

· 临床研究 ·

新生儿呼吸窘迫综合征 SP-A 基因多态性的研究

翟亮, 吴红敏, 魏克伦, 赵诗萌, 姜红

(中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的 探讨新生儿呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndrome, RDS)肺表面活性蛋白的基因表达特点已成为 RDS 发病机制的研究热点, 目前国内尚无有关报道。该文旨在探讨中国早产儿 SP-A 基因型的表达特点, 以及 SP-A 等位基因与 RDS 风险的相关性, 从基因水平探讨 RDS 发病机制, 以便更好的预防和治疗。**方法** 选择已确诊 RDS 的早产儿为实验组, 因早产寄养的新生儿为对照组, 取抗凝静脉血 2 mL, 采用 SSCP 方法检测 SP-A 基因 $6A^2$ 、 $6A^3$ 、 $1A^0$ 、 $1A^1$ 。**结果** SP- A_1 等位基因 $6A^2$ 、 $6A^3$ 的分布频率在 RDS 组分别为 0.50、0.056, 在对照组分别为 0.214、0.107; SP- A_2 等位基因 $1A^0$ 、 $1A^1$ 的分布频率在 RDS 组分别为 0.722、0.667, 在对照组分别为 0.679、0.821。两组比较 SP- A_1 等位基因 $6A^2$ 在 RDS 组有过表达现象($P < 0.05$), 而 $6A^3$ 有低表达倾向($P > 0.05$); 而 SP- A_2 等位基因 $1A^0$ 、 $1A^1$ 的分布频率两组无显著差异($P > 0.05$)。在胎龄 < 32 周的早产儿 SP-A 等位基因两组之间比较差异无显著性; 而在 > 32 周的早产儿, SP- A_1 等位基因 $6A^2$ 在 RDS 组有过表达现象(分布频率 0.56、0.15, $P < 0.05$)。男婴等位基因 $6A^2$ 在 RDS 组有过表达倾向($P > 0.05$)。**结论** 在该组正常早产儿人群中 SP- A_1 等位基因 $6A^2$ 、 $6A^3$ 均为低频率分布, SP- A_2 等位基因 $1A^0$ 与 $1A^1$ 均为高频率分布, $1A^0$ 、 $1A^1$ 的高表达为该组早产儿基因分布的特点; 在 RDS 患儿中, SP- A_1 等位基因 $6A^2$ 有高表达, 提示 $6A^2$ 可能为 RDS 的易感基因。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(3): 295-298]

[关键词] 肺表面活性蛋白; 呼吸窘迫综合征; 基因多态性; 新生儿

[中图分类号] R722 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)03-0295-04

Genetic polymorphism of surfactant protein A in neonatal respiratory distress syndrome

ZHAI Liang, WU Hong-Min, WEI Ke-Lun, ZHAO Shi-Meng, JIANG Hong. Department of Pediatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China (Wu H-M, Email: wuhm@cmu2h.com)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of gene expression of surfactant protein A in Chinese premature infants and the association between surfactant protein A and the risk of neonatal respiratory distress syndrome (RDS). **Methods** Vein-blood samples (2 mL) from 18 Chinese premature infants with RDS and 28 controls were assayed for SP-A genotypes $6A^2$, $6A^3$, $1A^0$ and $1A^1$ by SSCP. **Results** The frequency of allele distribution of SP- A_1 allele $6A^2$ and $6A^3$ was 0.50 and 0.056 respectively in the RDS group and was 0.214 and 0.107 in the control group. Compared with the controls, SP- A_1 allele $6A^2$ was over-represented in the RDS group ($P < 0.05$). In contrast, SP- A_1 allele $6A^3$ tended to be under-represented in the RDS group but there was no statistical difference when compared with the controls. The frequency of allele distribution of SP- A_2 allele $1A^0$ and $1A^1$ was 0.722 and 0.667 respectively in the RDS group and was 0.679 and 0.821 respectively in the control group. There were no significant differences in the distribution frequency of SP- A_2 allele $1A^0$ and $1A^1$ between the two groups. In the infants born at gestation > 32 weeks, SP- A_1 allele $6A^2$ was over-represented in the RDS group compared with the control group (frequency: 0.56 vs 0.15; $P < 0.05$). **Conclusions** The frequency of SP- A_1 allele $6A^2$ and $6A^3$ was low, in contrast, the frequency of SP- A_2 allele $1A^0$ and $1A^1$ was high in normal Chinese premature infants. SP- A_1 allele $6A^2$ may be a susceptible gene for RDS.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(3): 295-298]

