

微粒体基因 *16SrRNA* 在宫内感染诊断中的意义探讨

李娟<sup>1</sup> 侯莹<sup>2</sup> 赵媛<sup>1</sup> 张泽敏<sup>1</sup> 毛健<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 大连妇产医院新生儿科, 辽宁 大连 116033)

**[摘要]** **目的** 探讨微粒体基因与宫内感染的关系。**方法** 单胎早产出生者 30 例为病例组,按照早产原因分为胎膜早破(PROM)组 16 例(早破膜时间均>18 h),自发性早产(SPL)组 6 例,有指征的医源性早产(包括母亲或胎儿原因)8 例,另选取 10 例单胎足月出生者作为对照组。分别留取部分胎盘、胎膜、羊水、脐血、气管分泌物、胃液及新生儿静脉血等,观察各种原因早产胎盘、胎膜病理改变;用 PCR 方法分别测定微粒体基因 *16SrRNA* 及解脲脲原体(*UU*)基因在胎盘及胎膜等各类标本中的表达。**结果** 病例组中 21 例(70%)诊断为绒毛膜羊膜炎,主要病理改变为胎膜、胎盘组织中性粒细胞浸润,胎膜改变尤为明显,主要见于胎龄<32 周或出生体重<1 500 g 者。病例组 30 例患儿中,*16SrRNA* 基因阳性 12 例,*UU* 基因阳性 10 例,对照组 10 例患儿均未检测到 *16SrRNA* 及 *UU* 基因。PROM 组早产儿生后感染发生率高于其他原因早产患儿,但差异无统计学意义。**结论** 绒毛膜羊膜炎是导致胎膜早破及胎儿早产的主要原因,检测微粒体基因可间接反映是否有宫内感染存在。

[中国当代儿科杂志,2010,12(9):726-729]

**[关键词]** *16SrRNA*;解脲脲原体;绒毛膜羊膜炎;早产儿

**[中图分类号]** R722.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)09-0726-04

Value of microbial gene *16SrRNA* in the identification of antenatal infection

LI Juan, HOU Ying, ZHAO Yuan, ZHANG Ze-Min, MAO Jian. Department of Pediatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: lijuan8@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To study the relationship between microbial gene *16SrRNA* and intrauterine infection. **Methods** Thirty cases of single preterm birth were enrolled, including 16 cases due to premature rupture of membranes (PROM) (rupture time >18 hrs), 6 cases due to spontaneous preterm birth and 8 cases due to iatrogenic preterm birth. Ten cases of single term birth were used as the control group. Fetal membrane and placenta samples were obtained. Amniotic fluid, blood from cord or newborn babies as well as gastric fluid and tracheal secretions from infants with mechanical ventilation were also obtained. The histological features of placenta and fetal membranes were observed. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the presence of microbial *16SrRNA* and ureaplasma urealyticum (*UU*) in placenta, fetal membranes and other samples. **Results** Twenty-one (70%) cases were diagnosed as chorioamnionitis, characterized by neutrophil infiltration in fetal membrane and placenta tissues, especially in fetal membranes. Chorioamnionitis was most frequent in babies whose gestational age less than 32 weeks or birth weight lower than 1 500 g. Positive *16SrRNA* gene was found in 12 cases, and positive *UU* gene in 10 cases in the preterm birth group. Neither *16SrRNA* nor *UU* gene was detected in the control group. The PROM preterm babies developed more frequent infection than the babies premature born due to other causes, but there were no statistically significant differences in the incidence of infection. **Conclusions** Chorioamnionitis may be the major cause of PROM and premature birth. The detection of microbial genes is valuable in identification of intrauterine infection.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (9):726-729]

