

· 临床研究 ·

LGALS1 基因多态性与流感遗传易感性关联研究

何燕¹, 宋玥¹, 杜国平², 倪倩¹, 李伟¹, 卫平民^{1*}

¹东南大学公共卫生学院, 江苏 南京 210009; ²东南大学附属医院内科, 江苏 南京 210018

[摘要] 目的:探讨半乳糖凝集素1(lectin galactoside-binding soluble 1, LGALS1)基因单核苷酸多态性与我国常见流感感染类型的易感性关系。方法:采用病例对照研究方法,以2015—2017年江苏省疾病预防控制中心监测的流感阳性病例为病例组,南京市江宁医院监测的经实验室核酸检测为阴性的流感样病例及健康人群为对照组,收集咽拭子和血液,利用巢式PCR及基因测序等技术对基因多态性位点进行分型检测,比较两组人群基因型分布及频率差异。结果:LGALS1基因的rs4820294(G/A)位点和rs2899292(A/G)位点变异与流感遗传易感性相关($P < 0.05$),且rs2899292(A/G)位点变异与甲型H1N1易感性有关($P < 0.05$),rs4820294(G/A)位点变异与乙型流感易感性有关($P < 0.05$)。结论:LGALS1基因位点多态性与甲型H1N1和乙型流感易感性相关,但与其与季节性流感H3N2易感性的关系,需要进一步扩大样本量进行探讨。

[关键词] 半乳糖凝集素1;单核苷酸多态性;流感易感性;关联分析

[中图分类号] R511.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)10-1525-05

doi:10.7655/NYDXBNS20201022

Correlation analysis between LGALS1 gene polymorphism and influenza susceptibility

HE Yan¹, SONG Yue¹, DU Guoping², NI Qian¹, LI Wei¹, WEI Pingmin^{1*}

¹School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009; ²Department of Internal Medicine, Southeast University Hospital, Southeast University, Nanjing 210018, China

[Abstract] **Objective:** To explore the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of LGALS1 gene and susceptibility to common influenza infection types in China. **Methods:** A case-control study method was adopted. The influenza-positive cases monitored by Center for Disease Control and Prevention of Jiangsu province were the case group, and the influenza-like cases with a negative laboratory nucleic acid test and healthy people from Nanjing Hospital were the control group from 2015 to 2017. Pharyngeal swabs and blood were collected, gene polymorphism sites were detected by nested PCR and gene sequencing, and genotype distribution and frequency differences were compared between the two groups. **Results:** Rs4820294 (G/A) and rs2899292 (A/G) of LGALS1 were associated with influenza genetic susceptibility ($P < 0.05$), rs2899292 (A/G) was associated with A (H1N1) susceptibility ($P < 0.05$), and rs4820294 (G/A) was associated with B influenza susceptibility ($P < 0.05$), respectively. **Conclusion:** LGALS1 SNP is associated with influenza A (H1N1) and influenza B susceptibility, however, the sample size needs to be further expanded to explore its relationship with seasonal H3N2.

[Key words] LGALS1 (galactosin 1); single nucleotide polymorphism; influenza susceptibility; correlation analysis

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(10):1525-1528, 1533]

流感是目前威胁人类健康的重要传染病,可在高危人群中造成严重疾病和死亡,是重要的公共卫生问题。流感对人类健康造成威胁的主要方式包

括流感大流行和季节性流感。据世界卫生组织(WHO)统计,流感的季节性流行每年造成约29万~65万例与呼吸道疾病相关的死亡^[1],而偶尔的全球大流行仅在1年中就可以感染20%~40%的人口^[2]。流感病毒分为甲型(A型)、乙型(B型)和丙型(C型),目前只有甲型和乙型流感能在人群中传播。其中甲型流感依据其血凝素(HA)和神经氨酸酶

[基金项目] 教育部人文社科研究规划基金(16YJA840014);江苏省教育科学十三五规划重点资助项目(Ta201602)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: mpw1963@126.com

(NA)的不同又分为多个亚型。截至目前已发现18个HA亚型和11个NA亚型,其中H17N10和H18N11在蝙蝠体内发现^[3]。目前在我国流行的季节性流感包括甲型H1N1、H3N2以及乙型流感。

