

论著·临床研究

## 内蒙古西部地区汉族新生儿呼吸窘迫综合征与 SP-B 外显子 7 区域 R236C 位点的相关性研究

王晶 梅花 刘春枝 张亚昱 刘春丽 宋丹 张钰恒

(内蒙古医科大学附属医院新生儿科, 内蒙古 呼和浩特 010059)

**[摘要]** **目的** 通过检测和分析肺表面活性物质蛋白 B 基因外显子 7 (exon7) 区域上是否存在基因变异, 探讨其与内蒙古西部地区汉族新生儿呼吸窘迫综合征 (NRDS) 发病的关系。**方法** 采用病例对照研究方法, 选择祖上三代都居住在内蒙古西部地区的汉族 NRDS 患儿 47 例作为病例组, 选择同民族和同群体中未发生 NRDS 的新生儿 47 例为对照组。通过 PCR 基因分析技术检测 SP-B 基因外显子 7 区域上是否有突变, 以及 SP-B 外显子 7 (R236C) 位点的基因型、等位基因分布。**结果** 在内蒙古西部地区汉族新生儿中, SP-B 基因外显子 7 区域无突变发生; SP-B 外显子 7 (R236C) 位点基因型均可检出两种基因型 (CC、CT), 两组中均未检出 TT 基因型。病例组 CC 和 CT 基因型频率分别为 72% 和 28%, C 等位基因频率为 85%, T 等位基因频率为 15%。对照组此两种基因型分别为 85% 和 15%, C 等位基因频率为 93%, T 等位基因频率为 7%。病例组与对照组此位点基因多态性相比等位基因及基因型频率在两组之间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。**结论** 内蒙古西部地区汉族 NRDS 患儿的 SP-B 基因第 7 外显子未发现基因突变。未发现 SP-B 基因外显子 7 (R236C) 位点基因多态性与该地区汉族 NRDS 的发生有明显相关性。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18(9): 802-805]

**[关键词]** 呼吸窘迫综合征; 肺表面活性蛋白 B; 基因多态性; 新生儿

### Relationship between R236C site in exon 7 of SP-B gene and respiratory distress syndrome in Han newborns in western Inner Mongolia

WANG Jing, MEI Hua, LIU Chun-Zhi, ZHANG Ya-Yu, LIU Chun-Li, SONG Dan, ZHANG Yu-Heng. Department of Neonatology, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China (Mei H, Email: meihuayani@sina.com)

**Abstract: Objective** To detect and analyze the genetic variation in exon 7 of lung surfactant protein B (SP-B), and to investigate the relationship between the genetic variation and the incidence of neonatal respiratory distress syndrome (NRDS) in Han populations in western Inner Mongolia. **Methods** In the case-control study, 47 Han infants with NRDS were assigned to case group. All the 47 patients had the last three generations of their ancestors reside in western Inner Mongolia. Forty-seven Han newborns without NRDS were assigned to control group. PCR-based gene analysis was used to determine the mutation in exon 7 of SP-B gene and genotype and allele frequencies of the R236C site in exon 7 of SP-B gene. **Results** In Han newborns in western Inner Mongolia, there was no mutation in exon 7 of SP-B gene; two genotypes, CC and CT, were identified in the R236C site in exon 7 of SP-B gene. No TT genotype was found in the two groups. There were no significant differences in the genotype frequency of CC or CT as well as the allele frequency of C or T between the case and control groups (CC: 72% vs 85%,  $P>0.05$ ; CT: 28% vs 15%,  $P>0.05$ ; C: 85% vs 93%,  $P>0.05$ ; T: 15% vs 7%,  $P>0.05$ ). **Conclusions** There is no mutation in exon 7 of SP-B gene in Han infants with NRDS in western Inner Mongolia. There is no significant association between the gene polymorphism of the R236C site in exon 7 of SP-B gene and the incidence of NRDS in Han populations in that region.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(9): 802-805]

**Key words:** Respiratory distress syndrome; Surfactant protein B; Gene polymorphism; Newborn

[收稿日期] 2016-04-12; [接受日期] 2016-06-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81260107); 内蒙古自然科学基金 (2011MS1111)。

