

蒙汉族早产儿呼吸窘迫综合征与 S186N 基因多态性相关性研究

梅花 新春 张钰恒 刘春枝 张亚昱 刘春丽 宋丹 马金柱

【摘要】目的 研究蒙古族、汉族早产儿呼吸窘迫综合征(RDS)与肺表面活性物质蛋白(SP) C 基因外显子 5(exon5)区域基因多态性的相关性。**方法** 选择同时间、同民族和同群体中无血缘关系的蒙古族 RDS 早产儿 50 例(男 31 例,女 19 例)为实验组、汉族 RDS 早产儿 50 例为对照组(男 27 例,女 23 例),分别用聚合酶链式反应(PCR)基因多态性分析和基因检测技术对 SP-C exon5 区域基因进行测序,分别比较两组患儿 SP-C exon5 c.715G>A(S186N)位点基因型频率的差异。**结果** 实验组中检测出 SP-C exon5 区域 c.715G>A(S186N)位点有 3 种基因型,为 GG、AA、AG,三种基因型频率分别为 28%、62% 和 10%,G 等位基因频率为 33%,A 等位基因频率为 67%;对照组三种基因型频率分别为 78%、10% 和 12%,G 等位基因频率为 84%,A 等位基因频率为 16%;两组间 A 等位基因型频率的差异有统计学意义($\chi^2=53.300, P<0.05$)。**结论** 携带 SP-C exon5 区域 c.715G>A(S186N)位点 A 等位基因的蒙古族早产儿患 RDS 的风险更高。

【关键词】 S186N;呼吸窘迫综合征;蒙古族;汉族;早产儿;基因多态性;肺表面活性物质蛋白 C;外显子

The correlation between S186N gene polymorphism and the premature infants with respiratory distress syndrome in Mongolian and Han ethnic Mei Hua, Xin Chun, Zhang Yuheng, Liu Chunzhi, Zhang Yayu, Liu Chunli, Song Dan, Ma Jinzhu

Department of Pediatrics, (Mei H, Xin C, Zhang Yh, Liu Cz, Zhang Yy, Liu Cl, Song D); Department of Surgery, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhehaote, Inner Mongolia 010050 China

Corresponding author: Ma Jinzhu, Email: majinzhu2@sina.com

【Abstract】Objective To study the correlation between pulmonary surfactant protein C exon5 area's gene polymorphism and the premature infants with respiratory distress syndrome (RDS) among Mongolian and Han ethnic in Inner Mongolia District. **Methods** Fifty unrelated Mongolian RDS premature infants (28 weeks \leq gestational age <37 weeks) were recruited as study group (31 male and 19 female), and another 50 unrelated Han ethnic RDS premature infants (28 weeks \leq gestational age <37 weeks) were enrolled at the same time, as control group (27 male and 23 female). Polymerase chain reaction was used for gene polymorphism analysis and gene detection technology was employed to determine the sequence of SP-C gene exon5 area, respectively. At last, the difference in genotype frequency of SP-C gene exon 5 area C. 715G>A(S186 N) was compared between two groups. **Results** There were three genotypes could be checked out from SP-C gene exon 5 area C. 715G>A(S186N)locus; namely GG,AA,AG types, and in study group, genotype frequencies of these three genotypes were 28%, 62% and 10%, respectively, and G allele frequency was 33%, and A allele frequency was 67%. Genotype frequencies in control group were 78%, 10% and 12%, respectively, and G allele frequency was 84%.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.06.008

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 [2015MS(LH)0810;2011MS1111]; 内蒙古医科大学附属医院重大项目资助 (NYFY ZD 008)

作者单位: 010050 呼和浩特, 内蒙古医科大学附属医院新生儿科 (梅花、新春、张钰恒、刘春枝、张亚昱、刘春丽、宋丹); 普外科 (马金柱)

通信作者: 马金柱, Email: majinzhu2@sina.com

A allele frequency was 16%. The A allele genotype frequency in study group at SP-C exon 5 area C. 715G>A(S186N) significantly higher than that in control group. There was statistically significant difference in alleles variations between two groups ($\chi^2 = 53.300, P < 0.05$). **Conclusions** SP-C exon 5 area C. 715G>A(S186N) locus polymorphism related to Inner Mongolia Mongolian premature RDS. Individuals carrying SP-C exon 5 area C. 715G>A(S186N) A alleles have higher risk of suffering from RDS.

