

① 423-427

中国人重症肌无力的遗传易感性研究[†]李霞¹⁾ 朱运良²⁾ 陈军³⁾ 马洪军¹⁾ 蒋建明²⁾

R746.1

(1)西北大学生物学系,710069,西安;2)复旦大学遗传研究所,200433,上海;
3)西安庆安公司工学院,710077,西安;第一作者34岁,女,博士生)

摘要 重症肌无力与HLA II类基因关联性在不同人种和民族中具有不同遗传易感性。为探讨中国人重症肌无力(MG)与HLA-DQ分子关联性,采用聚合酶链式反应—限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,分析了50例中国正常人及49例重症肌无力患者的HLA-DQA1和-DQB1座位的基因型。结果:共检出正常人DQA1等位基因8种,DQB1等位基因10种,重症肌无力患者DQA1等位基因8种,DQB1等位基因9种。结果分析表明DQA1*0501与MG成负相关,DQB1*0302与MG成正相关。从基因水平首次用PCR-RFLP方法得出中国人重症肌无力DQ分子的易感基因型。

关键词 重症肌无力;人类白细胞膜抗原II类基因;遗传易感性;
分类号 R746.1

AChR-Ab

PCR-RFLP

重症肌无力(Myasthenia gravis, MG)是一种自身免疫性疾病(Autoimmune diseases, AID),在世界各地均有一定的发病率,严重危害人类健康。

病理学研究认为,烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)是造成MG自体免疫应答的抗原。实验证明MG患者胸腺上皮细胞含肌样纤维,胸腺细胞与骨骼肌存在共同抗原,该抗原致敏T细胞,产生抗乙酰胆碱受体的抗体(nAChR-Ab),与骨骼肌nAChR发生交叉免疫应答,使受体被阻滞、降解,因而出现无力症状。MG发病与人类主要组织相容性复合物(Major histocompatibility complex, MHG) I类抗原有关。HLA II类抗原(包括D区的DP, DQ, DR等基因产物)在发生自身免疫过程中起着重要作用。-DQ比-DR等位基因对自身免疫性疾病更具敏感性^[1]。I类抗原产物能提呈抗原给CD4⁺细胞,激活B细胞,使其增殖分化成浆细胞,释放AChR-Ab。

大量研究结果表明,HLA分子与MG的关联性在不同人种和民族中存在差异。找出这种差异的遗传因素,对于确定致病基因,明确致病机理都是至关重要的。有关MG与HLA关联性的研究,欧美学者起步较早。过去做HLA-I, I类抗原分型所采用的方法为血清学和混合淋巴细胞培养的方法,常常因基因表达过低而出现假阴性或因交叉反应及细胞生理功能改变而呈假阳性。

从80年代开始,国内外先后建立了以PCR为基础的HLA-DNA分型方法,如:PCR-RFLP, PCR-SSO, PCR-SSP, PCR-SSCP序列测定及其他技术。检索表明,在大陆、香港和中国台湾具有从血清学水平和DNA水平对MG与HLA的关联性进行研究的报道,尚未见到用PCR-RFLP方法对华人MG与HLA-DQ分子关联性进行研究的报道,探讨华人HLA-DQ分子与MG的关联性,不仅有助于了解遗传因素在疾病发病机理中的作用,而且可以促进MG诊断治疗。因此我们采用HLA基因分型的一种新的PCR-RFLP方法,即以等位基因特异性的限制酶消化基因座位特异的PCR扩增产物的方法,对江浙沪地区正常人及中国汉人MG的HLA-DQA1-DQB1基因进行了研究。现将结果报道如下。

† 国家自然科学基金青年基金资助课题(No. 39500049)

收稿日期:1998-04-08

1 材料和方法

1.1 研究对象

MG 患者由上海长海医院神经内科诊断,胸腺组织病理根据 CT 检查并结合术后病检确定。样本共 49 例,籍贯分布于江浙沪地区。正常人 DNA 标本:来自病例相同地区,共 50 例,身体健康,无 AID 病史或家族史。

