

II 类人白细胞抗原等位基因与晚期肝脾型日本血吸虫病的相关性研究

章俊华* , 刘文琪 , 李雍龙** , 龙小纯

【摘要】 目的 探讨 II 类人白细胞抗原 (HLA-II) 基因多态性与晚期肝脾型日本血吸虫病的相关性。方法 用聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-SSP) 技术对 46 例晚期肝脾型日本血吸虫病患者 (实验组) 和 43 例慢性日本血吸虫病患者 (对照组) HLA-DRB1、DPA1、DQA1 和 DQB14 个基因位点的等位基因进行分型。对两组间等位基因频率的差异进行 χ^2 检验。结果 实验组 HLA-DRB1 * 04、DPA1 * 0103、DQA1 * 0601 和 DQB1 * 0201 等位基因频率明显高于对照组, 而 HLA-DQA1 * 0501 和 DQB1 * 0601 等位基因频率明显低于对照组。结论 HLA-DRB1 * 04、DPA1 * 0103、DQA1 * 0601 和 DQB1 * 0201 等位基因, 因其与晚期肝脾型日本血吸虫病呈显著的正相关 ($P < 0.05$) 而可能是该病的遗传易感基因, 而 HLA-DQA1 * 0501 和 DQB1 * 0601 等位基因与对该病存在抵抗性有关。

【关键词】 肝脾型血吸虫病; HLA-II 抗原; 等位基因

中图分类号: R532.21; R392.11

文献标识码: A

Studies on the Association of Human Leukocyte Antigen Class II Alleles with Advanced Hepatosplenic Schistosomiasis japonica

ZHANG Jun-hua , LIU Wen-qi , LI Yong-long** , LONG Xiao-chun

(Department of Parasitology , Tongji Medical College , Huazhong University of Science and Technology , Wuhan 430030 , China)

【Abstract】 Objective To study the association of human leukocyte antigen class II (HLA-II) alleles with genetic susceptibility and resistance to advanced hepatosplenic schistosomiasis japonica. **Methods** The allelic types of HLA-DRB1, DPA1, DQA1 and DQB1 were detected by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) technique in 46 patients with advanced hepatosplenic schistosomiasis, characterized with extensive liver fibrosis. Another 43 subjects with chronic schistosomiasis were used as control. The statistical significance of differences in allelic frequencies was determined by χ^2 test.

Results The frequencies of HLA-DRB1 * 04, DPA1 * 0103, DQA1 * 0601, DQB1 * 0201 in advanced patients were markedly higher than those in control group, while the frequencies of HLA-DQA1 * 0501 and DQB1 * 0601 in control group were higher than those in advanced patients. **Conclusion** The study indicated that HLA-DRB1 * 04, DPA1 * 0103, DQA1 * 0601 and DQB1 * 0201 showing a positive, statistically significant ($P < 0.05$) association with advanced hepatosplenic schistosomiasis japonica may be the susceptible genes, whereas HLA-DQA1 * 0501 and DQB1 * 0601 may be more relevant to a resistance to the disease.

【Key words】 Hepatosplenic schistosomiasis; HLA-II antigens; Alleles

Supported by the Schistosomiasis Control Committee, Hubei Province (2003-04)

** Corresponding author, E-mail: lylong@mails.tjmu.edu.cn

流行病学资料证明,人类对某些疾病的易感性或抵抗性具有个体差异。这种个体差异在基因水平上与人类主要组织相容性复合体 (MHC) 的型别有关。MHC 位于人类第 6 号染色体,分为 3 类 (I、II、III) 包括若干个基因位点,其中大部分基因位点有多个等位基因。每种型别的等位基因编码的抗原 (即人类白细胞抗原,HLA) 各不相同,其中有的与某些

疾病的发生有关,如带有 HLA-B27 抗原的人易患强直性脊柱炎,我国带有 HLA-DR3/DR9 抗原的糖尿病患者高于其他人群^[1,2]。文献报道,与 HLA 相关联的疾病多达 500 种以上^[3]。研究 HLA 与疾病的相关性,将有助于了解遗传因素对于某些疾病的发生所起的作用,对疾病的诊断、预防和预后判断均有重要意义。晚期血吸虫病患者肝、脾肿大,门脉高压及其他并发症,严重危害人类健康。但并非所有患者都会发展到晚期,有的人终生在疫区生活,频繁接触疫水,却不出现晚期病症。而有的人幼年患血吸虫病即发展为晚期。这种个体差异与患者的 HLA 等位基因的型别有

