

- [14] Chan KC, Ding C, Gerovassili A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis [J]. Clin Chem, 2006, 52(12): 2211-2218.
- [15] Old RW, Crea F, Puszyk W, et al. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome[J]. Reprod Biomed Online, 2007, 15(2): 227-235.
- [16] Chim SS, Jin S, Lee TY, et al. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21; toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21[J]. Clin Chem, 2008, 54(3): 500-511.
- [17] Tong YK, Jin S, Chiu S, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach [J]. Clin Chem, 2010, 56(1): 90-98.
- [18] Lun F, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(50): 19920-19925.
- [19] Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(51): 20458-20463.
- [20] Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis in 2020[J]. Prenat Diagn, 2010, 30(7): 702-703.
- [21] Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2000, 46(11): 1832-1834.
- [22] Tsui NB, Chim S S, Chiu RW, et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling[J]. J Med Genet, 2004, 41(6): 461-467.
- [23] Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection[J]. Nat Med, 2007, 13(2): 218-223.
- [24] Tsui NB, Wong BC, Leung TY, et al. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study[J]. Prenat Diagn, 2009, 29(11): 1031-1037.
- [25] Go AT, Visser A, Betsalel OT, et al. Measurement of allelic-expression ratios in trisomy 21 placentas by quencher extension of heterozygous samples identified by partially denaturing HPLC [J]. Clin Chem, 2008, 54(2): 437-440.
- [26] Chim SS, Shing TK, Hung EC, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2008, 54(3): 482-490.

(收稿日期: 2011-02-04)

• 综 述 •

麻疹病毒病原学最新研究进展及其变异对疫苗保护性的影响

任增志 综述, 许红梅[△] 审校

(重庆医科大学儿童医院感染消化科 400014)

关键词: 麻疹病毒; 疫苗; 变异(遗传学); 病原学

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 08. 025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)08-0879-03

麻疹(measles)是麻疹病毒(measles virus, MV)引起的急性呼吸道传染病,是常见的传染病之一,为全球性传染病,世界上大部分地区均有此病流行的报道。该病主要发生在 5 岁以下婴幼儿,可引起发热、上呼吸道感染、结膜炎、口腔麻疹黏膜斑又称柯氏斑(koplik's spot)以及皮肤特殊性斑丘疹。个别的患者可引起肺炎、喉炎、心肌炎等严重并发症。

1 麻疹病毒病原学

麻疹是由 MV 引起的疾病。MV 属副粘病,为单股负链 RNA 病毒,长度为 15 893 bp,有 6 个结构基因,编码 6 个结构蛋白。从 3 端开始依次为:核蛋白(N)60×10³、磷酸蛋白(P)72×10³、基质蛋白(M)37×10³、融合蛋白(F)60×10³、血凝素蛋白(H)78×10³~80×10³及依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(L)210×10³。另外 P 基因还编码 V 蛋白和 C 蛋白,他们都是无结构蛋白。各蛋白在 N 蛋白的基因包装、复制和表达方面起主要作用,并使病毒的基因组壳体化。在麻疹病毒急性感染期主要是 N 蛋白介导人体的细胞和体液免疫,然而它也同时引起体内的免疫抑制,同时 N 蛋白还可结合 eIF3-p40 进而抑制宿主翻译^[1],另外 N 蛋白还可通过其磷酸位点的磷酸化作用促进病毒 mRNA 的转录和基因组的复制^[2]。

P 蛋白为聚合酶结合蛋白,它参与 RNA 的包膜和调控 N 蛋白的细胞定位。V 蛋白和 C 蛋白,在细胞毒素细胞上生长

时不起作用但是在病毒的致病性方面起一定的作用。类浆细胞树突状细胞的重要作用是在病毒感染机体后激活免疫反应刺激 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)后其强大的表达 α-干扰素(interferonα, IFN-α)的作用进而抑制病毒入侵。但是 MV V 蛋白通过抑制 Ik B 激酶 α(Ik B kinaseα, IKKα)和 IFN 调节因子 7(IFN regulatory factor 7, IRF7)的活性进而阻断 TLR 介导的 IFN 的产生,使机体处于免疫抑制状态从而促进 MV 的入侵;C 蛋白并不直接抑制 IFN 的产生,通过影响病毒聚合酶的活性进而调节 MV RNA 的转录、复制和合成,作为间接抑制 IFN 诱导的途径^[3-4]。但是 V 蛋白抑制作用比 C 更强^[5]。此外 C 蛋白还是 MV 在体内复制时必需的蛋白并且可以在细胞核和细胞质之间自由穿梭^[6-7]。

