

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2014.01.022

桥本甲状腺炎患者杀伤细胞免疫球蛋白样受体与人类白细胞抗原基因对频率的分析^①

李建婷 郭成 侯岩峰 焦玉莲 赵跃然 孙慧 徐进 曹铭锋 高聆 赵家军 张海清^②
李明龙^② (山东大学附属省立医院内分泌科, 济南 250021)

中图分类号 R581 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2014)01-0110-04

[摘要] 目的:探讨杀伤细胞免疫球蛋白样受体(Kill cell immunoglobulin-like receptor, KIR)与人类白细胞抗原(Human leukocyte antigen, HLA)组成的受体-配体基因对与桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)的关联性。方法:选择散发 HT 患者 44 例和健康对照 43 例,提取全血基因组 DNA,序列特异性引物聚合酶链反应检测 4 个 KIR 基因和 8 个 HLA-C 基因,根据受体-配体特异识别原则组成 KIR2DL1 + HLA-C2、KIR2DL2/2DL3 + HLA-C1、KIR2DS1 + HLA-C2 和 KIR2DS2 + HLA-C1 共 4 对 KIR/HLA-C 基因对,分析各基因对频率在两组人群中的差别。结果:活化性 KIR2DS2 + HLA-C1 基因对在 HT 患者组与对照组频率差异有显著性(36.36% vs 16.28%, $P < 0.05$)。其余基因对在两组间未见明显差异。结论:HT 患者活化性 KIR/HLA-C 基因对频率升高,传递活化性信号活化 NK 细胞和 T 细胞,可能是 HT 发病的免疫遗传学因素之一。

[关键词] 杀伤细胞免疫球蛋白样受体;人类白细胞抗原;基因;甲状腺炎;自身免疫性疾病

Analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen gene-pair frequencies in Hashimoto's thyroiditis patients

LI Jian-Ting, GUO Cheng, HOU Yan-Feng, JIAO Yu-Lian, ZHAO Yue-Ran, SUN Hui, XU Jin, CAO Ming-Feng, GAO Ling, ZHAO Jia-Jun, ZHANG Hai-Qing, LI Ming-Long. Department of Endocrinology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Ji'nan 250021, China

[Abstract] **Objective:** More research have been carried out to demonstrate that the gene pair consisted by kill cell immunoglobulin-like receptor (KIR) and human leukocyte antigen (HLA) played a role in the pathogenesis of many immunologic diseases. The aim of this study is to investigate the relationship of certain KIR/HLA-C gene pair with Hashimoto's thyroiditis (HT). **Methods:** Forty-four HT patients and forty-three randomly matched healthy controls were enrolled to detect the KIR and HLA-C genotypes. The genomic DNA were extracted, followed by four selected KIR genes and eight HLA-C genes were detected, and all of the target genes were determined by a polymerase chain reaction using sequence-specific primers (PCR-SSP). The four KIR genes were KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DS1 and KIR2DS2/3, as well as eight HLA-C consisted of HLA-Cw01-08 genes. Then the frequencies of four gene pairs, KIR2DL1 + HLA-C2, KIR2DL2/3 + HLA-C1, KIR2DS1 + HLA-C2 and KIR2DS2 + HLA-C1, were compared between HT patients and healthy control individuals. **Results:** The frequency of KIR2DS2/HLA-C1 gene pair was significantly higher of the patient group than that of the control group (36.36% vs 16.28%, $P < 0.05$). There were no significant differences in the frequencies of other KIR/HLA-C gene pairs. **Conclusion:** The increased frequencies of KIR2DS2 and HLA-C1 gene pair might confer to the pathogenesis of HT disease.