人类感染流感一般表现为自限性或轻症流感,并能在短时间自愈或者临床痊愈,但一部分患者可发展为重症流感并引发一系列并发症甚至死亡^[4]。流感病毒造成的宿主不同结局除了与流感自身的毒力和变异有关,可能还受到宿主自身的遗传因素影响^[5]。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是指在基因水平上由单个核苷酸碱基改变而引起的DNA序列多态性,在人群中发生的频率一般大于1%^[6]。SNP是个体、种群间差异的遗传物质基础之一,目前在探究常见疾病遗传性状及致病机制中发挥着重要作用,甚至成为决定人体应激能力、疾病易感性、症状严重性及治疗反应性差异的关键因素^[7]。半乳糖凝集素(lectin galactoside-binding soluble, LGALS)1,是典型的原型凝集素^[8],在组织中(如胎盘、肺脏、脑、心脏、脾脏、淋巴结等)分布广泛。LGALS不仅与细胞表达的聚糖结构结合,还能与某些微生物表面的聚糖结合,表明他们在病原体识别中作为可溶性模式识别受体发挥作用^[9]。由于流感病毒的HA和NA带有N-连接的寡糖侧链,而LGALS-1是一种 β -半乳糖苷结合蛋白,因此可以与流感病毒结合,抑制流感的复制^[10]。本研究采用病例对照研究方法,探讨LGALS1 SNP与我国人群中常见流感易感性的关系,从宿主遗传基因水平上探讨流感的发病机制。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究基于江苏省流感监测网络,采用病例对照的研究方法,根据《流行性感诊断与治疗指南(2018年版)》对采集样本进行诊断,共收集江苏省疾病预防控制中心2015年9月—2017年12月流感阳性病例83例。此外,从南京市江宁医院获得经实验室核酸检测为阴性的流感阴性病例及健康人群共118例作为对照组,对所有纳入的研究对象采集咽拭子及血液进行流感亚型分析和基因测序分析。

纳入标准:发热38℃及以上、咳嗽或咽痛之一而就诊的门急诊患者或住院患者;流感病毒核酸检测(RT-PCR)结果为甲型或乙型流感病毒阳性;本人或家属知情同意。排除标准:发热38℃以上,伴咳嗽或咽痛症状之一,但缺乏其他实验室确定诊断依

据的病例;自身免疫性疾病患者;入院后血液或痰细菌培养阳性的患者。本研究所有纳入研究对象均获得其知情同意,并通过学校医学伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 病毒的提取和分型

采用自动核酸提取仪(Applied Biosystems公司,美国)从流感阳性病例咽拭子中提取病毒RNA,采用实时荧光定量PCR,通过甲/乙型流感病毒、甲型H1、H3流感病毒核酸检测试剂盒(泰州硕世生物科技有限公司)进行病毒分型。

1.2.2 LGALS1基因SNP的选择

从NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)SNP数据库查找LGALS1基因所有的SNP,同时搜集相关文献,选取在中国人群中位基因频率高于0.05的rs482029和rs2899292进行分析。

1.2.3 LGALS1基因SNP分析

采用QIAamp DNA Blood Mini Kit试剂盒(Qiagen公司,德国)从血液或咽拭子样本中提取研究对象DNA,利用巢式PCR及基因测序等技术对基因多态性位点进行分型检测。

根据文献及引物设计软件Primer5.0设计扩增引物,并由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,所有引物均经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化,LGALS1基因rs4820294位点上游引物:5'-ACCCTGGGC-CATCTCCTAA-3',下游引物:5'-CTCCACCTCCC-CACCAAAT-3';rs2899292位点上游引物:5'-AC-CAGCTGTGAGTAGGTCTCT-3',下游引物:5'-TGAGTGTGAGCCAGTGTAGG-3'。分型结果判定:从GenBank网站下载对应位点序列,使用DNASar软件将测序成功的样本序列与标准序列进行比对拼接,根据峰图判断目标突变位点的基因型。

1.3 统计学方法

采用SPSS22.0软件进行统计分析。研究对象人口学特征采用 χ^2 检验、独立样本 t 检验;哈迪-温伯格平衡检验评估调查对象及资料的可靠性;单因素Logistic回归分析基因多态性与流感发病风险的关联。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本人口学特征

