

论著 · 临床研究

血小板活化因子乙酰水解酶基因多态性与早产儿颅内出血的关联性

张茜¹ 程欣茹¹ 徐淑玲² 时赞扬¹ 盛光耀¹

(1. 郑州大学第一附属医院儿科, 河南 郑州 450052; 2. 郑州市妇幼保健院儿科, 河南 郑州 450012)

[摘要] **目的** 本研究从基因水平探讨血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)基因第9外显子 Val279Phe 单核苷酸多态性与早产儿颅内出血是否具有关联性, 为有效预防颅内出血的发生提供理论依据。**方法** 选取颅内出血早产儿 58 例作为出血组, 无颅内出血早产儿 65 例作为对照组, 应用聚合酶链式反应(PCR)检测 PAF-AH 第9外显子 Val279Phe 单核苷酸多态性位点的基因型及等位基因的分布情况, 进行病例对照研究分析。**结果** 出血组和对照组 PAF-AH 第9外显子 Val279Phe 基因型分布频率差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中出血组正常基因型频率(63.8%)明显低于对照组(81.5%); 出血组突变杂合子基因型(34.5%)明显高于对照组(16.9%)。两组 PAF-AH 等位基因分布频率差异亦有统计学意义($P < 0.05$), 其中出血组 T 等位基因频率(19.0%)明显高于对照组(10.0%)。**结论** PAF-AH 第9外显子 Val279Phe 的单核苷酸基因多态性与早产儿颅内出血有关。

[中国当代儿科杂志, 2012, 14(8): 612-615]

[关键词] 颅内出血; 血小板活化因子乙酰水解酶; 单核苷酸多态性; 早产儿

[中图分类号] R722.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)08-0612-04

Association between platelet-activating factor acetylhydrolase gene polymorphism and intracranial hemorrhage in preterm infants

ZHANG Qian, CHENG Xin-Ru, XU Shu-Ling, SHI Zan-Yang, SHENG Guang-Yao. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: jsbwn@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To explore whether Val279Phe single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 9th exon of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) are associated with intracranial hemorrhage in preterm infants. **Methods** A case-control study was performed. Polymerase chain reaction (PCR) was used to test genotype and allele frequencies of the 9th exon Val279Phe SNPs of PAF-AH in 58 preterm infants with intracranial hemorrhage (hemorrhage group) and 65 preterm infants without intracranial hemorrhage (control group). **Results** There were significant differences in genotype frequency of Val279Phe SNPs in the 9th exon of PAF-AH between the hemorrhage and control groups ($P < 0.05$). Frequency of normal genotype in the hemorrhage group (63.8%) was significantly lower than in the control group (81.5%). In contrast, frequency of heterozygous genotype (34.5%) in the hemorrhage group was significantly higher than in control group (16.9%). There were also significant differences in allele frequency of Val279Phe SNPs in the 9th exon of PAF-AH between the two groups ($P < 0.05$). T allele frequency in the hemorrhage group (19.0%) was significantly higher than in the control group (10.0%). **Conclusions** Val279Phe SNPs in the 9th exon of PAF-AH may be associated with intracranial hemorrhage in preterm infants. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(8): 612-615]

Key words: Intracranial hemorrhage; Platelet-activating factor acetylhydrolase; Single nucleotide polymorphism; Preterm infant

早产儿颅内出血(ICH)是由多种原因引起的以颅内高压、呼吸衰竭、抽搐及黄疸等为主要表现的危重疾病,胎龄越小,发病率越高,该病死亡率及致残率极高,严重者可有神经系统后遗症。近年来,随着围产医学及新生儿重症监护技术水平不断提高,早产儿存活率逐年增高,ICH发生率也有增无减。已经证实血小板活化因子乙酰水解酶(platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH)基因第9外显子 Val279Phe 的单核苷酸多态性是成人急性脑出血的危险因素^[1-3]。早产儿 ICH 除了与自身的解剖生理特点和