基金项目:湖北省血吸虫病防治研究委员会资助项目(2003-04)

作者单位:华中科技大学同济医学院寄生虫学教研室,武汉 430030

* 现工作单位:武汉血液中心免疫血液学研究室,武汉 430030

** 通讯作者, E-mail: lylong@mails.tjmu.edu.cn

关。作者在湖北省武汉市蔡甸区血吸虫病流行区对慢性和晚期肝脾型血吸虫病患者的白细胞抗原 4 个基因位点 HLA-DRB1、DPA1、DQA1 和 DQB1 进行等位基因分型,探讨了晚期肝脾型血吸虫病患者的遗传易感性及其与 HLA 等位基因的相关性。

材料与方法

1 研究对象

在武汉市蔡甸区,随机选取无亲缘关系、无其他肝脏疾病的汉族晚期肝脾型日本血吸虫病患者 46 例为实验组,其中男 27 例,女 19 例,年龄为 30~68 岁 (51.8 ± 10.3 岁);另选 43 例无亲缘关系的慢性日本血吸虫病患者为对照组,其中男 26 例,女 17 例,年龄为 42~75 岁 (55.3 ± 7.8 岁)。两组在暴露方式、感染程度等方面相似。根据既往有疫水接触史和虫卵检查阳性,确认两组均为血吸虫病患者。所有患者均经腹部 B 超检查,依据 WHO 标准,将肝纤维化 0 级和 1 级的患者合并为对照组^[4]。实验组的标准包括触诊脾肿大 (23 例) 或既往因门脉高压行脾切除术 (23 例),以及 B 超发现肝纤维化达到 3 级或 4 级。以上所有患者均经 B 超检查排除其他肝实质性疾病。

2 方法

2.1 引物 参考文献 [5-7], 针对上述 HLA-DRB1、DPA1、DQA1 和 DQB1 4 个基因位点的第 2 外显子多态性设计等位基因的序列特异性引物 (SSP) 56 对,可鉴别 DRB1 位点 13 个等位基因特异性, DPA1 位点 6 个等位基因特异性, DQA1 位点 10 个等位基因特异性, DQB1 位点 19 个等位基因特异性。内对照引物扩增人类生长激素基因片段,产物长度为 429 bp。以上引物均由上海博亚生物工程公司合成。

2.2 基因组 DNA 提取 取两组患者外周静脉血 2 ml, 枸橼酸钠抗凝, -80°C 保存。采用改良的快速盐析法提取基因组 DNA。紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度,制成浓度约为 $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ 的 DNA 溶液, -20°C 保存备用。

2.3 聚合酶链反应 (PCR) $10\ \mu\text{l}$ 反应体系包括: $1 \times$ PCR 缓冲液 ($1\ \text{mmol/L}$ Tris · HCl, pH 8.3; $50\ \text{mmol/L}$ KCl; $1.5\ \text{mmol/L}$ MgCl₂; 0.001% 明胶), $2\ \text{pmol}$ SSP, $0.4\ \text{pmol}$ 内对照引物, 脱氧腺苷酸 (dAMP)、脱氧胞苷酸 (dCMP)、脱氧胸苷酸 (dT-MP) 和脱氧鸟苷酸 (dGMP) 各 $200\ \mu\text{mol}$, 99.5% 丙三醇 (终浓度为 5.0%、V/V), 甲酚红 (终浓度为 0.001% W/V), 基因组 DNA $100\ \text{ng}$ 。PCR 反应条件为 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 20s, 65°C 退火 90s, 10 个循环; 94°C 变性 20 s, 61°C 退火 50s, 72°C 延伸 50s, 20 个循环。将 PCR 扩增产物上样于含有