本研究共纳入研究对象201例,其中病例组83例,对照组118例;病例组男46例,女37例,年龄(41.7 \pm 2.2)岁;对照组男62例,女56例,年龄(46.1 \pm

1.3)岁,两组年龄和性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。从流感亚型的角度看,83例流感患者中,12例(14.46%)为甲型H1N1亚型;61例(73.49%)为季节性H3N2亚型;10例(12.05%)为乙型流感。

2.2 哈迪-温伯格遗传平衡法则检验

以 $P > 0.05$ 为标准判断调查的群体是否达到遗传平衡,在群体中是否稳定遗传,结果见表1, LGALS1基因的rs4820294和rs2899292位点变异在对照中群体基因遗传稳定,有代表性。

表1 哈迪-温伯格遗传平衡检验
Table 1 Hardy-Weinberg genetic equilibrium test

SNP位点	基因型	病例组[n(%)]	对照组[n(%)]	理论值	χ^2 值	P值
rs4820294	AA	2(2.41)	6(5.08)	3.917	1.656	0.20
	AG	38(45.78)	31(26.27)	35.170		
	GG	43(51.81)	81(68.65)	78.917		
rs2899292	AA	17(20.48)	35(29.66)	39.186	2.491	0.11
	AG	41(49.40)	66(55.93)	57.630		
	GG	25(30.12)	17(14.41)	21.186		

2.3 SNP关联分析

单因素 Logistic 回归分析结果显示(表2), LGALS1基因rs4820294(G/A)及rs2899292(A/G)位点突变与流感的发生有关,与GG基因型相比,rs4820294位点AG基因型感染流感的风险提高了1.31倍(OR=2.31,95%CI:1.27~4.21)。与AA基因型相比,rs2899292位点GG基因型感染流感的风险提高了3.2倍(OR=4.20,95%CI:1.42~12.28)。

表2 LGALS1单核苷酸多态性关联分析
Table 2 Association analysis of single nucleotide polymorphisms in LGALS1 gene

位点	基因型	病例组 [n(%)]	对照组 [n(%)]	OR	95%CI
rs4820294	GG	43(34.68)	81(65.32)	1.00	—
	AG	38(55.07)	31(44.93)	2.31	1.27~4.21
	AA	2(25.00)	6(75.00)	0.63	0.12~3.25
rs2899292	AA	17(32.69)	35(67.31)	1.00	—
	AG	41(38.32)	66(61.68)	1.26	0.51~3.10
	GG	25(59.52)	17(40.48)	4.20	1.42~12.38

2.4 常见亚型流感相关的SNP位点关联分析

如表3所示,甲型H1N1流感亚型LGALS1基因rs2899292位点AA、AG、GG基因型频率在病例组与对照组差异具有统计学意义($\chi^2=9.995, P=0.008$),其中病例组AA、AG、GG基因型的频率分别为8.33%、41.67%和50.00%,对照组中相应基因型频率分别为29.60%、55.93%、14.41%。等位基因A和G在甲型H1N1流感病例组与对照组间的频率分布差异有统计学意义(A:29.17% vs. 57.63%; G:70.83% vs. 42.37%; $\chi^2=7.129, P=0.008$)。

乙型流感中rs4820294位点基因型在两组间分布差异有统计学意义($\chi^2=9.709, P=0.014$),病例组中AA、AG、GG基因型的频率分别为10.00%、70.00%和20.00%,在对照组中基因频率分别为5.08%、26.27%和68.64%。等位基因A和G在乙型流感病例组与对照组间的频率分布差异有统计学意义(A:45.00% vs. 18.30%; G:55.00% vs. 82.13%; $\chi^2=8.169, P=0.008$)。

LGALS1基因rs2899292位点和rs4820294位点在季节性H3N2亚型流感中的各基因型分布差异无统计学意义($P=0.053$)。

3 讨论

流行性感是一种全球性传染病,人群普遍易感,流感病程具有自限性,但同时流感又可在高危人群中造成严重疾病甚至死亡。在流感发生发展过程中,除了流感病毒自身毒力和剂量影响宿主反应外,宿主自身的某些关键因子,如细胞表面受体、胞内信号转导分子以及与炎症因子等免疫相关因子在某种程度上决定着机体感染疾病后的最终转归^[11]。这些关键因子在基因水平上的变异构成了流感基因多态性的遗传背景。既往研究多从流感病毒角度开展相关致病机制研究,忽视了患者遗传差异在流感发生发展中的作用。本研究发现LGALS1基因多态性与流感易感性有关,为进一步探索流感病毒入侵人体的致病机制及流感防治工作提供依据。