[收稿日期] 2012-04-14; [修回日期] 2012-05-24
[基金项目] 河南省科技厅基金资助项目(项目批准号:083SGYS33263-5)。
[作者简介] 张茜,女,博士,副教授,副主任医师。

多种围产期高危因素,如脑室管膜下生发基质不完善、凝血因子缺乏、缺氧酸中毒及脑血流动力学等有关外,是否也同 PAF-AH 第 9 外显子 Val279Phe 单核苷酸基因突变有相关性,目前尚未见相关报道。本研究采用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测 PAF-AH 基因型及等位基因的分布情况,分析其与早产儿 ICH 的相关性,寻找早产儿 ICH 易感基因,探讨早产儿 ICH 的发生机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2011 年 7 月至 2012 年 2 月在郑州大学第一附属医院新生儿重症监护室 (NICU) 住院的早产儿 (胎龄 $27^{+3} \sim 36^{+6}$ 周) 作为研究对象。ICH 的诊断标准依据实用新生儿学第 4 版^[4],头颅 B 超对颅内中心部位病变分辨率高,为 ICH 的特异性诊断手段,本研究所有早产儿生后 3 d 内均进行床旁头颅 B 超检测,根据有无 ICH 分为出血组及对照组。出血组共 58 例,其中男 37 例,女 21 例,胎龄 $27^{+3} \sim 36^{+6}$ 周,出生体重 900 ~ 2750 g。根据出血程度分度:Ⅰ度 22 例 (脑室管膜下出血);Ⅱ度 18 例 (脑室出血不伴脑室扩张);Ⅲ度 15 例 (脑室出血伴脑室扩张);Ⅳ度 3 例 (脑室出血伴脑实质出血)。对照组共 65 例,其中男 40 例,女 25 例,胎龄 $27^{+4} \sim 36^{+6}$ 周,出生体重 1000 ~ 2870 g。所有早产儿均排除了重度窒息、先天畸形及遗传代谢性疾病。两组早产儿性别、胎龄及出生体重的差异无统计学意义。本研究征得患儿家属同意并签署知情同意书,研究方案经郑州大学第一附属医院医学伦理委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 外周股静脉采血 2 mL, 2% EDTA 抗凝,置 4℃ 冰箱保存,采用蛋白酶 K-酚-氯仿法提取 DNA。

1.2.2 引物的合成与 PCR 的扩增 针对 PAF-AH 基因第 9 外显子 Val279Phe 正常等位基因及突变等位基因,参考文献^[5]设计 4 条引物:上游引物 A: 5'-CTACAAATTTATATCATGCTT-3';下游引物 B: 5'-TTTACTATTCTCTTGCTTTAC-3';下游引物 C: 5'-TCACTAAGAGTCTGAATAAC-3';下游引物 D: 5'-TCACTAAGAGTCTGAATAAA-3'。

引物由上海生物工程公司合成。其中引物 A + B 特异性扩增 PAF 乙酰水解酶的全部第 9 外显子,引物 A + C 扩增正常等位基因,引物 A + D 扩增突

变等位基因。

PCR 反应体系共 50 μ L,其中 $2 \times$ Taq masterMix (Fermentas) 25 μ L, 10 μ mol/L 引物各 2 μ L, DNA 模板 0.6 μ g, 不足体积用灭菌双蒸水补足至 50 μ L。PCR 循环条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性、56℃ 退火、72℃ 延伸各 1 min,共 5 个循环;94℃ 变性、56℃ 退火、72℃ 延伸各 30 s,共 25 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,电泳液为 $0.5 \times$ TAE 液,电压 100 V,50 min 后置 5 μ g/L EB 中染色 15 min,PCR Marker (Promega) 作参照,紫外灯下观察结果并拍照。

1.3 统计学分析

分别计算各组基因型和等位基因的频率。应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验;组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电泳检测基因多态性

