

HLA-DPA1 基因第二外显子多态性与慢性乙型肝炎风险的相关性^{*}

郭建峰,黄建成,陈宏斌

宁德市闽东医院检验科,福建福安 355000

摘要:目的 探讨人类白细胞抗原(HLA)-DPA1 基因第二外显子多态性与慢性乙型肝炎易感性的关系。**方法** 募集宁德地区汉族人群 238 例乙型肝炎病毒(HBV)自限性感染者(自限性感染组)和 306 例慢性乙型肝炎患者(慢性乙型肝炎组)作为研究对象,应用 PCR-SSP 分型技术对 HLA-DPA1 基因第二外显子进行分型测定。**结果** 自限性感染组 HLA-DPA1 * 0103 等位基因频率为 37. 61%,高于慢性乙型肝炎组的 29. 41%,通过二元 Logistic 回归分析校正性别和年龄因素后,差异有统计学意义($P=0. 001,OR=0. 63,95\%CI:0. 47\sim 0. 82$)。自限性感染组 HLA-DPA1 * 0202 等位基因频率为 50. 84%,低于慢性乙型肝炎组的 60. 29%,校正性别和年龄因素后,差异有统计学意义($P=0. 001,OR=1. 59,95\%CI:1. 22\sim 2. 08$)。自限性感染组 HLA-DPA1 * 0201、HLA-DPA1 * 0401 等位基因分别为 8. 19%、3. 36%,慢性乙型肝炎组分别为 7. 35%、2. 94%,差异无统计学意义($P>0. 05$)。**结论** HLA-DPA1 基因第二外显子多态性与慢性乙型肝炎风险存在相关性,为寻找 HBV 感染慢性化的分子机制提供了参考。

关键词:人类白细胞抗原; 乙型肝炎病毒; 慢性乙型肝炎; 多态性; 等位基因

中图法分类号:R512. 62 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2022)21-2890-04

乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球重大公共卫生问题之一,人体感染 HBV 后可引起慢性乙型肝炎、肝硬化到肝细胞癌等一系列复杂的疾病谱^[1-2]。2015 年,全球约有 88. 7 万人死于 HBV 感染相关疾病。我国一般人群 HBV 表面抗原(HBsAg)流行率为 5%~6%,以此估算我国慢性 HBV 感染者约 7 000 万例^[3]。人类白细胞抗原(HLA)复合体位于第 6 号染色体的短臂,是已知的人体最复杂的基因系统,具有高度的多态性^[4-5]。HLA 复合体主要包含 I 类、II 类和 III 类基因。其中,II 类基因包括 HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ 基因簇^[6-7]。HLA-II 类分子在抗原识别和免疫应答等一系列过程中发挥了极其重要的作用,与许多感染相关疾病或肿瘤存在重要的关系,也与抗 HBV 感染有着密切的关系^[8-9]。目前国内外学者对 HLA-DRB1 和 HLA-DQ 基因多态性与慢性 HBV 感染的研究较多^[10-11],而对 HLA-DPA1 基因多态性与慢性 HBV 感染的研究较少。本研究以宁德地区汉族人群为研究对象,探讨 HLA-DPA1 基因第二外显子多态性与慢性乙型肝炎风险的关系,以期慢性 HBV 感染的分子机制提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2017 年 1 月至 2020 年 12 月共收集到符合要求的 HBV 自限性感染者 238 例(自限性感染组)和慢性乙型肝炎患者 306 例(慢性乙型肝炎组)

