

系统性红斑狼疮中医辨证与人类白细胞抗原-DQ 基因分型的相关性研究

查旭山¹ 谌国维² 范瑞强² 陈达灿² 陈 红²

摘要 目的:探讨系统性红斑狼疮(SLE)中医基本证型与人类白细胞抗原(HLA)-DQ 基因分型的相关性。方法:以广东籍健康者及 SLE 患者全血为研究标本, DNA 的提取用快速盐析法, HLA-DQ 基因分型用序列特异性引物(SSP)法。结果: SLE 患者组中 DQA1 * 0101 的检出率明显高于正常组, DQA1 * 0302、DQB1 * 0301 的检出率明显低于正常组;阴虚内热型的 DQA1 * 0501 基因频率、脾肾阳虚型及阴虚内热型的 DQA1 * 0101 基因频率高于其他各型($P < 0.05$);其他等位基因在各型间比较无统计学意义($P > 0.05$)。结论:广东籍汉族 SLE 患者中,疾病的易感基因表现为 DQA1 * 0101,而疾病的保护性基因在本研究中表现为 DQA1 * 0302、DQB1 * 0301;中医证型有一定的遗传倾向,与 HLA-DQ 基因有一定的内在联系。本研究提示 DQA1 * 0101 与脾肾阳虚及阴虚内热相关连,提示阴虚内热、脾肾阳虚型体质是广东籍 SLE 患者的易感体质,广东籍汉族人 SLE 患者阴虚内热体质还与 DQA1 * 0501 基因相关连,说明中医证型不是与单一的基因相关连,可能与一组或多组基因群关系更为密切。

主题词 红斑狼疮, 系统性/遗传学 辨证分型 @ HLA-DQ 基因分型

人类白细胞抗原(HLA)在机体的免疫识别及免疫反应中均有重要作用,HLA 是迄今发现最具多态性的遗传系统,与系统性红斑狼疮(SLE)有关的主要是 HLA-Ⅱ类基因^[1]。HLA-Ⅱ类基因座在 HLA-D 区,包括 HLA-DQ、DR、DP 三个亚区,其中某些 HLA-DQ、DR 位点间存在较强的连锁不平衡关系。对于 SLE 遗传易感性与 HLA-Ⅱ类基因相关性的认识随着对 HLA 本身的了解而不断深入,应用聚合酶链(PCR)等现代分子生物学技术已能够对多数 HLA 基因,尤其是 HLA-Ⅱ类基因进行分子克隆和核苷酸序列测定^[2],从而可以从 DNA 水平上对 HLA 分型。近年来随着分子生物学技术的发展,进一步揭示了 SLE 与 HLA-Ⅱ类基因特别是 DQ 亚区的关系^[3]。已有学者^[2]提出“共有表位”假说,认为 SLE 中不同 HLA-DQ 等

位基因所共有的多态性序列可能在导致某些自身抗体的产生中起重要作用。已有研究表明,HLA-DQ 基因多态性与 SLE 的种族易感性及临床特征有关^[4,5]。鉴于以上研究的基础,我们试图就 HLA-DQ 基因分型与 SLE 的中医辨证分型间的关系进行进一步探讨,旨在揭示证的本质。

1 资料与方法

1.1 研究对象:拟选广东籍(连续三代出生居住在广东省)汉族 SLE 患者 42 例, SLE 患者均符合 1992 年美国风湿病协会修订的诊断标准,且辨证后确定其中中医证型属于基本证型之一。其中男性 2 例,女性 40 例,年龄 9~62 岁,平均 32.5 ± 6.31 岁,自愿做 HLA 基因分型检测。选取连续三代均为广东籍无亲缘关系的健康者 110 例作为对照组,其中男 43 例,女 67 例,年龄 16~50 岁,平均 31.4 ± 8.24 岁。

1.2 样本来源及处理:以广东籍健康者及 SLE 患者全血为研究标本。入选者均取外周静脉血 4~10ml, ACDB 抗凝,离心(1500r/min)5min 后用毛细管吸取白细胞层,加 20ml 红细胞裂解液,洗 3 次备用。分离白细胞用改良的盐析法提取基因组 DNA,建立 DNA 资源库。

