

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01153

贵州汉族人群 HLA-DM 基因多态性分析

蒋红梅, 王永霞, 王勇

贵阳医学院临床微生物学和免疫学教研室, 贵阳 550004

摘要: 为了探讨贵州汉族人群 HLA-DM 基因多态性的分布情况, 采用 PCR-RFLP 法对 125 例贵州汉族人进行 HLA-DM 基因分型。结果显示, 贵州汉族人群 DMA*0101~0103 等位基因频率依次是 0.720、0.244、0.036, DMB*0101~0104 等位基因频率分布依次是 0.620、0.156、0.188 和 0.036; 贵州汉族人群中 DMA 的基因型以 DMA*0101/0101 和 0101/0102 为主, 而 DMB 的基因型以 DMB*0101/0101、0101/0102 和 0101/0103 为主。结果表明, HLA-DM 基因多态性具有地区性、民族性的遗传特征。

关键词: HLA-DM; 基因多态性; 汉族人群

HLA-DM polymorphisms in Guizhou Han individuals

JIANG Hong-Mei, WANG Yong-Xia, WANG Yong

Department of Clinical Microbiology and Immunology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Abstract: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine genetic polymorphisms at HLA-DMA/DMB loci in 125 healthy unrelated Han individuals from Guizhou Province. We found that the frequencies of DMA*0101, DMA*0102, and DMA*0103 alleles were 0.720, 0.242, and 0.036, respectively. The frequencies of DMB*0101, DMB*0102, DMB*0103, and DMB*0104 alleles were 0.620, 0.156, 0.188, and 0.036, respectively. Common genotypes for DMA were DMA*0101/0101 and 0101/0102. Common genotypes for DMB were DMB*0101/0101, 0101/0102, and 0101/0103. These results showed that the genetic polymorphism of HLA-DM gene in Han individuals from Guizhou Province is distinct from other regions.

Keywords: HLA-DM; genetic polymorphism; Han individuals

HLA-DM 基因是 1991 年美国 Cho 等^[1]首先发现的, 其位于人类 HLA-Ⅱ 类基因区的 HLA-DP 和 HLA-DQ 基因之间, 是一种非典型的 HLA-Ⅱ 类基因。HLA-DM 基因分为 DMA 和 DMB 两个区, 分别编码 HLA-DMA 分子和 HLA-DMB 分子, 共同组成 HLA-DM 异二聚体分子。目前已明确 DMA 有 4 个等位基因(DMA*0101~0104), DMB 有 5 个等位基因(DMB*0101~0105)^[2]。研究发现, DM 分子在通过

HLA-Ⅱ 类分子途径将抗原递呈给 CD4⁺T 细胞的过程中起着重要作用^[3]。HLA-DM 基因具有一定的多态性, 其遗传多态性的变化能导致 HLA-DM 分子结构与功能的变化, 从而影响 HLA-Ⅱ 类分子途径的抗原递呈过程。因此, DM 分子在某些 HLA-Ⅱ 类分子相关疾病的发病机制中可能有一定作用。本研究通过对贵州籍汉族人群 HLA-DMA 和 HLA-DMB 基因多态性的分析, 获得了相应的群体遗传学数据。

收稿日期: 2008-01-06; 修回日期: 2008-02-21

基金项目: 贵州省高层次人才科研条件特助经费(编号: 030516)资助 [Supported by Research Condition Special Foundation of Guizhou (No. 030516)]

作者简介: 蒋红梅(1973-), 女, 贵州人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 自身免疫病。Tel: 0851-6770945; E-mail: jhmzq@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 研究对象

遵照知情同意原则随机选择健康志愿者 125 例, 相互无血缘关系, 均为贵州籍汉族人, 其中男性 71 例, 女性 54 例, 平均年龄 37.5 岁(17~80 岁)。

1.2 主要试剂

DNA 抽提试剂盒购自美国 PEL-FREEZ 公司, Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶(*Fok*、*Hinf*、*Aci*、*Hha*、*Bsr*、*Apal*)、dNTP 和 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 研究方法

