

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000283

广东潮州地区新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症
基因突变分析詹小芬¹, 杨 辉¹, 杨惠钿¹, 陆志为², 陈江涛³, 郑淑妍¹, 林 敏¹, 杨立业¹(1. 南方医科大学附属潮州市中心医院检验中心, 潮州 521000; 2. 潮州市公安局法医鉴定中心, 潮州 521000;
3. 惠州市中心人民医院检验科, 惠州 516001)

【摘要】目的:了解潮州地区新生儿的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD)缺乏症的发病率及基因突变特点。**方法:**采用荧光斑点法对 2010 至 2012 年潮州市中心医院出生的 2 500 例新生儿进行 G6PD 缺乏筛查。对初筛阳性的 67 例标本用高分辨熔解曲线分析技术(high-resolution melting, HRM)和 PCR-DNA 测序法进行基因分型。**结果:**本次筛查发现潮州地区新生儿人群的 G6PD 缺乏症总发生率为 2.6%(67/2 500), 其中男婴 44 例(3.22%, 44/1 365), 女婴 23 例(2.03%, 23/1 135), 男女检出率比为 1.91:1(44/23), 两者之间无统计学差异($\chi^2=3.404, P=0.065$)。67 例初筛阳性标本中 58 例检测出有突变, 9 例未检出突变, 共检出 7 种基因突变, 含 26 例 1 376 G>T(c.1466G>T, 44.83%), 22 例 1 388 G>A(c.1478G>A, 37.94%), 5 例 95 A>G(c.185A>G, 8.62%), 2 例 871 G>A(c.961G>A, 3.45%), 1 例 392 G>T(c.482G>T, 1.72%), 1 例 493 A>G(c.583A>G, 1.72%), 1 例 1360 C>T(c.1450C>T, 1.72%), 没有检出复合突变类型。**结论:**潮州地区具有较高的 G6PD 发生率。G6PD Canton(1376 G>T)、G6PD Kaiping(1388 G>A)和 G6PD Gaohe(95 A>G)3 种突变类型最常见。

【关键词】葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症; 新生儿筛查; 基因突变; 高分辨熔解曲线; DNA 测序

【中图分类号】R446.11

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-07-17

Genotyping analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency
in neonates of Chaozhou area of Guangdong provinceZhan Xiaofen¹, Yang Hui¹, Yang Huitian¹, Lu Zhiwei², Chen Jiangtao³, Zheng Shuyan¹, Lin Min¹, Yang Liye¹(1. Laboratory Center, Chaozhou Central Hospital, Southern Medical University; 2. Verification Centre of Forensic
Medicine, Chaozhou Public Security Bureau; 3. Department of Laboratory, Huizhou Central Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the prevalence and genotypic mutant characteristics of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD) deficiency in neonates of Chaozhou area. **Methods:** A total of 2 500 neonates born in Chaozhou Central Hospital were screened for G6PD deficiency by inflorescent spot test (FST). Then, all positive screening samples were subjected to genotype through high-resolution melting assay or DNA sequencing. **Results:** The prevalence of G6PD deficiency in Chaozhou was 2.6%(67/2 500). Of the 67 infants suspected to be G6PD deficiency based on FST, 44 (3.22%, 44/1 365) were males and 23 (2.03%, 23/1 135) were females. The detected ratio of male and female was 1.91:1 without statistical differences ($\chi^2=3.404, P=0.065$). Among these 67 positive screening samples based on FST, 58 had gene mutation; 7 kinds of mutation were found including 26 cases of 1376 G>T (c.1466G>T, 44.83%), 22 cases of 1 388 G>A (c.1478 G>A, 37.94%), 5 cases of 95 A>G (c.185A>G, 8.62%), 2 cases of 871 G>A (c.961G>A, 3.45%), 1 case of 392 G>T (c.482G>T, 1.72%), 1 case of 493 A>G (c.583A>G, 1.72%) and 1 case of 1360 C>T (c.1450C>T, 1.72%). **Conclusion:** The incidence of G6PD deficiency is high in Chaozhou area. More male infants are detected with G6PD deficiency than females. G6PD Canton (1376 G>T), G6PD Kaiping (1388 G>A) and G6PD Gaohe (95 A>G) are the three most common variants in this area.