【Key Words】 S186N; Respiratory distress syndrome; Mongolian nationality; Han nationality; premature infants; Gene polymorphism; Pulmonary surfactant surfactant protein C; Exon

肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 的主要成分为肺表面活性物质蛋白 (surfactant protein, SP) 和磷脂。SP 包含 4 种亚型, 分别为 SP-A、SP-B、SP-C 与 SP-D。其中 SP-C 与呼吸窘迫综合征 (respiratory distress syndrome, RDS) 的发生有着密切关联。PS 的活性、功能与 SP-C 浓度和活性密切相关^[1-2]。SP-C 协助 PS 在肺泡表面的分布并维持其稳定性, 参与降低肺泡表面张力^[3]。SP-C 等位基因改变与发生 RDS 密切相关, 目前国内学者对 SP-C 基因多态性与 RDS 的相关性也有部分研究^[4-5]。本研究比较蒙古族、汉族早产 RDS 患儿 exon5 区域 c.715G>A(S186N) 位点基因型频率, 分析其与发生 RDS 的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

以 2013 年 9 月至 2016 年 1 月在本院新生儿病房住院治疗的蒙古族 RDS 早产儿为实验组 (RDS 组), 入组标准: ①出生体质量 1 000~5 000 g, 28 周 ≤ 胎龄 < 37 周早产儿, 性别比率大致均衡; ②各入选患儿间无血缘关系; ③符合欧洲颁布的 RDS 诊断标准^[1]: 生后不久呼吸困难进行性加重伴血氧下降, 需要吸氧才能维持 PaO₂>50 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa), 吸空气时 PaO₂<50 mmHg 或有中心性发绀, 同时有特异性胸片改变。以同期住院治疗的汉族 RDS 患儿为对照组。

排除标准: ①遗传代谢性疾病患儿; ②严重先天性疾病患儿; ③生后窒息患儿; ④母亲妊娠期糖尿病; ⑤母亲孕期有明确感染史。

本研究经医院医学伦理委员会批准, 血液样本采集均获得患儿家属知情同意。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 收集及挑选样本相关临床资料, 如姓名、性别、出生体质量及胎龄等。抽取各样本静脉血 1.0 mL, 放置抗凝管 (EDTA K2) 抗凝, 置 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 各样本基因组 DNA 的提取, 浓度测定及 PCR 扩增 取 1.0 mL 静脉血按血液基因组 DNA 提取试剂盒 Tanami Blood DNA Kit (离心柱型 - 目录号: DP318, 北京安美生医药科技有限公司, 中国) 的操作说明书进行基因组 DNA 提取。将提取 DNA 浓度用 Thermo 仪器检测 (北京安美生医药科技有限公司, 中国), 每次使用 1 μL DNA 液。DNA 浓度用 ng/μL 表示, >25 ng/μL 以上说明所提取 DNA 浓度较高。从样本所提取出的 DNA 总量当中取出 1~2 μL 作为待扩增的基因; 委托北京安美生医药科技有限公司合成的每一对引物可扩增长度为 700 bp, 将 SP-C 基因 exon5 区域全长分段扩增。按照 TAKARA PCR Amplification Kit (Code No.: DR011, 北京安美生医药科技有限公司, 中国) 试剂盒的说明进行 PCR 实验。PCR 反应体系: 6.25 μL 灭菌水、4 μL DNTP、12.5 μL GCI、0.5 μL 上游引物、0.5 μL 下游引物、1 μL DNA、0.25 μL LA Taw 酶。PCR 的循环参数: 预变性 94℃ 5 min; 变性 94℃ 30 s、退火 52℃ 45 s、72℃ 延伸 7 min, 循环 35 次。特异扩增 SFTPC exon5 的引物见表 1。

1.2.3 DNA 目的片段的序列测定及采用 PCR-RFLP 技术检测多态性 取待测序样本及上下游引物各 20 μL, 干冰保存寄送至北京安美生医药科技有限公司, 对 SP-C exon5 区域基因进行序列测定。应用 NCBI 数据库中的 BLAST 应用程序, 将测序结果与数据库中的 SP-C 基因序列进行比对, SP-C

表 1 特异扩增 SFTPB、SFTPC exon5 的引物

Table 1 Primers for specific amplification of SFTPB and SFTPC exon5

扩增区域	引物序列	BP	Tm	GC%	扩增片段	测序所用引物
SFTPC-E3-4F	ggaaag agggagcgc attgagtac	26	67.9	50	666	R
SFTPC-E3-4R	ctggcagccaat gaggacagtg	23	68.3	56.5		

基因 exon5 区域 c.715G>A (S186N) 位点基因多态性分析。

1.3 统计学方法

应用美国 SPSS13.0 版本统计软件作统计分析。计量资料数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用成组 *t* 检验; 计数资料以百分比或率表示, 采用四格表 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

入选的 50 例实验组中, 男 31 例、女 19 例, 胎龄 29 周⁺~36 周⁺, 出生体质量 1 000~4 550 g, 剖宫产 36 例, 规律胎肺成熟 38 例。入选的 50 例对照组中, 男 27 例、女 23 例, 胎龄 31 周⁺~36 周⁺, 出生体质量 1 063~3 300 g, 剖宫产 31 例, 规律胎肺成熟 35 例。两组研究对象以上几项一般情况比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.2 基因型频率比较