1.3.1 标本采集

静脉采血约 2~3 mL, 用 EDTA·Na₂ 抗凝备用。

1.3.2 DNA 提取

采用 DNA 抽提试剂盒严格按说明书操作。提取的 DNA 用紫外分光光度计测定浓度和纯度, $A_{260/280}$ 应在 1.6~1.8, 提取的 DNA 于 -20℃ 保存备用。

1.3.3 DMA 和 DMB 的 3 号外显子 PCR 扩增

实验所用引物按参考文献[4]设计, 由上海生物工程技术有限公司合成, 其序列如下: DMA 上游引物为 5'-AGTCTCTTTTCCCCCTACAC-3'、DMA 下游引物为 5'-ATCTATCCCTTTTGGCCCCCA-3', DMB 上游引物为 5'-GTCACCCTCCTTCCTAAAC-AT-3'、DMB 下游引物为 5'-CCATCCATCTGCCAT-ACACTT-3'。DMA 的目的产物为 370 bp、DMB 的目的产物为 348 bp。PCR 反应体系包括: 10×PCR 缓冲液 3 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.4 μL, DMA 上游、下游引物各 1 μL, DMB 上游、下游引物各 0.8 μL, 50 ng/μL DNA 模板 6 μL, 2.5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.4 μL, 去离子水 16.4 μL。反应条件: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 1 min, 56℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min(共 30 个循环), 最后 72℃ 延伸 5 min。

1.3.4 PCR 产物电泳

取 7 μL PCR 产物, 5 μL DNA Marker 作标准分子量对照, 在 2% 琼脂糖凝胶上, 120 V 稳压电泳 1 h, 在紫外凝胶成像仪上观察是否扩增出目的条带, 扩增片段长度 DMA 为 370 bp, DMB 为 348 bp。

1.3.5 酶切

DM 基因 PCR 扩增产物共用 6 种限制性内切酶进

行酶切, 即 DMA 基因内切酶 *Fok*、*Hinf*、*Aci*, DMB 基因内切酶 *Hha*、*Bsr*、*Apal*。各酶均切于相应基因的 3 号外显子。酶切反应体系为: 去离子水 2.9 μL, 酶切缓冲液 0.8 μL, PCR 产物 4 μL, 内切酶 0.3 μL, 总反应体系为 8 μL。其中 *Hinf*、*Aci*、*Hha*、*Apal* 的酶切温度为 37℃; *Fok* 的酶切温度为 55℃; *Bsr* 的酶切温度为 65℃。酶切反应时间为 4 h。

1.3.6 酶切产物电泳及判定

酶切产物用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳以分离判定等位基因及基因型。酶切产物 8 μL, 2 μL 6× 上样缓冲液, 恒压 96 V 电泳 1.5 h。电泳结束后, 0.2% 硝酸银染色, 观察结果。

1.4 DMA 和 DMB 等位基因和基因型的判定

有关 DMA 和 DMB 等位基因和基因型的判定方法参照有关文献[4]。

1.5 统计学处理

通过 SPSS 软件包用直接计算法统计各等位基因和基因型的频率, 样本分布经过 Hardy-Weinberg 平衡检验, $P>0.05$ 。

2 结果

2.1 DM 基因的 PCR-RFLP 结果

DMA 和 DMB 等位基因的 PCR-RFLP 的电泳结果见图 1 和表 1。

2.2 贵州汉族人群 DMA 和 DMB 等位基因频率及基因型分布

本研究中共检测到 7 种 DM 等位基因, 即 DMA*0101~0103 和 DMB*0101~0104, DM 等位基因在正常贵州汉族人群中的分布情况见表 2。可见, DMA 等位基因频率以 DMA*0101 最高, 0102 次之, 0103 再次, 未发现 0104 等位基因; DMB 等位基因频率以 DMB*0101 最高, 0103 其次, 0102 再次, 0104 最低。

