

颅内动脉狭窄与 HLA-DQA1、DQB1 基因多态性关系研究

荣艳红 周广喜 张明义

【摘要】 目的 探讨白细胞抗原 (HLA)-DQA1、DQB1 基因多态性与颅内动脉狭窄的关系。**方法** 运用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)方法对自 2006 年 7 月至 2007 年 3 月天津医科大学总医院神经内科收治的 15 例缺血性卒中伴颅内动脉中重度狭窄患者(简称狭窄组)、49 例缺血性卒中且无动脉狭窄患者(简称无狭窄组)和 52 例健康体检者(对照组)进行 HLA-DQA1 和 DQB1 基因多态性分型。**结果** 狭窄组 DQA1*0501 和 DQB1*0501 出现频率增高,与其它 2 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);而无狭窄组与对照组相比,DQA1*0301 和 DQB1*0301 频率增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** DQA1*0501 和 DQB1*0501 是缺血性卒中伴颅内动脉狭窄易感基因,DQA1*0301 和 DQB1*0301 为缺血性卒中易感因素。

【关键词】 缺血性卒中; 动脉狭窄; 基因多态性

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)02-0121-04

Association of HLA -DQA1 and HLA -DQB1 gene polymorphisms with intracranial artery stenosis RONG Yan-hong*, ZHOU Guang-xi*, ZHANG Ming-yi. *Institute of Neurology, General Hospital of Tianjin Medical college, Tianjin 300052, China

【Abstract】 Objective To analyze the relationship between HLA-DQA1 and HLA-DQB1 gene polymorphism and intracranial artery stenosis in patients with ischemic stroke. **Methods** Fifteen ischemic stroke patients with concurrent severe intracranial artery stenosis, 49 ischemic stroke patients without stenosis and 52 healthy control subjects from Tianjin were investigated for HLA-DQA1 and HLA-DQB1 polymorphisms by polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP). **Results** Compared with the stroke patients without intracranial artery stenosis and the healthy controls, the stroke patients with artery stenosis showed significantly increased frequency of DQA1 *0501 and DQB1 *0501 alleles ($P<0.05$). Compared with the other 2 groups, the frequencies of DQA1 *0301 and DQB1 *0301 alleles in the stroke patients without intracranial artery stenosis were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** HLA-DQA1*0501 and HLA-DQB1*0501 alleles predispose to the genetic susceptibility of ischemic stroke with intracranial artery stenosis, and DQA1*0301 and DQB1*0301 alleles are associated with the susceptibility to ischemic cerebrovascular diseases.

【Key words】 Ischemic stroke; Artery stenosis; Gene polymorphism

颅内动脉狭窄是导致卒中发作和复发的主要因素,而动脉粥样硬化则是动脉狭窄主要的病理基础。近年来,动脉粥样硬化发生发展与免疫遗传因素的关系日益得到重视,许多研究证明,免疫应答参与动脉粥样硬化的形成过程。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)具有人类多态性表达较高的遗传特征,它与疾病的免疫炎性反应直接

相关。本文采用聚合酶链反应-序列特异性引物(polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP)技术检测了缺血性卒中伴或不伴颅内动脉狭窄患者、健康对照者 HLA-DQA1、DQB1 位点的等位基因频率,探讨颅内动脉狭窄的发病机理及免疫遗传学背景。

对象和方法

一、研究对象

1. 缺血性卒中伴颅内动脉狭窄组(简称狭窄组);患者选择自 2006 年 7 月至 2007 年 3 月天津医

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.02.004

作者单位:300052 天津,天津医科大学总医院神经内科,天津市神经病学研究所[荣艳红(现工作单位为天津市宝坻区人民医院神经内科)、周广喜],干部病房(张明义)

科大学总医院神经内科住院的急性脑梗死或短暂性脑缺血发作患者,共 15 例,其中男 10 例,女 5 例;年龄 42~72 岁,平均(59.86±7.84)岁。入选标准:临床符合 1995 年中华医学会第四届全国脑血管疾病会议制定的《各类脑血管疾病诊断要点》中缺血性脑血管病标准;无自身免疫性疾病及严重感染、脏器衰竭;TCD 显示单侧或双侧颅内动脉中度以上狭窄;经 DSA 或 MRA 证实单侧或双侧颅内动脉中度以上狭窄;颅脑 CT 或 MRI 扫描确诊脑梗死;患者及家属签署知情同意书。

