

• 临床医学 •

文章编号: 1002-0217( 2016) 06-0559-03

## 结合珠蛋白基因多态性与未足月胎膜早破的临床研究

马少平 孔丽娜

( 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 妇产科, 安徽 芜湖 241001)

**【摘要】**目的: 探讨结合珠蛋白( haptoglobin, Hp) 基因多态性与未足月胎膜早破的关系, 为未足月胎膜早破的遗传病因学提供理论依据。方法: 应用序列特异性引物聚合酶链反应( PCR-SSP) 进行基因分型检测, 分析 Hp 基因型 Hp1-1 型、Hp2-1 型及 Hp2-2 型在正常足月分娩孕妇组( 对照组) 和未足月胎膜早破孕妇组( 研究组) 的分布。结果: 等位基因 Hp1 和 Hp2 在正常孕妇和未足月胎膜早破患者的分布频率分别为 39.06%、60.94% 和 28.0%、72.0% , 两组等位基因频率和基因型频率分布差异无统计学意义(  $P>0.05$ ) 。结论: 在中国汉族人群中, 结合珠蛋白基因多态性与未足月胎膜早破发生无相关性, 其基因型分布不是中国汉族孕妇未足月胎膜早破发病原因。

**【关键词】**胎膜早破; 结合珠蛋白; 基因; 多态性

**【中图分类号】**R 714.433 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2016.06.014

## Clinical study of haptoglobin polymorphism with preterm premature rupture of membranes

MA Shaoping KONG Li'na

Department of Gynecology &amp; Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the association of allelic polymorphism of haptoglobin( Hp) with preterm premature rupture of membrane( PPRM) for genetic evidence leading to PPRM.**Methods:** PCR techniques with sequence specific primers( SSP) was used to detect genotype Hp1-1, Hp2-1 and Hp2-2 in human Hp gene and their distribution in normal pregnancy and PPRM.**Results:** The frequencies of Hp1 and HP2 alleles were 39.06% and 60.94% for the normal pregnancies, and 28% and 72% for the test group, respectively. There was no significant difference in the genotype distribution (  $P>0.05$ ) and allelic frequencies (  $P>0.05$ ) between groups.**Conclusion:** The findings showed no association of haptoglobin polymorphism with PPRM, suggesting that this gene distribution may not be the risk factor of pregnant women in Han population complicated with PPRM.

**【Key words】** premature rupture of membrane; haptoglobin; gene; polymorphism

胎膜早破( 尤其是未足月胎膜早破) 对母儿有较大危害。据报道胎膜早破导致的新生儿病死率和发病率分别为 18%~20% 和 21.4%。未足月胎膜早破对母儿的影响与破膜时孕周和分娩时孕周相关, 孕周越小, 危害越大。结合珠蛋白( haptoglobin, Hp) 又称触珠蛋白, 是一种  $\alpha_2$  唾液酸糖蛋白。Hp 有三种主要的基因型: Hp1-1, Hp2-2 和杂合子 Hp2-1。Jin-Kyung 等<sup>[1]</sup> 对 34 例足月胎膜早破的韩国孕妇及 187 例正常足月孕妇进行研究, 认为 Hp1 等位基因是胎膜早破的易感基因。目前认为足月胎膜早破与未足月胎膜早破的发病机制可能有所不同, Hp 基因多态性与未足月胎膜早破的关系暂无相关报道。本研究旨在探索 Hp 基因多态性与未足月胎膜早破的关系, 从分子生物学水平上探讨未足月胎膜

早破的病因, 为早预测、早预防胎膜早破提供临床诊治依据, 从而降低母儿发病率及病死率。

### 1 资料与方法

1.1 临床资料 随机选取 2014 年 3 月 1 日~8 月 31 日在弋矶山医院住院的 25 例未足月胎膜早破孕妇作为研究组, 头位、无其他产科合并症, 无内外科合并症, 无宫颈机能不全, 无宫颈环扎、羊膜腔穿刺术史, 胎膜破裂前无外伤及性交等诱因。选取同期的 32 例正常足月待产孕妇作为对照组。对照组孕妇无产科合并症, 无内外科合并症。所有对照组孕妇均随访至分娩, 未发生胎膜早破及其他合并症。

1.2 主要设备和试剂 TC9600-G-230V 多功能梯度 PCR 仪( 美国 Labnet) TG16。胎膜早破诊断标准

收稿日期: 2016-03-22

作者简介: 马少平( 1978-) , 女, 主治医师, ( 电话) 15395362963 ( 电子信箱) 35092714@qq.com.

