

• 论著 •

人白细胞 DR 抗原基因与
动脉粥样硬化性脑梗死关系的研究

张双彦 郭英全 于明 曹峰林 张宪忠

【摘要】 目的 探讨人白细胞 DR 抗原(HLA-DR)基因与动脉粥样硬化性脑梗死(ABI)免疫遗传的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应和顺序特异性引物(PCR-SSP)基因分析方法,对 31 例 ABI 患者及 30 名无血缘关系健康人的 HLA-I DR 部分等位基因及亚基因进行检测分析。**结果** ABI 组 HLA-DR B1*0301 等位基因相对危险度(RR)=5.684 2,明显高于其他位点,差异有显著性($P<0.05$);其他 HLA-DR B1* 各等位基因未见异常。**结论** HLA-DR B1*0301 等位基因可能为北方汉族 ABI 患者的致病易感基因或与其他基因相连锁而共同致病。

【关键词】 脑梗死,动脉粥样硬化; 聚合酶链反应; 顺序特异性引物; 人白细胞 DR 抗原; 基因多态性; 易感基因

Research on association between atherosclerotic brain infarction and human leukocyte antigen DR gene

ZHANG Shuang-yan*, WU Ying-quan, YU Ming, CAO Feng-lin, ZHANG Xian-zhong. * Harbin The First Hospital, Harbin 150010, Heilongjiang, China

【Abstract】 Objective To evaluate the relationship between atherosclerotic brain infarction (ABI) and human leukocyte antigen DR (HLA-DR) gene at molecular level. **Methods** By using polymerase chain reaction-sequence-specific probe (PCR-SSP), gene special position of the HLA-I DR alleles were determined in 31 patients and 30 healthy individuals as controls, all of them were inhabitants of Northeastern China. **Results** The HLA-DR B1*0301 gene frequency in the group of ABI was obviously higher than that of control group ($RR=5.684\ 2$, $P<0.05$). **Conclusion** The HLA-DR B1*0301 gene may be the susceptible gene of ABI in Northeastern China, or it may associate with other genes to produce the disease.

【Key words】 atherosclerotic brain infarction; polymerase chain reaction; sequence specific probe; human leukocyte antigen DR gene; gene polymorphism; susceptible gene

动脉粥样硬化性脑梗死(atherosclerotic brain infarction, ABI)是严重危害人类健康的常见病,其病因及发病机制至今仍不十分清楚。在以往研究中,ABI 所具有的遗传素质倾向及免疫失衡已引起诸多学者关注,认为免疫机制在 ABI 的发生、发展中起重要作用^[1-3]。由于人类免疫遗传基因位于人白细胞抗原(HLA)区域内,而且在免疫遗传和免疫调控中起至关重要的作用,从免疫遗传学角度研究发现,ABI 与人类免疫遗传基因多态性有关,尤其是与 HLA-II 类基因 DR 关系密切^[4]。既往研究均采用血清学和细胞学方法,但对 II 类抗原辨别困难,且因同源性干扰,各抗原之间常发生交叉反应,假阳性率高,影响认识上的正确性及深度^[3]。聚合酶链反应和顺序特异性引物(PCR-SSP)技术是目前基因研究中最先进的方法之一。新近研究表明,HLA-DR 抗

原在 DNA 序列上存在高度多态性^[5]。本研究中采用 PCR-SSP 技术对我国北方汉族 ABI 患者和健康人的 HLA-DR 基因进行了检测,旨在分析中国汉族人 HLA-II 类基因在 ABI 发生中的作用机制,为诊断、治疗和预防 ABI 提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 ABI 组:按照全国第 4 届脑血管病学术会议制定的诊断标准^[6],经临床检查(病史、体征和实验室检查)及头颅 CT 和(或)MRI 扫描确诊的患者共 31 例,其中男 20 例,女 11 例;年龄 43~67 岁,平均(50±7)岁;均系无血缘关系的北方汉族个体,除外糖尿病、原发性高血压和脑肿瘤患者。

1.1.2 对照组:体检正常的献血员 30 名,男 18 名,女 12 名;年龄 40~52 岁,平均(46±6)岁。

1.1.3 所有受检者祖籍及出生地均为我国北方地区的汉族人,无血缘关系,排除肝、肾和内分泌等影响脂质代谢的疾病。

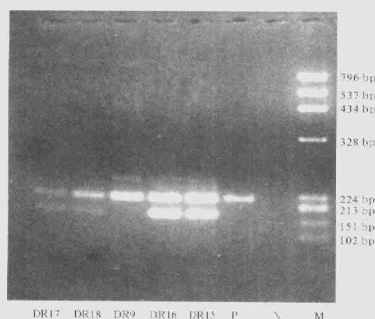
1.2 实验方法

基金项目:黑龙江省哈尔滨市青年科技基金项目(017421005)

作者单位:150010 哈尔滨市第一医院(张双彦,曹峰林,张宪忠);130021 吉林大学中日联谊医院(张双彦,郭英全,于明)

