

基于转录组测序技术的重症手足口病相关基因研究

陈程¹ 刘映霞² 杨桂林² 邓永² 单灵波¹ 邹容容² 彭忠田¹

【摘要】目的 应用转录组测序技术(RNA-seq)分析重症手足口病(SHFMD)患者外周血单个核细胞(PBMC)转录组情况,筛选SHFMD相关基因,探讨其发生的可能免疫机制。**方法** 收集2014年5月至8月深圳市第三人民医院收治的重症和轻症手足口病(MHFMD)患儿各5例,以及5例健康体检儿童的外周血,均分离PBMC,采用转录组测序技术筛选显著的差异表达基因(DEGs),并通过实时荧光定量PCR对DEGs进行验证。**结果** SHFMD组相对健康对照组共117个DEGs,其中108个基因上调,9个基因下调;SHFMD组相对MHFMD组共26个DEGs,其中14个基因上调,12个基因下调;两组DEGs中共有8个相同基因,其中TNFRSF13C、IL-7R、THBS1和VEGFA下调,S100A8、S100A12、IL-8和IL-1 β 上调(P 均 < 0.05)。**结论** S100A8、S100A12、IL-8、IL-1 β 、TNFRSF13C、IL-7R、THBS1和VEGFA是SHFMD相关的差异表达基因,可能在SHFMD的发生中起重要作用,有望成为手足口病重症化的预测基因。

【关键词】 转录组测序;重症手足口病;预测基因

Research of the severe hand, foot and mouth diseases related susceptibility genes based on the transcriptome sequencing technologies Chen Cheng¹, Liu Yingxia², Yang Guilin², Deng Yong², Shan Lingbo¹, Zou Rongrong², Peng Zhongtian¹. ¹Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China; ²Department of Infectious Diseases, The Third People's Hospital of Shenzhen, University of South China, Shenzhen 518112, China
Corresponding author: Peng Zhongtian, Email: pzt-pzt@163.com

【Abstract】Objective To screen severe hand, foot and mouth disease (SHFMD) related genes, and to explore the possible immune mechanisms by high-throughput transcriptome sequencing technology (RNA-seq). **Methods** Total of 15 PBMC samples were collected from 5 patients with SHFMD, 5 patients with mild hand, foot and mouth disease (MHFMD) and 5 cases of healthy control (HC), during May 2014 and August 2014, in the Third People's Hospital of Shenzhen. The RNA of the PBMCs were sequenced by the RNA-seq technology, on the basis of RPKM (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) multiples and expression level fold-change, and the differentially expressed genes (DEGs) were screened. Furthermore, the expression levels of the DEGs by quantitative real-time PCR were confirmed. **Results** Total of 117 DEGs between SHFMD and MHFMD were found, including 108 up-regulated genes and 9 down-regulated genes; and 26 DEGs between SHFMD and HC, including 14 up-regulated genes and 12 down-regulated genes. The two groups of DEGs had 8 genes in common, among which S100A8, S100A12, IL-8, IL-1 β were up-regulated, while TNFRSF13C, IL-7R, THBS1, VEGFA were down-regulated (P all < 0.05). **Conclusions** S100A8, S100A12, IL-8, IL-1 β , TNFRSF13C, IL-7R, THBS1 and VEGFA are SHFMD specific DEGs, which may play an important role in the development of SHFMD and potentially serve as gene markers to predict the occurrence of SHFMD.

【Key words】 Transcriptome sequencing; Severe hand, foot and mouth disease; Predicted gene

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.01.006

基金项目: 深圳市新发传染病重点专科基金(No. 201161); 深圳市科技创新委项目(No. JCYJ20150402111430623)

作者单位: 421001 衡阳市, 南华大学附属第一医院感染科¹; 518112 深圳市, 南华大学附属深圳市第三人民医院感染科²

通讯作者: 彭忠田, Email: pzt-pzt@163.com;

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)主要是由肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇A组16型(Coxsackievirus A 16, CoxA16)引起的急性小儿传染病,主要表现为手、足、口腔等部位的疱疹、斑丘疹。少数患者病情进展迅速,在发病1~5 d出现脑炎、脑膜脑炎、神经源性肺水肿和循环障碍,甚至死亡等危重症表现。2008至2014年,HFMD疫情反复出现在我国的各个省市,全国手足口病每年总发病数从488 955例增加至2 778 861例,总死亡数从126例增加至501例,发病数和死亡数均占丙类传染病的首位(国家卫生计生委疾病预防控制局发布数据),已成为严重危害我国儿童健康疾病之一。随着发病数和死亡数的上升,重症手足口病(severe hand, foot and mouth disease, SHFMD)的发病机制受到越来越多研究者的关注,已有大量证据表明年龄、免疫系统功能、促炎和抗炎因子等在SHFMD的发生、发展中发挥重要作用。

