

中国汉族人群蚕蚀性角膜溃疡与 HLA 等位基因的相关性研究

王青松 袁 进 周世有 陈家祺

Association of Mooren's ulcer and HLA alleles in Chinese Han population

Wang Qingsong, Yuan Jin, Zhou Shiyou, Chen Jiaqi. State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Abstract Objective Auto-immunology plays an important role in the pathogenesis of Mooren's ulcer. Recently, researches showed that human leucocyte antigens (HLA) allele is related to Mooren's ulcer. This study was to investigate the association between Mooren's ulcer and HLA alleles in Chinese Han population. **Methods** A total of 17 patients with Mooren's ulcer were collected from the same ethnic group (Han nationality) and different parts of China. And the diagnosis of Mooren's ulcer was determined based on the typical ulcer findings, history, and physical examination of eye and relevant laboratory tests. HLA typing (HLA-A, B, DR, DQ) was performed by polymerase chain reaction (PCR) using sequence specific primers (PCR-SSP). Their HLA typing results were compared with published data from control populations of the same ethnic group. **Results** The frequency of HLA-DR17(3) in Mooren's ulcer patients was 29.41%, and that of control population was 5.58% with a statistically significant difference ($RR = 7.05, P < 0.01$). The frequency of HLA-DQ2 in Mooren's ulcer patients was 29.41%, and that of controls was 12.34%, showing a considerable difference between them ($RR = 6.77, P = 0.005$). The frequency of HLA-DQ5 in Mooren's ulcer patients was 14.71% without significant difference in comparison with controls (15.33%) ($RR = 0.95, P = 0.922$). The frequency of HLA-A33 was significantly increased in Mooren's ulcer patients (23.53%) compared with controls (8.95%) ($RR = 3.13, P = 0.003$). A significant difference was also found in frequencies of HLA-B58 and HLA-DQ0303 between patients (20.59%, 29.41%) and controls (6.91%, 5.79%) ($RR = 3.49, P = 0.002; RR = 2.96, P < 0.001$). **Conclusion** Our data support the possible linkage of HLA-DR17(3), HLA-DQ2 gene with Mooren's ulcer. No significant association is found between HLA-DQ5 and Mooren's ulcer in Chinese Han nationality. HLA-A33, HLA-B58 and HLA-DQ0303 genes might be candidate genes of HLA associated with Mooren's ulcer.

Key words Mooren's ulcer; human leucocyte antigens; Chinese Han nationality

摘要 目的 探讨中国汉族人群蚕蚀性角膜溃疡与人类白细胞抗原 (HLA) 基因的相关性。**方法** 根据典型形态特征,结合病史、体格检查和实验室检查确诊蚕蚀性角膜溃疡患者,提取 17 例中国汉族蚕蚀性角膜溃疡患者基因组 DNA。采用序列特异性引物-聚合酶链反应 (PCR-SSP) 法进行 HLA 基因分型。**结果** 在蚕蚀性角膜溃疡组和正常对照组中,HLA-DR17(3) 基因频率分别为 29.41% 和 5.58% ($P < 0.01, RR = 7.05$); HLA-DQ2 基因频率分别为 29.41% 和 12.34% ($P = 0.005, RR = 6.77$); HLA-DQ5 基因频率分别为 14.71% 和 15.33% ($P = 0.922, RR = 0.95$); HLA-A33 基因频率分别为 23.53% 和 8.95% ($P = 0.003, RR = 3.13$)。HLA-B58 基因频率分别为 20.59% 和 6.91% ($P = 0.002, RR = 3.49$); HLA-DQ0303 基因频率分别为 29.41% 和 5.79% ($P < 0.01, RR = 2.96$)。**结论** 中国汉族人群中 HLA-DR17(3) 和 HLA-DQ2 与蚕蚀性角膜溃疡的致病密切相关,与 HLA-DQ5 无相关性。研究同时发现 HLA-A33、HLA-B58 和 HLA-DQ0303 与蚕蚀性角膜溃疡致病可能密切相关。

关键词 蚕蚀性角膜溃疡; 人类白细胞抗原; 中国汉族人群

分类号 R 772.21 文献标识码 A 文章编号 1003-0808(2009)04-0316-03

本课题为国家自然科学基金 (30700929)、卫生部临床重点学科项目 (2004-468) 资助

作者单位: 510060 广州, 中山大学中山眼科中心 国家眼科重点实验室
通讯作者: 陈家祺 (Email: gdeyeb@mail.sysu.edu.cn)

