

论著·临床研究

肠道病毒71型感染手足口病S100B基因多态性研究

李晶 单若冰 刘瑞海 徐迎军 曲妮燕 潘桂梅
张娜 杨娜 陈真真 张文祥 李自普

(青岛大学附属青岛市妇女儿童医院重症医学中心 PICU, 山东 青岛 266000)

[摘要] **目的** 研究S100B基因rs9722位点基因多态性与肠道病毒71型(EV71)感染手足口病(HFMD)的相关性。**方法** 以124例EV71感染HFMD患儿为研究对象,56例健康儿童作为对照组,两组均进行S100B基因rs9722位点基因多态性检测;并且74例HFMD患儿进行血清S100B蛋白检测。**结果** S100B基因rs9722位点检出3种基因型:CC型、CT型和TT型,基因型频率分布符合Hardy-Weinberg平衡。与对照组比较, HFMD组患儿S100B基因rs9722位点TT基因型频率和T等位基因频率明显增高($P<0.01$)。重症EV71感染相关HFMD患儿TT基因型频率和T等位基因频率均明显高于普通型患儿($P<0.05$)。与痊愈组比较, HFMD不良预后组的S100B基因rs9722位点TT基因型频率和T等位基因频率明显增高($P<0.05$)。74例HFMD患儿各基因型的血清S100B蛋白水平以TT基因型最高,CC型最低($P<0.01$)。**结论** S100B基因rs9722位点T等位基因可能是EV71感染HFMD发展为重症的危险因素。 [中国当代儿科杂志, 2017, 19(8): 904-907]

[关键词] 肠道病毒71型;手足口病;S100B蛋白;基因多态性;儿童

Association between S100B gene polymorphisms and hand, foot and mouth disease caused by enterovirus 71 infection

LI Jing, SHAN Ruo-Bing, LIU Rui-Hai, XU Ying-Jun, QU Ni-Yan, PAN Gui-Mei, ZHANG Na, YANG Na, CHEN Zhen-Zhen, ZHANG Wen-Xiang, LI Zi-Pu. Department of Pediatric Intensive Care Unit, Critical Care Medicine Center, Women and Children's Hospital, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266000, China (Email: lisang1976@aliyun.com)

Abstract: Objective To investigate the association between rs9722 polymorphisms in the S100B gene and hand, foot and mouth disease (HFMD) caused by enterovirus 71. **Methods** A total of 124 HFMD children with enterovirus 71 infection were enrolled as subjects, and 56 healthy children were enrolled as control group. The rs9722 polymorphisms in the S100B gene were detected for both groups, and the serum level of S100B protein was measured for 74 HFMD children. **Results** The rs9722 locus of the S100B gene had three genotypes, CC, CT, and TT, and the genotype frequencies were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. Compared with the control group, the HFMD group had significant increases in the frequencies of TT genotype and T allele ($P<0.01$). Children with severe HFMD caused by enterovirus 71 infection had significantly higher frequencies of TT genotype and T allele than those with moderate or mild HFMD ($P<0.05$). Compared with the cured patients, the patients with poor prognosis had significant increases in the frequencies of TT genotype and T allele in the rs9722 locus of the S100B gene ($P<0.05$). Among the 74 children with HFMD, the children with TT genotype had the highest serum level of S100B protein, and those with CC genotype had the lowest level ($P<0.01$). **Conclusions** T allele in the rs9722 locus of the S100B gene might be a risk factor for severe HFMD caused by enterovirus 71 infection. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(8): 904-907]

Key words: Enterovirus 71; Hand, foot and mouth disease; S100B protein; Gene polymorphism; Child

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)是由柯萨奇病毒A组16型(CoxA16)、

肠道病毒71型(enterovirus71, EV71)等肠道病毒引起的急性传染病,大多数为自限性、预后良好;