有研究发现,不同基因型和等位基因的人发生手足口重症的概率不同^[1],同时,Yuan等^[2]发现IL-6在SHFMD患儿血清中显著高于普通手足口病患儿,Han等^[3]亦发现血清CCL2在并发脑炎的手足口患儿中高表达。但近年来对SHFMD相关因子的研究主要采用单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)方法,由于研究基因位点有限,并未全面的展示宿主免疫反应状态,未确定是否还有其他因子协同作用。

转录组测序技术即利用第二代高通量测序方法对cDNA进行测序,全面快速地获取某一物种特定器官或组织在某一状态下的几乎所有转录组和基因组。自2007年出现以来已广泛应用于医学领域,如肝癌、直肠癌和获得性免疫缺陷综合征等的研究。而Zhang等^[4]利用转录组测序技术对感染EV71恒河猴的PBMC进行分析,发现TAC1、IL-17A与EV71所致SHFMD显著相关。本研究首次将转录组技术应用于HFMD患儿PBMC测序中,通过分析SHFMD、轻症手足口病(mild hand, foot and mouth disease, MHFMD)患儿和健康小儿PBMC中RNA转录组情况,试图发现SHFMD相关预测基因,为SHFMD的早期及时治疗提供科学依据。

资料与方法

一、临床资料

本研究共入组15例儿童(SHFMD患儿5例,

MHFMD患儿5例,健康儿童5例),所有HFMD患者均来自2014年5月至8月深圳市第三人民医院感染科住院患儿,健康对照为同期来院健康体检儿童。SHFMD/MHFMD诊断标准依据我国卫生部发布的《手足口病诊疗指南(2013年版)》,且排除合并其他常见感染性疾病,如麻疹、巨细胞病毒感染和流行性腮腺炎等;HFMD患儿肠道病毒三项检测结果为EV71阳性。本研究经深圳市第三人民医院伦理委员会批准,且获得患者或家属知情同意。

二、样本收集

HFMD样本收集时间为患儿入院当天用药前,健康样本为儿童体检当天,分别采集外周静脉血5 ml,6 h内通过密度梯度离心的方法提取外周血PBMCs,于液氮冻存储备用。

三、转录组测序

1. PBMCs总RNA提取:PBMCs总RNA使用德国Qiagen公司提供的Rneasy kit进行提取,RNA浓度和纯度通过Agilent 2100生物分析仪(Agilent)进行检测,所有样本总RNA完整性(RIN) > 7.5, 28S:18S rRNA > 1.8。

2. 文库制备与测序:质检合格的RNA,送于深圳华大基因研究院采用Illumina HiSeq™ 2000平台进行测序。测序原始数据经质量评估和过滤后,将reads映射至参考人类基因组和转录组(本研究人类基因组和转录组序列来自UCSC基因组生物信息学网)。然后使用对应映射结果计算每个基因RPKM值(reads per kilobase of exon model per million mapped reads, RPKM),即每1百万个map上的reads中,map到外显子每1千个碱基上的reads个数。最后使用NOISeq程序在各比较组中筛选显著差异表达基因(DEGs)。DEGs遵循标准:比较两组的基因差异表达情况,表达值变化倍数Fold-change ≥ 2或Fold-change ≤ -2.0且概率 > 0.8。

4. 实时荧光定量PCR(qRT-PCR):所有qRT-PCR引物均通过Primer Premier 5软件设计,引物序列如表1所示,引物均由ABI公司合成并经过PCR特异性验证。RNA的反转录采用Takara公司提供的6210A试剂盒完成。随后使用Qiagen公司的Quantitect SYBR Green RT-PCR kit进行qRT-PCR扩增,每个样本均对8个基因进行同步检测,每个基因2个复孔。反应体系如下:1 μl cDNA(cDNA合成使用),0.8 μmol/L × 2上下游引物,10 μl TaKaRa Ex Taq^{II} Mix,0.4 μl Rox Reference Bye和7 μl H₂O;

反应条件: 预变性 95 °C, 30 s; 95 °C、5 s, 60 °C、30s; 40循环; 75 °C、15 s; 60 °C、1 min; 95 °C、15 s。计算结果采用仪器和方程 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

四、统计学处理

采用统计软件SPSS 18.0对初级数据进行统计分析, 计量资料使用 $\bar{x} \pm s$; 同一基因不同组间采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义; 显著差异表达基因筛选采用泊松分布。

