

广西壮族慢性肾衰患者的 HLA 基因多态性分析^{*}

罗 欢,谢浣宽,黄 冰,罗 靖,顾国龙(广西中医药大学附属瑞康医院检验科,南宁 530011)

【摘要】 目的 研究广西壮族人群人类白细胞抗原(HLA)基因多态性及与慢性肾衰(CRF)的遗传易感性。**方法** 采用聚合酶链反应-序列特异性引物扩增(PCR-SSP)技术,对 46 例广西壮族 CRF 患者及 46 例无血缘关系的广西壮族人群进行 HLA-A、-B 和-DRB1 基因分型,统计分析其抗原频率、基因频率、三座位单倍型频率及相对危险度。**结果** CRF 患者组表达 HLA-A 抗原 9 个,HLA-B 抗原 15 个,HLA-DRB1 抗原 12 个,其中 B56 和 DR4 的基因频率显著高于对照组($P<0.05$),A26、B62 和 DR8 的基因频率显著低于对照组($P<0.05$);患者组总共表达 89 种 A-B-DRB1 三座位单型,其中 A2-B56-DR14 单型频率患者组显著高于对照组($P<0.05$,RR=1.053)。**结论** HLA-B56、DR4 可能是广西壮族 CRF 患者的易感基因,A26、B62 和 DR8 可能是其保护基因,A2-B56-DR14 可能为广西壮族 CRF 患者的易感三座位单倍型。

【关键词】 广西; 壮族; 人类白细胞抗原; 多态性; 肾衰
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.08.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)08-1074-03

慢性肾衰(CRF)是各种原发或继发肾脏疾病发展到晚期的共同结果。经研究发现,多种原发性肾小球疾病的发病与种族和地区有关,也与人类白细胞抗原(HLA)基因的多态性密切相关^[1-3]。HLA 在肾脏疾病的发生、发展及预后中起重要作用。壮族是我国人口最多的少数民族,主要聚居在广西的南宁、百色、河池等地区。对于广西壮族群体而言,CRF 的发病率不亚于汉族。本研究采用聚合酶链反应-序列特异性引物扩增(PCR-SSP)技术,对广西壮族 CRF 患者进行 HLA-A、-B、-DRB1 基因分型,探讨广西地区壮族人群 HLA 基因多态性与 CRF 的遗传易感性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者组:经临床诊断为 CRF 且等候肾移植的患者 46 例,平均年龄 38 岁(18~65 岁),其中男 32 例,女 14 例,均为广西中医药大学附属瑞康医院 2008~2014 年确诊的患者;对照组:健康成年人 46 例,平均年龄 37 岁(17~62 岁),其中男 32 例,女 14 例,性别及年龄分布与疾病组相当。对照组经过问卷调查,对实验知情,自愿同意行 HLA 配型。各检查对象之间无血缘关系,均为连续居住在广西境内 3 代以上的壮族人。

1.2 方法

1.2.1 DNA 模板制备 所有检测标本均为新鲜留取。取受检者外周静脉血 2 mL(EDTA 抗凝),取 200 μ L 用 QIAamp DNA Blood Mini Kit(批号:20120908-222512、20130706-222419、20141024-222523,美国 QIAGEN 公司,购自南宁恒因生物科技有限公司)提取基因组 DNA,DNA 纯度(D260/D280)A 值为 1.7~2.0。

1.2.2 特异性 PCR 扩增 采用 HLA-A、B、DR PCR-SSP 基因分型试剂盒(批号:Unitray Lot#003、004、005,美国 Invitrogen-Dynal 公司,购自南宁恒因生物科技有限公司)进行 HLA 基因分型。具体操作步骤如下:270 μ L 无菌蒸馏水和 7.5 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)于 580 μ L PCR 缓冲液的 DMIX 管中,震荡混匀;取上述混合液 8 μ L 加入分型板的阴性对照孔,加 80 μ L DNA 标本至剩余缓冲液管中,震荡混匀;除阴性孔外每孔中加入上述混合液 8 μ L,用密封条密封试剂板。置于 PCR 扩增仪上进行扩增,循环程序:96 $^{\circ}$ C 60 s,1 个循环;96 $^{\circ}$ C 25 s,70 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,5 个循环;96 $^{\circ}$ C 25 s,65 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,21 个循环;96 $^{\circ}$ C 25 s,55 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 120 s,4 个循

环,最后 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 电泳检测 PCR 产物的检测采用 1 $\times$ TAE 液配制含 0.5 μ g/mL 溴乙啶的 2%琼脂糖凝胶,扩增产物 10 μ L 点样,按 15 V/cm 稳压电泳 20 min,紫外灯下观察结果,应用 SSP 软件分析基因型别。