[收稿日期] 2017-02-26; [接受日期] 2017-06-06

[作者简介] 李晶,女,博士,副主任医师。

[通信作者] 李自普,男,主任医师。

少数出现脑炎、脑脊髓炎、肺水肿、循环障碍的HFMD多为EV71感染,致死原因主要为脑干脑炎及神经源性肺水肿^[1],但具体机制尚未完全阐明。S100B是一种酸性钙结合蛋白,与中枢神经系统感染、癫痫、急性缺血性脑卒中等多种中枢神经系统疾病的发生发展密切相关^[2-4]。而且S100B基因多态性与许多中枢神经系统疾病的易感性、疾病进展及预后明显相关^[5-6]。但S100B基因多态性与EV71感染所致HFMD的相关性未见报道。本研究检测健康儿童和EV71感染HFMD患儿S100B基因rs9722位点基因多态性及表达水平,探讨S100B基因多态性在发病机制中的作用及意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2011年10月至2015年9月期间青岛市妇女儿童医院诊断并治疗的EV71感染(咽拭子或大便标本EV71荧光定量RT-PCR检测阳性)所致的HFMD患儿124例作为研究对象,既往无癫痫、脑瘫或运动、精神发育落后等;选取同期健康体检儿童56例作为对照组,其中男30例、女26例,年龄 25 ± 10 个月。124例HFMD患儿中男75例、女49例,年龄 22 ± 11 个月,其中80例为普通HFMD、44例为重症HFMD。对照组与HFMD患儿性别构成比($\chi^2=0.036, P=0.85$)及年龄的差异($t=1.31, P=0.19$)无统计学意义。HFMD诊断及分型符合手足口病诊疗指南(2010年版)^[1]。疗效判断参照文献^[7],124例中118例痊愈,预后不良6例:包括住院过程中死亡、放弃治疗后死亡以及3个月内仍有严重神经系统后遗症的患儿。本研究获得医院伦理委员会批准及受试者家属知情同意。

1.2 S100B基因rs9722位点基因多态性检测

选取位于S100B基因的第三个外显子单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)rs9722位点测序,用Premier Primer 5.0软件设计引物(北京六合华大基因科技有限公司合成),序列如下:S100B-F GCATTGTGGAAAGGCACG, S100B-RAAAGAGCAGGAGGTTGTGGAC,扩增产物长度为147 bp。

入院后立即采集静脉血2 mL(EDTA抗凝), -20°C 储存。提取基因组DNA,测定DNA

浓度后 -20°C 冰箱保存。PCR反应体系为dNTP 2.0 μL , $10 \times$ rTaq buffer 3 μL , Forward Primer 1.0 μL , Reverse Primer 1.0 μL , 模板DNA 2.0 μL , rTaq 0.2 μL , ddH₂O 20.8 μL ,总体积30.0 μL 。PCR反应条件为预变性 95°C 5 min,变性 95°C 30 s,退火 56°C 45 s,延伸 72°C 1 min,37个循环;终末延伸: 72°C 10 min, 12°C forever。PCR产物纯化、测序,反应体系为DNA 2.0 μL , Primer 1.0 μL , Bigdye 2.0 μL , DMSO 1.0 μL ,总体积6.0 μL ;测序反应条件为 95°C 2 min, 95°C 30 sec, 55°C 30 s, 60°C 90 s,共30个循环; 12°C forever。由华大基因提供测序服务。

1.3 ELISA法检测血清S100B

74例患儿入院第1天采集外周静脉血3 mL,室温静置30 min,离心3000 rpm \times 15 min,收集血清, -20°C 保存待测。血清S100B检测按照试剂盒(上海恒远生物科技有限公司)说明书进行。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据处理。采用基因计数法计算基因频率,基因型频率和等位基因频率,组间比较用 χ^2 检验。研究对象与Hardy-Weinberg平衡的符合程度用 χ^2 检验或Fisher确切概率检验。正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 S100B基因rs9722位点基因测序结果

S100B基因rs9722位点测序结果(图1)与Genebank中检索出的人S100B DNA序列一致,检出3种基因型:CC型(GTAACAGAGA[C/C]GGTCATGCAA)、CT型(GTAACAGAGA[C/T]GGTCATGCAA)和TT型(GTAACAGAGA[T/T]GGTCATGCAA)。S100B基因rs9722位点基因型频率分布符合Hardy-Weinberg平衡($\chi^2 < 3.84, P > 0.05$),表示资料代表性好。