作为研究对象。研究对象的临床资料见表 1。自限性感染组年龄显著高于慢性乙型肝炎组,差异有统计学意义($P<0. 05$),慢性乙型肝炎组性别比例、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平显著高于自限性感染组,差异有统计学意义($P<0. 05$)。研究对象的选取参照中华医学会 2019 年版《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准^[3],慢性乙型肝炎诊断标准如下:血清 HBsAg 阳性至少持续 6 个月且血清 ALT 持续或反复升高,或肝组织学检查有肝炎病变。HBV 自限性感染者必须为 HBsAg 阴性,HBV 表面抗体、HBV 核心抗体同时阳性,肝功能各项指标均正常。以上研究对象均排除人类免疫缺陷病毒和(或)丙型肝炎病毒感染及其他原因导致的肝脏病变者。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 DNA 标志物、核酸染色剂、无水乙醇、琼脂糖和 MgCl₂ 购自生工生物工程有限公司,PCR Mix 购自 TaKaRa 公司。DNA 提取试剂盒(吸附柱法)购自天根生物科技有限公司。

1.2.2 DNA 提取 采集静脉血 3 mL,乙二胺四乙酸抗凝,使用吸附柱法提取 DNA,过程严格按说明书操作。

1.2.3 引物设计 本实验采用 PCR-SSP 分型技术检测 HLA-DPA1 第二外显子基因型,引物序列参考

^{*} 基金项目:宁德市科技计划项目(20170013)。

文献[12],以人生长激素(HGH)为内参引物,引物由生工生物工程有限公司合成,见表 2。

1.2.4 PCR 反应体系 分型引物上、下游(10 μmol/L)各 1 μL、HGH 引物上、下游(2 μmol/L)各 1 μL、MgCl₂(25 mmol/mL)0.5 μL、DNA 模板(约 50

μg/mL)2 μL、PCR Mix 10 μL,加去离子水至 25 μL。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,62 ℃ 35 s,72 ℃ 30 s,10 个循环;95 ℃ 30 s,56 ℃ 60 s,20 个循环;72 ℃ 5 min。反应结束后取 20 μL 产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察扩增产物片段。

表 1 研究对象的一般资料

组别	男/女(<i>n</i> / <i>n</i>)	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	ALT($\bar{x}\pm s$,U/L)	AST($\bar{x}\pm s$,U/L)
自限性感染组	121/117	46.81±10.52	19.44±9.88	20.86±10.09
慢性乙型肝炎组	220/86	39.16±12.73	355.99±439.48	214.16±307.88
<i>t</i> / χ^2	25.372	7.657	−13.392	−10.975
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 HLA-DPA1 基因第二外显子等位基因扩增引物序列

等位基因		引物序列(5′−3′)	碱基长度(bp)	产物长度(bp)
0103+0301	F	GGG AGT TTA TGT TTG AAT TTG ATG AA	26	209
	R	AGA TAG GGC GTA CCG TTG GT	20	
0103+0104	F	ATG CCG CGT TTG TAC AGA CG	20	208
	R	AGA TAG GGC GTA CCG TTG GT	20	
0104	F	TCT CTA CTG TCT TTA TGC AGC GG	23	242
	R	GAT CCA CAT AGA ACA TCT CAT CG	23	
0201	F	GAC CAT GTG TCA ACT TAT GCC GC	23	108
	R	CTT TTT ATC CAG ATC CAC ATA GAA CTG	27	
0202	F	GAC CAT GTG TCA ACT TAT GCC AT	23	105
	R	CTT GTC CAG ATC CAC ATA GAA CTG	24	
0301	F	GAC CAT GTG TCA ACT TAT GCC AT	23	257
	R	AGA TAG GGC GTA CCG TTG GT	20	
0401	F	GCG TTT GTA CAG ACG CAT AGA A	22	207
	R	GTG GTT GGA ACG CTG GAT AGC	21	
HGH	F	ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C	28	439
	R	CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A	25	

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。连续性变量的组间比较使用 *t* 检验,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。性别构成比采用 χ^2 检验,计数资料以例数或百分率表示。校正性别和年龄影响因素,使用二元 Logistic 回归分析 HLA-DPA1 基因第二外显子多态性与慢性乙型肝炎风险的相关性,相对危险度以优势比(*OR*)和 95%可信区间(95%*CI*)表示。检验为双侧,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因分型 HLA-DPA1 * 0202 等位基因扩增结果 见图 1。

