



(21) 申请号 202311419598.3

(22) 申请日 2023.10.30

(71) 申请人 广东省妇幼保健院(广东省妇产医院、广东省儿童医院)

地址 511400 广东省广州市番禺区兴南大道521号

(72) 发明人 钟隽鏖 刘雨丰 叶秀桢 马健
张亮 张静 林颖仪 马冬菊
莫镜

(74) 专利代理机构 深圳国海智峰知识产权代理
事务所(普通合伙) 44489

专利代理师 虞玖玲

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

NR3C1基因Bc1I位点多态性在新生儿难治性
脓毒性休克评估中的应用

(57) 摘要

本发明提供了NR3C1基因Bc1I位点多态性在新生儿难治性脓毒性休克评估中的应用。本发明发现NR3C1基因Bc1I位点多态性可用于评估新生儿脓毒性休克严重程度;进一步地,NR3C1基因Bc1I位点多态性可用于评估新生儿难治性脓毒性休克患病风险和预后情况,与NR3C1基因Bc1I位点G等位基因相比,NR3C1基因Bc1I位点C等位基因的患儿发展为难治性脓毒性休克的风险更高,预后更差。本发明为评估新生儿脓毒性休克的严重程度及患儿发展为难治性脓毒性休克的风险提供了新的特异性指标,为难治脓毒性休克提供早期预警,以及为临床新生儿脓毒性休克的治疗方案的制定提供指导。

1. 检测NR3C1基因Bc1I位点多态性的试剂在制备评估新生儿脓毒性休克严重程度的试剂盒中的应用。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,NR3C1基因Bc1I位点C等位基因新生儿脓毒性休克严重程度高于NR3C1基因Bc1I位点G等位基因新生儿。

3. 检测NR3C1基因Bc1I位点多态性的试剂在制备评估新生儿难治性脓毒性休克患病风险的试剂盒中的应用。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,NR3C1基因Bc1I位点C等位基因新生儿发展为难治性脓毒性休克的风险高于NR3C1基因Bc1I位点G等位基因新生儿。

5. 检测NR3C1基因Bc1I位点多态性的试剂在制备辅助评估新生儿脓毒性休克预后的试剂盒中的应用。

6. 检测NR3C1基因Bc1I位点多态性的试剂在制备辅助评估新生儿脓毒性休克治疗方案的试剂盒中的应用。

7. 如权利要求1~6任一项所述的应用,其特征在于,所述试剂为用于PCR法、qPCR法、测序法、PCR-RFLP法、TaqMan探针法、基因芯片法检测的试剂。

8. 如权利要求1~6任一项所述的应用,其特征在于,所述试剂包括针对NR3C1基因的特异性扩增引物。

9. 如权利要求8所述的应用,其特征在于,所述引物包括如SEQ ID NO.1所示的上游引物和如SEQ ID NO.2所示的下游引物。

10. 一种新生儿脓毒性休克严重程度和/或预后评估试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括检测NR3C1基因Bc1I位点多态性的试剂。

NR3C1基因BclI位点多态性在新生儿难治性脓毒性休克评估中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子诊断技术领域,具体涉及NR3C1基因BclI位点多态性在新生儿难治性脓毒性休克评估中的应用。

背景技术

[0002] 脓毒性休克,亦称为感染性休克,是脓毒症进展的最危重阶段,由微生物及其毒素等产物所引起的循环、细胞和代谢紊乱,感染灶中的微生物及其毒素、胞壁产物等侵入血循环,激活宿主的各种细胞和体液系统;产生细胞因子和内源性介质,作用于机体各种器官、系统,导致组织灌注不足、心血管功能障碍,甚至多器官功能衰竭。

[0003] 脓毒性休克是新生儿死亡的主要原因,占新生儿重症监护病房死亡人数的45%。此外,难治脓毒性休克(refractory septic shock, RSS)病死率可高达80%。有研究显示RSS是脓毒性休克儿童死亡的首要原因,因此,RSS的成功诊治是降低脓毒性休克患儿病死率的重要手段。2016年欧洲儿科和新生儿重症监护协会提出了脓毒性休克评分(septic shock score, SSS),以便早期诊治RSS。根据患儿是否存在高乳酸血症、血管活性药物剂量高与心肌功能障碍,提出SSS以指导RSS患儿的诊治,并指出bSSS \geq 2和cSSS \geq 3.5与病死率显著相关。