1.2 基因组 DNA 的制备^[2]

用真空采血管(Nipora,日本产品)抽取静脉血 5 mL,依照 Miller 法抽提基因组 DNA。

1.3 引物设计

HLA-DQA1 基因的第二个外显子用 GH26 和 GH27 一对引物扩增;HLA-DQB1 基因的第二个外显子用 QB301, QB302, QB501 扩增^[3]。

1.4 PCR 扩增 DQA1, DQB1 目的基因

按照第 11 届国际组织相容性会议(1991)推荐的方法进行。变性、退火和延伸温度 DQA1 分别为 94℃, 56℃ 和 72℃; DQB1 则分别为 94℃, 59℃ 和 72℃。在 DNA 扩增仪(上海复旦生物实验技术研制所) FR-800 上扩增 32 个循环。对 PCR 产物以 12%PAGE 进行检测。

1.5 RFLP 分型

DQA1 扩增产物分别用 ApaI, Hph I, BsaI, Fok I (Biolabs, 美国), Mbo I (Toyobo, 日本) 酶切, 用 Mnl I (Biolabs, 美国) 以 20%PAGE 区分 *0101 和 *0102。扩增产物分别用 Hae III, Bsp1286 I, BssH I, BsaH I, Hae I (Biolabs, 美国), Apa I, Hpa I, Rsa I (Toyobo, 日本) 酶切。DQA1, DQB1 均以 12%PAGE 确定酶谱, 并均按 H. Inoko 研究组分型标准确定样品的基因型^[3]。

1.6 统计分析

MG 与 HLA-DQA1, -DQB1 各等位基因的关联通过相对危险率(relative risk, RR)和 P 值来确定, RR 依照 Haldane 公式计算。当 RR 的显著性确定后,为进一步明确表示相关等位基因对 MG 的作用, 计算病因分数 EF(RR>1 时)和预防分数 PF(RR<1 时)。P 值用 Fisher's exact test 计算(Halbau software, 1988)当 P<0.05 时具有显著差异。

2 实验结果及讨论

2.1 实验结果

用 PCR-RFLP 方法鉴定出了正常人和 MG 患者 HLA-DQA1 及 DQB1 的各等位基因, 比较了 DQA1 和 DQB1 各等位基因在正常人和 MG 患者中的分布情况, 全部结果列于表 1, 表 2。

表 1 中国汉人 MG 患者 HLA-DQA1 等位基因的分布及与正常人的比较

Tab. 1 Comparison of Gene Frequencies of HLA-DQA1 Alleles
in MG Patients with Normal Han Chinese

DQA1 等位基因	基因频率		RR	P _{corr}	EF/PF
	MG 病人 (n=98)	正常人 (n=96)			
* 0101	0.051 0	0.093 8	0.541 8	0.279 9	0.041 4*
* 0102	0.122 5	0.011 5	1.074 4	1.000 0	0.008 5
* 0103	0.102 1	0.072 9	1.415 8	0.613 2	0.030 0
* 0201	0.091 8	0.062 5	1.477 9	0.592 6	0.029 7
* 0301	0.408 2	0.322 9	1.439 6	0.235 8	0.124 6
* 0401	0.040 8	0.031 3	1.272 1	1.000 0	0.008 7
* 0501	0.102 1	0.218 8	0.416 6	0.031 5	2.011 0*
* 060 1	0.081 6	0.083 3	0.977 9	0.590 5	0.001 8*

(1)由表 1 可见,HLA-DQA1*0301 等位基因虽然在 MG 患者中频率较高,但与正常人比较并无显著差异($P_c=0.2358$)。而*0501 则与 MG 成负相关($RR=0.4166$, $P_c=0.0315$, $PF=2.0110$),可能为保护基因。

表 2 中国汉人 MG 患者 HLA-DQB1 等位基因的分布及与正常人的比较

Tab. 2 Comparison of Gene Frequencies of HLA-DQB1 Alleles
in MG Patients with Normal Han Chinese