溴化乙啶 (EB) 的 2% 琼脂糖凝胶样品孔中, $15\ \text{V}/\text{cm}$ 电泳 20 min, 紫外灯下观察分型结果。

2.4 统计分析 采用 SAS6.12 统计软件对两组计数资料进行 χ^2 检验, 当理论数 < 5 时用连续校正公式, 当理论数 < 1 时用 Fisher's 精确概率法。危险度 (RR) 采用 Woolf 法计算。

结 果

1 等位基因分型

共检出 41 种等位基因型 (表 1)。两组均未检出 HLA-DPA1 * 0104、DQA1 * 0302、DQB1 * 0504、0605、0606、0607 及 0608 等位基因型。

2 等位基因的基因频率分析

两组等位基因频率统计结果见表 1。实验组 HLA-DRB1 * 04、DPA1 * 0103 基因频率明显高于对照组, 差异有显著性意义 (χ^2 分别为 6.389 和 5.589, P 值均 < 0.05); HLA-DQA1 * 0601、DQB1 * 0201 基因频率实验组明显高于对照组, 差异有非常显著性意义 (χ^2 分别为 8.027 和 7.079, P 值均 < 0.01); 而 HLA-DQA1 * 0501 和 DQB1 * 0601 基因频率实验组明显低于对照组, 两组差异有显著性意义 (χ^2 分别为 8.350 和 7.605, P 值均 < 0.05)。其他的 HLA-DRB1、DPA1、DQA1 和 DQB1 等位基因的频率在两组间的差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

HLA 与某些疾病的关系已成为当前研究的热点之一。有关人类 3 种主要血吸虫病与 HLA 的关系也陆续报道。早期的研究仅局限 HLA 的类别与疾病的关系, 对疾病发生的可能性只能作出粗略估计^[8,9]。随着分子生物学的发展和人类基因组计划的进行, 研究工作已深入到 HLA 的等位基因型别与疾病发生的关系上, 对于疾病发生的可能性将会作出更精确的估计。

现已明确, 血吸虫病属于免疫性疾病, 血吸虫虫卵是该病的主要致病因子。虫卵沉积在宿主组织 (主要是肝脏) 中形成虫卵肉芽肿, 继而导致肝纤维化、脾肿大、门脉高压等晚期血吸虫病严重临床表现。虫卵肉芽肿的形成需 CD4^+ T 细胞参与, 而 CD4^+ T 细胞需由与 HLA-II 类相关的抗原呈递过程激活, 因此血吸虫病的发生、发展和转归均与 HLA 的型别有关。Secor 等^[10]证实巴西人的曼氏血吸虫病肝脾型的发生率与 DRB1 * 07 和 DQB1 * 0201 有关。May 等^[11]报道埃及血吸虫病引起的膀胱病变与 HLA-DPA1 * 0301、* 002021 和 * 02022 有关。

表 1 HLA-DRB1、DPA1、DQA1 和 DQB1 4 个位点等位基因的基因频率及 χ^2 检验结果
 Table 1 The alleles of HLA-DRB1、DPA1、DQA1 and DQB1 loci and their frequencies as well as the results of χ^2 test

等位基因 Allele	基因频数 Frequency		危险度 Rate of risk	χ^2 Chi-square test	P 值 P-value
	实验组 Experimental group	对照组 Control group			
	DRB1 01	1			
15	14	10	1.364	0.491	0.484
16	1	3	0.304	0.330	0.566 **
03	5	2	2.414	0.463	0.496 **
04	20	7	3.135	6.389	0.011
07	4	9	0.389	2.457	0.117
08	9	11	0.739	0.403	0.525
0901	17	18	0.856	0.169	0.681
1001	1	0	-	-	1.000 *
11	4	3	1.258	0.000	1.000 **
12	12	14	0.771	0.373	0.541
13	0	1	-	-	0.483 *
14	4	7	0.513	1.102	0.294
DPA1 0103	22	9	2.689	5.589	0.018
0201	5	11	0.392	2.940	0.086
0202	59	58	0.863	0.216	0.642
0301	0	1	-	-	0.483 *
0401	6	7	0.787	0.172	0.678
DQA1 0101	1	2	0.462	0.003	0.953 **
0102	16	15	0.996	0.000	0.993
0103	10	9	1.043	0.008	0.930
0104	6	4	1.430	0.047	0.829 **
0201	7	3	2.278	0.752	0.386 **
0301	26	20	1.300	0.581	0.446
0401	3	7	0.380	1.181	0.277 **
0501	10	24	0.315	8.350	0.004
0601	13	2	6.911	8.027	0.005
DQB1 0201	14	3	4.966	7.079	0.008
0301	15	13	1.094	0.047	0.828
0302	10	7	1.376	0.384	0.536
0303	16	16	0.921	0.044	0.833
0304	4	3	1.258	0.000	1.000 **
0401	3	2	1.416	0.000	1.000 **
0402	1	1	0.934	-	1.000 *
0501	2	1	1.889	0.000	1.000 **
0502	3	6	0.449	0.622	0.430 **
0503	2	2	0.933	0.000	1.000 **
0601	13	27	0.360	7.605	0.006
0602	8	4	1.952	1.156	0.282
0603	0	1	-	-	0.483 *
0604	1	0	-	-	1.000

