

# HLA 单倍型与汉族人瘢痕疙瘩不同表型相关性研究

陆闻生 郑晓冬 周燕 周海林 蒋法兴 张思平 胡白

**【摘要】 目的** 不同种族人群瘢痕疙瘩患者 MHC 单倍型连锁已被证实。本文旨在研究不同发病严重程度和家族史的中国汉族人瘢痕疙瘩患者其不同的 MHC 单倍型连锁。**方法** 利用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)法,对192例瘢痕疙瘩患者及252例健康对照进行PCR反应,分析单倍型的分布情况,探讨汉族人瘢痕疙瘩与HLA单倍型的相关性。**结果** (1)10个二位点单倍型与瘢痕疙瘩发病呈正相关;(2)携带A\*25-B\*07和B\*07-DRB1\*15单倍型的瘢痕疙瘩患者更多表现为有阳性家族史;(3)携带HLA-A\*25-B\*07、B\*07-DRB1\*15和DQA1\*0104-DQB1\*0503单倍型的瘢痕疙瘩患者更多的表现中等严重程度。**结论** 本研究证实了在中国汉族人群瘢痕疙瘩患者体内存在着与其他种族不同的HLA抗原连锁,携带某种单倍型的人群可能更倾向于表现为某种临床表型,不同临床表型可能存在遗传异质性。

**【关键词】** 瘢痕疙瘩; HLA 抗原; 单倍性; 聚合酶链反应

瘢痕疙瘩(Keloids, OMIM No. 148100)是皮肤损伤后引发的胶原异常积累所致的过度瘢痕化,是人类特有的一种病理愈合现象。瘢痕疙瘩是皮肤科和整形外科领域的常见病,多发病。瘢痕疙瘩可发生于所有人群,流行病学调查表明,有色人种如黑种人和黄种人瘢痕疙瘩的发生率明显高于白种人,黑人发病率约为白人的5~15倍,黑种人、欧洲白种人、亚洲黄种人发病率在4.5%~16%,最高可接近20%<sup>[1]</sup>。由于病因不明,发病机制复杂及种族和个体差异,目前尚无十分有效的根治方案<sup>[2]</sup>。该病好发于胸骨区,亦可见于肩部,面部,颈部和耳部等处,病程慢性迁延,严重影响患者的容貌,形象及自我评价,进而在很大程度上影响患者的心理健康<sup>[3-4]</sup>。同时继发于烧伤,烫伤者可形成大面积损害,严重者可影响受累肢体功能,给患者身心健康带来严重影响,给家庭和社会带来沉重的负担<sup>[3]</sup>。瘢痕疙瘩的病因复杂,其发病机制尚未完全阐明,目前普遍认为该病是一种多基因或基因与环境因素共同作用的一种复杂性疾病。大量研究表明遗传因素与疾病发病密切相关。其中免疫遗传因素在瘢痕疙瘩的发病中起着重要作用<sup>[5-10]</sup>。因此,寻找瘢痕疙瘩免疫遗传相关易感基因并探讨其功能是从根本上揭示疾病病因和发病机制的重要途径,对今后疾病的预防和治疗方案的改进具有重要意义,也可能揭示基底成纤维细胞异常增殖的分子遗传学机制,从而有助于其他瘢痕性疾病的研究。近年来人们对免疫遗传研究主要集中在人类主要组织相容性抗原复合体(major histocompatibility complex, MHC),然而,至今与瘢痕疙瘩相关的MHC区域易感基因未能被真正确认。本实验应用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)技术观察瘢痕疙瘩及其不同表型与HLA单倍体的相关性,为进一步探讨免

