

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.16.026

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200402.0905.002.html\(2020-04-02\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200402.0905.002.html(2020-04-02))

乙型肝炎病毒相关性肝癌患者 HLA-I 基因多态性分布特征研究

陈甜甜¹, 张春雷^{1△}, 曾学辉¹, 詹葆娥¹, 高素青²

(1. 广东省深圳市中医院检验科 518033; 2. 广东省深圳市血液中心输血医学研究所 518035)

[摘要] **目的** 探讨乙型肝炎病毒(HBV)相关性肝癌(HCC)患者人类白细胞抗原(HLA) I 类(A、B、C)等位基因多态性分布特征。**方法** 用基于 Illumina 平台 GenDx NGSgo 分型方法对 101 例 HCC 患者(试验组)和 186 例健康者(对照组)进行 HLA-I 基因分型,并进行统计学分析。**结果** 与对照组比较,试验组 HLA-I B*44:03 基因频率(2.97% vs. 0.81%)更高,HLA-I A*02:01 基因频率(5.45% vs. 10.48%)和 HLA-I C*03:03 基因频率(2.48% vs. 6.72%)更低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 携带不同 HLA-I 等位基因与 HBV 阳性患者发展成为 HCC 有一定的相关性。

[关键词] HLA 抗原;肝肿瘤;乙型肝炎病毒;二代测序;多态性;单核苷酸**[中图法分类号]** R457.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)16-2723-05

Study on the distribution of HLA-I gene polymorphism in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma

CHEN Tiantian¹, ZHANG Chunlei^{1△}, ZENG Xuehui¹, ZHAN Bao'e¹, GAO Suqing²

(1. Department of Laboratory Science, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen, Guangdong 518033, China; 2. Institute of Blood Transfusion, Shenzhen Blood Center, Shenzhen, Guangdong 518035, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the distribution characteristics of human leukocyte antigen (HLA) HLA-I (A, B, C) allele polymorphisms in patients with hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** HLA-I genotyping on 101 HCC patients (the experiment group) and 186 healthy persons (the control group) was performed by the GenDx NGSgo typing method based on Illumina platform, and analyzed the data. **Results** Compared with the control group, HLA-I B*44:03 gene frequency (2.97% vs. 0.81%) in the experiment group was higher, HLA-I A*02:01 gene frequency (5.45% vs. 10.48%), and HLA-I C*03:03 gene frequency (2.48% vs. 6.72%) in the experiment group was lower, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Different HLA-I alleles correlate with HCC in HBV infection.

[Key words] HLA antigens; liver neoplasms; hepatitis B virus; next generation sequencing; polymorphism, single nucleotide

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是重要免疫相关基因之一,在调节自然杀伤(natural killer, NK)细胞活化过程发挥重要作用。机体在感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)后,病毒的清除依赖于人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)-I 类分子将抗原肽递呈给 CD8⁺特异的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL),再攻击被 HBV 感染的肝细胞从而起到对病毒的杀伤作用。NK 细胞是

否活化取决于活化性受体传递的活化信号和抑制性受体类型,杀伤细胞免疫球蛋白受体(killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR)受体识别靶细胞表面的主要组织相容性复合体(MHC)-I 类分子,传导激活或者抑制信号来控制 NK 细胞的反应。由于不同个体 HLA-I 等位基因的差异,表达不同的 HLA-I 抗原,不同个体携带 HLA-I 和 KIR 基因也不相同,其产物活化后传递的信号性质、强度会有不同,表

作者简介:陈甜甜(1985-),主管技师,本科,主要从事自身免疫性疾病及病毒性肝炎实验室诊断研究。△ 通信作者, E-mail: 47762746@

现出的 NK 细胞功能就有不同^[1-4]。本研究对 101 例肝癌患者 HLA-I 进行基因分型,了解其等位基因多态性分布特征,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 1 月至 2018 年 2 月深圳市中医院肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)并感染乙肝病毒的 101 例患者为试验组,其中男 60 例、女 41 例,年龄 42~75 岁,中位年龄 59.5 岁。纳入标准:(1)原发性 HCC;(2)HCC 的诊断标准参考中国抗癌协会肝癌专业委员会 2001 年修订的标准执行;(3)HCC 患者均为乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)阳性超过 6 个月;(4)其他肝炎病毒血清标志物(甲型肝炎病毒 IgM、丙型肝炎病毒抗体、丁型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗体和戊型肝炎病毒 IgM 和人免疫缺陷病毒抗体)均为阴性。排除标准:患者间有亲缘关系。选取 186 例健康献血者为对照组,其中男 102 例、女 84 例,年龄 20~55 岁,中位年龄 41.0 岁。两组性别构成比比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究获得伦理委员会批准,研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 制备