[作者简介] 王晶, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 梅花, 女, 主任医师。

新生儿呼吸窘迫综合征 (neonatal respiratory distress syndrome, NRDS) 是由于肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 缺乏或不成熟所致, 多见于早产儿, 是一种多因素参与的疾病<sup>[1-2]</sup>。遗传因素对 NRDS 的发生有重要的作用<sup>[3]</sup>。研究表明 NRDS 中存在多种基因变异<sup>[4]</sup>, 其中肺表面活性蛋白 B (surfactant protein B, SP-B) 的减少、缺失和基因结构变异与 NRDS 有关, SP-B 基因变异多位于其前 9 个外显子区域, 其中以外显子 2、4 和 7 最为多见。目前国内外研究多集中在外显子 2 和 4 上, 对外显子 7 的研究相对较少。仅少数国外学者研究发现外显子 7 位点基因多态性与 NRDS 发病有关, 例如 Ballard 等<sup>[5]</sup>发现在第 7 外显子上存在点突变可使 SP-B 含量减少, 导致 NRDS 发生。而目前国内尚无相关报道。本研究利用临床病例和基础研究相结合的思路寻找内蒙古地区 SP-B 基因第 7 外显子区域有无基因突变, 以及 SP-B 外显子 7 (R236C) 位点基因多态性的比较, 以期探寻我区 NRDS 发病的分子遗传学机制和防治的新策略。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2013 年 7 月至 2015 年 10 月在内蒙古医科大学附属医院新生儿病房住院治疗的汉族 NRDS 患儿 (祖上三代都居住在内蒙古西部地区的汉族) 47 例为病例组, NRDS 诊断符合欧洲颁布的 NRDS 诊断标准<sup>[1]</sup>。另选取同期住院的汉族非 NRDS 患儿 47 例为对照组, 胸片提示无明确肺部感染和 NRDS 表现, 血常规和超敏 C 反应蛋白检查回报无明确感染者。本研究获得医院伦理委员会批准及家属知情同意。

### 1.2 诊断及排除标准

诊断标准 NRDS 的诊断标准<sup>[1]</sup>: 生后当时或很快发病, 并在生后 2 d 内进行性恶化, 生后早期出现呼吸窘迫如紫绀、呻吟、吸凹和呼吸急促, 随后发展为呼吸衰竭, 吸入空气时  $\text{PaO}_2 < 50 \text{ mm Hg}$ , 有中心性发绀或需要吸氧才能维持  $\text{PaO}_2 > 50 \text{ mm Hg}$ , 肺部 X 线典型表现为毛玻璃样改变和支气管充气征等特异性表现。

排除标准: (1) 严重先天性疾病, 如复杂型

先天性心脏病、膈疝和脑发育不良等; (2) 遗传代谢性疾病, 如苯丙酮尿症、先天性甲状腺功能低下和糖尿病等; (3) 母亲孕后期明确感染史; (4) 多胎; (5) 出生时及生后窒息。

### 1.3 研究方法

1.3.1 样本采集及处理 生后 24 h 内分别抽取两组患儿静脉血各 1 mL, 放于 EDTAK2 管中抗凝, 在  $-80^\circ\text{C}$  的低温冰箱中保存备用。

1.3.2 样本基因组 DNA 提取及其浓度测定 严格按照 TIANamp Blood DNA Kit 血液基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型 - 目录号: DP318) 进行基因组 DNA 提取。使用 Thermo (NANODROP 2000) 仪器检测所提取 DNA 的浓度。

1.3.3 SP-B 基因 PCR 扩增 由北京安美生医药科技有限公司合成 SP-B 基因的上下游引物, 上游的引物是: 5'-GAGGCAGAGCCGGGAAGGTG-3', 下游的引物是: 5'-CACCTCCATACAGTGGGGGCT-TAATG-3'。从样本所提取出的 DNA 总量中取出部分作为待扩增的基因。严格按照 TAKARA PCR Amplification Kit (Code No.: DR011) 使用说明进行 PCR 实验。

1.3.4 DNA 目的片段的序列测定及分析 取得测序样本干冰保存寄送至北京安美生医药科技有限公司进行序列测定, 寻找 SP-B 基因是否存在突变及 SP-B 基因外显子 7 (R236C) 位点基因多态性。

### 1.4 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件作统计分析。计量资料数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用  $t$  检验, 基因突变频率用直接计数法, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组患儿一般情况比较

病例组 47 例患儿中, 男 28 例, 女 19 例, 剖宫产 33 例 (70%), 经产道娩出 14 例 (30%); 胎龄 29 周~40 周 (29~33<sup>+</sup>6 周 30 例, 34~36<sup>+</sup>6 周 10 例, 37~40 周 7 例), 其中在 34 周~40 周 NRDS 患儿中选择性剖宫产 9 例、母亲糖尿病 5 例、妊娠期高血压 3 例。出生体重 1050 g~3150 g (<1500 g 21 例, 1500 g~17 例, 2500 g~4000 g 9 例), 使用促肺成熟药物 34 例 (72%)。对照组 47 例患儿中,

男23例,女24例,剖宫产37例(79%),经产道娩出10例(21%),胎龄29周~40周(29~33<sup>+6</sup>周30例,34~36<sup>+6</sup>周10例,37~40周7例),其中在34~40周非NRDS中,选择性剖宫产9例、母亲糖尿病5例、妊娠期高血压3例,出生体重1115g~3100g(<1500g 23例,1500g~1600g 2500g~4000g 8例),使用促肺成熟药物38例(81%);病例组与对照组患儿在胎龄、性别、出生方式、出生体重以及是否合理使用皮质激素促肺成熟等方面比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。见表1。

