

云南地区肾移植受者BK病毒感染与HLA等位基因相关性分析

汪佳婕, 潘永圣, 安婧, 蒲丹 (昆明市第一人民医院检验科, 昆明 650011)

摘要: 目的 研究云南地区肾移植受者BK病毒(BK virus, BKV)感染与人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)等位基因HLA-B, HLA-DR抗原分布频率, 探讨肾移植受者BKV感染与HLA-B, HLA-DR抗原之间的相关性。方法 选取昆明市第一人民医院自2017年6月~2020年12月肾移植受者399例为研究对象, 按照BKV感染与否分为BKV感染组($n=126$)和BKV未感染组($n=273$)。应用聚合酶链反应序列特异性引物技术(polymerase chain reaction sequence specific primer, PCR-SSP)检测HLA-B和HLA-DR等位基因, 用SPSS软件分析肾移植受者BKV感染尿液阳性HLA-B和HLA-DR抗原分布频率, 比较HLA-B和HLA-DR抗原与BKV感染不同结局的关系。结果 BKV未感染组检出的HLA-B等位基因有33种, 占比大于10%的基因型有7种, 分别为HLA-B*13(16.85%), HLA-B*46(19.41%), HLA-B*51(10.62%), HLA-B*55(10.62%), HLA-B*60(17.58%), HLA-B*62(24.91%)和HLA-B*75(16.48%); BKV感染组中检出的HLA-B等位基因有25种, 其中占比大于10%的基因型有5种, 分别为HLA-B*46(24.60%), HLA-B*55(10.32%), HLA-B*60(24.60%), HLA-B*62(22.22%)和HLA-B*75(15.87%)。BKV未感染组检出的HLA-DR等位基因有14种, 其中占比大于10%的基因型有7种, 分别为HLA-DR*4(30.40%), HLA-DR*8(15.75%), HLA-DR*9(20.15%), HLA-DR*11(12.45%), HLA-DR*12(42.12%), HLA-DR*14(20.15%)和HLA-DR*15(25.27%); BKV感染组中检出的HLA-DR等位基因有14种, 其中占比大于5%的基因型有8种, 分别为HLA-DR*4(27.78%), HLA-DR*8(18.25%), HLA-DR*9(16.67%), HLA-DR*11(11.11%), HLA-DR*12(42.86%), HLA-DR*13(11.90%), HLA-DR*14(23.81%)和HLA-DR*15(19.84%)。HLA-B*13等位基因在BKV未感染组检出率高于BKV感染组($\chi^2=4.642$, $P=0.031$); HLA-DR*17等位基因在BKV感染组的检出率高于BKV未感染组($\chi^2=4.791$, $P=0.029$)。结论 云南地区肾移植受者HLA-B*13等位基因可能是抗BKV的保护因子; 而HLA-DR*17等位基因可能与BKV感染的机会呈正相关。

关键词: BK病毒感染; 人类白细胞抗原(HLA); 肾移植受者

中图分类号: R373; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414(2022)05-014-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.004

Correlation Analysis between BK Virus Infection and HLA Alleles in Renal Transplant Recipients in Yunnan

WANG Jia-jie, PAN Yong-sheng, AN Jing, PU Dan

(Department of Laboratory Medicine, the First People's Hospital of Kunming City, Kunming 650011, China)

Abstract: Objective To study the frequency of BK virus (BKV) infection of human leukocyte antigen (HLA)-B and HLA-DR antigen in kidney transplant recipients in Yunnan, and explore the correlation between BKV infection and HLA-B, HLA-DR antigen in kidney transplant recipients. **Methods** A total of 399 kidney transplant recipients aged 3 to 70 years from June 2017 to December 2020 in the First People's Hospital of Kunming City were selected as the research. They were divided into BKV infected group (126 cases) and BKV uninfected group (273 cases) according to whether they were infection or not. Used polymerase chain reaction sequence-specific primer technology (PCR-SSP) to detect HLA-B, HLA-DR alleles, and use SPSS software to analyze the distribution frequency of BKV-positive urine HLA-B and HLA-DR antigens in kidney transplant recipients, and compare the relationship between HLA-B and HLA-DR antigens and different outcomes of BKV infection. **Results** There were 33 HLA-B alleles detected in BKV unaffected group, and 7 genotypes that accounted for more than 10% were HLA-B*13(16.85%), HLA-B*46(19.41%), HLA-B*51(10.62%), HLA-B*55(10.62%), HLA-B*60(17.58%), HLA-B*62(24.91%) and HLA-B*75(16.48%). There were 25 HLA-B alleles detected in the BKV infection group, among which 5 genotypes account for more than 10%, namely HLA-B*46(24.60%), HLA-B*55(10.32%), HLA-B*60(24.60%), HLA-B*62(22.22%) and HLA-B*75(15.87%). There were 14 HLA-DR alleles detected in BKV unaffected

