

# 汉坦病毒感染者与非感染者 HLA-B、DQ 基因单核苷酸多态性研究

李琦, 韩旭, 魏亚梅, 韩占英, 张艳波, 齐顺祥, 许永刚  
河北省疾病预防控制中心病毒病防治所, 石家庄 050021

**摘要:** **目的** 分析肾综合征出血热(HFRS)患者和健康人群 HLA-B 及 HLA-DQ 基因区域的单核苷酸多态性(SNP)位点, 探讨人感染汉坦病毒与其遗传特性间的关联性。**方法** 采用等位基因特异性引物扩增(ASP-PCR)技术对 HLA-B 及 HLA-DQ 区域上的 5 个 SNP 位点进行扩增, 利用病例对照研究探讨 SNP 与人群汉坦病毒感染状态之间的关系。**结果** 筛选 HFRS 患者阳性标本 24 份, 同时采集与病例相匹配的健康人群标本 51 份。rs34933313 位点患者组和对照组的 CC 基因型频率分别为 4.17% 和 29.41%, GG 基因型为 12.50% 和 15.69%, CG 基因型为 83.33% 和 54.90%, CC、GG 基因型频率患者组低于对照组, CG 基因型频率患者组高于对照组, 且二者之间差异有统计学意义( $\chi^2=7.050, P=0.029$ )。其他 4 个位点两组间的差异均无统计学意义。**结论** rs34933313 位点的基因多态性可能与人群汉坦病毒感染有关, 可能会增加人群感染该病毒的风险。HLA-B 基因可能与人群感染汉坦病毒存在相关性。

**关键词:** 肾综合征出血热; 汉坦病毒; 单核苷酸多态性

**中图分类号:** R373.3+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2014)05-0438-03

**DOI:** 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.05.014

## Study on single nucleotide polymorphisms in HLA-B gene and HLA-DQ gene among Hantavirus-infected and non-infected populations

LI Qi, HAN Xu, WEI Ya-mei, HAN Zhan-ying, ZHANG Yan-bo, QI Shun-xiang, XU Yong-gang  
Hebei Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050021, Hebei Province, China

**Abstract: Objective** To analyze the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in HLA-B gene and HLA-DQ gene in hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) patients and healthy people and to study the relationship between Hantavirus infection and genetic characteristics of humans. **Methods** Five SNPs in HLA-B gene and HLA-DQ gene were amplified using allele-specific primer PCR (ASP-PCR). The association between SNPs and Hantavirus infection was investigated by case-control study. **Results** According to the result of the HFRS antibody diagnostic assay, 24 Hantavirus-positive whole blood samples were included. Negative samples were collected from 51 healthy people. The frequencies of CC genotype of rs34933313 in the case group and control group were 4.17% and 29.41%, respectively; the frequencies of GG genotype were 12.50% and 15.69%, respectively; the frequencies of CG genotype were 83.33% and 54.90%, respectively. The frequencies of CC and GG in the case group were significantly lower than those in the control group, and the frequency of CG genotype in the case group was significantly higher than that in the control group; significant difference in the genotype of rs34933313 was found between the two groups ( $\chi^2=7.050, P=0.029$ ). No significant difference was found at any of the other four sites. **Conclusion** SNP at rs34933313 might be associated with Hantavirus infection and may increase the risk of Hantavirus infection in humans. HLA-B gene is probably related to Hantavirus infection in humans.

**Key words:** Hemorrhagic fever with renal syndrome; Hantavirus; Single nucleotide polymorphism

我国是受肾综合征出血热(HFRS)危害最为严重的国家,该病是由汉坦病毒(Hantavirus, HV)感染引起的,每年报告发病数占全球总数90%以上<sup>[1-2]</sup>。河北省是HFRS的高发省份,自1981年发现首例患者至今,每年都有病例发生。HFRS的具体发病机制尚不完全明确,除有HV的直接作用外,机体的免疫状态和对HV的遗传易感性等因素也发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,