1.3 统计学处理 用直接计算法计算 HLA-A、-B、-DRB1 抗原频率和基因频率(GF,GF=1- $\sqrt{1-AF}$)。患者组和对照组的对比分析采用 χ^2 检验,并计算相对危险指数(RR=具有某基因型的患者数 $\times$ 无此基因型的对照人数/无此基因型的患者人数 $\times$ 有此基因型的对照人数),四格表 χ^2 检验计算 P 值,所有统计分析均由统计软件 SPSS20.0 完成,以($P<0.05$)为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HLA-A、-B、-DRB1 基因频率 对所有广西壮族 CRF 患者和对照组进行 HLA-A、-B 和-DRB1 基因分型,CRF 患者表达 HLA-A 抗原 9 个,HLA-B 抗原 15 个,HLA-DRB1 抗原 12 个,对照组表达 HLA-A 抗原 9 个,HLA-B 抗原 16 个,HLA-DRB1 抗原 13 个,基因型别和基因频率,见表 1~3。从表 1~3 中两组的基因频率数据计算可以得出,患者组中 B56 和 DR4 的基因频率显著高于对照组($P<0.05$),提示 B56 和 DR4 可能是广西壮族 CRF 患者的易感基因。同时,患者组中 A26、B62 和 DR8 的基因频率显著低于对照组($P<0.05$),提示 A26、B62 和 DR8 有可能是广西壮族 CRF 患者的保护基因(见表 4)。

表 1 两组 HLA-A 等位基因频率分布(%)

HLA-A 基因型别	患者组	对照组
1	1.09	1.09
2	37.45	35.73
3	0.00	1.09
11	34.06	35.73
24	16.59	15.30
26	4.45	6.75
29	2.20	3.31
31	2.20	1.09
33	6.75	6.75
未分型	10.31	7.92

^{*} 基金项目:广西青年基金资助项目(2013GXNSFBA019164)。

表 2 两组 HLA-B 等位基因频率分布(%)		
HLA-B 基因型别	患者组	对照组
5	0.00	1.09
7	1.09	2.20
13	6.75	7.92
27	1.09	0.00
35	9.11	10.31
38	5.59	6.75
46	15.30	14.03
51	3.32	2.20
54	2.20	3.32
56	9.11	2.20
58	4.45	5.59
60	24.82	23.39
61	4.45	4.45
62	4.45	6.75
67	0.00	1.09
75	5.59	7.92
76	3.32	2.20
未分型	5.59	4.45

表 3 两组 HLA-DRB1 等位基因频率分布(%)		
HLA-DRB1 基因型别	患者组	对照组
1	0.00	1.09
4	11.53	9.11
7	1.09	2.20
8	7.92	10.31
9	6.75	7.92
10	3.32	2.20
11	3.32	3.31
12	10.31	9.11
13	5.59	6.75
14	11.53	10.31
15	26.28	24.82
16	7.92	6.75
17	4.45	4.45
未分型	6.75	7.92

表 4 广西壮族 CRF 患者组与对照组 HLA 基因频率的比较(%)				
基因型别	患者组	对照组	RR	P
易感基因				
B56	9.11	2.20	1.438	<0.01
DR4	11.53	7.92	1.062	<0.05
保护基因				
A26	4.45	6.75	0.573	<0.05
B62	4.45	6.75	0.573	<0.05
DR8	7.92	10.31	0.652	<0.05

2.2 单倍型频率及两组间比较 患者组 184 条单型中总共有 89 种 A-B-DRB1 三座位单型,频率>1%的有 6 种;对照组 184 条单型中共有 92 种 A-B-DRB1 单型,频率>1%的有 7 种(见表 5)。两组相比较,只有 A2- B56-DR14 单型频率患者组显著高于对照组($P<0.05$,相对危险比 RR 为 1.053),提示 A2-B56-DR14 可能为广西壮族 CRF 患者的易感三座位单倍型。患者组与对照组相比没有显著降低的三座位单倍型。

2.3 广西壮族与其他地区人群对 CRF 易感性的基因差异比较 将本研究中的广西壮族人群与部分中国汉族人群和部

国外人群相比较,HLA 基因的差异性见表 6。从表 6 中可以看出,广西壮族与南方汉族在易感基因和保护基因方面都有相似性;但与福建汉族和国外人群有很大差异。说明不同地区不同种族的 CRF 与 HLA 基因有不同的相关性。

