

## 反复腹痛患儿及其级家庭成员的 HLA-DQA1、DRB1、DQB1 等位基因分布

方佳慧<sup>1)</sup>, 黄永坤<sup>1)</sup>, 唐睿珠<sup>1)</sup>, 刘梅<sup>1)</sup>, 曹佳<sup>1)</sup>, 王丽<sup>2)</sup>

(1) 昆明医科大学第一附属医院儿科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医科大学, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 探讨反复腹痛患儿及其家族成员人类白细胞抗原 (HLA) -DQA1、DRB1、DQB1 等位基因频率的分布. **方法** 收集完整的 7 个反复腹痛患儿及其一级和二级家族成员 49 人的血液标本, 用聚合酶链反应 - 序列特异性引物 (PCR-SSP) 方法进行 HLA-DQA1、DRB1、DQB1 基因分型检测. **结果** 反复腹痛患儿家族 HLA-DRB1、DQA1 等位基因与其反复腹痛症状存在对应的“链性现象”. **结论** HLA-DRB1\*09、HLA-DQA1\*0302 及 HLA-DQA1\*0601 等位基因可能与反复腹痛症状相关.

**[关键词]** 腹痛; 家庭; 人类白细胞抗原; 等位基因

**[中图分类号]** R573.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 07-0034-04

## Allele Analysis of HLA-DQA1、DRB1、DQB1 in Families of Children with Recurrent Abdominal Pain

FANG Jia-hui<sup>1)</sup>, HUANG Yong-kun<sup>1)</sup>, TANG Rui-zhu<sup>1)</sup>, LIU Mei<sup>1)</sup>, CAO Jia<sup>1)</sup>, WANG Li<sup>2)</sup>

(1) Department of Pediatrics, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the allele frequencies of human leukocyte antigen-DQA1、DRB1、DQB1 of children with recurrent abdominal pain and their family members. **Methods** The technique of polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) technique was applied to identify the allele frequencies of HLA-DQA1、DRB1、DQB1. **Results** There was a corresponding "chain phenomenon" between HLA-DQA1、DRB1 allele and recurrent abdominal pain symptoms in children with recurrent abdominal pain and their family members. **Conclusions** HLA-DQA1\*0302, HLA-DQA1\*0601 and HLA-DRB1\*09 allele may be associated with the symptom of recurrent abdominal pain.

**[Key words]** Abdominal pain; Family members; HLA; Allele

反复腹痛又称之为再发性腹痛, 指病程 3 个月以上, 病程中至少有 3 次以上基金的腹痛发作, 亦有报道将病程定为大于 1 月或大于 2 月<sup>[1]</sup>, 现国内外尚无统一诊断标准. 反复腹痛因其再发性且疼痛程度不一, 常常影响患儿及其家长的生活和学习, 更加重其精神、经济负担. 人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 又称人类主要组织相容性复合体 (human major histocompatibility complex, MHC), 是迄今为止发现的最为复杂的人

类遗传系统, 它作为一个与疾病关联最为密切的基因复合体, 决定了人类疾病易感性及个体差异. 本研究以反复腹痛患儿及家庭成员为研究对象, 用聚合酶链反应 - 序列特异性引物 (polymerase chain reaction-sequence specific primers, PCR-SSP) 方法对家庭成员进行 HLA-DQA1、DRB1、DQB1 等位基因分型, 研究和分析反复腹痛患儿及家庭中 HLA-DQA1、DRB1、DQB1 等位基因的分布.

**[基金项目]** 云南省自然科学基金资助项目 (2009CD163)

**[作者简介]** 方佳慧 (1982~), 女, 云南昆明市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事小儿消化、感染与免疫性疾病研究工作.

**[通讯作者]** 王丽. E-mail: ynkmwangli@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选择 3~14 岁, 因反复腹痛半年以上来我科就诊的患儿 7 例及与其生活密切接触的一级 (父母辈) 和二级 (祖辈) 亲属列为研究对象, 并详细询问病史, 重点收集有无慢性胃肠疾病症状尤其腹痛症状的资料. 参考患儿持续或反复上腹痛或不适的诊断标准<sup>[2]</sup>. 所有研究对象必须符合以下条件: (1) 在云南出生且生活 3 a 以上; (2) 无严重的心、肺、脑、肾、皮肤、营养、内分泌疾病及免疫缺陷病; (3) 近 4 周内无服用抗生素、铋剂、质子泵阻滞剂和激素史.

### 1.2 实验仪器与主要试剂

基因扩增仪 PE-9600; 高速低温离心机; 微量加样器; 96 孔电泳仪; 分子生物学专用紫外线分光光度仪; 170-8126 Universal Hood 凝胶成像仪; 725 型超低温冰箱; 漩涡混合器; 医用洁净工作台.