**作者简介:** 李琦,男,博士,主任医师,主要从事自然疫源性疾病预防工作,Email: liqinew@126.com

SNP)是在基因组上单个核苷酸的变异,其发生率在人群中>1%<sup>[4]</sup>,并可导致机体对慢性损伤反应具有明显的个体差异,影响人群对于疾病的易感性和疾病严重程度。本研究从基因多态性入手,选取HLA-B及HLA-DQ基因,应用等位基因特异性引物扩增(ASP-PCR)技术,对河北省HFRS患者和健康人群HLA-B及HLA-DQ基因上的5个SNP位点进行基因分型,探讨这些SNP位点的基因多态性与HFRS发病的关联性,为疾病的易感性提供遗传方面的证据,同时为该疾病预防及治疗措施的研究和应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验标本 筛选 HFRS 患者阳性全血标本 24 份,同时选择与病例相匹配的未检测到 HV 的健康人群全血 51 份为对照组。标本由河北省疾病预防控制中心病毒所提供。

1.2 SNP 位点的选取与引物合成 通过 NCBI 查找与疾病相关的 SNP 位点。选择 HLA-B 基因的 SNP 位点 rs71543422、rs34933313、rs41557013 和 HLA-DQ 基因的 rs12722040、rs1142324。设计特异性引物(表 1),并由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 SNP 位点及其引物

Table 1 SNPs and primers in this study

ID 号	等位基因	特异性引物	目的条带长度 (bp)	退火温度 (°C)
rs41557013	C/T	F1:AGGACCAAACCTCAGGACAC F2:AGGACCAAACCTCAGGACAT RP:AGCAACAATGCCACGAT	296	59
rs71543422	C/T	F1:GTCGTAGCGCAACTGGTC F2:GTCGTAGCGCAACTGGTT RP:CGCGTTTACCCGGTTTCA	190	58
rs12722040	C/T	F1:TCGCTCTGACCACCGTGAC F2:TCGCTCTGACCACCGTGAT RP:CTGCTGGACTCCTTTACC	574	59
rs1142324	C/T	F1:CTGGAGAGGAAGGAGACTGC F2:CTGGAGAGGAAGGAGACTGT RP:AATGAACCTGGTATGGA	208	59
rs34933313	C/G	F1:CACAGTGCAGCTCACTCAGC F2:CACAGTGCAGCTCACTCAGG RP:TGGTGGTCTACCCCTTGA	186	60

1.3 基因组 DNA 的提取 将全血标本使用天根生物的试剂盒进行基因组 DNA 的提取,-20 °C 保存备用。

1.4 ASP-PCR 扩增 ASP-PCR 反应体系共 20 μl,其中 5×buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)4 μl,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl,dNTP(10 mmol/L) 0.1 μl,Taq DNA 聚合酶 2 U,模板 DNA 3.5 μl。反应条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,59 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 35 次扩增,循环结束后 72 °C 继续延伸 7 min,扩增产物 4 °C 保存。

1.5 电泳及结果判读 取 8 μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。根据电泳结果判读,若引物 F1 扩增出目的片段,而引物 F2 没有,则此位点的等位基因型为 M/M 型;如果引物 F1 和 F2 均扩增出目的片段,此位点的等位基因型为 W/M 型;若引物 F2 扩增出目的片段,而引物 F1 没有,此位点的等位基因型为 W/W 型。

1.6 数据分析 SNP 位点的基因型频率采用直接计数法获得,各位点基因频率的群体代表性使用哈-温平衡法(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。各 SNP 位点基因型频率的差异性比较采用  $\chi^2$  检验( $\alpha=0.05$ )。

## 2 结果

2.1 SNP 位点基因型鉴定 75 份标本在 5 个 SNP 位点上均扩增出目的片段,各位点不同基因型的鉴定结果如表 2 所示。

表 2 各 SNP 位点的基因扩增结果  
Table 2 The genotyping results at each SNP site

位点	标本量 (份)	目的片段长度 (bp)	基因型				
			CC	CT	TT	CG	GG
rs40557013	75	296	19	46	10	-	-
rs71543422	75	190	18	45	12	-	-
rs12722040	75	574	9	42	24	-	-
rs1142324	75	208	22	38	15	-	-
rs34933313	75	186	16	-	-	48	11