Key words: Pulmonary surfactant protein; Respiratory distress syndrome; Genetic polymorphism; Premature infant

新生儿呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndrome, RDS)是新生儿期危重症之一, 有较高的发病

[收稿日期] 2007-09-30; [修回日期] 2007-11-07

[作者简介] 翟亮, 女, 硕士, 主任医师。主攻方向: 新生儿疾病。现工作单位为鞍山市妇儿医院, 邮编: 114001。

[通讯作者] 吴红敏, 教授, 中国医科大学附属盛京医院儿科, 邮编: 110001。

率和病死率,也是导致儿童慢性肺疾病的主要原因。虽然早产是RDS最重要的原因,但许多早产儿并不发生RDS。研究发现^[1],控制表面活性蛋白合成的基因因素在RDS发病中起重要作用。目前导致RDS易感的特殊基因还不完全清楚,最可能的候选基因是编码肺脏所特有的表面活性蛋白基因,特别是编码SP-A、SP-B基因^[2],不同的SP-A等位基因对RDS具有保护性或易感性作用^[3]。

由于SP-A与RDS密切相关,探讨SP-A等位基因对RDS的易感性或保护性有其重要的临床意义,目前国内尚无这方面的研究报道。本研究选择本地汉族早产儿为研究对象,应用SSCP方法检测患RDS早产儿SP-A基因多态性,寻求RDS的易感基因,从基因水平探讨RDS发病机制,以便更好的治疗和预防。

1 实验材料和方法

1.1 研究对象

选择2004年12月~2005年8月间在中国医科大学附属盛京医院新生儿病房住院、胎龄<37周、X线检查为Ⅲ、Ⅳ级RDS表现^[4]的早产儿作为研究对象,正常寄养的早产儿纳入对照组(家属知情同意)。

1.2 临床资料

本研究中46例早产儿,其中RDS组18例,对照组28例,胎龄28~36周,平均胎龄RDS组为 32.5 ± 2.5 周,对照组为 33.1 ± 2.2 周,其中<32周早产儿RDS组9例,对照组8例;出生体重在915~3250g,平均体重RDS组为 1837.5 ± 795.2 g,对照组为 1774.1 ± 543.8 g;男性RDS组14例,对照组15例;在RDS组中,合并感染4例,动脉导管未闭1例,气胸2例,持续性肺动脉高压1例,早产儿脑损伤2例;退院2例。对照组中,合并呼吸暂停3例,巨细胞病毒抗体阳性1例,先心病1例。

1.3 研究方法

1.3.1 外周血白细胞DNA提取 于新生儿生后3d内采集外周静脉血2mL,置于EDTA抗凝管中,用红细胞裂解液提取白细胞,用NaClO₄、SDS解聚核蛋白,最后用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提,乙醇沉淀。

1.3.2 SP-A引物的合成 美国国立图书馆基因库检索基因(1A⁰、1A¹、6A²、6A³)全序列,电脑软件primer 5.0版自行设计引物。PCR扩增引物由北京三博远志生物技术有限公司合成,2.50D/支,所用引物序列如下:SP-A₁-6A²(221bp、51.5℃),6A²-DNA-F 5'-GCC TCT GCC TAT CCA CAT-3' 6A²-DNA-R 5'-

CCT GAG CCT CCT GTC CTT-3';
SP-A₁-6A³(120 bp、51℃),6A³-DNA-F 5'-CTG CCT AAT CCA GGA ACC CAT-3' 6A³-DNA-R 5'-TCC ACC TCG GAG CTT TCT TAC-3';
SP-A₂-1A⁰(117 bp、48℃),1A⁰-DNA-F 5'-TCC TCC AAG AAG TAA CCA-3' 1A⁰-DNA-R 5'-GCA CGC CTA AAT ACA CTA-3';
SP-A₂-1A¹(260 bp、49℃),1A¹-DNA-F 5'-GGG ATG TTT ATT GGG ATT-3' 1A¹-DNA-R 5'-CAG CAA ATG AAC AAG TAG AA-3'。

