

## · 临床论著 ·

## HLA-DRB 多态性与 HBV 感染的相关性研究

邢文斌 郭晓楠 徐慧宁

**【摘要】目的** 通过对慢性乙型肝炎男性患者的配偶和子女 HBV 感染状况及其 HLA-DRB 多态性分析, 揭示 HLA-DRB 与 HBV 感染的相关性。**方法** 采用 ELISA 方法筛查 HBV 血清标志物, 采用 PCR/SSP 技术扩增 HBV 感染者及易感人群 HLA-DRB1 不同位点等位基因片段, 琼脂凝胶电泳分离基因片段, 紫外透射反射分析仪判定 HLA-DRB1 型别。**结果** 慢性乙型肝炎患者及 HBV 携带者携带 HLA-DRB1\*0201、0301 基因显著高于健康对照组; HLA-DRB1\*1301 在健康对照组的携带率显著高于慢性乙型肝炎患者及病毒携带者; HLA-DRB1\*0201、0301、0701 和 1301 在感染后恢复组与健康对照组相比携带率差异无统计学意义; HLA-DRB1\*0201、0301、0701 和 1301 等位基因在肝炎组与携带组中差异无统计学意义; HLA-DRB1\*0201、0301 和 0701 在肝炎组携带率较高, HLA-DRB1\*1301 在感染后恢复组携带率较高。**结论** HLA-DRB1\*0701、0301、0201 与 HBV 慢性感染有关, HLA-DRB1\*1301 与 HBV 的清除有关。

**【关键词】** HBV 感染; 肝炎, 乙型, 慢性; 配偶和孩子; HLA-DRB1; 等位基因

**The correlation between HLA-DRB polymorphism and HBV infection** XING Wenbin, GUO Xiaonan, XU Huining. The Department of Infectious Diseases, The Sixth People's Hospital of Dalian, Dalian 116031, China  
Corresponding author: XING Wenbin, Email: xingwb123@126.com

**【Abstract】Objective** To analyze the HBV infection status and their HLA-DRB polymorphism among male patients with chronic hepatitis B, meanwhile their spouses and children were collected, to identify the correlation between HLA-DRB and HBV. **Methods** The serum markers of hepatitis B were tested by ELISA, different HLA-DRB1 allelic fragments in the patients with HBV and their spouses and children were amplified by amplification, and the gene fragments were separated by agar gel electrophoresis, UV transmittance reflectance analyzer determine the type of HLA-DRB1. **Results** The patients with chronic hepatitis B and HBV carriers carrying HLA-DRB1\*0201, 0301 genes were significantly higher than those of healthy control group. The frequency of HLA-DRB1\*1301 allele in healthy control group were higher than those in HBV patients and carriers. There was no significant difference between the recovery group and healthy control group with HLA-DRB1\*0201, 0301, 0701 and 1301 alleles. The frequency of HLA-DRB1\*0201, 0301, 0701 and 1301 alleles between the patients with chronic hepatitis B and HBV carriers were no significant difference. The frequency of HLA-DRB1\*0201, 0301 and 0701 alleles in the hepatitis group was higher, and HLA-DRB1\*1301 allele in recovery group was higher. **Conclusions** HLA-DRB1\*0701, 0301 and 0201 alleles were related to HBV chronic infection, and HLA-DRB1\*1301 allele was related to the clearance of HBV.

**【Key words】** HBV infection; Chronic hepatitis B; Spouses and children; HLA-DRB1; Allele

乙型肝炎是全世界的公共卫生问题, 不同人种 HBV 感染率和发病率不同。HBV 感染的不同疾病过程与机体对病毒的免疫反应强度有关, 而后者主要与人类主要组织相容性复合体 (major histocompatibility, MHC) 有关。MHC 指导人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 的合成, 其中 HLA-DRB 多态性最为复杂。本研究通过检测

慢性 HBV 感染者及易感人群的 HLA-DRB 多态性, 以揭示 HLA-DRB 多态性与 HBV 感染的相关性。

## 资料与方法

## 一、研究对象

本研究为前瞻性研究, 随机选取男性慢性乙型肝炎患者 80 例, 诊断标准参照 2005 年西安修订的《病毒性肝炎防治方案》。分别留取患者及配偶、

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.01.017

基金项目: 大连市卫生局科研基金项目 (No. 2012-021)

作者单位: 600031 大连市, 大连市第六人民医院肝病科

通讯作者: 邢文斌, Email: xingwb123@126.com

子女的抗凝血和血清各 2 ml。留取标本在  $-80^{\circ}\text{C}$  冷冻保存, 备检。所有患者均知情同意, 并经本院医学伦理学委员会批准。