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验 将 5 个 SNP 位点基因型的观察人数利用哈-温平衡定律进行检验。经统计分析,各 SNP 位点实际基因型频率与理论基因型频率差异无统计学意义,其分布均符合哈-温平衡,标本的选择有较好的群体代表性(表 3)。

表 3 哈-温平衡检验

Table 3 Hardy-Weinberg equilibrium test for each SNP site

位点 ID	基因型			$\chi^2$ 值	P 值
	CC	CT	TT		
rs40557013	观察人数	19	46	2.375	0.308
	预期人数	23	15		
rs71543422	观察人数	18	45	1.752	0.416
	预期人数	22	16		
rs12722040	观察人数	9	42	1.067	0.587
	预期人数	12	27		
rs1142324	观察人数	22	38	0.036	0.982
	预期人数	23	15		
rs34933313	观察人数	16	48	3.297	0.192
	预期人数	22	16		

2.3 各 SNP 位点基因型频率在患者组和对照组的分布 患者组和对照组在 rs34933313 位点 CC 基因型频率分别为 4.17% 和 29.41%,CG 为 83.33% 和 54.90%,GG 为 12.50% 和 15.69%。CC 和 GG 基因型频率患者组均低于对照组,CG 基因型频率患者组高于对照组,患者组与对照组基因型频率的差异有统计学意义( $\chi^2=7.050, P=0.029$ ),可以认为该位点的基因多态性会增加人群感染 HV 的风险(表 4)。

rs41557013 位点患者组和对照组 CC 基因型频率分别为 29.17% 和 23.53%,TT 为 20.83% 和 9.80%,CT 为 50.00% 和 66.67%,患者组与对照组基因型频率的差异

**表 4** 患者组与对照组 rs34933313 位点基因型频率分布  
**Table 4** Genotype frequency distribution of rs34933313 between the case group and control group

组别	例数	基因型频率(%)		
		CC	CG	GG
患者组	24	1(4.17)	20(83.33)	3(12.50)
对照组	51	15(29.41)	28(54.90)	8(15.69)
$\chi^2$ 值		7.050		
P值		0.029		

无统计学意义,尚不能认为该位点的基因多态性与疾病的发生存在关系( $\chi^2=2.433, P=0.296$ );rs71543422 位点的 CC 基因型频率分别为 37.50% 和 17.65%, TT 为 16.67% 和 15.68%, CT 为 45.83% 和 66.67%, 患者组与对照组基因型频率的差异无统计学意义( $\chi^2=3.871, P=0.144$ ),尚不能认为该位点的基因多态性与疾病的发生存在关系;rs12722040 位点的 CC 基因型频率分别为 12.50% 和 11.76%, TT 为 33.33% 和 31.37%, CT 为 54.17% 和 56.87%, 患者组与对照组基因型频率的差异无统计学意义( $\chi^2=0.048, P=0.976$ ),尚不能认为该位点的基因多态性与疾病的发生存在关系;rs1142324 位点的 CC 基因型频率分别为 12.50% 和 37.25%, TT 为 25.00% 和 17.65%, CT 为 62.50% 和 45.10%, 患者组与对照组基因型频率的差异无统计学意义( $\chi^2=4.826, P=0.090$ ),尚不能认为该位点的基因多态性与疾病的发生存在关系。

综合以上结果可以看出,rs34933313 位点的基因多态性可能与 HV 感染有关,可能会增加人群感染 HV 的风险。其余 4 个位点尚未发现其基因多态性与疾病的发生存在关系。HLA-B 基因可能与人群感染 HV 存在相关性。

### 3 讨论

HLA 系统是目前所知人体最复杂的多态系统,在机体的免疫系统中发挥着重要作用。具有高度的多态性,一些遗传性状与疾病有着密切的关系,是研究疾病易感性最不可忽视的遗传因素。HLA-I 和 HLA-II 类基因在调控机体实施免疫应答中发挥着重要作用。本研究选取的 HLA-B、HLA-DQ 基因即分别来自上述基因<sup>[5-6]</sup>。有报道显示 HLA-B 基因影响着人群对于 SARS 的易感程度<sup>[7]</sup>,但也有研究表示其基因多态性与 SARS 的发生无关<sup>[8]</sup>,可见 HLA-B 基因是否影响某些疾病的发生还存在不确定性。

