

妊娠期糖尿病与婴儿过敏性疾病相关性的研究

何平 李诚

【摘要】 目的 探讨妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)与婴儿过敏性疾病的关系,并评价蛋白激酶C ζ (PKC ζ)是否可作为婴儿早期预测过敏性疾病的指标。方法 采用荧光定量PCR(RT-PCR)检测40例单胎足月妊娠正常孕妇及40例GDM孕妇外周血及80例足月新生儿脐血中PKC ζ 水平,并对这些婴儿进行随访,调查出生后6个月内过敏性疾病发生情况。结果 (1)正常孕妇组与GDM孕妇组所分娩新生儿脐血PKC ζ 的表达值 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分别为(0.0015 \pm 0.000571)及(0.0011 \pm 0.000323),两组比较差异有统计学意义($t=9.545, P=0.011$);正常孕妇组与GDM孕妇组外周血PKC ζ 的表达值 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分别为(0.0012 \pm 0.000511)及(0.0004 \pm 0.000205),两组比较差异有统计学意义($t=11.314, P<0.01$);(2)正常孕妇组及GDM孕妇组婴儿过敏性疾病的发生率分别为15%和60%,比较有显著差异($\chi^2=17.280, P<0.01$);(3)GDM是婴儿过敏性疾病发生的高危暴露因素(OR=8.500, 95% CI 2.905~24.879, $P<0.01$);(4)脐带血PKC ζ 的表达对婴儿过敏性疾病的诊断临界值为0.00128,敏感性35.5%,特异性34.7%,而外周血PKC ζ 的表达对婴儿过敏性疾病的诊断临界值为0.000995,敏感性12.3%,特异性32%。结论 GDM是过敏性疾病发生的高危暴露因素;脐血及孕妇外周血PKC ζ 对过敏性疾病均有预测作用。

【关键词】 糖尿病, 妊娠; 蛋白激酶C ζ ; 婴儿过敏性疾病

The study on the relationship between gestational diabetes and allergic diseases of infants

HE Ping, LI Cheng, *Obstetrics and Gynecology of Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, China, Supported by Guangdong Province Natural science Foundation of China(S2011010003396)*

Corresponding Author: HE Ping, E-mail: heping-20088@163.com

【Abstract】 Objective To explore the relationship between gestational diabetes (Gestational Diabetes Mellitus, GDM) and allergic diseases in infants and evaluate the predictive value of the protein kinase C ζ (PKC ζ). **Methods** Using real time PCR (RT-PCR) to detect PKC ζ level in peripheral blood of 40 normal pregnant women and 40 pregnant women with GDM and PKC ζ level in cord blood above 80 pregnant women. These infants were followed up and the allergic disease incidence was investigated within six months after the birth. **Results** (1)The PKC ζ expression value of umbilical cord blood of new born delivered by normal pregnant women and GDM women are (0.0015 \pm 0.000571) and (0.0011 \pm 0.000323), there exist significant difference ($t=9.545, P=0.011$). The PKC ζ expression value of peripheral blood of GDM pregnant women and normal pregnant women are (0.0004 \pm 0.000205) and (0.0012 \pm 0.000511), which show significant difference ($P<0.01$); (2)The allergic disease incidence of two groups are 15%(the normal group), 60%(the GDM group), and there exist significant difference ($\chi^2=17.280, P=0.000<0.05$); (3)GDM is the exposure factors of allergic disease in infants (OR=8.500, 95% CI: 2.905-24.879, $P=0.000<0.05$); (4)The diagnosis value of the expression of PKC ζ in umbilical cord blood to allergic disease of infants is 0.00128, the sensitivity is 35.5%, the specificity is 34.7%. The diagnosis value of the expression of PKC ζ in peripheral blood to allergic disease of infants is 0.000995, the sensitivity is 12.3%, the specificity is 32%. **Conclusions** GDM is the exposure factors of allergic disease in infants. The protein kinase C ζ (PKC ζ) in cord blood and maternal blood both can predict allergic disease.