group, of which 7 genotypes accounted for more than 10%, namely HLA-DR*4 (30.40%), HLA-DR*8 (15.75%), HLA-DR*9 (20.15%), HLA-DR*11 (12.45%), HLA-DR*12 (42.12%), HLA-DR*14 (20.15%) and HLA-DR*15 (25.27%). There were 14 HLA-DR alleles detected in the BKV infection group, of which 8 genotypes account for more than 10%, namely HLA-DR*4 (27.78%), HLA-DR*8 (18.25%), HLA-DR*9 (16.67%), HLA-DR*11 (11.11%), HLA-DR*12 (42.86%), HLA-DR*13 (11.90%), HLA-DR*14 (23.81%), HLA-DR*15 (19.84%). HLA-B*13 allele in BKV unaffected group detection rate is higher than BKV infection group ($\chi^2=4.642$, $P=0.031$). HLA-DR*17 Alleles in the BKV infection group was higher than the BK virus unaffected group ($\chi^2=4.791$, $P=0.029$). **Conclusion** HLA-B*13 allele in the Yunnan area may be a protective factor of anti-BK viruses, and the chance of BK virus infection was positively correlated with HLA-DR*17.

Keywords: BK virus infection; human leukocyte antigen(HLA); kidney transplant recipient

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是代表人类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)最复杂的多态基因簇^[1-2],是一种可以识别所有有核细胞上同种异体抗原的表达分子^[3],可将抗原呈递给淋巴细胞并启动特异性免疫应答,密切参与对病毒的免疫反应^[4],尤其对多瘤病毒BK引起的BK病毒(BKV)相关肾病(BKVN),也被认为是肾移植患者移植丢失的相关风险因素^[5-6]。其中,HLA I类分子呈递的病毒肽与CD8⁺T细胞相互作用,而HLA II类分子与CD4⁺T细胞相互作用^[7],在控制感染和诱导抗病毒免疫中起着关键作用。研究表明,CD4⁺T细胞在人类BKV感染中有充分的记录,某些HLA等位基因可通过将抗原表位从保守的病毒蛋白优先呈递至免疫系统来提供保护或导致病毒感染的进展减慢^[8],直接参与抗BKV的免疫应答。在肾移植中,受体免疫系统的主要目标是供体细胞表面的HLA分子,因此,评估肾移植受者I类和II类HLA抗原有助于BKV筛查和早期的干预。云南地区HLA-B, HLA-DR等位基因与BKV的相关性研究至今尚未见有报道,本文就HLA-B, HLA-DR等位基因与BKV之间的相关性展开分析。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2017年6月~2020年12月昆明市第一人民医院肾移植科检查BK病毒DNA的肾移植患者399例为研究对象,其中男性276例,女性123例,年龄3~70岁;通过实时定量聚合酶链方法检测尿液BKV的DNA,其中感染组126例(尿液BKV DNA载量 $>2.00 \times 10^3$ copies/ml),尿液BKV阴性(BKV未感染组)273例(尿液BKV DNA载量 $<2.00 \times 10^3$ copies/ml或无Ct值)。两组参与者均对实验知情同意,并通过医学伦理委员会批准。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 实验主要仪器设备:基因扩增仪(BIOER,杭州博日仪器有限公司),多功能流式点阵仪(Luminex 200,美国Luminex公司),核酸浓度测定仪(Qbit4,赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2.2 实验主要试剂:血液基因组DNA提取试剂盒(DP348-02,北京天根生化科技有限公司),HLA-SSO LABType分型试剂盒(美国One lambda公司),Taq DNA聚合酶(上海普洛麦格生物产品有限公司)等。

1.3 方法 采集肾移植受者静脉血2~3ml至EDTA-K₂抗凝真空采血管充分混匀,用血液基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA, Qbit4测定DNA浓度并调整至15~25 ng/ μ l。配制PCR反应体系(D-mix13.8 μ l/人份+Primer4 μ l/人份+DNA聚合酶0.2 μ l/人份+DNA2 μ l/人份,终体积为20 μ l),分别利用HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ位点的不同引物进行扩增。PCR结束后,将产物变性、中和,分别加入四种寡核苷酸探针标记的微珠混匀,60℃杂交15min。杂交结束后,加入SAPE染料进行染色,然后将杂交板转移至Luminex 200平台进行数据获取,使用Fusion软件进行结果分析(具体操作步骤参照试剂说明书)。