LGALS1包含保守的碳水化合物识别域,用于识别各种微生物表面不同的碳水化合物^[12]。LGALS

表3 LGALS1与流感相关SNP位点关联分析

Table 3 Association analysis between LGALS1 and SNP sites related with different influenza types [n(%)]

位点	基因型	H1N1 流感		χ^2 值	P值	H3N2 流感		χ^2 值	P值	乙型流感		χ^2 值	P值
		病例组	对照组			病例组	对照组			病例组	对照组		
rs4820294				—	0.380*			5.640	0.053			9.709	0.014
	AA	0(0.00)	6(5.08)			1(1.64)	6(5.08)			1(10.00)	6(5.08)		
	AG	5(41.67)	31(26.27)			26(42.62)	31(26.27)			7(70.00)	31(26.27)		
	GG	7(58.33)	81(68.64)			34(55.74)	81(68.64)			2(20.00)	81(68.64)		
rs2899292				9.995	0.008			5.885	0.053			0.745	0.661
	AA	1(8.33)	35(29.66)			14(22.95)	35(29.66)			2(20.00)	35(29.66)		
	AG	5(41.67)	66(55.93)			29(47.57)	66(55.93)			7(70.00)	66(55.93)		
	GG	6(50.00)	17(14.41)			18(29.51)	17(14.41)			1(10.00)	17(14.41)		

*Fisher确切概率法。

是存在于黏膜分泌物和血清中的C型胶原凝集素家族,在保护宿主免受病原体入侵和提高其清除率方面发挥着作用。研究表明^[13],LGALS1在机体固有免疫、适应性免疫和肿瘤的发展、转移中发挥着重要作用。在固有免疫中调节中性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞功能;适应性免疫中,在T细胞存活、免疫调节和炎症、肿瘤发生发展及免疫逃逸中扮演着重要角色。HA和NA是流感病毒致病性的两个决定性因素。HA通过将病毒与宿主细胞表面含唾液酸的聚糖结合,并通过膜融合促进病毒基因组的渗透而在感染的起始中起双重作用。NA切割病毒糖蛋白上的唾液酸,从而防止结块并促进病毒释放^[14]。这两种病毒表面糖蛋白也是宿主固有免疫和适应性免疫应答的重要靶标。LGALS通过限制病毒感染和防止压倒性炎症而在针对流感病毒感染的先天免疫反应中发挥作用^[15]。

本研究发现, LGALS1基因位点突变与流感易感性相关,其中rs2899292(A/G)位点突变可致机体对甲型H1N1易感,rs4820294(G/A)位点变异与乙型流感易感性有关。这一研究结果在动物实验中也得到证实, Yang等^[15]通过基因敲除发现LGALS1敲除小鼠比野生型小鼠更容易感染流感病毒。陈永坤^[16]的研究发现, LGALS1基因rs2899292-GG基因型可能与H3N2流感重症感染有关。在本研究可能受到样本量的限制尚未发现LGALS1基因相关位点突变与H3N2流感易感性的关系(P=0.053)。但有学者提出rs2899292和rs4820294 GG基因型是人感染H7N9禽流感的保护性因素^[17]。这与本研究以及陈永坤^[16]研究结论存在差异,可能与研究样本量及研究方法不同有关,因此rs2899292位点突变与流感易感性真实关系还需要在不同流感亚型及进

一步扩大样本的情况下进行深入研究。

流感的发生发展是由病毒和宿主遗传背景相互作用的复杂因素决定的^[11,18],既往研究对于流感病毒引起疾病机制已有一定认识和了解,但对于宿主遗传背景影响疾病转归方面却知之甚少。本研究通过分析LGALS1基因多态性与流感遗传易感性的关系,为相关研究提供了理论基础,并为今后的流感防治提供了新的思路。但本研究纳入的样本量有限,获得的研究结果及结论需要再进一步扩大样本量进行验证,以期获得更可信的科学理论。

[参考文献]

[1] TAUBENBERGER J K, MORENS D M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(1):15-22