1.3 DNA 的提取用快速盐析法:参照 Miller 等的方法改进。上述备用白细胞的一半加 1ml 白细胞核裂解液, 80μg/L SDS 和蛋白酶 K(终浓度 400mg/L), 56℃ 恒温水浴消化 1h 后,加入 6mol/L NaCl 300μl 剧烈震荡 15~30s, 离心(1000r/min)10min, 吸取上清液 0.8~1.0ml 到另一管中,加入冰无水乙醇 2ml,摇动至絮状 DNA 沉淀析出,挑出 DNA 放入另一管中,用 75% 的冰乙醇洗一次,自然干燥,加 100μl TE 缓冲液。用紫外分光光度计测浓度和纯度,其 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值须在 1.6~1.8 之间。

1.4 序列特异性引物(SSP):根据 1995 年公布的 HLA-Ⅱ类等位基因核苷酸序列,参照 Olerup 等设计序列,由北京大学附属人民医院中心实验室提供。

1.5 PCR-SSP 方法:SSP 只能与等位基因特异性片段的碱基序列互补性结合,从而通过 PCR 反应特异性的扩增该基因片段。在 PCR-SSP 反应体系中,每一 DNA 标本均做 32 支反应管(DQA1 用 12 管,DQB1

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39830460)

1 广州中医药大学第一附属医院皮肤科,广州市机场路 16 号(510405)

2 广州中医药大学第二附属医院皮肤科

收稿日期:2002-11-18;修回日期:2003-01-27

用 20 管), 每管反应液 10 μ l, 每一 PCR 反应管中含有待测基因组 DNA 75ng, 0.25U TaqDNA 聚合酶, 5 $\times$ PCR buffer [50mmol KCl, 1.5mmol MgCl₂, 10mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 0.001% (w/v) Gelatin], Tris-HCl (pH8.3), 0.001% (w/v) Gelatin], Tris-HCl (pH8.3), 0.001% (w/v) Gelatin], 1% BSA, 200 μ mol DTPs (dATP, dGTP, dCTP), 0.25 μ mol 特异性引物。PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5min, 然后变性 94 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$ 退火 65 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$ 延伸 72 $^{\circ}$ C 1min 共 30 个循环。PCR 扩增产物经含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶, 在 100V 电压下进行电泳 15min, 紫外灯下观察电泳结果并照相后直接判断结果。

1.6 统计学方法: 基因频率以直接计算法统计各等位基因的百分率, 用 χ^2 检验或确切概率法统计。P 值用 Bonferroni 法校正。相对危险度 (RR) 用 Woolf 法计算: $RR = ad/bc$ 。式中 a 为群体中携带某一特定 HLA 型的患者人数, b 为群体中不携带某一特定 HLA 型的患者人数, c 为群体中携带某一特定 HLA 型的正常人数, d 为群体中不携带某一特定 HLA 型的正常人数。RR 值显著性检验采用精确概率 P 值法, 并经校正 (Pc)。P 值计算按下列公式:

$$P = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{a! b! c! d! N},$$

不同证型间基因频率比较用 χ^2 检验。

2 结果

SLE 患者与正常人及 SLE 不同中医证型的 HLA-DQA1、DQB1 分型结果如表 1、表 2。

DQA1: 与正常组比较, SLE 患者组中 DQA1 * 0101 等位基因频率显著升高 ($RR = 3.12$, $P_c = 0.036$), DQA1 * 0102 在 SLE 患者组中检出率最高, 但与正常组比较差异无显著性; 而 SLE 患者组中 DQA1 * 0302 的检出率明显低于正常组 ($RR = 0.09$, $P_c = 0.045$)。

DQB1: SLE 患者组中 DQB1 * 0601 频率最高, 但与正常组比较差异无显著性 ($P > 0.05$); DQB1 * 0301 的检出率明显低于正常组, 两者比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。

不同中医证型比较, 脾肾阳虚、阴虚内热型的 DQA1 * 0101 基因频率高于其他各型 ($P < 0.05$), 以脾肾阳虚型最高; 阴虚内热型 DQA1 * 0501 基因频率高于其他各型 ($P < 0.05$), 其他各等位基因在各型间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