* :用 Fisher's 精确概率法计算 P 值, ** :连续校正公式计算 χ^2 所得 P 值。

* :Pvalue from Fisher's exact probability test, ** :Pvalue by continuity correction formula.

Ohta 等认为日本血吸虫病肝硬化与 HLA-DR6 有关,而 Hirayama 等报告 HLA-DRB1 * 11011、* 0409 和 * 0701 与晚期肝脾型日本血吸虫病的抵抗有关^[12,13]。McManus 等发现 HLA-DRB1 的 2 个等位基因(DRB1 * 0901、DRB1 * 1302)和 HLA-DQB1 的 2 个等位基因(DQB1 * 0303、DQB1 * 0609)与晚期肝脾型日本血吸虫病的易感性有关^[14]。本研究证实,武汉市蔡甸区血吸虫病流行区晚期肝脾型血吸虫病患者的易感性与 HLA-DRB1 * 04、DPA1 * 0103、DQA1 * 0601

和 DQB1 * 0201 基因相关,而 HLA-DQA1 * 0501 和 DQB1 * 0601 基因可能是该病的抵抗基因。

HLA 抗原具有高度的多态性,不同人种,甚至不同地区的同一人种,其 HLA 抗原都有不同。本研究结果与 McManus、Hirayama 在我国其他地区进行的 HLA-II 类抗原与日本血吸虫病关联的研究结果不完全一致^[14,15]。这可能与感染人群遗传背景的差异、日本血吸虫不同的地理株或者不同的感染暴露模式等因素有关。

参 考 文 献

- [1] Gran JT, Husby G. HLA-B27 and spondyloarthropathy : value for early diagnosis[J]. J Med Genet, 1995 32 :497-501.
- [2] 宋长兴, 邱长春, 朱席琳, 等. I 型糖尿病 HLA - DRB1 等位基因分析[J]. 中国医学科学院学报, 1995 15 :321-325.
- [3] 谭建明, 周永昌, 唐孝达, 主编. 组织配型技术与临床应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 494.
- [4] World Health Organization. 1991. Meeting on ultrasoundography in schistosomiasis. Proposal for a practical guide to the standardized use of ultrasound in the assessment of pathological changes[R]. World Health Organization, Geneva; mimeographed document no: TDR. SCH/ULTRASON/91.3 3-14.
- [5] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours : an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation[J]. Tissue Antigens, 1992 39 :225-235.
- [6] Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours[J]. Tissue Antigens, 1993 41 :119-134.
- [7] Aldener-Cannava 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 :153-160.

