

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.025.html

HLA-DQA1 基因拷贝数变异 与乙型肝炎病毒感染后不同转归的易感性

李卫¹, 郝玉峰², 饶建国³, 李旭²

摘要 目的 探讨人类白细胞抗原(HLA)DQA1 基因拷贝数变异(CNV)与中国汉族人群乙型肝炎病毒(HBV)感染后不同转归和疾病进展的关系。方法 采用 AccuCopy CNV 检测技术检测 825 例慢性 HBV 感染患者和 287 例急性自限性 HBV 感染者的 HLA-DQA1 基因 CNV, 采用 χ^2 检验等分析 HLA-DQA1 CNV 与 HBV 感染后慢性化和疾病进展的发病风险。结果 在 HBV 感染后急慢性转归方面, 急性自限性 HBV 感染组 HLA-DQA1 拷贝数 > 2 的比例显著高于慢性 HBV 感染组 (15.3% vs 6.9%, $\chi^2 = 25.22$, $P < 0.001$)。在慢

性 HBV 感染后疾病进展方面, 随疾病进展, HLA-DQA1 基因拷贝数 < 2 的比例在慢性乙型肝炎(CHB)组、肝硬化(LC)组和肝癌(HCC)组 3 组间逐渐增加, 分别为 10.1%、15.3% 和 27.9%, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 25.66$, $P < 0.001$)。根据 E 抗原分组分析显示, E 抗原阳性患者组和 E 抗原阴性患者组 HLA-DQA1 CNV 的比例无显著性差异。结论 HLA-DQA1 基因 CNV 是 HBV 感染慢性化的遗传易感因素, HLA-DQA1 基因拷贝数减少可能是 HBV 感染慢性化和疾病进展的危险因素。

关键词 乙型肝炎病毒; 人类白细胞相关抗原 DQA1; 拷贝数变异; 基因易感性

中图分类号 R 512.6+2; R 394.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-1053-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.025

2017-02-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81273142)

作者单位: ¹安徽医科大学阜阳传染病临床学院(阜阳市第二人民医院)肝病科, 阜阳 236000

²安徽医科大学第二附属医院肝病科, 合肥 230601

³六安市人民医院感染病科, 六安 237000

作者简介: 李卫, 男, 本科, 副主任医师;

李旭, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: aaylixu@qq.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染后的转归与病毒、宿主免疫和宿主遗传因素密切相关。病毒本身的毒力并不能完全阐释其机制, 除病毒因

Relationship between bleeding degree and PMP, vWF and FN in patients with hematological diseases and its clinical significance

Dai Jifei¹, Zhu Lixin², Cai Xuelin², et al

(¹Dept of Haematology, ²Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To measure the relationship between the degree of bleeding and platelet microparticles (PMP), von Willebrand factor (vWF), fibronectin (FN) in hematologic patients with low platelet count, analyze the clinical significance of PMP, vWF, FN and predict the degree of bleeding. **Methods** According to WHO grading standards of the degree of bleeding, the patients were divided into 0 group, 1 group, 2 group, 3 group, 4 group and health group. Flow cytometry was used to detect PMP in the peripheral blood in the patients. The enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the vWF and FN in the peripheral blood in the patients. **Results** ① The level of PMP, vWF and FN had significance difference in each group ($P < 0.001$). ② In the different degree of bleeding, severity bleeding with much lower PMP [1 group and 2 group; 3 group, 4 group and the control group had no significance difference, others had significance difference ($P < 0.001$)], much high vWF [each group had significance difference ($P < 0.001$), except 1 group and 2 group], much higher FN [each group had significance difference ($P < 0.001$), except 0 group and 1 group]. **Conclusion** The level of PMP, vWF, FN is helpful to predict the degree of bleeding in hematologic patients with low platelet count.

Key words the degree of bleeding; platelet microparticles; von Willebrand factor; fibronectin

素外,个体间免疫功能的差异和宿主基因易感性可能发挥着重要作用^[1-2]。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)基因系统的多态性对HBV的易感性具有关键性的影响,与HBV感染的清除与否、HBV感染慢性化后的疾病转归、抗病毒治疗疗效、肝癌的发生等均有着密切相关性^[3-5]。