2.2 HLA-DPA1 基因第二外显子等位基因检测结

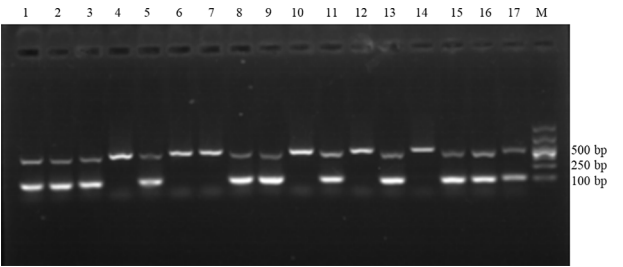
果 从表 3 可见,自限性感染组 HLA-DPA1 * 0103 等位基因频率为 37.61%,高于慢性乙型肝炎组的 29.41%,通过二元 Logistic 回归分析校正性别和年龄因素后,差异有统计学意义(*P*=0.001,*OR*=0.63,95%*CI*:0.47~0.82)。自限性感染组 HLA-DPA1 * 0202 等位基因频率为 50.84%,低于慢性乙型肝炎组的 60.29%,校正性别和年龄因素后,差异有统计学意义(*P*=0.001,*OR*=1.59,95%*CI*:1.22~2.08)。自限性感染组 HLA-DPA1 * 0201、DPA1 * 0401 等位基因分别为 8.19%、3.36%,慢性乙型肝炎组分别为 7.35%、2.94%,差异无统计学意义(*P*>0.05)。自限性感染组和慢性乙型肝炎组均未发现 HLA-DPA1 *

0301 和 HLA-DPA1 * 0104 等位基因。

表 3 自限性感染组和慢性乙型肝炎组等位基因分布[n(%)]

组别	HLA-DPA1 * 0103	HLA-DPA1 * 0201	HLA-DPA1 * 0202	HLA-DPA1 * 0401
自限性感染组	179(37.61)	39(8.19)	242(50.84)	16(3.36)
慢性乙型肝炎组	180(29.41)	45(7.35)	369(60.29)	18(2.94)
P *	0.001	0.935	0.001	0.961
OR(95%CI)	0.63(0.47~0.82)	0.97(0.59~1.63)	1.59(1.22~2.08)	0.98(0.46~2.07)

注：* 表示统计分析均校正性别和年龄因素。



注：1、2、3、5、8、9、11、13、15、16、17 为扩增出 HLA-DPA1 * 0202 等位基因；4、6、7、10、12、14 为未扩增出 HLA-DPA1 * 0202 等位基因；M：DNA 标志物。

图 1 HLA-DPA1 * 0202 等位基因扩增结果电泳图

3 讨 论

HBV 通过肝细胞膜上的钠离子—牛磺胆酸—协同转运蛋白作为受体进入肝细胞^[13]。HBV 感染慢性化及发展为肝硬化和肝细胞癌的机制至今仍不清楚。多数研究认为病毒本身及环境因素不能完全解释这些差异^[14-16]。LIN 等^[17]报道其研究人群的同卵双生子慢性 HBV 感染率较异卵双生子高。慢性 HBV 感染还具有明显的家族聚集性^[18-19]，存在血缘关系的亲属较不具有血缘关系的亲属发生慢性 HBV 感染的倾向性更高^[20]，上述数据提示，遗传因素是慢性 HBV 感染的重要影响原因。HLA-Ⅱ类分子具有稳定和促进免疫细胞相互结合增强免疫应答的启动和效应的功能。HLA 的作用是将内源性或外源性抗原以 HLA-肽复合物的形式，通过 T 细胞表面的 TCR，传递给 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞，以激活 T 细胞产生免疫应答。2009 年，KAMATANI 等^[21]学者通过全基因组关联分析首次报道了 HLA-DPA1 和 HLA-DPB1 基因 3'端非翻译区的 rs3077 和 rs9277535 多态性与慢性乙型肝炎风险存在关联，他们进一步通过连锁分析发现，rs3077A 与 HLA-DPA1 * 0103，rs3077C 与 HLA-DPA1 * 0202 存在高度连锁不平衡。在后继研究中，如 YAN 等^[22]、WANG 等^[23]研究中，除了广西壮族人群研究结果无统计学意义外，其他研究人群均与 KAMATANI 等^[21]学者的研究结果相一致。由于不同地区汉族人群遗传异质性、病毒基因型等因素的存在，我国的 HBV 基因型主要是 B 型和 C 型，其中南方以 B 型为主，北方以 C 型为主^[3]。以上原因可能

