

好地反映心室的复极过程,进而对室性心律失常的预测更有价值。

综上所述,冠心病患者 QTd、QTcd 及 Te - Te 明显延长是预测恶性心律失常发生的无创性心电学指标,可为其早期预防提供一定的帮助。与 QTd、QTcd 比较,Tp - Te 间期能够更好地反映心室的复极过程,是预测室性心律失常更有效的指标,特别是当 Te - Te > 148ms 时,应积极采取预防措施。

参考文献

- 1 Roche BM, Kijawornrat A, Robert L, *et al.* Relationship between prolongation of QTc and prolongation of the peak of T (Tp) to the end of T (Te) [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005, 52(1):178 - 181
- 2 Hitender J, Avasthi R. Correlation between dispersion of repolarization (QT dispersion) and ventricular ectopic beat frequency in patients with acute myocardial infarction; a marker for risk of arrhythmogenesis? [J]. International Journal of Cardiology, 2004, 93:69 - 73
- 3 Yan GX, Wu Y, Liu T, *et al.* Phase 2 early after depolarization as a trigger of polymorphic ventricular tachycardia in acquired long QT syndrome [J]. Circulation, 2001, 103:2851
- 4 Di Diego JM, Belardinelli L, Antzelevitch C. Cisapride - induced transmural dispersion of repolarization and torsade de pointes in the canine left ventricular wedge preparation during epicardial stimulation [J]. Circulation, 2003, 108(8):1027 - 1033
- 5 杨天骄,肖建民,马业新,等. 急性缺血对犬在体心肌跨心室壁复极不均一性的影响 [J]. 心电学杂志, 2003, 22(1):18 - 20
- 6 徐大文,张春泰,李映. 自主神经对急性缺血心肌跨室壁复极离散度影响的实验研究 [J]. 中华心律失常学杂志, 2002, 6(5):285 - 288
- 7 Yan GX, Antzelevitch C. Cellular basis for the normal T wave and the

electrocardiographic manifestations of the long - QT syndrome [J]. Circulation, 1998, 98(18):1928 - 1936

- 8 Antzelevitch C, Oliva A. Amplification of spatial dispersion of repolarization underlies sudden cardiac death associated with catecholaminergic polymorphic VT, long QT, short QT and Brugada syndromes [J]. J Intern Med, 2006, 259(1):48 - 58
- 9 Xia Y, Liang Y, Kongstad O, *et al.* T peak - tend interval as an index of global dispersion of ventricular repolarization: evaluations using monophasic action potential mapping of the epi - and endocardium in swine [J]. J Interv Card Electrophysiol, 2005, 14(2):79 - 87
- 10 Castro HJ, Antzelevitch C, Tornos BF, *et al.* T peak - tend and T peak - tend dispersion as risk factors for ventricular tachycardia/ventricular fibrillation in patients with the Brugada syndrome [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(9):1828 - 1834
- 11 Xia Y, Liang Y, Kongstad O, *et al.* T peak - tend interval as an index of global dispersion of ventricular repolarization: evaluations using monophasic action potential mapping of the epi and endocardium in swine [J]. J Interv Card Electrophysiol, 2005, 14(2):79 - 87
- 12 Hlaing T, Dimino T, Kowey PR, *et al.* ECG repolarization waves: their genesis and clinical implications [J]. Ann Noninvasive Electrocardiol, 2005, 10(2):211 - 223
- 13 Antzelevitch C, Sicouri S, Di diego JM, *et al.* Does T peak - tend provide an index of transmural dispersion of repolarization? [J]. Heart Rhythm, 2007, 4(8):1114 - 1116
- 14 夏云龙,杨延宗. T 波形成的电生理机制及其争议 [J]. 心血管病学进展, 2010, 31(4):497 - 500
- 15 林晓明,杨希立,刘鹤龄,等. 急性心肌梗死 T 波峰 - 末间期的临床意义 [J]. 临床心血管病杂志, 2010, 4(26):275 - 277

(收稿日期:2012 - 08 - 17)

(修回日期:2012 - 08 - 27)

