

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.05.032

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201010.0928.002.html\(2020-10-10\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201010.0928.002.html(2020-10-10))

SPOCK2 基因多态性与支气管肺发育不良的关系研究进展*

刘丽巧,肖莎莎 综述,米弘瑛[△] 审校

(昆明理工大学附属医院/云南省第一人民医院儿科 650032)

[摘要] 随着新生儿医学的发展及肺表面活性物质的应用,越来越多的早产儿和极低出生体重儿得以存活,但支气管肺发育不良(BPD)的发病率也在逐年增加,作为早产儿最棘手的问题之一,其发病机制尚不完全清楚,目前仍缺乏特效药物及治疗手段,因此研究 BPD 机制是目前新生儿科医生最具有挑战性的热门课题之一。多项研究表明,SPOCK2 基因多态性与 BPD 的发病密切相关,该文就 SPOCK2 基因多态性与早产儿 BPD 的相关性研究进展予以综述。

[关键词] SPOCK2;基因多态性;支气管肺发育不良;早产儿

[中图分类号] R722.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)05-0860-05

Relation ship study progress of SPOCK2 gene polymorphism and bronchopulmonary dysplasia *

LIU Liqiao, XIAO Shasha, MI Hongying[△]

(Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology/ the First Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] With the development of neonatal medicine and the application of pulmonary surfactant, more and more premature and very low birth weight infants are surviving. However, the incidence rate of bronchopulmonary dysplasia (BPD) is increasing year by year. As the most difficult problem of premature infants, the pathogenesis is not yet fully understood, and there is still no specific drugs and treatment methods for this disease. Therefore, to study the pathogenesis of BPD is one of the most challenging and hot topics for neonatal pediatricians. A number of studies have shown that SPOCK2 gene polymorphism is closely related to the incidence of BPD. This article reviewed the research progress on the relationship between SPOCK2 gene polymorphism and BPD in preterm infants.

[Key words] SPOCK2; gene polymorphism; bronchopulmonary dysplasia; premature infant

随着围生医学及 NICU 技术的不断发展,极低出生体重儿和超低出生体重儿的存活率明显提高,支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)的发病率也逐年上升^[1-2],由于出生胎龄小,肺发育极度不成熟,呼吸系统后遗症已成为早产儿长期患病和死亡的重要原因之一^[3]。BPD 发病机制复杂,目前仍不明确。多项研究结果显示 BPD 为一种多因素疾病,是遗传因素与环境因素相互作用的结果^[4],即在遗传易感性的基础上各种不利因素如氧中毒、气压伤、容量伤、炎症等导致的肺损伤,以及损伤后肺组织的异

常修复,其中炎性损伤与损伤后修复均受基因易感性调控^[5]。临床研究发现,在胎龄、出生体重和治疗措施相同的情况下,并非所有的早产儿均发生 BPD,其预后也不尽相同。1 项对双胞胎的研究发现,同卵双胞胎 BPD 患病率明显高于异卵双胞胎,不同种族新生儿 BPD 患病情况也有明显的差异性。这些均提示 BPD 的发生与遗传因素密切相关。回顾以往的研究,总结遗传相关疾病的研究方法有:家系研究、双胞胎研究、全基因组关联分析及候选基因研究等,其中候选基因研究具有明显假设驱动优势,即候选基因的选择

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目(昆医联合专项)(2017FE468-166);云南省卫健委内设研究机构项目(2016NS236);名医专项(YNWR-MY-2019-017)。 作者简介:刘丽巧(1991—),在读硕士研究生,主要从事儿科学研究。 [△] 通信作者, E-mail: hongyingmi6100@sina.com。

