DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).1996.0066
中山医科大学学报(Acad J SUMS)1996,17(3):205～209

胰岛素依赖型糖尿病起病年龄相关的HLA-DQA1遗传异质性①

程 桦② 张 莹 傅祖植 严 棠

(中山医科大学孙逸仙纪念医院内科内分泌科;广州,510120)

提 要 比较3组起病年龄不同的胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)病人(A组≤14岁,B组15～30岁,C组≥31岁)其HLA-DQA1链52位精氨酸(Arg)与IDDM易感性之间的关系。结果显示,A组HLA-DQA1链52位Arg(+)等位基因频率为87.5%,明显高于对照组(53.9%,$P<0.05$,RR=5.98)及B组和C组($P<0.05$);A组HLA-DQA1链52Arg(+)/Arg(+)表现型的频率为75%,明显高于C组(23.1%,$P<0.05$)。本文提示:HLA-DQA1链52位Arg与IDDM易感性之间的关系存在着起病年龄相关的异质性,有必要进一步研究以阐明IDDM的免疫遗传学本质。

主题词 糖尿病,胰岛素依赖型/遗传学;HLA-DQ抗原/遗传学;遗传;异质性年龄因素

中图号 R 587.102

近年来国内外研究发现人类白细胞抗原(HLA)Ⅱ类抗原与胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)易感性有关:HLA-DQB1链52位精氨酸(Arg)与对IDDM的易感性相关,而HLA-DQB1链57位天门冬氨酸(Asp)则与对IDDM的抵抗性(或保护性)相关。国内大多数有关资料中IDDM病人起年龄小于14岁或18岁[1,2],但据报道至少半数以上IDDM病人于20岁以后起病[3],实际上作者所在医院的IDDM病人中至少约80%于14岁以后发病。目前尚不明确是否成年起病的IDDM病人HLA-DQ位点与IDDM易感性之间也存在着相似关系。本研究比较3组起病年龄不同的IDDM病人其HLA-DQA1 52位Arg与IDDM易感性之间的关系,从而探讨IDDM是否在免疫遗传性方面存在着异质性。

1 研究对象和方法

1.1 研究对象

均为无亲属关系的华南籍汉族人,包括40例IDDM病人(男20例,女20例;年龄31.7岁±12.4岁)和51例健康正常对照者(男24例,女27例;年龄30.6岁±8.7岁)。IDDM根据下述条件进行综合分析判断而作出临床诊断:①起病年龄;②起病急缓;③酮症倾向;④对注射外源性胰岛素的依赖性;⑤体型;⑥低胰岛素血症,即空腹C-肽<400 pmol/L,餐后2 h C-肽<600 pmol/L及/或胰高糖素刺激后6 min C-肽<600 pmol/L。40例IDDM病人按起病年龄而分为≤14岁起病组(A组,8例),15～30岁起病组(B组,19例)和≥31岁起病组(C组,13例)。IDDM各组主要临床特征见表1。

1.2 实验方法

所有研究对象均抽取外周血3 ml,肝素抗凝,分离白细胞,用酚提法抽提基因组DNA。HLA-DQA1第2个外显子用下列引物进行扩增:PP-DQA1-PL(5'-GGTGTAAACTTGTACCAG-3',12-18aa)和PP-DQA1-PR(5'-CATTGGTAGCAGCGGTAGAG-3',80-86aa)。聚合酶链反应(PCR)循环条件

① 广东省科委重点攻关项目基金资助课题;② 第一作者,1943年出生,女,硕士,副教授

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为:93℃45 s,53℃45 s,72℃20 s,共 30 个循环,最后置 72℃5 min。PCR 扩增产物经电泳分析结果为 225bp。采用 5'末端标记法标记 DQA1 1-52、3-52、5-52 及 6-52 共 4 个探针(探针序列见表 2)。^{32}P 所标记的探针与 PCR 扩增产物进行狭缝杂交,使用 DB 硝纤膜,42℃预杂交 2～4 h,预杂交液含 6×SSC(1×SSC 为 0.15 mmol/L 氯化钠、0.015 mmol/L 柠檬酸钠)、5×Denhardt's(1×Denhardt's 为 0.02%W/V 牛血清白蛋白、0.02%W/V 聚蔗糖 400、0.02%聚乙烯吡咯烷酮)、0.5%十二烷基磺酸钠(SDS)、100 mg/L 鲑精 DNA(ssDNA)、50%甲酰胺。42℃杂交过夜,杂交液为预杂交液中加入[γ-^{32}P]三磷酸腺苷 5'末端标记的探针。计算洗膜温度 Tm[Tm=4×(G+C)+2×(A+T)],G、C、A、T 分别代表探针中鸟便嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和胸腺嘧啶的数目。严格于 Tm 下洗膜 10 min。经放射自显影读取结果。标准 DNA(HLA－DQA 链 0101、0201、0301 和 0501,购自上海第二医科大学免疫室)(见表 2)。