美国 Promega 公司提供的血液基因组 DNA 提取试剂盒 (批号: 20090907); 美国 QIAGEN 公司提供的 HLA-DQ-DR (批号: 11M) 基因分型试剂盒; 美国 QIAGEN 公司提供的 HLA-DQA1 (批号: 69K) 基因分型试剂盒; 大连宝生物有限公司提供的 DNA 分子量标准 DL-2000 (批号: B6601A); 西班牙 BIOWEST 公司提供琼脂糖 (批号: 111860); Taq 酶由上海 Promega 公司提供 (批号: M1665S); 溴乙锭由上海华舜生物技术有限公司提供 (批号: ZL0825S10011Z); 5×TBE 液由上海捷瑞生物工程有限公司提供 (批号: 1110641Z).

### 1.3 实验方法

**1.3.1 样本的收集** 获得父母及其他家庭成员知情同意并签署知情同意后, 每位研究对象抽取静脉血 3~5 mL, 置于 EDTA 抗凝管中, 分离血清与白细胞层, 并放置于 -70℃ 冰箱内待检测.

**1.3.2 血液基因组 DNA 制备** 具体操作按说明书进行, 提取的 DNA 用分子生物学专用紫外线分光光度仪测定浓度和纯度. DNA 纯度为 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值, 该比值必须在 1.6~1.8 之间, 浓度必须在 50~300 ng/μL (以 100 ng/μL 为理想), 否则必须重新提取 DNA. 将已提取的 DNA 放置于 -20℃ 冰箱保存备用进行扩增. (注: 整个实验过程中严格遵守无菌操作规程, 戴好口罩和手套).

**1.3.3 HLA-DRB1、DQB1 及 HLA-DQA1 等位基**

**因分型** 具体操作方法按试剂盒说明书进行, 待 PCR 扩增完毕, 加样后进行电泳, 电泳条件同上. 电泳结束后将电泳胶放置在凝胶成像仪上照相, 结合紫外灯判读并借助其提供的专用读板纸判读结果. 要求: 各电泳道内控带必须存在, 各阳性条带必须与规定的相应分子量对应.

## 2 结果

### 2.1 反复腹痛患儿及其家族成员的腹痛分布情况

7 个反复腹痛患儿及家庭一级 (父辈)、二级 (祖辈) 亲属腹痛的分布情况, 见表 1.

### 2.2 反复腹痛患儿及其家族成员的 HLA-DQA1 等位基因 PCR-SSP 分型

7 个家庭内患儿以及一级、二级亲属 HLA-DQA1 等位基因 PCR-SSP 分型分布情况, 见表 2. 发现反复腹痛患儿家庭中 HLA-DQA1 等位基因的分型也存在与腹痛症状对应的“链性现象”, 即在相应的家庭中带有该等位基因的成员均出现腹痛症状. 2、5 号家庭的 HLA-DQA1\*0302 等位基因, 4 号家庭的 HLA-DQA1\*0601 等位基因.

### 2.3 反复腹痛患儿及其家族成员的 HLA-DRB1 等位基因 PCR-SSP 分型

7 个家庭内患儿以及一级、二级亲属 HLA-DRB1 等位基因 PCR-SSP 分型分布情况, 见表 3. 发现 2 号反复腹痛的患儿家庭中 HLA-DRB1 等位基因的分型存在与腹痛症状对应的“链性现象”, 即在 2 号家庭中带有 HLA-DRB1\*09 等位基因的成员均出现腹痛症状.

### 2.4 反复腹痛患儿及其家族成员的 HLA-DQB1 等位基因 PCR-SSP 分型

7 个家庭内患儿以及一级、二级亲属 HLA-DQB1 等位基因 PCR-SSP 分型分布情况, 见表 4. 在所有患儿家庭中 HLA-DQB1 等位基因的分型与腹痛症状无显著对应的“链性现象”.

## 3 讨论

### 3.1 反复腹痛家庭成员的 HLA-DQA1 等位基因与胃肠道疾病的关系

Garza-González 等<sup>[3]</sup>在对墨西哥胃癌及高异型性胃癌患者 HLA-DQA1 基因的研究中发现 DQA1\*0503 为独立的保护因素, 并推测此基因在此人群中为保护基因. Santolaria<sup>[4]</sup>对西班牙白种人 Hp 感染相关消化性溃疡患者的研究发现

表 1 7 个家庭成员的腹痛情况分布

Tab. 1 Abdominal pain distribution in the members of 7 families

序 号	患儿		一级亲属		二级亲属			
	男	女	父亲	母亲	爷爷	奶奶	外公	外婆
1	Aa		Aa	Aa	C	C	C	Aa
2	B		Aa	Aa	Aa	B	B	Aa
3		B	Ab	C	Ab	C	Ab	C
4		Aa	Ab	C	Ac	C	C	C
5		Aa	C	Ab	C	B	Ab	B
6		Aa	B	C	C	C	C	C
7	Aa		Aa	C	Aa	Aa	C	C