用 5%乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,采集外周静脉血 5 mL,混匀冻存在 -20°C 冰箱保存待用。DNA 提取时 25°C 解冻后使用全自动核酸提取试剂(台湾瑞宝)制备全基因组 DNA,测定 DNA 浓度,将浓度调整至 $30\sim 50\text{ ng}/\mu\text{L}$,纯度 A260/280 为 $1.62\sim 2.00$ 。

1.2.2 HLA 基因分型

HLA-I A、B、C 基因分型采用基于 Illumina 平台 GenDx NGSgo 全长基因测序方法(北京博富瑞基因诊断技术有限公司, <http://www.bfrbiotech.com/>),送公司严格按照 Illumina 平台测序手册准备基因文库、说明操作检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,对理论频数小于 5 的 χ^2 检验,采用四格表检验的校正公式,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HLA-I A、B、C 位点 Hardy-Weinberg 平衡检验

两组 HLA-I A、B、C 位点期望值和观察值基因频率比较,差异无统计学意义($\chi^2=3.84, P>0.05$),

HLA-I A、B、C 基因分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2.2 两组 HLA-I A 的分布比较

HLA-I A * 02:01、02:03、02:07、11:01、24:02 和 33:03 为两组最常见等位基因,且频率均大于 5%。试验组 HLA-I A * 02:01 基因频率低于对照组(5.45% vs. 10.48%, $OR=0.492$),差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组 HLA-I A 基因频率分布比较[n(%)]

HLA-I A 位点	试验组 (n=101)	对照组 (n=186)	χ^2	P	OR
0101	3(1.49)	4(1.08)	0.183	0.801	1.387
0201	11(5.45)	39(10.48)	4.179	0.040	0.492
0203	16(7.92)	28(7.53)	0.029	0.865	1.057
0205	0	1(0.27)	—	1.000	—
0206	4(1.98)	12(3.23)	0.750	0.387	0.606
0207	29(14.36)	51(13.71)	0.046	0.831	1.055
0209	0	1(0.27)	—	1.000	—
0210	0	2(0.54)	—	0.543	—
0228	0	1(0.27)	—	1.000	—
0301	1(0.50)	4(1.08)	0.060	0.807	0.458
0303	1(0.50)	0	—	1.000	—
1101	55(27.23)	104(27.96)	0.035	0.852	0.964
1102	9(4.46)	14(3.76)	0.163	0.686	1.192
2301	0	1(0.27)	—	1.000	—
2402	33(16.34)	56(15.05)	0.164	0.685	1.102
2403	1(0.50)	1(0.27)	—	1.000	1.846
2407	0	1(0.27)	—	1.000	—
2410	2(0.99)	1(0.27)	0.290	0.590	3.710
2420	1(0.50)	0	—	0.352	—
24353	1(0.50)	3(0.81)	0.000	1.000	—
2601	4(1.98)	4(1.08)	0.261	0.610	1.859
2602	0	1(0.27)	—	1.000	—
2901	0	3(0.81)	0.454	0.501	—
3001	3(1.49)	7(1.88)	0.000	0.990	0.786
3004	0	1(0.27)	—	1.000	—
3101	5(2.48)	5(1.34)	0.429	0.512	1.863
3102	0	1(0.27)	—	1.000	—
3201	1(0.50)	1(0.27)	—	1.000	1.846
3303	18(8.91)	22(5.91)	1.814	0.178	1.556
6801	2(0.99)	1(0.27)	0.290	0.590	3.710
7402	2(0.99)	2(0.54)	0.009	0.923	1.850

—:无数据。

2.3 两组 HLA-I B 的分布比较

HLA-I B * 13:01、15:02、40:01 和 46:01 等位

基因为两组最常见等位基因,且频率均大于 5%。试验组 HLA-B * 44:03 基因频率显著高于对照组 (2.97% vs. 0.81%,OR=3.765),差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组 HLA-B 基因频率分布比较[n(%)]

