

mxA 基因多态性与 SARS 病毒易感性的病例对照研究

王宏伟 何静 张泮河 汤芳 王天宝 栾一禾 吕辉
曹朝阳 吴晓明 赵秋敏 刘玮 曹务春

【摘要】 目的 探讨黏病毒抗性蛋白 1(MxA)基因多态性与人群严重急性呼吸综合征(SARS)发病间的关系。方法 采用病例对照研究,用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析检测 *mxA* 基因启动子-88 位 G/T 多态性位点,对 SARS 传播的相关因素进行问卷调查,并用 SPSS 软件进行单因素和多因素分析。结果 选取了 66 例 SARS 病例和 64 名对照进行研究。与 GG 基因型相比,含等位基因 T 的基因型(GT+TT)在病例中的构成比(81.3%)显著高于对照组(62.5%),OR 值(95% CI)为 2.700(1.208~6.037)。多因素 logistic 回归分析结果表明,在调整了与 SARS 病例接触时戴口罩,穿防护服,戴眼罩等相关因素后,与 GG 基因型相比,含等位基因 T 的基因型(GT+TT)仍与 SARS 发病有显著性关联,调整 OR 值(95% CI)为 2.911(1.027~8.250)。结论 *mxA* 基因启动子-88 位 G/T 多态性可能与中国汉族人群 SARS 发病的基因易感性有关。

【关键词】 严重急性呼吸综合征; *mxA* 基因; 病例对照研究

A case-control study on the *mxA* polymorphisms and susceptibility to severe acute respiratory syndromes virus WANG Hong-wei*, HE Jing, ZHANG Pan-he, TANG Fang, WANG Tian-bao, LUAN Yi-he, LV Hui, CAO Zhao-yang, WU Xiao-ming, ZHAO Qiu-min, LIU Wei, CAO Wu-chun. *Epidemiological Department of Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Corresponding author: CAO Wu-chun, Email: caowc@nic.bmi.cn

【Abstract】 Objective To investigate the association between the genetic polymorphisms of myxovirus resistance 1 (MxA) gene and susceptibility to severe acute respiratory syndromes (SARS). **Methods** A case-control study was conducted and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the T/G polymorphism at position-88 in the *mxA* gene promoter. Information on related factors of SARS was collected using a pre-testing questionnaire. Univariate and multivariate logistic analyses were conducted with SPSS software package. **Results** Sixty-six cases and sixty-four controls were selected for the study. Comparing with GG genotype, the proportion of GT genotype were significantly higher in the case group (81.3%) than that in the control group (62.5%) with an OR (95% CI) of 2.700 (1.208-6.037). Multivariate logistic regression analysis revealed that the significant association remained after factors as wearing masks, protection gowns and eye-protection when contacting with SARS patient etc. were adjusted with an OR (95% CI) of 2.911 (1.027-8.250). **Conclusion** *mxA* promoter-88G/T SNP might be conferred to host genetic susceptibility to SARS in Chinese Han population.

【Key words】 Severe acute respiratory syndromes; *mxA* gene; Case-control study

黏病毒抗性蛋白 1 (myxovirus resistance 1,

MxA)基因位于于人 21 号染色体长臂上,经 IFN α / β 处理可诱导产生 78 kd 的 MxA 蛋白,分布于细胞的胞浆内,这种胞浆蛋白可直接发挥对多种病毒的抗病毒效应。国外大量的研究资料表明,MxA 蛋白主要对 RNA 病毒敏感^[1-3]。Torisu 等^[4]在日本人群中的病例对照研究中发现,*mxA* 基因启动子-88 位 TT 基因型和 T 等位基因在由麻疹病毒引起的亚急性硬化性全脑炎(SSPE)病例中的频率显著高于对照

基金项目:国家重点发展计划“863”计划资助项目(2003AA208406,2003AA208412C);欧盟 EPISARS 基金资助项目(511063);美国 NIH CIPRA 基金资助项目(NIH U19 AI51915)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所(王宏伟、何静、张泮河、汤芳、吴晓明、赵秋敏、刘玮、曹务春);北京武警总队医院(王天宝、栾一禾、吕辉、曹朝阳)