引物 (A + B) PCR 特异性扩增片段长 160 bp,为 PAF-AH 的第 9 外显子片段;引物 (A + C)、(A + D) 分别扩增正常等位基因 (G) 及突变等位基因 (T),片段长均为 108 bp。根据所加入的不同引物扩增结果,鉴定所有样本基因型。均以第 9 外显子扩增片段为阳性前提,样本如仅能扩增出正常等位基因片段者,为正常基因型 (GG);仅扩增出突变等位基因片段者,为突变纯合子基因型 (TT);若兼而有之则为突变杂合子基因型 (GT)。见图 1。

2.2 两组早产儿 PAF-AH 基因型及等位基因频率的比较

经检验,两组基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 (*P* > 0.05),说明资料具有群体代表性。出血组与对照组 PAF-AH 基因型和等位基因分布见表 1。因 TT 型例数少,计算 χ^2 值及 *P* 值时将 TT 型归入 GT 型一起分析。出血组及对照组均存在 PAF-AH 基因多态性,在对照组中,基因型频率的分布以 GG 型最常见,GT 型次之,等位基因的频率以 G 最常见。与对照组比较,出血组 GT 型明显增高,GG 型明显下降,等位基因 T 的基因频率明显增高,两组 PAF-AH 基因型及等位基因分布频率的差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

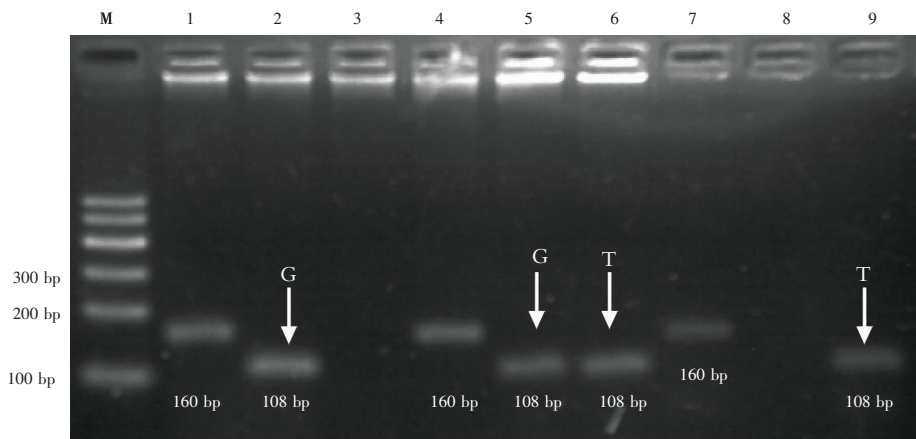


图1 PCR 检测 PAF-AH 基因第 9 外显子 Val279Phe 琼脂糖凝胶电泳图 M: PCR 标准分子量;第 1~3 泳道为未突变基因型(GG);第 4~6 泳道为突变杂合子基因型(GT);第 7~9 泳道为突变纯合子基因型(TT)。图中 G 为正常等位基因,T 为突变等位基因。

组别		基因型			等位基因	
		GG	GT	TT	G	T
对照组	65	53(81.5)	11(16.9)	1(1.5)	117(90.0)	13(10.0)
出血组	58	37(63.8)	20(34.5)	1(1.7)	94(81.0)	22(19.0)
χ^2 值		4.917			4.038	
P 值		0.027			0.044	

3 讨论

早产儿 ICH 发生过程复杂。小于 32 周的早产儿脑室周围室管膜下及小脑软脑膜下存在胚胎生发层基质,其血管壁缺乏胶原纤维及弹力纤维的支持,仅含单层内皮细胞,对缺氧、酸中毒极敏感,易发生坏死、崩解而出血,同时产生大量血小板活化因子(PAF);ICH 时中性粒细胞产生 PAF,血管内皮细胞在缺血应激下也可产生 PAF,进而对脑循环起重要作用。而其脑组织中脂质结构也十分丰富,对 PAF、氧自由基损伤非常敏感。另外,PAF 通过内皮细胞使血管通透性增加,导致血管源性脑水肿,PAF 还可使脑血管自主调节功能紊乱,使脑血流随着外周血压的变化而产生波动,即压力被动性脑血流,增加了 ICH 的风险。