作者简介:张双彦(1961-),女(汉族),黑龙江哈尔滨人,博士研究生,副主任医师。

1.2.1 基因引物的设计及化学合成:HLA 基因图谱已明确,通过计算机国际互联网在人类基因库中对 6 号染色体主要组织相容性复合体(MHC)取得的单核苷酸多态性(SNP)进行检索。可选择性地合成所需每一 DR 等位基因或亚基因引物及反义引物中的一对,引物由上海基因研究所协助合成。分别特异性地扩增所需检测 DNA 片断。标准 DNA(由上海生物制品公司合成)及 PCR-SSP 分型结果:标准 DNA 及 DR17、DR18、DR9、DR15 和 DR16 等位基因的特异性引物扩增产物均出现了清晰的特异性扩增带。PCR-SSP 分型结果符合率为 100%,表明所需基因片段扩增成功,见图 1。



M 为 Marker, N 为阴性对照, P 为阳性对照

图 1 HLA-DR 等位基因特异性引物扩增结果

Figure 1 Results of HLA-DR alleles proliferation

1.2.2 DNA 提取:留取外周血 5 ml, 质量分数为 5% 的乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 采用 Resse 介绍的方法提取基因组 DNA^[5]。

1.2.3 PCR-SSP 方法:使用美国 PE 公司生产的 PCR 仪(4800)及有关试剂。PCR 扩增反应体积

50 μ l, 96 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 然后 96 $^{\circ}$ C 变性 25 s, 70 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 5 个循环后改退火温度为 58 $^{\circ}$ C, 共计 34 个循环。为防止污染, 每个 PCR 都设阳性对照, 扩增产物经质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶常规电泳 15~20 min, 紫外灯下观察结果。

1.3 统计学处理:采用四格表确切概率算法, 相对危险度(RR)和 χ^2 检验按文献[3]公式计算。

2 结果

2.1 PCR-SSP 方法检测基因位点:1 例北方汉族 ABI 患者的 HLA-DR B1*0301 等位基因结果见图 2。

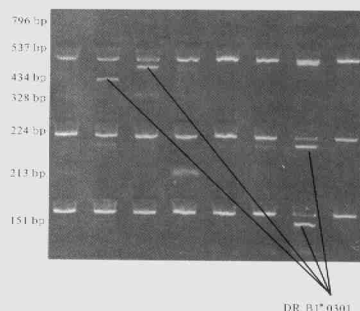


图 2 1 例北方汉族 ABI 患者 HLA-DR B1*0301 结果

Figure 2 HLA-DR B1*0301 of a northern Chinese patient with ABI

2.2 PCR-SSP 分型结果(表 1):ABI 组和对照组间 HLA-DR B1* 各等位基因的分布差异均有显著性, DR B1*0301 等位基因 $RR=5.6842$, 经 χ^2 检验, $P<0.05$ 。提示 DR B1*0301 等位基因与 ABI 有关, 可能是 ABI 的易感基因。其他 DR B1* 各等位基因和亚基因未见相关性。

表 1 ABI 组与对照组 HLA-DR B1* 各等位基因分布情况

Table 1 Distribution of DRB1* alleles in ABI patients and controls

组别	例数(例)	DR B1*01	DR B1*0301	DR B1*0302	DR B1*0303	DR B1*0401	DR B1*0404	DR B1*07	DR B1*08
对照组	30	1	3	1	2	1	2	2	1
ABI 组	31	1	12	1	1	1	1	2	0
RR		0.966 7	5.684 2	0.966 7	0.466 7	0.966 7	0.466 7	0.933 5	0.000 0
χ^2 值		0.000 6	6.776 7	0.000 6	0.386 0	0.000 6	0.386 0	0.001 2	1.050 6
P 值		0.508 2	0.008 1	0.508 2	0.374 7	0.508 2	0.374 7	0.387 6	0.491 8
组别	例数(例)	DR B1*09	DR B1*10	DR B1*11	DR B1*12	DR B1*13	DR B1*14	DR B1*15	DR B1*16
对照组	30	2	1	2	1	2	1	3	1
ABI 组	31	3	1	0	1	1	1	1	0
RR		1.500 0	0.966 7	0.451 6	0.966 7	0.466 7	0.966 7	0.333 3	0.000 0
χ^2 值		0.183 7	0.000 6	2.136 7	0.000 6	0.386 0	0.000 6	1.141 8	1.050 6
P 值		0.328 7	0.508 2	0.237 7	0.508 2	0.374 7	0.508 2	0.241 2	0.491 8

3 讨论

有关 ABI 与 HLA 关系的研究国内外报道较少,且结果各异,可能与不同种族、地域有关,特别是对 HLA-DR 的研究目前国内尚无报道。国外报道认为:ABI 与 HLA-DR 关系密切^[2-4]。我们的实验结果表明:HLA-DR B1*0301 等位基因可能是北方人群 ABI 病的易感基因;临床上可视该基因为 ABI 易感基因之一或同与之相连锁的其他基因共同致病。其机制可能为:ABI 是多因素致病,遗传因素是重要致病因素,高血压、高血脂、吸烟、糖尿病等危险因素在脑血管病的发病中仅起部分作用^[7],因此可能存在与易感性基因紧密连锁的其他相关基因协同致病。

