论著·临床研究

肺表面活性物质蛋白 B 基因多态性与新生儿呼吸窘迫综合征易感性的相关性研究

卢维城[1] 向伟[2] 吴明[3] 郑旭[1] 林静[1] 陈兴月[1] 魏海波[1] 詹端[1] 李春蕾[1]

(1. 海南省人民医院新生儿科,海南 海口 570311; 2. 海南省妇幼保健院,海南 海口 570206;
3. 海南省人民医院心脏内科,海南 海口 570311)

[摘 要] **目的** 研究肺表面活性物质蛋白(SP)B 基因单核苷酸多态性分布以及与新生儿呼吸窘迫综合征(RDS)的关系。**方法** 选择 88 例 RDS 早产儿和未并发 RDS 的早产儿 103 例作为研究对象,采用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,应用聚合酶联反应-限制性片段长度多态性技术检测 SP-B -18A/C、SP-B 1580C/T 两个位点的单核苷酸多态性,分析两个位点多态性与 RDS 的关系。**结果** SP-B -18A/C、SP-B 1580C/T 两个位点在病例组和对照组中均存在多态性,与未并发 RDS 的早产儿对照组比较,RDS 患儿 SP-B 1580C/T 位点基因型以 CC 型明显增多,($\chi^2=12.26$, $P<0.01$),C 等位基因分布频率显著增高($\chi^2=11.97$, $P<0.01$),携带 C 等位基因的个体患 RDS 的风险是非携带者的 2.26 倍($OR=2.26$, 95% CI: 1.42~3.60)。两组 SP-B -18A/C 位点的基因型和等位基因分布频率,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** SP-B 1580 位点 C/T 多态性与 RDS 有关,SP-B 1580C/T 可能是 RDS 的易感基因,携带 SP-B 1580 位点 C 等位基因的个体患 RDS 的风险增加。SP-B -18A/C 与 RDS 无关。

[中国当代儿科杂志,2012,14(1):24-27]

[关 键 词] 呼吸窘迫综合征; 肺表面活性物质蛋白 B; 单核苷酸多态性; 新生儿
[中图分类号] R725.6 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2012)01-0024-04

Relationship between pulmonary surfatcant-associated protein B polymorphisms and the susceptibility to neonatal respiratory distress syndrome

LU Wei-Cheng, XIANG Wei, WU Ming, ZHNEG Xu, LIN Jing, CHEN Xing-Yue, WEI Hai-Bo, ZHAN Duan, LI Chun-Lei. Department of Neonatology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, *China* (*Xiang W, Email: xiangwei8@163.com*)

Abstract: Objective To study the relationship between pulmonary surfatcant-associated protein B (SP-B) gene polymorphisms and their susceptibility to neonatal respiratory distress syndrome (RDS). **Methods** Eighty-eight preterm infants with RDS (RDS group) and 103 infants without RDS (control group) were enrolled. The genomic DNA was isolated using DNA kits. Polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism technique was used to detect the genotype and allele frequency of the SP-B -18A/C and SP-B 1580C/T single nucleotide polymorphisms. The association between the polymorphisms and RDS was analyzed. **Results** SP-B -18A/C and SP-B 1580C/T were found to be polymorphic in both RDS and control groups. The frequencies of CC genotype ($\chi^2=12.26$, $P<0.01$) and C allele ($\chi^2=11.97$, $P<0.01$) of SP-B 1580C/T were significantly higher in the RDS group than in the control group. The C allele significantly increased the risk of RDS ($OR=2.26$, 95% CI: 1.42-3.60). The frequencies of genotype and allele of SP-B -18A/C showed no significant difference between the two groups. **Conclusions** SP-B 1580C/T polymorphism contributes to the etiology of RDS and may serve as the susceptibility gene for RDS. The C allele increases the risk of RDS. SP-B -18A/C shows no association with the etiology of RDS. [**Chin J Contemp Pediatr**, **2012**, **14** (**1**):**24-27**]

Key words: Respiratory distress syndrome; Pulmonary surfactant protein B; Single nucleotide polymorphism; Newborn infant