来源于细胞和动物实验、早期人体研究或相关生物学基础理论,这些研究中基因改变可引起蛋白结构甚至功能改变。近年来一些相关基因的多态性在 BPD 发生发展过程中的作用日益受到重视。BPD 已被证实与相关基因的多态性、表达异常有关,如血管表皮生长因子(VEGF),肺泡表面活性物质相关蛋白(SPs)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)及表面活性蛋白 D(SFTPD)基因^[6-9],但多数相关的候选基因与 BPD 的关系需进一步明确。其中羧素 2(SPOCK2)基因特别受关注,但其与 BPD 发生的关系尚不完全清楚,因此本文就 SPOCK2 基因多态性与早产儿 BPD 的相关性研究进展予以综述。

1 关于 SPOCK2

SPOCK2,又称 Testican-2,属于基质细胞蛋白家族(secreted protein, acidic, cysteine-rich, SPARC)成员之一。SPARC 的作用是在细胞增殖、周期进程、凋亡、黏附和细胞-基质相互作用等生物学过程中发挥作用。目前已知的同源物为 SPOCK-1, SPOCK-2 和 SPOCK-3;SPOCK2 最初被描述为精液中的一种未命名的软骨素/乙酰硫酸蛋白多糖,后来在筛选人 cDNA 文库中发现,它与中枢神经系统有关,目前在人类的卵巢、睾丸、肺、前列腺和肾脏^[10-11]均发现该基因的表达。研究发现人类的乳腺癌、前列腺癌、结肠癌和子宫内膜癌与 SPOCK2 的甲基化密切相关^[12-13]。

2 SPOCK2 的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与 BPD

HADCHOUEL 等^[14]首先观察到 SPOCK2 基因在大鼠肺部的高表达,并发现 SPOCK2 是 BPD 发生的一个风险基因,SPOCK2 基因上的 SNP rs1049269 的关联仅见于白种人($P=0.025$, $OR=1.79$),而 rs1245560 的关联在白种人($P=0.02$, $OR=1.85$)及非洲人($P=0.007$, $OR=2.43$)中均可见,并且这种关联在轻度 BPD 患儿中并未显示,只在中-重度 BPD 患儿中发现,基于轻度 BPD 不受遗传影响,而中-重度明显受遗传因素的影响,为了系统性研究遗传对极低出生体重儿罹患中、重度 BPD 的影响,WANG 等^[15]使用了一种基于大群体的方法,采用全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)和基于外显子组的基因型鉴定平台,评估了数以百万计的 SNP,结果既没有在全基因组显著性水平上鉴定出与中-重度 BPD 相关的 SNP,也没有重复出既往的发现。对于既往研究中发现的与 BPD 有关的 27 个 SNPs,如表面活性蛋白 D(SFTPD)、白细胞介素-18(IL-18)、超氧化物歧化酶 3(SOD3)、基质金属蛋白酶-16(MMP-16)及选择素 L(SELL)等均 $P<0.1$,无

统计学意义。研究认为最有可能与 BPD 相关的 SNP 是 rs118078182,这是一种在发育中的肺间质中表达的跨膜胶原,但是由于复制样本量是有限的,真实的信号可能没有被检测到。与此同时,其他学者认为,以 P 值小于 5×10^{-8} 的标准对于全基因组来说太过严格,导致检测结果均无统计学意义。同样,MAHLMAN 等^[16]在 BPD 的 GWAS 中发现,没有一个 SNP 达到严格的全基因组显著性水平,但存在许多提示性关联,研究中发现中-重度 BPD 与 SNP rs11265269 之间存在明显暗示性关联,并且这种联系在芬兰人口和法国的非洲裔婴儿中得到了复制。尽管最初的 GWAS 信号无一个得到一致的复制,但其中一些可能代表了真正的关联信号。例如,在 GWAS 中提示与 BPD 相关的 SNP 中,RASGFR1(编码 Ras 蛋白特异性鸟嘌呤核苷酸释放因子 1)内的 SNP 可能代表真正的关联,因为位于该基因附近的其他 SNP 在 BPD 的先前 GWAS 中显示关联信号。此外,其他一些具有提示性相关 SNP 的基因可能在生物学上与 BPD 表型相关。例如,已知 SGCD 基因(编码肌聚糖)与气道反应性相关,这一过程与 COPD 患者的肺功能下降有关,这些都需要更大规模的研究来评估这些基因在 BPD 中的潜在作用。