[0004] NR3C1基因BclI(rs41423247)位点多态性为野生型GG基因型(称为G等位基因),突变型GC基因型和CC基因型(称为C等位基因)。关于NR3C1基因BclI(rs41423247)位点多态性与疾病之间目前已有一些相关研究,例如,携带NR3C1基因BclI位点C等位基因的低血压早产儿需要更高剂量的血管活性药物及氢化可的松;携带NR3C1基因BclI位点C等位基因的COVID-19患者发生死亡的风险更高。然而,在新生儿脓毒性休克中NR3C1基因BclI位点多态性未见相关报道。

发明内容

[0005] 基于此,本发明的目的在于提供NR3C1基因BclI位点多态性在新生儿难治性脓毒性休克评估中的应用,以便实现难治性脓毒性休克的早诊早治,降低新生儿死亡率。

[0006] 为达到上述目的,本发明采用如下技术方案。

[0007] 本发明的第一个方面,提供了检测NR3C1基因BclI位点多态性的试剂在制备评估新生儿脓毒性休克严重程度的试剂盒中的应用。

[0008] 在一些实施例中,NR3C1基因BclI位点C等位基因新生儿脓毒性休克严重程度高于NR3C1基因BclI位点G等位基因新生儿。

[0009] 本发明的第二个方面,提供了检测NR3C1基因BclI位点多态性的试剂在制备评估新生儿难治性脓毒性休克患病风险的试剂盒中的应用。

[0010] 在一些实施例中,NR3C1基因BclI位点C等位基因新生儿发展为难治性脓毒性休克的风险高于NR3C1基因BclI位点G等位基因新生儿。

[0011] 本发明的第三个方面,提供了检测NR3C1基因Bc1I位点多态性的试剂在制备辅助评估新生儿脓毒性休克预后的试剂盒中的应用。

[0012] 本发明的第四个方面,提供了检测NR3C1基因Bc1I位点多态性的试剂在制备辅助评估新生儿脓毒性休克治疗方案的试剂盒中的应用。

[0013] 在一些实施例中,所述试剂为用于PCR法、qPCR法、测序法、PCR-RFLP法、TaqMan探针法、基因芯片法检测的试剂。

[0014] 在一些实施例中,所述试剂包括针对NR3C1基因的特异性扩增引物。

[0015] 在一些优选的实施例中,所述引物包括如SEQ ID NO.1所示的上游引物和如SEQ ID NO.2所示的下游引物。

[0016] 本发明的第五个方面,提供了一种新生儿脓毒性休克严重程度和/或预后评估试剂盒,所述试剂盒包括检测NR3C1基因Bc1I位点多态性的试剂。

[0017] 在一些实施例中,所述试剂盒为用于PCR法、qPCR法、测序法、PCR-RFLP法、TaqMan探针法、基因芯片法检测的试剂盒。

[0018] 在一些实施例中,所述试剂盒包括针对NR3C1基因的特异性扩增引物。

[0019] 在一些优选的实施例中,所述引物包括如SEQ ID NO.1所示的上游引物和如SEQ ID NO.2所示的下游引物。

[0020] 本发明发现NR3C1基因Bc1I位点多态性可用于评估新生儿脓毒性休克严重程度,所述NR3C1基因Bc1I位点C等位基因新生儿脓毒性休克严重程度高于NR3C1基因Bc1I位点G等位基因新生儿。进一步地,NR3C1基因Bc1I位点多态性可用于评估新生儿难治性脓毒性休克患病风险和预后情况,与NR3C1基因Bc1I位点G等位基因相比,NR3C1基因Bc1I位点C等位基因的患儿发展为难治性脓毒性休克的风险更高,预后更差。本发明为评估新生儿脓毒性休克的严重程度及患儿发展为难治性脓毒性休克的风险提供了新的特异性指标,为难治脓毒性休克提供早期预警,以及为临床新生儿脓毒性休克的治疗方案的制定提供指导。

具体实施方式

[0021] 本发明下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0022] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。

[0023] 本发明的术语“包括”和“具有”以及它们任何变形,意图在于覆盖不排他的包含。例如包含了一系列步骤的过程、方法、装置、产品或设备没有限定于已列出的步骤或模块,而是可选地还包括没有列出的步骤,或可选地还包括对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤。

