

强直性脊柱炎患者 HLA-B27 基因亚型检测的临床意义

刘湘 宁勇 姚群峰 李一荣 周志明 胡丽华

基金项目:湖北省教育厅青年人才项目(No.Q20071601)

作者单位:430065 武汉市,湖北中医学院医学检验与技术学院

通讯作者:胡丽华, E-mail: huluhua20022301@yahoo.cn

【摘要】 目的 探讨强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)患者 HLA-B27 基因亚型检测的临床意义,同时评价一种新的检测 HLA-B27 基因亚型的聚合酶链反应-序列特异性引物(polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP)高分辨技术,为临床诊治 AS 提供实验室依据。**方法** 选择我院 2007 年 9 月至 2009 年 7 月住院及门诊就诊的 AS 患者 190 例为 AS 组,其中男 129 例,女 61 例,平均年龄(39±9)岁。对照组为健康体检者 156 例,男 81 例,女 75 例,平均年龄(30±11)岁。采用 PCR-SSP 高分辨技术对研究人群进行 HLA-B27 基因亚型检测。**结果** 本研究共检出 6 种亚型,分别是 B*2702、B*2703、B*2704、B*2705、B*2706 及 B*2713。在 AS 组与对照组中,以 B*2704 亚型为主(构成比分别为 72.1%和 56.4%),其次为 B*2705 亚型(构成比分别为 21.6%和 31.4%),两组中均检测到频率较低的 B*2702 亚型(构成比分别为 0.5%和 1.3%)及 B*2703 亚型(构成比分别为 5.3%和 8.3%),而 B*2713 亚型仅在 AS 组检测到 1 例(构成比为 0.5%),B*2706 亚型仅在对照组检测到 4 例(构成比为 2.6%)。AS 组与对照组相比,B*2703 及 B*2705 亚型构成比的差异均无统计学意义($\chi^2=1.301, P>0.05$; $\chi^2=4.032, P>0.05$)。B*2704 亚型在两组中所占比例均为最高且组间差异具有统计学意义($\chi^2=9.279, P<0.01$),且 OR 值为 1.997,95%可信区间为 1.279~3.119,提示 B*2704 亚型与 AS 发病危险度相关。**结论** 中国汉族人群中 AS HLA-B27 亚型以 B*2704 和 B*2705 为主要亚型,其中 B*2704 与 AS 发病危险度呈强相关,B*2706 可能与 AS 发病危险度呈负相关。本文研究所使用的 PCR-SSP 法能检测出 29 个 HLA-B27 亚型(B*2701~B*2730,其中 B*2722 除外),可满足当前对 HLA-B27 基因亚型检测的需要。

【关键词】 强直性脊柱炎;HLA-B27 亚型;PCR-SSP

The clinical significance of HLA-B27 subtypes detection in ankylosing spondylitis patients

LIU Xiang, NING Yong, YAO Qun-feng, et al. Department of medical laboratory and technology, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

【Abstract】 Objective To analyze the association of the HLA-B27 subtypes with ankylosing spondylitis(AS), and investigate the usefulness of HLA-B27 subtype in clinical diagnosis of AS. Meanwhile, to evaluate a new high-resolution polymerase chain reaction-sequence-specific primer (PCR-SSP). **Methods** A total of 190 patients with AS and a control group of 156 subjects were recruited for the study. HLA-B27 subtypes were confirmed by PCR-SSP. **Results** 6 HLA-B27 subtypes were determined: B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706 and B*2713. Among HLA-B*2704 (patients 72.1%, controls 56.4%) and HLA-B*2705 (patients 21.6%, controls 31.4%) were the two high frequency genotypes in the control group and the AS group. There were statistically significant difference in the distribution of B*2704 subtypes between the AS group and the control group ($\chi^2=9.279, P<0.01$), and OR=1.997, 95% CI=1.279~3.119. Although the frequency of genotype B*2703 and B*2705 in the AS group was higher than in the control group, but the difference had no statistically significance ($\chi^2=1.301, P>0.05$; $\chi^2=4.032, P>0.05$). Other HLA-B27 subtypes were relatively rare. One B*2713 subtype was detected only in the AS group, four B*2706 subtypes were found only in controls. **Conclusion** B*2704 is the dominant subtypes followed by B*2705. B*2704 is strongly associated with AS. B*2706 may have a negative association with AS. Subtyping of HLA-B27 by PCR-SSP has been proved to be suitable for clinical application. It is useful to diagnose AS in clinic.