通讯作者:曹务春,Email:caowc@nic.bmi.cn

组。本研究也选取这一多态性位点,探索其与严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒易感性的关系。

对象与方法

1. 研究对象的选择:

(1) 病例组:选取在北京某医院住院的汉族 SARS 病例,全部病例均为医务人员,并经临床确诊,符合国家卫生部 2003 年 4 月 14 日颁布的 SARS 诊断标准(试行)中的临床诊断标准^[5],并经实验室检测血清抗 SARS 病毒抗体 IgG 阳性。

(2) 对照组:从该医院工作人员中选取汉族正常人作为对照,全部对照均有明确的 SARS 病例接触史,经检测 SARS 病毒抗体 IgG 均为阴性。病例与对照组之间均无血缘关系。

2. 方法:

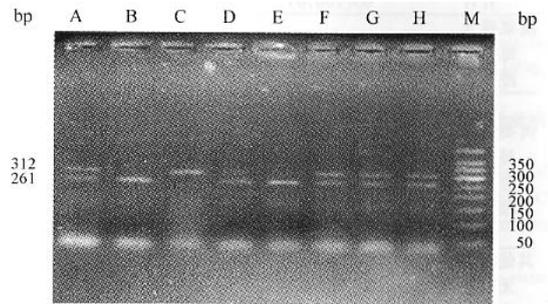
(1) 问卷调查:设计调查问卷,内容包括一般情况(年龄、性别等)、有关的环境因素(吸烟饮酒状况、营养状况、其他疾病、手术史等)以及与 SARS 患者接触时的相关因素(戴口罩、穿防护服、戴眼罩),对所有研究对象进行现场问卷询问和填写。同时抽取 5 ml 血标本用柠檬酸钠抗凝管常温保存,并在 24 h 内提取白细胞。

(2) 基因组 DNA 的提取:用淋巴细胞分离液从抗凝血中分离白细胞,使用博大公司的全血基因组快速提取试剂盒提取白细胞中的基因组 DNA 用于扩增。

(3) 聚合酶链反应(PCR):参照文献[6]合成以下引物: MxA1: TGAAGACCCCAATTACCAA; MxA2: CTCTCGTTCGCCTCTTTCAC; PCR 产物大小为 351 bp。PCR 反应体系为: 100 ng 模板 DNA, 2.0 mmol/L MgCl₂, 1 U Taq DNA 聚合酶, 上游引物与下游引物各 0.5 μmol/L, 总反应体积为 50 μl。在 2700 PCR 仪上进行扩增, 循环条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环。在 2% 琼脂糖凝胶电泳, 以 50 bp Marker 为标准分子量对照, 鉴定 PCR 扩增产物; 选取三种基因型各一个样品进行克隆测序, 确证扩增片段是正确的。

(4) 基因多态性分析:用博大公司的玻璃奶纯化试剂盒回收 PCR 产物,用于酶切。酶切体系为:纯化产物约 200 ng, Hha I 酶(Biolabs 公司产品) 10 U, 反应体系为 20 μl, 37℃ 温育 1-2 h。将酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳 80 V 电压分离酶切片段。

0.5 μg/ml 溴化乙锭染色后,在紫外灯下观察。酶切结果显示, MxA 中 -88 位 G/T 多态性位点处如果是 G, 就能构成 Hha I 的识别位点, 同时该 PCR 产物还存在另外两个 Hha I 的识别位点, 所以被酶切得到 261、51、23 及 16 bp 4 个片段(等位基因型 GG); 多态性位点是 T, 只得到 312、23 及 16 bp 3 个片段(等位基因型 TT)。从而产生三种基因型, GG(261、51、23 及 16 bp 共 4 个片段), GT(312、261、51、23 及 16 bp 共 5 个片段), TT(312、23 及 16 bp 共 3 个片段)。如图 1 所示, 由于 51、23 及 16 bp 片段较小, 在 2% 琼脂糖凝胶电泳并不能显示出来, 所以只能观察到 312、261 bp 两个片段, 但并不妨碍判断结果。



