

OAS2-751C/A 位点基因多态性与儿童 EV71 感染的关联性研究*

吕 华¹ 刘培培¹ 胡静飞² 李 菲¹ 郭 娅¹ 陈宗波^{1△}

(¹ 青岛大学附属医院, 青岛 266003; ² 青岛市妇女儿童医院, 青岛 266003)

摘要 目的 探讨 2'-5' 寡聚腺苷酸合成酶 2 基因 5' 端调控区 751C/A (OAS2-751C/A) 位点单核苷酸多态性与肠道病毒 71 型 (EV71) 易感性及其病情严重程度的关系。**方法** 选取 2014 年 6 月至 2015 年 9 月青岛大学附属医院及青岛市妇女儿童医院收治的 EV71 检测为阳性的患儿 215 例, 参照《手足口病诊疗指南 (第 2010 版)》的标准, 根据病情轻重分为轻症组 127 例, 重症组 88 例。同期收集无感染症状的健康体检儿童 174 例, 提取外周血 DNA, 利用多重高温连接酶检测反应 (iMLDR) 技术检测 OAS2-751C/A 位点基因多态性。利用 SPSS16.0 对结果进行统计学分析。**结果** OAS2-751C/A 位点基因型分布及等位基因频率在 EV71 感染组及对照组之间差异具有显著统计学意义 ($P < 0.05$), EV71 感染组 A 等位基因频率明显高于对照组 ($P < 0.05$); 轻症组与重症组之间基因型分布及等位基因分布频率无明显差异 ($P > 0.05$)。**结论** OAS2-751C/A 位点 A 等位基因可能与人体对 EV71 易感性相关, 与病情严重程度无关。A 等位基因可能是 EV71 感染的危险因素。

关键词 肠道病毒 71 型; 2'-5' 寡聚腺苷酸合成酶 2; 基因多态性

中图分类号: R725.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2016)04-094-04

Association of Genetic Polymorphism of OAS2-751C/A with the Susceptibility and Severity of Enterovirus-71 infection in Chinese children

LV Hua¹, LIU Peipei¹, HU Jingfei², LI Fei¹, GUO Ya¹, CHEN Zongbo^{1△}

(¹ The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003;

² Women and Children Hospital of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective The goal of this study was to explore the relationship of the genetic polymorphism of the OAS2-751 with the predisposition and the severity of the enterovirus 71 (EV71) infection in children. **Methods** 215 EV71-infected children were selected in this study whom were admitted in the Affiliated Hospital of Qingdao University and Women and Children hospital of Qingdao from 2014 June to 2015 September. 174 healthy children were also selected who received the physical examination in the hospitals at the same time. And the EV71-infected children were divided into 127 mild cases and 88 severe cases according to the Hand, Foot, and Mouth Disease diagnosis and treatment guidelines (2010). Then genomic DNA were extracted from white blood cells. Using an improved multiplex ligation detection reaction (iMLDR) technique the genotype for the C/A polymorphism at the-751 position of OAS2 gene of both groups was detected. The differences among groups were compared by SPSS16.0. **Results** The genotype distribution and allele frequency of the OAS2-751C/A between the EV71-infected group and healthy control group was significantly different ($P < 0.05$), and the A allele frequency of the EV71-infected group was significant higher than the control group ($P < 0.05$). However, there was no statistically difference in the distribution of the genotype and the allele frequency between the mild and the severe group ($P > 0.05$). **Conclusion** The A carrier of the OAS2-751C/A was found to be associated with the susceptibility of EV71, but not related to the severity of EV71-infection. And A allele could be the risk factor of EV71 infection in the Chinese children.

Keywords: Enterovirus 71; 2'-5' oligoadenylate synthetase 2; Polymorphism

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (311711212)

△ [通信作者] 陈宗波, E-mail: drchen001@126.com

肠道病毒 71 型 (EV71) 属于小 RNA 病毒科, 是儿童手足口病的主要病原体之一^[1]。自 1974 年 Schimidt 等^[2]首次报道以来, 已在全世界多个国家和地区爆发流行, 严重威胁儿童身体健康。儿童感染 EV71 后, 可引起手足口病 (hand, foot, and mouth disease, HFMD)、无菌性脑膜炎、脑干脑炎及神经源性肺水肿或肺出血, 甚至心肺衰竭^[3-4]。目前, 对于 EV71 致人体感染机制的研究中, 宿主遗传因素越来越受到重视, 有研究结果显示, IFN- γ 基因第 1 内含子区 +874T/A 位点基因多态性可以改变转录因子的结合位点, 影响 IFN- γ 的表达^[5], 而干扰素主要通过诱导产生抗病毒蛋白发挥作用。其中, 人 OAS 是干扰素诱导合成的抗病毒蛋白之一, 通过 OAS/RNase L 系统发挥抗病毒作用, 构成清除病毒的第一道防线^[6]。Barkhash 等^[7]研究发现在俄罗斯人群中 OAS2 基因的 3 个 SNPs 与感染蜚传播性脑炎病毒有关。而 OAS2-751C/A 位点单核苷酸多态性与儿童 EV71 感染的关联性尚未见报道。本文是通过检测 EV71 感染患儿 OAS2-751C/A 位点基因多态性, 以探讨该位点与 EV71 易感性及其严重程度的相关性。