【Key words】 Ankylosing spondylitis; HLA-B27 subtypes; Polymerase chain reaction-sequence-specific primer

1973 年 Brewerton 和 Schlosstein 报道了 HLA-B27 与强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 的密切相关性^[1,2],这是 AS 研究史上的里程碑,AS 发病机制的研究也主要集中在对 HLA-B27 的研究上。种系发生的研究表明,进化中自然选择导致了 HLA-B27 具有丰富的多态性^[3,4],HLA-B27 至少有 30 种亚型^[5],它们之间只有个别位点上的核苷酸有差异。而受 HLA 基因分型技术的限制,以往的研究中往往只能分析少量 HLA-B27 亚型,从亚型水平探讨 AS 发病机制的研究结果缺乏精确性与完整性。中国人群 HLA-B27 阳性率约为 2%~7%,其多态性的资料很有限,尤其是近年公布的许多新的 HLA-B27 亚型的分布情况^[6]。最近由 Downing 等^[7,8]创建的一种新的 PCR-SSP 高分辨技术,可以检测到 29 种 HLA-B27 基因亚型。在此基础上本文采用病例对照研究方案,使用该技术进行 HLA-B27 亚型检测,旨在分析 HLA-B27 基因亚型与 AS 的相关性,探讨 HLA-B27 基因亚型检测的临床意义,为临床诊治提供实验室依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2007 年 9 月至 2009 年 7 月在华中科技大学同济医学院附属协和医院住院和门诊就诊的 AS 患者 190 例,男 129 例,女 61 例,平均年龄(39±9)岁,诊断符合 1984 年 Linden 修改的纽约标准^[9]。健康对照者为来自该院健康体检者 156 例,男 81 例,女 75 例,平均年龄(30±11)岁,无炎症性下腰痛等与 AS 相关临床症状及 AS 家族史。所有研究对象为无血缘关系的中国汉族人群,AS 患者均已采用 SYBR Green I 荧光聚合酶链反应^[10]检测为 HLA-B27 阳性。

1.2 模板 DNA 的提取 采集受检者静脉血 2 ml,用 EDTA-K₂ 抗凝;采用 NaI 法提取白细胞基因组 DNA,溶于三羟甲基氨基甲烷缓冲液,-20℃保存。

1.3 PCR-SSP 高分辨技术检测 HLA-B27 亚型 根据已公布的 HLA-B27 基因亚型序列^[7],在第 2 和第 3 外显子内选择适当顺序设计 HLA-B27 亚型特异性引物 29 对,由上海 invitrogen 生物技术公司合成。

PCR 体系总体积 20 ul,含基因组 DNA 150 ng,10×PCR 缓冲液 2 ul,25 mmol/L 的 Mg²⁺ 2 ul,10 u-mol/L dNTPs(Fermentas 公司,美国),上下游引物各 0.4 ul,Taq DNA 聚合酶 1 U(Fermentas 公司,美国),不足体积用灭菌双蒸水补足。

按照下述条件进行 PCR 反应:95℃,变性 90 s;95℃ 30 s,64.5℃ 50 s,72℃ 20 s,10 个循环;95℃

30 s,61.5℃ 50 s,72℃ 30 s,10 个循环;95℃ 30 s,60℃ 50 s,72℃ 40 s,10 个循环;20℃ 1 h。每个引物对作为一个独立的 PCR 反应体系,每份样本 DNA 均同时做 29 管 PCR 反应,每管均包含内参照引物对^[6],为人类生长激素内含子,扩增产物为 800 bp 以上。反应均在 T3 Thermocycler 型(德国 Biometra 公司)基因扩增仪上完成。

