

HLA - II 类基因与慢性乙型肝炎重型化的相关性

蒋业贵, 王宇明

蒋业贵, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

蒋业贵, 男, 1966-12-20 生, 安徽巢湖市人, 汉族, 2002 年获第三军医大学内科学博士学位, 主治医师, 讲师. 主要从事肝炎、肝硬化和消化系统肿瘤的研究, 发表论文 30 篇.

项目负责人: 蒋业贵, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. jiangyegui@yahoo.com.cn

电话: 023-68754141

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-05

Association between HLA class II genes and severity of chronic hepatitis B

Ye-Gui Jiang, Yu-Ming Wang

Ye-Gui Jiang, Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Ye-Gui Jiang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. jiangyegui@yahoo.com.cn

Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-05

Abstract

AIM: To investigate the association between the polymorphism of HLA -DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles and severity of chronic hepatitis B.

METHODS: HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles in 54 patients with chronic hepatitis B and 32 patients with chronic severe hepatitis B were analyzed by using polymerase chain reaction/sequence specific primer (PCR/SSP) technique.

RESULTS: The frequency of HLA-DRB1*1 001 allele in the chronic severe hepatitis B group was markedly higher than that in the chronic hepatitis B group (14.1% vs 1.9%, $\chi^2=19.2997$, $Pc=0.0281$, $RR=9.78$). No significant different allele frequencies of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles were observed between the chronic severe hepatitis B group and the chronic hepatitis B group.

CONCLUSION: HLA-DRB1*1 001 is closely associated with the severity of chronic hepatitis B, and may be a valuable marker of evaluating the prognosis of patients with chronic hepatitis B.

Jiang YG, Wang YM. Association between HLA class II genes and severity of chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):622-625

摘要

目的: 探讨 HLA -DRB1、-DQA1 和 -DQB1 等位基因多态性与慢性乙型肝炎重型化之间的关系.

方法: 采用聚合酶链反应/序列特异性引物(PCR/SSP)技术对 52 例慢性乙型肝炎和 32 例慢性重症乙型肝炎的 HLA -

DRB1、-DQA1 和 -DQB1 等位基因多态性进行了分析.

结果: HLA -DRB1*1 001 在慢性重症乙型肝炎组的等位基因频率明显高于慢性乙型肝炎组(14.1% vs 1.9%, $\chi^2=19.2997$, $Pc=0.0281$, $RR=9.78$). HLA -DQA1 和 HLA -DQB1 等位基因频率在慢性重症乙型肝炎组和慢性乙型肝炎组间差异无显著性.

结论: HLA -DRB1*1 001 与慢性乙型肝炎的重型化有关, 可能是一个对判断病情和预后有价值的实验指标.

蒋业贵, 王宇明. HLA - II 类基因与慢性乙型肝炎重型化的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(3):622-625

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/622.asp>

0 引言

不同个体对乙型肝炎病毒(HBV)易感性的差异与个体的免疫特性有关, 而后者主要取决于人类主要组织相容性复合体(MHC). 人类白细胞抗原(HLA)是 MHC 的基因产物. HLA 复合体作为调节机体免疫应答的重要基因群, 与抗 HBV 免疫反应有着密切的关系, 某些特殊的 HLA 基因型可能影响着 HBV 感染的慢性化和重型化. 我们利用聚合酶链反应/序列特异性引物(polymerase chain reaction/sequence specific primer, PCR/SSP)技术通过对慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者中 HLA - II 类基因多态性的分析, 从基因水平研究免疫遗传因素在慢性乙型肝炎重型化发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 我科 2000 年住院慢性乙型肝炎 52 例, 男 43 例, 女 9 例, 平均年龄(33 ± 9 岁). 慢性重型乙型肝炎 32 例, 男 27 例, 女 5 例, 平均年龄(35 ± 9 岁). 符合 2000 年第十次全国传染病与寄生虫学术会议修订的诊断标准, 均为重庆地区无血缘关系的汉族人.