**Key words:** *16SrRNA*; Ureaplasma urealyticum; Chorioamnionitis; Preterm infant

早产是全球性的围产医学问题,是新生儿死亡的主要原因。Moss<sup>[1]</sup>报道,澳大利亚早产发生率为8%,而早产所致的新生儿死亡占全部新生儿死亡的75%。2002 年我国早产的发生率为7.8%<sup>[2]</sup>。随着围产医学的进步及新生儿复苏技术的改进,早产儿生存率逐年提高。越来越多的证据表明,宫内感染是早产的主要原因,约占早产的20%~33%,胎龄小于30 周的早产80%由感染所致,胎龄24~28 周的早产90%以上与宫内感染有关<sup>[3,4]</sup>。宫内感染使各种炎症细胞及炎症因子增高,胎儿暴露于宫内的炎症环境,易引起胎膜早破(premature rupture of the membranes,PROM)。

[收稿日期]2009-09-05;[修回日期]2010-01-15  
[作者简介]李娟,女,博士,教授。

早产胎膜早破(preterm premature rupture of the membranes, PPRM)是指妊娠未满37周,临产前胎膜破裂。胎膜早破发生后,病原体逆行进入羊膜腔,可加重宫腔内感染。常见病原体常为多种细菌混合感染。近年证实,解脲脲原体(*ureplasma urealyticum, UU*)是宫内感染的主要病原体<sup>[5]</sup>。由于亚临床感染及抗生素的广泛应用,传统细菌学培养常不能获得阳性结果,细菌核糖体小亚基RNA(*SrRNA*)基因为所有细菌共有,与细菌整个基因组的变化相比,具有高度的保守性,其中*16SrRNA*基因是细菌染色体上编码RNA的DNA序列,仅存在于细菌等原核生物染色体基因中,对细菌感染的敏感性较高,常用于革兰氏菌、支原体、衣原体等病原体检测<sup>[5]</sup>。为明确宫内感染与早产的关系,本研究用PCR方法分别测定微粒体基因*16SrRNA*及*UU*基因在不同原因早产胎盘、胎膜、羊水、脐血、气管分泌物、胃液及新生儿静脉血中的表达,探讨宫内感染对胎儿的影响及与早产儿预后的关系。

# 1 资料与方法

## 1.1 研究对象

2007年11月至2008年3月于本院产科单胎早产分娩者30例为病例组,按早产原因分为胎膜早破(PROM)组16例(破膜时间均>18h),自发性早产(spontaneous preterm labor, SPL)组6例,有指征的医源性早产(包括母亲或胎儿原因,简称医源性早产,indicated preterm birth, IPB)8例;胎龄<30周7例,30~周11例,32~周7例,34~36周5例;自然分娩13例,剖宫产17例。另取同期单胎足月分娩10例作为对照组,其中自然分娩6例,剖宫产4例。根据病理结果将病例组又分为绒毛膜羊膜炎组和无绒毛膜羊膜炎组。

## 1.2 方法

- 1.2.1 标本获取 经产妇同意,并签署知情同意书。无菌操作组织取材:剖宫产分娩者,分娩过程中留取羊水2 mL,做细菌培养;分娩后取脐带血1 mL, EDTA抗凝;于胎膜破口处取2 cm×2 cm胎膜全层组织;胎盘组织分别在胎盘中央及边缘取材,大小为1 cm×1 cm;留取部分胎膜、胎盘,以10%福尔马林固定,石蜡包埋,余部分-70℃保存。新生儿出生30 min内未开奶前留取胃液1 mL,静脉血0.5 mL, EDTA抗凝;机械通气的新生儿,如可能留取部分气管分泌物0.5~1 mL, -70℃保存。
- 1.2.2 胎膜、胎盘病理改变 对留取的病例组及

对照组胎盘、胎膜做病理学检查,方法如下:石蜡包埋组织经切片,脱蜡后苏木精-伊红染色,由本院病理科医生采用双盲法光镜下观察胎膜、胎盘组织学变化。绒毛膜羊膜炎诊断标准主要为组织学诊断,即胎盘及胎膜有中性粒细胞浸润<sup>[6]</sup>。