参照谢幸主编的第八版《妇产科学》<sup>[2]</sup>:孕周明确,有明确阴道流液史,窥阴器检查可见液体自宫颈流出,或后穹窿处有积液,阴道液酸碱度检查 pH 值 > 6.5。微量高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)引物合成参照文献,上游引物 A: 5'-GCTGT-CACTGCTGCGTAAAG-3'; 下游引物 B: 5'-GGT-CAGTCTTTGGTTGGGTAG-3'; 上游引物 C: 5'-CCT-GCCTCGTATTAAGTGCACCAT-3'; 下游引物 D: 5'-CCGAGTGCTCCACATAGCCATGT-3'; 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成特异性引物,PCR 扩增试剂盒由 Promega(北京)生物技术有限公司提供; DNA 提取试剂盒及 DNA Markers 由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

### 1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取和检测 严格依照试剂盒说明书进行操作提取,应用核酸蛋白测定仪检测所提取 DNA 样本。

1.3.2 PCR 扩增 PCR 反应体系 包括模板 DNA 3 μL, 2.5U/L Taq DNA Polymerase 2 μL, 10×Taq buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, 10 μm 上下游引物各 0.5 μL, 超纯 dNTP Mixture(2.5 mmol/L each) 2 μL, 加入 DEPC 水补至 25 μL 体系。引物 A 和 B 及引物 C 和 D 扩增体系相同。反应条件:引物 A 和 B 扩增时,95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 1 min,69℃ 退火 2 min,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环,末次循环后 72℃ 充分延伸 10 min,冷却至 4℃。引物 C 和 D 扩增时,95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 1min,69℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,末次循环后 72℃ 充分延伸 10 min,冷却至 4℃。

1.3.3 PCR 产物 Hp 基因型的鉴定 取 PCR 扩增产物 5 μL,与 2 μL 6×DNA 电泳 Loading Buffer 混合均匀后,依次点样于 1.5% 琼脂糖凝胶加样孔中,并点样相匹配的 DNA Marker。电压 80 V,电泳 40 min。应用 Tanon2500 全自动数码凝胶图像分析系统,在紫外灯下检测并摄像,通过观察电泳图,进行 Hp 基因型分型。

1.4 统计学方法 按 Hardy-Weinberg 平衡法确定样本代表性,基因计数法计算出相对等位基因频率,等位基因频率和基因型频率分布差异采用 χ<sup>2</sup> 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组一般临床资料比较 对照组与研究组之间的年龄、孕次、未生育人数比例、入院体温等差异无统计学意义(P>0.05),未足月组孕妇无明显绒毛

膜羊膜炎的表现,对照组与研究组白细胞数 P = 0.023, P<0.05 差异有统计学意义。见表 1。

表 1 两组一般临床资料比较

项目	对照组(n=32)	研究组(n=25)
年龄/岁	28.47±3.96	26.88±2.83
孕次	1.72±1.17	1.56±1.04
未生育人数/n(%)	28(87.5)	25(100)
体温/℃	36.6±0.3	36.8±0.3
白细胞数/(×10 <sup>9</sup> /L)	9.33±2.21	11.09±3.18

