

· 论 著 ·

# 强直性脊柱炎与 HLA-B27 基因亚型的相关性研究

王 华,甄拴平,党丽君,张树琪  
(陕西省宝鸡市中医医院检验科 721001)

**摘要:**目的 探讨不同人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)基因亚型与强直性脊柱炎(AS)的相关性。方法 采集骨科、针灸风湿科门诊及住院患者静脉全血,应用基因分析法定性检测 HLA-B27,其中 HLA-B27 阳性的 AS 确诊患者 380 例,并选取 HLA-B27 阳性健康对照组 50 例,同时通过序列特异性引物 PCR(PCR-SSP)技术检测 AS 患者和健康对照组的 HLA-B27 基因亚型。结果 380 例 AS 患者中,检出 HLA-B2704 亚型 217 例(57.1%),HLA-B2705 亚型 143 例(37.6%),HLA-B2707 亚型 11 例(2.9%),HLA-B2711 亚型 9 例(2.4%);50 例 HLA-B27 阳性健康对照组中,检出 HLA-B2706 亚型 23 例(46.0%),HLA-B2709 亚型 21 例(42.0%),HLA-B2704 亚型 4 例(8.0%),HLA-B2705 亚型 2 例(4.0%),两组比较差异有统计学意义( $P=0.002$ )。结论 宝鸡地区 AS 患者 HLA-B27 基因亚型以 B2704 和 B2705 为主,与宝鸡地区汉族人群 AS 的发病呈强相关;B2706 及 B2709 为该地区保护亚型。

**关键词:**强直性脊柱炎; HLA-B27; PCR-SSP; 亚型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)14-1954-03

## Study on correlation between ankylosing spondylitis and HLA - B27 subgenotype

WANG Hua, ZHEN Shuanping, DANG Lijun, ZHANG Shuqi

(Department of Clinical Laboratory, Baoji Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoji, Shaanxi 721001, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the correlation between different HLA-B27 subgenotype and ankylosing spondylitis (AS). **Methods** The whole venous blood was collected from the outpatients and inpatients of the orthopedics, acupuncture and rheumatism departments and HLA-B27 was qualitatively detected by using the gene analysis method. Among them, 380 cases of AS were HLA-B27 positive, and 50 cases of HLA-B27 positive were selected as the healthy control group. Then the HLA-B27 subgenotypes were detected by using the sequence specific primers PCR(PCR-SSP) technology. **Results** Among 380 cases of AS, 217 cases (57.1%) of HLA-B2704 subgenotype, 143 cases (37.6%) of HLA-B2705 subgenotype, 11 cases (2.9%) of HLA-B2707 subgenotype and 9 cases (2.4%) of HLA-B2711 subgenotype were detected out; among 50 cases of HLA-B27 positive in the healthy control group, 23 cases (46.0%) of HLA-B2706 subgenotype, 21 cases (42.0%) of HLA-B2709 subgenotype, 4 cases (8.0%) of HLA B2704 subgenotype and 2 cases (4.0%) of HLA-B2705 subgenotype were detected out, the differences between the two groups were statistically significant ( $P=0.002$ ). **Conclusion** The subgenotypes of HLA-B27 among the AS patients in Baoji area are dominated by the genotype B2704 and B2705, which is strongly correlated with the occurrence of AS among Han population in Baoji area; B2706 and B2709 are the protective subgenotypes in this area.

**Key words:** ankylosing spondylitis; HLA-B27; PCR-SSP; subtype

强直性脊柱炎(AS)是一种自身免疫疾病,目前尚未明确病因,认为属于遗传性疾病。AS 是一种以骶髂关节炎及中轴关节病变为特征的慢性炎性血清阴性脊柱关节病。AS 致残率高,早期诊断对患者的治疗非常重要。人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)的检测有助于 AS 的诊断,在我国 90% 以上的 AS 患者 HLA-B27 呈阳性<sup>[1]</sup>,同时 HLA-B27 存在多个等位基因,不同亚型的分布有着地域和人种的差别。笔者选取了宝鸡地区 HLA-B27 阳性 AS 患者及健康人进行 HLA-B27 基因亚型检测,探讨本地区主要致病亚型及可能的保护亚型,以期为本地区 AS 的防治提供有用的依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2010 年 1 月至 2014 年 7 月本院骨科、针灸风湿科门诊及住院患者,均为宝鸡及周边地区汉族个体,其中 HLA-B27 阳性的 AS 确诊患者 380 例(符合 1984 年 AS 纽约修订诊断标准<sup>[2]</sup>),男 247 例,女 133 例,男女性别比例 1.86 : 1,平均(35.00 ± 8.37)岁;健康对照组 50 例,均为宝鸡地区汉族