【Key words】 glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; neonate screening; genotypic mutant; high resolution melting analysis; DNA sequencing

作者介绍: 詹小芬, Email: konfutea@hotmail.com,

研究方向: G6PD 缺乏症及高分辨熔解曲线技术。

通信作者: 杨立业, Email: yangleeyee@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81101329); 广东省社会发展计划项目(编号: 2011B031800329); 广东省医学科研基金项目(编号: B2013444, A2011758); 中国博士后科学基金(编号: 2013M542195)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000283.html>

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD) 缺乏症, 又称蚕豆病, 是由于 G6PD 基因发生突变而引起的一种 X 连锁不完全显性遗传性溶血性酶缺陷疾病。大部分人终生没有任何临床症状, 在某些诱因的作用下, 如食蚕豆或某些药物及感染时发病, 临床表现以急性溶血性贫血及由此所致的高胆红素血症为主, 新生儿期发病, 易引起核黄疸, 造成智力低下, 此病呈全球性分布, 各民族和地区分布有差异^[1-2]。在我国主要分布在长江流域以南各省, 广东省是 G6PD 缺乏症高发区^[3], 已将 G6PD 筛查列入新生儿疾病筛查的项目。潮州市属于广东的东部地区, 东部与福建接壤, 户籍人口 254.06 万 (六普), 是 G6PD 缺乏症的高发区域。本地居住的潮州人是闽南民系的一支, 是福建移民与本地原住民的融合混合群体。我院自 2010 年 10 月开展新生儿疾病筛查, 现对 G6PD 筛查结果做一汇总。

1 资料与方法

1.1 筛查对象

采集 2010 年 10 月至 2012 年 5 月在潮州市中心医院出生的活产新生儿或儿科住院新生儿共 2 500 例, 其中男性 1 365 名, 女性 1 135 名, 男女比例为 1.2:1。95% 以上的新生儿为本地潮州人。

1.2 筛查标本的采集

对出生 72 h 后的新生儿, 根据《广东省新生儿疾病筛查管理办法》^[4]要求, 用 Whatman 903 滤纸采集足跟内侧或外侧血制备血斑, 自然晾干后保存于 4 ℃, 1 周内进行 G6PD 缺乏的检测。

1.3 筛查方法

1.3.1 G6PD 荧光斑点定性试验 采用 G6PD 荧光斑点法试剂盒 (广州米基公司, 广州) 进行 G6PD 活性筛查, 严格按照试剂说明进行操作。步骤如下: (1) 用 620 型细胞打孔器在滤纸干血片上打一直径 3 mm 的小血片于空白微量板中, 同时设定阴、阳对照孔; 加入荧光反应试剂 120 μ l/孔, 于 Shaker HT 恒温振荡器 37 ℃ 恒温 900 r/min 振幅振动 30 min 后, 去纸片再振荡 1 min, 用芬兰雷勃 Ascent 荧光读数仪读取荧光数值, 并吸取 5 μ l/孔反应液滴于滤纸上, 立即用风筒 (低档凉风) 吹干; 将滤纸置紫外分析仪观察荧光强度。 (2) 结果判断标准如下: 活性正常者: 10 min 内出现强荧光; 中度缺乏者: 10~30 min 出现荧光; 重度缺乏或完全缺乏: 30 min 不出现荧光^[5]。

1.3.2 G6PD/6PCG 比值法确诊试验 (1) 操作: 凡初筛结果阳性 (G6PD 缺乏者) 均召回采集抗凝全血, 采用改良 G6PD 定量比值法试剂 (广州米基公司, 广州) 严格按照说明书操作。

(2) 结果判断标准为: G6PD/6PCG 比值等于 1.0~2.3 为正常; G6PD/6PCG 比值 < 1.0 为 G6PD 缺乏^[6]。

1.4 基因分型

1.4.1 DNA 提取 对 G6PD 荧光斑点定性试验和 G6PD 定量比值法确诊为 G6PD 缺乏的血斑标本提取 DNA, 利用自配 10% 的 Chelex-100 提取人基因组 DNA, 首先剪切 0.5 $\times$ 0.5 cm 滤纸血斑, 加 500 μ l 去离子蒸馏水, 震荡 30 s, 然后静置 0.5 h 以上。接着震荡后用 13 600 r/min 离心 4 min, 弃上清。加 160 μ l 的 10% 浓度的 Chelex-100, 振荡后用 56 ℃ 孵育 2 h, 接着 98 ℃ 变性 8 min, 振荡 30 s, 13 500 r/min 离心 1 min, 然后放置于冰箱 4 ℃ 冷却 0.5 h 以上, 备用。