1.4 统计学分析 采用SPSS 20.0(IBM公司)统计软件进行数据分析,采用Hardy-Weinberg进行吻合度检验。计数资料用例数和百分率表示,两组间等位基因频率比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法。进行HLA-B, HLA-DR抗原与BKV感染的相关性分析,计算OR值及95%CI。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BKV感染组和对照组的HLA-B等位基因分布频率 见表1。BKV感染组和BKV未感染组的HLA-B等位基因分布符合Hardy-Weinberg平衡定律。BKV未感染组检出的HLA-B等位基因有33种,其中占比大于10%的基因型有7种,分别为HLA-B*13(16.85%), HLA-B*46(19.41%), HLA-B*51(10.62%), HLA-B*55(10.62%), HLA-B*60(17.58%), HLA-B*62(24.91%)和HLA-B*75(16.48%);BKV感染组中检出的HLA-B等位基因有25种,其中占比大于10%的基因型有5种,分别为HLA-B*46(24.60%), HLA-B*55(10.32%), HLA-B*60(24.60%),

HLA-B*62 (22.22%) 和 HLA-B*75 (15.87%)。BKV 未感染组中 HLA-B*13 (16.85%) 的频率高于 BKV 感染组 (8.73%), 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.642$, $P=0.031$)。

表1 BKV 感染组与 BKV 未感染组 HLA-B 等位基因的数量及分布频率

HLA-B 基因	BKV 未感染组 (n=273)		BKV 感染组 (n=126)		χ^2	P
	数量	频率 (%)	数量	频率 (%)		
7	16	5.86	11	8.73	1.125	0.289
8	2	0.73	1	0.79	—	0.681
13	46	16.85	11	8.73	4.642	0.031
15	0	0.00	1	0.79	—	0.316
18	2	0.73	0	0.00	—	0.468
27	11	4.03	3	2.38	0.692	0.406
35	24	8.79	11	8.73	0.000	0.984
37	10	3.66	2	1.59	1.273	0.259
38	23	8.42	12	9.52	0.130	0.718
39	19	6.96	9	7.14	0.004	0.947
44	22	8.06	6	4.76	1.436	0.231
45	1	0.37	0	0.00	—	0.684
46	53	19.41	31	24.60	1.397	0.237
48	9	3.30	5	3.97	0.115	0.735
49	2	0.73	1	0.79	—	0.681
50	1	0.37	0	0.00	—	0.684
51	29	10.62	11	8.73	0.342	0.558
52	17	6.23	9	7.14	0.119	0.730
53	2	0.73	0	0.00	—	0.468
54	18	6.59	10	7.94	0.238	0.625
55	29	10.62	13	10.32	0.009	0.926
56	6	2.20	0	0.00	2.812	0.094
57	2	0.73	0	0.00	—	0.468
58	13	4.76	11	8.73	2.401	0.121
60	48	17.58	31	24.60	2.676	0.102
61	14	5.13	12	9.52	0.273	0.098
62	68	24.91	28	22.22	0.340	0.560
63	1	0.37	0	0.00	—	0.684
65	0	0.00	1	0.79	—	0.316
67	3	1.10	1	0.79	0.081	0.776
71	3	1.10	0	0.00	—	0.555
72	1	0.37	0	0.00	—	0.684
75	45	16.48	20	15.87	0.024	0.878
76	5	1.83	1	0.79	0.627	0.428
77	1	0.37	0	0.00	—	0.684

注：“—”表示采用 Fisher 确切概率法计算，无统计值。

2.2 BKV 感染组和 BKV 未感染组的 HLA-DR 等位基因分布频率 见表2。BKV 感染组和 BKV 未感染组的 HLA-DR 等位基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。BKV 未感染组检出的 HLA-DR 等位基因有 14 种，其中占比大于 10% 的基因型有 7 种，分别为 HLA-DR*4 (30.40%)，HLA-