DQB1 等位基因	基因频率		RR	Pcorr	EF/PF
	MG 病人 (n=84)	正常人 (n=100)			
*0201	0.1070	0.0400	2.6983	0.0896	0.0674
*0301	0.0480	0.0300	1.5572	0.7040	0.0170
*0302	0.1530	0.0600	2.9900	0.0307	0.1109
0303	0.0240	0.0400	0.6498	0.6896	0.0127
*0401	0.0360	0.0200	1.6920	0.6612	0.0146
0402	0.0000	0.0400	0.1262	0.1266	0.0000
*0501	0.0120	0.0000	3.6170	1.0000	0.0086
*0502	0.0120	0.0100	1.1916	1.0000	0.0019
*05031	0.0000	0.0000	1.1893	0.0000	0.0000
*05032	0.0000	0.0000	1.1893	0.0000	0.0000
*0504	0.0000	0.0000	1.1893	0.0000	0.0000
0601	0.3930	0.4300	0.8598	0.6536	0.0602
0602	0.2140	0.3100	0.6138	0.1806	0.1189
*0603	0.0000	0.0000	1.1893	0.0000	0.0000
*0604	0.0000	0.0200	0.2331	0.5011	0.0000
*0605	0.0000	0.0000	1.1893	0.0000	0.0000

注:n:等位基因总数;Pcorr:Fisher 测验修正值(Halbau software,1988);

RR:相对危险率;EF:病因分数;PF:预防分数;* :PF 值

(2)由表 2 可见,HLA-DQB1*0302 等位基因在患者中和正常人中的分布有较明显的差异和相对高的危险率($RR=2.990$, $P_c=0.0307$, $EF=0.1109$)。DQB1*0402 和*0604 的 RR 值分别为 0.1262 和 0.2331。所以推断*0302 为易感基因,而*0402 和*0604 可能为保护基因。

2.2 讨论

重症肌无力是一种累及神经肌肉接头处突触后膜上乙酰胆碱受体的自身免疫性疾病。其可能有遗传(如:家族性 MG)、免疫系统功能异常以及体内外环境等因素引起。而免疫系统功能的异常涉及 MHC(在人中即为 HLA)抗原、Ig 和 TCR 等的编码基因。目前对 HLA 基因的研究多集中在通过血清学或基因分型分析 HLA 与 MG 的关联性上,其中研究较多的是 HLA I 类基因和 II 类基因的 HLA-DQ,-DR 位点,对 HLA-DP 位点与 MG 的关联性研究则相对较少,其原因可能和 DP 与其他位点之间的关联不是很密切有关,Baisch 等认为研究 HLA-DP 位点与自身免疫性疾病的关联性对于 HLA 单体型的疾病遗传易感性研究意义不大^[4]。然而已有大量实验证明 HLA-DPB1 与多种自身免疫性疾病(至少 50 种)相关联,如 Hodgkin 病、Graves 病、类风湿性关节炎、多发性硬化症等。而且 HLA-DPB1 的多态性仅次于最富多态性的-DRB1;在抗原呈递过程中起着重要作用;-DP 与-DR 以及其他重要基因之间的连锁不平衡也曾报道^[5],因此并不能轻易否认 DPB1 与 MG 的关联性的研究意义。

近年来,国内外从血清学和基因水平对 MG 与 HLA 的关系的研究为本研究结果提供了有意义的比较。大量研究结果表明,HLA 分子与 MG 的关联性在不同人种和民族中存在差异。国内外学者曾从血清学角度研究了 HLA 与 MG 的关联性,Jawahar 认为,白种人 MG 与 HLA-A1,B8,DR3 显著相关,推测易感基因可能在 B8 附近^[6]。Dawkins 报道,香港中国人的 MG 与 HLA-Bw46,Bfs,C4A4,C4B2,DR9 显著相关^[7]。国内学者报道 MG 患者与 HLA-Bw46,DR9 有显著关联^[8]。这一发现与香港中国人

