

· 论 著 ·

青壮年军人腰腿痛患者 HLA-B27 及其基因亚型检测分析

高文博¹, 徐海栋², 刘 刚², 李卫巍¹, 夏欣一¹, 虞 伟¹, 李晓军¹

[摘要] 目的 通过检测 2126 例青壮年军人腰腿痛患者人类白细胞抗原 B27 (HLA-B27) 阳性率和表达强度, 了解本地区军人强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 与 HLA-B27 抗原相关性, 并初步探讨其对 AS 的临床诊断意义; 通过检测确诊 AS 军人患者 HLA-B27 基因亚型, 了解本地区军人 HLA-B27 基因亚型分布情况。方法 用流式细胞仪分析 2013 年 8 月 1 日 - 2014 年 1 月 10 日 2126 例因腰腿痛入南京军区南京总医院就诊的军人患者 HLA-B27 抗原表达情况; 用荧光定量 PCR 法对其中确诊 AS 患者 HLA-B27 基因亚型进行检测分析。结果 2126 例患者中 HLA-B27 阳性者 158 例, 阳性率为 7.4%, 男女患者 HLA-B27 抗原阳性率分别为 7.1% 和 10.0% ($P < 0.01$); 33 例 HLA-B27 阳性确诊患者中, B*2704 和 B*2705 为主要型别, 分别占 51.5% 和 42.4%。结论 HLA-B27 对于 AS 仅有辅助诊断作用, 不宜作为 AS 的常规筛选指标。

[关键词] 人类白细胞抗原 B27; 流式细胞术; 强直性脊柱炎; 军人; 基因分型

[中图分类号] R593.23 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.03.003

Detection of HLA-B27 and genetic subtypes in young soldiers with low back pain

GAO Wen-bo¹, XU Hai-dong², LIU Gang², LI Wei-wei¹, XIA Xin-yi¹, YU Wei¹, LI Xiao-jun¹. 1. Institute of Medical Laboratory Sciences of PLA, 2. Department of Orthopedics, Nanjing School of Clinical Medicine, Southern Medical University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship and diagnostic significance between ankylosing spondylitis and HLA-B27 antigen in soldiers in one military district by detecting the positive rate and expression intensity of HLA-B27 antigen in 2126 young soldiers with low back pain, and evaluate its clinical significance. To investigate the distribution of genetic subtypes of AS by detecting genetic subtypes of HLA-B27 in confirmed soldiers. **Methods** The expression of HLA-B27 antigen of peripheral blood T lymphocytes in 2126 hospital admission patients was analyzed by flow cytometry. Genetic subtypes of HLA-B27 was determined by fluorescence quantitative polymerase chain reaction assay. **Results** 158 patients were positive in 2126 patients. The positive rate of antigen HLA-B27 was 7.4%, and the male and female patients' positive rates of HLA-B27 antigen were 7.1% and 10.0%, respectively ($P < 0.01$). Among the 33 confirmed AS patients with HLA-B27 antigen positivity, B*2704 and B*2705 were the main type with accounting for 51.5% and 42.4% respectively. **Conclusion** HLA-B27 is helpful for auxiliary diagnosis of AS, but is not suitable as a screening indicator of AS.

[Key words] HLA-B27; flow cytometry; ankylosing spondylitis; soldiers; genetic subtypes

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种慢性炎症性自身免疫性疾病, 主要侵犯骶髂关节、中轴骨骼, 也可涉及周边关节、眼、肠道和主动脉^[1]; 其在我国的发病高峰为 15 ~ 35 岁, 平均年龄 25 岁, 并且男性平均好发年龄小于女性。自 20 世纪 70 年代 Brewerton 等^[2]首次提出人类白细胞抗原 B27 (HLA-B27) 与强直性脊柱炎 (AS) 之间存在密切关系后, 大量研究数据^[3]进一步证实, 早期 HLA-B27 检测对 AS 诊断有重要作用。据流行病学调查, AS 患者 HLA-B27 阳性率高达 90% ~ 96%, 而