WANG 等^[15]在进行基因分型时发现:主成分分析的前 3 个组成部分确定了 4 个种族群体,分别代表非洲裔美国人,西班牙裔美国人,白种人和亚洲人,并且在每个种族亚群中确定的 SNP 没有重叠,比如在白种人群中发现的关联性最强的 SNP rs6988306 在其他种族中均无重复;MAHLMAN 等^[16]研究中强关联的 rs11265269 也仅在芬兰人口和法国的非洲裔婴儿中得到了复制。尽管既往研究种族混合群体中已显示出 BPD 对成人和儿童肺功能的影响,并且最新的研究也显示 BPD 具有明显种族差异性^[17],但在不同人种中的 BPD 与 SPOCK2 的基因相关性还需进一步证实。

3 SPOCK2 在 BPD 中可能的作用机制

3.1 SPOCK2 与 MMPs

HADCHOUEL 等^[14]观察到 SPOCK2 基因在大鼠肺部高表达,而且在肺的发育过程中 SPOCK2 mRNA 水平变化显著。一般来说,肺泡化通常发生在大鼠的第 4~21 天,他们发现 SPOCK2 基因的表达在肺发育过程的微观和囊泡阶段表达水平非常低,而在肺泡化时开始显著升高,在第 18 天时表达水平达到峰值,一直持续至第 28 天,随后降低至正常新生鼠的水平,这提示肺发育和终止过程与 SPOCK2 密切相关。HADCHOUEL 等还发现 SPOCK2 是由肺成纤维细

胞和上皮细胞合成的,然后沉积在包括基膜在内的细胞外基质(ECM)中,免疫荧光研究显示 SPOCK2 在整个 ECM 中均表达。

有研究表明 SPOCK2 与基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-14、MMP-16 相互作用,在肺发育中起关键作用并与 BPD 风险有关^[18-20],并且于正在发育的肺中,MMP-2 在次级分离过程中充当主要的蛋白酶。SPOCK1 和 SPOCK3 可抑制 MMP-14 和 MMP-16,并将 pro-MMP-2 水解成其活性形式,而 SPOCK2 则通过其 NH₂ 末端独特结构域与 SPOCK3 的 COOH 末端结构域结合,消除这种抑制作用,从而使得 MMP-2 被激活,最终促进 ECM 的降解和细胞的迁移和侵袭^[18]。为进一步研究 SPOCK2 在肺发育过程中的作用是否由 MMP-2 激活介导,HADCHOUEL 等^[21]设计了 SPOCK2 抗体在高氧条件下和在空气中对 MMP-2 的激活作用,结果显示与之前的报道一致^[22];在空气暴露的大鼠中 MMP-2 活性显著减少,而高氧条件下 MMP-2 的活性被激活,但在高氧条件下,注射生理盐水的动物和注射抗体的动物之间 MMP-2 的激活率无显著差异,基于此,他们认为 SPOCK2 在肺泡发育中的作用可能与 MMP-2 激活有关,但由于缺乏相关模型印证,该假设并未被确认。

3.2 SPOCK2 与肺泡上皮细胞转化

为进一步研究 SPOCK2 在肺发育过程中的作用,HADCHOUEL 等^[21]设计了两种小鼠模型,一种使用特定的 SPOCK2 抗体,一种通过转基因小鼠模型重现高氧诱导的 SPOCK2 表达,从而导致条件性和肺靶向 SPOCK2 的表达。在高氧条件下饲养小鼠时,用 SPOCK2 抗体治疗可显著改善肺泡形成。SPOCK2 的过度表达改变了在室内空气繁殖的幼鼠的肺泡发育,并加剧了高氧血症引起的病变。这项研究为 SPOCK2 对肺泡发育的有害作用提出了有力的论据,尤其是在肺损伤后,提示其在 BPD 敏感性中的作用,这些作用不是通过金属蛋白酶活性的释放和正常肺泡形成所必需的因子的表达来介导的,可能涉及 I 型(AT1)和 II 型上皮肺泡细胞(AT2)之间的平衡。