蚕蚀性角膜溃疡是一种慢性疼痛性角膜溃疡, 病变起自角膜边缘, 渐向角膜中央和周边部发展, 可累及巩膜。研究表明, 自身免疫在蚕蚀性角膜溃疡发病过程中发挥着重要作用^[1-3], 但其确切的发病机制尚不

清楚,且无特异而高效的治疗方案。我们前期的研究证实了环孢素 A 治疗的有效性^[4]。近期提示人白细胞抗原 (human leucocyte antigens, HLA) 等位基因 DR17(3)、DQ2 和 DQ5 可能与蚕蚀性角膜溃疡的发病相关,但仅检测了 2 例中国人^[5-6]。本研究检测并分析临床确诊蚕蚀性角膜溃疡的中国汉族患者 HLA-A-B-DRB1 和 HLA-DQ 等位基因,分析其与蚕蚀性角膜溃疡的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

进行性蚕蚀性角膜溃疡患者 17 例,其中男 13 例,女 4 例,单眼患者 12 例,双眼患者 5 例。17 例均为中国汉族人;年龄 31~65 岁,平均(44.6 ± 10.9)岁。根据患者角膜病灶的典型形态,即角膜周边部溃疡,向中央的浸润缘呈穿凿状,结合详细的病史采集、体格检查和实验室检查(抗溶血性链球菌素 O、抗核抗体、抗双链 DNA 抗体等),并排除可引起周边性角膜溃疡的系统性疾病后确诊为蚕蚀性角膜溃疡。

1.2 主要试剂与仪器

DNA 快速抽提试剂盒、人类基因组 DNA 提取纯化试剂盒(德国 QiaGen 公司);PCR 扩增仪、Syngene 凝胶成像分析系统(美国 PE 公司);PCR-SSP 基因分型试剂盒、Clintyper 分析软件(美国 PEL-FREEZ 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 的提取 按照人类基因组 DNA 抽提、纯化试剂盒说明提取 DNA。取 0.5% EDTA 抗凝全血 200 μL 置于 1.5 mL 离心管中,加入 200 μL AL 缓冲液和 20 μL 蛋白酶 K 混匀,56 °C 孵育 10 min,加入 200 μL 无水乙醇混匀,转移至树脂柱,10 000 r/min 离心 1 min,加入 500 μL AW1,10 000 r/min 离心 1 min,加入 500 μL AW2,10 000 r/min 离心 3 min。将树脂柱转移至 1.5 mL 离心管,加入 200 μL 无菌蒸馏水,室温孵育 1 min,10 000 r/min 离心 1 min。紫外分光光度计测 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.6~1.9,符合 PCR 反应的要求。

1.3.2 PCR-SSP 分型 采用美国戴诺公司提供的 HLA-A-B-DRB1 基因低分辨率分型试剂盒和 HLA-DQ 基因高分辨率分型试剂盒行 PCR-SSP 分型。按照试剂盒说明将适量 DNA、蒸馏水、Taq 酶和 PCR 缓冲液混合均匀,取 8 μL 混合液加入分型板的反应孔中,阴性对照孔不加,用密封条封闭试剂板,并标记样品号。PCR 扩增条件为:94 °C 变性 1 min;以 94 °C 25 s、70 °C 50 s、72 °C 45 s 为 1 个循环,扩增 5 个循环;再以 94 °C 25 s、65 °C 50 s、72 °C 45 s 为 1 个循环,扩增 21 个循

环;最后以 94 °C 25 s、55 °C 60 s、72 °C 120 s 为 1 个循环,扩增 4 个循环。取 PCR 反应产物 8 μL 上样到 2% 琼脂糖凝胶,电泳 20 min(1 × TBE,8 V/cm)后,在紫外线凝胶成像仪下观察结果,分析电泳带,确定 HLA 等位基因分型结果。如果出现分型结果有疑问的样本,用与原分型试剂不同批号或其他厂家试剂进行复核。

1.3.3 结果分析 HLA 基因频率采用直接计数法计数:pi = 基因组数/2N(pi 为相应基因频率,N 为观察数)^[7]。HLA-A-B-DRB1 基因频率正常对照组采用已知的 20 596 例健康汉族 HLA 基因频率资料^[8],HLA-DQ 基因频率正常对照组采用已知的 535 例汉族 HLA 基因频率资料^[9]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计学软件进行分析,采用 χ² 检验比较两组各位点等位基因频率差异。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

