

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.06.009

文章编号: 1005-8982(2016)06-0037-08

临床论著

人类白细胞抗原 -B 等位基因多态性与江苏地区汉族人群 2 型糖尿病的相关性研究*

夏玲芝¹, 曹鹏¹, 李晓娥², 许涛², Khawar Ali Shahzad², 毛源¹, 张厚智¹, 沈传来²

(1. 南京金域医学检验所 实验诊断部, 江苏 南京 210002; 2. 东南大学医学院病原生物学与免疫学系 江苏 南京 210009)

摘要:目的 探讨人类白细胞抗原(HLA-B)等位基因多态性与江苏地区汉族人群 2 型糖尿病的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应直接测序分型法(PCR-SBT)对 118 例江苏地区汉族 2 型糖尿病(T2DM)个体进行 HLA-B 等位基因分型,计算各等位基因频率和血清型频率,并与中华骨髓库江苏分库汉族志愿者人群(644 例和 20 248 例)进行统计学比较。**结果** HLA-B*1501 的等位基因频率在江苏地区汉族 T2DM 人群中明显升高(8.90% vs 3.03%, $P_c = 0.000$, $OR = 3.13$, 95%CI=1.80~5.42, Power=98.23%),而 HLA-B*5801 的等位基因频率则明显下降(1.69% vs 8.62%, $P_c = 0.000$, $OR = 0.18$, 95%CI=0.07~0.50, Power=91.07%);相对应地,HLA-B*15 的血清型频率在江苏地区汉族 T2DM 人群中明显升高(21.18% vs 13.03%, $P_c = 0.022$, $OR = 1.79$, 95%CI=1.26~2.55, Power=90.15%),而 HLA-B*58 的血清型频率则明显下降(1.69% vs 8.62%, $P_c = 0.000$, $OR = 0.18$, 95%CI=0.07~0.50, Power=91.09%)。**结论** HLA-B*1501 等位基因可能与江苏地区汉族人群 2 型糖尿病的易感性有关,而 HLA-B*5801 则可能有保护作用。这些结果首次提示 HLA-I 类基因多态性可能与中国人群 2 型糖尿病有关。

关键词: 2 型糖尿病;HLA-B;等位基因多态性;PCR-SBT

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

Association between HLA-B allelic polymorphism and type 2 diabetes mellitus in Han ethnicity of Jiangsu*

Ling-zhi Xia¹, Peng Chao¹, Xiao-e Li², Tao Xu², Khawar Ali Shahzad²,
Yuan Mao¹, Hou-zhi Zhang¹, Chuan-lai Shen²

(1. Department of Laboratory Medicine, Nanjing KingMed Diagnostics Limited Company, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Department of Pathogen Biology and Immunology, Medical School of Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: Objective To explore the association of HLA-B allele polymorphism with type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Han ethnicity of Jiangsu region. **Methods** One hundred and eighteen patients with clinically diagnosed T2DM were examined. HLA-B typing was performed using polymerase chain reaction with sequence-based genotyping (PCR-SBT). The frequency of HLA-B alleles and serotypes in the group with T2DM was compared with that in Han ethnic healthy populations (644 persons and 20248 persons) from Jiangsu branch of Chinese National Marrow Donor Program (CMDP). **Results** Compared with the healthy donors, there was an increased frequency of HLA-B*1501 (8.90% vs 3.03%, $P_c = 0.000$, $OR = 3.13$, 95% CI = 1.80-5.42, statistical power = 98.23%) and a decreased frequency of HLA-B*5801 (1.69% vs 8.62%, $P_c = 0.000$, $OR = 0.18$, 95% CI = 0.07-0.50, statistical power = 91.07%) in the group with T2DM. Accordingly, a higher frequency of HLA-B*15 serotype (21.18% vs 13.03%, $P_c = 0.022$, $OR = 1.79$, 95% CI = 1.26-2.55, power = 90.15%) and a lower frequency of HLA-B*58

收稿日期: 2015-11-04

* 基金项目: 江苏省科技厅科技支撑计划项目资助(No: BE2012739)

[通信作者] 沈传来, E-mail: chuanlaishen@seu.edu.cn; Tel: 13776629706; 025-83272454

serotype (1.69% vs. 8.62%, $P_c = 0.000$, $OR = 0.18$, 95% CI = 0.07-0.50, power = 91.09%) were found in the T2DM group. **Conclusions** HLA -B*1501 allele may be a marker of susceptibility for T2DM, in reverse, HLA -B*5801 allele is possibly associated with a resistant effect on T2DM in Han ethnicity of Jiangsu region. These data suggest, for the first time, the association of HLA class I genes with the T2DM in Chinese population.