[Key words] Killer cell immunoglobulin-like receptor; Human leukocyte antigen; Gene; Thyroiditis; Auto-immune disease

杀伤细胞免疫球蛋白样受体(Killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR)主要表达于自然杀伤细胞(Natural killer, NK)和部分 T 细胞表面,通过

特异性识别靶细胞表面人类白细胞抗原(Human leukocyte antigen, HLA),调控 NK 细胞和 T 细胞的免疫活性。HLA-C 属于经典的 HLA-I 类分子,广泛分布于有核细胞表面,根据第 80 位氨基酸的不同,可将 HLA-C 分为 HLA-C1 (Asn80) 和 HLA-C2 (Lys80) 两组。HLA-C1 组包括 HLA-Cw01、Cw03、Cw07、Cw08,特异性识别 KIR2DL2/3 和 KIR2DS2; HLA-C2 组包括 HLA-Cw02、Cw04、Cw05、Cw06,特异性识别 KIR2DL1 和 KIR2DS1。两组 HLA-C 配体分

①本文为国家自然科学基金项目(30901461)。

②通讯作者,E-mail:haiqingzhang7576@163.com, E-mail:liminglong@medmail.com.cn。

作者简介:李建婷(1986年-),女,主要从事内分泌与代谢病的研究。E-mail:ting1016@163.com。

别与不同的 KIR 受体结合,影响机体自身的免疫稳态,导致疾病的发生^[1-3]。

桥本甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis, HT) 是自身免疫甲状腺病的一种,其发病机制可能与 HT 患者体内 NK 细胞和 T 细胞的免疫功能紊乱有关,但是具体机制尚未完全阐明。本研究旨在以往研究的基础上,用序列特异性引物 PCR (sequence specific primer polymerase chain reaction, PCR-SSP) 方法进一步分析 KIR/HLA 受体配体基因对的分布及其与 HT 发病间的关联性。

1 材料与方法

1.1 试剂与引物 Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, dNTP 购自上海生物工程技术服务有限公司。引物设计参照文献^[4,5],由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 研究对象的选择 HT 组选择 2012 年 10 月至 2013 年 3 月就诊于山东省立医院的山东地区桥本甲状腺炎患者 44 例,其中男 1 例,女 43 例,患者全部存在弥漫性甲状腺肿大,实验室检查见甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAb) 和甲状腺球蛋白抗体 (TgAb) 明显升高,甲状腺 B 超示符合桥本甲状腺炎表现,甲状腺细针穿刺细胞学检查结果确诊为 HT,并排除其他甲状腺及自身免疫性疾病。对照组为同期同地区无血缘关系的随机健康个体 43 例,其中男 1 例,女 42 例,均排除甲状腺疾病、自身免疫性疾病及相关家族病病史。HT 患者组与对照组的年龄、性别分布经检验无统计学差异。

1.3 基因组 DNA 提取 空腹抽取外周静脉血,ACD 抗凝,用氯仿、饱和酚法提取 DNA。

1.4 KIR 基因分型分析 用序列特异性引物 PCR 方法进行 KIR 基因分型。测定的 KIR 基因包括抑制性 KIR: KIR2DL1、KIR2DL2/3, 活化性 KIR: KIR2DS1、KIR2DS2 以及框架基因 KIR2DL4。PCR 反应体系 20 μ l,其中模板 DNA 100 ng,上、下游引物终浓度 0.2 μ mol/L, 10 \times PCR buffer 2 μ l, MgCl₂ 1.6 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.5 U,加 ddH₂O 至 20 μ l。反应条件:96 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,循环参数:96 $^{\circ}$ C 变性 25 s,65 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,进行 5 个循环;96 $^{\circ}$ C 变性 25 s,60 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,进行 21 个循环;96 $^{\circ}$ C 变性 25 s,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,进行 5 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,Alpha Imager TM2200 生物图像分析仪分析结果。每一个 DNA 模板的 PCR 扩增反应,以框架基

因 KIR2DL4 作为 PCR 反应效率的内参照。

1.5 HLA-C 基因分型分析 用序列特异性引物 PCR 方法进行 HLA-C 基因分型。测定的 HLA-C 基因为 HLA-Cw01-Cw08。PCR 反应体系 20 μ l,其中模板 DNA 100 ng,上下游引物终浓度 0.5 μ mol/L, 2 \times PCR buffer 10 μ l, dNTP 0.25 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.5 U,加 ddH₂O 至 20 μ l。反应条件:96 $^{\circ}$ C 预变性 7 min,循环参数:96 $^{\circ}$ C 变性 30 s,68 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,进行 5 个循环;96 $^{\circ}$ C 变性 30 s,63 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,进行 21 个循环;96 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,进行 5 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物处理同上。