1.2.3 *16SrRNA*及*UU*基因检测 引物设计:*16SrRNA*引物上游为5' AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG 3',下游为5' ACGGTTACCTTGTTACGACTT 3',扩增产物长度为400~500 bp;*UU*引物上游为5' CAA TCT GCT CGT GAA GTA TTA C 3',下游为5' ACG ACG TCC ATA AGC AAC T 3',扩增产物长度为428 bp。由上海生物工程公司提供。DNA提取试剂盒由大连宝生物工程公司提供,按说明书进行操作,提取胎膜、胎盘、羊水、胃液等标本的DNA。PCR反应体系:*16SrRNA*及*UU*基因均按12.5 μL的反应体系。*16SrRNA*基因循环条件为95℃预变性2 min,95℃变性30 s,56℃退火40 s,72℃2 min,共循环30次,延伸10 min。*UU*基因循环条件为95℃预变性5 min,95℃变性1 min,56℃退火1 min,72℃2 min,共循环35次,延伸10 min。将扩增好的DNA样本各取2 μL,加入6×加样缓冲液0.5 μL,用1.3%琼脂糖凝胶,130 V电压电泳45 min,电泳后的琼脂糖凝胶于凝胶图像分析仪上,紫外线透射扫描拍照。

## 1.3 统计学分析

实验结果以计数资料表示,应用SPSS 13.0统计软件分析,采用四格表 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 胎膜及胎盘病理改变

按照绒毛膜羊膜炎的病理学诊断标准,30例病例组中,21例(70%)诊断为绒毛膜羊膜炎,主要病理改变为胎膜、胎盘组织有中性粒细胞浸润,胎膜改变尤为明显。其中PROM组14例,占该组的87.5%,自发性和医源性早产组为7例,占该组的50%, $\chi^2=3.37$ , $P>0.05$ 。对照组未见异常胎膜、胎盘病理改变。

## 2.2 绒毛膜羊膜炎早产儿围产期特点

绒毛膜羊膜炎主要见于胎龄<32周或出生体重<1 500 g者,病例组中9例行羊水细菌培养,1例为大肠杆菌生长。绒毛膜羊膜炎组及无绒毛膜羊膜炎组早产儿围产期一般情况见表1。

## 2.3 *16SrRNA*及*UU*基因在各类标本中的检测结果

图1显示*16SrRNA*及*UU*两种基因在各类标本中阳性率比较,胎膜及胎盘中阳性率最高,因胎膜中

两种基因阳性率高于胎盘,故本研究仅比较胎盘与其他标本检测结果,其中胎盘中 *16SrRNA* 阳性率明显高于脐血、气管分泌物、新生儿胃液及静脉血,  $\chi^2$  分别为 4.39 ( $P < 0.05$ )、11.2 ( $P < 0.01$ )、15.9 ( $P < 0.01$ )、23.6 ( $P < 0.01$ );胎盘中 *UU* 基因阳性率明显高于气管分泌物、新生儿胃液及静脉血,  $\chi^2$  分别为 7.3、12.7、18.4 ( $P < 0.01$ )。另外 *16SrRNA* 与 *UU* 基因在各类标本中检出率变化趋势基本一致。见图 1。

2.4 *16SrRNA* 及 *UU* 基因检测及其与绒毛膜羊膜炎的关系

用 PCR 方法检测各组标本 *16SrRNA* 及 *UU* 基因,任意一个标本阳性即记为阳性。结果发现,对照组 10 例均未检测到 *16SrRNA* 及 *UU* 基因;病例组 30 例中, *16SrRNA* 基因阳性 12 例次, *UU* 基因阳性 10 例次,二者均阳性 8 例次。21 例绒毛膜羊膜炎患儿中,10 例检测到 *16SrRNA* 或 *UU* 基因,其余 11 例患儿未检测到 *16SrRNA* 或 *UU* 基因。12 例 *16SrRNA* 阳性患儿,8 例有绒毛膜羊膜炎病理改变,10 例 *UU* 阳性患儿均有绒毛膜羊膜炎改变,阳性病原体基因检测结果见表 2。