普通人群 HLA-B27 阳性率仅 4% ~ 9%。军人是一类特殊群体, 大部分为青壮年, 正处于 AS 好发年龄段。为此, 我们用流式细胞术对 2126 例因腰腿痛到南京军区南京总医院就诊的军人患者进行了 HLA-B27 抗原检测, 同时用荧光定量 PCR 技术对确诊 AS 患者进行 HLA-B27 基因亚型分析, 以探讨 AS 患者 HLA-B27 抗原阳性及其基因亚型分布及其对 AS 的诊断意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2013 年 8 月 1 日 - 2014 年 1 月 10 日, 因腰背痛或关节痛到南京军区南京总医院就诊的军人患者 2126 例, 其中男 1885 例, 女 241 例; 年龄 15 ~ 55 (25.8 ± 9.0) 岁; 明确 AS 诊断者 36 例, 男 29 例, 女 7 例。AS 诊断符合 1984 年美国风湿病

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81470071)

作者单位: 210002 南京军区南京总医院 (南方医科大学南京临床医学院), 1. 临床中心实验科, 2. 骨科

通讯作者: 李晓军, Email: xiaojunli62@126.com

协会 (ASA) 关于 AS 的修订纽约标准^[4]。

1.2 主要仪器与试剂 FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); ABI7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); HLA-B27 试剂盒 (美国 BD 公司); DNA 提取试剂盒 (德国 QIAGEN 公司); HLA-B27 基因高分辨率分析试剂盒 (天津秀鹏公司); Taq DNA 聚合酶 (日本 TaKaRa 公司)。

1.3 HLA-B27 检测 空腹抽取 2126 例患者静脉血 5 mL, 加入含 EDTA-K₂ 抗凝剂的真空采血管中, 按试剂盒操作说明书进行检测。每个样品采集的细胞数不少于 15 000 个, 通过校准微球设定荧光界值, 以 CD3 (T 淋巴细胞) 设门并检测其 HLA-B27 的表达荧光强度, \geq 本批 HLA-B27 试剂盒设定界值 141 者, 报告为 HLA-B27 阳性, 否则为 HLA-B27 阴性。

1.4 HLA-B27 基因亚型分型

1.4.1 DNA 提取 用 QIAGEN 公司 DNA 提取试剂盒提取 PBMC 中 DNA, 严格按试剂盒说明书操作 (DNA 浓度为 30 ~ 100 ng/ μ L, A 值 260/280 比值 1.60 ~ 2.00)。

1.4.2 HLA-B27 亚型分型 用 HLA-B27 基因高分辨率分型试剂盒, 严格按照说明书进行。反应体系 20 μ L (包括 dNTP-Buffer 18 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.15 μ L, 荧光染料 0.25 μ L 和 DNA 2 μ L), 加入含有特定引物的反应板的相应孔中。扩增条件: 96 $^{\circ}$ C 2 min; 96 $^{\circ}$ C 20 s, 68 $^{\circ}$ C 60 s, 5 个循环; 96 $^{\circ}$ C 20 s, 65 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 10 个循环; 96 $^{\circ}$ C 20 s, 63 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 15 个循环; 采集荧光信号, 72 $^{\circ}$ C 2 min。人生长激素 (HGH) 基因序列特异性引物为内参。溶解曲线按仪器默认程序。B27 引物孔扩增曲线有明显指数扩增期, 且该孔溶解导数曲线峰值/内参孔溶解导数曲线峰值的比值 ≤ 2.5 , 判断为阳性, 否则判断为阴性。

1.5 统计学处理 用 SPSS 13.0 统计软件进行。组间 HLA-B27 阳性率的比较用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HLA-B27 检测结果 2126 例腰腿痛患者中, HLA-B27 阳性者仅为 158 例, 占受检总数的 7.4% (158/2126), 其中男性 134 例, 占男性患者总数 7.1% (134/1885); 女性 24 例, 占女性患者 10.0% (24/241)。女性患者 HLA-B27 阳性率高于男性, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 HLA-B27 阳性与 AS 关系 在 2126 例腰腿痛患者中, 根据诊断标准, 确诊 AS 者 36 例 (1.69%,

36/2126)。36 例 AS 患者中, HLA-B27 阳性 33 例, 占全部腰腿痛患者的 1.55% (33/2126), 占 HLA-B27 阳性者 20.89% (33/158)。