结 果

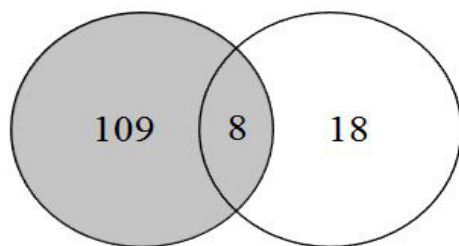
一、转录组测序差异表达基因

使用NOISEq程序分析结果显示, SHFMD组相对MHFMD组共26个DEGs (其中14个基因上调, 12个基因下调); SHFMD组相对健康对照组共117个DEGs (其中108个基因上调, 9个基因下调); 对两组DEGs进行比较发现, 共有8个共同的DEGs (图1), 其中IL-1 β 、IL-8、S100A8和S100A12显著上调; VEGFA、THBS1、IL-7R和TNFRSF13C显著下调 (P 均 < 0.05), 详见表2。

二、实时荧光定量PCR对差异表达基因进行验证

本研究选取SHFMD vs MHFMD组中8个DEGs的测序数据进行qRT-PCR验证, 以Beta-Actin为内参。其中IL-1 β 、IL-8、S100A8和S100A12显著上调; VEGFA、THBS1、IL-7R和TNFRSF13C显著下

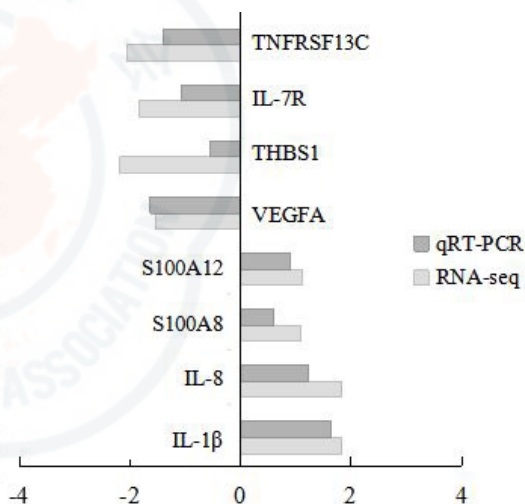
调, 与转录组测序计算结果 (RPKM比值) 基本一致 (图2)。



SHFMD vs H 组 SHFMD vs MHFMD 组

注: 灰色部分: SHFMD 组 vs 健康对照组, 白色部分: SHFMD 组 vs MHFMD 组

图1 转录组测序 DEGs 交集韦恩图



注: X 轴代表转录组测序结果比值 [\log_2 (SHFMD vs MHFMD)] 和荧光定量 PCR 比值 [\log_2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)]; Y 轴代表 8 个共同显著差异基因

图2 差异表达基因实时荧光定量 PCR 验证结果图

表1 8个差异表达基因扩增引物序列表

基因名称	引物序列 (5'→3')
TNFRSF13C	正向引物: GCCGATTACAGTCTTCACTC
	反向引物: GCAAGCACACCAAACCTCCAT
IL-7R	正向引物: GGCAGGCTCAAGAGGGAATA
	反向引物: GCTCTGAGATCATGGACGGAT
THBS1	正向引物: ATCCATACCCGAGACGATTG
	反向引物: ACCTGGGTAAATCAGCTAACG
VEGFA	正向引物: GCGACACATTGTTGGAAGAA
	反向引物: CGACATAGGTCCTTTTAGGCT
S100A8	正向引物: TACCATCATGTTGACCGAGC
	反向引物: GTCATCCCTGTAGACGGCAT
S100A12	正向引物: CAGGCTGACACCTCTCTAA
	反向引物: CGTCTTGATTAGCATCCAGG
IL-8	正向引物: TGACTCCAAACCTTTCCACC
	反向引物: TCCTTGGGGTCCAGACAGA
IL-1 β	正向引物: TCTACGAATCTCCGACCACC
	反向引物: TTAGGCAGGGAACCAGCAT

注: TNFRSF13C: 肿瘤坏死因子受体超家族13C, IL-7R: 白细胞介素7受体, THBS1: 血小板反应蛋白1, VEGFA: 血管内皮生长因子, S100A8/A12: S100钙结合蛋白A8/A12, IL-8: 白细胞介素8, IL-1 β : 白细胞介素1 β

表2 转录组测序共同差异表达基因检测两两比较结果 (\bar{x})