1.6 统计学处理 应用 SPSS18.0 软件包处理,患者组与对照组之间 KIR/HLA-C 基因对频率显著性差异采用四格表卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KIR/HLA-C 基因对频率在两组间的比较 分别比较 HT 患者组和健康对照组 KIR2DL1 + HLA-C2、KIR2DL2/3 + HLA-C1、KIR2DS1 + HLA-C2 和 KIR2DS2 + HLA-C1 四对 KIR/HLA-C 基因对的频率 (图 1),四对基因对均以不同频率表达,与对照组相比,HT 患者组外周血中 KIR2DS2 + HLA-C1 基因对频率显著升高 (36.36% vs 16.28%, $P < 0.05$),其余 3 对基因对 KIR2DL1 + HLA-C2、KIR2DL2/3 + HLA-C1 和 KIR2DS1 + HLA-C2 在 HT 组和对照组频率差异均无统计学意义。

2.2 各 HLA-C 基因频率在两组间的比较 分别比

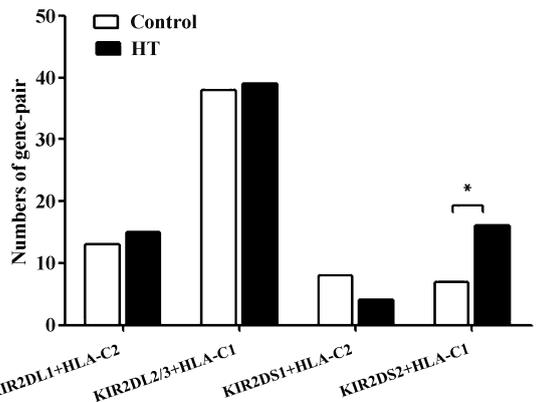


图 1 4 对基因对在两组人群中频率的差异性比较

Fig. 1 Frequencies of four KIR/HLA-C gene-pairs in HT patients in comparison with healthy controls

Note: * . $P < 0.05$.

表 1 HLA-C1 和 HLA-C2 基因频率比较

Tab. 1 Frequencies of HLA-C1 and HLA-C2 genes in patients compared with control subjects

HLA-Cw01-08	Controls(%) (n = 43)	HT(%) (n = 44)	P
01	19.77	31.82	0.250
02	2.33	1.14	1.000
03	40.70	15.91	0.007 ²⁾
04	13.95	11.36	0.716
05	2.33	2.27	1.000
06	17.44	19.32	0.156
07	29.07	28.41	0.944
08	47.67	26.41	0.038 ¹⁾
HLA-C1	88.37	86.36	0.778
HLA-C2	30.23	34.09	0.700

Note: Data are presented as percentages, P values were determined using chi-square test, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$.

较 HLA-C1 (HLA-Cw02、04、05、06) 和 HLA-C2 (HLA-Cw01、03、07、08) 两组 HLA-C 基因, 两组 HLA-C 基因在外周血中呈不平衡表达, 其中 HLA-Cw03 和 HLA-Cw08 基因在 HT 患者中频率较健康对照组减低, 两组相比差异有显著性 (15.91% vs 40.70%, 26.14% vs 47.67%, P 均 < 0.05)。但是总的 HLA-C1 和 HLA-C2 频率在两组间无显著性差异(表 1)。

3 讨论

近年来, 关于 KIR 基因与疾病间关系的研究屡见不鲜, 越来越多证据表明, 特定的 KIR 基因型在肿瘤、病毒感染、妊娠流产及自身免疫性疾病的发生发展中起重要作用^[6-9]。根据我们之前的研究, KIR 多态性与 HT 的发病相关, 其中抑制性 KIR 基因 KIR2DL5 可能是 HT 发病的保护因子^[10]。但是随着研究的深入, 研究者们发现在判断 KIR 生物学效应时, 应同时分析其与 HLA 配体的配对情况, KIR 只有通过特异性 HLA 配体结合才能发挥对 NK 细胞和 T 细胞免疫活性的调节作用。例如, 单独分析 KIR 频率时, 黑色素瘤患者和 1 型糖尿病患者的 KIR 频率与正常人群相似; 而分析 KIR 受体与 HLA 配体基因对时, 发现黑色素瘤患者的抑制性 KIR/HLA-C 基因对频率较正常人群低^[11], 1 型糖尿病患者活化性基因对频率较正常人群高^[12]。到目前为