【Key words】 Diabetes, Gestational; Protein kinase C-epsilon; Allergic diseases in infants

基金项目: 广东省自然科学基金(S2011010003396)

作者单位: 510623 广州市妇女儿童医疗中心妇产科

通讯作者: 何平, E-mail: heping-20088@163.com

近年来,全球过敏性疾病的发病率有升高趋势,婴幼儿过敏性疾病的发病率也不断上升。而引起过敏性疾病的原因众多,其中免疫失衡是主要的原因^[1]。研究表明,由于妊娠期糖尿病(Gestational Diabetes Mellitus, GDM)孕妇体内免疫平衡被打破,而胎儿的T细胞可被通过胎盘的母体因素所致敏,从而导致免疫失衡^[2]。近年来有学者报道蛋白激酶C ζ (PKC ζ)可作为评价过敏性风险的标志物,而PKC ζ 与GDM发生过程中的胰岛素抵抗增加密切相关^[3-4]。GDM与婴儿过敏性疾病是否存在某种联系尚未明确。本研究拟分析孕妇外周血及新生儿脐血PKC ζ 与婴儿过敏性疾病的关系,以期对过敏性疾病的早期预防提供理论依据。

资料与方法

一、研究对象

2011年6月~2012年6月在广州市妇女儿童医疗中心产房收集40例正常孕妇及40例GDM孕妇外周血及80例孕妇所分娩足月新生儿脐血标本。所有研究对象均为足月单胎,两组孕妇均排除过敏性家族史,家里未喂养动植物,丈夫无嗜烟等,正常孕妇组排除妊娠期合并症及并发症。

二、研究方法

1. 所有孕妇临产后抽取外周静脉血5 ml,新生儿出生后立即抽取脐静脉血5 ml,所采集的标本置于EDTA抗凝管中-4℃保存,Trizol试剂盒提取RNA(OD₂₆₀/OD₂₈₀比值大于1.8者进行下一步实验)、逆转录,合成后的cDNA样品-20℃保存。

2. Real-time PCR: 实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems, 型号AB7500); 试剂盒: SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, QPK-201); 反应条件: 95℃ 60 s, 95℃ 15 s, 60℃ 60 s(共40个循环)步骤: 两步法, 三种温度分别是预变性, 变性, 退火延伸(表1)。

逆转录反应引物序列: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; RT-PCR引物序列:

PRKCZ-F: CCCTTCCTGGTCCGATTACACTC

PRKCZ-R: GTAGAACCTGGCGTGCTCCTC

Human GAPDH-F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG

Human GAPDH-R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCC。

3. 随访: 6个月龄时随访子代过敏性疾病的发生情况, 诊断依据: (1) 湿疹: 全身反复出现湿疹样

表1 PCR反应体系

成分	浓度	加入体积	终浓度
SYBR Green Realtime PCR Master Mix	2×	10 uL	1×
上游引物	10 uM	0.4 uL	0.2 uM
下游引物	10 uM	0.4 uL	0.2 uM
PKC ζ cDNA溶液		2 uL	
ddH ₂ O		7.2 uL	
总体积		20 uL	

的皮疹;(2)过敏性鼻炎:经常晨起或者冷热变化的时候出现喷嚏、流涕或鼻塞等症状;(3)哮喘性支气管炎:反复性喘息发作>2次,并可闻及哮鸣音^[5]。此外,进一步结合划痕实验、点刺实验及IgE检测等进行辅助诊断。

4. 统计学方法: 采用统计软件SPSS 13.0软件包进行统计分析, 计量资料使用($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间的比较采用两独立样本的t检验; 计数资料使用百分比表示, 两组间的比较采用 χ^2 检验; 采用Logistic回归分析GDM随访为婴儿过敏性疾病的暴露因素, 并用ROC曲线分析PKC ζ 对过敏性疾病的预测作用, 设定P<0.05时差异有统计学意义。