[2] TAUBENBERGER J K, REID A H, JANCZEWSKI T A, et al. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001, 356(1416):1829-1839

[3] SRIVASTAVARI B, BLAZEJEWSKA P, HESSMANN M, et al. Host genetic background strongly influences there sponse to influenza a virus infections [J]. PLoS One, 2009, 4:4857

[4] 卫生部流行性感 冒诊断与治疗指南编撰专家组. 流行性感 冒诊断与治疗指南(2011年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(10):725-734

[5] SHORT K R, KEDZIERSKA K, VAN DE SANDT C E. Back to the future: lessons learned from the 1918 influenza pandemic[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8:343

[6] KATSONIS P, KOIRE A, WILSON S J, et al. Single nucleotide variations: biological impact and theoretical interpretation[J]. Protein Sci, 2014, 23(12):1650-1666

(下转第1533页)

- ity testing-twenty-ninth edition: M100[S]. 2019
- [8] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing-twenty-sixth edition: M100[S]. 2018
- [9] LI Y, SHEN H, ZHU C, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenem-resistant infections among ICU admission patients in central China: prevalence and prediction model [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019:9767313
- [10] WANG Q, WANG XJ, WANG J, et al. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: data from a longitudinal large-scale CRE study in China(2012-2016)[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(S2):S196-205
- [11] 谭善娟,李玲,邱蔓,等. 多学科协作联合集束化管理对ICU多重耐药菌感染预防的效果[J]. *中国感染控制杂志*, 2018, 17(2):156-159
- [12] 程国平,简雪峰,许德英,等. MALDI-TOF MS在碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌流行病学分析中的应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(1):62-66
- [13] ZHANG Y W, ZENG J, LIU W N, et al. Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China [J]. *J Infect*, 2015, 71:553-560
- [14] ZHANG Y W, JIN L Y, OUYANG P W, et al. Evolution of hypervirulence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a multicentre, molecular epidemiological analysis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75:327-336
- [收稿日期] 2020-03-07

(上接第1528页)

- [7] 余韬,吕飒丽,李岩. 二代测序技术分析SNP在法医学上的应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(11):1686-1691
- [8] 刘健楠. 半乳糖凝集素-1病理生理作用的研究进展[J]. *南方农业*, 2016, 10(3):164-165
- [9] THIEMANN S, BAUM L G. Galectins and immune responses-Just how do they do those things they do?[J]. *Annu Rev Immunol*, 2016, 34:243-264
- [10] NITA-LAZAR M, BANERJEE A, FENG C, et al. Desialylation of airway epithelial cells during influenza virus infection enhances pneumococcal adhesion via galectin binding[J]. *Mol Immunol*, 2015, 65(1):1-16
- [11] 康晓蕾,林海洋,张剑琿. 流感基因多态性的研究进展[J]. *医学综述*, 2014, 20(12):2121-2123
- [12] BERTLEFF-ZIESCHANN N, BECHOLD J, GRIMM C, et al. exploring the structural space of the galectin-1-ligand interaction[J]. *Chem Bio Chem*, 2017, 18(15):1477-1481
- [13] 刘健楠. 半乳糖凝集素-1病理生理作用的研究进展[J]. *南方农业*, 2016, 10(3):164-165
- [14] NITA-LAZAR M, BANERJEE A, FENG C, et al. Galectins regulate the inflammatory response in airway epithelial cells exposed to microbial neuraminidase by modulating the expression of SOCS1 and RIG1 [J]. *Mol Immunol*, 2015, 68(2 Pt A):194-202
- [15] YANG M L, CHEN Y H, WANG S W, et al. Galectin-1 binds to influenza virus and ameliorates influenza virus pathogenesis [J]. *J Virol*, 2011, 85(19):10010-10020
- [16] 陈永坤. 影响流感临床严重程度的病毒及宿主相关因素研究[D]. 中国疾病预防控制中心, 2017
- [17] CHEN Y, ZHOU J, CHENG Z, et al. Functional variants regulating LGALS1 (Galectin 1) expression affect human susceptibility to influenza A (H7N9) [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8517
- [18] 宋玥,杜国平,颜文娟,等. 甲型流感易感基因单核苷酸多态性的研究进展[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(9):1326-1330
- [收稿日期] 2019-11-10