HLA-B27 阳性健康人个体之间无血缘关系,男 33 例,女 17 例,男女比例 1.94 : 1,平均(34.00 ± 6.40)岁。两组年龄、性别比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

**1.2 仪器与试剂** PCR 仪器购自杭州博日,HC-2517 高速离心机购自安徽中佳公司;JY600C 电泳仪购自北京君意公司,全血 DNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒购自台湾贝索公司。BAG HISTO HYPE HLA-B27 Hight 试剂盒和 EXTRA-GENE 试剂盒由德国 BAG 公司提供,上海培清 JS-300 凝胶图像分析仪,Gene Quant Pro 型 DNA 浓度测定仪。

## 1.3 方法

**1.3.1 应用序列特异性引物 PCR(PCR-SSP)定性检测** 外周血 T 淋巴细胞 HLA-B27 清晨空腹抽取患者及健康对照组静脉血 1.0 mL,EDTA 抗凝,各项操作及结果判断严格按照说明书步骤进行。

**1.3.2 HLA-B27 基因亚型测定** 采用 PCR-SSP 技术检测 HLA-B27 阳性患者及健康对照人群 HLA-B27 亚型的 DNA。

(1)DNA 模板的制备:采用 EXTRA-GEN 试剂盒(盐析法),浓度 >50 ng/ $\mu$ L,  $A_{260}/A_{280}$  的比值为 1.6~2.0。(2)PCR 扩增:使用 BAG HISTO HYPE HLA-B27 Hight 试剂盒(可检测 HLA-B2701 至 B2743 亚型),PCR 反应体系的配制和 PCR 扩增反应严格按照试剂盒操作说明书进行。(3)凝胶配制:准确称取 2.0 g 的琼脂糖溶解于 100 mL 0.5×TBE 溶液(浓度为 2.0%)。(4)PCR 扩增产物分析:准确吸取 10  $\mu$ L 扩增产物加入电泳槽内琼脂糖凝胶中,采用 150 mV 电压电泳 10 min,然后用 JS-300 凝胶图像分析仪照相,最后用 BAG HISTO HYPE HLA-B27 Hight 格局分析表进行 HLA-B27 亚型分型结果的

判定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,计数资料采用百分率表示,各组 HLA-B27 阳性率比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结 果

HLA-B27 阳性 AS 患者年龄分布情况,见表 1。AS 患者及健康对照组 HLA-B27 基因亚型检出情况,见表 2。AS 患者及健康对照组 HLA-B27 基因亚型分布差异有统计学意义 ( $P=0.002$ )。

表 1 HLA-B27 阳性 AS 患者年龄分布情况

性别	1~10 岁	11~20 岁	21~30 岁	31~40 岁	41~50 岁	51~60 岁	61~70 岁	71~80 岁	81~90 岁	合计
男										
HLA-B27 阴性(n)	8	97	142	97	108	60	56	13	7	588
HLA-B27 阳性(n)	2	61	75	48	39	14	6	1	1	247
阳性率(%)	20.0	38.6	34.5	33.1	26.5	18.9	9.6	7.1	12.5	29.6
女										
HLA-B27 阴性(n)	5	45	128	174	260	172	72	26	3	885
HLA-B27 阳性(n)	0	13	37	31	31	12	8	1	0	133
阳性率(%)	0.0	22.4	22.4	15.1	10.6	6.5	10.0	3.7	0.0	13.1

表 2 AS 患者及健康对照组 HLA-B27 基因亚型检出情况[n(%)]

亚型	AS 患者(n=380)	健康对照组(n=50)
B2704	217(57.1)	4(8.0)
B2705	143(37.6)	2(4.0)
B2706	0(0.0)	23(46.0)
B2707	11(2.9)	0(0.0)
B2709	0(0.0)	21(42.0)
B2711	9(2.4)	0(0.0)