基因名称	转录组测序结果	
	SHFMD vs MHFMD	SHFMD vs H
IL-1 β	1.8259	1.5285
IL-8	1.8312	1.3862
S100A8	1.0849	0.9773
S100A12	1.1112	1.8381
VEGFA	-1.5449	-1.6583
THBS1	-2.1815	-0.9677
IL-7R	-1.8284	-1.3206
TNFRSF13C	-2.0637	-1.8022

注: 转录组测序结果为 \log_2 (SHFMD vs MHFMD) 和 \log_2 (SHFMD vs H), 比值 > 1 或 < -1 表示差异具有统计学意义

讨 论

由于目前关于重症手足口病的发病机制仍不明确,也无上市的疫苗和有效的抗病毒药物,使得SHFMD的早期诊断、早期干预治疗显得尤为重要。本研究利用第二代高通量测序技术对PBMC中的RNA进行全转录组深度测序,全面分析SHFMD相对于MHFMD及健康儿童间显著差异表达基因,寻找SHFMD特异性的差异表达分子,希望这些显著差异表达基因能作为疾病早期的预测因子。本研究中SHFMD组与健康对照组间比较共筛选出117个DEGs,即重症组相对健康组特异表达基因;接着,又将SHFMD组和MHFMD组进行比较,共得出28个重症组相对轻症组特异表达基因,两组比较结果取交集共得8个DEGs:其中IL-1 β 、IL-8、S100A8和S100A12显著上调,VEGFA、THBS1、IL-7R和TNFRSF13C显著下调。

IL-1 β 是重要的炎症反应介质之一,参与各种细胞活动,包括细胞增殖、分化和凋亡,促进单核巨噬细胞分泌炎症因子。同时,IL-1还是内生致热源,可以直接作用于下丘脑引起发热反应。研究表明,手足口病并发脑炎、心肺功能衰竭者IL-1 β 显著升高,IL-1 β 受体拮抗剂和粒细胞集落刺激因子的水平可作为判断HFMD预后的标志物^[5]。而IL-8是主要由巨噬细胞分泌的一种趋化因子,负责招募中性粒细胞等炎症细胞。Wang等^[6]报道血清中IL-8水平与HFMD的严重程度密切相关,并可能在疾病的早期阶段用作重症预测标志物。以上研究与本研究检测结果一致,因而从转录组和蛋白组水平都表明IL-1 β 、IL-8在SHFMD中扮演者重要角色,可能成为SHFMD早期预测因子。

S100A8/A12为S100钙结合蛋白家族成员,是单核巨噬细胞蛋白质重要组成部分。S100蛋白通过活化内皮细胞,可诱导特定的炎症反应,增加血管通透性和促进血栓形成,其还可通过Toll样受体(toll like receptor, TLR)或高级糖化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)来激活先天性免疫,在炎症反应中起关键作用。此外,S100B蛋白在脑组织中也有表达,因其浓度不同而发挥营养神经或促凋亡作用。研究发现血清中S100A8/A9水平可能与目前实验室常用炎症指标显著相关,如C-反应蛋白、红细胞沉降率和类风湿因子等,可作为某些疾病的分子标志,如类风湿性关

节炎和心血管疾病^[7-9]。本研究发现,S100A8/A12在SHFMD中显著上调,故推测S100A8/A12同样通过影响多种炎性细胞因子和蛋白,加重炎症反应和脑组织损伤,从而导致SHFMD的发生。

THBS1是一种由血小板、平滑肌细胞、内皮细胞等多种细胞产生的细胞外基质糖蛋白,大量体外和体内实验证明THBS-1可以抑制血管生成^[10],是一种天然的血管生成抑制剂。其抑制血管生成的机制可以概括为两类,一是直接作用于内皮细胞,抑制迁移、诱导内皮细胞凋亡;二是间接影响的各种细胞因子(如转化生长因子 β)、蛋白酶(如基质蛋白酶2、蛋白酶9)和生长因子(如成纤维细胞生长因子、VEGFA)来调节血管生成^[11]。Huang等^[12]研究发现VEGFA在EV71感染致HFMD患者的临床表现中扮演着多个角色,如可诱发神经系统症状,其过表达可引起肺水肿,然而EV71的存在可诱导VEGFA降解。本研究发现SHFMD转录组THBS1、VEGFA水平均显著下调,推测THBS1下调使VEGFA过表达,导致HFMD向危重症病情发展,但由于EV71可诱导VEGFA降解,从而导致两者在EV71所致SHFMD患儿中表达均下调。

