

安徽汉族肾阴不足型免疫性不孕不育症患者 HLA-DQB1 基因多态性研究

刘茜¹ 王望九¹ 鲍鑫¹ 杜华荣² 戴宁¹ 黄震¹ 梁文珍¹
中国明¹ 马宗华¹ 洪燕¹ 陈永华¹ 余荣娇¹ 张凯¹

(1. 安徽中医学院组织胚胎学教研室, 安徽省合肥市梅山路 103 号, 230038; 2. 安徽省计划生育研究所)

[摘要] **目的** 探讨肾阴不足型免疫性不孕不育症患者抗精子抗体与人类白细胞抗原 DQB1 (HLA-DQB1) 基因多态性的关系。**方法** 采用聚合酶链式反应序列特异性引物 (PCR-SSP) 技术, 对 57 例抗精子抗体阳性肾阴不足型不孕不育症患者 (免疫性不孕不育症组) 和 60 例正常健康者 (正常对照组) 的 HLA-DQB1 基因进行分型研究。**结果** 免疫性不孕不育症组 HLA-DQB1 * 0604 等位基因频率明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 而 HLA-DQB1 * 0303 等位基因频率明显低于正常对照组 ($P < 0.05$)。**结论** HLA-DQB1 * 0604 等位基因可能是抗精子抗体阳性肾阴不足型免疫性不孕不育症的易感基因, HLA-DQB1 * 0303 等位基因则可能是其保护基因。

[关键词] 抗精子抗体; 免疫性不孕不育症; 肾阴不足; 人类白细胞抗原; 等位基因

Study on HLA-DQB1 Gene Polymorphism of Kidney Yin Deficiency Immune Sterility Patients of Han Nationality from Anhui Province

LIU Qian, WANG Wangjiu, BAO Xin, et al.

(Department of Histology and Embryology, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038)

ABSTRACT **Objective** To explore the relation between human leukocyte antigen DQB1 (HLA-DQB1) gene polymorphism and anti-sperm antibody of kidney yin deficiency immune sterility patients. **Methods** Polymerase chain reaction-sequence specific primers technique was used for the genotype analysis to study the allele in HLA-DQB1 in 57 kidney yin deficiency immune sterility patients and 60 healthy people of Han nationality. **Results** The allelic frequency of HLA-DQB1 * 0604 was significantly increased in immune sterility patients than that of the healthy subjects ($P < 0.05$), and the allelic frequency of HLA-DQB1 * 0303 was obviously lower than that of the healthy subjects ($P < 0.05$). **Conclusion** The HLA-DQB1 * 0604 allele may be susceptible gene for kidney yin deficiency immune sterility patients with antisperm antibody positive, and the HLA-DQB1 * 0303 allele may be protective gene for immune sterility patients.

Key Words Antisperm antibody; Immune infertility; Kidney yin deficiency; Human leukocyte antigen; Allele

免疫性不孕不育症是 Meeker 于 1922 年首次提出^[1], 通常所说的免疫性不孕不育症即指抗精子抗体 (antisperm antibody, AsAb) 引起的免疫性不孕不育症。人类白细胞抗原-DQB1 (human leukocyte antigen DQB1, HLA-DQB1) 基因是一种具有高度多态性和多种免疫功能的 HLA-II 类基因, 与许多免疫性疾病相关。为探讨不同中医证型的不孕不育症患者与 HLA-DQB1 基因的相关性, 我们将 2007 年 3 月~2008 年 9 月采集的 97 例 AsAb 阳性的免疫性不孕不育症患者分为肾阴不足、湿热内蕴、瘀血阻滞 3 个证型, 并采用聚合酶链式反应序列特异性引物 (PCR-SSP) 技术, 对其中 57 例肾阴不足型患者进行了 HLA-DQB1 基因分

型研究, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例收集

免疫性不孕不育症组: 参照《中国性学百科全书》^[2]中免疫性不孕不育症诊断标准: 结婚两年以上, 夫妇同居, 性生活正常, 未避孕而不育, 排除生殖系统先天性生理缺陷和畸形, 血液 AsAb 阳性。共收集肾阴不足型患者 57 例, 其中男性 27 例, 女性 30 例, 年龄 23~38 岁, 平均 29 岁。主要临床症状如下: 腰酸膝软, 潮热盗汗, 脉细数, 口干低热, 舌红少苔。病例来源于安徽中医学院生殖医学研究室、安徽省中医院男科门诊、妇产科及安徽中医学院国医堂。