1.4.2 基因分型流程 采用本实验室以往建立的方法对所有的样本都经 11、12 号外显子进行基因测序, 将 G6PD Canton (1376 G>T, c.1466 G>T) 和 G6PD Kaiping (1388 G>A, c.1478 G>A) 2 种常见的基因突变类型筛选出来, 扩增引物及扩增片段见以往发表文献^[7]。对没筛查出这 2 种突变类型的标本采用高分辨熔解曲线分析技术 (high-resolution melting, HRM) 法检测 2~10 号外显子中中国人常见的其他突变类型 [95 A>G (c.185 A>G)、392 G>T (c.482 G>T)、493 A>G (c.583 A>G)、871 G>A (c.961 G>A)、1360 C>T (c.1450 C>T)]。最后对 HRM 法仍未检出突变的阳性样本进行所有编码外显子和外显子-内含子接合区基因测序, 方法均按照本实验室文献^[8]。

1.5 统计分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 卡方检验用于率的比较, 采用 Hardy-Weinberg 公式用于人群基因频率的分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 广东潮州地区 G6PD 缺乏症发生率与性别的关系

潮州地区 G6PD 缺乏症发生率与性别的关系见表 1。

表 1 新生儿 G6PD 缺乏症检出率与性别的关系

Tab.1 Relationship between gender and detection rate of neonate G6PD deficiency

性别	检测人数 (n)	G6PD 缺乏 人数 (n)	发生率 (%)	χ^2 值	P 值
男性	1 365	44	3.22	3.404	0.065
女性	1 135	23	2.03		
合计	2 500	67	2.60		

在 2 500 例 (男 1 365 例, 女 1 135 例) 受检者中, 检出 G6PD 缺乏的共 67 例 (男 44 例, 女 23 例), 总发生率为 2.6%。其中, 男女发生率分别为 3.22% (44/1 365) 和 2.03% (23/1 135), 男女发生率之间无统计学意义 ($\chi^2=3.404$, $P=0.065$)。

2.2 潮州地区与其他城市新生儿 G6PD 缺乏症发生率比较

潮州地区与其他城市新生儿 G6PD 缺乏症发生率比较见表 2。

表 2 潮州地区新生儿 G6PD 缺乏症发生率与其他城市的比较

Tab.2 Comparison of G6PD deficiency incidence between Chaozhou city and other cities in China

地 区	调查总人数 (n)	G6PD 缺乏人数 (n)	发生率 (%)	χ^2 值	P 值
潮州	2 500	67	2.60		
广州 ^[8]	11 437	420	3.70	5.990	0.014 ^a
佛山 ^[9]	8 057	373	4.60	18.155	0.000 ^a
梅州 ^[4]	1 450	103	7.10	43.600	0.000 ^a
梧州 ^[10]	3 235	352	10.88	140.049	0.000 ^a
南昌 ^[5]	10 792	129	1.20	30.796	0.000 ^a
上海 ^[7]	5 020	39	0.78	43.494	0.000 ^a
长沙 ^[7]	18 612	168	0.90	63.252	0.000 ^a
福建 ^[11]	2 510	72	2.86	0.165	0.685

注:a,与潮州地区存在统计学差异

经统计学分析,南方地区新生儿 G6PD 缺乏明显高于北方地区,潮州地区是 G6PD 缺乏症临界高发区。将数据与其他城市比较,除与福建省数据比较无统计学差异之外,与其他地区相比结果均有统计学意义。

2.3 HRM 检测与基因测序结果分析

67 例(男 44 例,女 23 例)样本经 HRM 分析和基因测序检测发现,存在 G6PD 基因突变的样本有 58 例(男 41 例,女 17 例),占 86.6%。样本共检出 7 种 G6PD 基因点突变(95 A>G,392 G>T,493 A>G,871 G>A,1360 C>T,1376 G>T,1388 G>A)(表 3)。本地区新生儿最常见的基因型为 1376 G>T(44.83%,26/58)和 1388 G>A(37.94%,22/58),2 种突变占所有病例总数的 75%以上,其次是 95 A>G、871 G>A、392 G>T、493 A>G 和 1360 C>T,未检测到双重杂合子。基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2=0.012$, $P=0.73$),说明群体基因平衡,数据来自同一蒙德尔群体。