巨细胞病毒感染患儿杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因多态性分析

陈晓晴 余 坚 葛海峰 郑晓群

摘 要 **目的** 探讨杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 基因多态性与人巨细胞病毒 (HCMV) 感染是否存在关联。**方法** 采用 PCR 序列特异性引物 (PCR - SSP) 方法检测 76 例巨细胞病毒感染患儿和 96 例正常对照的 KIR 基因的多态性。**结果** 患儿组 KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS5 基因频率显著高于健康对照组 ($\chi^2 = 9.145, P = 0.002; \chi^2 = 15.167, P = 0.000; \chi^2 = 4.611, P = 0.032$); 其余各 KIR 基因频率与对照组比较, 差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。具有 3 个或 3 个以上活化性 KIR 基因的个体在患儿组中占 63.16%, 在对照组中占 32.29%, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 16.273, P = 0.000$)。**结论** KIR 基因多态性与 HCMV 感染有关联, 活化性 KIR 基因数目增多可能是 HCMV 感染后发病的遗传因素之一。

关键词 杀伤细胞免疫球蛋白样受体 基因多态性 人巨细胞病毒

基金项目:温州市科技计划项目 (Y20100107)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院检验科

通讯作者:郑晓群, 电子信箱:zxq@wzhealth.com

Association of Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor (KIR) Gene Polymorphism with Human Cytomegalovirus Infection in Children.

Chen Xiaoqing, Yu Jian, Ge Haifeng, Zheng Xiaoqun. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigation whether the killer cell immunoglobulin like receptor (KIR) gene polymorphism is associated with human cytomegalovirus(HCMV) infection. **Methods** Seventy six children infected with HCMV and 96 normal controls were enrolled to detect the KIR gene by PCR – SSP. **Results** The gene frequencies of KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS5 were significantly higher in children infected with HCMV than in the healthy controls($\chi^2 = 9.145, P = 0.002; \chi^2 = 15.167, P = 0.000; \chi^2 = 4.611, P = 0.032$). The rest of the gene frequencies was found to have no statistically significantly difference compared with healthy controls($P > 0.05$). Individuals who possessed three or more than three activating KIR genes were more patients than control subjects (63.16% vs 32.29%, respectively, $\chi^2 = 16.273, P = 0.000$). **Conclusion** KIR gene polymorphism is associated with HCMV infection and the increased activating KIR genes may be onset of the genetic factor.

Key words Killer cell immunoglobulin like receptor; Gene polymorphism; Human cytomegalovirus

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是胎儿宫内感染和围生期感染的重要病原体,也是婴幼儿和免疫力低下个体的主要病原体之一,可导致严重疾病甚至死亡。免疫系统中 T 淋巴细胞及自然杀伤(NK)细胞功能异常与其活化增殖及相关性疾病的发生和发展密切相关^[1]。杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin – like receptors, KIR)主要表达于 NK 细胞和部分 T 淋巴细胞表面,具有高度多态性。KIR 可与人类主要组织相容性抗原 MHC – 1 类分子(major histocompatibility complex, MHC)特异性结合,调节 NK 细胞和 T 淋巴细胞活性,在先天免疫耐受和后天免疫应答中发挥重要作用。近年来,特异性 KIR 基因在病毒感染性疾病中的作用越来越受到重视,为探讨其与 HCMV 感染之间的关联,本研究采用 PCR 序列特异性引物(PCR – SSP)方法检测 76 例巨细胞病毒感染患儿和 96 例健康正常对照的 KIR 基因的多态性。

对象与方法

1. 对象:2009 年 10 月~2011 年 10 月温州医学院附属育英儿童医院收治确诊为 HCMV 感染的住院患儿 76 例,男性 48 例,女性 28 例,年龄 7.5 ± 0.5 个月,诊断标准^[2]:①血清

HCMV IgM 抗体阳性;②外周血多形核白细胞(PNMLs)中 HCMV pp65 抗原阳性;③双份血清 HCMV IgG 抗体效价呈 ≥ 4 倍增高;④血或尿 HCMV DNA 检测阳性,满足任何一项即可诊断为 HCMV 感染。所有病例进行血常规、血生化以及系列病毒学指标、肝胆脾 B 超检查,并排除其他病毒感染;同期选取笔者医院儿童保健科门诊健康体检的 96 例作为正常对照,其中男性 52 例,女性 44 例,年龄 10.1 ± 3.9 个月。

2. 试剂与仪器:Taq DNA 聚合酶和 dNTP(大连宝生物工程有限公司),引物由上海生工生物工程有限公司合成、纯化,各 KIR 基因引物序列及片段长度见表 1。德国 Eppendorf Mastercycler PCR 仪,美国 Bio RAD PAC300 型电泳仪,北京 WD – 9413A 型凝胶成像分析仪等。