在 125 例贵州汉族人中, 共检测出 4 种 DMA 基因型和 8 种 DMB 基因型, 分布情况见表 2。其中 DMA 的基因型以 DMA*0101/0101 和 0101/0102 为主(占 85.6%); 而 DMB 的基因型以 DMB*0101/0101、0101/0102 和 0101/0103 为主(占 80.8%)。

3 讨论

HLA-DM 分子在 HLA- 类分子的抗原递呈过

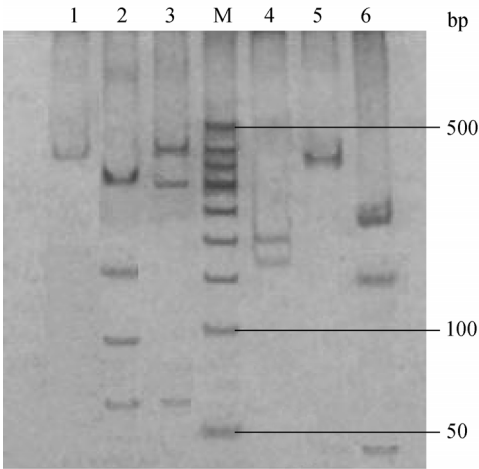


图 1 DM 基因的 PCR-RFLP 结果
M: DNA marker; 1~3: DMA 基因的 PCR-RFLP 结果, 4~6: DMB 基因的 PCR-RFLP 结果, 该标本基因型为 DMA0101/0103、DMB0101/0101。1: *Fok* 酶切结果: 370 bp; 2: *Hinf* 酶切结果: 277, 207, 93, 70 bp; 3: *Aci* 酶切结果: 370, 292, 78 bp; 4: *Hha* 酶切结果: 189, 159 bp; 5: 显示 *ApaI* 酶切结果: 348 bp; 6: *Bsr* 酶切结果: 220, 105, 23 bp。

Fig. 1 PCR-RFLP patterns of DM genes
M: DNA marker; 1~3: Patterns of DMA genes; 4~6: Patterns of DMB genes. This genotype is DMA0101/0103, DMB0101/0101. 1: *Fok* , 370 bp; 2: *Hinf* , 277, 207, 93 and 70 bp; 3: *Aci* , 370, 292 and 78 bp; 4: *Hha* , 189 and 159 bp; 5: *ApaI* , 348 bp; 6: *Bsr* , 220, 105 and 23 bp.

程中可能起着如下作用^[3~5]: (1) 作为经典HLA- 类分子的分子伴侣, 可以保证后者不被分解, 从而维持未装载抗原肽的空HLA- 类分子的稳定; (2) 当有合适的抗原肽出现时, DM分子可以促进占据抗原结合槽的稳定链(CLIP)的释放, 使抗原肽能够和HLA-

类分子结合; (3) DM分子可以作为抗原肽编辑器对与经典HLA- 类分子结合的抗原肽进行编辑、加工、修饰, 以便抗原肽能更好地为CD4⁺ T细胞所识别; (4) DM分子可以催化已与经典MHC- 类分子结合的低稳定肽的释放, 空出抗原结合槽供高稳定性肽与 类分子结合, 从而保证与 类分子结合的肽保持高质量, 使抗原递呈细胞(APC)的HLA- 类分子限制性得到最好的发挥; (5) DM可以延长外源性肽在APC表面的暴露时间, 使其能有足够的时间被CD4⁺ T细胞识别; (6) 细胞表面的DM分子可能涉及到保护性的免疫应答过程, 并与自身免疫性有关。

HLA-DM 基因位于 HLA- 类基因 D 区, 且 HLA-DM 分子在免疫系统中起的重要作用, 再加上 HLA-DM 基因有一定的遗传多态性, 所以推测 HLA-DM 基因的多态性可能在 HLA- 类分子相关疾病中扮演一定的角色。到目前为止, 已有大量关于 HLA-DM 与疾病尤其是自身免疫性疾病之间关联性的研究报道。刘湘源等^[6]通过对汉族人群中类风湿关节炎患者的 HLA-DM 基因研究发现, DM 基因多态性在一定程度上对类风湿关节炎病情及活动有很重要影响。杨文林等^[7]研究发现, HLA DMA*0101 和 DMB*0101 等位基因可能是汉族人群尖锐湿疣的易感基因或与易感基因连锁。