造成不同实验结果无法重复。因此，研究者认为有必要研究 HLA-DPA1 基因遗传变异与宁德地区汉族人群慢性乙型肝炎风险的关系。

本研究通过二元 Logistic 回归分析显示，HLA-DPA1 * 0103 等位基因具有抵抗 HBV 感染的能力 (OR=0.63)，HLA-DPA1 * 0202 等位基因则是慢性乙型肝炎风险的危险因子 (OR=1.59)。本研究与 OU 等^[24]学者的研究结果相似。OU 等^[24]还发现携带 rs3077 AA+GA 基因型的 HBV 感染者其总 HLA-DPA1 mRNA 表达水平显著低于健康人群，同时 HBV 感染者 HLA-DPA1 * 0103 mRNA 的表达水平也显著低于健康人群。O'BRIEN 等^[25]学者发现 rs3077G 等位基因能降低 HLA-DPA1 mRNA 的表达。以上研究结果提示，较低的 HLA-DPA1 mRNA 表达可能影响抗原肽的提呈进而降低宿主对 HBV 感染的免疫反应，导致 HBV 感染慢性化。

本研究还显示自限性感染组和慢性乙型肝炎组 HLA-DPA1 * DPA1 * 0103 等位基因频率分别为 37.61%和 29.41%，与 KAMATANI 等^[21]报道的日本健康人群和慢性乙型肝炎人群的结果 (38.3%和 26.8%)较为接近；本研究自限性感染组和慢性乙型肝炎组 HLA-DPA1 * DPA1 * 0202 等位基因频率分别为 50.84%、60.29%，均高于 KAMATANI 等^[21]报道的日本健康人群和慢性乙型肝炎人群的结果 (42.7%和 53.1%)。本研究和 KAMATANI 等^[21]研究均未发现 HLA-DPA1 * DPA1 * 0301 和 HLA-DPA1 * DPA1 * 0104 等位基因。

综上所述，本研究结果显示 HLA-DPA1 基因第二外显子多态性与慢性乙型肝炎风险存在相关性，为寻找 HBV 感染慢性化的分子机制提供了参考。

参考文献

[1] WANG W C,LIN Y S,CHANG Y F,et al. Association of HLA-DPA1, HLA-DPB1, and HLA-DQB1 alleles with the long-term and booster immune responses of young adults vaccinated against the hepatitis B virus as neonates [J]. Front Immunol,2021,12(1):710414.
[2] 杨旭洁,卢永杰,陈捷,等. 乙型肝炎病毒感染者疾病进展