蚕蚀性角膜溃疡组的 HLA-A-B-DRB1 和 HLA-DQ 等位基因的频率分布见表 1 和表 2。与健康对照组相比,HLA-DR17(3) 和 HLA-DQ2 的基因频率差异均有统计学意义(P < 0.01),其相对危险度(RR)分别为 7.05 和 6.77(表 3)。同时,与对照组相比,HLA-A33、HLA-B58 和 HLA-DQ0303 的基因频率差异均有统计学意义(P = 0.003、0.002、0.005,RR = 3.13、3.49、2.96)(表 4)。而包括 HLA-DQ5 在内的其他基因,其频率和对照组相比,差异均无统计学意义(表 1~3)。

表 1 HLA-A-B-DRB1 等位基因在蚕蚀性角膜溃疡组(n = 17)和健康对照组(n = 20 596)的分布
Table 1 Distribution of HLA-A-B-DRB1 alleles in Mooren's ulcer patients and controls

HLA	Gene frequency of MU group(×10 ⁻²)	Gene frequency of control(×10 ⁻²)
A2	20.47	31.53 ^a
A11	32.35	22.68 ^a
A24	17.65	17.33 ^a
A33	23.53	8.95 ^b
B7	5.88	1.76 ^a
B35	2.94	4.30 ^a
B39	2.94	2.80 ^a
B54	2.94	3.55 ^a
B58	20.59	6.91 ^b
B60	5.88	10.12 ^a
B61	2.94	5.89 ^a
B75	5.88	5.08 ^a
DR1	2.94	1.38 ^a
DR4	5.88	12.78 ^a
DR8	2.94	8.06 ^a
DR9	26.47	18.78 ^a
DR10	2.94	1.31 ^a
DR12	11.76	14.32 ^a
DR14	5.88	4.82 ^a
DR15	11.76	11.76 ^a
DR17(3)	29.42	5.58 ^b

^aP > 0.05, ^bP < 0.05

3 讨论

HLA 基因位于 6p21.3,是人体调控特异性免疫应答反应和决定病原体或者疾病易感性个体差异的主要

表 2 HLA-DQ 等位基因在蚕蚀性角膜溃疡组 (n = 17) 和健康对照组 (n = 535) 的分布

Table 2 Distribution of HLA-DQ alleles in Mooren's ulcer patients and controls

HLA	Gene frequency of MU group (× 10 ⁻²)	Gene frequency of control (× 10 ⁻²)
DQ2	29.41	12.34 ^b
DQ3	44.12	40.75 ^a
DQ0301	11.76	8.22 ^a
DQ0302	2.94	2.62 ^a
DQ0303	29.41	5.79 ^b
DQ5	14.71	15.33 ^a
DQ6	11.74	18.69 ^a

^aP > 0.05, ^bP < 0.05

表 3 蚕蚀性角膜溃疡组和健康对照组 HLA-DR17(3)、HLA-DQ2 和 HLA-DQ5 的基因频率

Table 3 Gene frequency of HLA-DR17(3), HLA-DQ2 and HLA-DQ5 in Mooren's ulcer patients and controls

HLA	GF of MU group (× 10 ⁻²)	GF of control (× 10 ⁻²)	χ ²	P	RR(95% CI)
DR17(3)	29.41	5.58	36.49	0.001	7.05(3.37 - 14.8)
DQ2	29.41	12.34	8.05	0.005	2.96(1.36 - 6.47)
DQ5	14.71	15.33	0.01	0.922	0.95(0.36 - 2.53)

表 4 蚕蚀性角膜溃疡组和健康对照组 HLA-A33、HLA-B58 和 HLA-DQ0303 的基因频率

Table 4 Gene frequency of HLA-A33, HLA-B58 and HLA-DQ0303 in Mooren's ulcer patients and controls

HLA	Gene frequency of MU group (× 10 ⁻²)	Gene frequency of control (× 10 ⁻²)	χ ²	P	RR(95% CI)
A33	23.53	8.95	8.85	0.003	3.13(1.42 - 6.92)
B58	20.59	6.91	9.89	0.002	3.49(1.52 - 8.03)
DQ0303	29.41	5.79	26.67	0.001	6.77(2.98 - 15.41)

基因系统,具有高度多态性,其等位基因的分布具有显著的人种、民族、地域特异性。HLA 基因系统不仅是器官移植^[10]和细胞移植^[11]是否成功的关键因素之一,同时在疾病相关性研究^[12]、群体遗传学^[13]、法医个体识别^[14]等领域发挥着重要作用。

蚕蚀性角膜溃疡是一种慢性疼痛性角膜溃疡,初发于角膜缘,向角膜中央和周边部发展,可累及全角膜。其确切的发病机制目前尚不清楚,有学者认为角膜外伤、白内障、角膜手术、碱烧伤、单纯疱疹病毒感染、带状疱疹病毒感染、丙型肝炎病毒感染、梅毒螺旋体感染以及某些寄生虫感染是其可能的致病因素。我们的研究明确否定了丙型肝炎病毒感染与蚕蚀性角膜溃疡致病的相关性^[15]。