每个反应管取 10 ul PCR 产物进行琼脂糖凝胶(含 0.5 ug/ml 溴化乙锭)电泳,每份样品 DNA 点样 29 孔,应用凝胶分析系统(BioSpectrum 公司,美国)摄像分析结果。按照条带的大小、组合及内参照带,判断 HLA-B27 的亚型^[7]。

1.4 统计学处理 用 SPSS12.5 软件包进行统计分析。计算 AS 组及对照组 HLA-B27 各亚型的构成比,组间结果的差异性采用 χ^2 检验,以比值比(odds ratio, OR)及 95% 可信区间(confidence interval, CI)表示相对危险度, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS 组及对照组 HLA-B27 亚型检测结果 用 PCR-SSP 高分辨技术在 AS 组及对照组中,共检测出该法可分析出的 29 种亚型中的 6 种,分别是 B*2702、B*2703、B*2704、B*2705、B*2706、B*2713。两组都以 B*2704 和 B*2705 亚型为主,其 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1、图 2。

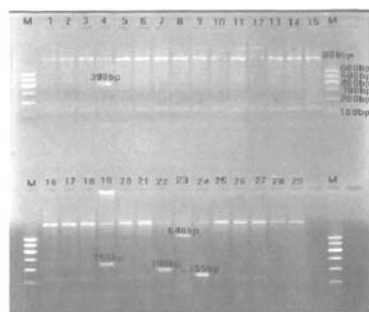


图 1 B*2704 亚型 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

注:图中 800 bp 条带为每管内参照带,M 为 maker;390 bp、255 bp、190 bp、640 bp、155 bp 为判断 B*2704 亚型条带组合

2.2 AS 组及对照组 HLA-B27 各亚型构成比 由表 1 可见两组均检测到 B*2702、B*2703、B*2704 及 B*2705 亚型,B*2704 亚型在两组中构成比较高(72.1% 和 56.4%),其次为 B*2705 (21.6% 和 31.4%),B*2702 和 B*2703 亚型在两组中构成比较低,而 B*2713 亚型仅在 AS 组中检测到 1 例,B*2706 亚型仅在对照组中检测到 4 例。AS 组与对

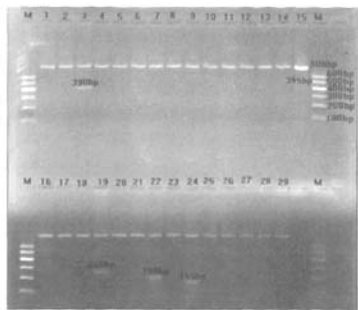


图 2 B*2705 亚型 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

注:图中 800 bp 条带为每管内参照带,M 为 maker;390 bp、255 bp、190 bp、155 bp 为判断 B*27058 亚型条带组合

照组相比,B*2703 及 B*2705 亚型构成比在两组间的差异均无统计学意义 ($\chi^2=1.301,P>0.05$; $\chi^2=4.032,P>0.05$),B*2704 亚型构成比组间差异有统计学意义($\chi^2=9.279,P<0.01$);且 B*2704 亚型数比为最高,OR=1.997,95% CI 为 1.279~3.119。

3 讨论

AS 是以中轴关节受累为主的一种慢性进行性炎性疾病,严重者可失去劳动能力,致残率较高。AS 起病大多缓慢而隐匿,当影像学检查出现痕迹确诊时患者病情已经发展到比较严重的阶段,很难达到早期发现、早期治疗的目的。HLA-B27 与 AS 的相关性是迄今为止所知的与该病相关性因素中最强的,因此临床上往往结合 HLA-B27 检测来辅助诊断疑似 AS 患者,HLA-B27 对 AS 的早期诊断、延缓或预防发病有着积极的指导作用^[11]。

尽管从 1973 年证实 HLA-B27 与 AS 具有强相关性到现在已近 40 年,但 HLA-B27 与 AS 发病的关系机理还不是很明确。随着 HLA 基因分型技术的成熟和发展,从亚型水平探讨 AS 的发病机制已成为可能,迄今已检测出至少 30 个 HLA-B27 等位基