拷贝数变异(copy number variation, CNV)包括基因组节段的缺失、重复及复杂重排等,与疾病发生发展密切相关。CNV可以直接影响或间接调控基因表达量的改变,从而增加疾病发生的风险^[6]。已有研究^[7-8]显示,HBV感染的慢性化与程序化死亡受体1和趋化性细胞因子配体蛋白等基因的CNV密切相关。但尚未见HLA-DQA1 CNV与HBV感染后转归和疾病进展的相关报道。因此,该研究采用病例对照研究的方法,探索HLA-DQA1基因CNV与HBV感染易感性的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2012年~2015年在安徽医科大学第一附属医院、安徽医科大学第二附属医院、阜阳市第二人民医院、六安市人民医院4家医院住院及门诊确诊的不同疾病阶段的慢性HBV感染患者825例,其中男663例,女162例,年龄11~85(42.13±15.27)岁;同时选取上述医院就诊的急性自限性HBV感染患者287例,其中男224例,女63例,年龄18~88(44.11±15.88)岁。所有入组患者为汉族人群,本研究已经通过安徽医科大学伦理委员会批准,研究中流行病学资料收集及血液标本的采集均经研究对象知情同意。急性和慢性HBV感染患者的诊断均符合2000年中国病毒性肝炎防治方案的诊断标准;急性自限性HBV感染的入选标准为:未接受过乙肝疫苗注射,乙肝五项检测为HBsAb、HBeAb和HBcAb均为阳性。排除合并心、肝、肾和造血系统严重疾病者。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA提取 所有入组患者采集外周静脉血5 ml于EDTA-2K抗凝管中,采用中量全血基因组DNA提取试剂盒提取外周血DNA(天津原平皓生物技术有限公司),紫外分光光度计和0.8%

琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度和纯度后于-80℃超低温冰箱保存。

1.2.2 CNV的检测 使用AccuCopy检测技术在慢性HBV感染组和急性自限性HBV感染组样本中进行检测。步骤如下:取一定量的竞争DNA(I)片段混合物-每个片段与各自对应的基因片段仅有微小差别(通常为2~5个碱基长度差异),与合适量的样本DNA(S)混合,作为随后多重荧光竞争性PCR扩增的模板;多重PCR产物经毛细管电泳后对不同基因位点扩增产物以及同一位点的不同模板(样本DNA与竞争DNA)扩增产物根据其长度差异进行分离;分析每个基因片段的S/I值,利用参照基因S/I值对目标基因S/I值进行校正后获取目标基因的准确拷贝数目,多重PCR引物。见表1。

1.3 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行分析。采用χ²检验分析HLA-DQA1 CNV与HBV感染后转归与疾病进展的相关性,以比值比(odds ratio, OR)及其95%可信区间(CI)表示相对风险度。

2 结果

2.1 HLA-DQA1 CNV与急慢性HBV感染转归的易感性 利用AccuCopy检测技术对慢性HBV感染患者及急性自限性HBV感染的拷贝数检测显示,HLA-DQA1存在拷贝数目为0、1、2和3四种变异形式。将拷贝数分为<2、=2、>2后在慢性HBV感染组与急性自限性HBV感染组进行比较显示,慢性HBV感染组HLA-DQA1基因拷贝数<2、=2、>2的比例分别为14.4%、78.7%和6.9%,而急性自限性HBV感染组为7.3%、77.4%和15.3%,两组间差异有统计学意义(P<0.001),提示HLA-DQA1基因拷贝数目减少是增加HBV感染慢性化的风险因素,和拷贝数>2比较,拷贝数=2的HBV感染患者慢性化的风险增加,OR(95% CI)为0.443(0.291~0.676),拷贝数<2的HBV感染患者慢性化的风险增加更显著,OR(95% CI)为0.229(0.124~0.42),见表2。

2.2 HLA-DQA1 CNV与慢性HBV感染后疾病进展的易感性 将825例慢性HBV感染患者按照疾病进展状态的不同分为慢性乙型肝炎(chronic

表1 CNV检测的多重PCR引物

探针	染色体	定位	扩增长度(bp)	引物结合区1	引物结合区2
HLA-DQA1-1	Chr6	32605503-32605683	208(+0,-2)	ATGCTGTGTTGTTCTACTAAGGACGCTA	CATTCTCAAATTTCCCTGAACAACCTTT
HLA-DQA1-2	Chr6	32608822-32609095	301(+0,-2)	TGCCAGGCACTCAGGAAATAGT	TCTTCACTCATCAGCTGACCAGC

hepatitis B , CHB) 组 435 例 ,肝硬化 (liver cirrhosis , LC) 组 268 例和肝癌 (hepatocellular carcinoma , HCC) 组 122 例 ,分析比较 HLA-DQA1 基因 CNV 在 HBV 慢性感染后疾病进展中的相关性 ,结果显示 ,CHB 组 HLA-DQA1 基因拷贝数 <2、=2、>2 的比例分别为 10.1%、83.4% 和 6.4% ,LC 组分别为 15.3%、77.2% 和 7.5% ,HCC 组分别为 27.9%、64.8% 和 7.4% ,HLA-DQA1 基因拷贝数 <2 的比例随病情加重逐渐增加 ,=2 的比例则逐渐减少 ,3 组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$) ,提示 HLA-DQA1 基因拷贝数目减少也增加了 HBV 感染后疾病进展的风险。见表 3。