- [8] Salam EA, Ishaac S, Mahmoud AAF. Histocompatibility linked susceptibility for hepatosplenomegaly in human schistosomiasis mansoni [J]. J Immunol, 1979 123 :1829-1831.
- [9] Wang CG, Zhu QY, Hang PY, et al. HLA and schistosomiasis japonica[J]. Chin Med J, 1984 97 :603-605.
- [10] Secor WE, del Corral H, dos Reis MG, et al. Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1 * 0201[J]. J Infect Dis, 1996 174 :1131-1135.
- [11] May J, Kreamsner PG, Milovanovic D, et al. HLA-DP control of human *Schistosoma haematobium* infection[J]. Am J Trop Med Hyg, 1998 2 :302-306.
- [12] Ohta N, Nishimura YK, Iuchi M, et al. Immunogenetic analysis of patients with post-schistosomal liver cirrhosis in mar[J]. Clin Exp Immunol, 1982 49 :493-499.
- [13] Hirayama K, Chen H, Kikuchi M, et al. Glycine-valine dimorphism at the 86th amino acid of HLA-DRB1 influenced the prognosis of post-schistosomal hepatic fibrosis[J]. J Infect Dis, 1998 177 :1682-1686.
- [14] McManus DP, Ross AG, Williams GM, et al. HLA class II antigens positively and negatively associated with hepatosplenic schistosomiasis in a Chinese population[J]. Int J Parasitol, 2001 31 :674-680.
- [15] Hirayama K, Chen H, Kikuchi M, et al. HLA-DR-DQ alleles and HLA-DP alleles are independently associated with susceptibility to different stages of post-schistosomal hepatic fibrosis in the Chinese population[J]. Tissue Antigens, 1999 53 :269-274.

(收稿日期: 2004-07-05 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2005)-01-0009-01

【 病例报告 】

重症粪类圆线虫感染并脑膜瘤、胆结石一例

苏水莲, 陈桂凤, 张瑞其

中图分类号: R532.19

文献标识码: B

2004 年 10 月, 作者诊治重症粪类圆线虫感染并脑膜瘤、胆结石 1 例, 报告如下。

1 一般情况

患者, 男性, 44 岁, 干部, 江西省遂川县人。1997 年 10 月, 右眼视觉模糊并有复视, 经医院 CT 检查诊断为脑膜瘤。粪检, 查见幼虫, 未作鉴定即诊断为蛔虫病, 给予口服肠虫清 2 片。11 月, 住院开颅做脑膜瘤剔除术, 取出脑膜瘤送省医院作病理检查, 诊断为良性肉芽肿。2001 年 3 月, 右上腹不适, 胃酸过多, 呕吐 2~3 次/d, 医院诊断为胆结石。粪检仍发现许多幼虫, 依旧诊断为蛔虫病。口服肠虫清 2 片/d, 连服 2 d。后住院做胆囊切除术 (切下的胆囊未作病理切片检查)。2004 年 9 月粪便带血丝、头晕、全腹疼痛, 经医院粪检又发现很多虫体, 患者口服左旋咪唑 150 mg, 睡前顿服, 连服 3 d。再次粪检复查仍有很多虫体, 遂送本室鉴定。

2 实验室检查及治疗

先用生理盐水直接涂片法, 显微镜下找到幼虫。再称取 1

g 粪便计数幼虫 6 880 条。用贝氏分离法收集粪便中分离的幼虫, 发现粪类圆线虫的杆状蚴和丝状蚴。第 1 疗程, 口服阿苯达唑 400 mg/d, 睡前顿服, 连服 5 d。取粪样镜检, 查见粪类圆线虫数有所下降。第 2 疗程, 增加服药天数、加大药物剂量, 10 mg/kg, Bid × 7 d。复查结果, 每克粪便查见粪类圆线虫幼虫 0~2 个。第 3 疗程, 口服噻苯达唑 25 mg/kg, Bid × 6 d。粪检结果阴转。

3 讨论

本例患者粪检查见大量幼虫, 长达 7 年, 被误诊为蛔虫感染, 进行驱蛔治疗。虽曾口服阿苯达唑和左旋咪唑, 但因粪类圆线虫对驱虫药耐受性较强, 常规驱虫难以杀灭。粪类圆线虫杆状蚴可迅速发育为具有感染性的丝状蚴, 引起重度自身反复感染, 并出现多种并发症。这种再感染引起极高的虫负荷 (超感染综合症)。丝状蚴在体内移行时可侵入脑膜、肝脏及胆囊, 形成肉芽肿, 压迫周围组织出现脑膜瘤和胆结石等播散性症状。因此, 对感染粪类圆线虫患者出现的并发症, 首先要进行驱虫治疗, 首选药物为噻苯达唑。如用阿苯达唑治疗应适当加大剂量并延长疗程, 并要进行长期粪检和随访。

(收稿日期: 2004-11-01 编辑: 富秀兰)