2. 缺血性卒中不伴颅内动脉狭窄组(简称无狭窄组):患者选自同时期天津医科大学总医院神经内科住院的急性脑梗死或短暂性脑缺血发作患者,共 49 例,其中男 33 例,女 16 例;年龄 41~72 岁,平均(56.83±10.44)岁。入选标准:TCD 显示无动脉狭窄,其他标准同狭窄组。

3. 对照组:选自同时期天津医科大学总医院健康体检者 52 例,无脑血管病,无自身免疫性疾病, TCD 检测无动脉狭窄,其中男 35 例,女 17 例;年龄 41~72 岁,平均(56.65±9.79)岁。3 组患者性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

二、TCD 检查过程

应用德力凯公司生产的 EMS-9 双深度双通道 TCD 筛选狭窄动脉。TCD 诊断颅内动脉中度以上狭窄和闭塞的标准为:(1)狭窄段的血流速度增加,峰值流速 >170 cm/s,均值流速 >120 cm/s,狭窄远段低流速、低搏动性改变;极度狭窄血流速度反而减慢。(2)频谱图形异常,主要为频谱紊乱,湍流或涡流信号。(3)声频粗糙、踏雪样或拉锯样杂音。(4)侧支循环的血流变化。

三、PCR-SSP 过程

1. DNA 提取:清晨空腹抽取肘静脉血 2 mL,置于 2%EDTA 抗凝 EP 管中,颠倒抗凝。全血基因组 DNA 提取按试剂盒(北京赛百胜公司)说明进行。

2. PCR 扩增基因片段:(1)引物的设计与合成参照文献[1]设计。*DQA1* SSP 共 16 条,可配成 12 对,另外 2 条为内参引物;*DQB1* SSP 共 20 条,可配成 12 对,另外 2 条为内参引物。(2)PCR 反应体系为 DNA 5 μ L,10 \times buffer 5 μ L,dNTP(包含 Mg^{2+}) 5 μ L,特异性引物 1 1 μ L (20 μ mol/L),特异性引物 2 1 μ L(20 μ mol/L),内参引物 1 1 μ L(20 μ mol/L),内参引物 2 1 μ L(20 μ mol/L),*Taq* 酶 0.5 μ L,用水补齐至总体积 50 μ L。PCR 反应条件:*DQA1* 为预变性 96 $^{\circ}$ C 2 min 后进入循环,94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,终止反应;*DQB1* 为预变性

94 $^{\circ}$ C 5 min 后进入循环,94 $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,终止反应。(3)主要仪器包括美国 Bio-Rad 公司 PCR 循环仪,美国 SYNGENE 公司紫外凝胶成像仪。

3. 电泳基因型鉴定:取 5 μ L 扩增产物在质量浓度为 20 kg/m³ 的琼脂糖(含溴化乙锭 1 μ g/mL)凝胶上电泳(条件为 5 V/cm,30 min)。0.5 \times TBE 为缓冲液,经紫外透射在泳道中见 DNA 条带为阳性,同时每个泳道均可见内源性阳性对照条带,观察,记录,拍照。

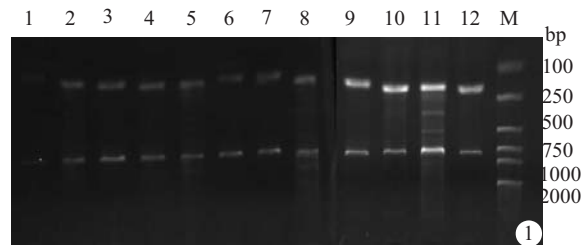
四、统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,统计方法采用 R \times C 表资料的 χ^2 检验及 Scheffe' 可信区间法, $P\leq 0.05$ 示差异有统计学意义。

结 果

一、*DQA1* 基因鉴定结果

在设计的 16 条引物中,共检出 12 个 *DQA1* 等位基因(图 1)。3 组之间,*DQA1**0501 和 *DQA1**0301 等位基因出现频率差异有统计学意义($P<0.05$)。多重比较结果显示,狭窄组患者中 *DQA1**0501 等位基因频率升高(36.7%),与其他 2 组(16.3%、10.6%)比较差异有统计学意义 ($P<0.05$,OR 分别为 2.967、4.895);无狭窄组 *DQA1**0301 频率升高(20.4%),与对照组(8.7%)比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$,OR 为 2.707)。(表 1)