Keywords: type 2 diabetes; HLA -B; allelic polymorphism; PCR-SBT

人类白细胞抗原 (human leucocyte antigen, HLA) 基因定位于第 6 号染色体短臂 6p21.31 区, 是迄今所知人类多态性最丰富的遗传系统, 在不同种族或同一种族不同群体中的等位基因分布有明显的种群特性, 也是最能代表个体特异性的遗传物质。其功能主要表现在对机体免疫应答反应的启动和调节控制, 与很多疾病的发生发展具有关联性。对各类疾病人群进行 HLA 基因型别和频率的分析对疾病机制的研究具有重要启示作用。

我国是糖尿病大国, 成人中发病率约 9%, 其中 2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2DM) 占 90% 以上。目前认为 2 型糖尿病是由环境和遗传因素共同作用的代谢紊乱性疾病, 不同遗传背景的个体在相同环境中的患病危险性不同。环境因素如高热量饮食、缺乏体力活动等作用于糖尿病易感者使患病率日益升高^[1]。多年来, 人们利用候选基因关联研究策略和近来的全基因组关联研究 (GWAS) 已鉴定出几十个与 T2DM 相关的基因位点。在中国人群中这些位点与 T2DM 的风险关系还在进一步验证^[2-3]。20 多年来关于 HLA 基因多态性与 T2DM 的相关性研究在国内外也不断有报道。但绝大多数研究都聚焦于 HLA -DR 和 DQA1、DQB1 等 HLA -II 类基因与各民族 T2DM 的关联性研究。比如: 美国黑人 T2DM 与 HLA -DR3、DR4 有关联^[4]; HLA -DRB1*070101 在黎巴嫩人和巴林岛人的 T2DM 中以及 HLA -DQB1*0201 在黎巴嫩人的 T2DM 人群中是易感基因^[5]; 维生素 D 受体的基因多态性与 HLA -DRB1*04 共同作用显著增加了沙特阿拉伯人群 T2DM 的危险性^[6]。在中国 T2DM 人群中 HLA -DQA1 和 DQB1 的研究较多, 比如云南汉族^[7]和彝族^[8], 广西汉族^[9]和壮族^[10]以及新疆维吾尔族^[11]与 HLA -DQA1 的关联; 2013 年, Ma 等^[12]报道 HLA -DQA1*0301 和 0501 等位基因是中国汉族 T2DM 的易感基因, 而 HLA -DQB1*0501 是 T2DM 合并肾病的保护性基因。关于 HLA -I 类基因, 如 HLA -A、HLA -B 等与 T2DM 的相关性研究则很少, 比如美国亚拉巴马州的非裔妇女的 HLA -B41 和 HLA -DR2 升高是 T2DM 的独立危险因素^[13]。中国 T2DM 中 HLA -I 类基因的研究尚未见

报道。

本课题组在从人血标本中克隆所有频率 >1% 的 HLA -B 等位基因时, 有意识地随机选取标本量较多的江苏地区汉族 2 型糖尿病患者群的 118 例血液标本, 运用聚合酶链反应直接测序分型法 (Polymerase chain reaction-sequence based typing, PCR-SBT) 技术进行 HLA -B 等位基因分型, 在基因水平上初步探讨了江苏地区汉族 T2DM 人群 HLA -B 的等位基因多态性分布状况, 并发现 HLA -B*1501 (B*15) 和 HLA -B*5801 (B*58) 的等位基因频率和血清型频率与江苏地区汉族健康人群存在显著差异性。尽管研究例数偏少, 但这一结果能提示我国糖尿病研究者应重视 HLA -I 类基因多态性与 2 型糖尿病间的关联。

1 资料与方法

1.1 调查对象

在南京金陵医学检验所实验室随机选取江苏地区汉族无亲缘关系的 T2DM 成人患者血液标本共计 118 例。其中, 男性 57 例, 女性 61 例, 年龄 24 ~ 94 岁, 平均 (56.3 ± 16.1) 岁。所有患者来自江苏省各县、区医院门诊和住院患者, 均经当地就诊医院明确诊断为 T2DM, 符合 1999 年世界卫生组织推荐的 T2DM 诊断标准。所有样本采样时的糖化血红蛋白 (HbA1c) ≥ 7.0%。

1.2 主要实验仪器及试剂

DNA 提取试剂盒 (北京天根公司), PCR 仪 (美国 BioRad 公司), 电泳仪 (北京六一仪器厂), 凝胶成像仪 (上海培清公司), 高保真 DNA 聚合酶 (诺维赞公司)。

1.3 基因组 DNA 制备

按照 DNA 提取试剂盒的操作步骤来提取基因组 DNA。用紫外分光光度计测定 DNA 纯度和浓度, $A_{260/280}$ 值介于 1.6 ~ 1.8, 调浓度至 80 ng/μl 左右, -20℃ 冰箱保存。

1.4 特异性 PCR 扩增

以基因组 DNA 为模板, 用 WHO 国际组织相容性工作组 (International Histocompatibility Working

Group, IHWG)推荐的特异性 PCR 引物(见表 1, PF1 和 PR1)扩增 HLA-B 的第 2, 3 外显子, 得到长度大约为 919 bp 的 DNA 片段。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 10 min; 然后 95℃ 变性 15 s, 70℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。

1.5 PCR 产物割胶纯化并测序

用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定, 之后对 919 bp 左右的目的片段进行割胶纯化。将纯化后的 PCR 产物送上海桑尼测序公司, 用针对第 2, 3 外显子的特异性测序(见表 1, PF2 和 PR2, PF3 和 PR3)引物进行双向测序。

1.6 PCR-SBT 分型

用 Seqman 软件将每个样本的 4 个测序结果拼接成一个完整的重叠序列后, 用 NCBI 的 dbMHC 数据库在线分析工具 SBT Input 对其进行 HLA-B 等位基因分型。