2.2 EV71感染所致HFMD患儿的S100B基因rs9722位点多态性

与对照组比较, HFMD组S100B基因rs9722位点TT基因型频率和T等位基因频率均明显增高,

见表1。重症 HFMD 患儿的 TT 基因型频率和 T 等位基因频率明显高于普通型患儿，见表2。

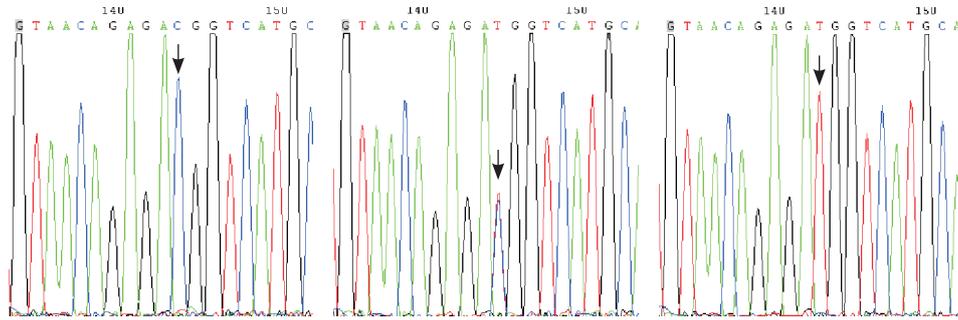


图1 S100B 基因 rs9722 位点 PCR 产物测序结果 左图为 CC 基因型，中图为 CT 基因型，右图 TT 基因型。突变位点如箭头所示。

表1 对照组与 HFMD 组 S100B 基因 rs9722 位点多态性分布 [例(%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
对照组	56	17(30)	29(52)	10(18)	63(56)	49(44)
手足口病组	124	14(11)	60(48)	50(40)	88(36)	160(64)
χ^2 值			14.06			13.66
P 值			<0.001			<0.001

表2 普通 HFMD 与重症 HFMD 患儿 S100B 基因 rs9722 位点多态性分布 [例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
普通型	80	9(11)	46(58)	25(31)	64(40)	96(60)
重症	44	5(11)	14(32)	25(57)	24(27)	64(73)
χ^2 值			17.01			16.84
P 值			<0.001			<0.001

2.3 不同预后 HFMD 患儿的 S100B 基因 rs9722 位点基因型及等位基因类型

与痊愈组比较，HFMD 不良预后组患儿 S100B 基因 rs9722 位点 TT 基因型频率和 T 等位基因频率均明显增高 ($P < 0.05$)，见表3。

表3 手足口病患儿不同预后组 S100B 基因 rs9722 位点多态性分布 [例(%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		CC	CT	TT	C	T
痊愈组	118	14(11.9)	60(50.8)	44(37.3)	88(37.3)	148(62.7)
不良预后组	6	0(0)	0(0)	6(100)	0(0)	12(100)
P 值*			0.009			0.01

注：*示 Fisher 确切概率检验。

2.4 EV71 感染 HFMD 患儿 S100B 基因 rs9722 位点各基因型血清 S100B 蛋白水平比较

74 例初发 HFMD 患儿各基因型的血清 S100B 蛋白水平差异有统计学意义，以 TT 基因型最高，CC 型最低，见表4。

表4 手足口病患儿 S100B 基因 rs9722 位点各基因型血清 S100B 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

基因型	例数	S100B 蛋白
TT	28	0.8 ± 0.2
CT	32	0.6 ± 0.2
CC	12	0.4 ± 0.1
F 值		24.91
P 值		<0.001

3 讨论

S100B 属于 S100 家族的一员，分子量小，活性最强，基因定位于 21 号常染色体长臂 2 区 2 带，含有 3 个外显子和 2 个内含子。S100B 蛋白是星形胶质细胞释放的神经营养因子，但高浓度有神经毒性作用，可通过刺激致炎因子表达导致细胞凋亡，并通过一氧化氮依赖途径诱导神经元细胞死亡，其过量表达与急性脑损伤有直接关系^[8-11]。与一些脑损伤常用标志物如脑型肌酸激酶、髓鞘碱性蛋白、神经元烯醇化酶等比较，S100B 蛋白被认为是最能反映脑损伤程度及预后的标志物^[12-13]。

EV71 属无包膜小 RNA 病毒，具有高度嗜神经性，最易侵犯脑干，导致循环不稳定及神经源性肺水肿。张乐海等^[14]研究发现，合并脑炎与未

合并脑炎的手足口病患儿 EV71 VP1 区基因型的差异无统计学意义,提示 HFMD 病情与个体差异有关。Zou 等^[15] 研究显示, I 型干扰素受体启动子 (IFNAR1) rs2843710 位点基因多态性与 EV71 感染 HFMD 的易感性和严重程度相关。Li 等^[16] 研究显示, 白介素 -4 -589C/T 基因多态性是汉族儿童 EV71 感染性疾病进展的重要原因。而最能反映脑损伤程度及预后的 S100B 蛋白, 其基因多态性是否与 EV71 感染 HFMD 发生发展有关, 尚未见报道。

