	AF (%)
HLA-B*08	7	3.50	2	2.00	6	3.75
HLA-B*13	8	4.00	4	4.00	8	5.00
HLA-B*14	11	5.50	3	3.00	4	2.50
HLA-B*27	4	2.00	2	2.00	4	2.50
HLA-B*52	18	9.00	11	11.00	3	1.88

二、HLA-A基因多态性在CHB组、RHBS组、ASC组分布结果比较

HLA-A*33在CHB组分布频率(2.50%)显著低于ASC组(8.75%),差异具有统计学意义($\chi^2 = 7.355$, $P = 0.007$, $OR = 0.248$, 95%CI 0.085~0.722)。HLA-A*33在RHBS组分布频率(1.00%)低于ASC组(8.75%),差异具有统计学意义($\chi^2 = 7.242$, $P = 0.007$, $OR = 0.96$, 95%CI 0.012~0.756),见表1。

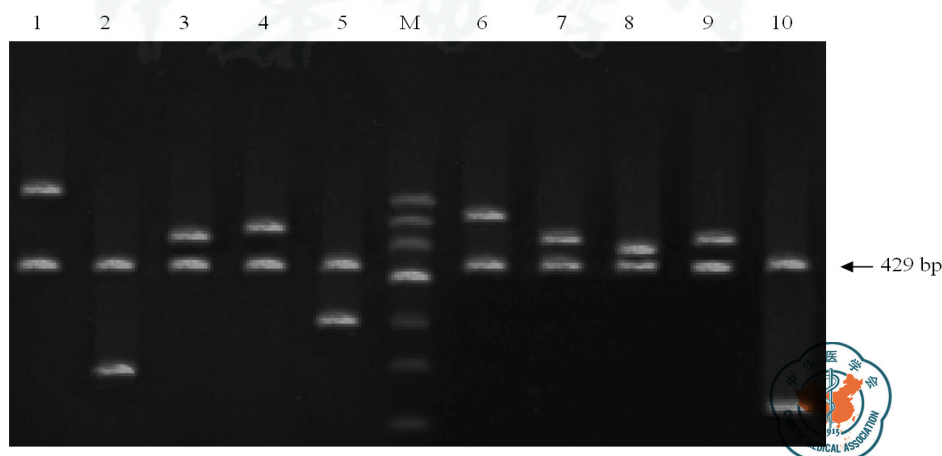
三、HLA-B基因多态性在CHB组、RHBS组、ASC组分布结果比较

HLA-B*52在CHB组分布频率(7.50%)高于ASC组(1.88%),差异具有统计学意义($\chi^2 = 8.757$, $P = 0.003$, $OR = 5.634$, 95%CI 1.596~19.887)。HLA-B*52在RHBS组分布频率(11.00%)高于ASC组(1.88%),差异具有统计学意义($\chi^2 = 10.665$, $P = 0.001$, $OR = 7.239$, 95%CI 1.908~27.467),见表2。

讨 论

环境、病毒(基因型、病毒变异、病毒载量)、宿主(免疫特性、健康状况)等因素被认为是影响HBV感染后病情进展的关键因素。宿主的免疫特性受负责编码HLA的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)调控。HLA基因在不同种族人群间呈现出的丰富多态性导致HBV易感性及临床结局有所不同,目前国内外有关HLA与HBV感染临床转归的相关性研究正成为揭示HBV感染后疾病发生发展宿主因素的热点。本研究与以往研究不同的是未将正常人群作为对照组,而是以新疆维吾尔族CHB、ASC、RHBS患者作为研究对象,3组患者均曾感染HBV且暴露史相同,可比性较高,所得结果更为准确。

近年来有关HLA-I类分子与HBV感染相关性报道重复性均较差,至今尚无定论,甚至存在矛盾之处,主要认为可能与使用不同检测方法、



注: M: Marker, 100 bp ladder; 1: HLA-A*03 (735 bp); 2: HLA-A*11 (195 bp); 3: HLA-A*24 (520 bp); 4: HLA-A*30 (570 bp); 5: HLA-A*33 (200 bp); 6: HLA-B*8 (605 bp); 7: HLA-B*13 (515 bp); 8: HLA-B*14 (445 bp); 9: HLA-B*27 (515 bp); 10: HLA-B*52 (135 bp)