表 5 广西壮族 CRF 患者组与对照组频率>1%的三座位单倍型比较(%)		
单倍型	患者组单倍型频率	对照组单倍型频率
A2-B56-DR14	2.72 ^a	0.54
A24-B46-DR15	2.17	2.17
A2-B46-DR9	1.63	2.17
A33-B58-DR15	1.63	0.54
A11-B60-DR12	1.09	0.54
A11-B46-DR4	1.09	1.09
A2-B62-DR8	0.54	1.09
A26-B38-DR15	0.00	1.09
A11-B35-DR14	0.54	1.09
A2-B75-DR4	0.54	1.09

注:与对照组相比,^a $P<0.05$ 。

表 6 广西壮族与其他地区 CRF 患者 HLA 易感基因与保护基因的比较				
地区及民族	患者组 (n)	对照组 (n)	易感基因	保护基因
南方汉族 ^[4]	3 911	4 707	HLA-B75, DR4,DR17	HLA-DR8,DR9
大连汉族 ^[5]	312	9 678	HLA-A2,A33, B7,DR4,DR7	/
福建汉族 ^[6]	89	344	DR7,DR12	/
欧洲白人 ^[7]	1 620	1 211	HLA-B35,DR5	HLA-B7,B8, DR2,DR3
巴西混血种人 ^[8]	105	160	HLA-A78,DR11	HLA-B14
广西壮族	46	46	HLA-A56,DR4	HLA-A26, B62,DR8

注:/表示无数据。

3 讨 论

HLA 是人体内最复杂的遗传多态性系统,HLA 与因各类肾脏疾病所致的 CRF 的发生、发展密切相关。Doxiadis 等^[7]报道 1 620 例欧洲白人 IgA 肾病 CRF 患者 HLA-B35、HLA-DR5 抗原频率显著增高,HLA-B7、B8、DR2、DR3 抗原频率显著降低,提示 HLA-B35、DR5 可能是欧洲白人 IgA 肾病患者最终并发 CRF 的易感基因。Crispim 等^[8]通过对 105 例巴西混血种人 CRF 患者的 HLA 多态性研究发现,HLA-A78、DR11 抗原频率显著增高,HLA-B14 显著降低,提示 HLA-A78、DR11 可能是 CRF 的易感基因,HLA-B14 是其保护基因。国内汪艳等^[5]报道 312 例大连地区汉族等候肾移植的 CRF 患者 HLA-A2、A33、B7、DR7、DR4 的基因频率显著高于对照组,提示这些基因可能是该地区汉族人群 CRF 的易感基因。吴月环^[6]对福建汉族的 HLA-DRB1 基因调查研究显示,DR7、DR12 与 CRF 密切相关。韩志明等^[4]对 3 911 例南方汉族 CRF 患者的大样本量研究显示,HLA-B75、DR4 和 DR17 可能对南方地区 CRF 患者具有独立易感关联,而表达 HLA-DR8、DR9 的肾脏病患者将可能不易并发 CRF。本研究发现,CRF 患者组中 B56 和 DR4 的基因频率显著高于对照组,说明 B56 和 DR4 与 CRF 的发病有密切的关联,或者也可以提示携带 B56 和 DR4 的广西壮族肾病患者,预后较差,易发展成不可逆的 CRF。而 A26、B62 和 DR8 的基因频率显著低于对照组,提

示 A26、B62 和 DR8 有可能是广西壮族 CRF 患者的保护基因。

与 HLA 相关疾病的易感基因与 HLA 紧密连锁。也就是说,HLA 等位基因在单个染色体上的组合即 HLA 单倍型更能反映疾病与 HLA 的相关性。韩志明等^[4]报道南方汉族 CRF 患者中 HLA-B75-DR4 单倍型频率显著高于对照组,提示 B75-DR4 可能是与 CRF 相关联的易感单倍型。刘楠等^[10]通过对 377 例汉族 CRF 患者的研究发现,DR11-DQ3、DR12-DQ3、A2-B15 可能是 CRF 的易感单倍型,A2-B38、A33-B58-DR3、DR13-DQ3 可能是 CRF 的保护单倍型。本研究发现,在广西壮族人群中,A2-B56-DR14 单倍型频率患者组显著高于对照组,提示 A2-B56-DR14 可能为广西壮族 CRF 患者的易感单倍型。

CRF 的病因很多,主要由慢性肾小球肾炎、糖尿病肾病、高血压肾病和肾病综合征等 7 种肾脏疾病所致^[11]。如能在本研究的基础上将 CRF 的病因做进一步分类,将有助于研究广西壮族 CRF 的遗传背景和发病机制、CRF 的早期诊断、判断预后及指导临床肾移植工作。因此本组下一步的研究重点是:(1)扩大样本量,进一步证实广西壮族 CRF 患者的 HLA 易感基因与易感单倍型;(2)将 CRF 患者的病因进行分类,研究不同病因所致的 CRF 与 HLA 基因的相关性。

参考文献

[1] Franco C, Yoo W, Franco D, et al. Predictors of end stage renal disease in African Americans with lupus nephritis [J]. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2010, 68(4): 251-256.

