

HLA-B27 基因表达量及亚型分析在 AS 疾病评估中的意义^{*}

孙灵迪^a,王平均^b,鹿永^a,武晓茜^a,邵先安^a

(解放军第 123 医院 a. 检验病理科;b. 脊柱外科,安徽蚌埠 233015)

摘要:**目的** 探讨人类白细胞抗原(human leukocyto antigens,HLA)B27(HLA-B27)基因表达量及其亚型在强直性脊柱炎疾病诊疗中的意义。**方法** 收集 120 例疑似强直性脊柱炎患者和 50 例健康体检者的临床资料,对所收集患者的全血采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 HLA-B27 基因相对表达量,在此基础上通过基因测序确认 HLA-B27 基因亚型。采用 SPSS17.0 软件对数据进行分析, $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。**结果** 120 例疑似强直性脊柱炎患者中,确诊 55 例,其中 HLA-B27 阳性 53 例(96.36%),BASDAI 评分与 HLA-B27 基因表达量具有相关性($r=0.845,P=0.000$)。基因亚型分别为 HLA-B27:04 型 29 例(54.72%),HLA-B27:05 型 20 例(37.74%),HLA-B27:02 型 2 例(3.77%),HLA-B27:03 型 1 例(1.89%),HLA-B27:07 型 1 例(1.89%)。50 例健康对照组中筛查 HLA-B27 阳性 2 例(4%),均为 B27:04 亚型。对 HLA-B27:04 和 HLA-B27:05 两种亚型患者年龄($t=0.711,P=0.480$)、性别($\chi^2=0.880,P=0.348$)、家族史($\chi^2=0.011,P=0.916$)和治疗史($\chi^2=0.113,P=0.736$)比较差异无统计学意义。**结论** HLA-B27 阳性 AS 患者以 HLA-B27:04 和 HLA-B27:05 为主。HLA-B27 基因表达量与其疾病活动指数相关。

关键词:强直性脊柱炎;人类白细胞抗原-B27;基因;表达量;疾病活动指数

中图分类号:R593.23;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)01-058-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.016

Significance of the Expression Quantity of HLA-B27 Gene and Its Subtype in Estimating Patients with Ankylosing Spondylitis

SUN Ling-di^a,WANG Ping-jun^b,LU Yong^a,WU Xiao-qian^a,SHAO Xian-an^a

(a. Clinical Laboratory and Pathological Department ;

b. Surgical Department ,the 123 Hospital of PLA ,Anhui Bengbu 233015,China)

Abstract: Objective To investigate whether expression quantity of HLA-B27 and its subtypes associated with incidence of AS,the gene expression of HLA-B27 and its subtypes were detected in patients with AS. **Methods** 120 cases patients suspected with AS and 50 healthy subjects were enrolled in the study. Main demographic and clinical characteristics of the subjects were collected. Meanwhile total RNA was isolated from peripheral blood and real time RT-PCR was used to measure the quantitative expression of HLA-B27 gene. Besides RT-PCR, sequence-based typing (SBT) method was used to confirm the HLA-B27 subtype. All experimental data were analyzed by SPSS17.0 software and P values <0.05 were considered to be significant. **Results** Firstly,there were 55 subjects were finally diagnosed as AS patients among the 120 patients suspected with AS. There were 53 subjects whose HLA-B27 was positive (96.36%) in 55 patients with AS. It showed that there was a correlation between BASDAI and expression quantity of HLA-B27 gene ($r=0.845,P=0.000$). Five subtypes were found and which were HLA-B27:04 subtype (29/53,54.72%),HLA-B27:05 subtype (20/53,37.74%),HLA-B27:02 subtype (2/53,3.77%),HLA-B27:03 subtype (1/53,1.89%) and HLA-B27:07 subtype (1/53,1.89%), respectively. Among the 50 healthy subjects,there were only one kind of subtype (2/50,4%),which was HLA-B27:04. There were no statistical difference in the age ($t=0.711,P=0.480$),sex ($\chi^2=0.880,P=0.348$),family history ($\chi^2=0.011,P=0.916$) and treatment ($\chi^2=0.113,P=0.736$) between the HLA-B27:04 and HLA-B27:05 subtypes. **Conclusion** HLA-B27:04 and HLA-B27:05 were primary subtypes in AS patients which HLA-B27 positive. There was a correlation between gene expression quantity of HLA-B27 and AS disease activity index.

