

•论著摘要•

2型糖尿病家系人类白细胞抗原 DRB1* 和 DQB1* 单倍型分析

袁宝军 顾玉欣 邹吉敏 安新 李伟 张志欣

2型糖尿病是以胰岛素抵抗和β-细胞功能减弱为特征的遗传异质性疾病,其发病与遗传因素密切相关^[1,2]。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)系统是目前已知的最为复杂的抗原系统之一,其中一些基因是参与某些疾病易感性的重要基因。目前,对2型糖尿病家系 HLA-DRB1* 和 DQB1* 基因易感性的研究甚少,我们随机选择唐山地区汉族6个具有2型糖尿病家族史的家系,探讨2型糖尿病与 HLA-DRB1* 和 DQB1* 基因单倍型的关系。

1 材料与方法

1.1 调查对象 经我院内分泌科确诊的住院和门诊患有2型糖尿病的家系共6个,每个家系的患者人数>2,共计22例,患病成员均按1997年世界卫生组织制定的诊断标准确诊,各家系成员均系唐山地区汉族人。

1.2 材料 Biotest 公司提供酶联探针杂交分析(ELPHA) HLA-DRB 和 HLA-DQB 低分辨率分型试剂盒。

1.3 基因组 DNA 的提取 抽取5 ml 抗凝新鲜血(2% EDTA 抗凝),分离白细胞,饱和酚/氯仿/异戊醇抽提,100 μl TE 溶解DNA。调整DNA浓度至50~100 ng/μl。

1.4 PCR 反应条件 检测 HLA-DRB 和 DQB 等位基因需要配置的PCR反应体系严格按操作说明执行。扩增条件:95℃预变性5 min,然后于95℃15 s、55℃15 s、72℃15 s 为一个循环进行扩增,共30个循环,结束后于72℃延伸6 min。

1.5 ELPHA 取扩增后的PCR产物,按照DRB、DQB低分辨率基因分型试剂盒操作。根据DRB-SSO、DQB-SSO反应格局图判断样本DRB、DQB等位基因特异性。

1.6 单倍型分离分析 按公式^[3] $\chi^2 = (1 \sum F - \sum f - 0.5) / \sum V(f)$ 计算 HLA-DRB1* -DQB1* 基因单倍型在家庭中的分布,确定本病与 HLA- DRB1* -DQB1* 基因单倍型是否关联。

1.7 患病同胞共享 HLA-DRB1* -DQB1* 基因单倍型分析 根据分离率,正常家庭同胞中共享HLA单倍型的分布按两条单倍型相同(2)、一条单倍型相同(1)、两条单倍型不同(0)3种类型的比例,期望值分别为25%、50%和25%。据此计算2型糖尿病患者同胞间共享 HLA-DRB1* -DQB1* 基因单倍型

的偏离情况,对6个家系的子一代作 HLA-DRB1* -DQB1* 基因单倍型分析。

1.8 Lods 分析^[4] 本文6个家系均满足Lods法分析所需条件。判断标准:Lods值>1支持连锁,Lods值>3肯定连锁,Lods值<-2否定连锁。两基因位点的重组率(θ)≤0.10为紧密连锁,θ≥0.20为松弛连锁,0.10<θ<0.20为中度连锁。

2 结 果

2.1 单倍型分离分析 6个家庭中子一代患病数均>2,共15例,单倍型分布见表1。单倍型分离分析得 $\chi^2 = 0.94$, $df = 1$, $P > 0.25$,表明家系中的 HLA-DRB1* -DQB1* 基因单倍型与随机分布未发生显著偏离。

表1 6个家庭 HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型分布

家庭	发病孩子数	HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型		
		父	母	孩子
1	4	ab	cd	ac. ac. ad. bc
2	2	ab	cd	ac. ac
3	2	ab	cd	ac. ad
4	3	ab	cd	bd. bd. bd
5	2	ab	cd	ac. bc
6	2	ab	cd	ac. bd

2.2 患病同胞共享单倍型分析 在上述6个家庭15例患病子一代同胞中,其同胞中共享单倍型见表2。观察值与期望值($Pd = 1.0$, Pd 代表疾病基因频率)对比见表3。 $\sum \chi^2 = 3.94$, $df = 2$, $P > 0.1$,未显示患病同胞共享 HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型的频率比期望值明显增高,说明与随机分布未发生显著偏离。

表2 患病同胞共享 HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型

家庭	患病同胞数	HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型	共享 HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型数量		
			(2)	(1)	(0)
1	4	ac. ac. ad. bc	2	2	0
2	2	ac. ac	2	0	0
3	2	ac. ad	0	2	0
4	3	bd. bd. bd	3	0	0
5	2	ac. bc	0	2	0
6	2	ac. bd	0	0	2
总计	15		7	6	2

