论著·临床研究

2',5'-寡腺苷酸合成酶1基因多态性与自发性早产和胎膜早破易感性的病例对照研究

杨晓¹ 张小爱² 吴志豪³ 彭薇¹ 朱丽娜¹ 王艳¹

(1. 北京军区总医院附属八一儿童医院发育生物学实验室, 北京 100700;
2. 军事医学科学院微生物和流行病学研究所病原微生物生物安全重点实验室, 北京 100071;
3. 军事医学科学院疾病预防控制所, 北京 100071)

[摘要] **目的** 探讨2',5'-寡腺苷酸合成酶1(OAS1)基因多态性和自发性早产和胎膜早破易感性的关系。**方法** 收集自发性早产儿599例作为病例组,其中包括胎膜早破171例;孕母无自发性早产和胎膜早破病史的673例足月儿作为对照组。采用病例-对照研究,用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析检测OAS1内含子区rs10774671位点的单核苷酸多态性。**结果** 病例组和对照组两组间OAS1 rs10774671基因型AA、GA、GG以及等位基因A、G的频率之间的差异均无统计学意义;有无胎膜早破病例组分别和对照组比较,上述频率之间的差异均无统计学意义;不同胎龄的自发性早产亚组分别和对照组比较,上述频率之间的差异均无统计学意义。**结论** OAS1基因多态性与自发性早产和胎膜早破易感性之间缺乏关联。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(9): 898-902]

[关键词] 2',5'-寡腺苷酸合成酶;自发性早产;胎膜早破;单核苷酸多态性;早产儿

A case-control study on association between OAS1 polymorphism and susceptibility to spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of membranes

YANG Xiao, ZHANG Xiao-Ai, WU Zhi-Hao, PENG Wei, ZHU Li-Na, WANG Yan. Developmental Biology Laboratory, Baiyi Children's Hospital Affiliated to Beijing Military General Hospital, Beijing 100700, China (Wang Y, Email: 001wangyan@sina.com)

Abstract: Objective To investigate the association between the genetic polymorphism of 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1) and susceptibility to spontaneous preterm birth (SPTB) and preterm premature rupture of membranes (PPROM). **Methods** The case-control study consisted of 599 preterm infants including 171 cases of PPRM, and 673 full-term infants without maternal histories of SPTB and PPRM as controls. The single nucleotide polymorphism (SNP) at OAS1 intron 5, rs10774671, was analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Results** No significant differences were observed between the case and control groups in the frequencies of genotypes (AA, GA, and GG) and alleles (A and G) of OAS1 rs10774671. When the case group was divided into two subgroups with or without PPRM, no significant differences in the genotype and allele frequencies were found between each subgroup and the control group. When the case group was divided into three subgroups with different gestational ages at SPTB, no significant differences in the genotype and allele frequencies were detected between each subgroup and the control group. **Conclusions** No association is identified between OAS1 SNP and susceptibility to SPTB and PPRM. [Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(9): 898-902]

Key words: 2',5'-oligoadenylate synthetase; Spontaneous preterm birth; Premature rupture of membranes; Single nucleotide polymorphism; Preterm infant

[收稿日期] 2015-05-28; [接受日期] 2015-07-20

[基金项目] 国家自然科学基金(81300527)。

[作者简介] 杨晓,女,硕士,主管技师。

[通信作者] 王艳,女,副主任技师。

早产分为自发性早产 (spontaneous preterm birth, SPTB) 和治疗性早产两种, 其中约 75%~85% 的早产为 SPTB, 而 SPTB 中约 50% 是早产胎膜早破 (preterm premature rupture of membranes, PPRM) 导致的^[1]。SPTB 的病因和发病机制至今仍不明确, 然而, SPTB 的发生具有明显的家族聚集性和种族差异性, 说明遗传因素在 SPTB 的发病中起重要作用^[2]。目前, 国内外关于早产遗传易感性的研究报道较少, 相关研究主要集中在探讨与感染、炎症和自身免疫相关的细胞因子方面, 如白细胞介素 (IL)、肿瘤坏死因子 (TNF)、单核细胞趋化因子 (MCP)、含硒蛋白 S (SEPS)、Toll 样受体 (TLR) 等的基因单核苷酸多态性与 SPTB 和 PPRM 遗传易感性的相关性^[3-6]。由于基因的多态性存在种族差异, 即使是同一个基因, 在不同种族中的研究结果也会出现不一致。因此, 针对中国人群进行大样本的早产遗传易感性研究具有十分重要的意义。