Keywords: ankylosing spondylitis; human Leukocyto Antigens B27; gene; expression quantity; bath ankylosing spondylitis disease activity index

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis,AS)是一种慢性炎症性疾病,该病引发骶髂关节炎及脊柱强直,进而导致患者身体结构变形、功能受损、生活质量下降,给患者及其家庭带来沉重的负担^[1]。AS 我国的发病率约为 0.24%,多发于青壮年男性,已有的研究表明,人类白细胞抗原(human leu-

^{*} 基金项目:南京军区医学科技课题资助项目(12MB015)。
作者简介:孙灵迪(1986—),男,硕士生,研究方向:分子免疫诊断。Tel:18305523929。
通讯作者:邵先安,男,副教授,硕士生导师,研究方向:分子/基因免疫。E-mail:XAShao@126.com。

kocyto antigens, HLA) B27 (HLA-B27) 在 AS 的发病中起着非常重要的作用^[2]。

毕氏强直性脊柱炎疾病活动指数(bath ankylosing spondylitis disease activity index, BASDAI) 是评价 AS 患者临床疾病活动度的重要工具之一, 脊柱关节炎患者中 BASDAI 与炎症、血管生成、软骨及骨转换等均存在着密切关系, 是有效且可靠的评价疾病活动的指标, 被众多学者以及临床工作者广泛接受^[3]。

近年来随着分子生物学技术的普及, 人们对 AS 的研究更加深入, 使得从基因水平探讨 AS 的发病机制成为研究的热点, 也为阐明 HLA-B27 在 AS 发病过程中扮演的角色提供了新的方向^[4]。但目前大多研究集中在 HLA-B27 抗原上, 对 HLA-B27 基因表达量以及各亚型之间在临床表现、BASDAI 评分等可能存在的相关性尚未见报道。基于此, 我们对 HLA-B27 表达量及其基因型进行检测, 以期 AS 的临床诊治和发病机制的研究提供新的视点。

1 材料与方法

1.1 检测对象 收集解放军第 123 医院骨科门诊 2013 年 10 月~2014 年 8 月就诊及住院疑似 AS 患者 120 例, 其中男性 78 例(65%), 女性 42 例(35%), 男女之比为 1.86 : 1, 年龄 28.95 ± 9.67 岁, AS 患者的诊断参照有关标准^[5]。采集患者空腹外周静脉血 4 ml, EDTA 抗凝。随机收集体检健康者 50 例均来自体检中心健康自愿者, 其中男性 32 例(64%), 女性 18 例(36%), 男女之比约为 1.78 : 1, 年龄 29.1 ± 10.34 岁。

1.2 试剂和仪器 RT-PCR 相关试剂(北京天根生化科技有限公司), SIM-F140AY65 型制冰机(日本 SANYO 公司), ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), ChemiDocTMXRS 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)等。

1.3 方法

1.3.1 对 AS 患者均进行疾病活动指数评分, 采用毕氏评分标准(BASDAI)^[3]。

1.3.2 总 RNA 提取及 cDNA 逆转录反应: 全血总 RNA 提取和 cDNA 逆转录按照说明书进行。

1.3.3 荧光定量 PCR 扩增反应: 根据 genbank 中 HLA-B27 基因序列及参考相关文献^[6], 反应程序的设置是以 GAPDH 为内参, 其上游序列(F): 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3', 下游序列(R): 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。HLA-B27 引物上游序列(F): 5'-GGT CCA AGA CGA GGA GGT TC-3', 下游序列(R): 5'-CGT GGG ACA GGA GGA ATT AG-