正常对照组: 有正常生育史, 年龄 23~38 岁, 平均年龄 30 岁, 身体健康, 血清、精浆、宫颈黏液 AsAb 阴性, 无自然流产史等病理妊娠史, 无免疫性疾病史, 共 60 例, 其中男性 27 例, 女性 33 例。研究对象来源于安

基金项目: 安徽省自然科学基金 (03043003); 安徽省教育厅科研项目

(2000j146); (安徽省 2009 年度高等学校省级优秀青年人才基金项目

(2009SQRZ117)

通讯作者: 王望九, wangjiu@mail.hf.ah.cn, (0551) 5169219

Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

徽省中医学院第一附属医院体检中心。AsAb 的检测参照文献[3]的方法。

1.2 引物设计

参考文献[4]设计 DQB1 的序列特异性引物 (SSP), 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。另设 2 条内对照引物, 用以扩增 β 珠蛋白基因第二内含子的一段保守区域, 作为内对照以判断 PCR 是否成功, 其扩增的特异片段长度为 796bp。

1.3 外周血基因组 DNA 提取

根据上海生工生物工程技术服务有限公司提供的 SK1262 血液基因组 DNA 抽提盒 (批号 0703) 从外周血提取基因组 DNA。

1.4 PCR 扩增

采用 50 μ l 的 PCR 反应体系, 先将未加入 Taq 酶的反应管在 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min, 然后加入 Taq 酶, 后采用三步 PCR 反应, 即在 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 在 58 $^{\circ}$ C 退火 60s, 在 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s。32 个周期循环后, 在 72 $^{\circ}$ C 保温 5min, 反应终止。取 PCR 扩增产物 12 μ l, 按 4:1 (V/V) 与上样缓冲液混合, 在 2.5% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭) 中, 以 0.5 $\times$ TBE 为缓冲液, 120V 电压下电泳 30~45min, 用凝胶成像仪拍照或在紫外分析仪下直接观察结果。以扩增的特异性条带的有无来判断 HLA-DQB1 的基因型。

1.5 统计学方法

根据每一等位基因的出现频数, 计算出该基因的阳性频率。对各等位基因座位的观察数据进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 以估计样本的可靠性。基因频率组间比较用 SPSS11.0 统计软件进行卡方检验 Mantel-Haenszel 公式或四格表确切概率法计算, 以分析组间的 DQB1 的基因型频率分布差异。

2 结果

2.1 两组受试者 HLA-DQB1 的等位基因分布情况

免疫性不孕不育症组及正常对照组等位基因共检出 17 种基因型, 表 1 示, 两组频率最高的均是 DQB1*0602, 其次为 DQB1*0201 和 0601, 未检出 DQB1*0304 和 0607 两种基因型, 部分等位基因 PCR 产物的电泳结果见图 1。两组的 HLA-DQB1 各等位基因进行了比较分析研究, 发现免疫性不孕不育症组 HLA-DQB1*0604 等位基因频率明显高于正常对照组 (OR = 4.453, $P < 0.05$), 因此, HLA-DQB1*0604 等位基因型可以认为是 AsAb 阳性的肾阴不足型免疫性不孕不育症的易感基因。免疫性不孕不育症组 HLA-DQB1*0303 等位基因频率明显低于正常对照组 (OR =

0.299, $P < 0.05$), 可能是其保护基因。

表 1 两组受试者 HLA-DQB1 等位基因分析 [例 (%)]

HLA-DQB1 等位基因	免疫性不孕不育 症组 (57 例)	正常对照组 (60 例)	OR	χ^2	P
0201	16 (14.04)	20 (16.67)	0.816	0.311	0.577
0301	8 (7.02)	11 (9.17)	0.748	0.362	0.547
0302	4 (3.51)	4 (3.33)	1.055	0.005	0.941
0303	4 (3.51) *	13 (10.83)	0.299	4.655	0.031
0401	1 (0.88)	3 (2.50)	0.345	0.916	0.338
0402	5 (4.39)	5 (4.17)	1.055	0.007	0.934
0501	3 (2.63)	2 (1.67)	1.595	0.26	0.61
0502	4 (3.51)	5 (4.17)	0.836	0.068	0.794
0503	2 (1.75)	4 (3.33)	0.518	0.583	0.445
0504	2 (1.75)	3 (2.50)	0.696	0.155	0.693
0601	21 (18.42)	12 (10.00)	1.781	3.422	0.064
0602	29 (25.44)	26 (21.67)	1.233	0.463	0.496
0603	2 (1.75)	3 (2.50)	0.696	0.155	0.693
0604	8 (7.02) *	2 (1.67)	4.453	4.092	0.043
0605	4 (3.51)	3 (2.50)	1.418	0.205	0.651
0606	0	2 (1.67)	1.017	1.916	0.166
0608	1 (0.88)	2 (1.67)	0.522	0.288	0.592