作为第 3 代遗传标记的 SNP 具有密度高、易分析等优点。因此,该技术已经应用在复杂性疾病易感性研究上,研究某个位点的基因频率与疾病之间的关联性。目前已有阿尔茨海默病、乳腺癌、糖尿病、冠心病等诸多复杂疾病完成了全基因组关联的分析研究<sup>[9]</sup>。

病例对照研究是相关性研究经常使用的实验方法,通过比较病例组和对照组之间遗传标记的差别,确定研究人群对疾病的易感性或拮抗性与该遗传标记的关联性。迄今为止,一些疾病的易感和拮抗基因已被成功确定,如 HLA-DR2 基因与结核病和麻风病<sup>[10]</sup>、SDF-1/CCR/IL-10 与艾滋病等<sup>[11]</sup>。可见利用 SNP 进行关联分析在研究中应用广泛和灵活,已成为揭示疾病和等位基因间关联性的最佳方法。

通过分析 HFRS 患者组和对照组在 HLA-B 及 HLA-DQ 基因上的 5 个 SNP 位点基因多态性可知,位于 HLA-B 基因上 rs34933313 位点的基因多态性可能与 HV 感染有关,可能会增加人群感染 HV 的风险。HLA-B 基因上的其余 2 个位点和 HLA-DQ 基因上的位点在本次实验中尚未发现与 HV 感染相关。本实验证实 HLA-B 基因与人感染 HV 存在关联,该基因可能在 HV 的感染机制上起着重要作用,对于关联的强度大小,要想获得更加肯定的结论,还需进一步扩大样本进行研究。HLA-DQ 基因上的 2 个 SNP 位点均未发现与人感染 HV 存在关联性,可能与位点的选择有关,HLA-DQ 基因与人感染 HV 是否相关,还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 王芹,周航,李德新,等. 2009 年中国肾综合征出血热监测分析[J]. 疾病监测, 2010, 25(12):938-943.
- [2] Liu X, Jiang B, Gu W, et al. Temporal trend and climate factors of hemorrhagic fever with renal syndrome epidemic in Shenyang city, China[J]. BMC Infect Dis, 2011, 2(11):331.
- [3] 于丹萍. 肾综合征出血热临床发病学的研究进展[J]. 中华内科杂志, 1997, 36(1):66-68.
- [4] Brookes AJ. The essence of SNPs[J]. Gene, 1999, 234(2):177-186.
- [5] Yossef R, Rosental B, Appel MY, et al. Upregulation of MHC class I expression following Dengue virus infection: the mechanism at the promoter level[J]. Expert Review Anti-Infect Therapy, 2012, 10(3):285-287.
- [6] Othman S, Rahman NA, Yusof R. Induction of MHC Class I HLA-A2 promoter by Dengue virus occurs at the NFkappaB binding domains of the Class I Regulatory Complex[J]. Virus Research, 2012, 163(1):238-245.
- [7] 陈振锋,魏茂提,胡役兰,等. HLA-B 基因多态性与严重急性呼吸综合征冠状病毒易感性关系研究[J]. 中国预防医学杂志, 2010, 11(1):43-47.
- [8] Xiong P, Zeng X, Song MS, et al. Lack of association between HLA-A, -B and -DRB1 alleles and the development of SARS: a cohort of 95 SARS-recovered individuals in a population of Guangdong, southern China[J]. Int J Immunogenet, 2008, 35(1):69-74.
- [9] 汪玉洁,白云,王升跃. 功能性 SNP 的筛选方法及其在疾病易感性研究中的应用[J]. 医学综述, 2013, 19(3):385-388.
- [10] Teran-Escandon D, Teran-Ortiz L, Camarena-Olvera A, et al. Human leukocyte antigen - associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligo nucleotide hybridization in Mexican patients[J]. Chest, 1999, 115(2):428-433.
- [11] Liu H, Chao D, Nakayama EE, et al. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(8):4581-4585.