2.2 对照组孕妇 Hp1-1 型、Hp2-1 型及 Hp2-2 型比例分别为 21.88%、34.37% 及 43.75%, 与我国 Hp 基因型分布接近。研究组孕妇 Hp1-1 型、Hp2-1 型及 Hp2-2 型比例分别为 16.00%、24.00% 及 60.00%。研究组孕妇 Hp2-2 型比例较对照组高, Hp1-1 型较对照组低,但差异无统计学意义(χ<sup>2</sup> = 1.121, P>0.05)。对照组孕妇 Hp1 和 Hp2 等位基因频率分别为 0.3906 和 0.6094; 研究组孕妇 Hp1 和 Hp2 等位基因频率分别为 0.2800 和 0.7200, 对照组与研究组差别无统计学意义(χ<sup>2</sup> = 1.526, P>0.05)。见表 2、3。

表 2 两组 Hp 基因型比较

基因型	n(%)	
	研究组	对照组
Hp1-1	4(16.00)	7(21.88)
Hp2-1	6(24.00)	11(34.37)
Hp2-2	15(60.00)	14(43.75)
总数	25(100.00)	32(100.00)

表 3 两组 Hp 等位基因频率比较

等位基因	n(频率)	
	研究组	对照组
Hp1	14(0.2800)	25(0.3906)
Hp2	36(0.7200)	39(0.6094)

## 3 讨论

胎膜早破是妊娠期常见并发症,且发病率逐年升高,Liu J 等 2010 年报道胎膜早破发生率近 20%,且认为发展中国家发病率较发达国家高<sup>[3]</sup>。胎膜早破使新生儿发病率及病死率均增高,我们需要了解胎膜早破的具体发生机制及相关高危因素,从根源上减少胎膜早破的发生。研究已证实,胎膜早破和胎膜上胶原破坏及程序性细胞凋亡相关,胎膜早破的高危因素有孕妇生殖道感染、吸烟、子宫张力过大、胎膜及蜕膜上各种调节因子的作用<sup>[4-5]</sup>。近年来研究发现氧化应激系统破坏绒毛膜羊膜的结缔组织导致胎膜早破的发生<sup>[6]</sup>。

Hp 是一种具有抗氧化作用的 α2 唾液糖蛋白,是一种急性期蛋白,在机体抗感染、修复损伤组织以

及维持内环境稳定的过程中具有重要作用。Hp 有 Hp1 和 Hp2 两种等位基因,主要构成三种基因型, Hp 等位基因频率分布及三种基因型的分布具有种族和地理差异性,调查显示 Hp1 等位基因频率在东南亚人种中较低,而在非洲及南美洲频率较高<sup>[7]</sup>。赵会全等<sup>[8]</sup>在 1988 年对我国多个民族的 Hp 基因型及等位基因频率进行统计,其中汉族人中, Hp2-2 型最多,占 55% 左右;其次为 Hp2-1 型,约占 35%; Hp1-1 型最少,约 10% 左右。Hp 不同基因型结构不同,其功能亦存在一定差异性。

Jin-Kyung 等<sup>[1]</sup>对 34 名韩国足月胎膜早破患者进行研究,结果显示 Hp1-1 基因型者,发生 PROM 的风险增高,其推测在未足月胎膜早破患者可能也存在这种关系,但未进行相关实验。本研究对正常足月分娩及未足月胎膜早破进行了分析。结果显示对照组 Hp1-1 型、Hp2-1 型及 Hp2-2 型比例分别为 21.88%、34.37% 及 43.75%, 与我国汉族人群 Hp 基因型分布接近。研究组 Hp1-1 型、Hp2-1 型及 Hp2-2 型比例分别为 16.00%、24.00% 及 60.00%。研究组 Hp2-2 型比例较对照组高, Hp1-1 型较对照组低,但差异无统计学意义。对照组 Hp1、Hp2 等位基因频率为 39.06%、60.94%, 研究组 Hp1、Hp2 等位基因频率为 28%、72%, 未足月组 Hp2 等位基因频率虽高于对照组,但差别无统计学意义。说明 Hp 基因多态性不是中国汉族人群发生未足月胎膜早破的高危因素。本研究就结合珠蛋白基因多态性与胎膜早破的关系进行研究,但结果与 Jin-Kyung 等实验结果并不一致。推测 Hp 基因多态性与未足月胎膜早破的发病机制可能存在种族差别,需进一步研究证实。