实验组中检测出 SP-C 基因 exon5 区域 c.715G>A (S186N) 位点可检出三种基因型: 即

表 2 实验组与对照组患儿一般情况比较

Table 2 Comparison of general data of experiment group and control group

组别	例数	性别 (男/女)	胎龄 ($\bar{x} \pm s$, 周)	出生体质量 ($\bar{x} \pm s$, g)	出生方式 剖宫产/经产道	是否规律促肺 (是/否)
实验组	50	31/19	33.54 ± 2.04	2024.80 ± 659	36/14	38/12
对照组	50	27/23	34.11 ± 1.35	2166.26 ± 510	31/19	35/15
χ^2/t 值		0.657	1.644	1.200	1.131	0.457
<i>P</i> 值		0.418	0.103	0.233	0.288	0.499

注: $P < 0.05$ 有统计学意义

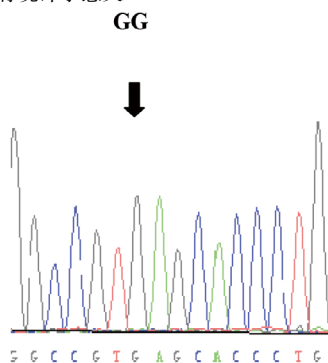


图 1 SP-C exon5 区域 c.715G>A (S186N) 位点基因多态性碱基序列图

Fig 1 Gene polymorphic sequence map of exon5 region c. 715G > A (S186N)

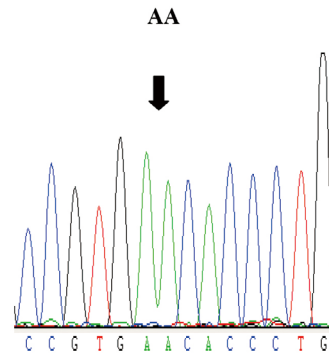


图 2 SP-C exon5 区域 c.715G>A (S186N) 位点基因多态性碱基序列图

Fig 2 Gene polymorphic sequence map of exon5 region c. 715G > A (S186N)

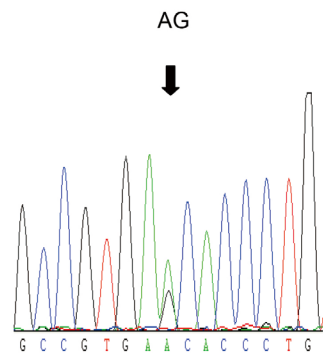


图 3 SP-C exon5 区域 c.715G>A (S186N) 位点基因多态性碱基序列图

Fig 3 Gene polymorphic sequence map of exon5 region c. 715G > A (S186N)

位基因频率为 33%, A 等位基因频率为 67%; 对照组此三种基因型频率分别为 78%、10% 和 12%, G 等位基因频率为 84%, A 等位基因频率为 16%; 实验组 A 等位基因型频率高于对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2=53.300, P < 0.05$) 见表 3。

表 3 2 组患儿 SP-C 基因 exon5 区域 c.715G>A (S186N) 位点等位基因及基因型分布 (例, %)

Table 3 Allele and genotype distribution of SP-C gene exon5 region c.715G>A (S186N) loci in 2 groups (case,%)

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		GG	AA	AG	G	A
实验组	50	14 (28)	31 (62)	5 (10)	33 (33)	67 (67)
对照组	50	39 (78)	5 (10)	6 (12)	84 (84)	16 (16)
χ^2 值			30.661			53.300
<i>P</i> 值			<0.05			<0.05

注: $P < 0.05$ 有统计学意义

GG、AA、AG 型。见 (图 1、2、3)。RDS 组此三种基因型频率分别为 28%、62% 和 10%, G 等

3 讨论

RDS 是新生儿较常见的呼吸系统危重症之一, 其发病率及死亡都很高, 其发病机制是由于 PS 缺乏而导致肺泡表面张力增加引起肺泡塌陷, 发病受多因素影响, 男孩, 剖宫产、母亲糖尿病、多胎、生后窒息是其危险因素^[6-7]。虽然早产是发生 RDS 的危险因素之一, 但其发病还受种族、胎膜早破、性别、多胎、产前是否规律促肺成熟、母亲患有疾病等相关因素的影响。