疫遗传学因素在瘢痕疙瘩的发病机理中的作用提供理论依据。

## 一、资料与方法

1. 检测对象:瘢痕疙瘩组为2010年8月至2012年12月安徽省立医院、安徽六安市人民医院、徐州医学院附属医院、无锡二院门诊就诊的瘢痕疙瘩患者,均符合瘢痕疙瘩的诊断标准。肥厚性瘢痕和其他伴有瘢痕疙瘩的综合征患者均被排除在外。研究人群包括91例男性患者和101例女性患者,年龄2~79岁,平均31.54岁;每例患者均填写知情同意书。对照组为同期在门诊就诊的非瘢痕疙瘩患者或外科住院患者的健康家属,无血缘关系,共收集血标本252份,年龄5~70岁,平均(32.40±10.05)岁,其中男124例,女128例。两组性别、年龄构成均无统计学差异。本研究采用统一设计的瘢痕疙瘩流行病学调查表,由经过专业培训的调查员以相同的态度对先证者及正常对照进行问卷调查。调查表内容包括一般情况(姓名、年龄、性别、住址、电话、文化程度和婚姻状况等),发病年龄,疾病病程,发病部位,皮损形状、数目和面积,皮损特点及严重程度评分。选用瘢痕疙瘩的颜色(正常、淡红和赤红)、高度(平坦、1~4 mm、5~8 mm和8 mm以上)、质地(正常、稍软、硬如橡皮和硬如软骨)、是否瘙痒(无、偶尔、时常和剧烈)和疼痛(无、有时、经常和剧烈)作为病情轻重程度的指标。每项指标根据临床表现赋予0~3分,分数越高代表病情越重。综合评分为0~15分,再将其分为0~5分(轻度)、6~10分(中度)和11~15分(重度)三组。记录每位患者瘢痕疙瘩的数量和发生部位。

2. 血标本收集:每例受检者收集2 ml,全血放入含枸橼酸钠的试管内,2000 r/min离心10 min,取出其中的白细胞,置于2 ml离心管内,放入-85℃冰箱保存。

3. 基因组DNA制备:采用改良盐析法从分离的细胞中提取基因组DNA,用紫外分光光度计测DNA原液吸光度,算出DNA原液浓度,用灭菌双蒸馏水将DNA模板配制成质量浓度为50 ng/μl的使用液,置于-20℃冰箱保存。

4. 等位基因序列特异性引物:按文献合成序列特异性引物

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.23.168

基金项目:2011年度国家青年基金(81101185);2011年度安徽省青年基金(1104606Q13)

作者单位:230001 合肥,安徽医科大学附属医院安徽省立医院皮肤科(陆闻生、周海林、蒋法兴、张思平、胡白),放射科(周燕);安徽医科大学第一附属医院皮肤科(郑晓冬)

通讯作者:胡白, Email: hu\_bai@126.com

及内对照引物<sup>[11]</sup>。利用 PCR-SSP 法分析 HLA-A、B、Cw、DQA1、DQB1、DRB1 各座位等位基因及单倍型的分布情况。另外合成 2 条内参照引物,用于扩增 HLA-DRB1 基因第 3 内含子 796 bp 片段的保守序列。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

5. PCR 反应及产物检测: 每个反应总体积 10 μl, 双蒸水 2.9 μl, 内参照引物 (2.0 μmol/L) 1.0 μl, 1.25 nmol/L dNTP 1.0 μl (上海生工生物工程技术有限公司) 10 倍缓冲液 (含 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 1.0 μl, 等位基因特异性引物 (10 mmol/L, P3', 等位基因特异引物 (10 mmol/L, P5') 0.5 μl, Taq 酶 (5 U/μl) 0.1 μl, 待测基因组 (50 ng/μl) 3.0 μl。采用 Touch-Down PCR 程序 1: 94 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 退火温度从 70 °C 开始, 每个循环下降 0.5 °C, 退火时间 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min。PCR 反应在 T-Gradient PCR 仪 (德国 Biometra 公司) 上进行。将 PCR 产物加 2 μl 溴酚蓝上样缓冲液, 在 2% 琼脂糖凝胶 (内含 0.5 μg/溴化乙啶) 上进行, 在 AAB 紫外线透射凝胶成像仪系统 (Advanced American