2.3 确诊 AS 患者 HLA-B27 基因亚型分型 33 例 HLA-B27 阳性者, 应用 HLA-B27 基因高分辨率试剂盒检测, 17 例表现为 B*2704, 占 51.5% (17/33), 是主要型别; 14 例表现为 B*2705, 占 42.4% (14/33); 1 例 HLA-B27 阳性, 分型未定, 占 3.03% (1/33); 1 例同时表达 B*2705/B*4002-10 合并杂合, 占 3.03% (1/33)。

3 讨论

AS 是一种慢性炎症性自身免疫性疾病, 也是脊柱关节病的一种。主要累及中轴关节和骶髂关节, 引起腰痛、晨僵、脊柱活动受限、外周关节受累、肌腱端炎、足跟痛等关节症状, 也可引起较为少见的关节外症状, 如虹膜炎、心血管表现、肺部表现和骨质疏松等。AS 在世界各地分布广泛, 不同种族和地区患病率差异较大。总体来说, AS 患病率白种人较高, 黄种人次之, 黑种人最低。AS 在各年龄段均可发病, 发病高峰为 15 ~ 35 岁, 平均发病年龄 25 岁左右。段振华等^[5]研究发现, 我国男性平均发病年龄 23.0 岁, 女性为 27.0 岁, 且性别间差异明显。以前普遍认为 AS 以男性居多, 但近年来的研究显示, 男女比例差距主要是由于女性发病较为隐匿、症状较轻易误诊漏诊造成的^[6]。

目前, AS 病因和发病机制尚不明确, 但普遍认为免疫反应调节是其主要致病机制, 包括细胞因子、T 细胞相互作用、遗传和微生物感染等。临床上, 多数 AS 患者均有消化系统及肺部感染病史, 亦提示感染可能是 AS 的诱发因素^[7]。HLA-B27 与 AS 的相关性是迄今为止已知的 HLA 与疾病的关联中最强和最典型的^[8]。有研究表明, HLA-B27 阳性率和等位基因的分布在不同种族和地区中存在差异, 因此分析不同人群中 HLA 抗原表达有助于疾病的早期诊断、预防和预判。本研究显示 HLA-B27 阳性率为 7.4%, 高于文献报道健康人群的阳性率 (4.5%)^[9], 其原因可能为本研究人群中男性多于女性, 且所处年龄位于 AS 好发年龄段, 但这一数值却远远低于朱宇芳^[10] (44.8%)、邹玲莉等^[11] (28.30%) 等的相关报道, 估计与 HLA-B27 检测受到本院医生的普遍重视, 已成为筛查腰腿疼痛患者特别是部队官兵的常规项目有关。另外吴振彪等^[12]关于某部队官兵脊柱关节病的流行病学调查也显示, 部队官兵的 AS 患病率 (0.21%) 反而低于

普通人群的患病率(0.4%)^[13],考虑与部队人群的特点及近年部队生活条件和就医情况改善有关。

国内外已有大量关于 HLA-B27 亚型分布情况的报道。不同研究人群,HLA-B27 亚型分布情况不同。本研究显示,B*2704 为本项研究 AS 患者主要型别占 51.5%,其次为 B*2705 占 42.4%,与上海^[14]、广东^[15]等地研究报道相符,而韩国^[16]和欧洲^[17] AS 患者 B*2705 为主要亚型。考虑到本研究确诊 AS 患者例数较少,可能存在选择偏倚,需扩大样本进一步研究。关于家系分析的研究表明,在 HLA-B27 阳性的 AS 患者一级亲属中,HLA-B27 阳性者占 31.3%,并且这些亲属患 AS 的相对危险率达到 120.4,是正常家庭对照组的 10.8 倍^[18]。本研究中 36 例确诊 AS 患者中 5 例有家族史,亦发现 AS 在部队中有较高的发病率,部分患者一入伍即查出患有 AS,因此如果在入伍查体中进行家族史的询问调查及相关专业检查,可以有效减少 AS 在部队的患病率,有利于提高部队训练水平及战斗力。但是值得注意的是,大约 80% 的 HLA-B27 阳性者并不发生 AS,大约 10% 的 AS 患者 HLA-B27 为阴性,提示 HLA-B27 在 AS 患者中表达可能只是一个重要的遗传因素,并不是影响本病的唯一因素。在本研究的 2126 例腰腿痛军人患者中只有 7.4% HLA-B27 为阳性,而确诊 AS 患者仅 1.69%。由于 HLA-B27 检测费用较高,从医疗成本考虑是对医疗资源的极大浪费,因此建议军人患者就医时,严格区分训练伤情^[19],并在有家族史或者其他较为明确的临床指征时再行 HLA-B27 检测,而不宜将其列为 AS 的筛选指标。