HLA 基因座具有高度遗传多态性, 在不同种族、民族、地域的人群中, 其等位基因和单倍型的频率存在差异, 因此在民族起源、进化、迁徙、融合等人类群体遗传学研究中具有重要作用^[8]。本文分析了贵州汉族人群 HLA-DM 基因多态性的分布

表 1 DM 基因的 PCR-RFLP 结果及等位基因型的判定^[4]
Table 1 PCR-RFLP patterns of DM genes and genotype assignment of DM alleles

DM	等位基因 Allele	氨基酸位点 Amino acid position		DM 基因 PCR-RFLP 结果 PCR-RFLP patterns of DM genes		
		密码子 144 Codon 144	密码子 179 Codon 179	<i>Fok</i>	<i>Hinf</i>	<i>Aci</i>
DMA	0101	Val	Ile	370 bp	207+93+70 bp	292+78 bp
	0102	Ile	Ile	224+146 bp	207+93+70 bp	292+78 bp
	0103	Val	Thr	370 bp	277+93 bp	370 bp
	0104	Ile	Thr	224+146 bp	207+93+70 bp	370 bp
DMB		密码子 144 Codon 144	密码子 179 Codon 179	<i>Hha</i>	<i>Bsr</i>	<i>ApaI</i>
	0101	Ala	Ile	189+159 bp	220+105+23 bp	348 bp
	0102	Glu	Ile	348 bp	220+105+23 bp	348 bp
	0103	Ala	Thr	189+159 bp	220+77+28+23 bp	348 bp
	0104	Val	Thr	348 bp	220+77+28+23 bp	187+161 bp

表 2 贵州汉族人群 HLA-DM 的等位基因及基因型分布

Table 2 The frequencies of HLA-DM alleles and genotypes in 125 healthy Han individuals from Guizhou Province

DMA						DMB					
等位基因	数目	频率	基因型	数目	频率	等位基因	数目	频率	基因型	数目	频率
Allele	<i>n</i>	Frequency	Genotype	<i>n</i>	Frequency	Allele	<i>n</i>	Frequency	Genotype	<i>n</i>	Frequency
0101	180	0.720	0101/0101	66	0.528	0101	155	0.620	0101/0101	48	0.384
0102	61	0.244	0101/0102	41	0.328	0102	39	0.156	0101/0102	27	0.216
0103	9	0.036	0101/0103	7	0.056	0103	47	0.188	0101/0103	26	0.208
0104	0	0.000	0102/0102	9	0.072	0104	9	0.036	0101/0104	6	0.048
			0102/0103	2	0.016				0102/0102	2	0.016
									0102/0103	8	0.064
									0103/0103	5	0.040
									0103/0104	3	0.024

情况,一方面丰富了有关HLA-DM的群体遗传学、法医学及人类学基因库资料,另一方面,为开展HLA-DM多态性与HLA-Ⅱ类分子相关疾病间关系的研究提供了基础数据。实验结果显示,贵州籍汉族人群DMA等位基因频率以0101最高,0102其次,0103最低,未发现0104等位基因;DMB等位基因频率以0101最高,0103其次,0102再次,0104最低。而DMA基因型以DMA*0101/0101和0101/0102为主,DMB基因型以DMB*0101/0101、0101/0102和0101/0103为主。与其他地区研究资料进行比对,发现在不同地区汉族人群中(贵州、安徽、上海、湖南),贵州籍与安徽籍^[9]DMB*0104等位基因频率有显著性差异($P<0.05$),贵州籍与湖南籍^[10]DMB*0102等位基因频率有显著性差异($P<0.05$),贵州籍与上海籍^[11]DMA*0101、DMA*0102等位基因频率有显著性差异(P 均 <0.05)。提示地理环境因素、遗传因素可能对DM等位基因多态性分布有重要影响。