1.7 统计学方法

通过直接计数法统计出各等位基因的频率, 基因频率 (GF) = 阳性基因数 / 个体总数 × 2。利用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 对不同人群间等位基因频率进行 2 × 2 列联表批量 χ^2 检验计算 P 值, 当理论频数 > 1 且 < 5 时, 采用连续性校正 χ^2 检验, 当理论频数 < 1 时, 使用 Fisher 精确概率检验。利用 SNP tools for Microsoft Excel 软件计算 OR (95%CI) 和 Power 值。P 值进行 Bonferroni 多重检验校正, $P_c = P \times$ 等位基因或血清型的个数。P < 0.05 认为差异具有统计学意义。

表 1 HLA-B 基因位点特异性的扩增和测序引物

引物	序列(5'-3')	位点
PF1	AGGCGGGGCGCAGGACCCGG	Intron1, 56-77
PR1	GGAGGCCATCCCCGGCGACTAT	Intron3, 37-59
PF2	GGAGCCGCGCCGGGAGGAGGTC	Intron1, 77-99
PR2	GGATGGGGAGTCGTGACCT	Intron2, 25-44
PF3	ACKGKGCTGACCGCGGGG	Intron2, 226-243
PR3	GGAGATGGGAAGGCTCCCCACT	Intron3, 12-35

2 结果

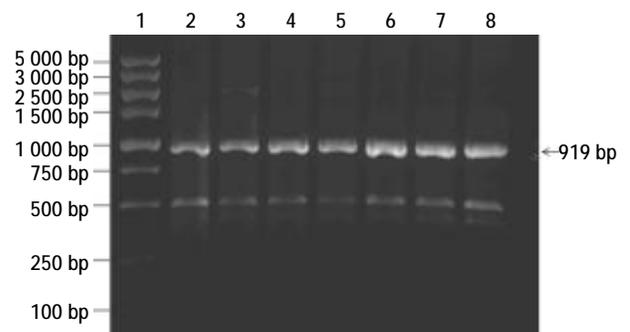
2.1 江苏地区汉族 2 型糖尿病人群中 HLA-B 等位基因频率的分布

通过对 118 例江苏地区汉族 2 型糖尿病个体进行 PCR-SBT 分型后得到 32 个 HLA-B 等位基因(见表 2)。其中等位基因频率 > 5% 的等位基因有 6 种, 分别是 HLA-B*4601 (14.41%), HLA-B*4001

(11.86%), HLA-B*1302 (10.17%), HLA-B*1501 (8.90%), HLA-B*1301 (7.63%) 和 HLA-B*4403 (5.08%)。这 6 种等位基因的频率合计为 58.05%, 占该人群的大多数; 另外, 还检测到 7 种频率 < 1% 的 HLA-B 等位基因。由于所检测的病例数和所获得的等位基因数均偏少, 因此未对其基因的多态性分布进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验。图 1 是代表性的 PCR 电泳图, 图 2 是代表性的 PCR 产物基因测序图。

2.2 与江苏地区健康人群 HLA-B 等位基因频率的比较

将 118 名江苏地区汉族 2 型糖尿病人群的 HLA-B 等位基因频率与中华骨髓库江苏分库汉族志愿者人群(644 例^[4])进行统计学比较。后者 644 例志愿者的数据是采用与本研究相同的 PCR-SBT 分型技术获得, 所用的 PCR 引物也是 IHWG 推荐的标准引物。结果如表 2 所示: 有 2 个 HLA-B 等位基因的频率在江苏地区汉族 T2DM 人群中明显提升, 即 B*1501 (8.90% vs 3.03%, $P_c = 0.000$, $OR = 3.13$, 95% $CI = 1.80 \sim 5.42$, $Power = 98.23\%$) 和 B*4402 (1.69% vs 0.08%, $P_c = 0.032$, $OR = 22.19$, 95% $CI = 2.47 \sim 199.42$, $Power = 79.01\%$)。其中 B*1501 与 T2DM 人群呈正相关最为可信, 因为它的 3 个统计分析指标差异都有统计学意义: $P_c < 0.01$, OR 值 > 3.0, 且其 95% 可信区间的下限 > 1.5, $Power$ 值(统计功效) > 80%, 高达 98.23%。统计显示, 有 1 个 HLA-B 等位基因的频率在 T2DM 人群中明显下降, 即 B*5801 (1.69% vs 8.62%, $P_c = 0.000$, $OR = 0.18$, 95% $CI = 0.07 \sim 0.50$, $Power = 91.07\%$), 其 OR 值 95% 可信区间的上限 ≤ 0.5 , $Power > 80\%$, 与 T2DM 人群呈负相关较为可信。统计功效 (statistical



用位点特异性引物扩增 HLA-B 的第 2, 3 外显子, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 可见 919 bp 目的条带。泳道 1: DNA marker; 泳道 2-8: 不同 T2DM 患者的样本