注：表 4 中 A 代表通过消化道钡餐或内窥镜检查明确有胃肠道疾病者以及有腹痛症状者（其中 Aa 为慢性胃炎，Ab 为胃溃疡，Ac 为十二指肠溃疡，B 代表有腹痛症状但未作检查者，C 代表无腹痛症状者）。

表 2 反复腹痛患儿及家族成员的 HLA-DQA1 等位基因

Tab. 2 HLA-DQA1 allele in family members of children with recurrent abdominal pain

序号	患儿		一级亲属		二级亲属			
	男	女	父亲	母亲	爷爷	奶奶	外公	外婆
1	①③		①③	③④	①④	④⑬	③	①④
2	①⑧		①⑧	⑧	①⑧	⑧⑬	⑧	①⑧
3		⑦⑨	⑤⑨	③⑦	⑨⑬	⑤⑬	③⑧	⑦
4		③⑬	④⑬	③④	⑬	④⑬	③⑨	④⑤
5		⑦⑧	④	③⑧	⑦⑨	④⑧	②⑤	⑤⑧
6		⑬	⑧⑬	⑤⑬	②⑨	③⑬	⑦⑬	⑤⑨
7	④		②③④	⑦	②③	④⑦⑨	⑦	①⑦

注：①为 HLA-DQA1\*0101、②为 \*0102、③为 \*010204、④为 \*0103、⑤为 \*0104、⑦为 \*030101、⑧为 \*0302、⑨为 \*0303、⑩为 \*0505、⑬为 \*0601。

表 3 反复腹痛患儿及家庭成员的 HLA-DRB1 等位基因

Tab. 3 HLA-DRB1 allele in family members of children with recurrent abdominal pain

序号	患儿		一级亲属		二级亲属			
	男	女	父亲	母亲	爷爷	奶奶	外公	外婆
1	⑮⑩		①⑩	④⑬	②⑩	①⑨	③⑦	③⑮⑰
2	⑥⑮⑱		⑥②⑬	⑥	②⑥⑬	⑥⑨	⑥	①⑥
3		②⑬	②⑪	②	②④	⑨⑪	⑥⑬	②③
4		②⑬	④⑨	④⑬	③⑨	④⑧⑩	②⑬	⑬
5		③⑥	③④	⑥⑬	②③	④⑥	⑪⑬	⑪⑮
6		⑨	②⑨	⑨⑪	②⑬	⑨⑩	②⑪	②⑪
7	②④		④⑬	②	⑬⑬	②	②	②⑬

注：①为 HLA-DRB1\*01、②为 HLA-DRB1\*04、③为 HLA-DRB1\*07、④为 HLA-DRB1\*08、⑥为 HLA-DRB1\*09、⑦为 HLA-DRB1\*10、⑧为 HLA-DRB1\*11、⑨为 HLA-DRB1\*12、⑩为 HLA-DRB1\*13、⑪为 HLA-DRB1\*14、⑫为 HLA-DRB1\*15、⑬为 HLA-DRB1\*16、⑮为 HLA-DRB1\*090106\0903、⑰为 HLA-DRB1\*1216、⑱为 HLA-DRB1\*1468\1493、⑲为 HLA-DRB1\*1527\1534。

表4 反复腹痛患儿及家庭成员的 HLA-DQB1 等位基因

Tab. 4 HLA-DQB1 allele in family members of children with recurrent abdominal pain

序号	患儿		一级亲属		二级亲属			
	男	女	父亲	母亲	爷爷	奶奶	外公	外婆
1	③④⑤		④⑤	④⑤	③⑤	②④	①④	②⑤
2	②④		②④	②④	②④	②	②	②④
3		②④	③④	②③	②	②④	②④	①②
4		②④	②⑤	④⑤	①②	②⑤	③④	②④⑤
5		②	②⑤	④	②	②⑤	④	②④
6		②	②③	②④	⑤	②⑤	④	③④
7	②⑤		④⑤	②	④	③⑤	②	②④