1.2 方法 基因组 DNA 提取 采用 ReadyPCR™ 全血基因组 DNA 纯化系统快速提取基因组 DNA, 试剂盒购自华美生物工程公司. PCR/SSP 技术测定 HLA -DRB1, -DQA1 和 -DQB1 等位基因多态性 按 Olerup(Tissue Antigens, 1992;39:225; 1993;43:119)方法设计针对 HLA -DRB1, HLA -DQA1 和 HLA -DQB1 第 2 外显子区域多态性的 SSP 共 39 条, 组成 40 对特异性扩增引物对, 分别鉴定 HLA -DRB1*1-10 等位基因型别、所有已知有表达的 10 种 HLA -DQA1 和 13 种 HLA -DQB1 等位基因型别. SSP

由上海生工生物工程技术公司合成. PCR 扩增产物加样至含溴化乙锭的 20 g/L 琼脂糖凝胶中, 15 V/cm 凝胶电泳 20 min, 经紫外透射下泳道中见明显 DNA 条带为阳性, 确定其基因型别. PCR 反应假阴性质控 每一 PCR 反应中, 都含有一对扩增基因和一个内对照基因(人生长激素基因)的引物, 后者引物序列为: 5' -primer: 5' -GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3', 3' -primer: 5' -TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTTC-3', 扩增产物大小为 429 bp. 每次扩增后, 人生长激素基因作为 PCR 扩增的阳性内对照, 均应有阳性条带产物, 如这一基因受抑, 可能出现假阴性结果, 同时还有利于纯合子基因型检测的准确性. 假阳性质控 根据扩增 DNA 片段碱基数判断.

统计学处理 等位基因频率的计算采用直接算法,

两组间等位基因分布的差异用四格表法进行 χ^2 检验, 对 $\chi^2 > 3.84$ 者按 Fisher 法计算确切 P 值, 并计算校正 P 值(Pc), 相对危险性(RR)按 Woolf 公式计算.

2 结果

2.1 HLA - DRB1 等位基因检测 慢性重型乙型肝炎组的 HLA - DRB1*1001 等基因频率(14.1%)明显高于慢性乙型肝炎组(1.9%), 二者相比差异显著($\chi^2=19.2997$, Pc = 0.0281, RR=9.78, 表 1). 其他等位基因频率在慢性重型乙型肝炎组和慢性乙型肝炎组间差异无显著性.

2.2 HLA - DQA1 等位基因检测 慢性乙型肝炎组和慢性重型乙型肝炎组的 HLA - DQA1 等基因频率相比差异无显著性(表 2).

表 1 慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者的 HLA - DRB1 等位基因频率

DRB1 等位基因	慢性乙型肝炎 (n=52)		慢性重型乙型肝炎 (n=32)		χ^2	Pc	RR
	阳性(n)	等位基因频率(%)	阳性(n)	等位基因频率(%)			
0101/0103	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
0301	18	17.31	9	14.06	0.3826	> 0.05	0.74
0401/0411	13	12.50	9	14.06	0.1001	> 0.05	1.17
0701/0702	8	7.69	4	6.25	0.1346	> 0.05	0.79
0801/0804	6	5.77	3	4.69	0.0969	> 0.05	0.79
0901	16	15.39	9	14.06	0.0663	> 0.05	0.88
1001	2	1.92	9	14.06	19.2997	0.0281	9.78
1101/1104	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
1201/1202	15	14.42	8	12.50	0.1474	> 0.05	0.82
1301/1302	1	0.96	0	0.00	0.6228	> 0.05	0.00
1303/1304	1	0.96	0	0.00	0.6228	> 0.05	0.00
1401, 1404	6	5.77	3	4.69	0.0969	> 0.05	0.79
1402, 1403	0	0.00	0	0.00	0.0000	> 0.05	0.00
1501/1502	11	10.58	6	9.38	0.0709	> 0.05	0.86
1601/1602	2	1.92	1	1.56	0.0299	> 0.05	0.81
Blank	3	2.89	1	1.56	0.3054	> 0.05	0.53