近年来国内外研究者对 RDS 的发病机制及治疗等方面研究较多^[8-9]。尤其 SP-C 的独特结构和生理功能方面广泛研究, 目前实验和临床研究证实 SP-C 结构和功能异常与 SP-C 基因变异有关^[10]。国外研究发现新生儿发生 RDS 与 SP-C 基因转录水平有关, 转录增高不易发生 RDS^[11]。2001 年, Noguee 等^[12]通过研究一位母亲与她婴儿的基因, 在同一个等位基因发现导致 exon4 的缺失, ProSP-C C 端区域 37 个氨基酸缺失引起 SP-C 基因变异, 这也证实了 SP-C 遗传缺陷属于常染色体显性遗传。文献报道 SP-C 基因变异有许多种类型, 最常见于 exon5 区域, 表明 exon5 区域是 SP-C 基因的变异热点。国内研究证实, SP-C 基因编码区 557 位 G → A 杂合变异引起 exon5 区域 S186N 氨基酸改变^[13]。但还有研究发现 SP-C 基因外显子 4(T138N)、外显子 5(S186N) 位点基因多态性与内蒙古地区汉族 RDS 的发生无明显相关性^[14], 与本研究结果不一致, 可能种族不同引起, 需进一步研究证实。本研究发现 SP-C exon5 区域 c.715G>A (S186N) 位点等位基因频率在蒙古族早产儿 RDS 组与汉族早产儿 RDS 组两组之间有显著性差异, 蒙古族 RDS 组该位点以 A 等位基因型频率比汉族 RDS 组显著增高, 表明携带 SP-C 基因 exon5 区域 c.715G>A (S186N) 位点 A 等位基因的蒙古族患 RDS 的几率高。

参 考 文 献

- [1] Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants-2010 update[J]. Neonatology, 2010, 97(4):402-417. DOI:10.1159/000297773.
- [2] Akella A, Deshpande SB. Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders[J]. Indian J Exp Biol, 2013, 51(1):5-22.
- [3] Glasser JR, Mallampalli RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection[J]. Microbes infect, 2012, 14(1):17-25. DOI:10.1016/j.micinf.2011.08.019.
- [4] Almlén A, Walther FJ, Waring AJ. Synthetic surfactant based on analogues of SP-B and SP-C is superior to single-peptide surfactants in ventilated premature rabbits[J]. Neonatology, 2010, 98(1):91-99. DOI:10.1159/000276980.
- [5] Glasser JR, Mallampalli RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection[J]. Microbes Infect, 2012, 14(1):17-25. DOI:10.1016/j.micinf.2011.08.019.
- [6] 代苗英, 李少兵, 胡金绘, 等. 不同胎龄新生儿呼吸窘迫综合征高危因素及临床分析[J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(7):644-648. DOI:10.3969/j.issn.1000-3606.2014.07.012.
- [7] Sweet D, Bevilacqua G, Carnielli V, et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome[J]. J Perinat Med, 2007, 35(3):175-186. DOI: 10.1515/JPM.2007.048.
- [8] Wu R, Lin SY, Zhao HM. Albuterol in the treatment of acute respiratory distress syndrome: A meta-analysis of randomized controlled trials[J]. World J Emerg Med, 2015, 6(3):165-171. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2015.03.001.
- [9] Wang RL, Xu K, Yu K, et al. Effects of dynamic ventilatory factors on ventilator-induced lung injury in acute respiratory distress syndrome dogs[J]. World J Emerg Med, 2012, 3(4):287-293. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2012.04.009.
- [10] Cameron HS, Sonmchini IVI, Carrera P. et al. A Common mutation in the surfactant protein C gene associated with lung disease[J]. J Pediatr, 2005, 146(3):370-375. DOI:10.1016/j.jpeds.2004.10.028.
- [11] Wambach JA, Yang P, Wegner DJ, et al. Surfactant protein-C promoter variants associated with neonatal respiratory distress syndrome reduce transcription[J]. Pediatr Res, 2010, 68(3):216-220. DOI:10.1203/00006450-201011001-00421.
- [12] Noguee LM, Dunbar AE, Wert SE, et al. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease[J]. N Engl J Med, 2001, 344(8):573-579. DOI: 10.1056/NEJM200102223440805.
- [13] 朱春梅, 曹玲, 黄荣妍, 等. 肺表面活性蛋白基因突变相关性婴幼儿肺间质疾病一例报告并文献复习[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(2):84-89. DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2013.02.002.
- [14] 梅花, 张玉恒, 刘春枝, 等. 内蒙古地区汉族新生儿期呼吸窘迫综合征与肺表面活性物质蛋白-C 基因的相关性研究[J]. 中国小儿急救医学, 2015, 22(7):454-457. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4912.2015.07.002.
- [15] 梅花, 张玉恒, 宋丹, 等. 内蒙古蒙汉族新生儿期呼吸窘迫综合征研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(6):714-718. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4912.2015.07.002.
- [16] Boggaram. Regulation of lung surfactant protein gene expression[J]. Front Biosci, 2003, 8:751-764.

(收稿日期: 2018-01-28)

(本文编辑: 何小军)