M: 50 bp Marker; A、D、F、G、H: GT 型; B、E: GG 型; C: TT 型
图 1 *mxA* 基因 PCR-RFLP 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳

(5) 统计学分析:将资料录入计算机进行整理, 首先进行病例对照一般情况的均衡性比较, 然后对各环境因素及 *mxA* 基因多态性与 SARS 发病的关系分别进行单因素分析。为控制可能的混杂因素的影响, 将是否发病作为因变量, *mxA* 基因型别及单因素分析中有显著意义的环境因素作为自变量, 进行多因素非条件 logistic 回归分析, 计算调整 OR 值及 95% CI。以上所有统计过程均由 SPSS 10.0 软件完成, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况比较:按照病例组与对照组的纳入标准共调查 66 例患者, 平均年龄 28.37 岁。对照 64 名, 平均年龄 29.59 岁。经 χ^2 检验, 两组在性别、年龄中的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明病例与对照两组具有良好的可比性。

2. 对各环境因素进行单因素分析:单因素分析结果表明, 吸烟饮酒情况、蔬菜摄入、肉类摄入、其他疾病、手术史等因素在两组中的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而与 SARS 患者接触时戴口罩、穿

防护服、戴眼罩情况在病例组和对照组中的分布差异均有统计学意义($P < 0.05$),从不戴口罩、从不穿防护服、从不戴眼罩为 SARS 发病的危险因素(表 1)。

表1 各环境因素与 SARS 关系的单因素分析结果

变量	病例组 (%)	对照组 (%)	P 值
吸烟情况			0.380
否	7(10.6)	10(15.9)	
是	59(89.4)	53(84.1)	
合计	63(100.0)	63(100.0)	
饮酒情况			0.914
从不	35(53.8)	33(53.2)	
偶尔	26(40.0)	24(38.7)	
经常	4(6.2)	5(8.1)	
合计	65(100.0)	62(100.0)	
蔬菜摄入			0.771
每天有	39(60.0)	40(62.5)	
经常有	26(40.0)	24(37.5)	
合计	65(100.0)	64(100.0)	
肉类摄入			0.616
每天有	34(51.5)	34(53.1)	
经常有	29(43.9)	29(45.3)	
很少有	3(4.6)	1(1.6)	
合计	66(100.0)	64(100.0)	
其他疾病			0.563
无	57(89.1)	58(92.1)	
有	7(10.9)	5(7.9)	
合计	64(100.0)	63(100.0)	
手术史			0.092
无	59(92.2)	60(98.4)	
有	5(7.8)	1(1.6)	
合计	64(100.0)	61(100.0)	
接触时戴口罩			0.003
总是	38(57.6)	54(84.4)	
偶尔	12(18.2)	6(9.3)	
从不	16(24.2)	4(6.3)	
合计	66(100.0)	64(100.0)	
接触时穿防护服			<0.001
总是	21(31.8)	50(78.1)	
偶尔	2(3.0)	2(3.1)	
从不	43(65.2)	12(18.8)	
合计	66(100.0)	64(100.0)	
接触时戴眼罩			<0.001
总是	18(27.3)	52(81.3)	
偶尔	7(10.6)	5(7.8)	
从不	41(62.1)	7(10.9)	
合计	66(100.0)	64(100.0)	

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比

3. *mxA* 基因多态性与 SARS 关系的单因素分析:由表 2 可见,含 T 等位基因的基因型(GT+TT)在病例组中的构成比(81.3%)显著高于对照组(62.5%)。

4. 多因素非条件 logistic 回归分析:以是否发病作为因变量,*mxA* 基因型及与 SARS 患者接触时戴口罩、穿防护服和戴眼罩为协变量,进行多因素

logistic 回归分析,结果显示调整了三个因素后,含 T 等位基因的基因型(GT+TT)仍与 SARS 发病相关,调整 OR 值及 95% CI 为 2.911(1.027~8.250)(表 3)。