表 2 慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者的 HLA - DQA1 等位基因频率

DQA1 等位基因	慢性乙型肝炎 (n=52)		慢性重型乙型肝炎 (n=32)		χ^2	Pc	RR
	阳性(n)	等位基因频率(%)	阳性(n)	等位基因频率(%)			
0101	9	8.65	4	6.25	0.3500	> 0.05	0.68
0102	22	21.15	12	18.75	0.1901	> 0.05	0.82
0103	5	4.81	3	4.69	0.0013	> 0.05	0.97
0104	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
0201	3	2.88	1	1.56	0.3054	> 0.05	0.53
0301	15	14.42	8	12.50	0.1474	> 0.05	0.14
0302	0	0.00	0	0.00	0.0000	> 0.05	0.00
0401	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
0501	27	25.96	20	31.25	0.8992	> 0.05	1.54
0601	12	11.54	6	9.38	0.2203	> 0.05	0.77
Blank	9	8.65	8	12.50	0.7262	> 0.05	1.59

表3 慢性乙型肝炎和慢性重型乙型肝炎患者的HLA-DQB1等位基因频率

DQA1 等位基因	慢性乙型肝炎 (n=52)		慢性重型乙型肝炎 (n=32)		χ^2	Pc	RR
	阳性(n)	等位基因频率(%)	阳性(n)	等位基因频率(%)			
0201	10	9.62	7	10.94	0.0859	> 0.05	1.18
0301	37	35.58	20	31.25	0.6802	> 0.05	0.68
0302	6	5.77	3	4.69	0.0969	> 0.05	0.79
0303	15	14.42	9	14.06	0.0051	> 0.05	0.97
0401	5	4.81	3	4.69	0.0014	> 0.05	0.97
0402	1	0.96	1	1.56	0.1231	> 0.05	1.65
0501	3	2.88	4	6.25	1.1748	> 0.05	2.33
0502	7	6.73	3	4.69	0.3154	> 0.05	0.67
0503	2	1.92	1	1.56	0.0299	> 0.05	0.81
0601	7	6.73	3	4.69	0.3154	> 0.05	0.67
0602	4	3.85	5	7.81	1.5036	> 0.05	2.22
0603	2	1.92	1	1.56	0.0299	> 0.05	0.81
0604	2	1.92	2	3.13	0.2524	> 0.05	1.67
Blank	3	2.89	2	3.13	0.0082	> 0.05	0.65

2.3 HLA-DQB1等位基因检测 慢性乙型肝炎组和慢性重型乙型肝炎组的HLA-DQB1等基因频率相比差异无显著性(表3)。

3 讨论

不同个体在HBV感染后临床表型复杂多样,从一过性的抗原血症、自限性的急性肝炎、慢性病毒携带、进行性肝损害乃至肝硬化,形成了复杂的疾病谱。宿主在HBV感染后不同的临床发展过程,除了与病毒本身的因素有关外,更重要的是由于不同个体对HBV所发生的免疫反应的不同^[1-9],而后者主要取决于MHC。HLA是MHC的基因产物,是首次发现的与疾病有明确关系的遗传系统,为目前已知的最复杂的人类基因复合体,各基因座位均有众多的等位基因,这些基因位于人第6号染色体短臂上P21.3带处,占人体整个基因组的1/30 00^[10-27]。在HLA 128个功能基因中39.8%基因和免疫系统有关,特别是II类区域中几乎所有基因均显示免疫相关功能。HLA与疾病相关性的具体机制尚不清楚。HLA基因最显著的特征是具有明显的多态性,其多态性的差异决定个体免疫应答的不同。因此,推测HLA系统的特定等位基因是否在某些疾病的发生上起重要作用。HLA复合体作为调节机体免疫应答的重要基因群,与抗HBV免疫反应有着密切的关系,某些特殊的HLA基因型可能影响着HBV感染的慢性化和重型化^[28-32]。

严重的肝细胞损伤构成了重型肝炎发生的病理基础。目前,乙型肝炎肝细胞损伤机制的研究主要集中在HBV基因变异,包括前C区和S区变异。HBV DNA前C区1896位变异导致HBeAg前体蛋白的合成中断,造成HBeAg减少或消失,使抑制性T细胞(Ts)活性受到抑制,造成Ts对HBc/HBeAg特异性辅助性T细胞调节