结 果

一、一般资料比较

两组孕妇的一般资料无显著差异, 经比较两组具有可比性(表2)。GDM孕妇组婴儿出生后25例纯母乳喂养, 15例非纯母乳喂养, 正常孕妇组婴儿出生后20例纯母乳喂养, 20例非纯母乳喂养, 两组婴儿出生后喂养方式差异无统计学意义(χ^2 值=3.000, P=0.223)。

表2 两组孕妇一般资料比较

组别	年龄(岁)	BMI(kg/m ²)	孕周
正常孕妇组	27.5±4.7	24.5±4.5	38.9±0.9
GDM孕妇组	26.9±3.4	25.9±4.0	39.3±1.1
t值	1.2	2.8	0.281
P值	0.483	0.171	0.915

二、孕妇外周血及新生儿脐血中PKCζ的含量

正常孕妇及GDM孕妇外周血及所分娩新生儿脐血中PKCζ的表达值如表3所示,正常孕妇外周血及所分娩新生儿脐血的PKCζ的表达值 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 明显高于GDM组孕妇,实时PCR如图1,2所示。

三、婴儿过敏性疾病随访情况

正常孕妇组婴儿发生一种或多种过敏性疾病发生率达15%(6/40),其中单纯湿疹的发生率为

表3 两组孕妇外周血及所分娩新生儿脐血中PKCζ的表达差异

组别	外周血PKCζ	脐带血PKCζ
正常孕妇组	0.0012±0.000511	0.0015±0.000571
GDM孕妇组	0.0004±0.000205	0.0011±0.000323
<i>t</i> 值	11.314	9.545
<i>P</i> 值	<0.01	0.011