## 二、研究方法

1. 采用 ELISA 方法筛查 HBV 血清标志物。依据筛查结果分 4 组, 即慢性乙型肝炎组、慢性 HBV 携带组、感染后恢复组和未被感染组。

2. PCR/SSP 技术测定 HLA-DRB1 基因的多态性: (1) 基因组 DNA 的提取: 从外周静脉血中提取淋巴细胞, 用标准酚氯仿法提取基因组 DNA, 溶于  $40\sim 60\ \mu\text{l}$  的 TE 缓冲液中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。用紫外分光光度计测试纯度及浓度,  $A_{260\text{nm}}$  为  $1.6\sim 1.8$ 。

(2) 采用 PCR/SSP 法扩增目的基因: 根据第 11 届国际 HLA Work-shop 会议确定的 HLA-DRB1 基因核苷酸序列, 按照引物设计基本原理, 设计相应的特异性引物序列进行扩增, 5 对引物序列详见表 1, 分别扩增 HLA-DRB1\*0201、0301/0302、0701、1301/1302 等位基因片段。

(3) 电泳取 PCR 产物  $10\ \mu\text{l}$  在含溴已锭的 1.5% 琼脂凝胶上进行电泳 (电泳仪为 DYY-III 2 稳压电流电泳仪), 电压为  $40\sim 70$  伏特, 电泳时间为 30 min, 在紫外透射反射分析仪 ZF-4 上直接判断和确定 HLA-DRB1 型别。

## 三、统计学处理

每一等位基因出现的频率用直接计数法计算,

两组间数据的检验采用四表格法  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切检验法, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。相对危险性 (RR) 采用 Woolf 公式计算。RR = 1, 表明与疾病无联系; RR < 1, 表明与疾病存在负联系; RR > 1, 表明与疾病存在正联系, RR 值越大, 风险性越大, 与疾病的关联越大。

## 结 果

### 一、HBV 病毒血清标志物筛查及分组

慢性乙型肝炎男性患者 80 例中, 配偶为 HBV 携带者 4 例, 感染后恢复者 44 例, 未感染者 32 例; 子女中为 HBV 携带者 27 例, 感染后恢复者 0 例, 未感染者 53 例; 依据筛查结果分 4 组, 其中慢性乙型肝炎组 80 例, 慢性 HBV 携带组 31 例, 感染后恢复组 44 例, 未被感染组 85 例, 另选取对照组 20 例;

### 二、HLA-DRB1 基因的多态性

1. 各组 HLA-DRB1\*0201、0301、0701、1301 等位基因的检测与正常对照组的比较: 慢性乙型肝炎患者及 HBV 携带者携带 HLA-DRB1\*0201、0301 基因显著高于健康对照组 ( $P < 0.05$ ), 感染 HBV 的风险系数较大 (RR 均 > 6), 提示 HLA-DRB1\*0201、0301 与 HBV 感染有关, 而 HLA-DRB1\*1301 在健康对照组的携带率显著高于

表 1 HLA-DRB1\*0201、0701、0301 和 1301 基因 PCR 扩增引物序列

引物	引物序列 (5'→3')	引物序列 (3'→5')
0201	ACGGAATGTGAAGGCCAG	GAGCCACTCCACGCACCG
0301	ACGTTT CTT GGA GTA CTC TAC	CCGCTGCACTGTGAAGCTCT
0701	CCTGTGGCAGGGTAAGTATA	CCCGTAGTTGTGTCTGCACAC
1301	GCGAATTCTACTTCCATAACCAGGAGGA	GCGAATTCCTCCGCTCGTCTCCAG

表 2 肝炎组 HLA-DRB1 等位基因与正常对照组的比较

组别	例数	HLA-DRB1 等位基因			
		0201	0301	0701	1301
肝炎组	80	49	54	43	18
No		61.25	67.50	53.75	22.50
AF					
对照组	20	4	3	7	14
No		20	15	35	70
AF					
$\chi^2$		7.81	17.99	2.25	16.59
$P_c$		< 0.05	< 0.05	> 0.05	< 0.05
RR		6.32	11.77	2.16	0.12

表 3 病毒携带组 HLA-DRB1 等位基因与正常对照组的比较

组别	例数	HLA-DRB1 等位基因			
		0201	0301	0701	1301
携带组	31	20	19	17	8
No		64.52	61.29	54.84	25.80
AF					
对照组	20	4	3	7	14
No		20	15	35	70
AF					
$\chi^2$		18.96	21.81	3.77	18.97
$P_c$		< 0.05	< 0.05	> 0.05	< 0.05
RR		7.27	8.97	2.26	0.15