氧化应激在胎膜早破的发生中起到重要的作用,结合珠蛋白有明显的抗氧化作用, Hp 的抗炎作用是基因型依赖性的, Hp1-1 及 Hp2-2 各自分别主导 Th2 细胞反应和 Th1 细胞反应<sup>[9]</sup>, Hp1-1 型抗氧化活性高于 Hp2-2 型<sup>[7]</sup>。当循环中的红细胞被破坏后释放出游离血红蛋白(Hb), Hp 可与游离 Hb 结合形成稳定的 Hp-Hb 复合物, Hp-Hb 复合物具有氧化还原活性,可终止氧化损伤。循环中的 Hp-Hb 复合物与单核巨噬细胞表面特异性受体 CD163 结合后,被单核巨噬细胞吞噬清除<sup>[7]</sup>。研究显示, Hp-Hb 复合物与 CD163 受体结合可提高炎症抑制因子白介素 10 的表达<sup>[10]</sup>。Hp-Hb 复合物对 CD163 的亲合力也是基因型依赖性的,而 Hp2-2 基因型对 CD163 有较高亲和力<sup>[11]</sup>。推测 Hp1 等位基因可能

为胎膜早破的保护性基因, Hp2-2 基因型发生胎膜早破的风险大于其他基因型。本研究虽然结果显示在未足月胎膜早破组中 Hp2-2 基因型所占比例大于正常对照组,但差异亦无统计学意义,可能和本研究中样本较少有关。

本研究仅对中国安徽地区汉族孕妇做出相关分析,但其是否可能参与其他种族或其他地区未足月胎膜早破的发生仍需进一步研究,全面评价 Hp 基因多态性与未足月胎膜早破之间的关系尚需更多更全面的研究。

## 【参考文献】

- [1] JIN-KYUNG CHO, YEUN-HEE KIM, JIN-YANG PARK *et al.* Polymorphism of Haptoglobin in patients with premature rupture of membranes [J]. *Yonsei Med J* Vol 2009 50: 132-136.
- [2] 谢幸. 妇产科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 133.
- [3] LIU J, FENG Z C, WU J. The incidence rate of premature rupture of membranes and its influence on fetal-neonatal health: a report from mainland China [J]. *J Trop Pediatr* 2010 56( 1 ): 36-42.
- [4] MERCER BM, GOLDENBERG RL, MEIS PJ *et al.* The Preterm Prediction Study: prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network [J]. *Am J Obstet Gynecol* 2000 183: 738-745.
- [5] WOODS JR JR. Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes—a review [J]. *Placenta* 2001 22 Suppl A: s38-44.
- [6] BORNA S, BORNA H, DANESHBOODIE B. Vitamins C and E in the latency period in women with preterm premature rupture of membranes [J]. *Int J Gynaecol Obstet* 2005 90: 16-20.
- [7] LANGLOIS M R, DELANGHE J R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans [J]. *Clin Chem*, 1996 42( 10 ): 1589-1600.
- [8] 赵会全, 张贵寅. 六个民族中结合珠蛋白的遗传多态性 [J]. *人类遗传学学报*, 1988 7( 4 ): 359-361.
- [9] GUETTA J, STRAUSS M, LENY NS *et al.* Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin [J]. *Atherosclerosis* 2007 191: 48-53.
- [10] PHILIPPIDIS P, MASON JC, EVANS BJ *et al.* Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and hemoxygenase-1 synthesis: anti-inflammatory monocyte-macrophage responses in vitro in resolving skin blisters in vivo and after cardiopulmonary bypass surgery [J]. *Circ Res* 2004 94: 119-126.
- [11] KRISTIANSEN M, GRAVERSEN JH, JACOBSEN C *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor [J]. *Nature*, 2001, 409: 198-201.