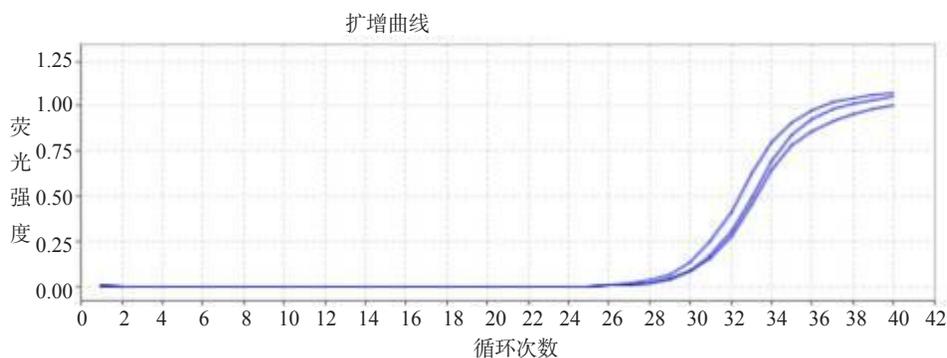


图1 PCR扩增曲线

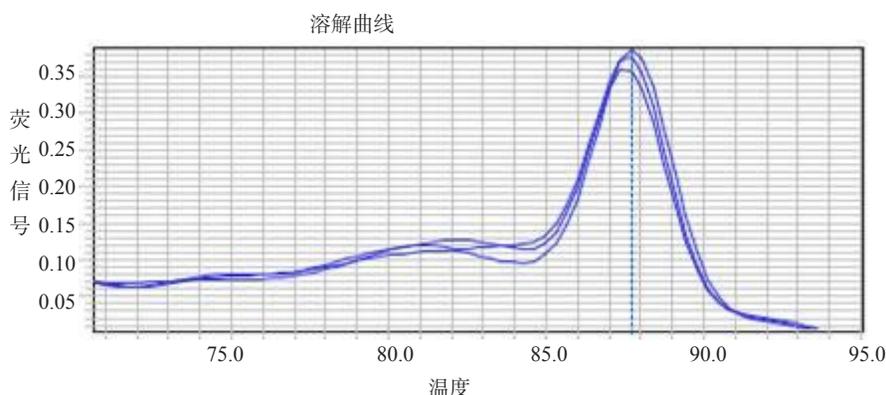


图2 溶解曲线

7.5%(3/40),合并过敏性鼻炎发生率5%(2/40),合并哮喘的发生率为2.5%(1/40)。GDM孕妇组婴儿发生一种或多种过敏性疾病,发生率达60%(24/40),其中单纯湿疹的发生率为30%(16/40),合并哮喘的发生率为5%(2/40),合并过敏性鼻炎的发生率为5%(2/40),单纯过敏性鼻炎的发生率为10%(4/40)。两组比较差异有统计学意义(表4)。

四、GDM与婴儿过敏性疾病

采用Logistic回归分析对两组发生率进行比较,两组比较差异有统计学意义($OR=8.500$,95%CI为

2.905~24.879, $P<0.01$),提示GDM是过敏性疾病发生的高危暴露因素。

五、PKCζ与过敏性疾病

采用ROC曲线分析脐血与孕妇外周血中PKCζ的表达对过敏性疾病的预测作用,脐血组如图3所示,曲线下面积为0.331,差异有统计学意义($P=0.011$),诊断最佳临界值0.00128,敏感性35.5%,特异性34.7%。外周血组如图4所示,曲线下面积为0.248, $P<0.01$,差异有统计学意义,诊断最佳临界值为0.000995,敏感性13.3%,特异性32%。提示脐血

表4 两组婴儿过敏性疾病随访情况

组别	单纯湿疹	单纯过敏性鼻炎	湿疹合并过敏性鼻炎	湿疹合并哮喘	总计
正常孕妇组婴儿	7.5%(3/40)	0%(0/40)	5%(2/40)	2.5%(1/40)	15%(6/40)
GDM孕妇组婴儿	40%(16/40)	10%(4/40)	5%(2/40)	5%(2/40)	60%(24/40)
χ^2 值	6.000	4.932	7.638	4.996	17.280
P值	0.112	0.026	0.006	0.025	<0.01