1.3.3 用PCR方法检测SP-A基因多态性 PCR的反应体积25 μL,其中DNA5 μL,10×buffer缓冲液2.5 μL,dNTPs(10 mmol/L)2 μL,Taq-DNA聚合酶(5U/μL)0.2 μL,以及1A⁰、1A¹、6A²、6A³基因的上游、下游引物(终浓度5 pmol/μL),水补至25 μL,PCR条件:94℃ 4 min,94℃ 40 s,48~51.5℃ 1 min,72℃ 1 min,35个循环,72℃ 7 min延伸。在PTC-100TM扩增仪上完成循环。

1.3.4 产物分析 所得PCR扩增产物10 μL经2%琼脂糖凝胶电泳,0.5%溴乙锭荧光染色10 min后,紫外灯下观察结果,凝胶成像扫描系统扫描拍照(图1~4)。

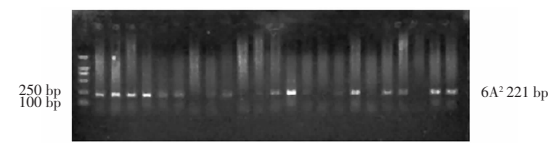


图1 SP-A₁等位基因6A²经PCR扩增后在2%琼脂糖凝胶电泳上的表达

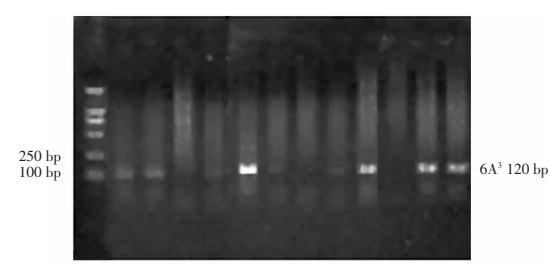


图2 SP-A₁等位基因6A³经PCR扩增后在2%琼脂糖凝胶电泳上的表达

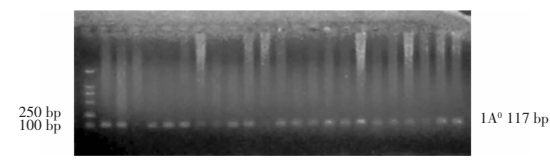


图3 SP-A₂等位基因1A⁰经PCR扩增后在2%琼脂糖凝胶电泳上的表达

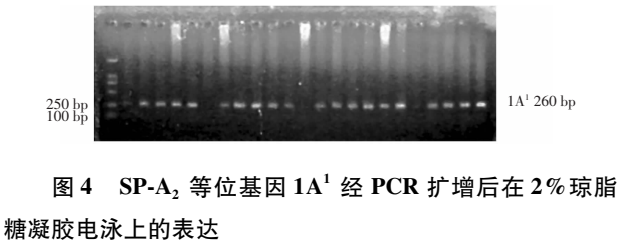


图4 SP-A₂ 等位基因 1A¹ 经 PCR 扩增后在 2% 琼脂糖凝胶电泳上的表达

1.3.5 统计学处理 基因表达的结果以阴性、阳性表示,两组间基因表达频率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 正常早产儿 SP-A 等位基因分布特点

28 例正常早产儿,SP-A₁ 等位基因 6 A²6 例(6/28),频率为 0.214,6A³ 3 例(3/28),频率为 0.107,6A² 高于 6A³,均在 0.25 以下;SP-A₂ 等位基因 1A⁰ 19 例(19/28),频率为 0.679,1A¹23 例(23/28),频率为 0.821,1A¹ 较 1A⁰ 略高,分布频率均大于 0.65。

2.2 RDS 患儿 SP-A 等位基因分布特点

18 例 RDS 患儿,SP-A₁ 等位基因 6A²9 例(9/18),频率为 0.50,比对照组(0.214)出现频率明显增加,在 RDS 组有过表达现象($P < 0.05$),6A³1 例(1/18),频率为 0.056,比对照组(0.107)低,在 RDS 组有低表达倾向,但与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$);SP-A₂ 等位基因 1A⁰ 13 例(13/18),频率为 0.722,与对照组(0.679)比较差异无显著性($P > 0.05$),1A¹ 12 例(12/18),频率为 0.667,比对照组(0.821)低,但两组比较差异无显著性(图 5)。