1~12 依次为:*DQA1**0101/4、0101/2/4、0302、A、0104、0102/3、0601、0103、0501、0401、0201、0301;M:Marker

图 1 HLA-DQA1 等位基因
Fig.1 HLA-DQA1 locus allelic

二、*DQB1* 基因鉴定结果

在设计的 20 条引物中,共检出 12 个 *DQB1* 等位基因(图 2)。3 组之间 *DQA1**0501 和 *DQA1**0301 等位基因出现频率差异有统计学意义($P<0.05$)。多重比较结果显示,狭窄组患者中 *DQB1**0501 等位基因频率(40.0%)升高,与其他 2 组(18.3%、10.6%)比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$,OR 分别为 2.963、

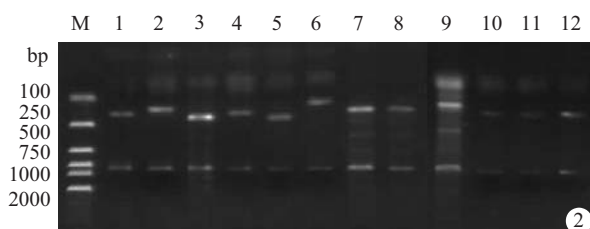
表 1 3 组之间 HLA-DQA1 等位基因频率比较

Tab.1 Comparison of HLA-DQA1 allele frequencies in 3 groups

等位基因	对照组(n=52)		狭窄组(n=15)		无狭窄组(n=49)		χ^2 值	P 值
	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)		
0101/4	4	3.8	3	10.0	6	6.1	1.753	0.416
0101/2/4	4	3.8	0	0	2	2.0	—	—
0501	11	10.6 ^a	11	36.7	16	16.3 ^a	11.572	0.003
0102/3	4	3.8	0	0	2	2.0	—	—
0103	17	16.3	3	10.0	6	6.1	5.350	0.069
0201	20	19.2	3	10.0	11	11.2	3.183	0.204
0601	6	5.8	4	13.3	8	8.1	1.900	0.387
0302	8	7.7	0	0	15	15.3	—	—
0401	5	4.8	0	0	4	4.0	—	—
0301	9	8.7	6	20.0	20	20.4 ^b	6.091	0.048
"A"	5	4.8	0	0	4	4.0	—	—
0104	11	10.6	0	0	4	4.0	—	—

与狭窄组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$

5.636);无狭窄组 *DQB1**0301 频率升高(17.3%),与对照组(5.8%)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,OR 为 3.428)。(表 2)



1~12 分别为:*DQB1**0504、0602/3、0301、0501/2/3、0601、0302、0604、03031、0401/2、0606、0603/4/5、0201;M:Marker

图 2 HLA-DQB1 等位基因

Fig.2 HLA-DQB1 locus allelic

讨 论

近年来,动脉粥样硬化与免疫遗传因素的关系日益得到重视。HLA 是人类最高多态的遗传系统,与疾病的免疫遗传直接相关,其在多基因遗传性疾病中起到重要作用^[2,3]。本实验旨在研究颅内动脉狭窄的免疫遗传学背景,为阐明动脉粥样硬化与动脉狭窄形成机制提供理论基础。

本研究发现缺血性卒中伴颅内动脉狭窄患者 *DQA1**0501、*DQB1**0501 等位基因频率明显高于对照组,也高于无动脉狭窄组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这种差异提示:*DQA1**0501、*DQB1**0501 基因是缺血性卒中伴颅内动脉狭窄的易感基因。另外本研究还发现狭窄组 *DQA1**0301、*DQB1**0301 等位基因频率明显高于正常对照组,差异有统计学意

义($P < 0.05$)。这种差异提示:*DQA1**0301、*DQB1**0301 基因是缺血性脑血管病发病的易感基因,此结果与沈乃莹等^[4]研究结果一致。