3. DNA 提取:均抽取待检者静脉血 2ml,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,盐析法提取全血基因组 DNA。

4. KIR 基因检测:用 PCR – SSP 法检测 KIR 基因家族中除框架基因及假基因之外的 12 个 KIR 基因(KIR1D、2DL1、2DL2、2DL3、2DL5、2DS1、2DS2、2DS3、2DS4、2DS5、3DL1 和 3DS1)。反应体系均为 25 μ l,含 ddH₂O 14.875 μ l、Taq DNA 聚合酶 0.125 μ l、10 $\times$ PCR Buffer (No Mg²⁺) 2.5 μ l、25mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l、d NTP Mixture 2 μ l、KIR 基因特异性上下游引物 0.5 μ l、基因组 DNA 3 μ l。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳判断结果。

表 1 各 KIR 基因引物序列及片段长度

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	片段长度(bp)
1D	2DS4F2: ATCCTGCAATGTTGGTCG	2DS4R4: CTGGATAGATGGAGCTGCAG	1885
2DL1	2DL1F: TGGTCAGATGTCATGTTTGAA	2DL1R: AGGTCCTGCCAGGCTTTCGC	145
2DL2	2DL2F: GGGAGGGGAGGCCCATGAAT	2DL2R: CTCGAGTTTGACCACTCGTAT	154
2DL3	2DL3F: TCTCCTTCATCGCTGGTGCTG	2DL3R: CAGGCTCTTGTTCCATTACAA	521
2DL5	2DL5F: GGTCTATTGGGAACCTTCA	2DL5R: AAGTCAGCCTGGAATGTTCCA	185
2DS1	PP2DS1F: TCTCCATCAGTCGCATGAA/G	PP2DS1R2: AGGGCCCAGAGAAAGTG/T	1838
2DS2	PP2DS2F: CTTCTGCACAGAGAGGGGAAGTA	PP2DS2R: CACGCTCTCTCCTGCCAA	1761
2DS3	RV2DS3F: GACATGTACCATCTATCCAC	PP2DS3R: GCATCTGTAGGTTCTCCT	130
2DS4	2DS4F2: ATCCTGCAATGTTGGTCG	2DS4R5: CTGGATAGATGGTACATGTC	1902
2DS5	2DS5F4: CTGCACAGAGAGGGACGTTTAACC	2DS5R664: TCCAGAGGGTCACTGGGC	179
3DL1	3DL1F3: AAGACACCCCTACAGATACCATCT	CONSR: GCAGGCACTGGGGACCTTAGACA	277
3DS1	3DS1F: CCTGGTGAAATCAGGAGAGAG	3DS1R: TGCAAGGGCACGCATCATGGA	179

5. 统计学方法:观测到的 KIR 基因表型频率(f)通过直接计数测得, $f(\%) = \text{阳性基因数} / \text{研究组总人数}$;KIR 基因频率(GF) $= 1 - (1 - f)^{1/2}$ 。各组间频率采用 SPSS 17.0 统计软件进行 χ^2 检验,人均 KIR 基因数的比较用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. KIR 基因 PCR-SSP 产物鉴定:12 个 KIR 基因 PCR-SSP 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1,其扩增片段大小为 130~1902bp。

2. 患儿组与健康对照组 KIR 基因频率比较:患儿组 KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS5 基因频率显著高于健康对照组(P 均 < 0.05),提示其可能与 HCMV 感染相关;另外 9 个 KIR 基因病例组与健康对照组比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表 2;患儿组人均活化性 KIR 基因数显著高于对照组($P <$

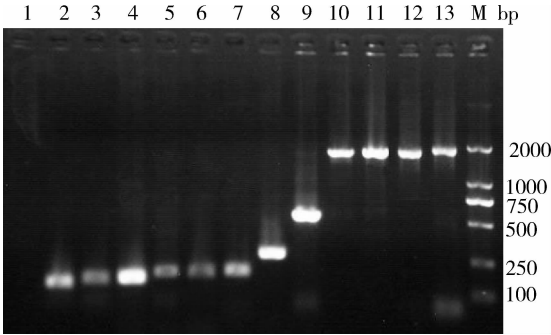


图 1 KIR 基因 PCR-SSP 扩增产物电泳图
1 泳道. 阴性对照;2~13 泳道. 依次为 2DS3、2DL1、2DL2、2DS5、3DS1、2DL5、3DL1、2DL3、2DS2、2DS1、1D、2DS4; M. DL2000 标准带