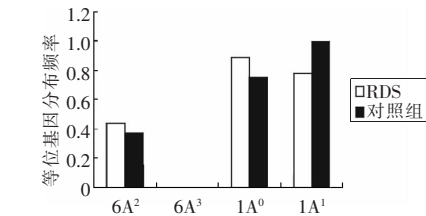


图6 <32 周婴儿 SP-A 基因分布

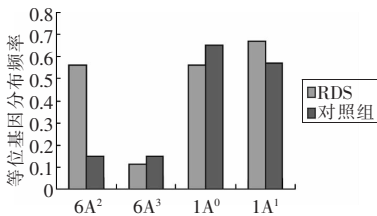


图7 >32 周婴儿 SP-A 基因分布

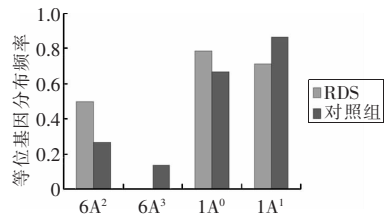


图8 男婴 SP-A 基因分布

3 讨论

人类 SP-A 基因位点有二个高度同源的功能基因 SP-A₁,SP-A₂ 和一个假基因。其中 SP-A₁ 有 5 个等位基因(6A,6A²,6A³,6A⁴,6A⁵),SP-A₂ 有 6 个等

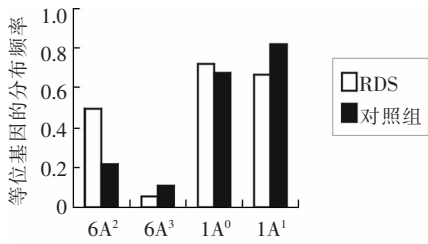


图5 SP-A 等位基因在 RDS、对照组的分布

2.3 高危因素对 RDS 与 SP-A 等位基因关系的影响

胎龄 <32 周的早产儿,SP-A 等位基因的分布在 RDS 组与对照组之间比较,所测四个等位基因(6A²,6A³,1A⁰,1A¹)差异均无显著性($P > 0.05$);胎龄 >32 周的早产儿,SP-A₁ 等位基因 6A² 在 RDS 组为 5 例(5/9),在对照组为 3 例(3/20),频率分别为 0.56、0.15,两组比较有显著差异($P < 0.05$),而 6A³、1A⁰,1A¹ 的分布在两组则差异无显著性(表 1;图 6,7)。

表 1 不同胎龄早产儿 SP-A 基因在 RDS 组、对照组分布(例)

		1A ⁰		1A ¹		6A ²		6A ³	
		阳性 阴性		阳性 阴性		阳性 阴性		阳性 阴性	
对照组	<32 周	6	2	8	0	3	5	0	8
	>32 周	13	7	15	5	3	17	3	17
RDS	<32 周	8	1	7	2	4	5	0	9
	>32 周	5	4	6	3	5	4	1	8

RDS 组男性占 0.778,女性占 0.222,男性高于女性,男婴 SP-A₁ 等位基因 6A₂ 在 RDS 组为 7 例(7/14),在对照组为 4 例(4/15),频率分别为 0.50,0.267,提示 6A² 在 RDS 组男婴中有过表达倾向,但两组比较无显著差异;男婴 6A³,1A⁰,1A¹ 分布在 RDS 组与对照组无差异(图 8)。

位基因(1A,1A⁰,1A¹,1A²,1A³,1A⁴)^[5]。由于存在种族差异,在人口中 SP-A 等位基因的分布频率各不相同,对芬兰人口 88 例正常对照组的研究表明^[3],6A²、1A⁰ 为芬兰人口高表达基因(频率分别为 0.52、0.54)。本研究结果显示,在本组 28 例汉族正常早产儿人群中 SP-A₁ 等位基因 6A²、6A³ 均为低频

率分布,分布频率均小于25%,SP-A₂等位基因1A⁰与1A¹均为高频率分布,分布频率均大于65%,1A¹略高于1A⁰,与芬兰研究结果不尽相同,可能与例数少有关,有待进一步筛查。

对患RDS的早产儿基因研究发现,SP-A基因多态性对RDS的发病风险有潜在性的影响^[6]。Ramet等^[3]对芬兰人口的研究发现,SP-A₁等位基因6A²在RDS组呈过表达,6A³则呈低表达,SP-A₂等位基因1A⁰也在RDS组呈过表达倾向,而且在胎龄<32周时这种联系更强烈,提示6A²、1A⁰为RDS的易感基因,6A³为RDS的保护性基因。本组资料显示,SP-A₁等位基因6A²在RDS组过表达,可能是RDS的易感基因,6A³有低表达倾向,与文献报道一致。SP-A₂等位基因1A⁰在RDS组无高频率表达,与文献报道不同,这种差异可能与种族因素有关。