HLA-I B 位点	试验组 (n=101)	对照组 (n=186)	χ^2	P	OR
0702	0	1(0.27)	—	1.000	—
0705	0	3(0.81)	0.454	0.501	—
1301	16(7.92)	21(5.65)	1.124	0.289	1.438
1302	3(1.49)	10(2.69)	0.399	0.528	0.546
1401	0	1(0.27)	—	1.000	—
1501	4(1.98)	16(4.30)	2.097	0.148	0.449
1502	14(6.93)	21(5.65)	0.378	0.539	1.245
1503	0	1(0.27)	—	1.000	—
1505	0	1(0.27)	—	1.000	—
1507	0	1(0.27)	—	1.000	—
1511	1(0.50)	3(0.81)	0.000	1.000	0.612
1512	0	3(0.81)	0.454	0.501	—
1517	0	1(0.27)	—	1.000	—
1518	2(0.99)	4(1.08)	0.000	1.000	0.920
1519	1(0.50)	1(0.27)	—	1.000	1.846
1525	1(0.50)	1(0.27)	—	1.000	1.846
1527	4(1.98)	2(0.54)	1.424	0.233	3.737
1801	0	1(0.27)	—	1.000	—
1802	1(0.50)	1(0.27)	—	1.000	1.846
2704	4(1.98)	7(1.88)	0.000	1.000	1.053
3501	3(1.49)	9(2.42)	0.195	0.659	0.608
3503	2(0.99)	2(0.54)	0.009	0.923	1.850
3505	1(0.50)	1(0.27)	—	1.000	1.846
3701	3(1.49)	3(0.81)	0.111	0.738	1.854
3801	0	1(0.27)	—	1.000	—
3802	11(5.45)	17(4.57)	0.216	0.642	1.203
3901	0	8(2.15)	2.980	0.084	—
3905	4(1.98)	1(0.27)	2.680	0.102	7.495
4001	35(17.33)	70(18.82)	0.195	0.659	0.904
4002	3(1.49)	2(0.54)	0.485	0.486	2.789
4006	0	8(2.15)	2.980	0.084	—
4401	2(0.99)	1(0.27)	0.290	0.590	3.710
4402	0	4(1.08)	0.882	0.348	—
4403	6(2.97)	3(0.81)	2.693	0.044	3.765
4601	36(17.82)	60(16.13)	0.269	0.604	1.128
4801	1(0.50)	7(1.88)	0.962	0.327	0.259
4803	0	1(0.27)	—	1.000	—
5001	1(0.50)	2(0.54)	0.000	1.000	0.920

续表 2 两组 HLA-B 基因频率分布比较[n(%)]

HLA-I B 位点	试验组 (n=101)	对照组 (n=186)	χ^2	P	OR
5101	10(4.95)	14(3.76)	0.460	0.497	1.332
5102	4(1.98)	5(1.34)	0.055	0.815	1.483
5201	2(0.99)	5(1.34)	0.000	1.000	0.734
5401	10(4.95)	9(2.42)	2.621	0.105	2.101
5502	4(1.98)	8(2.15)	0.000	1.000	0.919
5504	1(0.50)	0	—	0.352	—
5601	0	4(1.08)	0.909	0.340	—
5603	0	2(0.54)	—	0.543	—
5604	0	1(0.27)	—	1.000	—
5701	3(1.49)	1(0.27)	1.317	0.251	5.593
5801	8(3.96)	22(5.91)	1.009	0.315	0.656
8102	1(0.50)	1(0.27)	—	1.000	1.846

—:无数据。

2.4 两组 HLA-I C 的分布比较

HLA-I C * 01:02、03:02、03:04、04:01、07:02 和 08:01 为两组最常见等位基因,且频率均大于 5%。试验组 HLA-I C * 03:03 基因频率低于对照组 (2.48% vs. 6.72%,OR=0.368),差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 3。

表 3 两组 HLA-C 基因频率分布比较[n(%)]

HLA-C 位点	试验组 (n=101)	对照组 (n=186)	χ^2	P	OR
0102	39(19.31)	72(19.35)	0.000	0.989	0.997
0103	0	1(0.27)	—	1.000	—
0104	0	1(0.27)	—	1.000	—
0301	1(0.50)	0	—	0.352	—
0302	11(5.45)	24(6.45)	0.231	0.630	0.835
0303	5(2.48)	25(6.72)	4.315	0.038	0.368
0304	25(12.38)	45(12.10)	0.100	0.922	1.026
0401	12(5.94)	20(5.38)	0.079	0.778	1.112
0403	4(1.98)	6(1.61)	0.663	0.416	2.465
0482	1(0.50)	0	—	0.352	—
0501	0	3(0.81)	0.454	0.501	—
0602	9(4.46)	17(4.57)	0.004	0.950	0.974
0701	0	2(0.54)	—	0.543	—
0702	43(21.29)	68(18.28)	0.759	0.384	12.090
0704	2(0.99)	6(1.61)	0.550	0.814	0.610
0706	3(1.49)	0	3.065	0.080	—
0801	19(9.41)	35(9.41)	0.000	0.999	1.000
0802	0	1(0.27)	—	1.000	—
0803	0	3(0.81)	0.454	0.501	—