表4 感染后恢复组 HLA-DRB1 等位基因与正常对照组的比较

组别	例数	HLA-DRB1 等位基因			
		0201	0301	0701	1301
恢复组	44				
No		10	7	14	33
AF		22.72	15.90	31.82	75
对照组	20				
No		4	3	7	14
AF		20	15	35	70
$\chi^2$		0.09	0.01	0.10	0.28
$P_c$		> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
RR		1.18	1.07	0.87	1.29

表5 组间 HLA-DRB1 等位基因的比较

HLA-DRB1 等位基因	肝炎组与携带组比较		肝炎组与感染后恢复组比较		携带组与感染后恢复组比较	
	$\chi^2$	$P$	$\chi^2$	$P$	$\chi^2$	$P$
0201	0.09	> 0.05	13.62	< 0.05	2.12	> 0.05
0301	0.34	> 0.05	24.38	< 0.05	22.05	< 0.05
0701	0.09	> 0.05	4.43	< 0.05	5.29	< 0.05
1301	0.12	> 0.05	25.42	< 0.05	23.68	< 0.05

慢性乙型肝炎患者及病毒携带者 ( $P < 0.05$ )，感染 HBV 的风险系数较小 ( $RR = 0.12$ ) 提示 HLA-DRB1\*1301 可能为一种保护性基因；HLA-DRB1\*0201、0301、0701 和 1301 在感染后恢复组与健康对照组相比携带率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，提示健康人群的具有清除 HBV 的能力，详见表 2~4。

2. HLA-DRB1 等位基因在肝炎组、病毒携带组和感染后恢复组间的比较：HLA-DRB1\*0201、0301、0701 和 1301 等位基因在肝炎组与携带组中差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，提示慢性乙型肝炎患者与 HBV 携带者机体免疫能力相近，均不能完全清除病毒。而肝炎组与感染后恢复组差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，HLA-DRB1\*0201、0301 和 0701 在肝炎组携带率较高而 HLA-DRB1\*1301 在感染后恢复组携带率较高，提示 HLA-DRB1\*0701、0301、0201 与 HBV 慢性感染有关；HLA-DRB1\*1301 与 HBV 的清除有关；携带组与感染后恢复组相比除 HLA-DRB1\*0201 差异无统计学意义外，其余均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，进一步证实 HLA-DRB1\*0701、0301 与 HBV 慢性感染有关；HLA-DRB1\*1301 与 HBV 的清除有关，详见表 5。

## 讨 论

本研究对 80 例男性慢性乙型肝炎患者的配偶及子女进行 HBV 血清标志物检测，结果发现 40% 的配偶未感染过 HBV，肝炎血清标志物为阴性；60% 配偶感染 HBV，其中 55% 均为急性自限性肝

炎，表现为 HBV 血清标志物抗体阳性，5% 成为慢性 HBV 感染者。入组患者子女中，66% 未感染 HBV，34% 子女感染 HBV，且均为慢性 HBV 感染者。成人感染 HBV 后通常发展成急性自限性乙型肝炎而清除病毒，仅 5% 的感染者发展成慢性肝炎；而新生儿感染 HBV 后很少能够通过机体的免疫反应清除病毒，绝大部分感染者将发展成慢性感染。

不同个体对 HBV 抗原物质免疫应答水平与  $CD4^+$ T 细胞对 HBV 核蛋白的免疫应答有关，HLA-II 递呈病毒肽段给  $CD4^+$ T 细胞的能力影响个体的免疫应答。为此，对 HLA-II DRB1 的基因型进行研究，HLA-DRB1\*1301 与清除病毒感染有关，与文献报道一致<sup>[1-3]</sup>。携带 HLA-DR1301 人群接种乙肝疫苗后抗体的出现率较高<sup>[4]</sup>。有研究发现，在丙型肝炎病毒感染的儿童中，携带 HLA-DR1301 者转氨酶升高的水平较高<sup>[5]</sup>；有研究甚至认为其与慢性重型乙型肝炎的发生有关<sup>[6]</sup>。有研究认为 HLA-DR\*1301 者清除 HBV 与较强的  $CD4^+$ T 细胞应答有关<sup>[7]</sup>，进一步研究发现，HLA-DR13 分子连接 HBx 126-134，这个肽段与核心启动子区重叠，又是分泌  $INF-\gamma$  的 T 细胞的免疫控制的  $CD4^+$ T 细胞表位，因而能启动更强烈 HBV 核心特异性的  $CD4^+$ T 细胞<sup>[8]</sup>，从而清除 HBV 病毒。