1 资料与方法

1.1 资料

收集 2014 年 6 月至 2015 年 9 月在青岛大学附属医院、青岛市妇女儿童医院诊治的手足口病患儿 215 例, 其中男 112 例, 女 103 例, 年龄 (4.1 \pm 1.7) 岁。所有病例经 RT-PCR 定性法检测粪便 EV71 病毒核酸均为阳性, 且均符合以下标准: 1) 无任何遗传倾向性疾病; 2) 在取样当时均未诊断有神经系统疾病、心血管系统疾病、各种肿瘤及其他重大健康问题。根据中华人民共和国卫生和计划生育委员会制定的《手足口病诊疗指南 (第 2010 版)》的标准^[8], 按病情分轻症组 127 例, 重症组 88 例 (包括重型和危重型病例), 其中重症组符合以下标准: 1) 重型出现神经系统受累表现。如精神差、嗜睡、易惊、谵妄; 头痛、呕吐; 肢体抖动、肌阵挛、眼球震颤、共济失调、眼球运动障碍; 无力或急性弛缓性麻痹; 惊厥。体征可见脑膜刺激征, 腱反射减弱或消失。2) 危重型出现下列情况之一者, ①频繁抽搐、昏迷、脑疝; ②呼吸困难、紫绀、血性泡沫痰、肺部啰音等; ③休克等循环功能不全表现^[8]。同期选取临床无感染症状的健康体检儿童 174 例作

为对照组, 其中男 91 例, 女 83 例, 年龄 (4.2 \pm 1.5) 岁。血常规及生化指标检查均在正常范围内。感染组和对照组在性别、年龄等一般资料无差异, 具有可比性。本试验经青岛大学附属医院伦理委员会讨论通过, 所有标本采集均征得患儿监护人知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 入院时采集手足口病患儿急性期 (病程 3d 内) 静脉 EDTA 抗凝血 3ml, 血标本置于 -20 $^{\circ}$ C 下储存。同时记录患儿年龄、性别等资料。

1.2.2 标本基因组 DNA 制备 采用天根公司全血 DNA 提取试剂盒, 提取两组儿童 EDTA 抗凝血中基因组 DNA, 并将 DNA 提取物统一编码标注后, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.3 OAS2-751 位点基因多态性检测 采用改良的多重高温连接酶技术 (iMLDR) 检测 OAS2-751C/A 位点的基因多态性。OAS2-751C/A 位点基因扩增上游引物为 5'-AGAGGTTCCCACCCGCTGAC-3', 下游引物 5'-CTTAGAAGCAGGGGCGCA-CA-3'。多重 PCR 反应: 取 iMDLRTM 多重 SNP 分型试剂盒中的多重 PCR 引物混合物 1 μ l, 2XPCR Master mix 5 μ l 与 1 μ l 样本 DNA, 1 μ l 样本 DNA, 3 μ l dd H₂O 混匀, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 20s, 随之 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min30s, 重复 35 个循环, 之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min。在上述 PCR 产物中加入试剂盒中的 ExoI/SAP 酶 1 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1h, 75 $^{\circ}$ C 灭活 15min 纯化产物。将试剂盒中的 10 \times 连接缓冲液 2 μ l、高温连接酶 0.2 μ l、连接引物混合液 1 μ l 与纯化后多重 PCR 产物 3 μ l 以及 dd H₂O 3.8 μ l 混匀, 置于 94 $^{\circ}$ C 1min, 56 $^{\circ}$ C 4min, 重复 35 循环, 后保存在 4 $^{\circ}$ C 下。取 0.5 μ l 稀释后的连接产物, 与 0.5 μ l Liz500 Size Standard 荧光内标, 9 μ l Hi-Di 混匀, 95 $^{\circ}$ C 变性 5min 后上 ABI3130XL 测序仪。利用 ABI3130XL 测序仪, 收集原始数据并利用 GeneMapper 4.0 进行分析 (由上海天昊生物科技公司完成)。

1.3 统计学方法

根据 Hardy-Weinberg 平衡定律分别检测 OAS2-751C/A 位点基因型分布及等位基因频率是否具有群体代表性。采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 OAS2-751C/A 位点 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