续表 3 两组 HLA-C 基因频率分布比较[n(%)]

HLA-C 位点	试验组 (n=101)	对照组 (n=186)	χ^2	P	OR
0822	1(0.50)	0	—	0.352	—
1202	6(2.97)	12(3.23)	0.028	0.867	0.918
1203	1(0.50)	2(0.54)	0.005	0.946	0.920
1206	0	1(0.27)	—	1.000	—
1402	10(4.95)	11(2.96)	1.476	0.224	1.709
1403	3(1.49)	0	3.065	0.080	—
1501	0	1(0.27)	—	1.000	—
1502	7(3.47)	12(3.23)	0.023	0.878	1.077
1505	0	3(0.81)	0.454	0.501	—
1602	0	1(0.27)	—	1.000	—

—:无数据。

3 讨论

HLA-I 类分子几乎表达于所有有核细胞的表面,主要提呈内源性蛋白质抗原,如病毒抗原、肿瘤抗原,供 CLT 识别,诱发其细胞增殖和活化,导致抗原肽段溶解和肿瘤细胞破坏,因此其在免疫系统抵抗病毒和肿瘤中起重要作用。HLA 位于人类第 6 号染色体 6p21.31 区,是一群与免疫应答反应密切相关的基因家簇,HLA 各基因座等位基因具有高度遗传多态性,2015 年前大多数 HLA 基因分型方法使用第一代 DNA 测序技术(又称 Sanger 测序),通常通过设计第 2、3 和 4 外显子引物,获得这些区的外显子序列。近年虽然 HLA 与 HBV 研究热度持续发烧,但这些研究样本量小,且未对 HLA-I A、B 和 C 位点的 cDNA 进行全长测序^[4-10]。但本研究采用 Illumina 平台 GenDx NGSgo 全长基因测序方法,对两组标本进行全长序列测序,从等位基因水平比较差异。

鉴于 HLA 具有多态性,其分布又有种族和地域的差异,故在计算基因频率时,按地域分组研究人类 HLA 等位基因的分布频率。本研究选用深圳市中医院就诊患者作为研究对象,且 HLA-I A、B、C 基因分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡,验证了本研究标本选择的随机性,为本研究试验组与对照组数据比较提供了可靠的数据基础。ALBAYRAK 等^[11]对土耳其人群的研究中发现,HLA-A24 和 Cw1 基因频率在慢性乙型肝炎和乙型肝炎肝硬化组明显降低。SAWAI 等^[12]研究发现 HLA-I A * 33:03 与 HCC 发病率呈正相关性($OR=1.97, P=4.58 \times 10^{-4}$),本研究中试验组 HLA-I A * 33:03 阳性检出率高于对照组(8.91% vs. 5.91%, $OR=1.556$),但差异无统计学意义($P=0.178$),可能与人群差异性及其样本量少有关。

本研究同时也发现 HLA-I A * 02:01 与 HCC 发病率呈负相关性($P=0.040, OR=0.492$),表明这些基因抑制了 HCC 的发生,其原因可能为差异性基因表达导致了差异性的抗原表达,最终影响了机体免疫系统对病毒的清除能力下降。

MEYS 等^[13]研究发现 HLA-I B * 44 和 HLA-I B * 44-C * 05 单倍型频率在人免疫缺陷病毒(HIV)同时携带人乳头瘤病毒(HPV)感染疣的患者中有较高的表现,推测是疾病的易感基因,HLA-I B * 44 基因在本研究中有相似现象,可以进一步推测 HLA-I B * 44 基因是这两类病毒感染的易感基因。而牛津大学研究者发现 HLA-I B * 57 与 HIV 的免疫控制和延缓艾滋病的进展密切相关。携带 HLA-I B * 58:01 等位基因的 HIV 个体不产生 C+T 细胞靶向 kf11 Gag 抗原表位,HLA-I B * 58:01 结合了 kf11 肽,但 HIV 感染的 HLA-I B * 58:01 阳性细胞无法处理 kf11^[14]。本研究 HLA-I B * 58:01 等位基因在试验组阳性检出率虽低于对照组(3.96% vs. 5.91%, $OR=0.656$),但差异无统计学意义($P=0.315$),可能与人群差异性有关,需进一步研究观察。