DR*8 (15.75%)，HLA-DR*9 (20.15%)，HLA-DR*11 (12.45%)，HLA-DR*12 (42.12%)，HLA-DR*14 (20.15%)，HLA-DR*15 (25.27%)；BKV 感染组中检出的 HLA-DR 等位基因有 14 种，其中占比大于 10% 的基因型有 8 种，分别为 HLA-DR*4 (27.78%)，HLA-DR*8 (18.25%)，HLA-DR*9 (16.67%)，HLA-DR*11 (11.11%)，HLA-DR*12 (42.86%)，HLA-DR*13 (11.90%)，HLA-DR*14 (23.81%)，HLA-DR*15 (19.84%)。BKV 感染组中 HLA-DR*17 (9.52%) 的频率高于 BKV 未感染组 (4.03%)，差异有统计学意义 ($\chi^2=4.791$, $P=0.029$)。

表2 BKV 感染组与 BKV 未感染组 HLA-DR 等位基因的数量及分布频率

HLA-DR 基因	BKV 未感染组 (n=273)		BKV 感染组 (n=126)		χ^2	P
	数量	频率 (%)	数量	频率 (%)		
1	12	4.40	7	5.56	0.256	0.613
3	0	0.00	1	0.79	—	0.316
4	83	30.40	35	27.78	0.285	0.593
6	1	0.37	0	0.00	—	0.684
7	26	9.52	7	5.56	1.789	0.181
8	43	15.75	23	18.25	0.391	0.532
9	55	20.15	21	16.67	0.677	0.411
10	12	4.40	4	3.17	0.334	0.563
11	34	12.45	14	11.11	0.147	0.701
12	115	42.12	54	42.86	0.091	0.891
13	18	6.59	15	11.90	3.206	0.073
14	55	20.15	30	23.81	0.690	0.406
15	69	25.27	25	19.84	1.413	0.235
16	12	4.40	4	3.17	0.334	0.536
17	11	4.03	12	9.52	4.791	0.029

注：“—”表示采用 Fisher 确切概率法计算，无统计值。

2.3 HLA-B, HLA-DR 抗原与 BKV 感染的相关性分析 进一步比较差异有统计学意义的 HLA-B 等位基因和 BKV 感染的相关性。HLA-B*13 是抗 BKV 的保护因子 ($\chi^2=4.285$, $P=0.031$, $OR=0.472$, 95%CI: 0.236 ~ 0.946)，HLA-DR*17 是抗 BKV 的危险因素 ($\chi^2=4.791$, $P=0.029$, $OR=2.507$, 95%CI: 1.075 ~ 5.849)。

3 讨论

随着人类白细胞抗原 (HLA) 失配的减少，我们注意到 BKV 阳性的增加。BORN-DUVAL 等^[3-4]在报道中提到 BKV 的患病率可高达 20%。研究表明，特定的 HLA 等位基因可能与 BKV 感染的风险有关。HLA 等位基因参与 BK 抗原呈递并引发细胞毒性 T 细胞或自然杀伤细胞免疫介导的反应。HLA I 类分子在细胞毒性 CD8⁺T 细胞的帮助下对病毒有效，I 类 HLA 分子可以有效抵抗病毒^[8-10]。MASUTANI

等人^[6]发现 HLA-A2, HLA-B44, HLA-C6, HLA-DR7, HLA-DR15 和 HLA-DR51 匹配与较低的 BKV 风险相关, 而 KAVUZLU 等^[7]人最近的一项回顾性研究, 表明了肾移植受者中 HLA-A, HLA-B 和 HLA-DR 与 BKV 的相互关系, 发现 HLA-B*13 等位基因具有保护性, 使 BKV 感染几率降低了 86%。

很少有研究调查肾移植患者中 HLA 等位基因与 BKV 之间的关系, 而 HLA 的错配 (不匹配) 已经成为 BKVAN 的危险因素之一^[11], 目前尚未有研究证实总体 HLA 失配与 BKV 肾病的发生之间有任何关联^[12], 但研究表明 HLA 对 BKV 感染的演变是双向的。某些特定的 HLA 等位基因可能是 BKVAN 的诱因^[5], 而另一些则可能是保护性的^[6]。由于 HLA 等位基因较多, 此次研究选择与 BK 感染方向一致的等位基因进行相关性分析。通过近年的研究发现国内关于不同民族间 HLA 多态性与 BKV 相关性研究结果在不同地区、不同民族及人群中差异较大。因此, 本研究选取云南地区 BKV 感染组和 BKV 未感染组, 对 HLA 等位基因 HLA-B, HLA-DR 进行检测, 并进行统计学分析。结果表明 HLA I 类分子中的 HLA-B*13 等位基因是保护性因子 ($\chi^2=4.285$, $P=0.031$, $OR=0.472$, $95\%CI: 0.236 \sim 0.946$), 此结果与 KAVUZLU 等^[7]的研究结果一致。同时云南地区人群感染 BKV 的机会可能与 HLA-DR*17 呈正相关, HLA-DR*17 可能是 BKV 的易感基因 ($\chi^2=4.791$, $P=0.029$, $OR=2.507$, $95\%CI: 1.075 \sim 5.849$), 本研究结果说明, HLA-DR*17 等位基因可能会增加 BKV 感染的风险。