表2 *mxA* 基因多态性与 SARS 关系的单因素分析结果

基因型	病例组 (%)	对照组 (%)	OR 值(95% CI)	P 值
GG	13(19.7)	24(37.5)	1.000	
GT+TT	54(81.3)	40(62.5)	2.700(1.208~6.037)	0.016

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比

表3 *mxA* 基因多态性与 SARS 的多因素非条件 logistic 回归分析结果

变 量	OR 值(95% CI)	P 值
戴口罩		
总是	1.000	
偶尔	1.422(0.382~5.387)	0.600
从不	4.531(1.133~18.126)	0.033
穿防护服		
总是	1.000	
偶尔	0.960(0.089~10.334)	0.973
从不	1.628(0.445~5.964)	0.462
戴眼罩		
总是	1.000	
偶尔	3.339(0.742~15.023)	0.116
从不	10.349(2.560~41.833)	0.001
基因型		
GG	1.000	
GT+TT	2.911(1.027~8.250)	0.044

讨 论

国外有许多关于 MxA 蛋白的报道,但其抗病毒机制还有待进一步研究。目前认为,MxA 蛋白具有 GTP 水解酶活性,能识别病毒新合成的核糖核蛋白复合物(rRNPs),与其 NP 紧密结合,通过 GTP 酶构型改变而使 MxA 活化,发挥对病毒核衣壳的水解作用,因而可阻止上述病毒核衣壳转运至细胞核内,以达到阻止病毒基因组在核内复制的目的^[7,9]。此外,MxA 也能抑制 RNA 病毒在胞浆内的早期转录,进而抑制病毒的复制和蛋白质合成^[9,10]。

本研究在对研究对象进行的调查问卷中除了包括性别、年龄、吸烟饮酒情况、营养状况、其他疾病等以外,还包括与 SARS 病例接触时的各相关因素。结果表明,与 SARS 病例接触时戴口罩、穿防护服、戴眼罩均可能为保护性因素,这与有关的报道是一致的^[11]。经多因素 logistic 回归分析发现,含 T 等位基因的基因型(GG+GT)与 SARS 发病有显著性关联,OR 值为 2.911,提示含 T 基因型(GT+TT)感染 SARS 的相对危险性是不含 T 基因型(GG)的 2.911 倍。结果提示 *mxA* 基因启动子-88 位 T 等位基因可能是 SARS 发病的易感基因。

Jikata 等^[12]在体外研究中通过荧光报告基因实验发现, *mxA* 基因启动子-88 位 T 等位基因可促进 MxA 蛋白表达。而高水平的 MxA 蛋白会抑制麻疹病毒的转录和蛋白表达, 同时阻止机体免疫系统对麻疹病毒感染细胞的清除, 从而使病毒在细胞内持续存在^[13]。这说明含有 *mxA* 基因启动子-88 位 T 等位基因的人群在感染麻疹病毒时可能会因为体内 MxA 蛋白的高表达而使麻疹病毒难以被清除, 因而其患相关疾病如 SSPE 的可能性要高于不含 T 等位基因的人群。Torisu 等^[4]的实验结果证实了这一结论。本研究的结果表明 *mxA* 基因启动子-88 位 T 等位基因可能也是 SARS 发病的易感基因, 这提示 MxA 蛋白可能参与了 SARS 冠状病毒的感染和致病过程, 其具体的机制尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Schwemmler M, Weining KC, Richter MF, et al. Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein. *J Virol*, 1995, 69: 545-554.
- 2 Landis H, Simom Jodicke A, Kloti A, et al. Human MxA protein confers resistance to semliki forest virus and inhibits the amplification of a semliki forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J Virol*, 1998, 72: 1516-1522.
- 3 Heftri HP, Frese M, Landis H. Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La Crosse