3'。所有引物均由上海 Sangong 公司合成。PCR 反应预变性 95°C 15 min, 变性 95°C 30 s, 退火 56°C 20 s, 延伸 72°C 32 s, 40 个循环。将 PCR 阳性标本进行基因测序, 测序引物为相对应的各 PCR 反应引物, 测序及分析由南京 Genscript 公司协助完成。

1.3.4 HLA-B27 基因表达量的计算: HLA-B27 基因表达量的计算采用相对含量(F) = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值^[7]进行计算。

1.4 统计学分析 应用 SPSS17.0 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HLA-B27 基因表达量与 BASDAI 评分相关 120 例患者临床确诊为 AS 55 例, 非 AS 65 例。55 例 AS 患者中 HLA-B27 阳性者 53 例(96.36%)。50 例健康对照组中筛查 HLA-B27 阳性 2 例(4%)。HLA-B27 基因表达量以 F 来表示, 53 例 AS 患者 HLA-B27 基因表达量 F 值为 6.34 ± 2.77 。BASDAI 评分为 4.80 ± 1.26 。BASDAI 评分与 F 具有强相关性($r = 0.845$, $P = 0.000$)。提示 HLA-B27 基因表达量有可能作为 AS 病情活动度评估的客观指标。

2.2 AS 患者 HLA-B27 基因亚型分析 55 例 AS 患者中 HLA-B27 基因亚型检出情况为: 29 例 HLA-B27 : 04 (54.72%), 20 例 HLA-B27 : 05 (37.74%), 2 例 HLA-B27 : 02 (3.77%), 1 例 HLA-B27 : 03 (1.89%), 1 例 HLA-B27 : 07 (1.89%)。50 例健康对照组中筛查 HLA-B27 阳性 2 例(4%), 均为男性, 为 HLA-B27 : 04 亚型。进一步对 HLA-B27 : 04 和 HLA-B27 : 05 两组患者的年龄($t = 0.711$, $P = 0.480$)、性别($\chi^2 = 0.880$, $P = 0.348$)、家族史($\chi^2 = 0.011$, $P = 0.916$)和治疗史($\chi^2 = 0.113$, $P = 0.736$)进行比较分析差异均无统计学意义。

3 讨论 AS 是一种慢性免疫性疾病, 其发病机制未明。AS 患者多见于青壮年男性, 严重者可导致脊柱强直、功能丧失, 给患者和社会带来沉重的经济负担^[1]。因此, 有效的临床检验对疾病的早期诊断、及时治疗具有重要的意义。研究发现, HLA-B27 在 AS 患者呈现的阳性率高达 90% 以上, 而在正常人群中其阳性率却不到 10%。本研究 55 例 AS 患者中 HLA-B27 检测阳性者 53 例(96.36%), 50 例健康人群中筛查到 HLA-B27 阳性 2 例(4%), 表明 HLA-B27 与 AS 患者的发病有着密切的关联, 与相关研究结果相似^[8]。AS 是一种临床表现复杂多样的系统性、全身性疾病, 对其疾病严重程度的评价需全面评估, 而 AS 疾病活动

度指数是反映其严重程度客观评价指标。目前 BASDAI 是最常用于评价 AS 患者疾病活动度的指标。杜旭娜等^[9]研究发现,即使在评价无外周关节受累的 AS 病情活动度时 BASDAI 仍是最有效的评价工具。本研究中的 AS 患者大多处于疾病活动期,大多数 AS 患者病情比较严重。AS 患者 HLA-B27 基因表达量与 AS 疾病活动有关,据此可以推断 HLA-B27 基因表达量可作为 AS 病情活动度评估的实验室指标,客观地反映 AS 患者病情严重程度。