M 蛋白、F 蛋白和 H 蛋白共同形成病毒的外膜。M 蛋白能下调病毒聚合酶的活性进而影响到 MV mRNA 的转录和基因组的复制^[8],另外 M 蛋白还通过和 H 蛋白胞质尾部相互作用影响病毒的组装和细胞间的融合进而调节 MV 在不同类型细胞上的生长和通过与 N 蛋白相互作用调节 MV RNA 的合成和组装。F 蛋白的核苷酸序列保守,是副粘病毒科成员共有的特征蛋白。F 蛋白能激活体内替代的补体途径,并在病毒入侵细胞过程中起融合细胞膜的作用。H 蛋白和 F 蛋白组成糖蛋白复合物在麻疹病毒入侵时起受体结合和融合细胞膜的

[△] 通讯作者, E-mail: xuhongmwp@x@yahoo. com。

作用。*H* 基因是麻疹病毒的重要抗原基因, *H* 蛋白能激活 Toll 样受体 2 依赖性信号促进人体免疫激活还能上调 MV 受体促进病毒传播和增强其致病力, 但是也有报道称在 MV 感染时 *H* 蛋白能下调宿主细胞表面淋巴细胞活化信号分子(signaling lymphocyte activation molecule, SLAM) 的表达。*H* 蛋白含细胞受体结合位点, 主要是通过 S429、T436 和 H437 等结合位点与 SLAM 受体结合^[9], 还能与宿主细胞的麻疹受体 CD46 结合, 启动病毒的感染过程, 其有引起机体产生抗体的抗原位点, 能产生中和抗体以阻止病毒与人细胞 MV 受体结合, 在抗感染过程中起着非常重要的作用^[10]。

2 麻疹病毒变异

长期以来研究者一直认为 MV 是遗传比较稳定的病毒只有单一的血清型, 但是自从 20 世纪 80 年代以来国内外陆续有报道称发现了 MV 的变异, 即当前分离到的麻疹野毒株和 50~60 年代分离的病毒及用于疫苗研制的病毒株之间的差异。突出的表现为没有血凝和血吸附特性, 细胞培养时敏感范围变小、*H* 蛋白相对分子质量的变化和对其核苷酸序列分析后发现的基因变异。在 MV 基因组中, *F*、*M*、*L* 基因相对比较稳定, 不同麻疹野毒株之间的核苷酸变异主要发生在血凝素蛋白(hemagglutinin, HA) 和 *N* 蛋白基因。

2.1 *H* 蛋白 *H* 蛋白是一种位于病毒包膜上的糖蛋白, 由 617 个氨基酸组成。*H* 蛋白的变异最早由 Birrer 等发现并报道, 用两种抗 MV 血凝素单克隆抗体(*H*-1 和 F20) 对疫苗株和野毒株进行抗原性分析, 发现野毒株不能与 F20 结合首次证明了 MV 的抗原性变异。在核苷酸水平上 1977 年分离的 JM 株与 Moraten 疫苗株相比, *H* 蛋白氨基酸变异为 10 个, 核苷酸变异为 27 个。到了 1989 年在美国分离的野毒株与 Moraten 疫苗株相比, 核苷酸变异达到了 54~56 个而氨基酸变异也达到了 18~19 个, 这都提示了其变化有加速趋势。而李海峰^[11]等对中国 MV *H* 基因的变异速率计算后发现, 表现为近十年的变异率大约为前三十年变异率的 1.4 倍, 也证实了麻疹病毒变异的加快。黄志成等^[12]对杭州市 2006 年分离 MV *H* 基因序列分析发现, 分离株与近年来浙江分离株(浙江 CHN/9.05/7、浙江 CHN/02/2) 相比, 变化不大, 但是与疫苗株 CAM-70 的核苷酸相比有 49 个不同, 相似性为 94.93%; Changchun-47 有 48 个不同, 相似性为 95.04%; Moraten、Schwarz、Shanghai-191 均有 46 个不同, 相似性为 95.14%。Zhou 等^[13]对吉林省 2001~2008 年流行的 5 个代表株与疫苗株 S191 比较时发现了 89~95 个核苷酸变异和 25~30 个氨基酸变异, 并且 *H* 基因的变异还在逐年积累, 这些都表明了 *H* 蛋白基因的变异。