肺表面活性物质(pulmonary surfactant,PS)是由磷脂和四种肺表面活性物质蛋白(SP)构成的磷脂-蛋白复合物,PS 主要的生理功能是降低肺泡表面张力。SP 在肺表面活性物质中所占的含量虽少,

[收稿日期]2011-08-26;[修回日期]2011-09-27
[基金项目]海南省卫生厅课题(琼卫 2009-24)。
[作者简介]卢维城,男,硕士,主治医师。
[通信作者]向伟,教授。

但却是 PS 发挥功能的重要载体，SP-B 具有促进磷脂薄膜形成、分布、吸附的作用[1]，其活性和浓度直接决定 PS 的功能与活性。国外研究表明 SP-B 基因多态性是引起新生儿呼吸窘迫综合征（respiratory distress syndrome，RDS）的重要因素[2-3]，目前国内这方面的研究鲜有报道。本研究采用聚合酶联反应－限制性片段长度多态性技术检测 SP-B -18A/C、SP-B 1580C/T 两个位点的基因型频率及等位基因的分布情况，分析两个位点与 RDS 的关系，寻找 RDS 的易感基因，为 RDS 防治提出新的措施。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组 2009 年 7 月至 2010 年 10 月在海南省人民医院新生儿科住院的 RDS 患儿 88 例。RDS 诊断标准参照第三版《实用新生儿学》[4]。纳入标准包括：①胎龄小于 37 周的早产儿；②新生儿生后 12 h 内出现进行性呼吸困难、发绀、呻吟、鼻扇和三凹征；③胸片主要表现为双肺野透亮度减低，呈毛玻璃样改变，可见支气管充气征。

1.1.2 对照组 同期在海南省人民医院新生儿科住院未并发 RDS 的早产儿 103 例。胎龄、出生体重、性别和产前使用激素等情况与病例组比较差异无统计学意义。

1.1.3 排除标准 病例组和对照组中若出现以下情况则除外：①糖尿病母亲分娩的患儿；②有严重宫内窘迫史或出生重度窒息的患儿；③产前或产后预防性应用表面活性物质的患儿；④先天性畸形、严重宫内感染患儿；⑤血标本采集前 2 周曾有输血史的患儿。

研究方案经海南省人民医院伦理委员会批准及家长知情同意。

1.2 试剂与方法

1.2.1 主要试剂及材料 根据 GenBank（gi：6439）提供的基因序列和有关文献[5]，设计 PCR 引物，委托上海生物工程技术服务有限公司合成（表 1）。主要试剂及材料还包括 Taq DNA 聚合酶、Apa Ⅱ、Dde Ⅰ、Hinf Ⅰ（Fermentas），SYBR Green Ⅰ（Bio Teke Corporatio）、PCR 仪（Biometra Tgradient 96，德国）及凝胶成像系统（Tanon 4100，上海）。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 取 2 mL 静脉血按 DNA 试剂盒（北京天根公司：DP-319）的操作说明书进行。

1.3.2 PCR 反应体系及反应参数 反应总体积为 10 μL，包括基因组 DNA（50 ng/μL）0.5 μL，10×PCR 缓冲液 1.0 μL，dNTPs（20 mM）0.2 μL，上下游引物各 0.3 μL，5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL，不足体积用灭菌双蒸水补足至 10 μL。-18A/C 位点循环参数为：①95℃ 预变性 5 min；②95℃变性 45 s；③64.5℃退火 45 s；④72℃延伸 1 min，重复②～④5 个循环，每个循环退火温度降低0.5℃；⑤95℃变性 45 s；⑥58.5℃退火 45 s；⑦72℃延伸 1 min，重复⑤～⑦30 个循环，72℃延伸 10 min。1580C/T 位点的循环参数为：除步骤③65.5℃退火 45 s 和⑥59.5℃退火 45 s 外，余步骤同 -18A/C 位点。产物用含 GoldView 核酸染料的 2% 琼脂糖凝胶，加上 0.5×TBE 缓冲液电泳 1 h 后用自动凝胶成像系统分析。