Biotechnology 公司产品) 观察结果。

6. 数据处理: 等位基因频率 (AF)、连锁不平衡 (LD, 即 Δ)、单倍型频率 (P<sub>AB</sub>)、连锁不平衡值 (Δ<sub>AB</sub>) 的计算见文献<sup>[12]</sup>。采用 Info Epi6、SPSS 软件对瘢痕疙瘩患者及正常人对照, 不同严重程度、发病是否有家族史及正常人对照间进行等位基因频率比较。比较采用 χ<sup>2</sup> 检验, 以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

二、结果

HAL- I、II 类等位基因间的两点单倍型连锁不平衡分析, 10 个二位点单倍型与瘢痕疙瘩发病呈正相关结果见表 1。以上基因间的连锁均有统计学意义 (P < 0.05)。携带 A\*25-B\*07 (χ<sup>2</sup> = 3.36, P < 0.05) 和 B\*07-DRB1\*15 (χ<sup>2</sup> = 17.82, P < 0.05) 单倍型的瘢痕疙瘩患者更多表现为有阳性家族; 携带 HLA-A\*25-B\*07 (χ<sup>2</sup> = 4.03, P < 0.05), B\*07-DRB1\*15 (χ<sup>2</sup> = 5.53, P < 0.05) 和 DQA1\*0104-DQB1\*0503 (χ<sup>2</sup> = 20.66, P < 0.05) 单倍型的瘢痕疙瘩患者更多的表现中等严重程度。表明不同类型的瘢痕疙瘩患者可能有不同的遗传基础 (表 2~6)。

表 1 汉族人瘢痕疙瘩患者表现明显相关性的 HAL- I、II 类等位基因间两点单倍型连锁不平衡分析[例, (%) ]

组别	例数	A*03-B*07	A*03-Cw*0802	A*25-B*07	A*25-Cw*0802	B*07-Cw*0802
对照组	252	0	0	2(0.79)	6(2.38)	4(1.59)
患者组	192	8(4.17)	11(5.73)	8(4.17)	23(11.98)	15(7.81)
OR		undefined	undefined	5.43	5.58	5.25
95% CI				1.06~37.48)	2.10~15.65	1.60~19.07
Δ <sub>AB</sub>		0.0225	0.0294	0.0219	0.068	0.0423
P <sub>AB</sub>		0.0172	0.016	0.014	0.0479	0.0268
P 值		0.0011	0.0001	0.023	0.0001	0.0029
组别	例数	B*07-DQB1*0501	B*07-DRB1*15	DQA1*0104-DQB1*0501	DQA1*0104-DQB1*0503	DQB1*0503-DRB1*15
对照组	252	0	2(0.79)	2(0.79)	3(1.19)	1(0.40)
患者组	192	10(5.21)	10(5.21)	17(8.85)	23(11.98)	10(5.21)
OR		undefined	6.87	12.14	11.30	13.79
95% CI			1.39~45.94	2.65~77.07	3.16~48.02	1.80~290.51
Δ <sub>AB</sub>		0.0217	0.001	0.0377	0.036	0.0006
P <sub>AB</sub>		0.0079	0.0245	0.0026	0.0065	0.0265
P 值		0.0002	0.0109	0.0001	0.0000	0.0014

注: OR 为比值比, CI 为可信区间

表 2 HAL- I、II 单倍型在有家族史的瘢痕疙瘩患者组和对照组中的分布 (例)

组别	例数	A*03-B*07	A*03-Cw*0802	A*25-B*07	A*25-Cw*0802	B*07-Cw*0802
对照组	252	0	0	2	6	4
有家族史患者组	57	3	2	3	5	4
χ <sup>2</sup> 值		8.48	4.28	3.36	3.83	3.5
P 值		0.006	0.0335	0.0453	0.034	0.041
组别	例数	B*07-DQB1*0501	B*07-DRB1*15	DQA1*0104-DQB1*0501	DQA1*0104-DQB1*0503	DQB1*0503-DRB1*15
对照组	252	0	2	3	4	1
有家族史患者组	57	1	7	8	4	4
χ <sup>2</sup> 值		0.66	17.82	18.75	3.5	8.98
P 值		0.1845	0.0001	0.0001	0.041	0.0046