MV *H* 基因和疫苗株相比发生了明显的变化, 这种变异的速率还在加快。*H* 蛋白是 MV 的重要抗原蛋白, 是抗体对抗病毒的重要靶位。对抗 MV 最重要的中和性抗体和保护性抗体都是直接对抗 *H* 蛋白^[14], *H* 蛋白的变异已经影响了麻疹疫苗的免疫保护性效果。

2.2 *N* 蛋白 在所有 MV 基因中 *N* 基因变异最大, 尤其是其末端的 450 bp 最大变异可达到 12%。在国内, 对 2006 年杭州分离的 MV *N* 基因序列分析时发现: 与浙江 CHN/9.05/7 (2005 年分离株) 的核苷酸有 5 个不同, 相似性 98.96%; CHN/02/2 (2004 年分离株) 有 19 个氨基酸不同, 相似性 96.04%; 与 Shanghai-191、Schwarz、Moraten、Changchun-47、CAM-70 均有 26 个氨基酸不同, 相似性 94.58%^[13]。有学者对中国 6 省 2005 年麻疹病毒分离株分子进行了特征分析, 发

现野毒株与中国疫苗株的核苷酸同源性仅为 88.7%~92.5%, 氨基酸同源性为 88.0%~91.2%。金成录等^[15]对 2005~2006 年长春地区流行株 *N* 蛋白序列特征分析时发现, 11 个标本的 *N* 基因序列完全相同但是不同与疫苗株长春-47。两年之间的流行株差异率为 0.4%。与世界其他的 22 个麻疹代表株的差异率为 6.6%~10.9%。

2.3 *M* 蛋白 与其他蛋白相比 *M* 蛋白相对较保守变异较小。Jiang 等^[16]从 SSPE 患者分离到的 MV *M* 蛋白上发现了 3 个氨基酸变异分别是 L165P、L250P、Y282H, 这些变异改变了 *M* 蛋白的可溶性和亚细胞定位。

2.4 其他蛋白 其他蛋白的变异较小但是有学者对疫苗株和野毒株的聚合酶活性进行对比性分析时发现, 野毒株的聚合酶活性明显低于疫苗株, 还发现了 *L* 基因核苷酸序列的变异和 *L* 蛋白上数个氨基酸的替换。有研究者分析 MV 野毒株和疫苗株的 *P* 蛋白和 *C* 蛋白活性时发现, 野毒株 *P* 蛋白刺激转录和复制的速度是疫苗株的 4~6 倍, 并且还发现了 *P* 蛋白上 10~16 个氨基酸的改变和 *C* 蛋白上的 3~4 个氨基酸的改变。

因此, 在 MV 所有基因组中 *H*、*N* 基因变异最大, 但是其他基因也有变异, 为了更好地控制和消灭麻疹, 应该在重点监测 *H*、*N* 基因变异的同时监测其他基因的变异情况, 为应对麻疹提供有利的流行病学监测。

3 MV 变异对现行疫苗保护性的影响

3.1 麻疹疫苗一般概况 麻疹是严重危害儿童健康的传染病之一, 在疫苗发明前经常是儿童期传染病发病率和死亡率的首位病因。自从 20 世纪 60 年代麻疹减毒活疫苗研制成功推广以后, 麻疹的发病率和死亡率明显下降。麻疹曾一度得到控制。但是由于麻疹病毒变异对疫苗保护性的影响使得近几年麻疹的发病率又有所上升, 而且患者的发病年龄和流行特征也有所变化。中国使用的疫苗株主要是沪 191 株和长春-47 株。在接种 MV 疫苗后和麻疹野毒株感染一样, 产生细胞免疫和体液免疫从而有良好的抗感染能力, 也同时形成病毒血症。惟一不同的是自然感染时为野毒株致病性强, 而疫苗株是经过减毒降低了致病性而保留了免疫原性。