注: 与同基因正常对照组比较, * $P < 0.05$

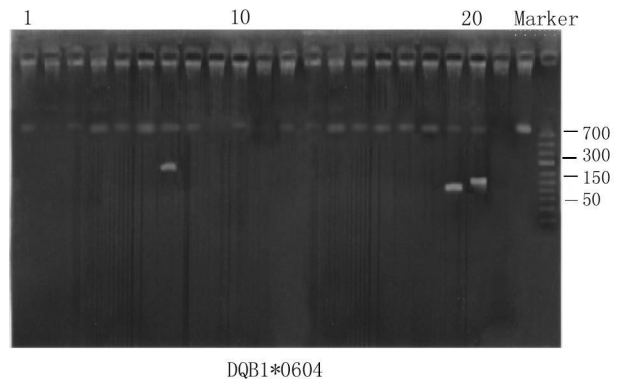


图 1 HLA-DQB1*0604PCR-SSP 扩增效果

注: 23 孔为 Marker, 1-22 孔分别代表 DQB1*0501, 0502, 0503, 0601, 0602, 0603/8, 0604, 0201, 0201/0302, 0301/4, 0302/3, 0303, 0401, 0402, 0504, 0605, 0606, 0602/3/7, 0604/5/6/7, 0604/5/6/8, 0601/0301, 0304

3 讨论

HLA 系统是迄今发现的人类最复杂、最具多态性的遗传系统。其复合体遗传区位于人类第六号染色体短臂 6q21.31, 全长 $3.5 \times 10^6 \sim 4.6 \times 10^6$ 碱基对。HLA 不仅是人类的遗传标志, 而且还与机体免疫应答、免疫调控及某些病理状态的产生密切相关, 杜华荣等[5]采用 PCR-SSP 技术, 以探讨 AsAb 阳性的免疫性不孕不育症患者与 HLA-DQA1 基因的相关性, 结果提示, DQA1*0401 可能是安徽汉族免疫性不孕不育症的易感基因。林其德[6]、郑梅玲等[7]的研究表明, HLA-DQB1*0303 等位基因可能是抗心磷脂抗体阳性习惯性流产患者的易感基因。Hataya 等[8]认为, HLA-

DQB1*0501 是抗心磷脂抗体阳性的习惯性流产患者的保护性基因。Tsujiy^[9]在对 38 例 AsAb 阳性的日本免疫性不孕的女性患者研究中发现, AsAb 阳性所致的免疫性不孕的日本女性 HLA-DRB1*0901 和 DQB1*0303 的频率明显高于其它种族的免疫性不育患者, 可能为该疾病的易感性基因。

由于地域、种族、研究方法、基因连锁不平衡等倚因素的作用, 以及基因的多效性和遗传的异质性可能造成基因型与表现型的不对应。另一方面, 由于同一抗原在递呈的过程中可能被不同的 HLA 等位基因编码的 HLA 抗原所选中, 并诱发出特异性和强度不同的免疫应答, 从而造成不同个体对相同的抗原免疫反应不同, 导致对免疫性不育的易感性也不同^[10], 所以 HLA-II 类基因的多态性也是免疫性不育不同中医证型的结构基础。中医的证与 HLA 的多态性和连锁不平衡现象之间有很多的共同性。中医学认为, 人之禀赋有阴阳, 脏气有强弱, 百姓之血气各不同形。多态性的中医体质类型与 HLA 系统为数众多的复等位基因而具有多态性可参合研究。HLA 基因频率分布同样有其地理差异, 提示自然选择力赋予某些基因的遗传优势。因此, 我们对免疫性不育患者不同的中医证型与 HLA-DQB1 进行相关性研究, 从基因层面探讨中医证型的实质, 阐明中医不同证型的患者存在免疫性不孕不育的易感性。