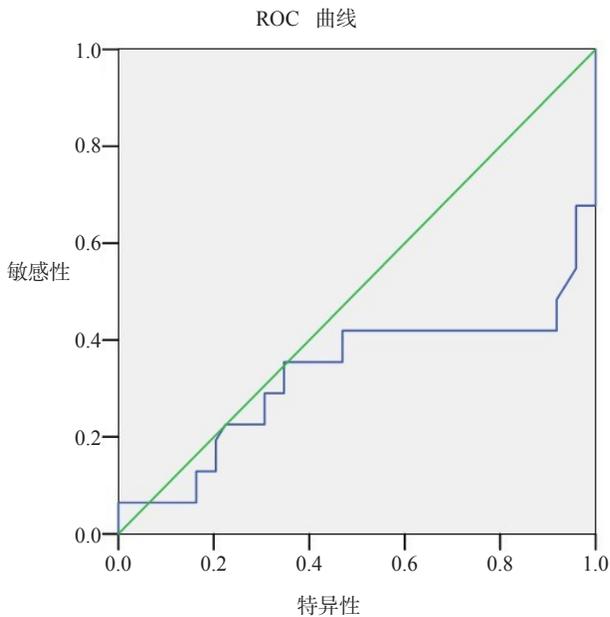


图3 脐血PKCζ的表达与过敏性疾病

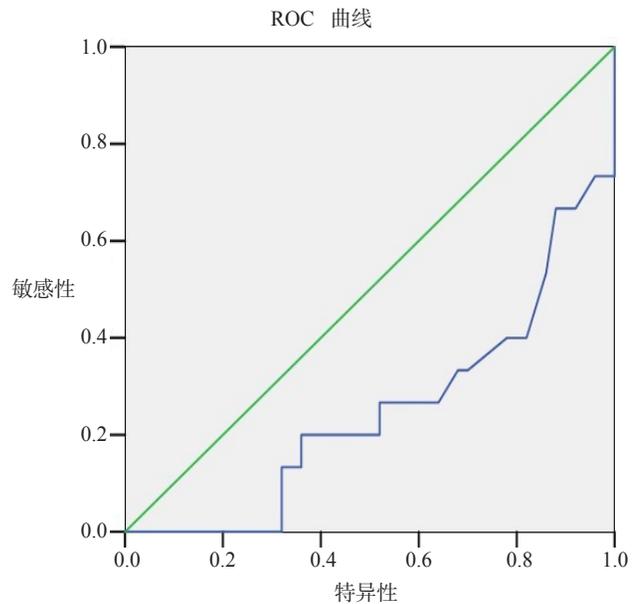


图4 外周血PKCζ的表达与过敏性疾病

及孕妇外周血中 PKCζ 的表达对婴儿过敏性疾病均有预测作用。

讨 论

GDM 是指妊娠期间首次发生或者发现任何程度的糖耐量异常,各国报道的发生率在 1%~14% 之间,我国发生率约在 1%~5%^[6]。GDM 并发症多,一直是国际关注的热点,妊娠期胰岛素抵抗增加是目前公认的妊娠期糖尿病发生的主要病理生理机制^[7]。胰岛素抵抗机制较为复杂,其中蛋白激酶 C(PKC) 介导的胰岛素的作用是近年来研究的热点。

PKCζ 是非典型 PKC 家族成员,在介导胰岛素、参与免疫调节及信号传导方面有重要作用^[8-9],并参与合成释放孕酮、人绒毛膜促性腺激素、胎盘激素、IL-6、肿瘤坏死因子等激素及化学物质,在人类外周

血液、组织、胎盘及脐血等均有表达^[10]。Ferrante^[3]的研究团队于 2007 年通过 western blot 等方法首次发现 PKCζ 作为评价过敏风险的新标志物。脐血 IgE 水平作为预测儿童过敏性疾病的价值已被证实, Ferrante 研究团队的研究结果显示在过敏家族史孕妇中,脐血 PKCζ 预测其子代 1 岁时过敏性疾病的敏感性为 80%,特异性为 63%,明显高于脐血 IgE (特异性仅 26%~47%)。那么在非过敏性家族史孕妇中,是否同样能预测子代过敏性疾病的发生率。本研究对 40 例 GDM 组和 40 例正常对照组新生儿脐血和孕妇外周血应用实时 PCR 方法检测血清 PKCζ 水平,发现 GDM 组中无论是脐血中还是孕妇外周血中 PKCζ 的表达均较正常组中下降,差异有显著性意义(脐血组 $P=0.011$,外周血组 $P=0.000$)。PKCζ 与 GDM 关系密切,GDM 孕妇外周血及所分娩新生儿脐

血中PKC ζ 的表达量均下降,这与相关报道的高血糖环境下PKC ζ 的表达量会下降这一报道相一致^[4]。过敏性疾病是机体内的Th1/Th2平衡被打破,而GDM患者比正常孕妇存在着更为明显的Th1细胞因子如IL-2、干扰素- γ 的下调和Th2细胞因子如IL-10、IL-6、IL-4等的上调,即Th1/Th2比值的下降。同时Th2细胞因子具有调节功能,介导GDM的保护性反应,特别是IL-4与过敏性反应密切。并且相关大量研究证明了成年疾病的胎儿起源学说,胎儿免疫系统在宫内发育过程中可以受到各种不良因素的干扰,高血糖的暴露可能对子代出生后发展为过敏性疾病具有长期的影响。随访发现GDM组子代过敏性疾病无论是湿疹、过敏性鼻炎还是哮喘发生率均高于正常组,提示GDM是子代过敏性疾病的高危因素,与Rajesh的研究结果一致^[11]。本课题进一步使用ROC曲线分析评价PKC ζ 对GDM孕妇所分娩新生儿过敏性疾病的预测价值,结果显示脐血PKC ζ 预测过敏性疾病的敏感性35.5%,特异性34.7%。外周血预测过敏性疾病的敏感性13.3%,特异性32%,两者在预测过敏性疾病均有统计学意义,提示脐血及母亲孕期外周血PKC ζ 在预测婴儿过敏性疾病有一定的意义。