3.2 现行疫苗的保护效果分析 自从发现 MV 变异后研究者就开始注意观察期对疫苗保护性的影响。徐闻青等^[17]发现麻疹免疫者产生的中和抗体水平明显低于自然感染者, 两者的麻疹抗体几何平均滴度(GMT) 分别为: 针对野毒株 1:9.56 和 1:22.40, 针对疫苗株 1:40.05 和 1:65.41, 相差 2.9~4.2 倍; 通过疫苗产生的抗体中和野毒株的能力平均低于疫苗株 4.2 倍。这些都说明了麻疹减毒活疫苗的保护性有所降低。但同时刘毅等^[18]对陕西省 2008 年 MV 减毒活疫苗强化免疫实施后的麻疹发病控制效果评估时发现, 在 MV 强化免疫前 8 个月龄至 14 岁组的 MV 抗体 GMC 和阳性率都较低为 (1 465±4.51) mIU/mL 和 89.78%; 但是在强化免疫后 MV 抗体 GMC 和阳性率为 (2 270.38±3.02) mIU/mL 和 98.68% 均显著高于 MV 强化免疫前, 并且各年龄组麻疹抗体 GMC 远大于 MV 抗体的保护水平。2008 年陕西省麻疹报告发病率为 1.96/10 万显著低于往年。这说明 MV 强化后免疫效果显著。冯德杰等^[19]对疫苗株 S191 *N* 基因稳定性及免疫细胞表位分析时发现, S191 与世界流行株的同源性达 94.7%~99.4%, 和中国流行株代表序列的同源性为 95.0%~95.4%。并且中国流行株代表 H1a 有 1 个辅助性 T 细胞表位和 3 个 CD8T 表位内的氨基酸保持不变, S191 株共 4 个重要 T 细胞表位和中国流行株仍然保持一致说明中国流行株和 S191 仍共同保留了一

些重要的抗原表位。所以无论从序列同源性到氨基酸关键点都表明现行疫苗仍有一定的保护力。

因此, MV 基因变异引起的抗原改变在一定程度上影响了现行疫苗的保护性, 使得近几年的发病率又有所上升。但是现行疫苗还有一定的保护能力, 可以通过强化免疫等手段提高整个人群体内抗体水平阻断麻疹的传播。同时应根据现行的流行株加紧研制保护性更好的新型疫苗。

4 问题与展望

自泛美卫生组织率先提出到 2000 年美洲区实现消灭麻疹的目标以来, 各国通过不断的努力都取得了实质性的进展。并且美洲区已于 2000 年实现了麻疹消灭的目标, 而中国所在的西太平洋地区也提出了在 2012 年消灭麻疹的目标。但是由于麻疹的变异使得现有的疫苗保护性下降, 近几年中国的发病率又有所上升。同时一些输入性病例的出现对中国对麻疹发病率的控制提出了严峻的挑战。同时中国消除麻疹工作还面临着麻疹疫情回升、免疫空白、免疫失败、流动人口增加、麻疹集中率低下等困难。所以为了更好地做好 2012 年消灭麻疹的工作, 必须加强对麻疹发病的监测, 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术快速诊断并确定流行株基因类型, 做好流行病学监测为控制麻疹的发病率提供依据。同时提高麻疹疫苗接种率并进行强化免疫。基于 MV 变异对疫苗保护性的影响, 加强对 MV 变异的监测仍有重要意义, 同时应根据当前流行株研制保护性更好的疫苗。

参考文献

[1] Sato H, Masuda M, Kanai M, et al. Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40[J]. J Virol, 2007, 81(21):11569-11576.

[2] Hagiwara K, Sato H, Inoue Y, et al. Phosphorylation of measles virus nucleoprotein upregulates the transcriptional activity of minigenomic RNA[J]. J Proteomics, 2008, 8(9):1871-1879.