EV71 感染组及对照组 OAS2-751C/A 位点基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 ($P > 0.05$), 研究对象具有群体代表性 (见表 1、表 2)。

表 1 EV71 感染组 OAS2-751C/A 位点基因型及基因频数 (n, %)

项目	n	基因型			等位基因	
		CC	CA	AA	C	A
实际频数	215	80(37.2)	112(52.1)	23(10.7)	272(63.3)	158(36.7)
H-W 理论频数		86(40)	100(46.5)	29(13.5)		
χ^2		3.13				
P		0.08				

表 2 对照组 OAS2-751C/A 位点基因型及基因频数 (n, %)

项目	n	基因型			等位基因	
		CC	CA	AA	C	A
实际频数	174	91(52.3)	65(37.4)	18(10.3)	247(71)	101(29)
H-W 理论频数		87.7(50.4)	71.7(41.2)	14.6(8.4)		
χ^2		1.51				
P		0.22				

2.2 各组 OAS2-751C/A 位点基因型分布比较

感染组与对照组之间该位点基因型分布差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 9.58, P < 0.05$)。而轻症组与重症组之间基因型分布无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组 OAS2-751C/A 位点基因型分布比较 (n, %)

组别	n	CC	CA	AA	χ^2	P
对照组	174	91(52.3)	65(37.4)	18(10.3)	9.58	0.008
感染组	215	80(37.2)	112(52.1)	23(10.7)		
轻症组	127	44(34.6)	69(54.4)	14(11.0)	0.88	0.645
重症组	88	36(40.9)	43(48.9)	9(10.2)		

2.3 各组 OAS2-751C/A 位点等位基因频率比较

感染组中 A 等位基因频率明显高于对照组 (36.7% vs 29%, $P < 0.05$); 轻症组与重症组比较等位基因分布频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 各组 OAS2-751 位点等位基因频率比较 (n, %)

组别	n	C	A	χ^2	P
对照组	348	247(71)	101(29)	5.17	0.023
感染组	430	272(63.3)	158(36.7)		
轻症组	254	157(61.8)	97(38.2)	0.557	0.455
重症组	176	115(65.3)	61(34.7)		

3 讨论

EV71 感染后临床表现及病情严重程度不尽相同^[2,4]。不同个体对 EV71 易感性不同, 感染 EV71 后病情严重程度也有明显差异, 这种差异除与病毒毒力及环境因素有关外, 宿主基因组因素导致自身免疫功能的改变发挥着至关重要的作用, 因此从宿主遗传因素探讨 EV71 感染的遗传易感机制越来越受到关注^[5]。

OAS 广泛存在于人体细胞中, 在静止细胞中处于低水平, 干扰素作用时被强烈诱导, 且在 dsRNA 存在下被激活, 被激活的 OAS 能够激活潜在 RNase L, 裂解细胞中的病毒或细胞中的单链 RNA, 参与机体免疫应答, 发挥抗病毒活性^[10]。OAS2 基因定位于人类 12 号染色体上, OAS 合成受遗传基因的控制, 个体间合成量存在明显差异, 可能是由细胞因子基因调节区及启动区基因的多态性导致的。OAS2 基因存在多个单核苷酸多态性位点, 而有研究表明, OAS2 的多个单核苷酸多态性位点与登革病毒的感染有关^[11]。本文结果显示 EV71 感染组及对照组基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 ($P > 0.05$), 且 EV71 感染组 OAS2-751C/A 位点 A 等位基因明显高于对照组, 而轻症组与重症组之间基因型分布及等位基因频率均无明显差异, 提示 OAS2-751C/A 位点与 EV71 感染的遗传易感性密切相关, 与病情严重程度无关, 即 OAS2-751C/A 位点 C→A 可能导致基因转录活性发生改变, OAS2 合成减少, 进而导致机体清除病毒能力降低, 对 EV71 易感性升高。

综上所述, OAS2-751C/A 位点 A 等位基因可能与人体对 EV71 易感性相关, 与病情严重程度无关, 携带 A 等位基因者对 EV71 的感染风险增高。但由于遗传、环境及病毒毒力等多种因素共同作用机体, 影响 EV71 感染及病情的严重程度, 因此要确切了解 OAS2 基因多态性与 EV71 感染的相关性, 尚需进一步扩大样本量, 多地区、多种族共同研究。
(下转第 100 页)

致腕关节功能恢复较差,所以结果提示在客观疗效评价上手术治疗优于保守治疗,而保守治疗存在创伤小、花费较低等优势;综上所述,应根据患者年龄、身体条件以及对腕关节功能的期望值等综合因素进行治疗方式的选择。

参考文献:

[1] Hand D P, Jones M D, Trumble T E. Treatment of complex fracture, wrist fractures [J]. Orthop Clinics North Am, 2002, 33: 35.

