

血红素加氧酶-1 基因多态性与新生儿高胆红素血症的相关性研究

王瑞 方小燕 刘杰波

(深圳市罗湖区人民医院新生儿科, 广东深圳 518010)

【摘要】背景: 血红素加氧酶(hemeoxygenase ,HO)是胆红素代谢过程中的一个重要的限速酶, 其中的血红素加氧酶-1(HO-1)启动子中的(GT)n重复序列可以调控其表达, 我们就是研究HO-1基因多态性在新生儿高胆红素血症中的作用。方法: 收集本院2019年6月至12月收治1w内的新生儿(日龄≤7天且胎龄>35w), 入院后检测血清总胆红素, 根据hour-specific bilirubin nomogram大于第95百分位点纳入实验组(96例), 同期本院出生(日龄≤7天且胎龄>35w)且未接受过蓝光照射治疗的新生儿(30例)为对照组, 检测两组HO-1基因中的(GT)n重复序列。结果: (GT)n重复序列长度在15至42之间, 重复率最高的出现在22和30, 因此定义长度<21为(GT)n重复序列短等位基因(S), 长度≥21为(GT)n重复序列长等位基因(L), 短等位基因在实验组的比例比对照组显著升高(分别为18%、7%), 且两组差异有统计学意义(P=0.012)。实验组中纯合的短等位基因及杂合的短等位基因所占比例均较对照组高(分别为28%、10%), 且两组差异有统计学意义(P=0.028), 线性回归分析得知短等位基因(纯合或杂合)与新生儿高胆红素血症显著相关(OR, 3.2; 95%CI:0.98-9.33)。结论: 在我国汉族人群中, HO-1基因(GT)n重复序列短等位基因(<21)可明显激活HO-1基因转录活性, 产生更多的胆红素, 是导致新生儿高胆红素血症的高危因素。

关键词: 基因多态性; 血红素加氧酶-1; 新生儿高胆红素血症

近年来, 对新生儿高胆红素血症的血清胆红素水平和病理生理过程的基因调控研究, 日渐突显^[1]。基因突变和基因多态性可共同或单独作用, 从而导致高胆红素血症。新生儿期胆红素代谢的不平衡, 是导致新生儿高胆红素血症(neonatal hyperbilirubinemia)的一个重要因素^[2], 胆红素代谢中的某些基因因素和/或环境因素可通过影响其代谢过程, 使血清胆红素产生增多^[3]。目前已知, 肝细胞质中尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1(UDP-glucuronosyltransferase,UGT1A1)能够把非结合胆红素转化成为结合胆红素, 若其G17R基因突变, 会使血中游离非结合胆红素增多, 导致新生儿高胆红素血症, 现有研究显示, 新生儿高胆红素血症接近一半的病例是因此基因突变导致的。

血红素加氧酶(hemeoxygenase HO)是在1968年被Tenhunen^[4]首次描述了其在血红素代谢中的作用, 它通过一个耗能的过程将血红素代谢为胆红素, 同时释放等量的一氧化碳和铁离子, HO有三种同工酶, HO-1、HO-2和HO-3。HO-1编码在第22号染色体上(22q12), 由32-KDa蛋白质组成, 在组织中广泛分布, 尤以脾脏为主^[5, 6], 在氧化应激、缺血、热休克时活性增强。HO-2主要分布在脑和睾丸中, 而HO-3在体内广泛分布, 但催化作用极弱^[9]。HO-1基因启动子5'端(GT)n二核苷酸长度多态性可调控HO-1基因启动子的活性, 短(GT)n重复序列可以增加HO-1的表达, 从而产生较多的胆红素, 而长(GT)n重复序列可降低HO-1的表达^[7]。在已有的多研究结果中, 证实HO-1启动子基因型多态性对新生儿高胆红素血症的调控作用, 在不同人群、种族中, 其结果不尽相同。因此, 我们假设HO-1基因启动子中的(GT)n重复序列长度可导致新生儿早期高胆红素血症^[8, 9]。在我们的这个研究中, 证实中国汉族新生儿中, 其高胆红素血症与(GT)n重复序列长度的相关性。