图1 HLA-A、HLA-B区10个等位基因在3组研究对象的电泳图

样本来自不同种族及地区的人群以及样本量存在抽样误差等有关。本研究结果为HLA-A*33分布频率在CHB组、RHBS组显著高于ASC组,而CHB组和RHBS组之间差异无统计学意义,与Ramezani等^[12]将伊朗人作为研究对象所得结果相似。笔者认为形成此结果的原因可能是HLA-A*33分子呈递内源性HBV抗原能力较弱,TCL难以将其杀灭,同时对肝细胞造成的损伤也较小,因此HBV感染后易形成病毒携带状态。李东良等^[13]采用DNA侧序分型技术(sequencing-based typing, SBT)研究认为HLA-A*2402是乙型肝炎肝硬化的易感基因,另外Karan等^[14]针对土耳其人群的研究发现HLA-A*24基因频率在CHB、乙型肝炎肝硬化患者中明显降低。本研究显示,HLA-A*24基因频率分布在CHB和RHBC组较ASC组高,但差异无统计学意义。针对上述3种不同的研究结果,笔者认为不同种族人群对HBV易感性有所区别,不仅表现在HLA基因分布频率的不同,亦可能与同一类型HLA分子在不同种族间所表现出的呈递效率不相同有关。早在2003年Thio等^[15]认为美国高加索人HLA-A*03可抵制HBV感染,属于保护性基因,而本研究中维吾尔族人同样具有高加索人血缘未得出上述结论,可能因相同种族的群体长期生活在不同环境的过程中优势选择造成遗传学上的改变,从而凸显出不同的优势等位基因。另外,HLA-B*52在RHBS组、CHB组分布频率均高于ASC组,差异具有统计学意义,与Ramezani等^[10]所得结果相似,上述结果可能与HLA-B*52分子对HBV呈递效率较高有关,当机体呈递效率高时表现为高免疫状态,此时对病毒而言是积极的清除过程,易发展为一过性感染。若病毒载量较高,难以完全清除,就肝细胞而言处在长期的被动损伤过程,最终可能发展为CHB。由此得出,HBV感染后形成不同临床结局的两组研究对象均表现为HLA-B*52基因高携带状态并不矛盾。

综上所述,新疆维吾尔族人群HLA-A*33分子抗HBV感染效力较低且与病毒携带状态有关;HLA-B*52分子具有较强的抗HBV感染能力,可能形成一过性HBV感染或者CHB。HLA-A、HLA-B分子清除肝细胞内HBV同时造成肝细胞的损伤,即HBV感染后因HLA分子所起到的抗病毒效力不同引起HBV感染后临床结局不同,与以往多数研究仅限于单纯的找出与HBV感染结局有关的HLA基因,未分析临床结局与HLA抗病毒效力的相关性。在世

界范围内不同种族人群已进行了大量类似研究,目前尚无公认的与HBV感染后转归密切相关的目的基因,其结论仍未应用于临床,但随着研究的不断深入,目的基因进一步的发现与证实,临床病情的评估和预测将会变得有效可行。

参考文献

- 1 Albayrak A, Ertek M, Tasyaran MA, et al. Role of HLA allele polymorphism in chronic hepatitis B virus infection and HBV vaccine sensitivity in patients from Eastern Turkey. *Biochem Genet*, 2011, 49(3-4): 258-269.
- 2 Guo X, Zhang Y, Li J, et al. Strong influence of human leukocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the han Chinese population. *Hepatology*, 2011, 53(2): 422-428.
- 3 van den Oord JJ, de Vos R, Desmet VJ. In situ distribution of major histocompatibility complex products and viral antigens in chronic hepatitis B virus infection: evidence that HBc-containing hepatocytes may express HLA-DR antigens. *Hepatology*, 1986, 6(5): 981-989.
- 4 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13(2): 29-60.
- 5 Huang CF, Lin SS, Ho YC, et al. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3(2): 97-106.
- 6 Singh R, Kaul R, Kaul A, et al. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(12): 1770-1787.
- 7 Krishnan A, Wang Z, Srivastava T, et al. A novel approach to evaluate the immunogenicity of viral antigens of clinical importance in HLA transgenic murine models. *Immunol Lett*, 2008, 120(1-2): 108-116.
- 8 Lai SP, Li SB, Yan CX, et al. Study on HLA class I DNA typing of PCR-SSOP. *Chinese J Forensic Med*, 1999, 14(2): 68-72.
- 9 库热西江·托呼提, 哈木拉提·吾甫尔, 张利占, 等. 和田地区维吾尔族、汉族人群HBsAg携带率的流行病学调查分析. *第一军医大学学报*, 2004, 24(11): 1287-1288.
- 10 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(11): 324-329.
- 11 Bunce M, O'Neill CM, Bamardo MC, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, 1995, 46(5): 355-367.
- 12 Ramezani A, Hasanjan Roshan MR, Kalantar E, et al. Association of human leukocyte antigen polymorphism with outcomes of hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(11): 1716-1721.
- 13 李东良, 郑建勇, 彭经宙, 等. 福建地区汉族人乙型肝炎肝硬化与人类白细胞抗原 I 类基因的相关性. *第四军医大学学报*, 2009, 30(18): 1703-1706.
- 14 Karan MA, Tascioglu NE, Ozturk AO, et al. The role of HLA antigens in chronic hepatitis B virus infection. *J Pak Med Assoc*, 2002, 52(6): 253-256.
- 15 Thio CL, Thomas DL, Karacki P, et al. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol*, 2003, 77(22): 12083-12087.

(收稿日期: 2013-06-08)

(本文编辑: 李卓)