HLA-B27 基因具有多态性,而且不同的基因亚型在不同条件下与 AS 遗传易感性不尽一致。本研究发现,AS 患者与 HLA-B27 : 04 关联性最强,其次为 HLA-B27 : 05,与相关文献研究相似^[8,10]。我们对检测到的 HLA-B27 阳性 AS 患者中 HLA-B27 : 04 和 HLA-B27 : 05 两种亚型临床表现等方面进行比较,发现差异均无统计学意义。推测 HLA-B27 不同亚型在 AS 患者中的作用可能与亚型之间的共有序列有着密切的关系,而 HLA-B27 基因因碱基突变等导致的各个亚型与 AS 的临床特征或许没有直接的关系。实验中我们还检测到 2 例 HLA-B27 阴性的 AS 患者,提示其他易感基因或者致病因素在 AS 发病中起着一定的作用。

综上所述,HLA-B27 基因表达量与 AS 疾病活动指数存在相关性,联合 HLA-B27 基因表达水量及其亚型检测可能会为及早筛选、诊断 AS 并判断疾病活动情况提供依据。

参考文献:

[1] Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, et al. Global prevalence of ankylosing spondylitis[J]. Rheumatology, 2014, 53(4): 650-657.

[2] Robinson PC, Brown MA. The genetics of ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2012, 38(3): 539-553.

[3] Jiang Y, Yang M, Wu H, et al. The relationship between disease activity measured by the BASDAI and psychological status, stressful life events, and sleep

quality in ankylosing spondylitis[J]. Clinical Rheumatology, 2015, 34(3): 503-510.

[4] Zambrano-Zaragoza JF, Agraz-Cibrian JM, González-Reyes C, et al. Ankylosing spondylitis: from cells to genes[J]. International Journal of Inflammation, 2013 (50): 1653.

[5] Raychaudhuri SP, Deodhar A. The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis[J]. J Autoimmun, 2014(48/49): 128-133.

[6] Johnsen SS, Bakland G, Nossent JC. The distribution of HLA-B27 subtype in patients with ankylosing spondylitis in Northern Norway [J]. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2014, 43(4): 296-300.

[7] Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening[J]. Gut, 2009, 58(10): 1375-1381.

[8] 张志坚, 奚永志, 孙玉英. 全基因组单核苷酸多态性与强直性脊柱炎遗传易感性的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(18): 1289-1291.

Zhang ZJ, Xi YZ, Sun YY. Progress of genetic susceptibility of the whole genome single nucleotide polymorphism and ankylosing spondylitis[J]. Natl Med J China, 2011, 91(18): 1289-1291.

[9] 杜旭娜, 李 晏, 张胜利, 等. 比较 BASDAI 和 mini-BASDAI 对强直性脊柱炎病情的判断价值[J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(6): 556-558.

Du XN, Li Y, Zhang SL, et al. Value of bath ankylosing spondylitis disease activity index and mini-bath ankylosing spondylitis disease activity index for diagnosis of ankylosing spondylitis[J]. Journal of Chinese PLA Postgraduate Medical School, 2012, 33(6): 556-558.

[10] 孙灵迪, 梅传忠, 鹿 永, 等. PCR-SBT 与 IMS-ELISA 法在强直性脊柱炎患者 HLA-B27 检测中的比较[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 16-18.

Sun LD, Mei CZ, Lu Y, et al. Comparison analysis of HLA-B27 detection by PCR-SBT and IMS-ELISA in AS patients[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(2): 16-18.

收稿日期: 2015-07-18 修回日期: 2015-08-24

念珠菌耐药机制研究进展*

侯 欣^a, 张 丽^a, 徐英春^a, 赵玉沛^b

(中国医学科学院北京协和医院 a. 检验科; b. 基本外科, 北京 100730)

摘要: 近年来念珠菌感染的流行病学发生改变, 尽管白念珠菌仍是大多数医院引起侵袭性念珠菌病的主要病原体, 但是

* 基金项目: 卫生公益性行业科研专项(项目编号: 201402001)。

作者简介: 侯 欣(1990—), 女, 博士研究生, 主要从事微生物鉴定及耐药机制研究。

通讯作者: 徐英春, 研究员, E-mail: xycpumch@139. com