一、实验方法:

1.实验组:

a.纳入标准: 本院2019年6月至12月收治的新生儿(日龄≤7天且胎龄>35w), 入院后检测血清总胆红素, 根据hour-specific bilirubin nomogram大于第95百分位点纳入实验组: 日龄≤24h, 血清总胆红素>153.9μmol/L; 日龄≤48h, 血清总胆红素>222.3μmol/L; 日龄≤72h, 血清总胆红素>273.6μmol/L; 日龄>72h, 血清总胆红素>290.7μmol/L。

b.排除标准: 明确诊断有G-6-PD缺乏症、地中海贫血、感染、溶血、消化道畸形、代谢性疾病、甲状腺功能低下。

c.光疗标准: 胎龄35-37^w: 日龄<24h, 血清总胆红素<136.8μ

mol/L; 日龄24-48h, 血清总胆红素<188.1μmol/L; 日龄48-72h, 血清总胆红素<239.4μmol/L; 日龄>72h, 血清总胆红素<248.0μmol/L。胎龄>38w: 日龄<24h, 血清总胆红素<205.2μmol/L; 日龄24-48h, 血清总胆红素<256.5μmol/L; 日龄48-72h, 血清总胆红素<307.8μmol/L; 日龄>72h, 血清总胆红素<342.0μmol/L。

2.对照组: 同期本院出生(日龄≤7天且胎龄>35w)且未接受过蓝光照射治疗的新生儿。

3.DNA 抽提

a.提取外周血, 溶解DNA, 析出含DNA的黏稠物, 过滤后再溶解, 12000xg离心后对DNA鉴定。

b.引物设计

启动子(GT)n重复序列引物:
FAM-AGAGCCTGCAGCCTCTCAGA(A/T)TGGAGAGGAGCAGTCATA TG

4.PCR方法: 应用PCR技术对所需DNA进行扩增, 用HindIII酶对产物进行切割, 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用软件GeneMaker v2.2.0高通量分析片段序列。

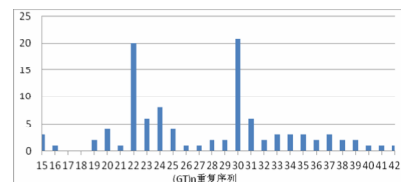
二、结果

两组患儿基本资料比较(表1)

	实验组(96例)	对照组(30例)	P
男/女	53/43	18/12	0.605
日龄	4.20 ± 1.55	6.25 ± 1.88	0.150
出生体重	3122 ± 324	3221 ± 314	0.745
体重	3079 ± 375	3210 ± 325	0.650
头围	33.81 ± 1.01	34.92 ± 1.05	0.759
身高	50.20 ± 1.54	49.88 ± 1.44	0.352
顺产/剖宫产	70/26	21/9	0.422
母乳喂养*	96	30	0.855

*母乳喂养定义: 每天纯母乳喂养大于喂养量的一半。

表2



*纵坐标为等位基因频率%

HO-1 (GT)_n 重复序列的等位基因比较 (表 3)

	实验组 (96 例)	对照组 (30 例)	P
	n=192;n (%)	n=60;n (%)	
短等位基因 (S)	34 (18)	4 (7)	0.012
长等位基因 (L)	158 (40)	56 (41)	0.584

HO-1 (GT)_n 重复序列的基因型比较 (表 4)

	实验组 (96 例)	对照组 (30 例)	P	OR(95%CI)
	n=96;n (%)	n=30;n (%)		
纯合子 (SS)	10 (8)	1 (3)		
杂合子 (SL)	24 (20)	3 (7)		
SS 或 SL	34 (28)	4 (10)	0.028	3.20 (0.98-9.33)