对人的胎肺组织研究表明^[7],胎龄25周以后,SP-A开始在II型上皮细胞及其前体细胞胞浆内表达,32周以后开始逐渐增强,生后表达明显增强,SP-A生前多以储存状态为主,因此,胎龄在32周以前,肺表面活性蛋白水平低下,这是<32周的早产儿易感RDS的生理基础。在胎龄对RDS与SP-A等位基因关系的影响上,本组资料显示,SP-A₁等位基因6A²分布的差异并不在小胎龄组,而是分布在>32周的早产儿,这与Ramet^[3]报道不相符合,可能与例数少有关,同时提示6A²作为RDS的易感基因,也可单独发挥作用,使>32周早产儿对RDS易感。

除了与胎龄密切相关外,RDS发病还与其他因素有关,种族、性别、多胎以及母亲疾病、产前糖皮质激素治疗均影响RDS的发病风险。研究表明^[8],男性发生RDS的危险高于女性;黑人发生RDS的危险低于白人;母亲患糖尿病及出生时窒息增加早产儿发生RDS的危险;产前糖皮质激素促成成熟治疗,加速表面活性物质系统的分化,降低RDS发生率及严重性;在多胎妊娠中,第一胎RDS的发生率低于第二胎^[9~11]。本组研究,男婴在RDS组占77.8%,明显高于女性,这与国外资料报道相符,而男婴SP-A等位基因6A²在RDS组有高频率分布倾向,但与对照组比较差异无显著性,考虑与病例数过少有关。

Marttila^[12]进一步研究发现,当SP-B外显子4

基因型为Thr/Thr时,SP-A₁等位基因6A²在RDS组与对照组相比有过表达,6A³在RDS组有低表达,因此提出SP-B Ile131Thr的基因多态性是导致SP-A等位基因作为RDS易感(6A²、1A⁰)或保护性(6A³、1A²)因素的基因决定簇。在本组RDS中未检测SP-B Ile131Thr基因型,是否存在SP-B Ile131Thr基因的种族分布差异,造成6A³、1A⁰对RDS易感性的不同,或其他因素影响6A³、1A⁰对RDS易感性,有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Hallman M, Haataja R. Genetic basis of respiratory distress syndrome[J]. Front Biosci, 2007, 12:2670-2682.
- [2] Hallman M, Haataja R, Marttila R. Surfactant proteins and genetic predisposition to respiratory distress syndrome[J]. Semin Perinatol, 2002, 26(6):450-460.
- [3] Ramet M, Haataja R, Marttila R, Floros J, Hallman M. Association between the surfactant protein A (SP-A) gene locus and respiratory-distress syndrome in the Finnish population[J]. Am J Hum Genet, 2000, 66(5):1569-1579.
- [4] 倪佳臣. 常见症状的鉴别诊断[M]. //胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学上册. 第7版. 北京:人民卫生出版社,2002, 459.
- [5] Floros J, Hoover RR. Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1408(2-3): 312-22.
- [6] Heinrich S, Hartl D, Griese M. Surfactant protein A—from genes to human lung diseases[J]. Curr Med Chem, 2006, 13(27): 3239-3252.
- [7] 孔祥永,杜江,封志纯. 肺表面活性物质相关蛋白A在人胎肺发育中的表达及意义[J]. 中国儿童保健杂志,2005,13(6): 472-474.
- [8] Flon SJ, Fan R. Surfactant protein A and B genetic variants and RDS: allele interactions[J]. Biol Neonate, 2001, 80(Suppl 1): 22-25.
- [9] Marttila R, Haataja R, Ramet M, Pokela ML, Tammela O, Hallman M. Surfactant protein A gene locus and respiratory distress syndrome in Finnish premature twin pairs[J]. Ann Med, 2003, 35(5):344-352.
- [10] 陈幽,韩玉昆,叶贞志,卢光进. 呼吸窘迫综合征并发支气管肺发育不良危险因素分析[J]. 中国当代儿科杂志,2007,9(1): 15-18.
- [11] 周晓光,罗先琼,杨琳琳,陈远彬,张小庄,赵庆国. 肺表面活性物质预防早产儿呼吸窘迫综合征的临床研究[J]. 中国当代儿科杂志,2001,3(4):387-390.
- [12] Marttila R, Haataja R, Guttentag S, Hallman M. Surfactant protein A and B genetic variants in respiratory distress syndrome in singletons and twins[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168(10):1216-1222.

(本文编辑:吉耕中)