收稿日期:2003-08-12

作者单位:063000 唐山市,华北煤炭医学院附属开滦医院检验科(袁宝军、邹吉敏、安新);050000 石家庄市,河北医科大学附属第三医院中心实验室(顾玉欣);100088 北京市,北京红十字血液中心HLA实验室(李伟、张志欣)。

作者简介:袁宝军,男,1966年3月生,河北省唐山市人,医学硕士,副主任检验师。Tel:0315-3025732

表 3 患病同胞间 HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型分布

观测与 期望值	数量(%)			$\sum \chi^2$
	(2)	(1)	(0)	
观测值	7(46.67)	6(40.00)	2(13.33)	
期望值	3.75(25.00)	7.5(50.00)	3.75(25.00)	
χ^2	2.82	0.30	0.82	3.94

2.3 Lods 分析 6 个家系的 Lods 计算结果见表 4, 从表中可见 $\theta = 0.30$, $Lods = 0.184$, $RP = 1.527$, 本病易感基因与 HLA-DRB1*、DQB1* 位点基因连锁的相对概率仅是不连锁的 1.5 倍, 两位点距离按文献计算^[5] 图距 $D = 25Log_e(1 + 2\theta/1 - 2\theta) = 34.657$ cm, 相距甚远。

表 4 6 个家系中 HLA 和 2 型糖尿病 Lods 计算结果

家系号	婚姻类型	子代基因型 abcd(DR)	θ					
			0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
1	GgTt × ggtt	Z1 4:2						
		E1 4:2	-∞	-1.191	-0.678	0.257	-0.088	-0.018
2	GgTt × GgTt	Z3 2:1						
		E3 2:1	-0.164	-0.121	-0.088	-0.042	-0.017	-0.004
3	GgTt × ggtt	Z1 3:0						
		E1 2:1	0.544	0.485	0.427	0.296	0.160	0.047
4	GgTt × ggtt	Z1 3:1						
		E1 3:1	-∞	-0.483	-0.241	-0.064	-0.012	-0.001
5	GgTt × ggtt	Z1 3:1						
		E1 2:2	-∞	-0.491	-0.253	-0.077	-0.019	-0.003
6	GgTt × ggtt	Z1 3:0						
		E1 2:1	0.544	0.485	0.427	0.296	0.160	0.047
总计		Lods	-∞	-1.316	-0.406	0.152	0.184	0.068
		RP	-	-	-	1.419	1.527	1.169

3 讨 论

本文单倍型分离分析、患病同胞共享 HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型分析结果表明, 患病同胞间的 HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型呈随机分布, 无显著性偏离, 说明 2 型糖尿病与 HLA-DRB1* -DQB1* 单倍型可能无关联。对 6 个家系亲代和子代相对进行 Lods 分析也得到相同结论, 考虑在 HLA 领域与 2 型糖尿病易感性关联的可能是 6 号染色体上某些单个基因, 并非该单倍型中各位点基因共同作用。值得注意的是, 有 2 个家系分析表明亲代中的等位基因均以 HLA-DRB1* -12-DQB1* 0301 单体形式传给子代, 提示该单体可能为中国北方汉族人中的稳定单体型, 但其作用尚待深入研究。

本病的易感基因与 HLA-DRB1*、DQB1* 间的图距为 34.657 cm, 提示假设的易感基因与 HLA 有很大距离, 患病同胞共享单倍型分析还表明, 本病易感基因与 HLA-DRB1*、DQB1* 基因连锁的可能性非常小, 这一现象说明了外显率的不完全性, 提示本病易感基因需要其他环境因子的触及, 因此本病可能为遗传因素和环境因素共同作用的结果, 这与 Trevisan 等^[1]所做的流行病学调查结果相一致。

由于 HLA 基因的结构与功能复杂, 并且 HLA-DRB1*、DQB1* 基因只提供 6 号染色体上很小一段信息, 而 2 型糖尿病的发病方式未明, 为进一步确定家系中 2 型糖尿病与 HLA 的关系, 尚需扩大样本量, 在更多家庭调查中多调查其他基因遗传标记, 用更多的多态性遗传标志及更先进的分型方法作深入研究。

参 考 文 献

1 Trevisan R, Vedovato M, Tiengo A. The epidemiology of diabetes mellitus. Nephrol Dial Transplant, 1998, 13: 2-5.
2 张素华, 余路, 邱鸿鑫, 等. 家族性非胰岛素依赖型糖尿病患者的家系调查. 中华医学杂志, 1996, 76: 435-439.
3 赵桐茂. HLA 分型原理和应用. 上海: 上海科学技术出版社, 1984. 217-220.
4 蔡选青. 一种简易、准确和有效的人类基因定位方法——Lods 法. 国外医学遗传学分册, 1982, 3: 113-121.
5 张修武, 张之炯, 郭迅, 等. 家族性肥厚型心肌病易感基因与 HLA-DQ 位点相关性分析. 中华微生物学和免疫学杂志, 1997, 17: 352-355.