表 3 58 例新生儿 G6PD 缺乏症患者基因型结果

Tab.3 Genotype results of 58 neonates with G6PD deficiency

突变类型	男性半合子 (n)	女性杂合子 (n)	合计	%
95 A>G(c.185 A>G)	3	2	5	8.62
392 G>T(c.482 G>T)	1	0	1	1.72
493 A>G(c.583 A>G)	0	1	1	1.72
871 G>A(c.961 G>A)	2	0	2	3.45
1360 C>T(c.1450 C>T)	1	0	1	1.72
1376 G>T(c.1466 G>T)	20	6	26	44.83
1388 G>A(c.1478 G>A)	14	8	22	37.94
总计	41	17	58	100.00

此外,还有 9 例(女 6 例,男 3 例)样本未检测到基因突变,可能含有中国人常见突变以外的其他稀有突变或新突变,为此针对这 9 例样本进行 2-12 外显子和外显子-内含子接合区进行基因序列测定,与人 G6PD 基因序列(GenBank: NC_000023.10)进行比对,未发现突变。

3 讨 论

G6PD 缺乏症是最常见的红细胞酶病,由红细胞内磷酸戊糖旁路的遗传性缺陷造成^[5]。G6PD 缺乏症目前尚无根治方法,一旦发病,只能对症治疗。所以及早筛查、采取预防措施,控制诱因,减少该病的发生是很有必要的。据统计,全球约有 4 亿人受累,我国华南及西南各省较常见,主要分布在热带和亚热带,我国的南方地区是高发区,尤其是广西、广东、云南、福建等省^[6]。我国各地发生率报道不一,呈现由南向北逐渐减低的趋势^[4,7-12]。潮州地区是 G6PD 缺乏症临界高发区,明显高于北方城市,但低于高发生率的广西^[9]。与广东省其他地区相比,潮州的 G6PD 发生率也是相对低的^[13]。但潮州地区与福建省的数据不存在统计学差异,这可能是因为潮汕人群和福建人群均属于闽南语系的人群,从基因源流上具有很高的相似性。

本次研究的 G6PD 基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。潮州地区新生儿男性 G6PD 缺乏率为 3.22%,基因频率为 0.032。根据男性的基因频率对女性的纯合子和杂合子的基因频率进行估算如下:女性纯合子估计值 $P^2=(0.032)^2=0.001$,女性杂合子估计 $2pq=2 \times 0.032 \times (1-0.032)=0.062$ 。根据此计算结果可以发现,相对于 0.062 的女性理论检出率,实验中的 0.020 的检出率,肯定有相当大一部分的杂合子发生漏检。导致这部分女性杂合子漏检的原因可能是由于这个方法敏感性不足^[12]。G6PD 缺乏症为 X 连锁不完全显性遗传,男性只有 1 条 X 染色体,一旦这唯一的染色体发生 G6PD 基因突变,则表现为酶活性显著缺乏;女性有 2 条 X 染色体,若 2 条 X 染色体均有基因缺陷,则为纯合子,表现为严重缺乏,如果只有 1 条 X 染色体发生 G6PD 基因突变,则为杂合子,杂合子酶活性可呈不同程度缺乏,一部分女性杂合子虽有基因缺陷,但对表型无影响,G6PD 活性可完全正常。G6PD 缺乏率只代表有表现型的发生率,所以杂合子检出率较低,与男性相比女性 G6PD 缺乏症发病率偏低。因此,G6PD 基因型的确定有助于 G6PD 缺乏症的明确诊断,尤其是酶活性差异很大的女性杂合子。

HRM 是近年来国外兴起的一种用于突变扫描和基因分型的新技术^[14]。其检测原理是根据不同的熔解温度与荧光强度形成的曲线来判断突变类型,具有高通量、高速度、更经济、方便的特点^[15]。由于