表1 两组患儿一般情况的对比 [( $\bar{x}\pm s$ )或n(%)]

组别	例数	男性	胎龄(周)	BW(g)	剖宫产	使用促肺成熟药物
对照组	47	23(49)	34±4	1922±475	37(79)	38(81)
病例组	47	28(60)	33±4	1819±510	33(70)	34(72)
$\chi^2/t$ 值		1.072	1.962	1.009	0.895	0.949
$P$ 值		0.301	0.053	0.316	0.344	0.330

## 2.2 NRDS 患儿 SP-B 基因序列突变分析

实验通过基因测序法对 SP-B 外显子 7 进行基因测序,未发现基因突变现象。见图 1。

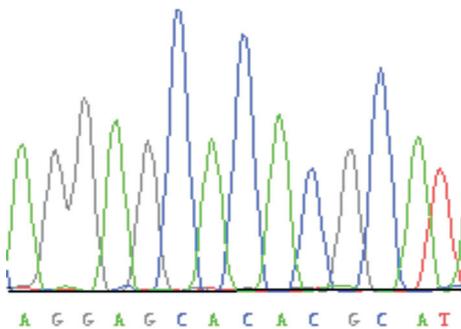


图1 SP-B 基因外显子 7

SP-B 基因外显子 7 (R236C) 位点基因多态性碱基序列图。见图 2、3。

## 2.3 两组患儿 SP-B 基因外显子 7 (R236C) 位点基因多态性比较

两组患儿 SP-B 基因外显子 7 (R236C) 位点基因型均可检出两种基因型:即 CC、CT 型。两组中均未检出 TT 型。其中,病例组此两种基因型频率分别为:72%、28%,C 等位基因频率为 85%,

T 等位基因频率为 15%。对照组此两种基因型分别为 85%、15%,C 等位基因频率为 93%,T 等位基因频率为 7%。SP-B 基因外显子 7 (R236C) 位点等位基因及基因型的比较两组之间无统计学差异( $P<0.05$ )。见表 2。

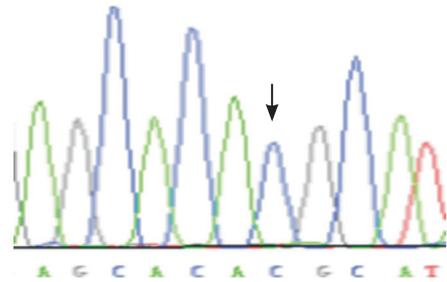


图2 SP-B 基因外显子 7 (R236C) 位点 CC 基因型

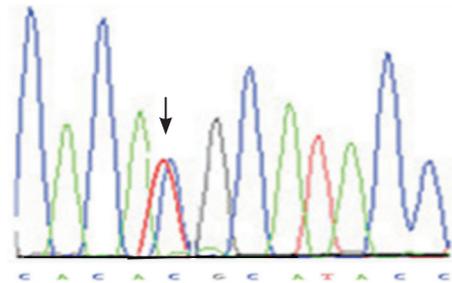


图3 SP-B 基因外显子 7 (R236C) 位点 CT 基因型

表2 SP-B 外显子 7 (R236C) 等位基因及基因型在两组中的分布比较 [例(%)]

组别	例数	基因型频率		等位基因频率	
		CC	CT	C	T
对照组	47	40(85)	7(15)	87(93)	7(7)
病例组	47	34(72)	13(28)	80(85)	14(15)
$\chi^2$ 值		2.286		2.627	
$P$ 值		0.131		0.105	

## 3 讨论

NRDS 作为一种与多种因素相关的疾病,其近几年的研究逐渐集中在肺表面活性蛋白基因突变及多态性的方向<sup>[6]</sup>。目前许多学者研究已证明 SP-B 基因缺陷与 NRDS 发病密切相关<sup>[7]</sup>。而 SP-B 基因的缺陷多由 SP-B 基因突变引起<sup>[8]</sup>。迄今为止,已发现多个位点的突变可引起部分或全部 SP-B 表达缺失。Nogee 等<sup>[9]</sup>发现 15 个 SP-B 基因突变位点与 NRDS 相关联,这些突变位点主要分布在肺表