表 2 HLA-DQA1 基因拷贝数变异与 HBV 感染后急性转归的关系 [n(%)]

组别	拷贝数<2	拷贝数=2	拷贝数>2	χ^2 值	P 值
慢性 HBV 感染	119(14.4)	649(78.7)	57(6.9)	25.22	<0.001
急性 HBV 感染	21(7.3)	222(77.4)	44(15.3)		

表 3 HLA-DQA1 基因 CNV 与慢性 HBV 感染后疾病进展的关系 [n(%)]

组别	拷贝数<2	拷贝数=2	拷贝数>2	χ^2 值	P 值
CHB	44(10.1)	363(83.5)	28(6.4)	25.66	<0.001
LC	41(15.3)	207(77.2)	20(7.5)		
HCC	34(27.9)	79(64.7)	9(7.4)		

2.3 HLA-DQA1 CNV 与慢性 HBV 感染后 E 抗原状态的相关性 因为 E 抗原血清转换与否与机体的免疫功能密切相关 ,因此将所有 CHB 患者按照 E 抗原状态进行分为 E 抗原阳性组和 E 抗原阴性组 ,其中 E 抗原阳性患者组 443 例 ,E 抗原阴性患者组 382 例 ,比较 HLA-DQA1 CNV 在两组间的分布差异 ,结果显示 ,HLA-DQA1 CNV 的分布在两组间比较差异无统计学意义 ,见表 4。

表 4 HLA-DQA1 基因 CNV 与慢性 HBV 感染后 E 抗原血清转换的关系 [n(%)]

组别	拷贝数<2	拷贝数=2	拷贝数>2	χ^2 值	P 值
E 抗原阳性	70(15.8)	338(76.3)	35(7.9)	3.302	0.192
E 抗原阴性	49(12.8)	311(81.4)	22(5.8)		

3 讨论

HBV 感染后引起肝损害的机制主要是宿主免疫系统对病毒抗原的免疫应答所致。HLA 基因族包含大量与人类免疫功能相关的基因 ,其编码产物具有抗原提呈功能 ,参与 T 细胞激活和分化 ,调控

特异性免疫应答。HLA-II 类分子可结合外源性抗原并将其呈递给 CD4 阳性的 T 细胞。HLA-DQA1 基因具有高度的多态性 ,不同的等位基因产物具有不同的氨基酸组成和空间构象 ,可能与提呈 HBV 相关抗原的能力差异有关。临床证据^[9] 显示 ,急性自限性 HBV 感染患者呈强烈 T 细胞应答 ,而持续性慢性 HBV 感染者则相反。大量研究^[10-11] 已经证实 ,HLA 基因的多态性与清除 HBV 感染的能力及 HBV 感染后的病情进展密切相关 ,可能影响了 HBV 感染后的临床转归。

CNV 跟 SNP 一样影响着基因的表达、表型的变异 ,但单个 SNP 影响基因表达量的能力有限 ,而 CNV 可以直接影响基因的表达量 ,并造成基因功能的改变 ,从而对临床表型产生直接影响。近年来 ,免疫系统基因拷贝数变异与病毒感染易感性的研究逐渐增加 ,Pelak et al^[12] 研究显示 ,KIR 基因的拷贝数变异影响了 HIV 感染的控制。APOBEC3B 基因拷贝数变异与 HBV 感染后的转归和病情进展密切相关^[13]。CCL3L1 拷贝数变异与 HBV 感染、丙型肝炎病毒感染和艾滋病毒感染后的转归密切相关^[14]。

本研究证实 ,急性自限性 HBV 感染组患者 >2 拷贝数的比例显著高于慢性 HBV 感染组 ,提示 HLA-DQA1 的拷贝数与 HBV 感染后转归密切相关。同时对慢性 HBV 感染组按照疾病进展进行分组比较显示 ,HCC 组和 LC 组的 HLA-DQA1 拷贝数 <2 的比例显著低于 CHB 组 ,提示 HLA-DQA1 的 CNV 影响疾病的进展。因此 ,本研究推测 HLA-DQA1 基因的 CNV 可能导致 HLA-DQA1 抗原表达水平的改变 ,进而影响 HBV 感染后不同转归的发生发展。Wang et al^[15] 研究结果也表明 ,HLA-DQA1 基因 CNV 与类风湿性关节炎密切相关 ,HLA-DQA1 基因拷贝数减少和正常拷贝数降低了类风湿性关节炎的发病率 ,而 HLA-DQA1 基因拷贝数目增加则增加了类风湿性关节炎发病的危险。