[2] Karahan GE, Seyhun Y, Oguz FS, et al. Impact of HLA on the underlying primary diseases in Turkish patients with end-tage renal disease[J]. Ren Fail, 2009, 31(1): 44-49.

[3] Karahan GE, Kekik C, Oguz FS, et al. Association of HLA phenotypes of end-stage renal disease patients pre-

paring for first transplantation with anti-HLA antibody status[J]. Ren Fail, 2010, 32(3): 380-383.

[4] 韩志明,肖露露,于立新,等.南方汉族等候肾移植终末期肾功能衰竭患者 HLA 基因多态性分析[J]. 现代泌尿外科杂志, 2010, 15(2): 110-113.

[5] 汪艳,朱敏,于卫健,等.大连地区汉族慢性肾功能衰竭患者的 HLA 基因多态性[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(3): 225.

[6] 吴月环. 福建汉人 HLA-DRB1 基因的 PCR-SSP 定型分析及其对 CRF 易感性的研究[J]. 医学信息, 2011, 24(2): 720-721.

[7] Doxiadis II, De Lange P, De Vries E, et al. Protective and susceptible HLA polymorphisms in IgA nephropathy patients with end-stage renal failure[J]. Tissue Antigens, 2001, 57(4): 344-347.

[8] Crispim JC, Mendes-Junior CT, Wastowski IJ, et al. HLA polymorphisms as incidence factor in the progression to end-stage renal disease in Brazilian patient awaiting kidney transplant[J]. Transplant Proc, 2008, 40(5): 1333-1336.

[9] 韩志明,肖露露,于立新. 含易感基因的 HLA 单倍型与终末期肾功能衰竭易感性的关系[J]. 山东医药, 2011, 51(18): 21-22.

[10] 刘楠,袁方,梁飞,等. 人类白细胞抗原多态性与慢性肾功能衰竭的遗传易感性研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(1): 33-36.

[11] 王宗谦,尹丽,张思晴. 慢性肾功能衰竭 937 例病因分析[J]. 中国实用内科杂志, 2013, 33(1): 58-61.

(收稿日期:2015-11-07 修回日期:2016-01-03)

• 临床探讨 •

精液生精细胞检查联合血清 FSH 水平预测无精子症患者 睾丸精子获取术成功的价值^{*}

陈伟辉,方小武,吴日然,吴嘉齐,韦剑洪,许小琴(广东省中山市博爱医院生殖中心 528401)

【摘要】 目的 探讨精液生精细胞检查联合血清促卵泡生长激素(FSH)水平用于无精子症患者睾丸精子获取术(TESE)成功与否的价值。**方法** 对 80 例行 TESE 的无精子症患者进行精液生精细胞检查和血清 FSH 水平检测,根据血清 FSH 水平分成 4 组。A 组 FSH 水平低于参考值下限,有 5 例;B 组 FSH 水平处于正常参考值范围,有 51 例;C 组 FSH 水平高于参考值上限的 1 倍,有 14 例;D 组 FSH 水平高于参考值上限的 2 倍,有 10 例;观察 4 组的睾丸精子获取成功率和不同类型生精细胞的睾丸精子获取成功率。**结果** 4 组的睾丸精子获取成功率分别为 40.0%、90.2%、42.9%、20.0%,不同类型生精细胞的睾丸精子获取成功率分别为 0、11.1%、50.0%、72.7%、88.1%。**结论** 精液中生精细胞的有无和类型对睾丸精子获取术成功与否具有较高的预测价值。

【关键词】 无精子症; 生精细胞; 血清 FSH 水平; 睾丸精子获取术
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.08.026 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)08-1076-03

无精子症依据其病理机制分为梗阻性无精子症和非梗阻性无精子症^[1],无精子症患者精液中基本找不到精子,睾丸穿刺取精术是目前临床用来治疗无精子症的重要手段,并且具有较好的临床效果,有报道称 60% 的非梗阻性无精子症患者和

大部分的梗阻性无精子患者可以通过睾丸穿刺取精术的方法获得精子^[2-3],解决生育问题,但是睾丸穿刺手术是一种创伤性手术,容易导致一些并发症的发生,如睾丸血肿、感染、抗体产生以及因手术创伤对睾丸血供的影响导致术后睾丸萎缩等,不

^{*} 基金项目:广东省中山市科技计划项目(2014A1FC026)。