注: ①为 HLA-DQB1\*02、②为 HLA-DQB1\*03、③为 HLA-DQB1\*04、④为 HLA-DQB1\*05、⑤为 HLA-DQB1\*06。

HLA-DQA1 \*0301 及 DQA1\*0102 基因对宿主 Hp 易感性无影响。一项对意大利 Hp 相关性胃腺癌的研究发现 HLA-DQA1\*0201 基因的缺乏可能是宿主发生结肠癌的遗传基因危险因素, 然而该研究未发现 HLA-DQA1 基因多态性与 Hp 相关性胃腺癌的发生有关<sup>[5]</sup>。和灿琳等<sup>[6]</sup>对反复腹痛与无反复腹痛者的研究发现 HLA-DQA1\*0302 可能是 Hp 感染后反复腹痛病症的相关基因。许春娣等<sup>[7]</sup>对上海 59 例十二指肠球溃疡患儿 HLA-DQA1 等位基因频率的研究发现患儿 HLA-DQA1\*03 等位基因频率均较正常小儿明显降低, 故认为 HLA-DQA1\*03 基因对消化性溃疡具有遗传抵抗作用, 然而认为此作用与 Hp 感染无关。本研究发现 HLA-DQA1\*0302、HLA-DQA1\*0601 基因与反复腹痛可能有相关性。

### 3.2 反复腹痛家庭成员的 HLA-DRB1、DQB1 等位基因与胃肠道疾病的关系

国内汪云利等<sup>[8]</sup>报道成都地区 Hp 阳性的慢性胃炎患儿 DQB1\*0602、\*03032 等位基因阳性率明显低于 Hp 阴性的慢性胃炎患儿, 故可认为该等位基因位点对 Hp 相关性胃炎具有遗传抵抗作用。李峰<sup>[9]</sup>等报道在 Hp 感染的家族成员中, 反复腹痛与无腹痛者之间存在免疫遗传学差异, 认为 HLA-DQB1\*09 和 HLA-DRB1\*09 基因与 Hp 感染后反复腹痛可能有相关性。国外研究中, Roberto 等<sup>[10]</sup>在对墨西哥混血胃癌患者研究中发现 HLA-DQB1\*0501 与其弥漫性胃腺癌的发生有关, 且推测其为易感基因, 无论有无 HP 感染。Quintero 等<sup>[11]</sup>对 42 例幽门螺旋杆菌感染的南部欧洲人群 HLA-II 基因研究中发现 DQB1\*0602 基因增加远端胃癌的风险。本研究发现 HLA-DRB1\*09 基因与反复腹痛可能有相关性。

- [1] 王茂贵. 小儿再发性腹痛的诊断思维程序[J]. 中国实用儿科杂志, 2000, 15(3):154-156.
- [2] RASQUIN A, DI LORENZO C, FORBES D, et al. Childhood functional gastrointestinal disorders: child/adolescent [J]. Gastroenterology, 2006, 130(5):1527-1537.
- [3] ELVIRA GARZA-GONZALEZ, FRANCISCO J. BOSQ-UES-PADILLA, et al. Association of gastric cancer, HLA-DQA1, and infection with Helicobacter pylori CagA+ and VacA+ in a Mexican population [J]. J Gastroenterol, 2004, 39(2):1138-1142.
- [4] SANTOLARIA S, BARRIOS Y, BENITO R, et al. Helicobacter Pylori and immunogenetic factors of the hosts: relevance of the HLA-DQA1\*0102 and \*0301 alleles in peptic ulcer[J]. Gastroenterol Hepatol, 2001, 24(3):117.
- [5] SELIMOGLU M A, ERTEJUB V, IBABDU T. Seroepidemiology of Helicobacter pylori infection in children living in eastern turkey[J]. Pediatr Int, 2002, 44(6):666-669.
- [6] 和灿琳, 李继梅, 黄永坤, 等. 反复腹痛者幽门螺杆菌感染和人类白细胞抗原-DQA1 等位基因频率分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2010, 3(3):166-169.
- [7] 许春娣, 江石湖, 陈舜年, 等. 十二指肠球溃疡患儿 HLA-DQA1 等位基因频率的研究[J]. 中华消化杂志, 1999, 19(3):172-174.
- [8] 汪云利, 刘双风, 杨艳, 等. 成都地区儿童消化道疾病及 HLA-DQB1 多态性分析 [J]. 西北国防医学杂志, 2006, 27(3):193-195.
- [9] 李峰, 李继梅, 黄永坤, 等. 家庭成员中反复腹痛和无反复腹痛者的幽门螺杆菌感染和 HLA-DQB1、DRB1 等位基因频率分析 [J]. 国际免疫学杂志, 2012, 35(1):71-76.
- [10] ROBERTO HERRERA-GOEPFERT, JESUS K YAMAMOTO-FURUSHO, et al. Role of the HLA-DQ locus in the development of chronic gastritis and gastric carcinoma in Mexican patients [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(48):7762-7767.
- [11] ENRIQUE QUINTERO, M A. ANGELES PIZARRO, LUIS RODRIGO, et al. Association of Helicobacter pylori-related Distal Gastric Cancer with the HLA Class II Gene DQB1\*0602 and cagA+ Strains in a Southern European Population[J]. Helicobacter, 2005, 10(1):12-21.

(2013-04-15 收稿)

### [参考文献]