图 1 HLA-B 基因位点特异性 PCR 产物

power)是假设检验能够正确侦测到真实的处理效应的能力。一般认为,一个研究在 Power>80%时才能比较有把握地保证总体中存在的现象可以通过样本检验得到识别,统计结果才比较可靠。本研究中的 B*1501 和 B*5801 的基因频率与健康人群的差异性统计 Power 值均超过 90%,提示尽管研究的样本量偏少(118 例),但是它们与江苏汉族人群 T2DM 呈正相关或负相关的统计分析还是可信的。

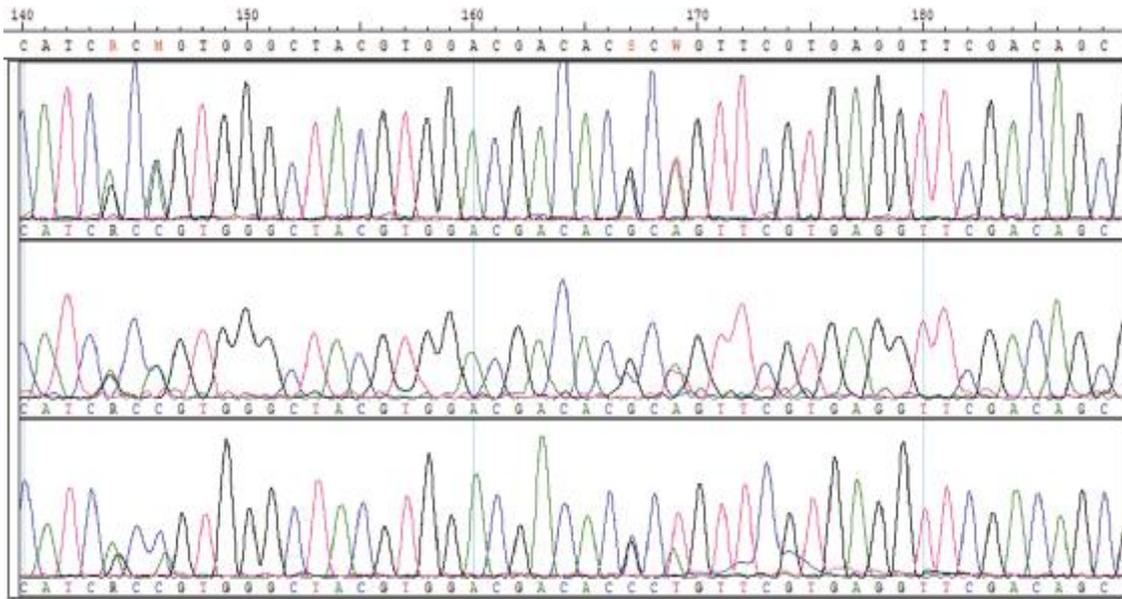
2.3 与江苏地区健康人群 HLA-B 等位基因血清型频率的比较

将 118 名江苏地区汉族 2 型糖尿病人群的 HLA-B 等位基因血清型频率分别与中华骨髓库江苏分库 644 例^[14]和 20 248 例^[15]汉族志愿者人群进行统计学比较。其中 20 248 例志愿者的数据是通过 PCR-SSP 和 PCR-SSOP 技术获得,只能精确到 HLA-B 等位基因的血清型(抗原型)。与 644 例中华