- 程度与宿主 CYP3A5 和 MDR1 基因多态性研究[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(1): 1-3.
- [3] 中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版) [J]. 中华临床感染病杂志, 2019, 12(6): 401-428.
- [4] ANDREANI M, GASPARI S, LOCATELLI F. Human leucocyte antigen diversity: A biological gift to escape infections, no longer a barrier for haploidentical hemopoietic stem cell transplantation[J]. *Int J Immunogenet*, 2020, 47(1): 34-40.
- [5] KONDYLI M, TREMBLAY D, REZGUI A, et al. Human leucocyte antigen alleles associated with asparaginase hypersensitivity in childhood acute lymphoblastic leukemia patients treated with pegylated asparaginase within dana farber cancer institute treatment protocols [J]. *Leuk Res*, 2021, 109(1): 106650.
- [6] ASHTON J J, LATHAM K, BEATTIE R M, et al. Review article: the genetics of the human leucocyte antigen region in inflammatory bowel disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019, 50(8): 885-900.
- [7] DERSH D, PHELAN J D, GUMINA M, et al. Genome-wide screens identify lineage- and tumor-specific genes modulating MHC-I and MHC-II-restricted immunosurveillance of human lymphomas[J]. *Immunity*, 2021, 54(1): 116-131.
- [8] SONG Y, XIA T, XIA X, et al. Genetic polymorphisms of the HLA-DP and HLA-DQ genes could influence Hepatitis B virus infection in Yunnan population[J]. *Immunol Invest*, 2021, 50(1): 47-57.
- [9] PUJADAS E, CORDON-CARDO C. The human leukocyte antigen as a candidate tumor suppressor[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(5): 586-589.
- [10] KOUKOULIOTI E, FISCHER J, SCHOTT E, et al. Association of HLA-DPA1 and HLA-DPB1 polymorphisms with spontaneous HBsAg seroclearance in Caucasians [J]. *Liver Int*, 2019, 39(4): 646-654.
- [11] WASITYASTUTI W, YANO Y, RATNASARI N, et al. Protective effects of HLA-DPA1/DPB1 variants against Hepatitis B virus infection in an Indonesian population [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 41(1): 177-184.
- [12] ALDENNER-CANNAVÁ A, OLERUP O. HLA-DPA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) and distribution of DPA1 alleles in Caucasian, African and Oriental populations[J]. *Tissue Antigens*, 1996, 48(3): 153-160.
- [13] WETTENGEL J M, BURWITZ B J. Innovative HBV animal models based on the entry receptor NTCP[J]. *Viruses*, 2020, 12(8): 828.
- [14] LV J, XU T, QIAN Z, et al. Association between HLA-DQ gene polymorphisms and HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2017, 20(17): 7150386.
- [15] LIN C L, KAO J H. Hepatitis B virus genotypes and variants[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(5): a021436.
- [16] CROAGH C M, DESMOND P V, BELL S J. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: a review of epidemiology and clinical relevance[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(3): 289-303.
- [17] LIN T M, CHEN C J, WU M M, et al. Hepatitis B virus markers in Chinese twins [J]. *Anticancer Res*, 1989, 9(3): 737-741.
- [18] GLEBE D, GOLDMANN N, LAUBER C, et al. HBV evolution and genetic variability: Impact on prevention, treatment and development of antivirals [J]. *Antiviral Res*, 2021, 186(1): 104973.
- [19] MATSUO J, DO S H, YAMAMOTO C, et al. Clustering infection of hepatitis B virus genotype B4 among residents in Vietnam, and its genomic characters both intra- and extra-family[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0177248.
- [20] TONG M J, WEINER J M, ASHCAVAI M W, et al. A comparative study of hepatitis B viral markers in the family members of Asian and non-Asian patients with hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma and with chronic hepatitis B infection[J]. *J Infect Dis*, 1979, 140(4): 506-512.
- [21] KAMATANI Y, WATTANAPOKAYAKIT S, OCHI H A, et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(5): 591-595.
- [22] YAN Z, TAN S, DAN Y, et al. Relationship between HLA-DP gene polymorphisms and clearance of chronic hepatitis B virus infections: case-control study and meta-analysis [J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(6): 1222-1228.
- [23] WANG L, WU X P, ZHANG W, et al. Evaluation of genetic susceptibility loci for chronic hepatitis B in Chinese: two independent case-control studies [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17608.
- [24] OU G, LIU X, YANG L, et al. Relationship between HLA-DPA1 mRNA expression and susceptibility to hepatitis B [J]. *J Viral Hepat*, 2019, 26(1): 155-161.
- [25] O'BRIEN T R, KOHAAR I, PFEIFFER R M, et al. Risk alleles for chronic hepatitis B are associated with decreased mRNA expression of HLA-DPA1 and HLA-DPB1 in normal human liver[J]. *Genes Immun*, 2011, 12(6): 428-433.