本研究发现, EV71 感染 HFMD 患儿 S100B 基因 rs9722 位点 TT 基因型频率和 T 等位基因频率均明显高于对照组, 提示 T 等位基因可能是 EV71 感染所致 HFMD 的高危宿主因素。而且, 重症患儿 TT 基因型频率和 T 等位基因频率均高于普通患儿; 与痊愈组比较, HFMD 不良预后组患儿的 S100B 基因 rs9722 位点 TT 基因型频率和 T 等位基因频率也增高, 提示 TT 基因型感染 EV71 更易发展为重症 HFMD, 有临床预警意义。74 例初发 HFMD 患儿各基因型的血清 S100B 蛋白水平以 TT 基因型最高, CC 型最低, 提示 S100B 基因 rs9722 位点 TT 基因型转录水平较高。

综上所述, 本研究从基因水平揭示了 S100B 基因多态性对 EV71 感染 HFMD 的发生发展及预后的作用, 也表明 CT 和 TT 基因型可影响 EV71 感染 HFMD 患儿 S100B 水平, 为进一步明确 HFMD 发病机制提供了线索, 为其治疗提供了新的靶点。但同时本研究也存在一定的局限性, 如样本量较小, 以及性别、环境、病情等因素未进一步分层, 这也是今后继续研究的方向。

[参 考 文 献]

[1] 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南 (2010 年版) [J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30(24): 1473-1475.
[2] 孙晓峰, 杨郁野, 张宏义, 等. 开颅术后颅内感染患者脑脊液与血清 S-100B 蛋白含量的变化意义 [J]. 中华医院感染学

杂志, 2016, 26(6): 1345-1347.
[3] 王晶, 殷亮, 吕涌涛, 等. S100B 在癫痫患者脑脊液和血清中的表达 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32(20): 3422-3424.
[4] 王百灵, 陈玉平, 孔伶俐, 等. 血清 S-100B 蛋白水平与前循环进展性卒中关系的研究 [J]. 中国老年保健医学, 2016, 14(3): 14-16.
[5] Zhai J, Cheng L, Dong J, et al. S100B gene polymorphisms predict prefrontal spatial function in both schizophrenia patients and healthy individuals [J]. Schizophr Res, 2012, 134(1): 89-94.
[6] 杨坤, 谢光荣, 胡义秋, 等. S100B 基因 rs9722 多态性与抑郁症的关联分析 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(5): 305-307.
[7] 安妍, 聂莹雪, 赵传胜. 107 例病毒性脑炎患者近期预后相关因素分析 [J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(11): 1014-1017.
[8] Staffa K, Ondruschka B, Franke H, et al. Cerebellar gene expression following human traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2012, 29(17): 2716-2721.
[9] Lo TY, Jones PA, Minns RA. Pediatric brain trauma outcome prediction using paired serum levels of inflammatory mediators and brain-specific proteins [J]. J Neurotrauma, 2009, 26(9): 1479-1487.
[10] 王鹏高, 施新革, 赵文增. S100 蛋白与体外循环脑损伤 [J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(4): 426-428.
[11] 刘希尧, 张建生, 丁永忠, 等. 广泛脑挫裂伤早期脑脊液 S100B 蛋白、IL-1 β 动态变化的实验研究 [J]. 中国急救医学, 2006, 26(5): 329-331.
[12] Laribi S, Kansao J, Borderie D, et al. S100B blood level measurement to exclude cerebral lesions after minor head injury: the multicenter STIC-S100 French study [J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 6(8): 1-10.
[13] White M, Foulis AK, Smith G, et al. The role of S100 staining in the pathological assessment of perineural invasion in rectal cancer [J]. Colorectal Dis, 2013, 11(3): 278-286.
[14] 张乐海, 马丽霞, 王世富. 山东省部分地区脑炎与非脑炎手足口病肠道病毒 71 型 VP1 区基因特征 [J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(8): 567-571.
[15] Zou R, Zhang G, Li S, et al. A functional polymorphism in IFNAR1 gene is associated with susceptibility and severity of HFMD with EV71 infection [J]. Sci Rep, 2015, 5: 18541.
[16] Li F, Liu XP, Li JA, et al. Correlation of an interleukin-4 gene polymorphism with susceptibility to severe enterovirus 71 infection in Chinese children [J]. Arch Virol, 2015, 160(4): 1035-1042.

(本文编辑: 俞燕)