2',5'-寡腺苷酸合成酶 1 (2',5'-oligoadenylate synthetase, OAS1) 基因是干扰素诱导效应基因 (包括 MXA、OAS1、PKR 等基因) 之一, 而 IFN 的生物学效应正是通过有活性的 ISG (IFN-stimulated genes) 的转录表达来实现的。该基因编码的 OAS1 蛋白是 IFN 诱导产生的最重要的酶蛋白之一, OAS1 基因启动子区域的多个功能性单核苷酸多态性不仅和 OAS1 蛋白抗病毒感染的活性有关, 而且可以通过调节不同细胞因子 (Th1/IL-2 和 Th2/IL-10) 的分泌来诱导机体对风疹病毒活疫苗的不同免疫反应^[7-8]。考虑到 OAS1 基因多态性对 OAS1 蛋白酶抗病毒感染活性影响以及对细胞因子分泌的调节作用, 我们猜测它的功能性单核苷酸多态性 rs10774671 可能与 SPTB 和 PPRM 的遗传易感性相关。本研究拟通过病例-对照研究探讨 OAS1 启动子区域内的 rs10774671 位点与 SPTB 和 PPRM 发生的关联性, 为早产的早期预测和临床治疗提供有应用价值的遗传标记。

1 资料与方法

1.1 研究对象

从 2009 年 1 月到 2011 年 5 月期间在我院新生儿监护病房住院的新生儿中选择病例组和对照

组。这些新生儿均来自于北京及其周边地区、在遗传学上无关联的汉族人, 排除胎儿畸形、宫内生长受限、子痫、结缔组织病、外伤、出血及任何需要进行引产的疾病。

病例组为胎龄 <37 周的 599 例单胎出生早产儿, 其中 PPRM 171 例。根据胎龄的大小, 病例组又分为 3 个亚组: 超早产组 (胎龄 <28 周; $n=28$)、极早产组 (胎龄 <32 周; $n=102$)、晚期早产组 (胎龄 ≥ 32 周; $n=469$)。临床检查孕妇阴道有液体流出, 阴道液酸碱度测定 $\text{pH}>6.5$, 显微镜检查阴道液涂于玻片上观察到羊齿状结晶, 可诊断为胎膜早破。

对照组的纳入标准为: 单胎妊娠, 胎龄 ≥ 37 周; 孕母无 SPTB 和 PPRM 病史。依照纳入标准, 对照组共纳入 673 例足月儿。

1.2 基因组 DNA 的提取及引物设计

采集每个研究对象 EDTA 抗凝静脉血 2 mL, 采用天根生化全血 DNA 提取试剂盒, 按照操作说明书提取 EDTA 抗凝血全基因组 DNA, 编号后放入 -20°C 冰箱保存备用。

以 Primer Express 3.0 软件设计引物序列。OAS1 基因 rs10774671 位点的引物序列: 上游引物 5'-TCGTCGGTCTCATCGTCTGTACTGTTGCTTTAA-GC-3'; 下游引物 5'-CCCCTACGTGGATCACTCACT-3'。以上引物均由上海生工生物合成。

1.3 应用 PCR 的方法扩增目的基因

PCR 的反应体积为 25 μL , 反应体系为 20 ng 模板 DNA 1 μL , 0.2 μM 的上、下游引物各 1 μL , 2XTaq PCR MasterMix (0.1 U Taq polymerase/ μL , 500 μM dNTP, 20 mM Tris-HCL, 100 mM KCL, 3 mM MgCl_2) 12.5 μL , 其余用去离子水补充。扩增 OAS1 基因反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 63.5°C 退火 30 s; 72°C 延伸 45 s; 重复 12 个循环, 72°C 末延伸 12 min; 94°C 变性 30 s, 57.5°C 退火 45 s; 72°C 延伸 45 s; 重复 20 个循环, 72°C 末延伸 12 min。扩增目的片段长度为: 300 bp; PCR 反应后取 5 μL 产物, 经 2.5%~3% 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像仪下对照 DNA MARK, 观察目的片段的扩增是否成功。