巴西的研究者发现 HBV 与 HLA-I C 有相关性^[15],本研究中 HLA-I C * 33:03 基因频率低于对照组(2.48% vs. 6.72%, $OR=0.368$),差异有统计学意义($P=0.038$),这一现象也可能提示携带 HLA-I C * 33:03 基因的 HBV 患者降低了发展为 HCC 风险,这些现象有待于积累临床研究资料及功能性实验加以验证。SAITO 等^[16]对年轻组 HCC 患者研究发现,KIR2DL2 绑定 HLA-I C1 组基因,增加了 HCC 患病风险。

综上所述,不同个体携带不同 HLA-I 类等位基因,从而产生不同抗原表达情况,本研究通过两组 HLA-I 类基因频率比较,分析了 HBV 相关的 HCC 患者的 HLA-I A、B、C 等位基因多态性分布特征,为 HCC 患者的 HLA 抗原表达及功能性研究提供遗传学基础数据。但本研究样本量相对较少,部分基因频率观察值较低,后续将进一步扩大病例数量,同时深入研究已经发现差异性基因的具体作用机制。

参考文献

- [1] RAZIORROUH B, SCHRAUT W, GERLACH T, et al. The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8⁺ T-cell func-

- tion[J]. *Hepatology*, 2010, 52(6):1934-1947.
- [2] TREMBLAY-MCLEAN A, BRUNEAU J, LEBOU CHÉ B, et al. Expression profiles of ligands for activating natural killer cell receptors on HIV infected and uninfected CD4⁺ T cells[J]. *Viruses*, 2017, 9(10):E295.
- [3] TANIMINE N, OHDAN H. Impact of multiplicity of functional KIR-HLA compound genotypes on hepatocellular carcinoma[J]. *Oncimmunology*, 2015, 4(1):e983765.
- [4] NIEHRS A, ALTFELD M. Regulation of NK-cell function by HLA class II [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10:55.
- [5] LIU X, WAN T, DANG S, et al. HLA-DQB1/DRB1 alleles associate with traditional Chinese medicine syndrome of chronic hepatitis B: a potential predictor of progression[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019:8146937.
- [6] OU G, XU H, YU H, et al. The roles of HLA-DQB1 gene polymorphisms in hepatitis B virus infection[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1):362.
- [7] KARRA V K, CHOWDHURY S J, RUTTALA R, et al. HLA-DQA1 & DQB1 variants associated with hepatitis B virus-related chronic hepatitis, cirrhosis & hepatocellular carcinoma[J]. *Indian J Med Res*, 2018, 147(6):573-580.
- [8] LIU X, WAN T, DANG S, et al. HLA-DQB1/DRB1 alleles associate with traditional Chinese medicine syndrome of chronic hepatitis B: a potential predictor of progression[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019:8146937.
- [9] SONG Y, XIA T, XIA X, et al. Genetic polymorphisms of the HLA-DP and HLA-DQ genes could influence hepatitis B virus infection in Yunnan population[J/OL]. *Immunol Invest*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32183599/>.
- [10] XIA Y, GAO S, CAI C, et al. A novel HLA-B allele, HLA-B*40:245 was identified in a patient with hepatitis B virus infection[J/OL]. *HLA*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29687633/>.
- [11] ALBAYRAK A, ERTEK M, TASYARAN M A, et al. Role of HLA allele polymorphism in chronic hepatitis B virus infection and HBV vaccine sensitivity in patients from eastern Turkey[J]. *Biochem Genet*, 2011, 49(3):258-269.
- [12] SAWAI H, NISHIDA N, KHOR S S, et al. Genome-wide association study identified new susceptible genetic variants in HLA class I region for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):7958.
- [13] MEYS R, PURDIE K J, DE KONING M N. HLA immunogenotype determines persistent HPV infection in anti-retroviral treated HIV [J]. *J Infect Dis*, 2016, 213(11):1717-1724.
- [14] KLOVERPRIS H N, STRYHN A, HARND AHL M, et al. HLA-specific intracellular epitope processing shapes an immunodominance pattern for HLA-B*57 that is distinct from HLA-B*58:01 [J]. *J Virol*, 2013, 87(19):10889-10894.
- [15] ARAUJO P, GONÇALVES G, LATINI F, et al. KIR and a specific HLA-C gene are associated with susceptibility and resistance to hepatitis B virus infection in a Brazilian population [J]. *Cell Mol Immunol*, 2014, 11(6):609-612.
- [16] SAITO H, UMEMURA T, JOSHITA S, et al. KIR2DL2 combined with HLA-C1 confers risk of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in younger patients [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(28):19650-19661.