[3] Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, et al. Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins[J]. J Virology, 2008, 82(17):8296-8306.

[4] Pfaller CK, Conzelmann KK. Measles virus V protein is a decoy substrate for Ikappa B kinase alpha and prevents Toll-like receptor 7/9-mediated interferon induction[J]. J Virology, 2008, 82(24):12365-12373.

[5] Fontana JM, Bankamp B, Bellini WJ, et al. Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus[J]. J Virology, 2008, 374(1):71-81.

[6] Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, et al. Translational inhibition and

increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus[J]. J Virology, 2006, 80(23):11861-11867.

[7] Nishie T, Nagata K, Takeuchi K. The C protein of wild-type measles virus has the ability to shuttle between the nucleus and the cytoplasm[J]. J Microbes Infect, 2007, 9(3):344-354.

[8] Reuter T, Weissbrich B, Schneider-Schaulies S, et al. RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription[J]. J Virology, 2006, 80(12):5951-5957.

[9] Xu Q, Zhang P, Hu C, et al. Identification of amino acid residues involved in the interaction between measles virus Haemagglutinin (MVH) and its human cell receptor (signaling lymphocyte activation molecule, SLAM)[J]. J Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 39(4):406-411.

[10] Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, et al. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(49):19535-19540.

[11] 李海峰, 卢亦愚, 严俊英, 等. 我国麻疹病毒流行株 H 和 N 基因变异速率探讨[J]. 中国病毒学, 2006, 21(6):541-545.

[12] 黄志成, 濮小英, 祝水芬, 等. 2006 年杭州市麻疹病毒分离株 N 和 H 序列分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(2):284-286.

[13] Zhou JH, Du ZS, Chang X. Hemogglutinin gene and amino acid characteristic of measles virus in Jilin province, 2001-2008[J]. Zhongguo Ji Hua Mian Yi, 2009, 15(5):417-422.

[14] de Swart RL, Yüksel S, Langerijs CN, et al. Depletion of measles virus glycoprotein-specific antibodies from human sera reveals genotype-specific neutralizing antibodies[J]. J Gen Virol, 2009, 90(12):2982-2989.

[15] 金成录, 胡钰, 郭淑英. 长春市麻疹病毒流行株 M 和 N 基因特征分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(6):1145-1146.

[16] Jiang DP, Ide YH, Nagano-Fujii M, et al. Single-point mutations of the M protein of a measles virus variant obtained from a patient with subacute sclerosing panencephalitis critically affect solubility and subcellular localization of the M protein and cell-free virus production[J]. J Microbes Infect, 2009, 11(4):467-475.

[17] 徐闻青, 杨忠东, 陈蕾, 等. 麻疹病毒分离及现行疫苗免疫效果分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2008, 14(3):198-202.

[18] 刘毅, 武继守, 候铁军, 等. 2007 年陕西省麻疹减毒活疫苗强化效果评价[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 15(2):71-73.

[19] 冯德杰, 高雪军, 赵雅静, 等. 麻疹病毒 S191 疫苗株 N 基因稳定性研究及免疫细胞表位分析[J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(4):1-6.

(收稿日期:2011-02-07)

• 综述 •

MicroRNAs 在类风湿性疾病发病机制中的研究进展

易 富¹, 蔡敏琪¹, 何后罗², 李 娅³

(1. 中国人民解放军第五十九中心医院检验科, 云南开远 661600; 2. 第二军医大学中医系, 上海 200433; 3. 重庆医科大学检验系, 重庆 400016)

关键词: 微 RNAs; 研究; 类风湿性疾病

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 08. 026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)08-0881-04

类风湿性疾病如骨关节炎、痛风、炎症性关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)等是一类与免疫系统密切相关的疾病, 他们大多数有异质性, 有复杂的临床表现, 患有这些疾病的患者常常会

出现全身性炎症, 并且在特定情况下, 患者还会产生自身抗体, 他们的发病机制复杂, 研究者对其了解得还不多, 这制约了对类风湿性疾病的诊疗。目前, 这类疾病很难根治^[1]。miRNAs