HRM技术存在以上优势,结合基因测序法,对 67 例新生儿 G6PD 缺乏症样本共检测出 58 例有基因突变。共发现 7 种 G6PD 基因突变类型,以 1376 G>T、1388 G>A、95 A>G 这 3 种突变为主,与以往研究结果一致^[16]。大量研究发现 G6PD Canton(1376 G>T)、G6PD Kaiping(1388 G>A)和 G6PD Gaohe(95 A>G)是中国人中最常见的 3 种 G6PD 基因突变类型,且仅在华人中存在,世界其他各民族未见报道。58 例 G6PD 缺乏症中 1376 G>T(26/58, 44.83%)、1388 G>A(22/58, 37.94%)、95 A>G(5/58, 8.62%) 3 种突变分别位于前 3 位,与国内的报道基本一致^[17]。以往研究报道广东、福建以 1376 G>T 突变为主相同,而与云南、重庆以 1388 G>A 突变为主不同^[17]。此外还有 9 例样本未检测到 G6PD 基因突变,针对这 9 例样本对 2-12 编码外显子和外显子-内含子接合区进行序列测定,并与 GenBank 中人 G6PD 基因序列进行比对,没有发现突变。可能的原因有:(1)因为本研究中新生儿筛查设定的 G6PD 活性定性和定量检测法切断值较高,导致部分 G6PD 活性正常的病人被归入到 G6PD 缺乏组;(2)血斑没有渗透反面,导致部分 G6PD 活性正常的误认为存在缺乏;(3)有些特殊的突变位于非编码区如启动甲基化等或其他发病机制等^[18-19]。

潮州地区位于广东的东部,东接福建,北连梅州,是 G6PD 缺乏症的临界高发区,在新生儿早期开展 G6PD 缺乏症的筛查,可积极预防由于 G6PD 缺乏而引起的一系列疾病的发生,有效保护新生儿健康。随着分子诊断学的发展,G6PD 基因型的确定有助于临床对 G6PD 缺乏症的明确诊断,能提高人口素质和健康,促进优生优育工作。

参 考 文 献

- [1] Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association[J]. Blood Rev, 2007, 21(5): 267-283.
- [2] Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, et al. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy[J]. Adv Parasitol, 2013(81): 133-201.
- [3] Du CS, Xu YK, Hua XY, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants and their frequency in Guangdong, China[J]. Hum Genet, 1988, 80(4): 385-388.
- [4] Pan M, Lin M, Yang LY, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations detection by improved high-resolution DNA melting assay[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(4): 3073-3082.
- [5] 徐小兰, 王 枫, 杨 蓉, 等. 南昌地区 10 792 例新生儿 G6PD 缺乏症筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(8): 85-85, 92.
- [6] 顾学范. 新生儿代谢性疾病筛查[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 119-123.
- [7] 许洪平, 王燕敏, 田国力. 上海市新生儿葡萄糖 6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查[J]. 上海预防医学, 2008, 20(6): 285-286.
- [8] 江剑辉, 李 蓓, 曹伟锋, 等. 广州市 125 万新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查和防治[J]. 广东医学, 2009, 30(9): 1219-1221.
- [9] 欧阳云英, 刘海平. 佛山市新生儿 PKU、CH、G6PD 缺乏症筛查结果的分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(1): 74-75.
- [10] 余永雄, 陈 唯, 陈 洁, 等. 梧州市新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(16): 1970-1971.
- [11] 苏跃青, 朱文斌, 王 旌, 等. 福建省 G6PD 缺乏症调查结果分析[C]. 中华医学会第八次全国检验医学学术会议暨中华医学会检验分会成立 30 周年庆典大会资料汇编, 2009.
- [12] 蔡若莲, 沈亦遼, 杨桂香, 等. 广东地区新生儿红细胞 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏的调查[J]. 新生儿科杂志, 1988, (1): 16-18.
- [13] Reclos GJ, Hatzidakis CJ, Schulpis KH. Glucose-6-phosphate dehydrogenate deficiency neonatal screening: preliminary evidence that a high percentage of partially deficient female neonates are missed during routine screening[J]. J Med Screen, 2000, 7(1): 46-51.
- [14] Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics[J]. Pharmacogenomics, 2007, 8(6): 597-608.
- [15] Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. Clin Chem, 2003, 49(3): 396-406.
- [16] 刘家明, 卢桂森. 我国少数民族 G6PD 缺乏症基因突变的研究[J]. 华夏医学, 2001, 4(4): 560-562.
- [17] 徐 芸, 罗建明. 我国 G6PD 缺乏症基因突变的研究现状[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2009, 14(3): 143-145.
- [18] Wu Y, Zhang Y, Zhang J. Distribution of exonic splicing enhancer elements in human genes[J]. Genomics, 2005, 86(3): 329-336.
- [19] Amini F, Ismail E. 3'-UTR variations and G6PD deficiency[J]. J Hum Genet, 2013, 58(4): 189-194.

(责任编辑: 冉明会)