表 1 早产儿绒毛膜羊膜炎组及无绒毛膜羊膜炎组一般情况比较 (例)

| 组别         | 例数 | 阴道分娩   | 胎龄 < 32 周 | 出生体重 < 1 500 g | Apgar 评分  |           | 呼吸窘迫综合征 | 吸氧     | 机械通气   |
|------------|----|--------|-----------|----------------|-----------|-----------|---------|--------|--------|
|            |    |        |           |                | 1 min ≤ 6 | 5 min ≤ 8 |         |        |        |
| 绒毛膜羊膜炎阴性组  | 9  | 3      | 5         | 4              | 5         | 6         | 1       | 2      | 2      |
| 绒毛膜羊膜炎阳性组  | 21 | 10     | 13        | 11             | 6         | 7         | 8       | 8      | 10     |
| $\chi^2$ 值 |    | 0.208  | 7.646     | 10.035         | 0.408     | 0.370     | 5.510   | 4.675  | 6.429  |
| <i>P</i> 值 |    | > 0.05 | < 0.01    | < 0.01         | > 0.05    | > 0.05    | < 0.01  | < 0.01 | < 0.01 |

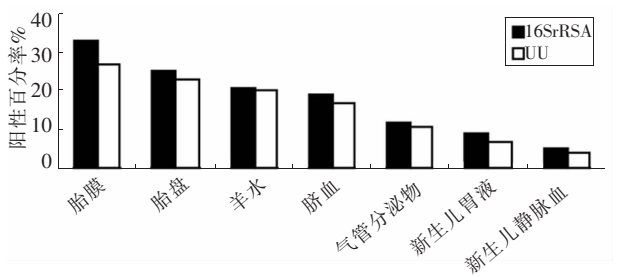


图 1 *16SrRNA* 与 *UU* 基因在各类标本中阳性率比较

表 2 *16SrRNA* 及 *UU* 基因检测与绒毛膜羊膜炎的关系

| 病例号 | 组别   | 胎龄(周)            | <i>16SrRNA</i> | <i>UU</i> | 绒毛膜羊膜炎 |
|-----|------|------------------|----------------|-----------|--------|
| 1   | PROM | 29 <sup>+5</sup> | +              | +         | +      |
| 2   | PROM | 28 <sup>+4</sup> | +              | +         | +      |
| 3   | PROM | 29 <sup>+6</sup> | +              | +         | +      |
| 4   | PROM | 28 <sup>+3</sup> | +              | +         | +      |
| 5   | PROM | 31 <sup>+6</sup> | +              | +         | +      |
| 6   | PROM | 31 <sup>+5</sup> | +              | +         | +      |
| 7   | PROM | 33 <sup>+3</sup> | +              | +         | +      |
| 8   | PROM | 34 <sup>+6</sup> | +              | -         | -      |
| 9   | PROM | 33 <sup>+2</sup> | +              | -         | -      |
| 10  | PROM | 30 <sup>+1</sup> | -              | +         | +      |
| 11  | IPB  | 35 <sup>+3</sup> | +              | -         | -      |
| 12  | IPB  | 33 <sup>+4</sup> | -              | +         | +      |
| 13  | SPL  | 29 <sup>+5</sup> | +              | +         | +      |
| 14  | SPL  | 33 <sup>+3</sup> | +              | -         | -      |

2.5 分娩方式对宫内感染的影响

病例组中经阴道分娩的早产儿 13 例,11 例诊断绒毛膜羊膜炎,其中 7 例 *16SrRNA* 及 *UU* 检测均为阳性;剖宫产出生的早产儿 17 例,10 例诊断为绒毛膜羊膜炎,其中 7 例 *16SrRNA* 阳性,5 例 *UU* 基因阳性;比较不同分娩方式与绒毛膜羊膜炎的关系,发现  $P > 0.05$ ,提示分娩方式对绒毛膜羊膜炎的发生