因^[3],国内外学者均认为 HLA-B27 亚型与 AS 密切相关,不同亚型可表现出对 AS 的正相关和负相关,所以在亚型水平上对疑似 AS 患者作 HLA-B27 检测,对 AS 的诊断和鉴别诊断更具有价值^[12]。

本文研究结果表明,无论是在 AS 组还是对照组中,都以 B*2704 分布最广,B*2705 亚型居次,与文献报道^[13,16]一致,这也进一步证实了 B*2704 亚型的普遍存在。但是,AS 患者中 B*2704 的频率(72.1%)明显高于对照组(56.4%),差异具有统计学意义 ($P<0.01$),计算 B*2704 亚型的 OR 值,显示 B*2704 亚型与 AS 发病危险度相关,OR 值为 1.997,95%CI 为 1.279~3.119,这与某些文献^[17,18]报道不同,可能由采样的种群和地区差异造成。

B*2703 亚型普遍存在于西非黑人中,B*2702 在中东占主导地位^[19,20]。本研究在 AS 组与对照组中均检出 B*2703 和 B*2702,前者与崔刘福^[21]等的研究结果类似,其与 AS 的相关性还存在争议;后者分布频率极低,无法进行统计学分析,尚需进行更大样本和多种群的研究。

另外,在本文中研究中,仅在对照组中检出 B*2706,因此推测 B*2706 与 AS 可能呈负相关,这与以往一些文献报道一致^[14-16]。值得注意的是,B*2713 亚型仅在 AS 组中检出 1 例,而在对照组中并未检出,提示该亚型可能与 AS 的发病有关,佐证了崔刘福^[21]等首次发现 B*2713 与 AS 相关的结论。

根据以上结果,并结合以往文献资料,可以推断中国汉族人群中 AS HLA-B27 亚型以 B*2704 和 B*2705 为主,其中 B*2704 与 AS 发病危险度呈强相关,B*2706 可能与 AS 发病危险度呈负相关,还有一些在 AS 患者中出现的低频率亚型,如 B*2703、B*2713 等与 AS 发病危险度的相关性也不可忽略。一旦可疑患者出现了 AS 早期临床症状,并检测到与 AS 呈强相关的 HLA-B27 基因亚型,就可以采取

表 1 AS 组与对照组 HLA-B27 亚型分布情况比较[例数(%)]

组别	例数	HLA-B27 亚型					
		B*2702	B*2703	B*2704	B*2705	B*2706	B*2713
AS 组	190	1(0.5)	10(5.3)	137(72.1)	41(21.6)	0	1(0.5)
对照组	156	2(1.3)	13(8.3)	88(56.4)	49(31.4)	4(2.6)	0
χ^2			1.301	9.279	4.032		
P			> 0.05	< 0.01	> 0.05		
OR			0.611	1.997	0.601		
(95 % CI)			(0.262~0.701)	(1.279~3.119)	(0.371~0.937)		

有效的干预措施防止疾病进一步发展。因此,HLA-B27 基因亚型的检测对 AS 的诊断和鉴别诊断具有重要的临床价值。

目前检测 HLA-B27 亚型的主要方法有 PCR-SSP, DNA 限制性片段长度多态性分析, PCR-单链构象多态性及 PCR-DNA 测序等。与之前国内外的许多同类研究不同, 本实验所用 HLA-B27 亚型检测方法是目前已知可分析较多亚型种类的高分辨 PCR-SSP 技术, 能检测出 29 个 HLA-B27 亚型 (B*2701~B*2730, 其中 B*2722 除外), 弥补了以往只能检测几个亚型的不足。且该法根据内对照及有无特异性区带使判定结果一目了然, 可以快速准确的对 HLA-B27 的相关亚型进行检测, 为进一步研究 HLA-B27 与 AS 的发病机制奠定了基础, 同时为临床早期诊断 AS 提供了新的检测方法。