【参考文献】

[1] 吴珊珊,段振华.强直性脊柱炎流行病学研究进展[J].安徽医科大学学报,2013,48(8):988-992.

[2] Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27[J]. Lancet, 1973, 1(7809):904-907.

[3] Rosenbaum JT, Davey MP. Time for a gut check: Evidence for the hypothesis that HLA-B27 predisposes to ankylosing spondylitis by altering the microbiome[J]. Arthritis Rheum, 2011, 3(11):3195-3198.

[4] van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic

criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria[J]. Arthritis Rheum, 1984, 27(4):361-368.

[5] 段振华,潘发明,梅 杨,等.强直性脊柱炎患者 445 例流行特征分析[J].中国公共卫生,2011,27(3):341-342.

[6] 莫成荣,张艺凡,姜兆荣,等.关注对女性强直性脊柱炎患者的诊治[J].辽宁中医杂志,2014,41(11):2412-2414.

[7] 曾 华,林桂英,冯修高,等.部队官兵肺炎衣原体感染与强直性脊柱炎关系的调查研究[J].东南国防医药,2013,15(2):110-112.

[8] 胡晓舟,苑 腾,王小林,等.流式细胞术与定量 PCR 法检测 HLA-B27 的对比[J].中国实验诊断学,2009,13(16):745-746.

[9] 王国英,黄海平,周海燕.探讨人类白细胞抗原 B27 对强直性脊柱炎的诊断价值[J].中国卫生检验杂志,2015,25(1):65-66.

[10] 朱宇芳.流式细胞术检测人类白细胞抗原-B27 在诊断强直性脊柱炎中的价值[J].国际检验医学杂志,2010,31(7):735-736.

[11] 邹玲莉,贾妙兴,常志娟,等.流式细胞术检测 4272 例人类白细胞抗原-B27 表达的临床意义[J].浙江中医药大学学报,2012,36(3):258-260.

[12] 吴振彪,朱 平,王宏冲,等.某部队官兵血清阴性脊柱关节病发病规律调查[J].中华流行病学杂志,2004,25(9):753-755.

[13] Gran JT, Husby G. The epidemiology of ankylosing spondylitis[J]. Semin Arthritis Rheum, 1993, 22(5):319-34.

[14] Liu Y, Jiang L, Cai Q, et al. Predominant association of HLA-B*2704 with ankylosing spondylitis in Chinese Han patients[J]. Tissue Antigens, 2009, 75(1):61-64.

[15] 邓志辉,高素青,曾健强,等.南方汉族强直性脊柱炎患者及健康人群 HLA-B27 基因的分子多态性及分布[J].中国输血杂志,2009,22(9):722-725.

[16] Lee SH, Choi IA, Lee YA, et al. Human leukocyte antigen-B*2705 is the predominant subtype in the Korean population with ankylosing spondylitis, unlike in other Asians[J]. Springer, 2008, 20(4):43-46.

[17] Fernandez-Sueiro JL, Alonso C, Blanco FJ, et al. Prevalence of HLA-B27 and subtypes of HLA-B27 associated with ankylosing spondylitis in Galicia, Spain[J]. Clin Exp Rheumatol, 2004, 22(4):465-468.

[18] Liu Y, Li J, Chen B, et al. Familial aggregation ankylosing spondylitis in Southern China[J]. J Rheumatol, 2001, 28(3):550-553.

[19] 孙艳萍,胡佳乐,罗志勇,等.某装甲部队腰部军事训练伤调查分析[J].东南国防医药,2012,14(5):443-445.

(收稿日期:2015-02-15;修回日期:2015-03-13)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)