[0024] 下面结合具体实施例进行说明。

[0025] 本发明中新生儿定义为从脐带结扎到生后28天内的婴儿。

[0026] 实施例1

[0027] 本实施例研究新生儿脓毒性休克患者NR3C1基因Bc1I位点多态性与脓毒性休克的关联。

[0028] 一、纳入研究的样本信息

[0029] 纳入标准:符合新生儿脓毒性休克诊断标准,即为由严重感染导致的心血管功能障碍。

[0030] 排除标准:先天性心脏病、怀疑染色体病或遗传代谢性疾病、膈疝、胎胎输血综合征。

[0031] 根据上述纳入标准和排除标准,共纳入41例患儿。

[0032] 二、NR3C1基因Bc1I位点多态性检测方法

[0033] 1.每位研究参与者入组时取1mL静脉血放入EDTA管中,在-20℃保存。使用TIANamp血液DNA试剂盒从300μl外周血样本中提取DNA,操作严格按照说明书进行。

[0034] 2.取20ng DNA进行PCR+Sanger测序。

[0035] NR3C1基因扩增特异性引物如下:

[0036] NR3C1-F:5' -AGG TTA CGG GGT AGA GAA AT-3' (SEQ ID NO.1);

[0037] NR3C1-R:5' -AGC AAT GCA GTG AAC AGT GT-3' (SEQ ID NO.2)。

[0038] 配置如下PCR扩增体系:2.5mmol/L dNTP(1ul)、10*PCR缓冲液(2.5ul)、25mmol/L MgCl₂、10umol/L NR3C1-F(1ul)、10umol/L NR3C1-R(1ul)、Taq DNA聚合酶(2.5ul)、模板DNA(5ul)。

[0039] 上述PCR扩增体系按照如下程序进行PCR扩展:(1)高温变性:DNA解链反应器经加热至93℃左右,维持一定时间后,模板DNA双链或经PCR扩增形成的双链DNA分离成单链,以便与引物结合;(2)低温退火:引物与模板DNA结合DNA分子经加热变性成单链后,温度降至55℃左右,引物与模板DNA单链的互补序列进行配对结合;(3)中温延伸:DNA合成到适宜的温度(70℃左右)时,DNA模板-引物结合物在Taq DNA聚合酶的作用下,以dNTP为反应原料,靶序列为模板,依据碱基互补配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板DNA链互补的半保留复制链;(4)多次循环以下三步重复循环高温变性→低温退火→中温延伸三个过程。

[0040] PCR扩增产物送至广东省妇幼保健院妇女儿童健康研究所进行Sanger测序。

[0041] 根据测序结果,41例患儿样本中,携带NR3C1基因Bc1IC等位基因(CC基因型和GC基因型)22例,G等位基因(GG基因型)19例。

[0042] 三、结果分析方法

[0043] 根据测序结果将患儿分为NR3C1基因Bc1I位点C等位基因组和NR3C1基因Bc1I位点G等位基因组。

[0044] 1.分析各组患儿的如下指标:低心脏指数、血培养阳性、肾上腺素使用率、72小时累积液体超负载百分比、重症监护(h),评估不同等位基因组的疾病严重程度。

[0045] 2.分析各组患儿难治性脓毒性休克的情况。

[0046] 本发明采用2016年欧洲儿科和新生儿重症监护协会提出的脓毒性休克评分(septic shock score,SSS)判断难治性脓毒性休克和非难治性脓毒性休克,可参考申请人以下研究成果:钟隽鏊等;不同休克评分方法对新生儿难治性脓毒性休克预后的评估价值;中华新生儿科杂志;2021年11月第36卷第6期。具体如下:

[0047] SSS评分分为计算式脓毒性休克评分(computed septic shock scores,cSSS)与床边脓毒性休克评分(bedside septic shock scores,bSSS)。涉及血管活性药物评分(vaso-inotrope score,VIS)、LAC、心脏指数(cardiac index,CI)与射血分数(ejection

fraction,EF),按以下公式进行计算:

[0048] ①VIS=多巴胺剂量+多巴酚丁胺剂量+[去甲肾上腺素剂量+肾上腺素剂量)×100]+(米力农剂量×10)[血管活性药物剂量单位均为 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$];

[0049] ②CI=每搏输出量×心率/[(0.035×体重+0.1)×1000];

[0050] ③cSSS= $1.001^{\text{VIS}}+1.1^{\text{LAC}(\text{mmol/L})}+18\times[\text{心跳骤停或EF}<25\% \text{或CI}<2.2\text{L}/(\text{min}\cdot\text{m}^2)]$ 。考虑此公式不便于临床计算,故改良为cSSS= $1.001\times\text{VIS}+1.1\times\text{LAC}(\text{mmol/L})+18\times[\text{心跳骤停或EF}<25\% \text{或CI}<2.2\text{L}/(\text{min}\cdot\text{m}^2)]$,符合1项或1项以上即为“1”,均无为“0”];