有研究证实了 AT2 在发育过程及肺损伤后充当 AT1 的祖细胞^[23],而 SPOCK2 是 AT2 向 AT1 转化的早期标志^[24]。研究发现当 AT2 细胞在胶原上培养时,SPOCK2 促进其快速向 AT1 的转分化,而当 AT2 细胞在基质凝胶上培养时,SPOCK2 的表达水平并无改变^[24]。通过对转基因小鼠和对照小鼠的肺进行形态分析,HADCHOUEL 等^[21]证明了 SPOCK2 在肺泡发育中的有害作用,这在肺损伤后表现尤为明显,同时也提示其在 BPD 易感性中的作用,这种效果可

能是由 AT2 和 AT1 细胞之间的失衡介导,但是由于缺乏足够的 AT2 细胞来进行细胞增殖和修复,这是二次分裂和最终肺泡形成所必需的。这个假设需要进一步的研究来证实。

3.3 血液中的微 RNA(miRNAs)可成为新生儿 BPD 的标志物

研究发现 rs1049269 这个 SNP 位点位于 SPOCK2 基因的 3'UTR 区域,根据理论推测可能会影响 miRNA 的结合,调控 SPOCK2 基因的后转录水平,进而对 BPD 的发生发展产生影响。miRNAs 属于内源性非编码 RNA,长约 20~22 个核苷酸。miRNAs 不编码蛋白,但在基因表达中发挥十分重要作用,主要显示在转录和转录后水平调控基因的表达。大部分 miRNAs 位于内含子区,少数位于外显子区。miRNAs 先在核内由 RNA 聚合酶 II 转录成初 miRNAs(primary miRNAs, pri-miRNAs),pri-miRNAs 在 Drosha-DGCR8 复合物的作用下形成带有发夹结构的前体 miRNAs(precursor miRNAs, pre-miRNAs),再与转运蛋白 5(exportin-5)结合转运至细胞质,并由 Dicer 酶剪切形成双链的 miRNA(miRNA-3p 和 miRNA-5p),这是来自于 pre-miRNAs 的互补的两条链。在与靶位点结合时,其中任意一条链均可作为成熟 miRNAs,miRNAs 与 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex RISC)整合,通过其 5'端第 2~8 位碱基与靶基因 mRNA 3'UTR 结合,进而抑制靶基因的翻译或使其降解,从而抑制基因的表达。在新生儿 BPD 中,WU 等^[25]在 15 例对照组和 15 例 BPD 患儿中,对 365 个 miRNAs 进行了筛查,结果发现 4 个 miRNAs(miR-152, miR-30a-3p, miR-133b, 和 miR-7)出现了异常的表达。临床上也多次报道了肺发育过程中 miRNA 的动态调节和接触调节。HU 等^[26]发现 miR-29a 的下调可以共同提高 GAB1 的表达,减少细胞凋亡并刺激增殖,最终阻碍 BPD 的发展。SHAH 等^[27]发现 miR-184-3p 的过表达加剧了 BPD 肺表型,而下调 miR-184-3p 的表达改善了 BPD 的表型并改善了呼吸功能。上述研究均提示血液中的 miRNAs 成为新生儿 BPD 的标志物是可行的。米弘瑛等^[28]通过荧光定量 PCR 技术分析 SPOCK2 的表达水平,和可能与该基因在 rs1049269 位点相结合的 3 个 miRNAs(miR-194, miR-939 和 miR-449b)的表达水平,探明 SPOCK2 基因及与该基因 3'UTR 结合的 miRNAs 在中国人群的表达水平变化,分析 SNP 对 miRNAs 与 SPOCK2 基因结合性的影响,结果显示 SPOCK2 基因多态性位点 rs1049269 AG 基因型和 G 等位基因频率与 BPD 有关,是 BPD