无明显影响。  
2.6 宫内感染对早产儿的影响  
病例组 30 例早产儿中,生后 3 d 内出现异常表现、临床诊断为新生儿感染者 18 例,其中 PROM 组 12 例 (75%), SPL 组 4 例 (67%), IBP 组 2 例 (25%),主要临床表现为频繁呼吸暂停、喂养不耐受、面色晦暗或皮肤有花纹伴低体温、腹胀、体重不增、呼吸窘迫等。尽管 PROM 组早产儿生后感染发生率 (75%) 高于 IBP 及 SPL 组,但差异无统计学意义。18 例感染新生儿中,病理学证实有绒毛膜炎改变者分别为:PROM 组 10 例,SPL 组 2 例,IBP 组 1 例;这些早产者组织中 *16SrRNA* 及 *UU* 阳性率分别为 50% (PROM 组 8 例,SPL 组 1 例)和 39% (PROM 组 6 例,SPL 组 1 例)。各组间绒毛膜羊膜炎发生率及微粒体基因检测阳性率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

3 讨论

Li 等<sup>[7]</sup> 认为,PPROM 与绒毛膜羊膜炎相互影响,即绒毛膜羊膜炎可导致 PPROM,而发生 PPROM 的孕妇又可加重绒毛膜羊膜炎。PROM 可由多种原因引起,其中感染是重要原因之一。本研究发现,PPROM 者绒毛膜羊膜炎占 87.5%,但与其他原因早产新生儿绒毛膜羊膜炎发生率差异无统计学意义,提示绒毛膜羊膜炎可能是导致胎儿早产的重要原因。绒毛膜羊膜炎为母亲或胎儿的炎症反应,这种炎症反

应在孕早期就已经存在,孕妇常为无症状性亚临床感染,但胎盘胎膜等却存在炎症的病理改变<sup>[8]</sup>。本研究中21例病理诊断为绒毛膜羊膜炎者,仅部分孕妇有临床表现,羊水细菌培养也仅1例阳性。

感染所致早产的发生机制主要为病原体侵入绒毛膜蜕膜间隙,释放的毒素引起中性粒细胞及巨噬细胞增多,产生各种炎症介质,如白介素1(IL-1)、IL-6、IL-8及肿瘤坏死因子(TNF),激活前列腺素(prostaglandins, PGs)合成系统,抑制列腺素降解酶活性,使前列腺素产生增加,促进子宫收缩,同时产生蛋白水解酶,水解宫颈附近胎膜内的细胞外物质,使组织张力强度降低,胶原纤维含量减少,胎膜脆性增加,导致胎膜破裂,胎儿早产<sup>[9-10]</sup>。

宫内感染主要导致羊水、胎盘、胎膜及胎儿的感染,病原体可为细菌、病毒、衣原体及支原体等,主要为细菌,常为阴道内毒力相对较弱的条件致病菌。除细菌外,病毒也是重要病原,已报道导致胎儿宫内感染的病毒多达数十种,主要有巨细胞病毒、柯萨奇病毒、腺病毒及水痘-带状疱疹病毒等<sup>[5]</sup>。近年研究发现,支原体、UU等是宫内感染的主要病原体<sup>[11]</sup>,用PCR方法检测病原体基因,简便快捷。本研究14例16SrRNA或UU基因阳性者中,10例病理诊断为绒毛膜羊膜炎,提示其余4例可能有细菌或UU以外的微生物感染。12例16SrRNA阳性者中,8例有绒毛膜羊膜炎的病理改变;10例UU阳性者均有绒毛膜羊膜炎改变,说明二者检测结果与病理改变有极好的一致性,提示可用检测微粒体基因间接反映是否有绒毛膜羊膜炎。尽管如此,细菌培养仍为确定病原菌的金标准,可进一步证实为哪种病原体。本研究中,羊水细菌培养的阳性率仅为4.8%(1/21),提示PCR方法较细菌培养方法具有较高的敏感性。细菌培养阳性率低的原因主要为多数PPROM孕妇分娩前常用抗生素预防感染,而且羊水培养常不作为分娩前及分娩过程中常规产科检查,普通的培养很难检测到UU及支原体等非细菌性病原体。