对于复杂疾病的遗传易感性研究 ,以 SNP 为基础的关联分析对疾病易感位点的检出能力有限 ,即单一位点的 SNPs 等位基因无法有效地将受累个体和健康对照区分开来 ,即使单倍型分析仍不能够很好地反映基因表达水平的改变 ,存在着一定的局限性。然而 ,对于致病性 CNV 来说 ,则不存在这样的问题。因为 CNVs 引起的基因改变足以改变表型 ,所以疾病与 CNV 的基因组关联分析更容易鉴定到致病突变基因^[6]。

参考文献

- [1] Zeng Z, Guan L, An P, et al. A population-based study to investigate host genetic factors associated with hepatitis B infection and pathogenesis in the Chinese population [J]. *BMC Infect Dis*, 2008, 8:1.
- [2] Krawczyk M, Müllenbach R, Weber S N, et al. Genome-wide association studies and genetic risk assessment of liver diseases [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(12):669-81.
- [3] Mbarek H, Ochi H, Urabe Y, et al. A genome-wide association study of chronic hepatitis B identified novel risk locus in a Japanese population [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(19):3884-92.
- [4] Wong D K, Watanabe T, Tanaka Y, et al. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in Southern Chinese [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e66920.
- [5] Stelma F, Jansen L, Sinnige M J, et al. HLA-C and KIR combined genotype as new response marker for HBeAg-positive chronic hepatitis B patients treated with interferon-based combination therapy [J]. *J Viral Hepat*, 2016, 23(8):652-9.
- [6] Jakobsson M, Scholz S W, Scheet P, et al. Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations [J]. *Nature*, 2008, 451(7181):998-1003.
- [7] 杨 湛, 吴令杰, 范慧敏, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染者程序性死亡因子 1 基因拷贝数和 mRNA 的表达水平 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(9):678-82.
- [8] 郑灵燕, 裴元元, 李森新, 等. CCL3L1 基因拷贝数目变异与慢性乙肝的易感性相关 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(10):1951-5.
- [9] Wang L, Wang K, Zou Z Q. Crosstalk between innate and adaptive immunity in hepatitis B virus infection [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(30):2980-91.
- [10] 杨 志, 张永萍, 仲英娜. 新疆维吾尔族 HLA-DQA1 基因多态性与乙型肝炎病毒感染结局相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(1):41-4.
- [11] 余金玲, 姚津剑, 里 进, 等. HLA-DQA1 基因 rs9272346 位点多态性与湖北汉族人群乙型肝炎不同临床转归的关联研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(1):93-6.
- [12] Pelak K, Need A C, Fellay J, et al. Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control [J]. *PLoS Biol*, 2011, 9(11):e1001208.
- [13] Zhang T, Cai J, Chang J, et al. Evidence of associations of APO-BEC3B gene deletion with susceptibility to persistent HBV infection and hepatocellular carcinoma [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(6):1262-9.
- [14] Hollox E J, Hoh B P. Human gene copy number variation and infectious disease [J]. *Hum Genet*, 2014, 133(10):1217-33.
- [15] Wang J, Yang Y, Guo S, et al. Association between copy number variations of HLA-DQA1 and ankylosing spondylitis in the Chinese Han population [J]. *Genes Immun*, 2013, 14(8):500-3.

Association between the copy number variation of HLA-DQA1 gene and the susceptibility to the outcome of HBV infection

Li Wei¹, Gao Yufeng², Rao Jianguo³, et al

¹*Dept of Hepatopathy, The Second People's Hospital of Fuyang City, Fuyang 236000;*

²*Dept of Hepatopathy, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;*

³*Dept of Infectious Disease, Lu'an People's Hospital, Lu'an 237000)*

Abstract Objective To explore the association between the copy number variation (CNV) of HLA-DQA1 gene and the outcome of HBV infection in Chinese Han population. **Methods** The HLA-DQA1 CNV of 825 patients with chronic HBV infection and 287 patients with acute self-limiting HBV infection was detected by AccuCopy assay. The chi-square test was used to evaluate the impact of HLA-DQA1 CNV on the outcome and disease progression after HBV infection. **Results** In the outcome of HBV infection, the proportion of HLA-DQA1>2 copy number in acute self-limiting HBV infection group was significantly higher than the proportion in chronic HBV infection group, 15.3% vs 6.9% $P<0.001$. In the disease progression of chronic HBV infection, the proportion of HLA-DQA1>2 copy number in the CHB, LC and HCC groups gradually increased, 10.1%, 15.3%, 27.9%, $P<0.001$. There was no significant difference between the proportion of the HLA-DQA1 copy number in the E antigen positive patients group and E antigen negative patients. **Conclusion** The CNV of HLA-DQA1 gene is the susceptibility factor of chronic HBV infection and the decrease of HLA-DQA1 copy number is a risk factor for the chronicity of HBV infection and disease progression after chronic HBV infection.

Key words hepatitis B virus; HLA-DQA1; copy number variation; gene susceptibility