1.3.3 酶切 在 0.5 mL EP 管中，依次加入10×Buffer 2 μL、内切酶 1 μL、PCR 产物 4 μL、ddH_2O 13 μL 形成 20 μL 体积 RFLP 反应体系，振荡混匀后，37℃酶切 1 h，65℃水浴 30 min，酶切后用 SYBR Green Ⅰ染色，将染色后的 PCR 产物行 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳液为 1×TBE，稳压 160 V 电泳 2 h。电泳完全之后利用凝胶成像系统进行拍照保存，对照目的条带并统计各位点基因型。

表 1 引物序列和内切酶

SNP 位点	引物序列（5′→3′）	PCR 产物长度（bp）	内切酶
-18A/C	F 5′-GTCCAGCTATAAGGGGCCGTG-3′	168	Apa Ⅱ
	R 5′-GTGAGTGGTGGAGCTGCCTA-3′		
1580C/T	F 5′-CTCGAATTCCGTGAACTCCAGCACCACCC-3′	270	Dde Ⅰ
	R 5′-GTGAGCTTGCAGCCCTCTCA-3′		

1.4 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析，计量资料采用均数 ± 标准差表示，两组间比较采用 t 检验；基因型和等位基因频率采用直接计数法计算，各组间基因型及等位基因频率比较采用四格表或 R×C 列联表 χ^2 检验，并以比值比（OR）及 95% 可信区间（CI）表示相对风险度，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SP-B -18A/C、1580C/T 位点多态性检测

-18A/C 位点扩增后片段大小为 168 bp，经酶切后产生 3 个片段，分别为 19 bp、149 bp、168 bp，其基因型辨别方法为：条带中含有 19 bp、149 bp 片段的为 AA 基因型，含有 168 bp 片段的为 CC 基因型，含有 19 bp、149 bp、168 bp 片段的为 AC 基因型。

1580C/T 扩增后片段大小为 270 bp,经酶切后产生 4 个片段,分别为 20 bp、96 bp、164 bp、184 bp,其基因型辨别方法为:条带中含有 20 bp 、96 bp 、164 bp 片段的为 CC 基因型,含有 96 bp、184 bp 片段的为 TT 基因型,含有 20 bp、96 bp、164 bp、184 bp 片段的为 CT 基因型。

2.2 两组患儿 SP-B 基因型及等位基因的比较

经 Hardy-Weinberg 遗传平衡法检验,各基因型及等位基因频率均达到遗传平衡,具有群体代表性。对照组和病例组均存在 SP-B 基因多态性,-18A/C 基因型频率分布以 AC 型最为常见,CC 型和 AA 型次之,等位基因的频率以 C 型多见。1580C/T 基因型频率分布以 CC 型多见,CT 型和 TT 型次之,等位基因的频率以 C 型常见。经 χ^2 检验,1580C/T 位点多态性在病例组和对照组两组人群基因型频率分布差异有统计学意义,病例组患儿 1580C/T 位点基因型 CC 型明显增多,TT 型明显减少($\chi^2 = 12.26$, $P < 0.01$);两组人群等位基因频率分布差异也有统计学意义,病例组 C 等位基因分布频率明显增高($\chi^2 = 11.97$, $P < 0.01$),携带 C 等位基因的个体患病风险是非携带者的 2.26 倍($OR = 2.26$, 95% CI: 1.42 ~ 3.60)。经 χ^2 检验,-18A/C 位点多态性在病例组和对照组两组人群的基因型频率分布差异无统计学意义($\chi^2 = 2.33$, $P > 0.05$),两组人群等位基因频率分布差异也无统计学意义($\chi^2 = 1.28$, $P > 0.05$)。见表 2 ~ 3。

表 2 两组 SP-B -18A/C、1580C/T 位点基因型比较 [n(%)]

组别	n	SP-B -18A/C			SP-B 1580C/T		
		CC	AC	AA	CC	CT	TT
对照组	103	34(33.0)	49(47.6)	20(19.4)	42(40.8)	48(46.6)	13(12.6)
病例组	88	32(36.4)	46(52.3)	10(11.4)	58(65.9)	25(28.4)	5(5.7)
χ^2 值		2.33			12.26		
P 值		0.31			0.002		