本研究分析微粒体基因在各标本中的检测结果发现,胎盘、胎膜检出率最高,提示可能与病原微生物具有早期定植选择性有关。目前还不清楚细菌何时定植到宫腔,引起宫腔内炎症反应。目前较为公认的假说是在受孕时,细菌已经存在于子宫内膜或在妊娠早、中期胎膜还没有完全与子宫壁贴合时就上行到子宫腔了,孕妇如果免疫力低下,机体不能清除细菌,就会发生羊膜腔感染而导致胎膜早破或早产<sup>[12]</sup>。

宫内感染可导致新生儿出现早发感染(生后36~72 h)。本研究中18例生后早发感染的早产儿中,均有异常临床表现或实验室阳性检查结果。研究发现,PROM及自发性早产的母亲可见宫腔内亚临床感染及炎症的病理改变,产前感染或炎症与早产儿出生后器官损伤有关,主要表现为脑白质损伤及支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)<sup>[13]</sup>。本研究发现,绒毛膜羊膜炎组生后患呼吸窘迫综合征、使用机械通气及需氧者亦明显多于无羊膜炎组,提示宫内感染可能通过影响肺泡Ⅱ型细胞的功能,使肺表面活性物质合成减少。

本研究显示,PROM组绒毛膜羊膜炎发生率及微粒体基因检测阳性率较其他原因所致早期组有增高趋势,虽然差异无统计学意义,但我们认为检测微粒体基因在一定程度上可以反映宫内感染状态,对判断早产儿的预后及指导治疗也有一定临床意义。

[参 考 文 献]

[1] Moss TJ. Respiratory consequences of preterm birth[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(3): 280-284.

[2] 中华医学会儿科分会新生儿学组. 中国城市早产儿流行病学初步调查报告[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(1): 25-28.

[3] Macones GA. Prematurity: causes and prevention[M]// Taesch HW, Ballard RA, Gleason CA. Avery's Disease of the Newborn. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004: 139-145.

[4] Denney JM, Culhane JF, Gogenberg RL. Prevention of preterm birth[J]. Womens Health, 2008, 4(6): 625-638.

[5] Kotecha S, Hodge R, Schaber JA, Miralles R, Silverman M, Grant WD. Pulmonary Ureaplasma urealyticum is associated with the development of acute lung inflammation and chronic lung disease in preterm infants[J]. Pediatr Res, 2004, 55(1): 61-68.

[6] Redline RW. Inflammatory responses in the placenta and umbilical cord[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2006, 11(5): 296-301.

[7] Li YH, Tullus K. Microbial infection and inflammation in the development of chronic lung disease of prematurity[J]. Microbes Infect, 2002, 4(7): 723-732.

[8] Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development[J]. Arch Dis Chil Fetal Neonatal Ed, 2006, 91(2): F132-135.

[9] Kunzmann S, Speer CP, Jobe AH, Kramer BW. Antenatal inflammation induced TGF-beta1 but suppressed TGF in preterm lungs[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(1): 223-231.

[10] Murthy V, Kennea NL. Antenatal infection/inflammation and fetal tissue injury[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2007, 21(3): 479-489.

[11] Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study[J]. Pediatrics, 2009, 123(5): 1314-1319.

[12] Maxwell NC, Davies PC, Kotecha S. Antenatal infection and inflammation: what is new?[J]. Curr Opin Infect Dis, 2006, 19(3): 253-258.

[13] Ryan RM, Ahmed Q, Lakshminrusimha S. Inflammatory mediators in the immunobiology of bronchopulmonary dysplasia[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2008, 34(2): 174-190.

(本文编辑:黄 榕)