面活性蛋白 B 基因的前 9 个外显子区域, 以外显子 2、4、7 分布最为显著, 而在不同种族、研究群体及疾病种类中, SP-B 基因的种类和分布频率不尽相同<sup>[10]</sup>。张费通等<sup>[11]</sup>对我国南方汉族人极低出生体重儿的 SP-B 基因进行研究, 发现 RDS 患儿 SP-B 基因的外显子 2 和外显子 5 相应位点变异率明显高于对照组。除 SP-B 基因突变可导致 SP-B 含量异常外, SP-B 基因单核苷酸多态性也对 SP-B 的含量有重要影响<sup>[12]</sup>。基因多态性较基因突变范围更广泛, 基因多态性为探索 NRDS 的发生、发展开辟了一个全新的领域<sup>[13]</sup>。Ballard 等<sup>[5]</sup>发现在第 7 外显子上存在点突变, 这种突变降低了 SP-B 的翻译效率和 (或) 改变了初始翻译产物的加工, 从而使 SP-B 含量减少。Wegner 等<sup>[14]</sup>学者研究发现 NRDS 导致的呼吸衰竭可能与 SP-B 外显子 7 缺失有关。

目前我国对 SP-B 外显子 7 基因突变的相关研究较少。本研究选取内蒙古西部地区汉族 NRDS 患儿为研究对象, 寻找 SP-B 基因外显子 7 区域是否存在基因突变, 结果显示: SP-B 外显子 7 (R236C) 位点基因型均可检出两种基因类型 (CC 和 CT)。病例组与对照组相比此位点基因多态性等位基因及基因型频率的差异无统计学意义, 提示 SP-B 外显子 7 (R236C) 位点多态性可能未参与内蒙古西部地区汉族 NRDS 的发生, 这可能与样本量少、位点选择、民族差异、地理环境等因素相关; 本研究虽然对研究样本的胎龄、性别、体重、出生方式及是否促肺进行了匹配, 但是仍不能排除其他潜在的混杂因素可能导致的结果偏倚, 需对结论进一步探讨。

同时, 本研究发现, 无论是病例组还是对照组均未发现纯合子 TT 基因型, 考虑该事件的发生可能是由于纯合子 TT 基因型胎儿出生后由于 SP-B 分泌明显减少, 致使肺功能明显异常, 易发生严重肺部疾病, 存活率低。国外 Noguee 等<sup>[9]</sup>研究发现, 1 例外显子 7 (R236C) 位点纯合子变异的 TT 基因型患儿因合并严重呼吸系统疾病, 在生后 9 个月左右死亡。余未见相关报道, 故有待进一步证实。

综上, 本研究发现 SP-B 外显子 7 (R236C) 位点多态性可能未参与内蒙古西部地区汉族 NRDS 的发生。可进一步扩大样本量、选择不同民族之间对比、不同地域以及不同基因位点等对 NRDS 与 SP-B 基因相关性进行研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, et al. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants-2010 update[J]. *Neonatology*, 2010, 97(4): 402-417.
- [2] Albert RK. The role of ventilation-induced surfactant dysfunction and atelectasis in causing acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(7): 702-708.
- [3] Hamvas A, Heins HB, Guttentag SH, et al. Developmental and genetic regulation of human surfactant protein B in vivo[J]. *Neonatology*, 2009, 95(2): 117-124.
- [4] Glasser JR, Mallampalli RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection[J]. *Microbes Infect*, 2012, 14(1): 17-25.
- [5] Ballard PL, Noguee LM, Beers MF, et al. Partial deficiency of surfactant protein B in an infant with chronic lung disease[J]. *Pediatrics*, 1995, 96(6): 1046-1052.
- [6] Akella A, Deshpande SB. Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders[J]. *Indian J Exp Biol*, 2013, 51(1): 5-22.
- [7] Mailaparambil B, Krueger M, Heizmann U, et al. Genetic and epidemiological risk factors in the development of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Dis Markers*, 2010, 29(1): 1-9.
- [8] Wilder MA. Surfactant protein B deficiency in infants with respiratory failure[J]. *J Perinat Neonatal Nurs*, 2004, 18(1): 61-67.
- [9] Noguee LM. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease[J]. *Annu Rev Physiol*, 2004, 66: 601-623.
- [10] Clark H, Clark LS. The genetics of neonatal respiratory disease[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2005, 10(3): 271-282.
- [11] 张费通, 崔其亮. 极低出生体重早产儿 80 例肺泡表面活性物质蛋白 B 外显子测序分析 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2016, 31(2): 97-100.
- [12] Boggaram V. Regulation of lung surfactant protein gene expression[J]. *Front Biosci*, 2003, 8: d751-d764.
- [13] Dahmer MK, O'cain P, Patwari PP, et al. The influence of genetic variation in surfactant protein B on severe lung injury in African American children[J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(5): 1138-1144.
- [14] Wegner DJ, Hertzberg T, Heins HB, et al. A major deletion in the surfactant protein-B gene causing lethal respiratory distress[J]. *Acta Paediatr*, 2007, 96(4): 516-520.

(本文编辑: 王庆红)