



## 子宫内膜异位症合并不孕与HLA-DQA1、DRB1的相关性

子宫内膜异位症(简称内异症)是生育期妇女常见病,发病率达10%~15%,其中30%~40%的患者不孕[1]。已有的研究发现内异症患者B淋巴细胞功能亢进,血清中IgG和抗内膜、卵巢组织自身抗体增加,补体C3和IgG在内膜沉积,其他免疫反应增多,因此普遍认为内异症是一种自身免疫性疾病[2],而自身免疫因素又是内异症并发不孕的主要原因之一[1]。HLA-DQA1、DRB1基因是一种高度多态性和具有多种免疫功能的HLA-II类基因,许多自身免疫性疾病都与其相关[3]。我们采用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)对内异位症患者进行HLA-DQA1、DRB1等位基因的基因分型并与对照组比较,旨在探讨子宫内膜异位症患者不孕与HLA-DQA1、DRB1的相关性。

### 1 对象和方法

#### 1.1 研究对象

珠江医院、南方医院和中山大学附属第二医院1999年9月至2000年12月收治的内异症患者102例(内异症组),年龄21~45岁,其中合并不孕者35例,均经腹腔镜或开腹手术后病理检查证实。对照组为健康生育期要求绝育、术中证实无内异症的妇女44例,均曾足月分娩两次,年龄24~43岁。为保证遗传背景相同,内异症组及对照组均来自中国南方。

#### 1.2 研究方法

1.2.1 基因组DNA的制备 从上述人群中每人抽取5 ml全血,用枸橼酸钠抗凝保存。取白细胞,用改良盐析法提取基因组DNA。

1.2.2 以PCR-SSP扩增DRB1 用半套式PCR提高扩增的敏感性和特异性,同时减少基因组DNA的用量。第一次PCR扩增采用通用DRB1引物DRBF和DRBR(表1),反应条件为95 °C, 5 min变性,然后以95 °C 40 s, 60 °C 40 s, 72 °C 40 s扩增25个循环,最后72 °C延伸10 min(在德国Biometra公司生产的Personal Cycler PCR仪上进行)。扩增产物为长约280 bp的片段,将PCR反应产物稀释50倍后取1 $\mu$ l作为第二次PCR的模板,用组特异性引物和引物DRBR在相对应的退火温度下进行扩增(表1)。每组组特异性引物对应的退火温度是在每组设立已知DRB1序列的阴性对照和阳性对照的情况下,利用德国Biometra公司生产的 T Gradient PCR仪反复实验、验证所得。反应条件为95 °C 5 min变性,然后以95 °C 20 s, 63~67 °C 20 s, 72 °C 20 s扩增35个循环,最后72 °C延伸10 min。根据PCR结果分出各样品的等位基因型。

1.2.3 以PCR-SSP扩增DQA1 PCR反应条件和内对照引物参见Jean[4]和Olerup[5]的研究,序列特异性引物的设计参见Jean[4]设计的引物,序列中带有下划线的字母是特别引入的不配对碱基,用以提高反应特异性(表2、3)。

1.2.4 统计分析 用直接计数法计算各等位基因、基因型和表现型频率。观察值和期望值比较进行Hardy-Weinberg平衡吻合度检测,群体间等位基因比较采用 $\chi^2$ 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著差异。

表 1 *HLA-DRB1* 通用引物和組特异性引物Tab.1 *HLA-DRB1* generic and group-specific primers

Primer sequence	Position of amino acid	AT (°C)
DRB generic primers		
DRBF:5'TTCGTGTCACCCACAGCACG3'	Intron-6	60.0
DRBF:5'TCGCCGCTGCACTGTGAAG3'	88-94	60.0
HLA-DRB1 group-specific primers:		
DR1:T,TTG,TGG,CAG,CTT,AAG,TTT,GAA	8-15	63.0
DR2:C,CTG,TGG,CAG,CCT,AAG,AGG	7-13	67.0
DR3/11/6G,TTC,TTG,GAG,TAC,TCT,ATGTC	6-13	63.5
DR4:GT,TTG,TTG,GAG,CAG,GTT,AAA,CA	6-13	63.0
DR7:C,CTG,TGG,CAG,GGT,AAG,TAT,A	7-14	60.0
DR8/12:T,TTG,TTG,GAG,TAC,TCT,ACG,GG	9-16	66.0
DR9:C,TTG,AAG,CAG,GAT,AAG,TTA,GAG	6-13	62.0
DR10:CGG,TTG,CTG,GAA,AGA,CGC,G	6-13	63.0