1.4 基因多态性分析

采用以 PCR 为基础的限制性内切酶片段长度多态性分析进行基因多态性分析, 25 μL 酶切反应

体系为：PCR产物 15 μL，10× 缓冲液 2.5 μL，限制性内切酶（BIOLABS 公司）Hind III 1 μL，其余用纯水补足。该反应体系在 37℃ 酶切过夜，酶切产物 10 μL 用 2.5%~3% 的琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪下对照 DNA MARK 鉴定酶切片段大小。若该位点为 A 等位基因，经 Hind III 酶切后，产物为 264 bp 和 36 bp 两个片段；若为 G 等位基因，则切不开，电泳后仅有 300 bp 的片段。

1.5 统计学分析

每一个 SNP 位点的基因型和等位基因型频率通过记数确定；采用 Arlequin 软件检验哈 - 温遗传平衡（Hardy-Weinberg equilibrium, HWE），确定研究样本的群体代表性。采用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析与处理。计数资料用频数（百分率）表示，组间比较采用卡方检验。计量资料呈非正态分布，用中位数（四分位间距） $[P_{50} (P_{25}, P_{75})]$ 表示，采用 Mann-Whitney *U* 检验。采用卡方检验对 OAS1 基因 rs10774671 位点的多态性与 SPTB 和 PPRM 的发生进行风险评估，用所得的比数比（OR）及其 95% 的置信区间（CI）表示风险强度。所有的统计检验均为双侧概率， $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 流行病学资料

以病历和问卷等方法收集全部研究对象的社会人口学资料，见表 1。在母亲年龄、妊娠次数、产次和新生儿性别上，病例组和对照组之间差异无统计学意义，但在胎龄、出生体重、1 min 及 5 min Apgar 评分方面，两组间比较差异有统计学意义（表 1）。

2.2 病例组和对照组 OAS rs10774671 基因型和等位基因频率分布的比较

排除对照组基因分型失败的 19 个样本外，病例组和对照组的实际样本量分别为 599 例和 654 例。基因型分布均符合哈 - 温遗传平衡定律（ $P > 0.05$ ），具有良好的群体代表性。两组 OAS rs10774671 基因型和等位基因频率的分布见表 2。病例组和对照组的 AA、GG、GA 基因型构成比、隐性遗传模式 GA+GG 的构成比及等位基因 A、G 频率之间的差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。由于病例组和对照组比较的卡方检验结果示差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），因此没有必要再计算 OR 及其 95% CI 来评价风险强度。

表 1 病例组和对照组的流行病学资料

项目	对照组 (n=673)	病例组 (n=599)	Z(χ^2) 值	P 值
母亲年龄 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$, 岁]	29(26, 31)	28(26, 30.5)	0.932	0.352
母妊娠次数 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$]	1(1, 7)	1(1, 6)	0.670	0.503
产次 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$]	1(1, 3)	1(1, 3)	0.161	0.872
胎龄 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$, 周]	39.0(38.2, 39.6)	34.0(32.0, 35.4)	30.420	<0.001
出生体重 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$, g]	3400(3045, 3650)	2060(1700, 2500)	27.508	<0.001
性别 [n(%)]				
男	366(54.4)	335(55.9)	(0.282)	0.595
女	307(45.6)	264(44.1)		
1 min Apgar 评分 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$]	10(10, 10)	10(9, 10)	11.513	<0.001
5 min Apgar 评分 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$]	10(10, 10)	10(9, 10)	12.837	<0.001

表 2 病例组和对照组 OAS rs10774671 的基因型和等位基因频率 [n (%)]

组别	n	基因型				等位基因	
		AA	GA	GG	GA+GG	A	G
对照组	654	318(48.6)	281(43.0)	55(8.4)	336(51.4)	917(70.1)	391(29.9)
病例组	599	290(48.4)	276(46.0)	33(5.6)	309(51.5)	856(71.5)	342(28.5)
χ^2 值			4.429		0.006		0.547
P 值			0.109		0.941		0.460

2.3 有无 PPRM 病例组和对照组 OAS rs10774671 基因型和等位基因频率分布的比较

有无 PPRM 病例组和对照组的 AA、GG、GA 基因型构成比、隐性遗传模式 GA+GG 的构成

比和等位基因 A、G 分布频率之间的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)，见表 3。由于组间比较的卡方检验结果显示差异无统计学意义 ($P>0.05$)，因此，没有必要再计算 OR 及其 95%CI 来评价风险强度。

表 3 有无 PPRM 病例组和对照组 OAS rs10774671 基因和等位基因频率的比较 [n (%)]