作用降低,引起刺激HBc/HBeAg特异性CTL产生能力异常增强和T细胞等免疫性分泌细胞因子能力异常增强,而导致肝细胞坏死加重。但并非所有的慢性重型乙型肝炎患者的HBV DNA都发生变异,且HBV DNA发生变异是在机体免疫压力下造成的。不同个体的不同免疫特性可能是慢性乙型肝炎重型化的根本原因。我们研究发现,慢性重型乙型肝炎组的HLA-DRB1*1001的等位基因频率明显高于慢性乙型肝炎组,两者相比差异显著,说明该等位基因与慢性乙型肝炎重型化有关,可能是一个对判断病情和预后有价值的实验指标。进一步说明特异性遗传背景可增加或降低人群患慢性乙型肝炎的危险性。但这种HLA与慢性乙型肝炎连锁不平衡关联性受HLA基因的极其高度的多态性的影响,因此在加大样本的基础上还需进行慢性乙型肝炎家系的HLA基因的调查研究,从而为探讨和揭示慢性乙型肝炎重型化的发病机制提供更有价值的科学依据。

4 参考文献

- 1 Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Sakamoto M, Hirohashi S, Ohashi Y, Kakizoe T. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2000;356:802-807
- 2 Chiari R, Hames G, Stroobant V, Texier C, Maille B, Boon T, Coulie PG. Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res* 2000;60:4855-4863
- 3 Zhang SL, Liu M, Zhu J, Chai NL. Predominant Th₂ immune response and chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:513-515
- 4 Chen WN, Oon CJ. Mutation "hot spot" in HLA class I-restricted T cell epitope on hepatitis B surface antigen in chronic carriers and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:757-761
- 5 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from pa-