表 1 IDDM 病人的临床特征

分 组	A 组 (n=8)	B 组 (n=19)	C 组 (n=13)	F	P
男/女	4/4	9/10	7/6		>0.05
起病年龄(岁)	10.10±1.60	23.40±3.50[1)]	37.20±5.30[1)2)]	121.42	>0.05
病程(年)	4.10±4.50	6.80±4.90	7.50±5.80	1.14	>0.05
体重指数(kg/m^2)	16.70±2.40	19.50±2.20[1)]	20.80±2.50[1)]	7.60	<0.01
空腹 C-肽(pmol/L)	91.60±60.90	177.70±126.50	255.90±113.40[2)]	4.20	<0.05

1)与 A 组比较,P<0.05; 2)与 B 组比较,P<0.05

表 2 合成的寡核苷酸探针序列

探 针	等位基因	序 列	氨基酸位置	52 Arg.
AG1－52	101,102,103	5'-CCTGAGTTCAGCAAATTTGG－3'	49-55	(－)
AG3－52	501,601,401	5'-GTGTTTGCCTGTTCTCAGAC－3'	46-53	(＋)
AG5－52	301	5'-CAGTTGCCTCTGTTCCGC－3'	47-52	(＋)
AG6－52	201	5'-CCTCTGTTCCACAGACTTAGA－3'	50-55	(－)

1.3 统计学处理

IDDM 病人和对照组之间以及 IDDM 各亚组之间 HLA DQA1 等位基因及表现型频率比较采用 χ^2 检验,当 1≤理论值<5 且样本数>40 时,采用 Yate's 连续校正;当 1≤理论值<5 而且样本数<40 或理论值<1 时采用 Fisher 精确检验法;对具统计学意义结果进行相对危险度(RR)计算。IDDM 病人亚组间其它各指标均数差异的比较采用方差分析。

2 结 果

2.1 IDDM 病人 HLA-DQA1 等位基因及表现型频率分析(表 3)

A 组 HLA-DQA1 链 52Arg(＋)频率为 87.5%,明显高于对照组(53.9%,P<0.05,RR=5.98);B 组和 C 组分别为 53.9%和

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

53.8%,与对照组的差异无统计学意义($P>0.05$)。A组HLA-DQA1链52Arg(+)频率高于B组和C组(P均<0.05)。A组HLA-DQA1链52Arg(−)频率为12.5%,明显低于对照组(46.1%,$P<0.05$;RR=0.17)以及B组和C组($P<0.05$)。

A组HLA-DQA1链52Arg(+)/Arg(+),Arg(+)/Arg(−)以及Arg(−)Arg(−)表现型频率分别为75%,25%和0%。A组HLA-DQA1链52Arg(+)/Arg(+)频率明显高于C组(23.1%,$P<0.05$)。比较A组和对照组HLA-DQA1链52Arg(+)/Arg(+)频率之间的差异,$P=0.06$。

A组HLA-DQA1链0301等位基因频率为87.5%,高于对照组以及B组和C组,HLA-DQA1链0201等位基因频率为12.5%,低于对照组以及B组和C组,但任何两组间的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2　IDDM亚组间主要临床特征比较(表1)

体重指数(BMI),A组低于B组和C组($P<0.05$)。空腹C-肽水平,A组低于B组,B组低于C组,A组和C组之间的差异具统计学意义($P<0.05$)。此外,发生酮症的平均次数,A组、B组和C组分别为2.8、2.0和1.0,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表3　IDDM病人起病年龄相关的HLA-DQA1链遗传异质性

分　组	正常对照组 ($n=51$)		IDDM组							
			A组 ($n=8$)		B组 ($n=19$)		C组 ($n=13$)		全组 ($n=40$)	
	n'[1)]	%	n'	%	n'	%	n'	%	n'	%
Arg(+)	55	53.90	14	87.50[2)]	22	57.90[3)]	14	53.80[3)]	50	62.50
Arg(−)	47	46.10	2	12.50[2)]	16	42.10[3)]	12	46.20[3)]	30	37.50
Arg(+)/Arg(+)	17	33.30	6	75.00	8	42.10	3	23.10[3)]	17	42.50
Arg(+)/Arg(−)	21	41.20	2	25.00	6	31.60	8	61.50	16	40.00
Arg(−)/Arg(−)	13	5.90	0	0.00	5	26.30	2	15.40	7	17.50
0301 allele	21	41.10	7	87.50	11	57.90	4	30.80	22	55.00
0201 allele	3	5.90	1	12.50	1	5.30	3	23.10	5	12.50

1)n'为各组HLA DQA1链52位基因表现型数目;　2)与对照组比较,$P<0.05$;　3)与A组比较$P<0.05$

3　讨　论

本研究中A组HLA-DQA1链52Arg(+)频率明显高于对照组($P<0.05$),而B组和C组与对照组的差异无统计学意义。A组HLA-DQA1链52Arg(+)频率高于B组和C组($P<0.05$),HLA-DQA1链52Arg(+)/Arg(+)频率高于C组($P<0.05$)。此外,A组HLA-DQA1链0301(Arg+)频率相当高,为87.5%;HLA-DQA1 0201频率相当低,为12.5%,但A组与对照组及B组和C组的差异无统计学意义,可能与例数不足有关。上述结果提示,本组IDDM病人存在着起病年龄相关的遗传异质性,儿童期起病的IDDM和成年起病的IDDM其遗传背景可能有所不同。儿童期起病的IDDM病人中HLA-DQA1 52Arg(+)/Arg(+)纯合子频率高,说明HLA-DAQ1 52Arg(+)本身或与其连锁的一些易感因素作用强可能是促使疾病早发的原因之一;成年起病的IDDM病人可能比儿童起病的IDDM病人更具异质