MG 患者的结果十分相似,而与白种人完全不同^[9]。

Spurkland 报道了挪威白种人非胸腺瘤型 MG 与 DQB1*0201 有相关性并进而推测与 DQA1*0501 相关^[10]。Hjelmstrom 等研究了瑞典人的 MG 患者,认为不同的 HLA-DQ 分子与 MG 具有重要相关性,其中 DQB1*0201 与 MG 成正相关,DQA1*0103 与 MG 成负相关,而 DQA1*0501-DQB1*0201 和 DQA1*0201-DQB1*0201 则为易感单体型^[11]。Khali I 等研究高加索人的 MG,发现 DQA1*01-DQB1*0201 或 DQA1*01-DQB1*0301 基因所决定的异源二聚体为 MG 致病分子。因而推测这两个单体型为疾病易感单体型^[9]。Inoko 等发现 DPB1*0201 和 DR53 与日本人 MG 密切相关,且 DQB1*03(*0301,*0302,*0303)与 MG 显著相关,这一结果与本实验结果相似。Inoko 等还提出如果研究清楚 HLA 基因与 MG 关联的碱基序列的对应关系,将有利于找出阻止 AChR-Ab 与 AChR 结合的多肽,对于临床治疗 MG 具有重要意义^[12]。对于不同人种和民族易感基因的差异,一种解释认为 MG 发生是由 MHC 区域的几个相关基因引起的,而不同群体,相关基因可能有所不同^[13]。

本实验结果说明 MG 病人的 DQB1*0302 为易感基因,这一结果与日本人 MG 病人的研究结果一致^[11]。DQ 分子易感单体型为 DQA1*0301-DQB1*0302。保护基因可能为 DQA1*0501, DQB1*0402, D604,其 RR 值分别为 0.416 6, 0.126 2 和 0.233 1。这一结果为疾病相关性研究提供了有意义的理论依据。

尽管 MG 已得到广泛研究,但有些问题仍然没有得到解决。为什么不同种族和民族对 MG 有不同的易感性。为什么有些病人没有抗乙酰胆碱受体的抗体?为什么遗传因素与疾病易感性有关?当 AChR 被自身抗体攻击时怎样调节 AChR 表达? HLA 对 MG 易感性不同,可能影响 AChR-Ab 及自身免疫状况,进而影响临床表现。但 HLA 与 MG 疾病之间的具体联系,亦即在何种机制,何种遗传背景的情况下,导致机体正常的 AChR 成为自身抗原,触发临床不同类型、不同程度的 MG 自身免疫病,仍是今后有待于进一步探索的课题。

总之,对不同人种和民族的 MG 与 HLA 的关联性进行研究,有助于致病基因的定位。随着分子遗传学技术向医学、免疫学的不断深入,在分子水平上揭示 MG 的发病机理,必将为 MG 的临床及基因治疗提供重要的理论依据。

参 考 文 献

- 1 Altmann D M, Sansom D, Marsh S G E. What is the basis for HLA-DQ associations with autoimmune disease. *Immunol Today*, 1991, 12(8): 267
- 2 Ota M, Seki T, Numura N, et al. Modified PCR-RFLP method for HLA-DQB1 and-DQA1 genotyping. *Tissue Antigens*, 1991, 38: 60
- 3 Hui K M, Bidwell J L. *Handbook of HLA Typing Techniques*. Florida: CRC. Press, 1993
- 4 Baisch J M, Capra J D. Linkage disequilibrium within the HLA complex does not extend into HLA-DP. *Scand J Immunol* 1993, 37(4): 499~503
- 5 Spurkland A, Vartdal F. Linkage disequilibrium between DPA1 and DPB1 alleles among Norwegian caucasoids and Japanese. *Tissue Antigens*, 1992, 40: 1~4
- 6 Jawahar. *HLA and Disease*. New York: Springer-Verlag, 1985, 165
- 7 Dawkins R. Association between myasthenia gravis and HLA Bw46, Bfs, C4A4, C4B2, BRw9 in Chinese. In: Bo Dupont, ed. *Immunobiology of HLA*, New York: Springer-Verlag, 1987. 437
- 8 张新根, 安家兵, 黄若群等. 儿童重症肌无力患者 HLA 超型研究. *中华神经精神病杂志*, 1992, 25(6): 358
- 9 Khali I. Trans-encoded DQ alpha beta heterodimers confer susceptibility to MG disease. *C-R-Acad-Sci-III*, 1993, 316: 652
- 10 Spurkland A N, Gihus E, Rsnning K S, et al. Myasthenia Gravis patients with thymome display different HLA associations. *Tissue Antigen*, 1991, 37~90
- 11 Hjelmstrom P, Giscombe R, Lefvert A K, et al. Different HLA DQ are positively and negatively associated in Swedish patients with myasthenia gravis. *Autoimmunity*, 1995, 22(1): 59
- 12 Horiki T, Inoko H. Combinations of HLA-DPB1 and HLA-DQB1 alleles determine susceptibility to early-onset MG