变态反应性疾病是全身的一种过敏反应,疾病越早发生,危害越大。因此对过敏高风险对象进行早期预防,降低过敏性疾病的发生率至关重要^[12-15]。多研究显示孕期干预及出生后干预如母乳喂养等可改善小儿过敏性疾病的发生率^[14-16]。孕期对PKC ζ 进行检测,对高风险孕妇进行孕期及哺乳期干预,降低过敏性疾病的发生,这些还需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 刘恩梅, 杨锡强. 小儿过敏性疾病的诊断与治疗. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(21): 1518-1520.
- [2] J-M Ategbro O, Grissa A, Yessoufou, et al. Modulation of Adipokines and Cyto Kines in Gestational Diabetes and Macrosomia. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(10): 4137-4143.
- [3] Susan L, Prescott, James Irvine, et al. Protein kinase C ζ : A novel protective neonatal T-cell marker that can be upregulated by allergy prevention strategies. J Allergy Clin Immunol, 2007, 120(1): 200-206.
- [4] Thompson NM, Norman AM, Donkin SS, et al. Prenatal and postnatal pathways to obesity: different underlying mechanisms, different metabolic outcomes. Endocrinology, 2007, 148(5): 2345-54.
- [5] 吴瑞萍, 胡亚美, 江载芳主编. 实用儿科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1956-1957.
- [6] 樊小琴, 徐丹芬, 卢朝霞. 妊娠期糖尿病筛查及相关因素分析. 中华全科医学, 2011, 8(9): 1223-1223.
- [7] Cplomiere M, Permezal MRiley C. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. Eur J Endocrinol, 2009, 160(4): 567-578.
- [8] 廖端芳, 关永源. 蛋白激酶C ζ 研究进展. 中国药理学通报, 2002, 18(1): 13-16.
- [9] Jovana Kapor-Drezgic, Xiaopeng Zhou, Tetsuya Babazono, et al. Effect of High Glucose on Mesangial Cell Protein Kinase C-delta and -epsilon is Polyol Pathway-Dependent. J Am Soc Nephrol, 1999, 10(6): 1193-1203.
- [10] A. L. Ruzycy, T. Jansson and N. P. Illsley. Differential Expression of Protein Kinase C Isoforms in the Human Placenta. Placenta, 1996, 17(7), 461-469.
- [11] Rajesh Kumar, Fengxiu Ouyang. Gestational diabetes, atopic dermatitis, and allergen sensitization in early childhood. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(5): 1031-1038.
- [12] 中华医学会儿科分会免疫学组, 《中华儿科杂志》编委委员会, 婴儿过敏性疾病预防、诊断和治疗专家共识. 中华儿科杂志, 2009, 47: 835-838.
- [13] Morgan WJ, Crain EF, Glruchalla RS, et al. Results of a home-base environmental intervention among urban children with asthma. N Engl J Med, 2004, 351(11): 1068-1080.
- [14] Kull, Almqvist C, Lijia G, et al. Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114(4): 755-760.
- [15] Siltanen, M, Kajosaari M, Poussa T, et al. A dual long-term effect of breastfeeding on atopy in relation to heredity in children at 4 years of age. Allergy, 2003, 58(6): 524-530.
- [16] Prescott SL, Smith P, Tang M, et al. The importance of early complementary feeding in the development of oral tolerance: concerns and controversies. Pediatr Allergy Immunol, 2008, 19(5): 375-380.

(收稿日期: 2013-06-06)

(本文编辑: 段 慧)