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

性,这些病人的遗传易感性可能主要由HLA-DQA1 52Arg(+)以外的其他易感基因所决定,也可能与环境因素或其他获得性因素有关[3]。

此外,本研究结果显示,A组与B组和C组比较,尚具有某些临床特征,包括BMI较低以及B细胞残留功能更差等,换言之,成年发病IDDM病人有较好的B细胞残留功能,与文献报道一致[6],提示IDDM病人在临床方面也存在着异质性。

近来有文献报道关于IDDM的异质性,包括免疫遗传学方面的异质性。如就HLA-DQ、-DR位点与IDDM易感性关系而言,不同种族如中国人、日本人、高加索人,北印度亚洲人和非洲的加勒比海人等之间有共同之处,也有不同之处[4]。IDDM发病率在世界范围内均呈现从北到南下降的趋势,以斯堪的纳维亚发病率最高,对某一人群所鉴定的易感性等位基因并不一定适用于地理位置不同的另一人群[5]。Caillat-Zncman(1992)报道15岁以后起病的IDDM病人(290例)与儿童期起病的IDDM病人(112例)比较,其非DR3/非DR4基因型频率明显较高,而DR3/DR4杂合子和HLA-DQB157 Asp(-)频率明显较低;这些非DR3/非DR4病人虽然临床上表现为IDDM,但诊断时胰岛细胞抗体阳性率较低,胰岛素缺乏程度也较轻[3]。有报道成年发病IDDM的临床特征是诊断前病程较长以及B细胞残留功能较好[6]。Kabayashi(1993)年报道缓慢起病的IDDM具有免疫遗传学及临床方面的特征,包括起病年龄晚,胰岛细胞抗体阳性率高,残留一定的B细胞功能及与HLA I类抗原无明显相关等[6]。此外,尚有报道在30岁以上的IDDM病人中男性病人较多,提示男性性别可能通过体液因素或免疫学过程对缓慢进展的B细胞功能衰竭有一定影响[6]。

本文结果及所复习文献提示HLA与IDDM易感性之间的关系是异质性的,有必要对IDDM病人按种族、地理分布、年龄、性别、临床及免疫学特征或其不同组合分组,进行HLA分型及遗传学研究;也有必要按HLA分型或遗传学特征进行分组研究其临床特征。

参 考 文 献

1 王 姮,何瑞娟. HLA-DQA1 DQB1等位基因在IDDM易感性中的作用. 中华内分泌代谢杂志,1993,9(4):202

2 颜 纯,王琳琳,胡学明. HLA-DQ基因和中国人胰岛素依赖型糖尿病易感性的相关分析. 中国糖尿病杂志,1994,2(1):3

3 Caillat-Zucman S, Garchon HJ, Timsit J, *et al*. Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. J, Clin, Invest J, 1992, 90(6): 2242

4 Penny MA, Mijovic CH, Cavan DA, *et al*. An investigation of the association between HLA-DQ heterodimers and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in five racial groups. Hum Immunol 1993, 38(3): 179

5 Weatherall D, Sarvetnick N, Shizuru JA. Genetic control of diabetes mellitus (review). Diabetologia, 1992, 35(Suppl 2): S1

6 Kobayashi T, Tamemoto K, Nakanishi K, *et al*. Immunogenetic and clinical characterizaton of slowly progressive IDDM. Diabetes Care, 1993, 16(5): 780

(1995-06-14收稿 1996-04-11修回)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

AGE-OF-ONSET RELATED HLA-DQA1 GENETIC HETEROGENEITYOF INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS

Cheng Hua　Zhang Ying　Fu Zuzhi　Yan Tang

(Department of Endocrinlolgy, Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Possible heterogeneity in immunogenetic aspects of IDDM was investigated by comparing the findings on relationship between HLA-DQA1 52 Arg (+) and IDDM predisposition in three groups with different age of IDDM onset(group A≤14 year)group B 15～30 year, group C≥31 year. Results showed that the frequency of HLA-DQA1 52 Arg (+)in group A(87.5%)was higher than thar in control (53.9%, $P<0.05$)and in group B and C($P<0.05$), the frequency of HLA-DQA1 52 Arg(+)/Arg(+)phenotype in group A (75%)was higher than that in group C (23.1%, $P<0.05$). It was concluded that the contribution of HLA-DQA1 52 arginine to IDDM susceptibility is heterogeneous, further study is necessary to clarify the immunogenetic entity of IDDM.

Subject headings　diabetes mellitus, insulin-dependent/genetics; HLA-DQ antigens/genetics; heterogeneity; age factors

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net