[0051] ④bSSS:VIS>200得1分,LAC>8mmol/L得1分,心跳骤停或EF<25%或CI<2.2L/(min·m²)得3分。

[0052] cSSS≥3.5或bSSS≥2分判定为难治性脓毒性休克。

[0053] 3.采用SPSS22.0进行统计学分析。计量资料采用中位数(四分位数)[M(P25,P75)]表示,组间比较采用Mann-Whitney U检验;计数资料以频数和率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

[0054] 四、结果

[0055] 1.疾病严重程度结果

[0056] 结果如表1所示:

[0057] 表1

	NR3C1 BclI G 等位 基因 (n=19)	NR3C1 BclI C 基因 (n=22)	P
低心脏指数, n (%)	5 (26.3)	13 (59.1)	0.035
血培养阳性, n (%)	0 (0)	7 (31.8)	0.022
[0058] 肾上腺素使用率, n (%)	4 (21.1)	12 (54.5)	0.028
72小时累积液体超负载百分比(%), [M(P25,P75)]	-44.1 (-76.3,32.6)	10.8 (-22.1,89.8)	0.019
重症监护时间(h), [M(P25,P75)]	451 (329,889)	1112 (542,2147)	0.025

[0059] 结果表明,与NR3C1基因BclI位点G等位基因组患儿相比,NR3C1基因BclI位点C等位基因组患儿的低心脏指数发生率、血培养阳性率、肾上腺素使用率、72小时累积液体超负载百分比和重症监护时间(h)均显著增高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。并且,NR3C1基因BclI位点G等位基因组和C等位基因组的28天全因死亡数分别为1例(5.3%)和5例(22.7%)。说明NR3C1基因BclI位点C等位基因组患儿的疾病严重程度高于NR3C1基因BclI位点G等位基因组患儿,且死亡率更高。

[0060] 进一步利用比值比OR分析两组患儿出现低心脏指数(脓毒性休克疾病严重程度的评价指标)的风险,结果如表2所示:

[0061] 表2

	低心脏指数 (n=18)	正常心脏指数 (n=23)	OR(95%CI)	P
[0062] NR3C1 BclI C 等位 基因, n (%)	13 (72.2)	9 (39.1)	4.0 (1.07-15.27)	0.035
NR3C1 BclI G 等 位基因, n (%)	5 (27.8)	14 (60.9)		

[0063] 结果表明,与NR3C1基因BclI位点G等位基因患儿相比,NR3C1基因BclI位点C等位基因患儿发生低心脏指数的风险升高4.0倍,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。说明NR3C1基因BclI位点C等位基因患儿的疾病严重程度高于G等位基因患儿。

[0064] 2. 难治性脓毒性休克结果

[0065] 两组患儿出现难治性脓毒性休克、cSSS ≥ 3.5 和bSSS ≥ 2 结果如表3所示:

[0066] 表3

	NR3C1 BclI G 等位基因 (n=19)	NR3C1 BclI C 等位基因 (n=22)	P
[0067] 难治性脓毒性休 克, n (%)	7 (36.8)	15 (68.2)	0.045
bSSS ≥ 2 , n (%)	5 (26.3)	13 (59.1)	0.035
cSSS ≥ 3.5 , n (%)	7 (36.8)	15 (68.2)	0.045

[0068] 结果表明,NR3C1基因BclI位点C等位基因的新生患儿发展为难治性脓毒性休克的人数显著高于NR3C1基因BclI位点G等位基因的新生患儿,提示C等位基因患儿出现难治性脓毒性休克的风险更高。

[0069] 进一步进行比值比OR分析,结果如表4所示:

[0070] 表4

	难治性脓毒性休克 (n=22)	非难治性脓毒性休 克 (n=19)	OR(95%CI)	P
[0071] NR3C1 BclI C 等位基因, n(%)	15 (68.2)	7 (36.8)	3.7(1.01-13.4)	0.045
NR3C1 BclI G 等位基因, n(%)	7 (31.8)	12 (63.2)		

[0072] 结果表明,NR3C1基因BclI位点C等位基因患儿难治性脓毒性休克的风险是NR3C1基因BclI位点G等位基因患儿的3.7倍,明显高于NR3C1基因BclI位点G等位基因患儿,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

[0073] 综上所述,本发明发现NR3C1基因BclI位点多态性可用于评估新生儿脓毒性休克的严重程度,并评估新生儿脓毒性休克出现难治性脓毒性休克的风险。

[0074] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对以上实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0075] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。