- tients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 6 Yan JC, Chen WB, Ma Y, Shun XH. Expression of vascular endothelial growth factor in liver tissues of hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:837-840
- 7 Jiang YG, Li QF, Mao Q, Wang YM. Primary human fetal hepatocytes with HBV infection *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:403-405
- 8 Cao T, Meuleman P, Desombere I, Sallberg M, Leroux-Roels G. In vivo inhibition of anti-hepatitis B virus core antigen (HBcAg) immunoglobulin G production by HBcAg-specific CD4(+) Th1-type T-cell clones in a hu-PBL-NOD/SCID mouse model. *J Virol* 2001;75:11449-11456
- 9 Du YP, Deng CS, Lu DY, Huang MF, Guo SF, Hou W. The relation between HLA-DQA1 genes and genetic susceptibility to duodenal ulcer in Wuhan Hans. *World J Gastroenterol* 2000; 6:107-110
- 10 Ding HL, Cheng H, Fu ZZ, Deng QL, Yan T. The relationship of Imp2 and DR3 genes with susceptibility to type I diabetes mellitus in south China Han population. *World J Gastroenterol* 2000;6:111-114
- 11 Lin J, Deng CS, Sun J, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. Study on the genetic susceptibility of HLA-DQB1 alleles in esophageal cancer of Hubei Chinese Hans. *Shijie huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:965-968
- 12 Pu J, Yang XS, Zhang YL, Pan LJ, Zhou DY. Expression of HLA-DR in epithelie around lymphofollicle of human gastrointestinal mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:706-707
- 13 Zhai SH, Liu JB, Zhu P, Wang YH. CD54, CD80, CD86 and HLA-ABC expressions in liver cirrhosis and hepato carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:292-295
- 14 Qu S, Li QF, Deng YZ, Zhang JM, Zhang J. Cloning and expression of HLA B27 gene. *World J Gastroenterol* 1999;5:345-348
- 15 Barrett S, Ryan E, Crowe J. Association of the HLA-DRB1*01 allele with spontaneous viral clearance in an Irish Cohort infected with hepatitis C virus via contaminated anti-D immunoglobulin. *J Hepatol* 1999;30:979-983
- 16 Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, Margaglione M, Villani MR, Stella F, Modola G, Agostiano V, Gaudiano C, Andriulli A. HLA class II favors clearance of HCV infection and progrssion of the chronic liver damage. *J Hepatol* 1999; 30:984-989
- 17 Chang KM, Gruener NH, Southwood S, Sidney J, Pape GR, Chisari FV, Sette A. Identification of HLA-A3 and -B7-restricted CTL response to hepatitis C virus in patients with acute and chronic hepatitis C. *J Immunol* 1999;162:1156-1164
- 18 De Maria A, Moretta L. HLA-class I-specific inhibitory receptors in HIV-1 infection. *Hum Immunol* 2000;61:74-81
- 19 Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O' Brien SJ. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 1999;283:1748-1752
- 20 Lekstrom-Himes JA, Hohman P, Warren T, Wald A, Nam J, Simonis T, Corey L, Straus SE. Association of major histocompatibility complex determinants with the development of symptomatic and asymptomatic genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Infect Dis* 1999;179:1077-1085
- 21 Lin J, Deng CS, Sun J, Zheng XG, Huang X, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. HLA-DRB1 allele polymorphisms in genetic susceptibility to esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9:412-416
- 22 Harcourt G, Hellier S, Bunce M, Satsangi J, Collier J, Chapman R, Phillips R, Klenerman P. Effect of HLA class II genotype on T helper lymphocyte responses and viral control in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2001;8:174-179
- 23 Zhou HC, Xu DZ, Wang XP, Zhang JX, Huang Y, Yan YP, Zhu Y, Jin BQ. Identification of the epitopes on HCV core protein recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:583-586
- 24 Ma X, Qiu DK. Relationship between autoimmune hepatitis and HLA-DR4 and DRbeta allelic sequences in the third hypervariable region in Chinese. *World J Gastroenterol* 2001;7:718-721
- 25 Godkin A, Jeanguet N, Thursz M, Openshaw P, Thomas H. Characterization of novel HLA-DR11-restricted HCV epitopes reveals both qualitative and quantitative differences in HCV-specific CD4+ T cell responses in chronically infected and non-viremic patients. *Eur J Immunol* 2001;31:1438-1446
- 26 Bosi I, Ancora G, Mantovani W, Miniero R, Verucchi G, Attard L, Venturi V, Papa I, Sandri F, Dallacasa P, Salvioli GP. HLA DR13 and HCV vertical infection. *Pediatr Res* 2002;51:746-749
- 27 Hue S, Cacoub P, Renou C, Halfon P, Thibault V, Charlotte F, Picon M, Rifflet H, Piette JC, Pol S, Caillat-Zucman S. Human leukocyte antigen class II alleles may contribute to the severity of hepatitis C virus-related liver disease. *J Infect Dis* 2002; 186:106-109
- 28 Thio CL, Carrington M, Marti D, O' Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE, Astemborski J, Thomas DL. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. *J Infect Dis* 1999;179:1004-1006
- 29 Sobao Y, Sugi K, Tomiyama H, Saito S, Fujiyama S, Morimoto M, Hasuie S, Tsubouchi H, Tanaka K, Takiguch M. Identification of hepatitis B virus-specific CTL epitopes presented by HLA-A*2402, the most common HLA class I allele in East Asia. *J Hepatol* 2001;34:922-929
- 30 Thimme R, Chang KM, Pemberton J, Sette A, Chisari FV. Degenerate immunogenicity of an HLA-A2-restricted hepatitis B virus nucleocapsid cytotoxic T-lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51. *J Virol* 2001;75:3984-3987
- 31 Pellegris G, Ravagnani F, Notti P, Fissi S, Lombardo C. B and C hepatitis viruses, HLA-DQ1 and -DR3 alleles and autoimmunity in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2002;36:521-526
- 32 Desombere I, Gijbels Y, Verwulgen A, Leroux-Roels G. Characterization of the T cell recognition of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by good and poor responders to hepatitis B vaccines. *Clin Exp Immunol* 2000;122:390-399