止, 国内外有关 HT 患者 KIR 与 HLA 受体配体基因对的研究鲜有报道, 因此, 我们在以往研究的基础上, 又延伸了对 HT 患者和健康对照人群 KIR/HLA-C 受体配体基因对频率差别的研究。

我们应用 PCR-SSP 方法分析两组人群间 4 对不同 KIR/HLA-C 基因对频率的差别, 结果显示只有活化性 KIR2DS2/HLA-C1 基因对频率在两组人群中有显著性差异, 并且 HT 患者频率明显高于健康人群 (36.36% vs 16.28%, $P < 0.05$), 虽然 HLA-Cw03 和 HLA-Cw08 在两组间有统计学意义, 但是总体 HLA-C1 和 HLA-C2 频率并没有统计学差异, 不能作为判定 HLA-C 基因有意义的标准。以往 Faridi 等^[8]应用 PCR-SSP 方法研究了早期复发性流产患者的 KIR 和 HLA 基因组合, 发现复发性流产患者 KIR2DL1/HLA-C2 基因频率低于正常早孕妇女, 而活化性 KIR2DS2/HLA-C1 基因频率则明显高于患者, 表明抑制性和活化性 KIR/HLA-C 基因均可能与习惯性流产的发生有关。国内徐金娥等^[13]做了类似的研究, 结果发现只有活化性 KIR2DS2/HLA-C1 基因对频率在两组间有统计学意义, 并且患者组频率高于对照组。Yen 等^[9]用同样的方法对类风湿性关节炎患者做了研究, 发现患者 KIR2DS2/HLA-C1 基因对频率较健康对照者高。HT、习惯性流产和类风湿性关节炎的发生均与自身免疫功能异常相关, 以上研究结果均提示抑制性和(或)活化性 KIR/HLA-C 基因对可能在自身免疫性疾病的发病中起作用。

对健康人而言, 抑制性 KIR/HLA 受配体对可避免机体发生自身免疫性疾病, 因此, 抑制性受配体基因对所占比例平衡是维持机体免疫状态的重要条件, 而活化性 KIR/HLA 受配体对主要增强机体免疫功能以抵抗病原体的入侵, 但是它的活化作用往往异常, 这又可能成为自身免疫性疾病的易感因素^[14]。NK 细胞和 T 细胞是机体重要的具有免疫功能的细胞, 表达在 NK 细胞和部分 T 细胞表面的 KIR 受体, 通过与特异性 HLA-C 类分子结合, 向 NK/T 细胞传递活化性或抑制性信号, 调节 NK/T 细胞功能^[15]。正常情况下, 活化性受体和抑制性受体传递的两种信号总和平衡, 使得 NK/T 细胞功能稳定, 可耐受自身正常细胞^[16,17]。如果活化性 KIR/HLA-C 组合频率超过了抑制性受配体组合频率, NK/T 细胞接受的活化性信号就多于抑制性信号, 对靶细胞的杀伤作用就强, 有可能对机体正常组织细胞进行攻击。相反, 如果抑制性信号多于活化性信号, NK/T 细胞的杀伤作用就会相对较弱, 损伤靶

细胞的能力相对减低,不会对机体正常细胞造成损伤^[18]。

本研究结果显示,与健康人群相比,HT患者外周血活化性 KIR2DS2/HLA-C1 基因对频率增加,可能通过影响活化性与抑制性 KIR/HLA-C 受配体对之间的平衡,使 NK/T 细胞的激活阈值下降,易于被自身抗原激活,破坏机体的免疫稳定状态,异常激活的 NK/T 细胞可直接杀伤自身甲状腺细胞造成甲状腺组织过度破坏,导致 HT 相关临床症状的发生。现已证实,CD4⁺ 辅助性 T 细胞 (T helper, Th) 的 Th1 型细胞因子介导的细胞免疫在 HT 发病中起主导作用^[19,20],异常激活的 NK/T 细胞也可分泌 TNF- α 、IFN- γ 等 Th1 细胞因子从而间接诱导甲状腺细胞凋亡,导致自身甲状腺组织破坏,致使 HT 的发生。