本研究中,实验组与对照组的一般情况对比无明显差异(表 2)。(GT)_n 重复序列长度在 15 至 42 之间,等位基因频率最高出现在 22 和 30,因此定义长度 < 21 为 (GT)_n 重复序列短等位基因 (S),长度 ≥ 21 为 (GT)_n 重复序列长等位基因 (L),实验组的短等位基因比例与对照组相比,显著升高(表 4,分别为 18%、7%),且两组差异有统计学意义 (P=0.012)。实验组中纯合的及杂合的短等位基因所占比例均较对照组高(表 5,分别为 28%、10%),且两组差异有统计学意义 (P=0.028),线性回归分析得知短等位基因(纯合或杂合)与新生儿高胆红素血症显著相关 (OR , 3.20; 95%CI:0.98-9.33)。

三、讨论

已知的短 (GT)_n 重复序列在 HO-1 基因启动子中分布越广泛,调控 HO-1 基因的转录活性越强,从而产生更多的胆红素,也是导致新生儿高胆红素血症的重要因素。目前对 (GT)_n 重复序列的划分尚比较随意,但已有多位研究学者认为短(GT)_n 重复序列 (< 25),可明显激活 HO-1 基因的转录活性^[7-10],但 HO-1 基因启动子 (GT)_n 重复序列长度在不同种族的分布是不同的。Yamada 发现短 (GT)_n 重复序列 (< 20) 发生新生儿高胆红素血症的风险是长 (GT)_n 重复序列 (≥ 29) 的 2.5 倍^[7]。本实验研究仅是汉族高胆红素血症与 (GT)_n 重复序列长度的相关性,结果证实有新生儿高胆红素血症的患儿其 (GT)_n 重复序列短等位基因显著升高,其中携带纯合基因的患儿与那些没有 (GT)_n 重复序列短等位基因的患儿相比,其发生新生儿高胆红素血症的风险高达 3 倍以上,与 Yamada 结论一致。

Katayama^[11]同样研究 108 例日本新生儿,却发现患有高胆红素血症的新生儿,其 HO-1 基因启动子中携带短等位基因(GT)_n 重复序列 (< 22) 的频率更多(p= 0.015),携带短等位基因(GT)_n 重复序列的 HO-1 基因启动子与新生儿高胆红素血症之间显著相关(OR: 3.1; 95% confidence interval (CI):1.03 ■ 9.53)。Tiwari^[17]对比 200 例印度新生儿,证实短等位基因(GT)_n 重复序列能使 HO-1 基因启动子活性增强,从而产生更多的胆红素,更短的(GT)_n 重复序列 (< 20) 是导致新生儿高胆红素血症的独立危险因素 (OR: 4.5;95% confidence interval (CI): 1.6 ■ 12.7)。Weng^[12]研究 444 例胎龄大于 35 周的台湾新生儿,短 (GT)_n 重复序列 (< 24) 与新生儿高胆红素血症具有相关性 (P < 0.001),短(GT)_n 重复序列是导致新生儿高胆红素血症的独立危险因素(OR: 2.19; 95%confidence interval (CI): 1.53 ■ 3.13, P < 0.001)。

相反地, Kanai^[8]分析 149 例日本新生儿(GT)_n 等位基因,发现短 (GT)_n 重复序列与新生儿高胆红素血症之间无相关性。Kaplan^[13]分析了 199 份以色列新生儿的 DNA 样本的(GT)_n 重复序列,并未发现新生儿高胆红素血症与(GT)_n 重复序列长度之间有相关性。Zhou^[14]研究了 988 例中国苏州地区生后 7 天内的新生儿黄疸值与短(GT)_n 重复序列 (< 27) 之间的联系,发现两者并无相关性,推测短(GT)_n 重复序列可能增加溶血的风险,与 Kaplan^[13]的研究结论相同。Lin^[5]分析了 502 例哈萨克族、769 例维吾尔族和 789 例汉族的 HO-1 启动子基因的(GT)_n 重复序列与胆红素水平有相关性,发现这种相关性只出现在维吾尔族人群中。

本研究中也存在一些局限性。HO-1 是血红素分解代谢过程的重要限速酶^[6],直接影响胆红素生成,基因的多态性可通过对代谢途径的影响,间接的引起或导致疾病的发生。此病例对照研究中的