in Japan. Autoimmunity, 1994, 19(1), 49

- 13 Cowland J B, Andersen V, Halberd P, et al. DNA polymorphism of HLA class I genes in systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens, 1994, 43:34

责任编辑 徐象平

Genetic Susceptibility of Myasthenia Gravis in Chinese Patients

Li Xia¹⁾ Zhu Yunliang²⁾ Chen Jun³⁾ Ma Hongjun¹⁾ Jiang Jianming²⁾

(1)Department of Biology, Northwest University, 710069, Xi'an; 2)Institute of Genetics,

Fudan University, 200433, Shanghai; 3)College of Engineering, Qing'an Company, 710077, Xi'an)

Abstract Myasthenia Gravis (MG) is an autoimmune disease which is about a neuromuscular disorder of autoimmune origin. MG in different races or ethnic groups has different genetic susceptibility. To search for the associations of MG in Chinese patients with HLA-DQ molecules, PCR-RFLP method was employed for genotyping HLA-DQA1 and -DQB1 genes of MG patients and normal Chinese. The distribution of alleles of -DQA1 and -DQB1 genes of MG patients and normal Chinese. The distribution of alleles of DQA1 and DQB1 in normal Chinese and MG patients were listed. The DQB allele, DQB1*0302 was positively associated with MG (RR=2.990, Pc=0.0307), and a negative association was found for DQA1*0501 (RR=0.4166, Pc=0.0315). DQ haplotype DQA1*0301-DQB1*0302 was significantly increased in patients when compared to controls (RR=7.727, Pc=0.0109).

Key words myasthenia gravis; HLA class I genes; genetic susceptibility

· 学术动态 ·

我校奖励优秀科研论文

根据中国科学技术信息研究所提供的检索报告并经核实, 我校教师 1996 年发表的科技论文被 SCI (科学引文索引) 收录 20 篇, 被 EI (工程索引) 收录 15 篇, 被 ISTP (科学会议录索引) 收录 1 篇。

在 SCI 上收录论文的第一作者: 张国伟 (2 篇), 张祖训 (1 篇), 岳端宏 (1 篇), 冯文科 (1 篇), 屈长征 (1 篇), 王佩 (1 篇), 史真 (1 篇), 邱江 (2 篇), 高胜利 (1 篇), 范恒 (2 篇)。

在 EI 收录论文的第一作者: 田来科 (2 篇), 梁志钢 (1 篇), 胡庆平 (1 篇), 蔡素雯 (1 篇), 张纪岳 (1 篇), 王鼎伟 (1 篇), 陆治国 (2 篇), 贺官中 (2 篇), 杨东勤 (1 篇), 张志军 (1 篇), 吴淑荣 (1 篇), 罗毅 (1 篇)。

在 ISTP 上收录论文的第一作者为胡庆平。

为了提高我校学术地位和在国内外的学术影响, 激励广大教师和科研人员在高等级学术刊物上发表学术论文的积极性。经学校研究决定, 凡科技论文被 SCI, EI, ISTP 等著名检索工具收录的学术论文的第一作者, 均予以通报表彰, 并发给一定数量的奖金。

(薛 鲍)