总之, 本文研究结果再次证实了 HLA-B27 亚型与 AS 发病的关联性, 为 HLA-B27 阳性 AS 患者的亚型分布频率提供了临床资料, 也为今后寻找新的 AS 早期诊断指标及治疗靶点奠定了基础。然而, 由于 HLA-B27 等位基因的分布呈高度偏态性且有明显的种群差异, 尤其对那些在中国人群中分布频率很低的等位基因, 还有待进一步的深入研究。

4 参考文献

- Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestones R, et al. High association of an HLA antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med*, 1973, 288:704-706.
- Brewerton DA, Hart FD, Nicholls, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-A27. *Lancet*, 1973, 1:904-907.
- Blanco-Gelaz MA, Lopez-Vazquez A, Garcia-Fernandez S, et al. Genetic variability, molecular evolution, and geographic diversity of HLA-B27. *Hum Immunol*, 2001, 62:1042-1050.
- Ball EJ, Khan MA. HLA-B27 polymorphism. *Joint Bone Spine*, 2001, 68:378-382.
- Taurog JD. The Mystery of HLA-B27: If It Isn't One Thing, It's Another. *Arthritis Rheum*, 2007, 56:2478-2481.
- 吴震, 古洁若, 林智明, 等. 中国汉族强直性脊柱炎患者人类白细胞抗原 B27 多态性研究. *中华风湿病学杂志*, 2008, 12:294-298.
- Dowing J, Coates E, Street J, et al. A High-Resolution Polymerase Chain Reaction-Sequence-Specific Primer HLA-B*27 Typing Set and Its Application in Routine HLA-B27 Testing. *Genet Test*, 2006, 10:98-103.
- Downing J, Guttridge MC, Thompson J, et al. Five-locus HLA typing of hematopoietic stem cell donor volunteers using PCR using sequence specific primers. *Genet Test*, 2004, 8:301-312.
- Van der Linden S, Valkenberg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*, 1984, 27:361-368.
- 李一荣, 胡丽华, 陈凤花, 等. 应用 SYBR Green I 实时荧光 PCR 法对中国汉族人群 HLA-B27 进行快速基因分型. *临床血液学杂志*, 2008, 21:526-529.
- Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, et al. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61:iii8-iii18.
- Conde RA, Sampaio-Barros PD, Donadi EA. Frequency of the HLA-B27 alleles in Brazilian patients with AS. *J Rheumatol*, 2003, 30:2512.
- Chou CT, Chen JM, Hsu CM, et al. HLA-B27 and its subtypes in 4 Taiwanese Aborigine tribes: a comparison to Han Chinese patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2003, 30:321-325.
- Lopez-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens*, 1995, 45:169-176.
- Garcia-Fernandez S, Gonzalez S, Mina Blanco A. New insights regarding HLA-B27 diversity in the Asian population. *Tissue Antigens*, 2001, 58:259-262.
- Chen IH, Yang KL, Lee A, et al. Low frequency of HLA-B*2706 in patients with ankylosing spondylitis. *Eur J Immunogenet*, 2002, 29:435-438.
- Lee SH, Choi IA, Lee YA, et al. Human leukocyte antigen-B*2705 is the predominant subtype in the Korean population with ankylosing spondylitis, unlike in other Asians. *Rheumatol Int*, 2008, 29:43-46.
- Birinci A, Bilgici A, Kuru O, et al. HLA-B27 polymorphism in Turkish patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int*, 2006, 26:285-287.
- Choo SY, St John T, Orr HT. Molecular analysis of the variant alloantigen HLA-B27d (HLA-B*2703) identifies a unique single amino acid substitution. *Hum Immunol*, 1988, 21:209-219.
- Gul A, Uyar FA, Inanc M, et al. A weak association of HLA-B*2702 with Behcet's disease. *Genes Immun*, 2002:368-372.
- 崔刘福, 宋海澄, 李宏芬, 等. HLA-B27 等位基因与强直性脊柱炎的相关性研究. *中华风湿病学杂志*, 2003, 7:55-56.

(收稿日期:2010-04-27)

(本文编辑:李磊)