[2] 姜保国. 桡骨远端骨折的治疗[J]. 中华创伤骨科杂志, 2006, 8 (3): 236-239. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-7600. 2006. 03. 010.

[3] 王志永. 应用外固定架治疗桡骨远端粉碎性骨折[J]. 内蒙古医学杂志, 2009, 41 (7): 861-862. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-0951. 2009. 07. 041.

[4] Keast-Buder O, Scherrfisch E H. Biology versus mechanics in the treatment of distal radial fractures [J]. J Orthop Trauma, 2008, 22: 91-95. DOI : 10. 1097/BOT. 0b013e3181839655.

[5] Liporace F A, Gupta S, Jeong G K, et al. A biomechanical comparison of a dorsal 3. 5-mm T-plate and a volar fixed-angle plate in a model of dorsally unstable distal radius fractures [J]. J Orthop Trauma, 2005, 19 (3): 187-191.

[6] Arora R, Lutz M, Hennerbichler A, et al. Complications following internal fixation of unstable distal radius fracture with a palmar locking-plate [J]. J Orthop Trauma, 2007, 21 (5): 316-322. DOI: 10. 1097/BOT. 0b013e318059b993.

[7] 吴洪, 陈耀伟. 锁定加压钢板治疗老年人桡骨远端骨折 32 例临床分析 [J]. 岭南急诊医学杂志, 2007, 12 (3): 193-194.

[8] 魏宏坡. 不同固定方式治疗老年桡骨远端骨折 [J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29 (4): 686-687. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-4813. 2013. 04. 071.

[9] Barrie K A, Wolfe S W. Internal fixation for intraarticular distal radius fractures [J]. Tech Hand Up Extrem Surg, 2002, 60: 10.

(收稿日期 2016-02-09)

(上接第 96 页)

参考文献:

[1] Zhang Q, Noni E, Jennifer C, et al. Severe enterovirus type 71 nervous system infections in children in the shanghai region of china: clinical manifestations and implications for prevention and care [J]. Pediatr Infect Dis J, 2014, 33 (5): 482 - 487. DOI: 10. 1097/INF. 000000000000194.

[2] Schmidt N J, Lennette E H, Ho H H. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system [J]. J Infect Dis, 1974, 129 (3): 304 - 309.

[3] 许红梅, 赖方方. 肠道病毒 71 型对神经系统和免疫功能的影响及疫苗研究进展 [J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27 (22): 1701-1704. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-515X. 2012. 22. 002.

[4] 付丹, 李成荣, 何颜霞, 等. 肠道病毒 71 型感染患儿免疫功能探讨 [J]. 中华儿科杂志, 2009, 47 (11): 829-834. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0578-1310. 2009. 11. 008.

[5] 赵娜, 陈宗波, 钱娜, 等. IFN- γ + 874 位点单核苷酸多态性和蛋白表达水平与肠道病毒 71 感染关系 [J]. 齐鲁医学杂志, 2010, 25 (4): 315-317, 320. DOI: 10. 3969/j. issn. 1008-0341. 2010. 04. 012.

[6] Justesen J, Hartmann R, Kieldgaard N O. Geme structure

and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family [J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57 (11): 1593-1612.

[7] Barkhash A V, Perelygin A A, Babenko V N, et al. Variability in the 2'-5'-Oligoadenylate synthetase gene cluster is associated with human predisposition to Tick-Borne encephalitis Virus-Induced disease [J]. Journal of Infectious Diseases, 2010, 202 (12): 1813-1818. DOI: 10. 1086/657418.

[8] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 手足口病诊疗指南 (2010) (EB/OL). <http://www. moh. gov. cn/ publicfiles/ business/ htmlfiles/ mohyzs/s 3586/ 201 004/46884. htm>, 2010-04-20.

[9] 俞蕙. 儿童手足口病重症病例的临床早期识别 [J]. 中华儿科杂志, 2012, 50 (4): 284-285. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0578-1310. 2012. 04. 011.

[10] Malathi K, Paranjape J M, Bulanova E, et al. A transcriptional signaling pathway in the IFN system mediated by 2'-5'-oligoadenylate activation of RNase L [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102 (41): 14533-14538.

[11] Ramanathan T, Paluru V. Association of dengue virus infection susceptibility with polymorphisms of 2'-5'-oligoadenylate synthetase genes: a case-control study [J]. Braz J Infect Dis, 2014, 18 (5): 548-550. DOI: 10. 1016/j. bjid. 2014. 03. 004.

(收稿日期 2016-01-20)