0.05),两组人均 KIR 基因总数及抑制性基因数的比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 2 各组 KIR 基因频率比较

KIR 基因	健康对照组($n = 96$)			患儿组($n = 76$)			χ^2	P
	n	表型频率(%)	基因频率(GF)	n	表型频率(%)	基因频率(GF)		
1D	50	52.08	0.308	38	50.00	0.293	0.074	0.786
2DS1	49	51.04	0.300	56	73.68	0.487	9.145	0.002
2DS2	37	38.54	0.216	52	68.42	0.438	15.167	0.000
2DS3	6	6.25	0.032	3	3.95	0.020	0.108 ^a	0.742
2DS4	70	72.92	0.480	56	73.68	0.487	0.013	0.910
2DS5	20	20.83	0.110	27	35.53	0.197	4.611	0.032
3DS1	29	30.21	0.165	25	32.89	0.181	0.142	0.706
2DL1	95	98.96	0.898	74	97.37	0.838	0.042 ^a	0.838
2DL2	92	95.83	0.796	73	96.05	0.801	0.000 ^a	1.000
2DL3	62	64.58	0.405	45	59.21	0.361	0.521	0.470
2DL5	34	35.42	0.196	33	43.42	0.248	1.143	0.285
3DL1	89	92.71	0.730	70	92.11	0.719	0.022	0.882

^a 为连续校正 χ^2 计算结果

表 3 两组人均 KIR 基因数的比较

项目	n	人均总 KIR	人均活化性	人均抑制性
			KIR	KIR
患儿组	76	7.26	2.88	4.38
对照组	96	6.59	2.20	4.39
t	-	-1.421	-2.573	0.062
P	-	0.157	0.011	0.950

3. 患儿组与对照组活化性 KIR 基因阳性率的比较:具有 3 个或 3 个以上活化性 KIR 基因的个体在患儿组中占 63.16%,在对照组中占 32.29%,差异有统计学意义($\chi^2 = 16.273, P = 0.000$),见图 2。

4. KIR 基因频率与 HCMV 感染的相关性:HCMV 的 KIR2DS2 基因频率(0.438)比健康对照组(0.216)显著升高,KIR2DS2 与 HCMV 感染呈现显著正相关

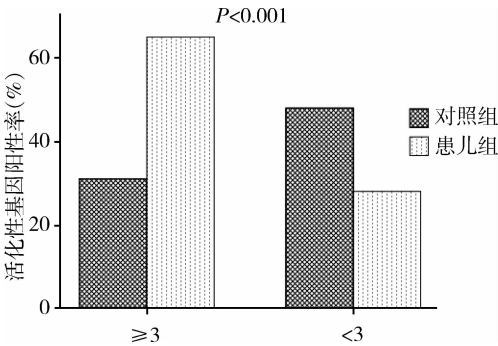


图 2 患儿组与对照组活化性 KIR 基因阳性率的比较

($P < 0.001$),与 HCMV 感染正相关的 KIR 基因尚有 2DS1 和 2DS5(P 分别为 0.002 和 0.032),其他位点

KIR 基因位点频率未发现统计学差异,见表 2。

讨 论

HCMV 是疱疹病毒科 β 属双股线性 DNA 病毒; HCMV 的感染相当普遍,多在婴幼儿期发生,儿童感染率 85% 左右;HCMV 感染通常无症状,病毒潜伏在宿主细胞中,多种诱因可使潜伏的病毒被激活,引发明显的临床症状,是婴儿期肝脏损害的主要原因之一。HCMV 感染的临床结局与宿主遗传因素、免疫状态和病毒因素等有关,HCMV 感染后宿主细胞的损伤主要是由 NK 细胞和 CTL 介导免疫反应所致。NK 细胞及 $CD8^+$ T 细胞表面的 KIR 能够识别被病毒感染细胞表面 MHC I 类分子,形成受体配体复合物,调节 NK 及 CTL 的细胞毒活性。KIR 为 I 型跨膜糖蛋白,膜外区有 2 个或 3 个 Ig 样结构域,属于免疫球蛋白超家族;长细胞质尾端的 KIR(- L)转导抑制信号,短细胞质尾端的 KIR(- S)转导活化信号,从而调节 NK 细胞和 T 细胞的活性,在肿瘤免疫、感染免疫及清除老化变异细胞等方面发挥调节作用。个体 KIR 的基因型决定其表达;编码 KIR 的基因位于染色体 19q13.42,是具有高度多样性的多基因家族,到目前为止,已发现 18 个基因,即 KIR1D、KIR2DL1 ~ 5、KIR2DS1 ~ 5、KIR3DL1 ~ 3、KIR3DS1、 X_V 、X 和 KIR2DP1;其中, KIR2DL4、KIR3DL2 和 KIR3DL3 为框架基因, X_V 、X 和 KIR2DP1 为假基因^[3]。研究显示,KIR 基因与多种病毒感染性疾病如:丙型肝炎病毒感染、乙型肝炎病毒感染、人类免疫缺陷病毒感染、EB 病毒感染相关^[4-7]。