HLA-DQ 分子与许多多基因遗传性疾病相关,其特异性取决于庞大的等位基因多态性。Goffinet 等^[5]研究认为在自身免疫性疾病发生过程中,HLA 分子的多少影响着自身免疫反应的产生,活化的 T 淋巴细胞激活 B 淋巴细胞产生针对组织的自身抗体,而这种作用与 HLA 分子特异性有关。许多研究表明:HLA-Ⅱ 类分子的立体结构与 HLA-I 类分子相似,在细胞膜表面,其 α 肽链与 β 肽链共同构成一个可与抗原(肽)结合的槽,槽底部的核心部位与 9 个氨基酸残基结合,其结合部位分为 9 个肽结合,即 P1-P9,*DQA1* 和 *DQB1* 分子的多态性产物就位于肽结合槽内,对结合的抗原片段或肽加以限制。据推测,*DQA1**0501 和 *DQA1**0301 及 *DQA1**0103 等位基因产物在不同的肽结合基序具有不同的多态特异性,如在 P1、P7,*DQA1**0301 可以和 *DQB1**0301、*0302、*0303,在 P5 可以和 *DQB1**0301,在 P9 可以和 *DQB1**0302 构成不同的多态性结合,而 *DQA1**0103 在 P1、P9 和 *DQB1**0603 构成多态性结合^[6]。因此 HLA-Ⅱ 类抗原的等位基因多态性能够改变 HLA 分子、抗原、T 细胞受体之间的相互作用,并由此来控制对外来抗原(或自身抗原)的免疫应答。由于 HLA-Ⅱ 类基因在人群中的连锁不平衡分布导致 HLA-Ⅱ 类分子自身极大的等位基因多态性,故 HLA-Ⅱ 类基因可作为多基因遗传性疾病的一个遗传标记。

表 2 3 组之间 HLA-DQB1 等位基因频率比较

Tab.2 Comparison of HLA-DQB1 allele frequencies in 3 groups

等位基因	对照组(n=52)		狭窄组(n=15)		无狭窄组(n=49)		χ ² 值	P 值
	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)		
0201	5	4.8	4	13.3	5	5.1	3.245	0.197
0401/2	5	4.8	0	0	4	4.0	—	—
0501/2/3	11	10.6 ^a	12	40.0	18	18.3 ^a	13.911	0.001
0504	6	5.8	0	0	5	5.1	—	—
0601	18	17.3	3	10.0	7	7.1	5.051	0.080
0602/3	15	14.4	3	10.0	13	13.3	0.395	0.821
0603/4/5	8	7.7	4	13.3	5	5.1	2.329	0.312
0604	7	6.7	0	0	10	10.2	—	—
0606	7	6.7	0	0	5	5.1	—	—
0301	6	5.8	4	13.3	17	17.3 ^b	6.673	0.036
0302	7	7.7	0	0	4	4.0	—	—
03031	9	8.7	0	0	5	5.1	—	—

与狭窄组比较,^aP<0.05;与对照组比较,^bP<0.05

总之, 本研究发现 *DQA1*0501* 和 *DQB1*0501* 为缺血性卒中伴颅内动脉狭窄的易感因素, *DQA1*0301* 和 *DQB1*0301* 为缺血性卒中易感因素, 但本研究患者例数较少, 尚不能完全排除其他干扰因素的影响, 还需进一步实验方能完善颅内动脉狭窄 HLA 易感基因的研究。

参 考 文 献

[1] Olerup O, Aldemer A, Fogdell A. HLA-DQB1 and HLA-DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours[J]. Tissue Antigens, 1993, 41(1): 119-134.

[2] Woolley N, Partante J, Szegedi G, et al. Diagnostic significance of HLA-DQ typing in patients with previous coeliac disease diagnosis based on histology alone [J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2006, 24(9): 1395-1402.

[3] Chen Z, Kauwe AL, Keech C, et al. Humanized transgenic mice expressing HLA DR4-DQ3 haplotype: reconstitution of phenotype

and HLA-restricted T-cell responses[J]. Tissue Antigens, 2006, 68 (3): 210-219.

[4] 沈乃莹, 闫征, 何培英. 动脉粥样硬化性血栓性脑梗死与 HLA-DQA1 肽结合基序的相关性研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18(4): 272-274.

[5] Goffinet J, Pierre S, Schneider B. Preformed anti-human leukocyte antigen antibodies jeopardize cardiac transplantation in patient with a left ventricular assist device [J]. Heart Lung, 2002, 31 (2): 122-130.

[6] Tong JC, Zhang GL, Tan T, et al. Prediction of HLA-DQ3.2[beta] Ligands: evidence of multiple registers in class II binding peptides[J]. Bioinformatics, 2006, 22 (10): 1232-1238.

[7] Serreze DV, Marron MP, DiIorenzo TP. "Humanized" HLA Transgenic NOD Mice to Identify Pancreatic [beta] Cell Autoantigens of Potential Clinical Relevance to Type 1 Diabetes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1103(1): 103-111.

(收稿日期: 2008-10-26)

(本文编辑: 张玲)