PAF-AH 基因突变,使 PAF-AH 酶水平及活性降低,对 PAF 的降解功能不全,可使 PAF 水平升高。升高的 PAF 增加内皮细胞钙离子信号转导,并引起内皮损伤^[5],导致内皮细胞功能障碍、血管通透性增加、脑血管自动调节功能受损。同时,升高的 PAF 活化环加氧酶依赖途径和电压门控钾离子通道途径两种独立旁路,并使内皮细胞膜表面的神经磷脂酶

依赖性的微囊蛋白富集,降低一氧化氮的含量,与损伤的内皮细胞一起引起脑损伤^[6]。PAF-AH 可以水解甘油骨架上含有短链残基的氧化磷脂^[7],PAF-AH 缺乏能够引起氧化磷脂的积聚,加速血管的损伤。本课题组在前期的研究中已经检测了 ICH 早产儿活动期、稳定期 PAF 及 PAF-AH 水平,并设正常早产儿进行对照,发现早产儿 ICH 活动期较出血稳定期及无出血组早产儿 PAF-AH 活性明显降低、PAF 水平显著增高,提示 PAF 及 PAF-AH 参与了早产儿 ICH 的发生^[8]。

PAF-AH 属于磷脂酶 A2 家族,广泛分布于机体的各种组织,该酶能够严格控制体内 PAF 浓度^[9],对 PAF 起关键性的降解作用。PAF 具有较强且多种生物活性,能够活化血小板和其他炎症细胞,在感染、变态反应、呼吸、消化、心血管及神经等系统的炎症反应中扮演重要角色。因 PAF-AH 对 PAF 的降解作用,使其在体内对多种疾病的防治都有重要作用。

Stafforini 等^[10]发现 PAF-AH 基因第 9 外显子存在 Val279Phe 单核苷酸多态性,该位点通过编码基因 G→T 变异,使遗传密码子由 GUU 转变为 UUU,最终导致氨基酸缬氨酸(Val)→苯丙氨酸(Phe)的转变。由于突变位点位于酶活性的中心位置—丝氨酸-273、天冬氨酸-296,该位点是蛋白质适当折叠保持活性的关键。蛋白质空间结构的变化导致其杂合子(Val/Phe)基因型酶活性是正常(Val/Val)基因型的一半,纯合子的酶活性几乎无法测出(Phe/Phe)^[11]。目前发现 Val279Phe 单核苷酸多态性与银屑病、哮喘、心脑血管等疾病有关,并证实其为成人脑血管疾病的独立危险因素^[10,12-13]。

本研究发现对照组 PAF-AH 基因第 9 外显子 T 等位基因携带率为 10. 0% , 明显低于日本人群 (21. 5%)^[11] , 也低于国内周春等^[14] 报道的 15. 28% (中国广西人群)。与对照组相比, 发生 ICH 的早产儿 PAF-AH 基因第 9 外显子突变基因型和 T 等位基因频率均显著升高, 这表明 PAF-AH 基因第 9 外显子 Val279Phe 单核苷酸多态性可能是早产儿 ICH 的遗传易感因素。研究发现, PAF-AH 对 Wnt 旁路起负性调节作用^[15] , 而动物实验表明, Wnt 旁路的抑制增加了血管出血的风险^[16-17] 。这可能也是 PAF-AH 基因 Val279Phe 单核苷酸多态性导致早产儿 ICH 的因素之一。

综上所述, 本研究发现 PAF-AH 基因 Val279Phe 单核苷酸多态性与早产儿 ICH 相关, 从遗传学角度探讨了早产儿 ICH 的发生机制, 为早产儿 ICH 的临床防治提供了理论依据, 但缺乏更为可靠的大样本病例对照研究结果的支持。今后的研究将进一步论证 PAF-AH 基因 Val279Phe 单核苷酸多态性与早产儿 ICH 发病机制的关系, 为早产儿 ICH 的防治提供新的方向。