3 讨 论

目前 AS 确诊主要是依靠临床表现和影像学、实验室检查结果。成年患者 AS 的诊断主要依赖于详细的病史和细致的体格检查,临床表现为腰、骶及下肢关节疼痛,晚期患者脊柱僵硬、活动受限,甚至引起其他组织的伤害,严重影响患者的生活<sup>[3]</sup>;对于有慢性炎性背痛的青少年,特别是缺乏足够的骶髂关节炎影像学证据时,HLA-B27 检测就显得尤为重要。AS 患者遍及世界各地,其总体发病率约为 7.3/100 000,在我国 AS 发病率约为 0.3%,多见于中青年男性,且 AS 致残率高,故早期确诊并及时治疗对患者非常重要。

本研究中,11~20、21~30、31~40 岁的 HLA-B27 阳性率分别为 38.6%、34.5%、33.1%,显著高于其他年龄段,且这些青壮年人群的临床症状和体征普遍不够典型,大多数缺乏足够的骶髂关节炎影像学证据。因此,对本地区疑似 AS 患者应尽早检测 HLA-B27,有助于青壮年 AS 患者的早期诊断和针对性治疗,同时结合 AS 家族史对于 AS 的预防具有积极的意义。尽管 HLA-B27 有助于 AS 诊断,但 HLA-B27 也可能出现于银屑病性关节炎、反应性关节炎和肠性关节炎等疾病,因此,临床

上对于不典型病例有必要进行 HLA-B27 基因亚型检测,这样有利于 AS 与上述疾病的鉴别诊断。

目前认为 HLA-B27 与 AS 可能有以下关系<sup>[4]</sup>:HLA-B27 为 AS 的致病菌或者感染因子受体;HLA-B27 与外来的抗原反应,诱导机体产生抗原耐受性;HLA-B27 增强了中性粒细胞活性;HLA-B27 为免疫应答基因,与机体是否容易感染起决定性因素。

资料显示,HLA-B27 有 81 个亚型,分别命名 B2701~B2782(B2722 等位基因后被删除)。B2705 为分布最广的亚型,可能是其他基因的祖基因,即其他基因是由其进化而来<sup>[5]</sup>,本研究采用的分型方法可检测 HLA-B2701~B2743 共 43 个亚型,涵盖了大多数的常见基因亚型。

研究显示,AS 的患病率与 HLA-B27 的出现频率和种族分布差异紧密相关,约 90% 的 AS 白人患者 HLA-B27 呈阳性,而在非洲黑人和日本人中,几乎不存在 AS 和 HLA-B27 相关性(HLA-B27 的阳性率低于 1%)。同时不同 HLA-B27 亚型有着不同的地域和人种分布特点<sup>[6]</sup>。在世界范围内,除了西非的塞内加尔、冈比亚外,B2705 和 AS 及相关的脊柱关节病有明显相关性。B2702 主要存在于白种人,中东犹太人和北非人;B2704、B2706、B2707 只在东方人种中发现,在我国也以 B2704 最多见,约占 55%,是主要的 HLA-B27 亚型,但 B2704 的分布频率在东方各民族间又存在一定差异<sup>[6]</sup>,究其原因,主要受 HLA-B27 易感性因素或地理环境因素差异的影响。

有报道认为,B2705、B2704、B2702 亚型与 AS 的发生呈正相关,B2703、B2708、B2709、B2707 与 AS 的发生呈负相关<sup>[7-9]</sup>,而 B2706 亚型则被普遍认为是 AS 的保护性基因。本研究结果显示,宝鸡地区 HLA-B27 阳性患者亚型分布依次为 B2704、B2705、B2707、B2711,且 B2704 亚型占 57.1%,B2705 亚型占 37.6%。50 例 HLA-B27 阳性健康对照组检出 4 种亚型:HLA-B2706 亚型 23 例(46.0%),HLA-B2709(下转第 1958 页)

2013 年后已无本地疟疾病例报告,但随着输入性疟疾不断增多,卵形疟病例显著增加<sup>[4]</sup>。因此,加强基层医疗单位对少见疟疾种类的培训,并在传统镜检、RDTs 方法基础上,结合 PCR 等分子生物学诊断技术,对降低少见输入性疟疾病例的漏诊、误诊,减少重症病例发生及防止输入性疟疾在本地传播,巩固消除疟疾的成果有重要意义。

参考文献

[1] Stephens JWW. A new Malaria parasite of man[J]. Proceedings of the Royal Society of London, 2016, 87(596): 375-377.

[2] Fuehrer HP, Noedl H. Recent advances in detection of Plasmodium ovale; implications of separation into the two species Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium ovale curtisi[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 387-391.

[3] 黄光全, 胡乐群, 张华勋, 等. 湖北省输入性疟疾发病态势及防控措施分析[J]. 中国热带医学, 2013, 13(12): 1490-1493.