参考文献(References):

- [1] Cho SG, Attaya M, Monaco JJ. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature*, 1991, 353(6344): 573–576. [\[DOI\]](#)
- [2] Brocke P, Garbi N, Momburg F, Hämmerling GJ. HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14(1): 22–29. [\[DOI\]](#)
- [3] Neumann J, König A, Koch N. Detection of aberrant association of DM with MHC class II subunits in the absence of invariant chain. *Int Immunol*, 2007, 19(1): 31–39. [\[DOI\]](#)
- [4] Kuwata S, Yanagisawa M, Nakagawa H, Saeki H, Etoh T, Miyamoto M, Juji T. HLA-DM genes polymorphisms in atopic dermatitis. *Allergy Clin Immunol*, 1996, 98 (6 Pt 2): S192–200. [\[DOI\]](#)
- [5] Jensen PE, Weber DA, Thayer WP, Chen X, Dao CT. HLA-DM and the MHC class II antigen presentation pathway. *Immunol Res*, 1999, 20(3): 195–205. [\[DOI\]](#)
- [6] LIU Xiang-Yuan, MIN Wei-Qi, HUANG Feng, LI Sheng-Guang. Study on HLA polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Chinese population. *Acad J PLA Postgrad Med Sch*, 2002, 23(1): 8–10.
刘湘源, 闵伟琪, 黄烽, 李胜光. 类风湿关节炎患者的HLA-DM基因多态性. 军医进修学院学报, 2002, 23(1): 8–10.
- [7] YANG Wen-Lin, YANG Jian, CHEN Sheng-Qiang, XIE Fang-Ying, HUANG Xin-Yu, YE Ting. HLA-DM gene polymorphism in Cantonese with condyloma acuminata. *J South Med Univ*, 2006, 26(7): 1014–1016.
杨文林, 杨健, 陈盛强, 谢芳英, 黄新宇, 叶婷. 尖锐湿疣患者 HLA-DM 基因多态性研究. 南方医科大学学报, 2006, 26(7): 1014–1016.
- [8] SHEN Chun-Mei, ZHU Bo-Feng, LI Sheng-Bin. HLA-A, B and DRB1 gene polymorphisms in Mongol ethnic group of Inner Mongolia. *Hereditas (Beijing)*, 2008, 30(2): 164–168.
沈春梅, 朱波峰, 李生斌. 内蒙古地区蒙古族 HLA-A、B、DRB1 基因座多态性分析. 遗传, 2008, 30(2): 164–168.
- [9] YE Dong-Qing, LU Wei, SHI Xiao-Ming, LI Xiang-Pei. Genetic polymorphisms of HLA-DM gene at the healthy Han nationality in Anhui. *Chinese Journal of Immunology*, 2002, 18(5): 353–356.
叶冬青, 陆伟, 施小明, 李向培. 皖籍汉族人群 HLA-DM 基因的遗传多态性分析. 中国免疫学杂志, 2002, 18(5): 353–356.
- [10] CHENG Wen, GUO Shi-Shi, SHI Wei, WANG Xiao-Yong. HLA-DM polymorphisms at the healthy Han nationality in Hunan. *Bull Hunan Med Univ*, 2002, 27(1): 91–92.
程文, 郭实士, 施为, 王小勇. 湖南籍汉族人群 HLA-DM 多态性分析. 湖南医科大学学报, 2002, 27(1): 91–92.
- [11] ZHANG Yong, ZHU Xiao-Chun, SUN Xue-Qing. Polymorphism of TAP, LMP and HLA-DM genes of Chinese Han population in Shanghai area. *Current Immunology*, 2006, 26(1): 31–34.
张勇, 朱晓春, 孙雪青. 上海人群中 TAP、LMP 和 HLA-DM 基因多态性研究. 现代免疫学, 2006, 26(1): 31–34.