表3 HAL- I、II单倍型在无家族史的瘢痕疙瘩患者组和对照组中的分布(例)

组别	例数	A*03-B*07	A*03-Cw*0802	A*25-B*07	A*25-Cw*0802	B*07-Cw*0802
对照组	252	0	0	2	6	4
无家族史患者组	135	5	9	5	18	11
$\chi^2$ 值		6.77	14.39	2.71	16.29	8.47
P 值		0.0049	0.0001	0.0532	0.0001	0.0036

  

组别	例数	B*07-DQB1*0501	B*07-DRB1*15	DQA1*0104-DQB1*0501	DQA1*0104-DQB1*0503	DQB1*0503-DRB1*15
对照组	252	0	2	3	4	1
无家族史患者组	135	9	3	15	9	6
$\chi^2$ 值		14.39	0.51	17.34	5.51	5.99
P 值		0.0001	0.3476	0.0000	0.0144	0.0083

表4 HLA - I、II单倍型在轻度瘢痕疙瘩患者组和对照组中的分布(例)

组别	例数	A*03-B*07	A*03-Cw*0802	A*25-B*07	A*25-Cw*0802	B*07-Cw*0802
对照组	252	0	0	2	6	4
轻度患者组	38	1	0	1	2	1
$\chi^2$ 值		1.20	-	0.03	0.23	0.04
P 值		0.1310	-	0.3449	0.2822	0.5071

  

组别	例数	B*07-DQB1*0501	B*07-DRB1*15	DQA1*0104-DQB1*0501	DQA1*0104-DQB1*0503	DQB1*0503-DRB1*15
对照组	252	0	2	3	3	1
轻度患者组	38	2	2	3	1	3
$\chi^2$ 值		6.78	2.12	4.39	0.00	8.69
P 值		0.0168	0.0847	0.0315	0.4316	0.0076

表5 HLA - I、II单倍型在中度瘢痕疙瘩患者组和对照组中的分布(例)

组别	例数	A*03-B*07	A*03-Cw*0802	A*25-B*07	A*25-Cw*0802	B*07-Cw*0802
对照组	252	0	0	2	6	4
中度患者组	137	3	8	6	18	11
$\chi^2$ 值		3.07	12.27	4.03	15.93	8.27
P 值		0.0431	0.0002	0.0249	0.0001	0.0040

  

组别	例数	B*07-DQB1*0501	B*07-DRB1*15	DQA1*0104-DQB1*0501	DQA1*0104-DQB1*0503	DQB1*0503-DRB1*15
对照组	252	0	2	3	3	1
中度患者组	137	6	7	11	17	5
$\chi^2$ 值		8.51	5.53	10.07	20.66	4.23
P 值		0.0018	0.0108	0.0001	0.0000	0.0221

表6 HLA - I、II单倍型在重度瘢痕疙瘩患者组和对照组中的分布(例)

组别	例数	A*03-B*07	A*03-Cw*0802	A*25-B*07	A*25-Cw*0802	B*07-Cw*0802
对照组	252	0	0	2	6	4
重度患者组	17	4	3	1	3	3
$\chi^2$ 值		45.20	30.39	0.55	7.24	10.49
P 值		0.0000	0.0002	0.1785	0.0140	0.0063

  

组别	例数	B*07-DQB1*0501	B*07-DRB1*15	DQA1*0104-DQB1*0501	DQA1*0104-DQB1*0503	DQB1*0503-DRB1*15
对照组	252	0	2	3	3	1
重度患者组	17	2	1	3	1	2
$\chi^2$ 值		16.05	0.55	12.95	0.26	9.78
P 值		0.0038	0.1785	0.0038	0.2310	0.0109