HLA-DRB1\*0301 与慢性 HBV 感染有关，这与文献报道一致<sup>[3, 9-10]</sup>。有研究发现，DRB1\*0301 还与乙肝疫苗接种的无应答有关，除了  $CD4^+$ T 细胞与 HBV 核心蛋白的亲合性比表面抗原高外，也与 HLA-DRB1\*0301 缺乏 HBV 表面抗原的配体有关<sup>[11]</sup>。HLA-DRB1\*0701 与 HBV 慢性感染有关。这与文献报道一致<sup>[12-13]</sup>。有研究发现，DRB1\*0701



与乙肝疫苗接种的无应答有关<sup>[12, 14]</sup>, 也有研究证实其在慢性肝炎组的携带率显著增高, 且与干扰素抗病毒治疗的无应答有关<sup>[15]</sup>。由此推测, HLA-DRB1\*0301、0701 与慢性 HBV 感染有关的原因可能与 HBV 肽段和 HLA-DRB1\*0301、0701 结合力弱有关, 不能将病毒抗原肽段递呈给特异性 T 细胞, 影响了机体对 HBV 的免疫应答, 导致 HBV 感染的慢性化。本研究还发现 HLA-DRB1\*0201 也与 HBV 的慢性感染有关。有研究提示 HLA-DRB1\*0201 与乙肝疫苗的正常应答有关<sup>[14]</sup>。目前有关 HLA-DRB1\*0201 的研究报道较少, 其导致 HBV 感染慢性化的原因有待于进一步研究。

HLA-DRB1\*1301 与 HBV 的清除有关, HLA-DRB1\*0701、0301、0201 与 HBV 慢性感染有关。HLA 基因型是影响 HBV 感染慢性化的主要因素之一。

### 参考文献

- 1 钱毅, 梁雪梅, 邹东, 等. 乙肝疫苗无, 弱应答与HLA-DR2, 7, 9 相关性的研究[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(6): 463-465.
- 2 Akcam Z, Sunbul M, Durupinar B, et al. Tissue types as prognostic risk factor in hepatitis B virus infection[J]. Indian J Gastroenterol, 2002, (4): 139-141.
- 3 Han Y, Jiang ZY, Jiao LX, et al. Association of human leukocyte antigen-DRB1 alleles with chronic hepatitis B virus infection in the Han Chinese of Northeast China[J]. Mol Med Report, 2012, 5(5): 1347-1351.
- 4 Mert G, Sengul A, Gul HC, et al. The role of human leukocyte antigen tissue groups in hepatitis B virus vaccination in Turkey[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2013, 12(1): 25-28.
- 5 Yosry A, Fouad R, Mahmoud S, et al. The association of HLA class II DR B1 alleles with HCV infection in Egyptian children[J]. Arab J Gastroenterol, 2011, 12(1): 25-28.
- 6 梁红霞, 江河清, 余祖江, 等. 慢性重型乙型肝炎与 HLA-DRB1\*1301, 1302 等位基因的相关性研究[J]. 临床医学, 2004, 24(2): 1-3.
- 7 Diepolder HM, Jung MC, Keller E, et al. A vigorous virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell response may contribute to the association of HLA-DR13 with viral clearance in hepatitis B[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 113(2): 244-251.
- 8 Malmassari SL, Deng Q, Fontaine H, et al. Impact of hepatitis B virus basic core promoter mutations on T cell response to an immunodominant HBx-derived epitope[J]. Hepatology, 2007, 45(5): 1199-1209.
- 9 蒋业贵, 王宇明. 乙型肝炎患者人类白细胞抗原DRB1, DQA1, DQB1等位基因多态性分析[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(4): 337-340.
- 10 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]. J Virol, 2003, 77(22): 12083-12087.
- 11 Godkin A, Davenport M, Hill AV. Molecular analysis of HLA class II associations with hepatitis B virus clearance and vaccine nonresponsiveness[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1383-1390.
- 12 Yang G, Liu J, Han S, et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DRB1 genotyping in Shaanxi Han patients in northwestern China[J]. Tissue Antigens, 2007, 69(2): 170-175.
- 13 卢亮平, 刘英, 李兴旺, 等. 中国北方汉族人群白细胞抗原DRB1及DQA1区基因多态性与乙型肝炎病毒感染结局的关系[J]. 中国医学科学院学报, 2006, 28(2): 134-142.
- 14 Qian Y, Zhang L, Liang XM, et al. Molecular analysis of HLA class II associations with hepatitis B virus clearance and vaccine nonresponsiveness[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1383-1390.
- 15 Chu RH, Ma LX, Wang G, et al. Influence of HLA-DRB1 alleles and HBV genotypes on interferon-alpha therapy for chronic hepatitis B[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(30): 4753-4757.

(收稿日期: 2014-05-11)

(本文编辑: 孙荣华)

邢文斌, 郭晓楠, 徐慧宁. HLA-DRB多态性与HBV感染的相关性研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(1): 65-68.