[参 考 文 献]

[1] Yoshida H, Imaizumi T, Fujimoto K, Itaya H, Hiramoto M, Yoshimizu N, et al. A mutation in plasmaplatelet-activating factor acetylhydrolase (Val279-Phe) is a genetic risk factor for cerebral hemorrhage but not for hypertension[J]. *Thromb Haemost*, 1998, 80(3): 372-375.

[2] Hiramoto M, Yoshida H, Imaizumi T, Yoshimizu N, Satoh K. A mutation in plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (Val279-Phe) is a genetic risk factor for stroke[J]. *Stroke*, 1997, 28(12): 2417-2420.

[3] 孙淑云, 李江, 张晨. 血小板活化因子乙酰水解酶基因突变 (Val279-Phe) 与急性脑出血的相关性研究[J]. *神经与精神卫生杂志*, 2003, 3(2): 112-114.

[4] 周丛乐. 颅内出血[M]//邵肖梅, 叶鸿瑁, 丘小汕. 实用新生儿学. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 706-715.

[5] Ito S, Noguchi E, Shibasaki M, Yamakawa-Kobayashi K, Watan-

abe H, Arinami T. Evidence for an association between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency and increased risk of childhood atopic asthma[J]. *J Hum Genet*, 2002, 47(2): 99-101.

[6] Zhou X, He P. Temporal and spatial correlation of platelet-activating factor-induced increases in endothelial [Ca²⁺]_i, nitric oxide, and gap formation in intact venules[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(5): H1788-H1797.

[7] Yang Y, Yin J, Baumgartner W, Samapati R, Solymosi EA, Rep-pien E, et al. Platelet-activating factor reduces endothelial nitric oxide production: role of acid sphingomyelinase[J]. *Eur Respir J*, 2010, 36(2): 417-427.

[8] 程欣茹. PAF 及 PAF-AH 在早产儿颅内出血中的变化及其临床意义[D]. 郑州大学, 2012.

[9] Sekuri C, Cam FS, Tengiz I, Ercan E, Bayturan O, Berdeli A. Association of platelet-activating factor acetylhydrolase gene polymorphism with premature coronary artery disease in Turkish patients[J]. *Anadolu Kardiyol Derg*, 2006, 6(2): 132-134.

[10] Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2)[J]. *Cardio-vasc Drugs Ther*, 2009, 23(1): 73-83.

[11] Stafforini DM, Satoh K, Atkinson DL, Tjoelker LW, Eberhardt C, Yoshida H, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency. A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(12): 2784-2791.

[12] Karabina SA, Gora S, Atout R, Ninio E. Extracellular phospholipases in atherosclerosis[J]. *Biochimie*, 2010, 92(6): 594-600.

[13] 林大东, 毕新岭, 朱克军, 缪明永, 米庆胜, 顾军. 血小板活化因子乙酰水解酶基因 Val279Phe 突变与银屑病的相关性研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2005, 38(3): 151-153.

[14] 周春, 经承学, 李铭芳, 谢湘芝. 血小板活化因子水解酶基因突变与原发性肾病综合征的相关性[J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(23): 1814-1816.

[15] Stremler KE, Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(10): 5331-5334.

[16] Livnat I, Finkelshtein D, Ghosh I, Arai H, Reiner O. PAF-AH Catalytic Subunits Modulate the Wnt Pathway in Developing GABAergic Neurons[J]. *Front Cell Neurosci*, 2010, 4: 19.

[17] Glaw JT, Skalak TC, Peirce SM. Inhibition of canonical Wnt signaling increases microvascular hemorrhaging and venular remodeling in adult rats[J]. *Microcirculation*, 2010, 17(5): 348-357.

(本文编辑: 邓芳明)