三、讨论

目前已有越来越多的证据表明瘢痕疙瘩是一种遗传性疾病<sup>[13-14]</sup>。首先, 瘢痕疙瘩更加容易出现在肤色较深的民族; 其次, 家族遗传性和双胞胎中的高发病率也显示瘢痕疙瘩具有遗传性。 瘢痕疙瘩的遗传学研究多集中在瘢痕疙瘩相关基因的表达水平上, 其中较多的集中在瘢痕疙瘩与 P53 基因、FAS 基因、c-myc、c-fos、ras 基因、Bcl-2 家族、ICE 家族等各种凋亡

基因以及细胞因子 TGF- $\beta$ 、IL 等相关性研究<sup>[15-17]</sup>, 但也只是停留在探索性研究阶段, 迄今为止尚未有统一的定论。近年来, 免疫遗传因素在异常瘢痕形成的重要性越来越受到重视。一些研究已经表明免疫遗传因素在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的发病机制起到一定的作用。Santucci 等在对增生性瘢痕和瘢痕疙瘩调查研究中发现瘢痕疙瘩皮损组织有大量的免疫细胞浸润, 其中包括 CD3<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞。目前免疫遗传研

究热点主要集中在主要组织相容性复合体(MHC),即作为已知的人类白细胞抗原(HLA)系统。人类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)编码的基因是位于人类第6对染色体短臂上紧密连锁的基因群。此区域是人类基因组中基因密度极高的区域之一,是免疫功能相关基因中最集中、最多的一个区域,是迄今所知人类基因多态性最丰富的一个区域,是与疾病关联最为密切的一个区域<sup>[18]</sup>。早在1977年Laurentaci和Dioguardi等首次报道了HLA-B14和B16抗原与瘢痕疙瘩发病显著相关,此后,国内外一些学者陆续对HLA等位基因与瘢痕疙瘩的相关性进行研究,不断发现了和瘢痕疙瘩及其不同临床表型的相关性位点,然而国内对瘢痕疙瘩的遗传学研究较少。HLA复合体是一组紧密连锁的基因群。这些连锁在一条染色体上的等位基因很少发生同源染色体间的交换,构成单倍型。在遗传过程中,HLA单倍型作为一个完整的遗传单位由亲代遗传给子代。HLA系统最突出的一个特点是某些HLA等位基因在一起的频率比预期的机会更多。如果单倍型频率比预期的随机重组率高,说明两个基因座存在着连锁不平衡。某些疾病的易感基因可能不是单一的等位基因,而可能是多个等位基因组成的基因群,检测扩展单倍型可以在寻找某些疾病基因方面提供更有价值的信息。我们可以通过家系或群体资料估计出单倍型和基因的频率。本研究通过对HLA-A、B、C、DQA1、DQB1、DRB1构建的单倍型,经过病例对照研究,发现10个有阳性意义的单倍型,包括A\*03-B\*07、A\*03-Cw\*0802、A\*25-B\*07、A\*25-Cw\*0802、B\*07-Cw\*0802、B\*07-DQB1\*0501、B\*07-DRB1\*15、DQA1\*0104-DQB1\*0501、DQA1\*0104-DQB1\*0503、DQB1\*0503-DRB1\*15与瘢痕疙瘩呈正相关,携带这些单倍型的人群瘢痕疙瘩易感性明显升高。

以往的报道中未见有关单倍型与瘢痕疙瘩不同临床表型之间相关性的报道,本研究通过分层分析发现,不同临床表型与HLA单倍型的相关性不同。通过HLA单倍型与瘢痕疙瘩不同严重程度相关性分析,未发现只与严重型瘢痕疙瘩有相关性的单倍型,而发现3个单倍型HLA-A\*25-B\*07、B\*07-DRB1\*15、DQA1\*0104-DQB1\*0503与瘢痕疙瘩的中等程度有相关性,说明携带该单倍型的患者易患中等程度瘢痕疙瘩。可能原因有待进一步探讨。瘢痕疙瘩的发生存在着家族聚集现象,通过HLA单倍型与瘢痕疙瘩阳性家族史的相关性分析,显示了A\*25-B\*07和B\*07-DRB1\*15单倍型与有阳性家族史的患者呈正相关性。B\*07-DQB1\*0501与散发患者有相关性。以上结果表明,家族史阳性的瘢痕疙瘩病患者与散发患者可能存在不同易感基因。