[4] Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 61(2): 315-320.

[5] Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, et al. Genetic polymorphisms influence Plasmodium ovale PCR detection accuracy[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(5): 1624-1627.

[6] Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite

Plasmodium ovale occur globally[J]. J Infect Dis, 2010, 201(10): 1544-1550.

[7] De Laval F, Oliver M, Rapp C, et al. The challenge of diagnosing Plasmodium ovale malaria in travellers; report of six clustered cases in French soldiers returning from West Africa[J]. Malar J, 2010, 9: 358.

[8] Tordrup D, Virenfeldt J, Andersen FF, et al. Variant plasmodium ovale isolated from a patient infected in Ghana [J]. Malar J, 2011, 10: 15.

[9] De Laval F, Simon F, Bogreau H, et al. Emergence of plasmodium ovale malaria among the French armed forces in the republic of Ivory Coast; 20 years of clinical and biological experience[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(8): 122-128.

[10] Rojo-Marcos G, Rubio-Muñoz JM, Ramírez-Olivencia G, et al. Comparison of imported Plasmodium ovale curtisi and P. ovale wallikeri infections among patients in Spain, 2005-2011[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(3): 409-416.

[11] 李美, 夏志贵, 汤林华. 卵形疟原虫 wallikeri 亚种及其基因检测体系的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(1): 64-67.

[12] Fuehrer HP, Habler VE, Fally MA, et al. Plasmodium ovale in Bangladesh: genetic diversity and the first known evidence of the sympatric distribution of Plasmodium ovale curtisi and Plasmodium ovale wallikeri in southern Asia[J]. Int J Parasitol, 2012, 42(7): 693-699.

(收稿日期: 2016-01-17 修回日期: 2016-03-20)

(上接第 1955 页)

亚型 21 例 (42.0%), HLA-B2704 亚型 4 例 (8.0%), HLA-B2705 亚型 2 例 (4.0%), 经统计分析, 两组差异有统计学意义 ( $P=0.002$ )。证实本地区 AS 患者中 HLA-B27 主要亚型分布为 B2704 亚型与 B2705 亚型, 且 B2704 亚型为优势亚型; 而 B2706 亚型及 B2709 亚型仅见于 HLA-B27 阳性健康者, 提示 B2706 亚型及 B2709 亚型为本地区保护亚型。

综上所述, 通过对宝鸡地区 HLA-B27 阳性的患者及健康对照人群 HLA-B27 分型研究, 发现了本地区 HLA-B27 基因主要致病亚型和可能的保护亚型, 对于症状体征不典型患者和疑难患者的诊断和鉴别诊断具有一定价值。但由于检测病例数量有限, 未能涉及本地区 HLA-B27 基因动态表达量与 AS 患者疾病活动指数的相关性, 后续将进一步开展这方面的工作, 为本地区 AS 的防治提供必要的探索。

参考文献

[1] 高凤云. HLA-B27 检测应用于强直性脊柱炎的临床意义 [J]. 吉林医学, 2012, 33(6): 1164.

[2] Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17(3): 157-171.

[3] 李梦远, 姚中强, 刘湘源. HLA-B27 与强直性脊柱炎免疫

学机制的研究进展 [J]. 生理科学进展, 2011, 42(1): 16-20.

[4] 李微, 王可鹏, 张广繁. 强直性脊柱炎与 HLA-B27 相关性的理论与实践 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(10): 101.

[5] Khan MA. HLA-B27 polymorphism and association with disease [J]. J Rheumatol, 2000, 27(5): 1110-1114.

[6] Duangchanchot M, Puapairoj C, Romphruk A, et al. HLA-B\* 27 subtypes in Northern and Northeastern Thais, Karens, and Bamars determined by a high-resolution PCR-SSP technique [J]. Tissue Antigens, 2009, 73(6): 590-594.

[7] López-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis Evidence for new associations [J]. Tissue Antigens, 1995, 45(3): 169-176.

[8] 汪薇, 李志强. HLA-B\* 27 基因亚型与强直性脊柱炎的相关性研究 [J]. 临床输血与检验, 2009, 11(4): 376-379.

[9] 陆君, 汪薇, 李志强. 强直性脊柱炎患者 HLA-B\* 27 基因亚型及序列研究 [J]. 中国输血杂志, 2011, 24(9): 743-745.

(收稿日期: 2016-01-19 修回日期: 2016-03-22)