结果 (OR, 3.20; 95%CI:0.98-9.33) 并不能说明短(GT)_n 重复序列是导致新生儿高胆红素血症的直接原因,只能证实短(GT)_n 重复序列与新生儿高胆红素血症之间有显著相关性。

四、结论

在我国汉族人群中,HO-1 基因 (GT)_n 重复序列短等位基因 (< 21) 可明显激活 HO-1 基因转录活性,产生更多的胆红素,是导致新生儿高胆红素血症的高危因素。

参考文献:

- [1]Kaplan M, Hammerman C. Hereditary contribution to neonatal hyperbilirubinemia.In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW (eds). Fetal and Neonatal Physiology, 5th edn. Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2017, pp 933 ■ 942.
- [2]Stevenson DK, VremanHJ,Wong RJ. Bilirubin production and therisk of bilirubin neurotoxicity. *Semin. Perinatol.* 2011; 35: 121 ■ 6.
- [3]Watchko JF, Lin Z. Exploring the genetic architecture of neonatalhyperbilirubinemia. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2010; 15: 169 ■ 75.
- [4]Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *ProcNatAcadSci USA* 1968; 61(2):748 ■ 755.
- [5]Rodgers PA, Stevenson DK 1990 Developmental biology of heme oxygenase. *ClinPerinatol* 17:275 ■ 291.
- [6]Elbirt KK, Bonkovsky HL 1999 Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 111:438 ■ 447.
- [7]Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S et al (2000) Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Gene* 2000; 66(1):187 ■ 195.DOI:10.1086/302729
- [8]Kanai M, Akaba K, Sasaki A, Sato M, Harano T, Shibahara S et al. Neonatal hyperbilirubinemia in Japanese neonates: analysis of the heme oxygenase-1 gene and fetal hemoglobin composition in cord blood. *Pediatr Res* 2003; 54(2): 165 ■ 171.DOI:10.1203/01.PDR.0000072329.56635.35
- [9]Tiwari PK, Sethi A, Basu S, Raman R, Kumar A. Hemeoxygenase-1 gene variants and hyperbilirubinemia risk in NorthIndian newborns. *Eur. J. Pediatr.* 2013; 172: 1627 ■ 32.
- [10]Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(8): 1097 ■ 1104. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.008
- [11]Katayama Y, Yokota T, Zhao H, Wong RJ, Stevenson DK, Taniguchi-Ikeda M et al. Association of HMOX1 gene promoter polymorphisms with hyperbilirubinemia in the early neonatal period. *Pediatr Int* 2015; 57(4): 645 ■ 649.DOI: 10.1111/ped.12591
- [12]Weng YH, Chiu YW, Cheng SW, Yang CY. Risk assessment of gene variants for neonatal hyperbilirubinemia in Taiwan. *BMC Pediatr* 2016; 16(1): 144. DOI: 10.1186/s12887-016-0685-8.
- [13]Kaplan M, Renbaum P, Hammerman C, Vreman HJ, Wong RJ, Stevenson DK. Heme oxygenase-1 promoter polymorphisms and neonatal jaundice. *Neonatology* 2014;106(4): 323 ■ 329.DOI: 10.1159/000365744
- [14]Zhou Y, Wang SN, Li H, Zha W, Peng Q, Li S et al. Quantitative trait analysis of polymorphisms in two bilirubin metabolism enzymes to physiologic bilirubin levels in Chinese newborns. *J Pediatr* 2014; 165(6): 1154 ■ 1160.DOI: 10.1016/j.jpeds.2014.08.041.
- [15]Lin R, Wang X, Wang Y, Zhang F, Wang Y, Fu W, Yu T, Li S, Xiong M, Huang W, Jin L:Association of polymorphisms in four bilirubin metabolism genes with serum bilirubin in three Asian populations. *Hum Mutat* 2009;30: 609 ■ 615.DOI: 10.1002/humu.20895.
- [16]Denmery PA. *Semin Neonatol.* 2002;7:111.