表 2 江苏地区汉族 2 型糖尿病人群与江苏地区汉族健康人群 HLA-B 等位基因频率的比较

HLA-B 等位基因	江苏汉族 T2DM (2n=118 × 2)		江苏汉族骨髓捐献者 (2n=644 × 2)		χ ² 值	P 值	P _c 值	OR 值	(95%CI)		Power/%
	阳性数	基因频率 1%	阳性数	基因频率 1%					下限	上限	
B* 07:02	2	0.85	23	1.78	0.584	0.445	14.240	0.47	0.11	2.01	17.34
B* 13:01	18	7.63	47	3.65	7.730	0.005 ¹⁾	0.160	2.18	1.24	3.82	77.58
B* 13:02	24	10.17	106	8.23	0.962	0.327	10.464	1.26	0.79	2.01	16.32
B* 15:01	21	8.90	39	3.03	18.174	0.000 ¹⁾	0.000 ²⁾	3.13	1.80	5.42	98.23
B* 15:02	11	4.66	29	2.25	4.531	0.033 ¹⁾	1.056	2.12	1.05	4.31	54.86
B* 15:11	5	2.12	33	2.56	0.161	0.688	22.016	0.82	0.32	2.13	5.95
B* 15:18	5	2.12	24	1.86	0.000	0.996	31.872	1.14	0.43	3.02	4.49
B* 15:25	3	1.27	4	0.31	2.199	0.138	4.416	4.13	0.92	18.59	45.62
B* 15:27	4	1.69	16	1.24	0.063	0.802	25.664	1.37	0.45	4.14	8.07
B* 15:32	1	0.42	0	0.00	0.911	0.340	10.880				
B* 27:04	4	1.69	19	1.47	0.000	1.000	32.000	1.15	0.39	3.42	4.40
B* 35:01	3	1.27	29	2.25	0.517	0.472	15.104	0.56	0.17	1.85	15.68
B* 35:03	1	0.42	10	0.78	0.029	0.865	27.680	0.54	0.07	4.27	8.37
B* 37:01	4	1.69	19	1.47	0.000	1.000	32.000	1.15	0.39	3.42	4.40
B* 38:01	1	0.42	5	0.39	0.000	1.000	32.000	1.09	0.13	9.39	3.00
B* 39:05	1	0.42	4	0.31	0.000	1.000	32.000	1.37	0.15	12.28	4.63
B* 40:01	28	11.86	107	8.31	3.126	0.077	2.240	1.49	0.96	2.31	42.01
B* 40:06	2	0.85	47	3.65	5.031	0.025 ¹⁾	8.000	0.23	0.05	0.94	53.66
B* 44:02	4	1.69	1	0.08	1.000	0.001 ¹⁾	0.032 ²⁾	22.19	2.47	199.42	79.01
B* 44:03	12	5.08	50	3.88	0.739	0.390	12.480	1.33	0.70	2.53	13.51
B* 46:01	34	14.41	123	9.55	5.092	0.024 ¹⁾	0.768	1.59	1.06	2.40	61.03
B* 48:01	6	2.54	34	2.64	0.007	0.931	29.792	0.96	0.40	2.32	3.05
B* 49:01	1	0.42	0	0.00	0.911	0.340	10.880				
B* 50:01	3	1.27	5	0.39	1.527	0.217	6.944	3.30	0.78	13.92	37.02
B* 51:01	3	1.27	49	3.80	3.884	0.049 ¹⁾	1.568	0.33	0.10	1.05	46.55
B* 52:01	8	3.39	55	4.27	0.390	0.532	17.024	0.79	0.37	1.67	9.06
B* 54:01	6	2.54	55	4.27	1.550	0.213	6.816	0.58	0.25	1.37	23.29
B* 55:02	6	2.54	33	2.56	0.000	0.986	31.552	0.99	0.41	2.39	2.60
B* 56:01	3	1.27	3	0.23	3.155	0.076	2.432	5.52	1.11	27.49	54.91
B* 57:01	4	1.69	25	1.94	0.000	1.000	32.000	0.87	0.30	2.53	4.40
B* 58:01	4	1.69	111	8.62	13.703	0.000 ¹⁾	0.000 ²⁾	0.18	0.07	0.50	91.07
B* 59:01	4	1.69	7	0.54	2.258	0.133	4.256	3.16	0.92	10.86	4.45

注:1)P<0.05;2)P_c<0.05, P_c=P×32



PCR 产物经割胶纯化后送上海桑尼公司,用针对第 2,3 外显子的特异性测序引物(PF2 和 PR2,PF3 和 PR3)进行双向测序,全长 928 bp

图 2 杂合子 HLA-B*1501/*4001(sample28)基因测序峰图(140-190 bp)

表 3 江苏地区汉族 2 型糖尿病人群与江苏地区汉族健康人群 HLA-B 血清型(抗原)频率的比较

HLA-B 等位基因	糖尿病组 (n=118)/%	江苏健康人组 (n=644)/%	χ ² 值	P 值	P _c 值	OR 值	(95%CI)		Power/%
							下限	上限	
B*07	0.85	1.78	0.584	0.445	9.790	0.47	0.11	2.01	17.34
B*13	17.80	11.88	6.260	0.012 ¹⁾	0.264	1.61	1.11	2.33	69.98
B*15	21.18	13.03	10.789	0.001 ¹⁾	0.022 ²⁾	1.79	1.26	2.55	90.15
B*27	1.69	2.79	0.944	0.331	7.282	0.60	0.21	1.70	15.91
B*35	1.69	3.64	2.355	0.125	2.750	0.46	0.16	1.28	32.16
B*37	1.69	1.47	0.000	1.000	22.000	1.15	0.39	3.42	4.40
B*38	0.42	3.11	5.480	0.019 ¹⁾	0.418	0.13	0.02	0.97	51.18
B*39	0.42	1.71	1.434	0.231	5.082	0.24	0.03	1.83	27.85
B*40	12.71	14.21	0.371	0.542	11.924	0.88	0.058	1.33	8.84
B*44	6.77	3.96	3.774	0.052	1.144	1.76	0.99	3.15	48.37
B*46	14.41	9.55	5.092	0.024 ¹⁾	0.528	1.59	1.06	2.40	61.03
B*48	2.54	2.72	0.023	0.879	19.338	0.93	0.39	2.25	3.54
B*49	0.42	0.00	0.911	0.340	7.480				
B*50	1.27	0.39	1.527	0.217	4.774	3.30	0.78	13.92	37.02
B*51	1.27	4.5	5.422	0.020 ¹⁾	0.440	0.27	0.08	0.88	58.57
B*52	3.39	4.27	0.390	0.532	11.704	0.79	0.37	1.67	9.06
B*54	2.54	4.27	1.550	0.213	4.686	0.58	0.25	1.37	23.29
B*55	2.54	2.64	0.007	0.931	20.482	0.96	0.40	2.32	3.05
B*56	1.27	0.31	2.199	0.138	3.036	4.13	0.92	18.59	45.62
B*57	1.69	1.94	0.000	1.000	22.000	0.87	0.30	2.53	4.40
B*58	1.69	8.62	13.703	0.000 ¹⁾	0.000 ²⁾	0.18	0.07	0.50	91.09
B*59	1.69	0.54	2.258	0.133	2.926	3.16	0.92	10.86	44.49