发病的高危因素,但是由于该研究纳入的病例较少,因此尚未进行 rs1049269 与不同程度 BPD 的相关性分析。此外,由于 rs1049269 位于 SPOCK2 基因的 3' UTR 区域,推测该位点可能通过影响某些 miRNAs 同 SPOCK2 的结合进而影响 SPOCK2 的表达,但这仍需进行更深入及更大样本量的研究验证。

4 展 望

综上所述,SPOCK2 与 BPD 的相关性目前仍未明确。全基因组关联研究也并未发现特定的 SNP 位点^[16-17],这提示 BPD 可能不是由单个基因介导,而是多基因介导的疾病,未来需要更大样本的研究和更深入的动物试验加以验证。至今为止,基于 BPD 的分子遗传学研究结果间的一致性也较低,尚无公认的研究结论^[30]。作为一个多系统共同参与、病理生理复杂的疾病,BPD 对患儿的影响可持续至整个婴儿期甚至成年早期,最新的研究揭示:BPD 早产儿发展为慢性阻塞性肺疾病(COPD)的风险较大,这是一种威胁人类生命的肺部疾病,几乎无有效的治疗方法^[31]。因此,研究 BPD 的发病机制具有重大临床意义,相信随着未来医学的不断进步与发展,SPOCK2 基因多态性与 BPD 的关系研究会越来越深入,越来越明确,为 BPD 的发病机制、治疗提供新的思路 and 方向。

参考文献

- [1] SABATELLI D, MILET B, MENA P, et al. Growth restriction increases the risk of bronchopulmonary dysplasia, death, and sepsis in twins of 30 weeks or less of gestation[J]. *Rev Chil Pediatr*, 2019, 90(1): 36-43.
- [2] ENDESFELDER S, STRAU E, SCHEUER T, et al. Antioxidative effects of caffeine in a hyperoxia-based rat model of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Resp Res*, 2019, 20(1): 88.
- [3] SIMONES A A, BEISANG D J, PANOSKALTIS-MORTARI A, et al. Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia: a clinical review [J]. *Pediatr Res*, 2018, 83(1/2): 308-317.
- [4] DAY C L, RYAN R M. Bronchopulmonary dysplasia: new becomes old again[J]. *Pediatr Res*, 2017, 81(1/2): 210-213.
- [5] THÉBAUD B, GOSS K N, LAUGHON M, et al. Bronchopulmonary dysplasia [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 357-368.
- [6] ZHANG F T, JIA C H, LIN X J, et al. The association between surfactant protein B gene variation and bronchopulmonary dysplasia in Chinese premature newborns[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(7): 3753-3758.
- [7] LIEKKINEN J, ENKAVI G, JAVANAINEN M, et al. Pulmonary surfactant lipid reorganization induced by the adsorption of the oligomeric surfactant protein B complex[J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(10): 3251-3268.
- [8] DAVIS N L. Commentary on "Oxygen desaturations in the early neo-natal period predict development of bronchopulmonary dysplasia" by Fairchild et al [J]. *Pediatr Res*, 2019, 85(7): 927-928.
- [9] 程林, 张应金, 黄冠芬, 等. 新生儿支气管肺泡灌洗液中 VEGF、IL-8 和 TGF- β 1 与支气管肺发育的关系[J]. *中国现代药物应用*, 2018, 12(13): 41-42.
- [10] LOU W, DING B, ZHONG G, et al. Dysregulation of pseudogene/lncRNA-hsa-miR-363-3p-SPOCK2 pathway fuels stage progression of ovarian cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(23): 11416-11439.
- [11] AHN N, KIM W J, KIM N, et al. The interferon-inducible proteoglycan testican-2/SPOCK2 functions as a protective barrier against virus infection of lung epithelial cells [J]. *J Virol*, 2019, 93(20): e00662-00669.
- [12] LIU G, REN F, SONG Y. Up-regulation of SPOCK2 inhibits the invasion and migration of prostate cancer cells by regulating the MT1-MMP-/MMP-2 pathway [J]. *Peer J*, 2019, 7: e7163.
- [13] REN F, WANG D N, WANG Y Z, et al. SPOCK2 affects the biological behavior of endometrial cancer cells by regulation of MT1-MMP and MMP-2 [J]. *Reproductive Sci*, 2020, 27(7): 1391-1399.
- [14] HADCHOUEL A, DURRMEYER X, BOUZIGON E, et al. Identification of SPOCK2 as a susceptibility gene for bronchopulmonary dysplasia [J]. *Am J Resp Crit Care*, 2011, 184(10): 1164-1170.
- [15] WANG H, JULIEN K R S, STEVENSON D