组别	n	基因型				等位基因	
		AA	GA	GG	GA+GG	A	G
对照组	654	318(48.6)	281(43.0)	55(8.4)	336(51.4)	917(70.1)	391(29.9)
病例组							
有 PPRM 组	171	81(47.4)	79(46.2)	11(6.4)	90(52.6)	241(70.5)	101(29.5)
无 PPRM 组	428	209(48.8)	197(46.0)	22(5.2)	204(47.7)	615(71.8)	241(28.2)

2.4 3 个 SPTB 亚组和对照组 OAS rs10774671 基因型和等位基因频率分布的比较

不同胎龄的 3 个亚组 (超早产组、极早产组、晚期早产组) 与对照组的 AA、GG、GA 基因型构成比、隐性遗传模式 GA+GG 的构成比和等位

基因 A、G 分布频率之间的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)，见表 4。由于组间比较的卡方检验结果显示差异无统计学意义 ($P>0.05$)，因此没有必要再计算 OR 及其 95%CI 来评价风险强度。

表 4 3 个 SPTB 亚组和对照组 OAS rs10774671 基因多态性的基因和等位基因频率 [n (%)]

组别	n	基因型				等位基因	
		AA	GA	GG	GA+GG	A	G
对照组	654	318(48.6)	281(43.0)	55(8.4)	336(51.4)	917(70.1)	391(29.9)
病例组							
超早产组	28	13(46.4)	13(46.4)	2(7.1)	15(53.6)	39(69.6)	17(30.4)
极早产组	102	50(49.0)	43(42.2)	9(8.8)	52(51.0)	143(70.1)	61(29.9)
晚期早产组	469	226(48.1)	220(46.9)	23(4.9)	243(51.8)	672(71.6)	266(28.3)

3 讨论

宫内或全身感染是导致 SPTB 和 PPRM 发生的重要风险因素^[9]。但是，也有研究表明，无论有无宫内感染，促进分娩的炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均可从蜕膜和绒毛膜中分离，而支持妊娠的炎性细胞因子 IL-10 在妊娠组织中则很少存在。表明人类妊娠组织细胞因子本身就有着促进炎症反应的倾向，感染只是诱导因素而非必要因素，也就是说并非所有的炎症性早产都是由感染引起的^[10]。

另一方面，妊娠可以看作是母亲的免疫系统对胎儿的免疫耐受，在这一过程中，I 型辅助型 T 细胞因子 (Th1) 和 II 型辅助型 T 细胞因子 (Th2) 发挥免疫调节的作用，它们通过互相平衡制约来

维持妊娠^[11]。在母亲-胎儿界面的分泌物以及血循环中，正常妊娠时，Th2 细胞因子 IL-4、IL-6 和 IL-10 浓度升高，而 Th1 细胞因子干扰素- γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 浓度降低；病理性妊娠 (如流产、子痫) 与 Th1 细胞因子的浓度升高和 Th2 细胞因子的浓度降低有关；发生 SPTB 和 PPRM 时，IFN- γ 和 TNF- α 等 Th1 细胞因子的浓度显著升高，说明细胞因子分泌水平的不平衡，破坏了母亲对胎儿的免疫耐受从而导致 SPTB 和 PPRM 的发生^[12]。

OAS1 基因的 rs10774671 位点是该基因启动子区最重要的功能性单核苷酸多态性之一，其位于 OAS1 第 5 内含子的最后一位核苷酸，是第 7 外显子的一个剪切受体，决定了 mRNA 的剪接^[7,13-14]。该位点通过影响 mRNA 剪接而影响产物 2',5'-OAS

的酶活性,与多种病毒感染性疾病的发生、发展和治疗转归密切相关^[13,15]。而在本研究结果中,干扰素抗病毒蛋白 OAS1 rs0774671 位点的 AA、GG、GA 基因型、隐性遗传模式 GA+GG 的构成比和 A、G 等位基因在病例组和对照组的分布规律相似;有无 PPRM 病例组分别和对照组比较,上述构成比和等位基因的分布规律也相似。上述结果说明 OAS1 基因的 rs10774671 位点与 SPTB 和 PPRM 的遗传易感性不相关。由于 SPTB 的发生和危害与早产儿出生时的胎龄密切相关,本研究将病例组按照不同胎龄分为 3 个亚组,探讨 OAS1 rs10774671 位点多态性和 SPTB 之间的联系在不同的胎龄间是否存在不同,结果显示 3 个亚组与对照组在 OAS1 rs0774671 位点的 AA、GG、GA 基因型、隐性遗传模式 GA+GG 构成比和 A、G 等位基因的分布规律均相似,说明 OAS1 基因的 rs10774671 位点与 3 个 SPTB 亚组的遗传易感性均不相关。如前所述,该位点和病毒感染性疾病的易感性密切相关,而与 SPTB 和 PPRM 的易感性不相关,可能是因为从某种意义上来说,SPTB 和 PPRM 的发生更倾向于是一种无感染的炎症性反应,所以两者之间缺乏关联是可以解释的。