IL-7是一种调节免疫系统细胞活性蛋白质,与其受体结合可引发了一系列细胞内的化学信号。未成熟造血细胞内通过IL-7受体信号可确保成熟B细胞和T细胞功能得以发挥,此外,IL-7受体信号可刺激这些未成熟细胞的生长、增殖和存活^[13]。因此,IL-7在维持幼稚和记忆CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞在外周循环的生存和平衡中起关键作用。与IL-7类似,TNFRSF13C可增强B细胞的体外存活,因而也称B细胞活化因子(B cell activating factor, BAFF),其是外周B细胞群的调节器^[14]。这两种因子都参与调节免疫细胞的成熟与生存,而越来越多的研究表明,SHFMD的发生发展与免疫功能的成熟度密切相关,免疫系统较成熟的年长儿童患HFMD多仅表现为轻微发热和少量出疹,疾病多呈自限性发展,IL-7与TNFRSF13C的下调引起免疫细胞成熟延迟、功能减退,从而增加SHFMD发生的可能。

重症手足口病作为儿童“头号杀手”,其发病机制至今尚不明确,早期甄别重症表现仍是降低病死率的关键。本研究首次通过转录组测序技术筛选出TNFRSF13C、IL-7R、THBS1、VEGFA、S100A8、S100A12、IL8和IL1B为SHFMD特异表

达基因, 这些差异表达基因有望成为疾病的早期预测因子, 以指导医护人员对患儿进行早期干预治疗, 改善疾病愈后。但本研究存在一定的局限性, 包括病例数较少, 未对发现的基因进行功能研究等; 这也是下一步需进行的工作, 即加大样本量对DEGs进行验证, 并对DEGs的功能进行研究。

参 考 文 献

- 1 Lv T, Li J, Han Z, et al. Association of interleukin-17F gene polymorphism with enterovirus 71 encephalitis in patients with hand, foot, and mouth disease[J]. *Inflammation*,2013,36(4):977-981.
- 2 Yuan A, Li J, Liu P, et al. Association of interleukin-6-572C/G gene polymorphism and serum or cerebrospinal fluid interleukin-6 level with enterovirus 71 encephalitis in Chinese han patients with hand, foot, and mouth disease[J]. *Inflammation*,2015,38(2):728-735.
- 3 Han Z, Li J, Chen Z. Genetic polymorphism of CCL2-2510 and susceptibility to enterovirus 71 encephalitis in a Chinese population[J]. *Archives of virology*,2014,159(9):2503-2507.
- 4 Zhang Y, Yang E, Pu J, et al. The gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells from EV71-infected rhesus infants and the significance in viral pathogenesis[J]. *PloS one*,2014,9(1):e83766.
- 5 Griffiths MJ, Ooi MH, Wong SC, et al. In enterovirus 71 encephalitis with cardio-respiratory compromise, elevated interleukin 1 β , interleukin 1 receptor antagonist, and granulocyte colony-stimulating factor levels are markers of poor prognosis[J]. *J Infect Dis*,2012,206(6):881-892.
- 6 Wang W, Li W, Yang X, et al. Interleukin-8 is elevated in severe hand, foot, and mouth disease[J]. *J Infect Dev Ctries*,2014,8(1):94-100.
- 7 Foell D, Frosch M, Sorg C, et al. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation[J]. *Clinica Chimica Acta*,2004,344(1):37-51.
- 8 Leach ST, Yang Z, Messina I, et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease[J]. *Scand J Gastroenterol*,2007,42(11):1321-1331.
- 9 Kang KY, Woo JW, Park SH. S100A8/A9 as a biomarker for synovial inflammation and joint damage in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Korean J Intern Med*,2014,29(1):12-19.
- 10 Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1[J]. *Nature medicine*,2000,6(1):41-48.
- 11 Lawler PR, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*,2012,2(5):a006627.
- 12 Huang SC, Raghavaraju G, Liu HS. High expression of vascular endothelial growth factor in EV71-infected patients does not originate from EV71-infected cells[J]. *Intervirology*,2009,53(6):394-401.
- 13 Sasson SC, Zaunders JJ, Kelleher AD. The IL-7/IL-7 receptor axis: understanding its central role in T-cell homeostasis and the challenges facing its utilization as a novel therapy[J]. *Curr Drug Targets*,2006,7(12):1571-1582.
- 14 Yu G, Boone T, Delaney J, et al. APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity[J]. *Nat Immunol*,2000,1(3):252-256.

(收稿日期: 2015-04-27)
(本文编辑: 孙荣华)

陈程, 刘映霞, 杨桂林, 等. 基于转录组测序技术的重症手足口病相关基因研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2016,10(1):26-30.