汉族的形成和发展无疑经历了十分复杂的融和、

表 1 SLE 患者与正常对照组 DQA1、DQB1 等位

基因频率 (%) 比较						
等位基因	SLE 患者 (42 例)	正常对照 (110 例)	χ^2	P	Pc	RR
DQA1*						
0101	19.04(16)	8.18(18)	8.21	0.004	0.036	3.12
0102	25.00(21)	18.18(40)				
0103	7.14(6)	10.45(23)				
0201	4.76(4)	2.27(5)				
0301	22.62(19)	28.63(63)				
0302	1.19(1)	10.45(23)	7.79	0.005	0.045	0.09
0401	7.14(3)	3.18(7)				
0501	15.48(13)	13.64(30)				
0601	0	0.4(1)				
DQB1*						
0201	17.86(15)	10.91(24)				
0301	0	19.09(42)	22.01	0.000	0.00	0
0302	0	2.73(6)				
0303	9.52(8)	9.09(20)				
0401	0	4.55(10)				
0501	7.14(3)	3.18(7)				
0502	11.90(10)	9.55(21)				
0503	1.19(1)	1.36(3)				
0504	2.38(2)	2.27(5)				
0601	20.24(17)	10.91(24)	5.34	0.019	0.21	2.45
0602	8.33(7)	5.45(12)				

表 2 SLE 患者不同中医证型 DQA1、DQB1 等位

基因频率 (%) 比较						
等位基因	热毒炽盛 型(8 例)	阴虚内热 型(14 例)	脾肾阳虚 型(6 例)	风湿热痹 型(7 例)	肝肾阴虚 型(7 例)	χ^2 P
DQA1*						
0101	18.75(3)	21.43(6)	41.67(5)	14.29(2)	0	9.92 0.04
0102	25.00(4)	21.43(6)	33.33(4)	28.57(4)	21.43(3)	2.59 0.63
0103	18.75(3)	10.71(3)				
0201	0	7.14(2)	0	14.28(2)	0	
0301	31.25(5)	21.43(6)	8.33(1)	21.43(3)	28.57(4)	3.39 0.49
0302	6.25(1)	0				
0401	0	7.14(2)	8.30(1)	0	0	
0501	12.5(2)	28.57(8)	8.33(1)	0	7.14(1)	9.57 0.05
0601						
DQB1*						
0201	12.5(2)	17.86(5)	16.67(2)	28.57(4)	14.29(2)	1.24 0.83
0301						
0302						
0303	18.75(3)	10.71(3)	16.67(2)	0	0	
0304						
0401						
0501	6.25(1)	7.14(2)				
0502	18.75(3)	14.28(4)	8.33(1)	7.14(1)	7.14(1)	1.87 0.76
0503				7.14(1)		
0504	12.50(2)					
0601	25.00(4)	25.00(7)	33.33(4)	14.29(2)	0	7.71 0.10
0602	0	7.14(2)	8.33(2)	14.29(2)	7.14(1)	
0607						
0608						

迁移的过程,不同地域的汉族人群又有各自的特点。我们对 110 例广东籍正常汉族人进行 HLA-DQ 基因分型,发现以 DQA1 * 0301 的频率(28.63%)最高,其次为 DQB1 * 0301(19.09%),与文献中其他 2 组华人群体^[6,7]的资料比较总体检验有显著性差异($P < 0.05$),但均以 DQA1 * 0301 的频率最高,显示华人的遗传系统既具有共性亦有各自的特点。这些资料为进一步研究广东籍汉族人的免疫遗传背景、疾病关联以及与其他群体比较提供了有价值的参考资料。

国内外近年来的研究表明,SLE 中确实存在着易感的 HLA-Ⅱ类等位基因,但存在种族差异。HLA-DQ 多态性在自身免疫性疾病的遗传易感中的作用已受到国内外学者的高度重视。DQ 亚区中 DQA1、DQB1 等位基因有高度的多态性,因而成为研究的焦点^[8]。Reveille 等^[9]研究发现 DQ 亚型 DQ6、DQ2.1 与 SLE 中抗 Ro、La 自身抗体关联。我们研究发现广东籍汉族 SLE 患者中,DQA1 * 0101 等位基因频率均显著高于正常对照组($P < 0.05$),与国内报道有所不同^[10]。HLA-DQB1 基因中 HLA-DQB1 * 0502 虽升高,但与正常组比较无显著性差异($P > 0.05$),即未发现与 SLE 易感的 HLA-DQB1 基因($P > 0.05$)。这表明广东籍汉族 SLE 与 HLA-DQ 的关联性方面,DQA1 * 0101 起主导作用。而 DQA1 * 0302、DQB1 * 0301 等位基因频率在本研究中明显低于正常组($P < 0.05$),说明疾病的保护性基因在本研究中表现为 DQA1 * 0302、DQB1 * 0301,而非江浙地区的 HLA-DQA1 * 0601^[10,11],这提示 HLA-DQA1 * 0302、DQB1 * 0301 对 SLE 发病可能有一定保护作用。另外,部分等位基因如 DQA1 * 0601、DQB1 * 0302、DQB1 * 0401 等虽在正常对照组中检出,但无统计学意义。