影响 BKV 感染过程的人类白细胞抗原 (HLA) 不仅能预测病毒尿自发消退或进展为病毒血症和相关肾病的可能性, 还有助于制定 BKV 早期筛查和干预措施, 对最有可能患上疾病的患者进行更频繁的病毒检测。最小化的降低免疫抑制剂的使用, 并且在总体上改善患者和同种异体移植的结果, 同时, 研究 HLA 等位基因与 BKV 的相关性也为供 - 受者的选择提供新的可能。为了更好地阐述 BK 感染与 HLA 基因型在不同人群中的关系, 我们应该加强全世界范围内的协作, 扩大 HLA 上不同基因座位研究, 增强对不同人群 BKV 感染与 HLA 相关性研究的探索, 为 BKV 的防治寻找新的突破口, 从而使人类从基因水平预防 BKV 感染, 为治疗 BKV 所致疾病提供可能。

参考文献:

[1] ALELIGN T, AHMED M M, BOBOSHA K, et al. Kidney transplantation: the challenge of human leukocyte antigen and its therapeutic strategies

- [J]. Journal of Immunology Research, 2018, 2018: 5986740.
- [2] 杨小柯, 何柳媚, 全湛柔, 等. 深圳地区人群乙型肝炎病毒携带者 HLA-DRB1 等位基因多态性及关联性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(5): 5-8, 32. YANG Xiaoke, HE Liumei, QUAN Zhanrou, et al. Analysis of allelic polymorphism and association of HLA-DRB1 in hepatitis B virus carriers in Shenzhen[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(5): 5-8, 32.
- [3] BORN-DUVAL C, CAILLARD S, OLAGNE J, et al. Risk factors for BK virus infection in the era of therapeutic drug monitoring[J]. Transplantation, 2013, 95(12): 1498-1505.
- [4] SHENAGARI M, MONFARED A, EGHTEDARI H, et al. BK virus replication in renal transplant recipients: Analysis of potential risk factors may contribute in reactivation[J]. Journal of Clinical Virology, 2017, 96:7-11.
- [5] DOGAN S E, CELEBI Z K, AKTURK S, et al. Prevalence and risk factors of BK viremia in patients with kidney transplantation: a Single-Center experience from Turkey[J]. Transplantation Proceedings, 2017, 49(3): 532-536.
- [6] MASUTANI K, NINOMIYA T, RANDHAWA P. HLA-A2, HLA-B44 and HLA-DR15 are associated with lower risk of BK viremia[J]. Nephrology, Dialysis, Transplantation 2013, 28(12): 3119-3126.
- [7] KAVUZLU M, BAŞTÜRK B, ATAÇ F B, et al. Investigation of the relationship between BK virus and human leukocyte antigens in kidney transplant recipients[J]. Experimental and Clinical Transplantation, 2020, 18(Suppl 1): 51-54.
- [8] MINA M M, LUCIANI F, CAMERON B, et al. Resistance to hepatitis C virus: potential genetic and immunological determinants[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2015, 15(4): 451-460.
- [9] RAO Xiangyu, HOOFF I, VAN BAARLE D, et al. HLA preferences for conserved epitopes: A potential mechanism for hepatitis C clearance[J]. Frontiers in Immunology, 2015, 6:552.
- [10] WUNDERINK H F, HAASNOOT G W, DE BROUWER C S, et al. Reduced risk of BK polyomavirus infection in HLA-B51-positive Kidney Transplant Recipients[J]. Transplantation, 2019, 103(3): 604-612.
- [11] HIRSCH H H, KNOWLES W, DICKENMANN M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients[J]. The New England Journal of Medicine, 2002, 347(7): 488-496.
- [12] WADEI H M, RULE A D, LEWIN M, et al. Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN)[J]. American Journal of Transplantation, 2006, 6(5 Pt 1): 1025-1032.

收稿日期: 2021-06-15

修回日期: 2022-03-21