目前对与动脉粥样硬化有关的脑梗死的研究是脑血管病遗传学最有意义的研究。越来越多的研究认为:动脉硬化的病理变化为细胞免疫反应^[2-4],较有意义的解释为氧化低密度脂蛋白作为内源性抗原激发免疫反应,同时性质不明的传染因子如病毒、细菌等使 HLA-DR 易感基因发生变异,失去对内源性免疫反应的限制而被激活^[8,9];抗原多肽传递给 CD4⁺ 细胞,激发免疫应答,从而诱发细胞因子分泌^[5,10],使单核细胞积聚并吞噬,形成泡沫细胞,进一步刺激平滑肌细胞增殖,动脉硬化斑块形成,造成局部缺血。因此,应重视扩展单倍型和其他相关基因

的关联研究,可能为精确定位奠定基础。

参考文献:

- 1 许治强,丁瑞娟,周伯荣,等. 112 例老年脑梗死患者抗心磷脂抗体的检测及意义[J]. 中国危重病急救医学,2001,13:495-496.
- 2 Fortun A, Khalil A, Gagne D, et al. Monocytes influence the fate of T cells challenged with oxidized low density lipoproteins towards apoptosis or MHC-restricted proliferation [J]. Atherosclerosis, 2001, 156: 11-21.
- 3 Kosel S, Egensperger R, Bise K, et al. Long-lasting perivascular accumulation of major histocompatibility complex class I-positive lipophages in the spinal cord of stroke patients: possible relevance for the immune privilege of the brain [J]. Acta Neuropathol (Berl), 1997, 94: 532-538.
- 4 Stemme S, Faber B, Holm J, et al. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 3893-3897.
- 5 谭建明,周永昌,唐孝达,等. 组织配型技术与临床应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:288-289.
- 6 王新德. 各类脑血管病诊断要点[J]. 中华神经杂志,1986,12:379.
- 7 李才明,张成. 脑血管病的遗传学研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志,2004,4:185-187.
- 8 Marsh S G, Kopp W, Valcavi R, et al. HLA-I nucleotide Sequences [J]. Tissue Antigens, 2001, 10: 16.
- 9 Russel H. Efficient DNA extraction for PCR from cell or blood [J]. Amplification, 1998, 2: 12.
- 10 陈汝兴,郑思榕. 细胞因子与脑梗死[J]. 中国中西医结合急救杂志,1998,5:382-384.

(收稿日期:2005-08-25 修回日期:2006-03-20)

(本文编辑:郭方)

• 启事 •

全国机械通气规范化操作与机械通气治疗新进展高级学习班 暨全国危重病与机械通气治疗学术交流会报名及征文通知

中华医学会继续教育部、空军总医院呼吸科联合承办的国家级 I 类继续医学教育项目(2006-03-02-065,10 学分)“全国机械通气规范化操作与机械通气治疗新进展高级学习班”暨“全国危重病与机械通气治疗学术交流会”定于 2006 年 7 月 8—13 日在辽宁省大连市迎利亚大酒店召开。欢迎各级医院从事呼吸科、急诊科、重症监护、神经内科、心血管内科、内分泌科、外科及睡眠医学的科研人员及临床医生、护士参加。

会议将邀请国内外知名的机械通气治疗专家就机械通气(有创与无创)治疗领域的理论和临床实践中的有关问题进行深入细致的研讨,重点讲述不同疾病机械通气治疗时的规范化操作和临床工作中遇到的各种困惑问题(如呼吸机选择、参数设置、撤机时机掌握、人-机对抗、并发症预防与处理等)。会议采取理论授课与实践操作相结合,强化操作示范和演示,使参会人员能够真正掌握呼吸机规范操作技能。同时举办学术交流、疑难病例和热点问题讨论沙龙。

征文内容:呼吸及其他危重病的管理、诊断与治疗,机械通气的有关问题,疑难病例和文献综述等。

征文要求:寄 600~1 000 字摘要 1 份,征文题目下注明省市、工作单位、科室、姓名及邮编。自留底稿。来稿请寄:100710 北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“机械通气会议”梁鸿收,Email:cbcmc@public3.bta.net.cn(Email 发稿时务必注明会议名称)。征文截止日期:2006 年 6 月 16 日。参会报名截止日期:2006 年 6 月 28 日。会务费 880 元(含光盘、资料、操作实习等),住宿费自理。联系电话:010-88283858,88285961(Tel/Fax)杨桂芳、梁鸿、刘智明,空军总医院呼吸科张波主任,电话:13331161076。

(中华医学会继续教育部 空军总医院呼吸科)