注:1)P<0.05;2)P_c<0.05, P_c=P×22

骨髓库江苏分库的汉族志愿者人群比较 (见表 3), HLA-B*15 血清型的频率在 T2DM 人群中显著增高 (21.18% vs 13.03%, $P_c=0.022$, $OR=1.79$, 95% CI=1.26~2.55, Power=90.15%)。另外, HLA-B*58 血清型的频率在 T2DM 人群中显著减低 (1.69% vs 8.62%, $P_c=0.000$, $OR=0.18$, 95% CI=0.07~0.50, Power=91.09%)。与 20 248 例中华骨髓库江苏分库的汉族志愿者人群比较 (见表 4), HLA-B*59 血清型的频率在江苏地区汉族 T2DM 人群中显著提高 (1.69% vs 0.2%, $P=0.000$, $P_c=0.000$, $OR=8.60$, 95% CI=3.13~23.67, Power=98.64%), 而 B*15 血清型的频率也有增高, 但 P_c 值未能 <0.05 (21.18% vs 14.4%, $P=0.003$, $P_c=0.066$, $OR=1.60$, 95% CI=1.17~2.19, Power=83.43%)。另有 B*51 ($P_c=0.022$, $OR=0.18$, Power=84.04%) 和 B*58 ($P_c=0.044$, $OR=0.24$, Power=79.82%) 的频率在

T2DM 人群中显著降低。

由于 20 248 例中华骨髓库江苏分库志愿者的数据是采用非基因测序方法获得, 不同于本研究的 HLA-B 等位基因分型方法, 因此在血清型频率的统计中可能有部分误差。但是, B*15 和 B*59 等位基因在 T2DM 人群中的血清型频率分别在上述 644 例和 20 248 例汉族志愿者人群相比中呈显著性增高, 其中 B*15 血清型频率的显著性增高较为可信; 同样 B*58 在 T2DM 人群中的血清型频率与上述两个健康人群比较均显著性下降。在 HLA-B 等位基因频率的比较中, B*1501 和 B*5801 频率在江苏地区汉族 T2DM 人群中分别显著升高和降低, 与血清型频率比较的结果相一致。这些结果提示: HLA-B*1501 (B*15) 可能是江苏地区汉族人群 T2DM 的易感基因, 而 HLA-B*5801 (B*58) 则可能是保护基因。

表 4 江苏地区汉族 2 型糖尿病人群与江苏地区汉族健康人群 HLA-B 血清型 (抗原) 频率的比较

HLA-B 等位基因	糖尿病组 (n=118)/%	江苏健康人组 (n=20 248)/ %	χ^2 值	P 值	P_c 值	OR 值	95%/CI		Power/%
							下限	上限	
B*07	0.85	2.5	2.636	0.104	2.288	0.33	0.08	1.34	33.91
B*13	17.80	13.2	4.322	0.038 ¹⁾	0.836	1.42	1.02	1.99	54.31
B*15	21.18	14.4	8.750	0.003 ¹⁾	0.066	1.60	1.17	2.19	83.43
B*27	1.69	2.7	0.903	0.342	7.524	0.62	0.23	1.67	15.42
B*35	1.69	4.6	4.529	0.033 ¹⁾	0.726	0.36	0.13	0.96	53.08
B*37	1.69	1.1	0.316	0.574	12.628	1.55	0.57	4.19	13.73
B*38	0.42	2.4	3.931	0.047 ¹⁾	1.034	0.17	0.02	1.23	41.67
B*39	0.42	2.2	3.457	0.063	1.386	0.19	0.03	1.35	38.24
B*40	12.71	13.6	0.157	0.692	15.224	0.93	0.63	1.36	5.89
B*44	6.77	3.8	5.672	0.017 ¹⁾	0.374	1.84	1.11	3.07	64.99
B*46	14.41	9.4	6.884	0.009 ¹⁾	0.198	1.62	1.13	2.34	73.85
B*48	2.54	2.1	0.060	0.806	17.732	1.22	0.54	2.74	6.85
B*49	0.42	0.1	0.292	0.589	12.958	4.30	0.59	31.44	30.10
B*50	1.27	0.5	1.466	0.226	4.972	2.57	0.82	8.09	36.37
B*51	1.27	6.7	11.109	0.001 ¹⁾	0.022 ²⁾	0.18	0.06	0.56	84.04
B*52	3.39	3.1	0.066	0.797	17.534	1.10	0.54	2.23	4.23
B*54	2.54	3.7	0.883	0.347	7.634	0.68	0.30	1.53	15.24
B*55	2.54	2.9	0.106	0.745	16.390	0.87	0.39	1.97	5.11
B*56	1.27	0.3	4.457	0.035 ¹⁾	0.770	4.30	1.36	13.61	69.80
B*57	1.69	1.6	0.000	1.000	22.000	1.06	0.39	2.86	3.26
B*58	1.69	6.6	9.196	0.002 ¹⁾	0.044 ²⁾	0.24	0.09	0.66	79.82
B*59	1.69	0.2	18.512	0.000 ¹⁾	0.000 ²⁾	8.60	3.13	23.67	98.64