AT: Annealing temperature

表 2 引物序列及其氨基酸位置

Tab.2 Primer sequence of *HLA-DQA1* and amino acid position

Primer	Primer sequence	Position of amino acid
DQA1	GTGGTGTAAACTTGTACCAG	aa 10-17
DQA2	TGAATTTGATGGAGATGCGG	aa 28-34
DQA4	TGAATTTGATGGAGATGTGC	aa 28-34
DQA6	CCATGTTTGTGAGTGCACCC	aa 60-67
DQA3	TACGGTCCCTCTGGCCAATA	aa 19-26
DQA5	ACGGTCCCTCTGGCCATTT	aa 19-26
DQA8-1	CGGGTCAAATCTAAGTCCGT	aa 52-59
DQA9	AATTGCGGGTCAAATCTTCT	aa 55-62
DQA11	GTTGGAGCGTTTAATCAGAC	aa 75-82
DQA12	ATGTTCAAGTTGTGTTAGT	aa 69-75
DQA16	GTTTGTCAAGTGCAAATTCCC	aa 59-66
DQA17	TTGTACCAGTCTTACGGGCT	aa 14-21
DQA18	TCAGGCCACCGCCAGGCGGC	aa 41-48

表 3 HLA-DQA1 分型及所用引物

Tab.3 Primers used in DQA1 genotyping and allelic identification

Primer1	Primer2	Size of PCR products	Alleles
DQA2	DQA6	120 bp	0101&4&5
DQA3	DQA6	145 bp	0101&4&5/0/102
DQA4	DQA6	120 bp	0102/0103&6
DQA4	DQA6	145 bp	0103
DQA1	DQA18	118 bp	0103
DQA3	DQA8-1	120 bp	0201
DQA1	DQA9	150 bp	0301
DQA3	DQA12	166 bp	0401
DQA1	DQA11	209 bp	0501
DQA1	DQA16	168 bp	0502
DQA17	DQA11	198 bp	0504
DQA5	DQA12	166 bp	0601

## 2 结果

内异症合并及未合并不孕者与正常对照妇女的HLA-DQA1、DRB1等位基因频率比较详见表4。

内异症患者HLA1-DQA1\*0301等位基因频率显著低于正常对照( $P < 0.01$ )，HLA1-DQA1\*0401等位基因频率显著高于正常对照( $P < 0.05$ )。

内异症合并不孕者HLA-DQA1\*0301、DRB1\*07、08/12等位基因频率均显著低于正常对照( $P < 0.05$ )；内异症合并不孕者HLA-DQA1\*0401、DRB1\*07、08/12的等位基因频率与无合并不孕者比较也有显著性差异( $P < 0.05$ )；内异症合并不孕者HLA-DQA1\*0301等位基因频率与无合并不孕者比较无显著差异。

内异症合并不孕者HLA1-DQA1\*0401等位基因频率与对照组无显著差异，而内异症无合并不孕组与对照组比较有显著差异( $P < 0.05$ )。

表 4 子宫内膜异位症患者与对照组的 HLA-DQA1、DRB1 等位基因频率比较

Tab.4 Comparison of the frequencies of HLA-DQA1, DRB1 allelic gene between the patients with endometriosis and control subjects

Alleles	Endometriosis			Control (%)
	Infertility (%)	Without fertility (%)	Total (%)	
<b>DQA1</b>				
*0101&4&5	8(0.114)	28(0.216)	36(0.181)	14(0.159)
*0102	18(0.257)	22(0.164)	38(0.196)	13(0.148)
*0103	18(0.257)	28(0.216)	46(0.230)	13(0.148)
*0106	0(0.000)	2(0.015)	20(0.08)	0(0.000)
*0201	18(0.257)	15(0.111)	33(0.162)	13(0.148)
*0301	4(0.057)*	11(0.082)*	15(0.073)*	26(0.295)
*0401	0(0.000)	11(0.082)*	15(0.073)*	0(0.000)
*0501	0(0.000)	4(0.030)	4(0.019)	6(0.068)
*0601	4(0.057)	11(0.082)	15(0.073)	5(0.057)
<b>DRB1</b>				
*01	4(0.057)	10(0.074)	14(0.069)	5(0.057)
*02	18(0.260)	16(0.119)	34(0.167)	15(0.170)
*03/11/16	18(0.260)	22(0.164)	40(0.196)	11(0.125)
*04	21(0.300)	22(0.164)	43(0.210)	15(0.170)
*07	0(0.000)**	16(0.119)	16(0.078)	8(0.091)
*08/12	0(0.000)**	16(0.119)	16(0.078)	12(0.136)
*09	7(0.100)	25(0.186)	32(0.156)	19(0.216)
*010	4(0.057)	8(0.059)	12(0.059)	3(0.034)