随着医疗实践的不断发展,我国古代已有医家依稀感觉到,体质的遗传是有物质基础的,如《类经》中指出:“夫人之器质,既禀于有生之初,则具一定之数。”这里说的“器质”在受生之初已有“定数”说的是体质的遗传,古人认为他是一种靠“元气”来完成的“先天禀赋之气”,虽然我们不能将其与现代遗传学的染色体相类比,但说明数百年前中医对遗传的物质性已有了一个初步的认识。SLE 的治疗至今仍是世界难题之一,结合中医药治疗 SLE 有一定的优势,它可明显减少激素样副作用,提高 SLE 患者的生存质量。中医认为先天肾阴不足、肾之阴阳失衡以致本虚标实是 SLE 的主要病因病机。一方面由于 SLE 病情复杂,临床表现变化多端,整个病程中可能出现热毒炽盛、风湿热痹、肝肾阴虚、脾肾阳虚等证型,但其辨证分型至今尚无统一标

准,给 SLE 证的标准化研究带来困难,因此有必要收集大样本的资料,确定其基本证型,以便使证的研究规范化、科学化;另一方面,虽然 SLE 的发病中可能出现热毒炽盛、风湿热痹、肝肾阴虚、脾肾阳虚等证型,但都是在本虚的基础上演变而来,故 SLE 有一定的易感体质(证型)。近年研究表明,遗传因素在 SLE 的发病中起决定性作用,HLA 是与 SLE 发生、发展关联的主要基因座位,SLE 的遗传易感性主要与 HLA-Ⅱ类多态性基因有关。证的多变性和基因的多态性具有认识上的一致性,辨证论治恢复阴阳平衡与基因治疗具有目的上的一致性,如果能发现“证”的易感基因,则可将基因治疗引入“证”的治疗中,这将为中医辨证论治提供新的方法,对中医现代化具有重要意义。

参考文献

- 1 Dong RP, Kimura A, Hashimoto H, et al. Difference in HLA-linked genetic background between mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigen*, 1993, 41(1): 20-25.
- 2 Lrnett FC. The genetic basis of lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois lupus erythematosus*. 4th ed, Philadelphia, Lea&Febiger, 1992: 13-26.
- 3 Skarsvag S, Hansen KE, Holst A, et al. Distribution of HLC class Ⅱ alleles among Scandinavian patients with systemic lupus erythematosus (SLE): an increased risk of SLE among [DRB1 * 03, DQA1 * 0501, DQB1 * 0201] class Ⅱ homozygotes? *Tissue Antigen*, 1992, 40(3): 128-133.
- 4 谢尚葵,冯树芳,沈福民. 系统性红斑狼疮临床表现与 HLA-Ⅱ类单倍型关联的研究. *中华微生物与免疫学杂志*, 2000; 20(1): 66-69.
- 5 Gladman DD, Urowitz MB, Darlington GA. Disease expression and class Ⅱ HLA antigens in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 1999, 8(6): 466-470.
- 6 孙逸平,高小红,秋季南,等. 中国人南北群体的 HLA class Ⅱ 基因的变异性. *中国免疫学杂志*, 1992, 8(5): 283-286.
- 7 吴耀生,罗超权,杨英浩,等. 序列特异性引物一聚合酶链反应法用于广东汉族人群 DQA1 等位基因分析. *中山医科大学学报*, 1998, 19(2): 157.
- 8 Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, et al. A molecular basis for MHC class Ⅱ-associated autoimmunity. *Science*, 1988, 240(4855): 1003-1009.
- 9 Reveille JD, Maceod MJ, Whittington K, et al. Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro(SS-A)/La(SS-B) autoantibody responses. *J Immunol*, 1991, 146(11): 3871-3876.
- 10 潘星华,陆建荣,猪子英俊,等. 中国汉人 HLA-DQA1 基因对系统性红斑狼疮的遗传易感性研究. *中国免疫学杂志*, 1995, 11(1): 19-22.
- 11 彭学标,徐文严,岳晓玉,等. 汉族系统性红斑狼疮患者 HLA-DQA1 位点多态性分析. *临床皮肤科杂志*, 1996, 25(4): 196-198.