另外,OAS1 基因启动子区域内的 7 个单核苷酸多态性(rs3741981, rs2057778, rs2285934, rs2285934, rs10774671, rs1051042, rs2660, rs7135577)均位于同一个具有重要功能的连锁不平衡区域内,这一区域内的多个单核苷酸多态性可调节细胞因子的平衡,从而影响机体对风疹病毒活疫苗的先天性免疫反应^[7]。SPTB 和 PPRM 作为复杂性状的疾病,其发生可能与多个基因或一个基因的多个位点的多态性相关,OAS1 基因的 rs10774671 位点与 rs1051042 和 rs2660 位点位于一个紧密型的连锁不平衡区域内,三者具有相似的调节细胞因子分泌的功能,那么这 3 个功能性位点的多态性可能协同影响 SPTB 和 PPRM 的易感性。从本研究的结果来看,单独探讨 rs10774671 位点和 SPTB 和 PPRM 易感性的关系是不相关的,但是并不能完全否定 OAS1 基因与 SPTB 和 PPRM 易感性的关系。因此,需要进一步探讨 OAS1 基因启动子区域的其他位点与 SPTB 和 PPRM 的易感性关系,以确定两者之间是否存在关联。

[参 考 文 献]

- [1] Bhat G, Peltier MR, Syed TA, et al. Fetal membrane biomarker network diversity and disease functions induced by intra-amniotic pathogens[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2013, 69(2): 124-133.
- [2] Varner MW, Esplin MS. Current understanding of genetic factors in preterm birth[J]. *BJOG*, 2005, 112 (Suppl 1): 28-31.
- [3] Yilmaz Y, Verdi H, Taneri A, et al. Maternal-fetal proinflammatory cytokine gene polymorphism and preterm birth[J]. *Dna Cell Biol*, 2012, 31(1): 92-97.
- [4] Macones GA, Parry S, Elkousy M, et al. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(6): 1504-1508.
- [5] Wang Y, Zhang XA, Yang X, et al. A MCP-1 promoter polymorphism at G-2518A is associated with spontaneous preterm birth[J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290(1): 289-296.
- [6] Wang Y, Yang X, Zheng Y, et al. The SEPS1 G-105A polymorphism is associated with risk of spontaneous preterm birth in a Chinese population[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65657.
- [7] Haralambieva IH, Dhiman N, Ovsyannikova IG, et al. 2'-5'-Oligoadenylate synthetase single-nucleotide polymorphisms and haplotypes are associated with variations in immune responses to rubella vaccine[J]. *Hum Immunol*, 2010, 71(4): 383-391.
- [8] Justesen J, Hartmann R, Kjeldgaard NO. Gene structure and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(11): 1593-1612.
- [9] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, et al. Epidemiology and causes of preterm birth[J]. *Lancet*, 2008, 371(9606): 75-84.
- [10] Weissenbacher T, Laubender RP, Witkin SS, et al. Diagnostic biomarkers of pro-inflammatory immune-mediated preterm birth[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 287(4): 673-685.
- [11] Chan RL. Biochemical markers of spontaneous preterm birth in asymptomatic women[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 164081.
- [12] El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, et al. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2004, 52(1): 45-52.
- [13] Lim JK, Lisco A, McDermott DH, et al. Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(2): e1000321.
- [14] Qu HQ, Polychronakos C. Reassessment of the type I diabetes association of the OAS1 locus[J]. *Genes Immun*, 2009, 10 (Suppl 1): S69-S73.
- [15] Barkhash AV, Perelygin AA, Babenko VN, et al. Variability in the 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene cluster is associated with human predisposition to tick-borne encephalitis virus-induced disease[J]. *J Infect Dis*, 2010, 202(12): 1813-1818.

(本文编辑: 邓芳明)