在前期研究中,Taylor 等^[5]研究了 12 例蚕蚀性角膜溃疡患者的 HLA 基因频率,其中包括欧洲白人、非裔黑人、亚裔印度和印度尼西亚人,提出 HLA-DR17(3)和 HLA-DQ2 可能与蚕蚀性角膜溃疡发病密切相关;Liang 等^[6]研究了中国台湾的 2 例蚕蚀性角膜溃疡

患者的 HLA 基因频率,结果支持 HLA-DR17(3)和 HLA-DQ2 与蚕蚀性角膜溃疡发病密切相关,并提示 HLA-DQ5 也与蚕蚀性角膜溃疡发病相关;Zelevsky 等^[16]研究了 38 例印度南部蚕蚀性角膜溃疡患者的 HLA-DR 和 HLA-DQ 的基因频率,研究结果再次支持 HLA-DR17(3)与蚕蚀性角膜溃疡发病密切相关,但对 HLA-DQ2 与蚕蚀性角膜溃疡发病的相关性并不肯定。

本研究结果表明,在中国汉族人群中,HLA-DR17(3)和 HLA-DQ2 与蚕蚀性角膜溃疡发病密切相关,其 RR 分别为 7.05 和 6.77;HLA-DQ5 与蚕蚀性角膜溃疡发病无相关性。本研究同时发现 HLA-A33、HLA-B58 和 HLA-DQ0303 与蚕蚀性角膜溃疡发病可能也密切相关,其 RR 值分别为 3.13、3.49 和 2.96。由于 HLA 基因系统的特点,不同人种、民族、地域以及更大样本条件下的研究结果与目前研究结论是否吻合,尚有待进一步的研究。

参考文献

- Lopez JS, Price FW, Jr, Whitcup SM, et al. Immunohistochemistry of Terrien's and Mooren's corneal degeneration[J]. Arch Ophthalmol, 1991, 109: 988 - 992
- Brown SI, Mondino BJ, Rabin BS. Autoimmune phenomenon in Mooren's ulcer[J]. Am J Ophthalmol, 1976, 82: 835 - 840
- Gottsch JD, Liu SH, Minkovitz JB, et al. Autoimmunity to a cornea-associated stromal antigen in patients with Mooren's ulcer[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36: 1541 - 1547
- Chen J, Xie H, Wang Z, et al. Mooren's ulcer in China: a study of clinical characteristics and treatment[J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84: 1244 - 1249
- Taylor CJ, Smith SI, Morgan CH, et al. HLA and Mooren's ulceration[J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84: 72 - 75
- Liang CK, Chen KH, Hsu WM, et al. Association of HLA type and Mooren's ulcer in Chinese in Taiwan[J]. Br J Ophthalmol, 2003, 87: 797 - 798
- 赵桐茂. 人类血型遗传学[M]. 北京: 科技出版社, 1987: 235 - 236
- 孙继丽, 杜可明, 傅敏, 等. 20596 名汉族造血干细胞供者 HLA 多态性统计学分析[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(5): 379 - 384
- Shaw CK, Chen LL, Lee A, et al. Distribution of HLA gene and haplotype frequencies in Taiwan: a comparative study among Min-nan, Hakka, aborigines and mainland Chinese[J]. Tissue Antigens, 1999, 53: 51 - 64
- Duquesnoy RJ. Clinical usefulness of HLA Matchmaker in HLA epitope matching for organ transplantation[J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20(5): 594 - 601
- Petersdorf EW. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation[J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20(5): 588 - 593
- Ghodke Y, Joshi K, Chopra A, et al. HLA and disease[J]. Eur J Epidemiol, 2005, 20(6): 475 - 488
- Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications[J]. Yonsei Med J, 2007, 48(1): 11 - 23
- Wu YY, Csako G. Rapid and/or high-throughput genotyping for human red blood cell, platelet and leukocyte antigens, and forensic applications[J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1 - 2): 165 - 176
- Wang QS, Yuan J, Zhou SY, et al. Chronic hepatitis C virus infection is not associated with Mooren's ulcer[J]. Eye, 2008, 22(5): 697 - 700
- Zelevsky JR, Taylor CJ, Srinivasan M, et al. HLA-DR17 and Mooren's ulcer in south India[J]. Br J Ophthalmol, 2008, 92: 179 - 181

(收稿: 2009-01-19 修回: 2009-02-21)

(本文编辑: 王莉红)