综上所述,HT 患者外周血中 KIR2DS2/HLA-C1 基因对频率增高,使 NK/T 细胞功能异常导致机体自身免疫功能紊乱,可能是引起 HT 发病的免疫遗传学因素之一。对 KIR/HLA-C 基因对的分析为研究 HT 的发病机制提供了新的方法,为今后桥本甲状腺炎的早期诊断早期治疗开辟新的思路。但是有关 KIR、HLA-C 基因在 mRNA、蛋白等表达水平的研究仍不完善,有待今后进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] Ho PY, Barton A, Worthington J, *et al.* HLA-Cw6 and HLA-DRB1 * 07 together are associated with less severe joint disease in psoriatic arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66 (6): 807-811.
- [2] Kano T, Mori T, Furudono M, *et al.* Human leukocyte antigen may predict outcome of primary recurrent spontaneous abortion treated with paternal lymphocyte alloimmunization therapy [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2007, 58(4): 383-387.
- [3] Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005; 5 (3): 201-214.
- [4] Martin MP, Nelson G, Lee JH, *et al.* Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles [J]. *J Immunol*, 2002, 169(6): 2818-2822.
- [5] Bunce M, O' Neill CM, Barnardo MC, *et al.* Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA2A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 and DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP) [J]. *Tissue Antigens*, 1995, 46(5): 355-367.
- [6] MacDonald KP, Kuns RD, Rowe V, *et al.* Effector and regulatory T-cell function is differentially regulated by RelB with antigen-presenting cells during GVHD [J]. *Blood*, 2007, 109(11): 5049-5057.
- [7] Khakoo SI, Tho CL, Martin MP. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection [J]. *Science*, 2004, 305(5685): 872-874.
- [8] Faridi RM, Agrawal S. Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) and HLA-C allorecognition patterns implicative of dominant activation of natural killer cells contribute to recurrent miscarriages [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(2): 491-497.
- [9] Yen JH, Moore BE, Nakajima T, *et al.* Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis [J]. *J Exp Med*, 2001, 193 (10): 1159-1167.
- [10] 张海清, 赵家军, 赵跃然, *et al.* 桥本甲状腺炎患者杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因多态性分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28(5): 454-457.
- [11] Naumova E, Mihaylova A, Stoitchkov K, *et al.* Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54(2): 172-178.
- [12] Vaner Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, *et al.* KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects [J]. *Diabetes*, 2003, 52(10): 2639-2642.
- [13] 徐金娥, 杨晓菊, 张云, 等. 杀伤细胞免疫球蛋白样受体及其配体 HLA-C 基因多态性与不明原因早期复发性流产的相关性 [J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 5(26): 420-424.
- [14] Smita K, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease [J]. *Semin Immunol*, 2008, 20(6): 343-352.
- [15] Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 217-251.
- [16] Joncker NT, Raulet DH. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells [J]. *Immunol Rev*, 2008, 224: 85-97.
- [17] MacFarlane AWt 4th, Campbell KS. Signal transduction in natural killer cells [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 298: 23-57.
- [18] 赖艳丽, 曹祥山, 吴强, 等. 免疫球蛋白样抑制性受体 KIR 基因与 HLA-Cw 的匹配对 NK 细胞活性的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(3): 637-642.
- [19] Yu S, Sharp GC, Braley-Mullen H. Thyrocytes responding to INF-gamma are essential for development of lymphocytic spontaneous autoimmune thyroiditis and inhibition of thyrocyte hyperplasia [J]. *J Immunol*, 2006, 176(2): 1259-1265.
- [20] Nanba T, Watanabe M, Inoue N, *et al.* Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease [J]. *Thyroid*, 2009, 19(5): 495-501.

[收稿 2013-09-09]

(编辑 许四平)