注: 1) $P < 0.05$; 2) $P_c < 0.05$, $P_c = P \times 22$

3 讨论

HLA 基因是目前已知的人类最为复杂的遗传系统。尽管其功能尚未完全清晰,但是它与很多疾病的关联性已被充分证实。1 型糖尿病(T1DM)已被证实与 HLA 基因区域显著关联,可以解释其近 40% 的遗传易感性,其余基因的作用则较小^[6]。2 型糖尿病(T2DM)与 1 型糖尿病的发病机制不同,但都与遗传因素有关。是否 HLA 等位基因多态性与 T2DM 相关尚无定论,但不断有报道。在中国,多个种族的 T2DM 人群被研究,但都是关于 HLA-DQA1 和 DQB1 等位基因关联性的分析。杨红英等^[7]先后对云南 108 例汉族 T2DM 患者和 58 例彝族 T2DM 患者进行研究,发现 DQA1*0301、0501 是云南汉族 T2DM 的易感基因,而 DQA1*0401 是保护基因,DQA1*0302 是 T2DM 合并肾病的易感基因;HLA-DQA1*0301 是云南彝族 T2DM 的易感基因,DQA1*0601 则是保护基因^[8]。梁敏等^[9]研究了 72 例广西汉族 T2DM 患者,发现 T2DM 组的 DQA1*0104 等位基因频率明显高于正常对照组 ($P < 0.01$, $RR = 6.51$), DQA1*0401 等位基因频率则明显低于正常对照组 ($P < 0.001$, $RR = 0.29$)。随后梁杏欢等^[10]研究了 67 例广西壮族 T2DM 患者,显示 HLA-DQA1*0301、0401 基因频率明显高于正常对照组,可能为壮族 T2DM 发病的易感基因。其中 DQA1*0401 在上海^[11]、广西和云南的汉族 T2DM 研究中则显示可能是保护基因。刘凤霞^[12]对 73 例新疆维吾尔族 T2DM 的研究显示,HLA-DQA1*0104 可能是新疆吐鲁番地区维吾尔族体 T2DM 的易感基因。2013 年, Ma 等^[13]研究了 310 例汉族 T2DM 患者和 100 例健康者,认为 HLA-DQA1*0301 (15.5% vs 8.0%, $P < 0.01$) 和 0501 (16.6% vs 8.5%, $P < 0.01$) 等位基因是中国汉族 T2DM 的易感基因,而 HLA-DQB1*0501 是 T2DM 合并肾病的保护性基因。

本研究采用“金标准”的 PCR-SBT 分型技术对 118 例江苏地区汉族的 T2DM 人群进行了 HLA-B 等位基因多态性研究,并与同样采用 PCR-SBT 分型技术获得的江苏地区汉族骨髓捐献者人群(644 例)的 HLA-B 等位基因分布频率^[14]进行了统计学比较,发现 HLA-B*1501 等位基因的频率在 T2DM 人群中明显升高,而 HLA-B*5801 的频率则在 T2DM 人群中显著下降。血清型频率的比较也得出一致的结果。由于研究的病例数偏少,而且对照组数据虽是

健康者而非体检人群,目前数据尚不足以证实这 2 个 HLA-B 等位基因与 T2DM 的关联性,但这一结果对我国糖尿病研究者则是一个提醒:HLA-I 类基因的多态性是否与 T2DM 有关联性值得注意。本研究将继续扩大检测标本量,以进一步明确这一结果的可信性。

HLA-I 类基因在人体细胞的表达范围和抗原提呈功能均与 HLA-II 类基因有明显不同。前者表达于除绒毛外滋养细胞外的所有有核细胞表面,提呈内源性抗原,包括来自细胞内的自身抗原、肿瘤抗原、病毒抗原等,介导 CD8⁺T 细胞的活化;后者主要表达于巨噬细胞、DC、成熟 B 细胞以及激活的 T 细胞和单核细胞表面,提呈外源性抗原,激活 CD4⁺T 细胞。HLA 某些等位基因与特定疾病的关联性与其在特定人种或人群中的频率高低有关,更与其提呈特定抗原肽的能力强弱有关。T2DM 是环境和遗传因素共同作用的结果,其中 HLA-I 类基因与 T2DM 的相关性研究很少,目前只报道美国亚拉巴马州非裔妇女的 HLA-B41 和 HLA-DR2 升高是 T2DM 的独立危险因素,未涉及机制探讨^[15]。本研究初步显示 B*1501 和 B*5801 与江苏地区汉族人群的 T2DM 有关,其可能提呈的与 T2DM 有关的优势抗原肽或者其他的非抗原提呈功能等仍待深入研究。

HLA 的分型主要经历了两个阶段:HLA 血清学分型和基因分型技术。血清学分型法具有便捷、经济、有效等优点,但准确性不高。基因型分型技术主要有 PCR-SSOP (序列特异性寡核苷酸探针)、PCR-SSP(序列特异性引物)以及 PCR-SBT(直接测序分型)等 3 种方法。PCR-SBT 法是用 PCR 扩增获得 HLA 基因座位的 DNA 片段,然后对 DNA 测序,根据碱基序列进行分型,比其他分型方法更为准确,称为 HLA 分型的“金标准”。本文运用 PCR-SBT 技术以及国际标准的 PCR 扩增引物对江苏汉族 T2DM 个体的 HLA-B 基因座位第 2、3 外显子进行扩增和测序,分型结果是可信的。本研究在 118 例 T2DM 个体中检测到 32 个 HLA-B 等位基因。与江苏地区汉族骨髓捐献者人群比较后,初步显示 HLA-B*1501 (B*15) 可能是江苏地区汉族人群 T2DM 的易感基因,而 HLA-B*5801 (B*58) 则可能是保护基因。