表 3 两组 SP-B -18A/C、1580C/T 位点等位基因比较 [n(%)]

组别	n	SP-B -18A/C		SP-B 1580C/T	
		C	A	C	T
对照组	103	117(56.8)	89(43.2)	132(64.1)	74(35.9)
病例组	88	110(62.5)	66(37.5)	141(80.1)	35(19.9)
χ^2 值		1.28		11.97	
P 值		0.26		0.001	
OR 值		1.27		2.26	
95% CI		0.84 ~ 1.91		1.42 ~ 3.60	

3 讨论

SP-B 基因定位于 2 号染色体的短臂,即 2p12→p11.2,长度约为 9500 bp,由 11 个外显子组成[6]。遗传因素在 RDS 发病机制中具有重要作用,剔除 SP-B 基因的小鼠生后不久即出现呼吸衰竭而死亡[7],死于 RDS 患儿的肺组织经免疫组化提示 SP-B 含量减少[8]。SP-B 遗传缺陷由许多 SP-B 基因突变引起,最常见的突变是外显子 4 上的 121ins2,即外显子 4 的 121 号密码子的第一个碱基 C 被 GAA 取代引起框移,该突变约占 SP-B 突变的 2/3[9]。国内 2008 年尹晓娟等[10]对 20 例汉族新生儿 RDS 与 SP 遗传缺陷的研究发现,2 例 42 周患儿含有 SP-B 基因 Intron 4 121ins2 的遗传缺陷变异体。

除 SP-B 基因突变导致 SP-B 含量缺乏或减少之外,SP-B 基因单核苷酸多态性也是影响 SP-B 含量的重要因素。-18A/C 位点位于 SP-B 基因启动子的 TAAT 盒与转录起始点之间。SP-B 基因启动子构象及其与转录因子的结合能力可以影响 SP-B 基因的转录水平。Steagall 等[11]研究证实,SP-B -18A/C 位点中 C 等位基因比 A 等位基因更能有效地提高转录活性,在支气管肺泡灌洗液中,AC 基因型 SP-B 含量是 AA 基因型的 3 倍。Flores 等[12]研究发现 -18A/C 位点多态性与 RDS 有关。但本研究结果表明 RDS 组和对照组的基因型和等位基因的频率均无显著性差异,说明 SP-B -18A/C 位点多态性与 RDS 易感性无关,与 Flores 等的实验结果不同,主要原因可能与基因的种族、地区分布差异有关,或者与研究样本量大小有关。

SP-B 1580C/T 位点多态性位于 SP-B 基因外显子 4 上,1580C/T 位点编码 SP-B 前体的 131 位上的苏氨酸并促进 129 位的天冬氨酸糖基化。天冬氨酸糖基化可能影响 SP-B 的加工折叠和分泌。Lin 等[13]研究发现 1580 位点 C 等位基因被认为是 RDS 的易感基因。Haataja 等[14]研究发现 1580C/T 的基因多态性是引起 SP-A 等位基因作为 RDS 易感或保护性因素的基因决定簇。Marttila 等[15]研究发现 1580C/T 的基因多态性与 RDS 相关, C 等位基因被认为是 RDS 的易感因素。Flores 等[12]应用延伸的传递不平衡检验方法结合以家族为基础的关联检验方法检测 RDS 患儿及其父母的 1580C/T 位点多态性,直接证实该位点也与 RDS 相关。本研究发现病例组 1580C/T 位点 C 等位基因频率明显高于对照组,携带 C 等位基因的早产儿患 RDS 的相对危险度

为非携带者的 2.26 倍,提示 1580C/T 为 RDS 的易感基因。本研究结果可以解释临床中选用不含 SP 的人工合成表面活性物质制剂(如 Exosurf)行表面活性物质替代疗法时,部分患儿无论是在改善氧合还是提高存活率等方面均比应用含有 SP 的天然表面活性物质效果差,其原因可能与患儿携带 1580C/T 多态性位点导致表面活性物质中 SP-B 不足而影响整体表面活性物质的功能有关。