\* $P < 0.05$  vs control group; \*\* $P < 0.05$  vs endometriosis without infertility group

### 3 讨论

HLA是位于人6号染色体短臂上一群高度多态性的紧密连锁的基因群,它所编码的主要组织相容性抗原在特异性免疫中处于中心地位。现已表明,HLA不仅控制着同种排斥反应,而且与机体免疫应答、免疫调节及某些病理状态的产生密切相关。许多自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、I型糖尿病等都与某些HLA抗原的表达有密切的关系[3]。现普遍认为内异症是自身免疫性疾病。多项研究证实,子宫内膜疾病患者在位和异位内膜的HLA抗原表达均升高,子宫内膜释放的干扰素能够增加II型抗原表达,巨噬细胞识别后,提呈给T细胞并刺激B细胞产生抗体,因此,II型抗原在异位症病人的免疫反应中起到关键性作用[6]。

近年来,国内外学者研究发现,自身免疫反应能通过影响子宫内膜与受精卵同步发育,早期胚胎的发育等途径导致患者不孕和病理性妊娠。20世纪80年代,人们在对Hutterite族妇女的研究中首次发现妊娠与HLA有关,原发性习惯性流产与HLA-DR、HLA-DQ均有相关性,而继发性习惯性流产与HLA-DR,HLA-DQ无相关性。

本研究发现内异症合并不孕者 HLA1-DQA1\*0301、DRB1\*\*07、\*08/12等位基因频率低于正常对照组,其中 HLA1-DRB1\*07、\*08/12等位基因频率也低于无合并不孕的患者,内异症无合并不孕患者HLA1\*0401等位基因频率显著高于正常对照;合并不孕的患者HLA1\*0401等位基因频率与对照组无显著差异。结果提示HLA-

DQA1\*0301, HLA-DRB1\*07、\*08/12可能与内异症的不孕机制相关, HLA1\*0401与子宫内膜异位症的发病机制相关, 但不参与内异症的不孕机制。由于HLA的多态性在不同的人群中分布差异很大, 某些疾病易感基因可能不是单一位点的等位基因, 而是多个等位基因组成的基因群, 因此我们还须观察多个人群, 并在此基础上进行家系研究。

#### 参考文献:

[1] Giudice LC, Tazuke SI, Swiersz L. Status of current research on endometriosis[J]. J Reprod Med, 1998, 43(Suppl 3 ): 252-62.

[2] Gleicher N, EI-Roeiv A, Contino E, et al. Is endometriosis an autoimmune disease [J]? Gynecol Obstet , 1987, 70:115.

[3] Lundin KEA, Sollid LM, Thorsby E. Class II-restricted T cell function[A]. In: Browning M, Michael A eds. HLA and MHC genes, molecules and function[M]. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1996. 329.

[4] Picard JK. Single-step allele-specific polymerase chain reaction HLA- DQ genotyping using ARMS primer[J]. Human Immunology, 1993, 38:115-9.

[5] Olerup A, Aldener A. HLA-DQB1 and HLA-DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP) in 2 hours[J]. Tissue Antigen, 1993, 41:119-34.

[6] Chiang CM, Hill JA. Localization of T cells, Interferon-gamma and HLA-DR in eutopic and ectopic human endometrium[J]. Gynecol Obstet Invest, 1997, 43: 245-50.

#### 参考文献:

[1] Giudice LC, Tazuke SI, Swiersz L. Status of current research on endometriosis[J]. J Reprod Med, 1998, 43(Suppl 3 ): 252-62.

[2] Gleicher N, EI-Roeiv A, Contino E, et al. Is endometriosis an autoimmune disease [J]? Gynecol Obstet , 1987, 70:115.

[3] Lundin KEA, Sollid LM, Thorsby E. Class II-restricted T cell function[A]. In: Browning M, Michael A eds. HLA and MHC genes, molecules and function[M]. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1996. 329.

[4] Picard JK. Single-step allele-specific polymerase chain reaction HLA- DQ genotyping using ARMS primer[J]. Human Immunology, 1993, 38:115-9.

[5] Olerup A, Aldener A. HLA-DQB1 and HLA-DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP) in 2 hours[J]. Tissue Antigen, 1993, 41:119-34.

[6] Chiang CM, Hill JA. Localization of T cells, Interferon-gamma and HLA-DR in eutopic and ectopic human endometrium[J]. Gynecol Obstet Invest, 1997, 43: 245-50.