瘢痕疙瘩与HLA的关系密切,瘢痕疙瘩的易感基因可能位于HLA基因区内或者与HLA基因相连锁。瘢痕疙瘩的易感基因可能是多个等位基因组成的基因群,检测扩展单倍型可以在寻找某些疾病基因方面提供更有价值的信息,尤其在瘢痕疙瘩家系中进行HLA扩展单倍型的研究将会得到更大的启示。

总之,对瘢痕疙瘩MHC区域易感基因发病机制的探讨,不仅能为临床医生诊治这种疾病提供指导,而且对于遗传咨询及风险预测及药物开发具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Marneros AG, Norris JE, Olsen BR, et al. Clinical genetics of familial keloids. *Arch Dermatol*, 2001, 137: 1429-1434.
- [2] Bran GM, Goessler UR, Hormann K, et al. Keloids: current concepts of pathogenesis (review). *Int J Mol Med*, 2009, 24: 283-293.
- [3] Brown BC, McKenna SP, Siddhi K, et al. The hidden cost of skin scars: quality of life after skin scarring. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2008, 61: 1049-1058.
- [4] Olaitan PB. Keloids: Assessment of effects and psychosocial-impacts on subjects in a black African population. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2009, 75: 368-372.
- [5] Shih B, Bayat A. Genetics of keloid scarring. *Arch Dermatol Res*, 2010, 302: 319-339.
- [6] Shih B, Bayat A. Comparative genomic hybridisation analysis of keloid tissue in Caucasians suggests possible involvement of HLA-DRB5 in disease pathogenesis. *Arch Dermatol Res*, 2012, 304: 241-249.
- [7] Ashcroft KJ, Syed F, Arscott G, et al. Assessment of the influence of HLA class I and class II loci on the prevalence of keloid disease in Jamaican Afro-Caribbeans. *Tissue Antigens*, 2011, 78: 390-396.
- [8] Lu WS, Zhang WY, Li Y, et al. Association of HLA-DRB1 alleles with keloids in Chinese Han individuals. *Tissue Antigens*, 2010, 76: 276-281.
- [9] Lu WS, Cai LQ, Wang ZX, et al. Association of HLA class I alleles with keloids in Chinese Han individuals. *Hum Immunol*, 2010, 71: 418-422.
- [10] Brown JJ, Ollier WE, Thomson W, et al. Positive association of HLA-DRB1\*15 with keloid disease in Caucasians. *Int J Immunogenet*, 2008, 35: 303-307.
- [11] Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, 1993, 41: 119-134.
- [12] Xiao FL, Yang S, Lin GS, et al. HLA haplotypic association with different phenotype of alopecia areata in Chinese Hans. *J Dermatol Sci*, 2007, 45: 206-209.
- [13] Zhu F, Wu B, Li P, et al. Association study confirmed susceptibility loci with keloid in the Chinese Han population. *PLoS One*, 2013, 8: e62377.
- [14] Nakashima M, Chung S, Takahashi A, et al. A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population. *Nat Genet*, 2010, 42: 768-771.
- [15] Smith JC, Boone BE, Opalenik SR, et al. Gene profiling of keloid fibroblasts shows altered expression in multiple fibrosis-associated pathways. *J Invest Dermatol*, 2008, 128: 1298-310.
- [16] Satish L, Lyons-Weiler J, Hebda PA, et al. Gene expression patterns in isolated keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen*, 2006, 14: 463-470.
- [17] Seifert O, Bayat A, Geffers R, et al. Identification of unique gene expression patterns within different lesional sites of keloids. *Wound Repair Regen*, 2008, 16: 254-265.
- [18] Rapin N, Hoof I, Lund O, et al. MHC motif viewer. *Immunogenetics*, 2008, 60: 759-765.

(收稿日期: 2013-10-14)

(本文编辑: 吴莹)