- Virus and other lethal viral infections. *J Virol*, 1999, 73: 6984-6991.
- 4 Torisu H, Kusubars K, Bassuny WM, et al. Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurology*, 2004, 62: 457-460.
- 5 北京市卫生局, 好医生医学教育中心. SARS 前线培训手册. 北京: 北京科学技术出版社, 2003. 4: 14-16.
- 6 Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection; role of *mxA*, *OAS-1* and *PKR*. *Genes and Immunity*, 2003, 4: 411-419.
- 7 Kochs G, Haller O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2082-2086.
- 8 Weber F, Haller O, Kochs G. MxA GTPase Blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J Virol*, 2000, 74: 560-563.
- 9 Kochs G, Haller O. GTP-bound human MxA interacts with the nucleocapsid of Thogoto virus (orthomyxoviridae). *J Biol Chem*, 1999, 274: 4370-4376.
- 10 Schumacher B, Staeheli P. Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MxA GTPase. *J Biol Chem*, 1998, 273: 28365-28370.
- 11 马淮健, 王宏伟, 方立群, 等. 医务人员 SARS 感染的危险因素病例对照研究. *中华流行病学杂志*, 2004, 25: 741-744.
- 12 Jikata M, Mishiro S, Miyamoto C, et al. Genetic polymorphism of the *mxA* gene promoter and IFN responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro. *Intervirology*, 2001, 44: 379-382.
- 13 Ter Meulen V. Molecular and cellular aspects of measles virus persistence in the CNS. *J Neurovirol*, 1997, 3: s3-s5.

(收稿日期: 2004-10-29)

(本文编辑: 尹廉)

• 疾病控制 •

浙江省江山市 1999-2004 年麻疹流行病学分析

姜慧仙 左江涛

了解江山市近年来麻疹流行病学特征, 加强麻疹控制工作。疫情资料来自江山市疾病预防控制中心法定传染病年报表及计划免疫相关疫情监测资料。人口资料来自历年江山市统计年鉴。据同期平均人口数统计期间发病率与平均发病率; 应用直线回归与相关分析麻疹发病率逐年变化趋势。

结果与分析: 6 年来江山市累计报告麻疹病例 300 例、死亡 1 例, 除 1999 年外, 每年均有麻疹爆发疫情。每月有病例发生, 高峰期在 3-7 月, 累计 186 例 (占 62%)。1999-2004 年发病率 (/10 万) 分别为: 3.56、3.90、8.82、6.33、11.74、18.28, 平均发病率 10.56/10 万。对发病率进行直线回归与相关分析, 回归系数 $\beta = 0.303$, 其假设检验 $F = 18.152$, $0.01 < P < 0.05$; 相关系数 $r = 0.905$, 其假设检验 $t = 4.255$, $0.01 < P < 0.05$ 。提示 6 年来江山市麻疹发病率总体呈递增

趋势。全市所辖 27 个乡镇中 22 个乡镇有病例发生, 集中分布在市区的须江镇 (流动人口较多) 及曾有疫情发生的 7 个乡镇, 发病构成比依次为: 须江镇 18.76%、新塘边镇 9.67%、何家山乡 8.67%、碗窑乡 8.67%、峡口镇 7.33%、淤头镇 5.67%。发病年龄为 6 月龄~76 岁, 其中 0~6 岁组 87 例占 29%, 7~14 岁组 152 例占 50.67%, 15~76 岁组 61 例占 20.33%。男:女为 1.01:1。幼儿教师 28 例占 9.33%; 散居儿童 70 例占 23.33%; 学生 160 例占 53.33%; 农民、工人等其他职业共 19 例占 6.34%。有免疫接种史的 117 例, 占 39%; 未接种及接种不详的 183 例, 占 61%。本次调查表明, 江山市正处于麻疹周期性流行的发病上升期, 呈高度散发与局部爆发并存的方式, 散发以幼儿和成人发病为主, 爆发以中、小学生发病为主。调查显示, 江山市部分地区还存在着免疫空白点。因此, 现阶段工作以控制麻疹爆发为重点, 以加强常规免疫和疫情监测为主要策略。

(收稿日期: 2005-05-23)

(本文编辑: 尹廉)

作者单位: 324100 浙江省江山市疾病预防控制中心 (姜慧仙); 黑龙江省萝北县妇幼保健院 (左江涛)