目前对免疫性不孕不育症的治疗分型还处于探索阶段, 尚未能统一。胡德宝等^[11]在临床上将其分为脾肾两虚型、湿热内蕴型、瘀血阻滞型。李凤仪^[12]将其大致分为脾肾阳虚型、肾阴亏虚型和肝胆湿热型。莫蕙等^[13]将其分为肾阴不足型、瘀血型、湿热型、肾阴虚夹瘀血湿热型、肾阴阳两虚型。虽然各家分型并不完全相同, 但其基本辨证思想是一致的, 多从脏器的虚实着手。本研究以人类免疫遗传系统的 HLA-DQB1 作为指标, 参考胡德宝等的分型标准, 将免疫性不孕不育患者按中医辨证分为肾阴不足型、湿热内蕴型和瘀血阻滞型 3 个证型, 并对肾阴不足型患者进行相关性研究。本研究发现, HLA-DQB1*0604 与肾阴不足型免疫性不孕不育患者有一定的相关性, 故 HLA-DQB1*0604 可能是肾阴不足型免疫性不孕不育患者的易感基因。而 HLA-DQB1*0303 等位基因则可能是其保护基因。这表明免疫性不孕不育的中医辨证分型是有遗传学基础的, 验证了免疫性不孕不育中医辨证的客观性。

参考文献

- [1] Naz RK, Zhu X, Kadam AL. Identification of human sperm peptide sequence involved in egg binding for immunocon-

traception[J]. Biol Reprod, 2000, 62(2): 318-324.

- [2] 吴阶平主编. 中国性学百科全书[M]. 北京: 中国百科全书出版社, 1998: 173.
- [3] 李笑梅, 陈永华, 王望九, 等. 不孕妇女抗精子抗体和抗子宫内膜抗体的检测[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(3): 181.
- [4] Bugwan TL, Klitz W, Alejandrino M, et al. The association of specific HLA class I and II alleles with type 1 diabetes among Filipinos[J]. Tissue Antigens, 2002, 59(6): 452-469.
- [5] 杜华荣, 王望九, 余元勋, 等. 安徽汉族免疫性不孕不育症与 HLA 基因的相关性研究[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 240-242.
- [6] 林其德, 陆佩华, 汪希鹏, 等. 抗心磷脂抗体阳性习惯性流产患者人类白细胞抗原-DQ 区域基因多态性的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(4): 208-211.
- [7] 郑梅玲, 牛丽云. 复发性流产与人类白细胞抗原 DQB1 基因多态性关系的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(3): 152-154.
- [8] Hataya I, Takakuwa K, Tanaka K. Human leukocyte antigen class II genotype in patients with recurrent fetal miscarriage who are positive for anticardiolipin antibody[J]. Fertil Steril, 1998, 70(5): 919-923.
- [9] Tsuji Y, Mitsuo M, Yasunami R, et al. HLA-DR and HLA-DQ gene typing of infertile women possessing sperm-immobilizing antibody[J]. J Reprod Immunol, 2000, 46(1): 31-38.
- [10] 林乔, 王米渠, 李炜弘. 人类基因组信息与证: 虚寒证—阳虚证[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(17): 2298-2302.
- [11] 胡德宝, 戴宁, 李维, 等. 免不 1 号治疗 79 例抗精子抗体阳性不育症的临床研究[J]. 生殖与避孕, 1999, 19(5): 285-289.
- [12] 李凤仪. 抗精子抗体阳性的中医分型[J]. 新中医, 1995, 27(9): 37-38.
- [13] 莫蕙, 郭慧红. 免疫性不孕(AsAb 阳性) 中医病机探讨[J]. 江苏中医, 1998, 19(12): 8-9.

(收稿日期: 2009-03-17; 修回日期: 2009-06-22)

[编辑: 邓媛]

寻求疑难杂症验方合作

您有效果神奇、应用已久、无毒副作用且功效显著的民间验方吗? 您希望它产业化吗? 您期盼它为更多人解除病痛吗? 这样的事情您自己完成有困难吗? 我们来合作好吗? 全国高科技健康产业委自然医学委员会所属的权健国际自然医学集团集科研、生产、销售为一体, 服务网点遍及全国, 旗下的天津权健自然医学科技发展有限公司致力于民间神奇验方的收集整理使之产业化服务人民大众。

期待与您的真诚合作! 共同造福人类!

公司: 天津市权健自然医学科技发展有限公司, 地址: 天津市武清区豆张庄乡权健道 1 号, 邮编: 301707, 电话: 022-22160816、022-22166188, 传真: 022-22160816, 联系人: 常小姐, 公司网址: www.ziranyixue.com。

合作流程: 来电咨询确认(咨询电话: 022-22160816) → 提供临床试用品 10 份 → 试验治愈率 70% 为成功 → 洽谈合作事宜(一般为购买验方)