本研究对 HCMV 感染患儿进行 KIR 基因多态性的分析,通过比较 HCMV 感染患儿组与对照组各型 KIR 基因频率的差异,发现 KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS5 基因频率在患儿组中显著增高(P 均 < 0.05),提示其可能与 HCMV 感染相关。KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS5 均为活化性 KIR,已有的文献报道,KIR2DS1 与系统性红斑狼疮(SLE)的发病相关,KIR2DS2 在类风湿性血管炎患者频率明显增高,其机制可能为活化性基因促进自身反应的 NK 细胞和 T 细胞激活,通过识别自身抗原打破免疫耐受,进而诱

导自身免疫病的发生。KIR2DS5 基因频率在 EB 病毒相关性嗜血淋巴组织细胞增生症(EB - HLH)患儿组明显增高,提示其与疾病的易感性有关,可能参与了 EB - HLH 的发生和发展^[7]。笔者分析,HCMV 感染机制可能与上述疾病相似。KIR 与 HLA 特异性结合,通过传导抑制信号或活化信号调节 NK 细胞的杀伤功能,在细胞表面 HLA 正常表达的情况下,NK 细胞表面的抑制性受体占主导地位,NK 细胞对正常的细胞不发挥杀伤作用,而被病毒感染的细胞,HLA 在细胞表面异常表达,NK 细胞表面活化性受体占主导地位,发挥杀伤功能,杀伤异常细胞^[8]。因此,KIR 基因谱的异常有可能导致 NK 细胞和 T 细胞功能异常,这可能是 HCMV 感染后宿主免疫功能异常的遗传因素之一。

参考文献

- 1 李亚男,方峰,甄宏,等. $CD4^+$ $CD25^+$ 调节性 T 细胞抑制效应性 T 细胞在 HCMV 感染中的免疫作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2008,28(3):234-238
- 2 郑晓群,冯晶晶,林虹,等. 尿液上皮细胞中巨细胞病毒载量预测婴儿巨细胞病毒激活感染的价值[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(4):403-406
- 3 李丽,何成涛,张建琼,等. SLE 患者杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因相关性分析[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(12):1359-1362
- 4 Carneiro VL, Lemaire DC, Bendicho MT, *et al.* Natural killer cell receptor and HLA - C gene polymorphisms among patients with hepatitis C: a comparison between sustained virological responders and non - responders[J]. Liver Int, 2010, 30(4):567-573
- 5 Lu Z, Zhang B, Chen S, *et al.* Association of KIR genotypes and haplotypes with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in Chinese Han population[J]. Cell Mol Immunol, 2008, 5(6):457-463
- 6 徐东兵,韩晓旭,张子宁,等. 中国 HIV - 1 感染者 KIR 基因多态性与疾病进展关系的研究[J]. 中华微生物和免疫学杂志,2008,28(12):1099-1102
- 7 Qin Q, Xie ZD, Liu CY, *et al.* Killer cell immunoglobulin - like receptor gene polymorphisms predispose susceptibility to Epstein - Barr virus associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Chinese children[J]. Microbiol Immunol, 2012, 56(6):378-384
- 8 董兆梅,史荔. HLA/KIR 基因系统与 HCV 感染的相关性研究进展[J]. 国际遗传学杂志,2012,35(1):31-36

(收稿日期:2012-07-30)

(修回日期:2012-10-15)

欢迎订阅

欢迎赐稿