- K, et al. A genome-wide association study (GWAS) for bronchopulmonary dysplasia[J]. *Pediatrics*, 2013, 132(2):290-297.
- [16] MAHLMAN M, KARJALAINEN M K, HUUSKO J M, et al. Genome-wide association study of bronchopulmonary dysplasia: a potential role for variants near the CRP gene[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):9271.
- [17] VESOULIS Z A, MCPHERSON C C, WHITEHEAD H V. Racial disparities in calculated risk for bronchopulmonary dysplasia: a dataset[J]. *Data Brief*, 2020, 30:105674.
- [18] NAKADA M, MIYAMORI H, YAMASHITA J, et al. Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12):3364-3369.
- [19] 袁二伟, 曲海新, 王玲玲, 等. 早产儿支气管肺发育不良的影响因素及血清 MMP-16、NF- κ B 检测的临床意义[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(3):561-564, 557.
- [20] LEE C, AN J, KIM J H, et al. Low levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 at birth may be associated with subsequent development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants[J]. *Korean J Pediatr*, 2015, 58(11):415-420.
- [21] HADCHOUEL A, FRANCO-MONTOYA M L, GUERIN S, et al. Over-expression of Spock2 in mice leads to altered lung alveolar development and worsens lesions induced by hyperoxia[J]. *Am J Physiol Lung Cancer Mol Physiol*, 2020.
- [22] PORZIONATO A, ZARAMELLA P, MACCHI V, et al. Fluoxetine may worsen hyperoxia-induced lung damage in neonatal rats [J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(12):1599-1610.
- [23] MORALES J H, NEWMAN D R, SANNES P L. Whole-genome analysis of temporal gene expression during early transdifferentiation of human lung alveolar epithelial type 2 cells in vitro [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):e93413.
- [24] WARBURTON D, LHASHASH A, CARRARO G, et al. Lung organogenesis[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 90:73-158.
- [25] WU Y T, CHEN W J, HSIEH W S, et al. MicroRNA expression aberration associated with bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a preliminary study[J]. *Resp Care*, 2013, 58(9):1527-1535.
- [26] HU Y, XIE L, YU J, et al. Inhibition of microRNA-29a alleviates hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia in neonatal mice via upregulation of GAB1 [J]. *Mol Med*, 2019, 26(1):104-113.
- [27] SHAH D, SANDHU K, DAS P, et al. miR-184 mediates hyperoxia-induced injury by targeting cell death and angiogenesis signalling pathways in the developing lung [J]. *Eur Respir J*, 2020:1901789.
- [28] 米弘瑛, 刘凯, 许小艳, 等. 辜素 2 (SPOCK2) 基因多态性与昆明地区新生儿支气管肺发育不良相关性 [J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(1):117-121.
- [29] WANG H, ST JULIEN K R, STEVENSON D K, et al. A genome-wide association study (GWAS) for onsidar and how to invest- gate [J]. *Arch Dis Child*, 2017, 102(1):84-90.
- [30] BUI D S, LODGE C J, BURGESS J A, et al. Childhood predictors of lung function trajectories and future COPD risk: a prospective cohort study from the first to the sixth decade of life [J]. *Lancet Resp Med*, 2018; 6:535-544.

(收稿日期:2020-10-28 修回日期:2020-12-13)