参 考 文 献:

[1] Chan JC, Malik V, Jia W, et al. Diabetes in Asia: epidemiology,

- risk factors, and pathophysiology[J]. JAMA, 2009, 301(20): 2129-2140.
- [2] 王楚媛, 孔令芳, 柳越, 等. 辽宁汉族 2 型糖尿病患者脂联素基因 T45G 多态性与吡格列酮疗效的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(26): 41-45.
- [3] 钱云, 沈洪兵. 中国人 2 型糖尿病遗传易感性的分子流行病学研究[D]. 南京医科大学博士学位论文, 2012, 6 月.
- [4] Banerji MA, Chaiken RL, Huey H, et al. GAD antibody negative NIDDM in adult black subjects with diabetic ketoacidosis and increased frequency of human leukocyte antigen DR3 and DR4 [J]. Diabetes, 1994, 43(6): 741-745.
- [5] Wassim YA, Saria FW, Mona RA, et al. Association of selective HLA Class II susceptibility-conferring and protective haplotypes with type 2 Diabetes in patients from Bahrain and Lebanon[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2006, 13(11): 1296-1298.
- [6] Nasser MA, Omar A, Majed SA, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and HLA-DRB1*04 cosegregation in Saudi type 2 diabetes patients [J]. The Journal of Immunology, 2012, 188 (3): 1325-1332.
- [7] 杨红英, 邵文琳, 袁惠云, 等. 云南汉族 2 型糖尿病与 HLA-DQA1 基因的关联研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2004, 21(3): 291-293.
- [8] 杨红英, 任春锋, 薛丽, 等. 云南彝族 2 型糖尿病与 HLA-DQA1 等位基因多态性的关联研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(6): 702-704.
- [9] 梁敏, 罗佐杰, 洗苏, 等. 广西汉族 HLA-DQA1 基因与 2 型糖尿病关联性的研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2002, 18(1): 48-49.
- [10] 梁杏欢, 罗佐杰, 林健, 等. HLA-DQA1 基因与广西地区壮族 2 型糖尿病的关联性[J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(4): 270-272.
- [11] 刘凤霞, 陈艳, 白鑫, 等. HLA-DQA1 基因与新疆吐鲁番地区维吾尔族 2 型糖尿病高血压的相关性[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(8): 880-885.
- [12] Ma ZJ, Sun P, Zhang R, et al. Association of the HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles in type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy in the Han ethnicity of China [J]. Journal of Diabetes Research, 2013, Article ID 452537, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/452537>.
- [13] Acton RT, Roseman IM, Bell DS, et al. Genes within the major histocompatibility complex predict NIDDM in African-American women in Alabama[J]. Diabetes Care, 1994, 17(12): 1491-1494.
- [14] 王晓艳, 潘芹芹, 樊甦, 等. 江苏汉族人群 HLA-A、B、DRB1 高分辨基因多态性和单体型研究[J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2011, 31(4): 507-512.
- [15] 李维, 唐荣才, 余梅贵, 等. 江苏骨髓分库汉族造血干细胞捐献志愿者 HL A-A、B、DRB 1 基因多态性和单倍型研究[J]. 中国输血杂志, 2007, 20(4): 276-281.
- [16] 罗说明, 周智广. 1 型糖尿病锌转运体 8 自身抗体与 HLA-DR-DQ 及 IFIH1 基因多态性的关联[D]. 中南大学湘雅二医院博士学位论文, 2013, 5 月.
- [17] 吴松华, 孙多奇, 郑泰山, 等. 中国人 2 型糖尿病与 HLA-DQA1 基因的关联研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1997, 13(1): 11-14.

(张蕾 编辑)

致作者信

尊敬的作者、读者:

最近有不法分子利用《中国现代医学杂志》假网站假邮箱诱使作者投稿、约稿, 诈取版面费或者加快费, 同时通过不正当手段将假网站置顶百度搜索结果前几名, 请大家不要向假网站及邮箱投稿。本刊从不向作者发电子版的录用通知, 除审稿费和版面费外不收加快费, 凡是大家收到电子版的盖有《中国现代医学杂志》假公章的《录用通知》都是假的, 更不要寄版面费和加快费。《中国现代医学杂志》投稿路径一: 《中国现代医学杂志》官网 www.zgxdyx.com; 投稿路径二: 进入中南大学湘雅医院官网→首页左下角点击“医学杂志”→点击《中国现代医学杂志》→点击《中国现代医学杂志》官网 <http://www.zgxdyx.com>。请大家提高警惕, 不要上当受骗, 造成不必要的损失。任何事情请来电咨询。编辑部咨询电话: 0731-84327993(咨询时间上午 8:00~12:00, 下午 2:30~5:30)。

《中国现代医学杂志》编辑部