本研究首次在国内探讨 SP-B 基因多态性与 RDS 的关系,但由于伦理原因无法检测未行气管插管患儿的肺泡灌洗液中的 SP-B 含量以比较各多态性位点对 SP-B 表达的影响。因此在今后的研究中需进一步扩大研究的样本量并在伦理道德的允许条件下检测肺组织或肺泡灌洗液中的 SP-B 含量,进一步论证 SP-B 基因多态性与 RDS 发病机制的关系。

[参 考 文 献]

[1] Whitsett JA, Nogee LM, Weaver TE, Horowitz AD. Human surfactant protein B: structure, function, regulation, and genetic disease[J]. Physiol Rev, 1995, 75(4): 749-757.

[2] Floros J, Veletza SV, Kotikalapudi P, Krizkova L, Karinch AM, Friedman C, et al. Dinucleotide repeats in the human surfactant protein B gene and respiratory distress syndrome[J]. Biochem J, 1995, 305(Pt 2): 583-590.

[3] Nogee LM, Wert SE, Proffit SA, Hull WM, Whitsett JA. Allelic heterogeneity in surfactant protein B deficiency[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(3 Pt 1): 973-981.

[4] 金汉珍. 新生儿呼吸窘迫综合征[M]//金汉珍,黄德珉,官希吉. 实用新生儿学. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,2003: 421-427.

[5] Lyra PP, Vaz FA, Moreira PE, Hoffmann JW, Demello DE, Diniz EM. Comparison of surfactant protein B polymorphisms of healthy term newborns with preterm newborns having respiratory distress syndrome[J]. Braz J Med Biol Res, 2007, 40(6): 779-786.

[6] Vamvakopoulos NC, Mody WS, Floros J. Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein B gene (SFTP3) to chromosome 2p12→p11.2[J]. Cytogenet Cell Genet, 1995, 68(1-2): 8-10.

[7] Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, et al. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(17): 7794-7798.

[8] deMello DE, Phelps DS, Patel G, Floros J, Laqunoff D. Expression of the 35 kDa and low molecular weight surfactant-associated proteins in the lungs of infants dying with respiratory distress syndrome[J]. Am J Pathol,1989,134(6): 1285-1293.

[9] Wert SE, Whitsett JA, Nogee LM. Genetic disorders of surfactant dysfunction[J]. Pediatr Dev Pathol, 2009, 12(4): 253-274.

[10] 尹晓娟,罗分平,李爱华,安育林,封志纯. 20 例汉族新生儿呼吸窘迫综合征肺表面活性物质蛋白遗传缺陷的研究[J]. 中华儿科杂志 2008,46(1):9-12.

[11] Steagall WK, Lin JP. Moss J. The C/A (-18) polymorphism in the surfactant protein B gene influences transcription and protein levels of surfactant protein B[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(2): L448-L453.

[12] Flores J, Thomas NJ, Liu WL, Papagaroufalis C, Xanthou M, Pereira S, et al. Family-based association tests suggest linkage between surfactant protein B (SP-B) (and flanking region) and respiratory distress syndrome (RDS): SP-B haplotypes and alleles from SP-B linked loci are risk factors for RDS[J]. Pediatr Res, 2006, 59(4 Pt 1): 612-621.

[13] Lin Z, Pearson C, Chinchilli V, Pietschmann SM, Luo J, Pison U, et al. Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of SP-B Thr131Ile with ARDS[J]. Clin Genet, 2000, 58(3): 181-191.

[14] Haataja R, Rämet M , Marttila R, Hallman M. Surfactant proteins A and B as interactive genetic determinants of neonatal respiratory distress syndrome[J]. Human Mol Genet, 2000, 9(18): 2751-2760.

[15] Marttila R, Haataja R, Rämet M, Lofgren J, Hallman M. Surfactant protein B polymorphism and respiratory distress syndrome in premature twins[J]. Hum Genet, 2003, 112(1): 18-25.

(本文编辑:王庆红)