

2);179-185.

[21] John S. Tzartos, Manuel A, Craner MJ, et al. Friese, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis [J]. *Neurobiology*, 2008, 172(1):146-155.

[22] Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(2):246-251.

[23] Longhi MS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis[J]. *J Autoimmun*, 2010, 34(1):7-14.

[24] Wang D, Zhang H, Liang J, et al. CD4⁺ CD25⁺ but not CD4⁺ Foxp3⁺ T cells as a regulatory subset in primary biliary cirrhosis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(6):485-490.

[25] Fenoglio D, Bernuzzi F, Battaglia F, et al. Th17 and regulatory T lymphocytes in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis as models of autoimmune fibrotic diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2012, 23(2):125.

[26] Yang XO, Chang SH, Park H, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(5):1063-1075.

[27] O'Connor. W, Kamanaka M, Booth CJ, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(6):603-609.

[28] Ivaylo II, Frutos Rde L, Manel N, et al. Specificmicrobiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine[J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(4):337-349.

[29] Ma HL, Liang S, Li J, et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(2):597-607.

[30] Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(5):1207-1211.

[31] Yang J, Chu Y, Yang X, Gao D, et al. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(5):1472-1483.

[32] Xing Q, Wang B, Su H, et al. Elevated Th17 cells are accompanied by FoxP3⁺ Treg cells decrease in patients with lupus nephritis. *Rheumatol Int*, 2012, 32(4):949-958.

[33] Ana Henriques, Luis Inês, et al. Th17 cells in systemic lupus erythematosus share functional features with Th17 cells from normal bone marrow and peripheral tissues[J]. *Clin Rheumatol*, 2012, 31(3):483-491.

(收稿日期:2012-06-19)

• 综 述 •

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的分子机制及诊断方法研究进展*

蒋 明¹综述, 侯家兴¹, 陈丕绩¹, 李春龙²审校

(1. 深圳市第七人民医院检验科, 广东深圳 518081; 2. 深圳市盐田区妇幼保健院检验科, 广东深圳 518081)

关键词: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 基因; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)23-2894-03

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)是催化 6-磷酸葡萄糖脱氢, 以维持抗氧化物质谷胱甘肽(GSH)的还原性, 清除细胞内过氧化物的毒性, 保护血红蛋白及细胞膜巯基蛋白, 而维持红细胞结构和功能的稳定。G6PD 缺乏症是全球最常见的 X 连锁不完全显性遗传性酶缺陷综合征, 俗称蚕豆病, 全球约 4 亿人受累, 患者在食用蚕豆、服用氧化性药物和感染等情况下, 血红蛋白氧化变性, 红细胞破坏而导致溶血^[1]。中国南方地区为此病高发区。现对 G6PD 缺乏症的临床症状、人群分布、发病机制以及诊断方法等综述如下。

1 G6PD 缺乏症的人群分布与临床表现

1.1 G6PD 缺乏症的人群分布 目前认为 G6PD 缺乏症是疟疾自然选择的结果^[2], 主要分布在热带、中东、东南亚、南美、地中海沿岸和我国南方地区, 发病率为 5%~25%, 推测全球约 3.3 亿人受累^[3-4]。在中国, 同一民族不同地区基因频率有明显差别, 同一地区不同民族反而相差不大, 呈“南高北低”的分布趋势, 华南及西南各省(广东、广西、云南及四川)等地为高发区, 北方地区少见^[5]。

1.2 G6PD 缺乏症的临床表现 G6PD 缺乏症的临床表现多样且变化大, 从无症状到新生儿黄疸、药物性溶血、感染造成的急性溶血等, 严重者导致新生儿期重症黄疸, 造成死亡或永久性神经损伤; 甚至有报道新生儿输入 G6PD 缺乏的血液后发生

输血反应, 这提示对于特定人群如新生儿输血时有必要进行血液筛选^[6]。由于此病大多数平时可无临床症状, 早期诊断和早期干预对于该病的预防和控制非常重要, 若采取必要的预防措施, G6PD 缺乏症的临床表现严重程度可大大降低或阻止。

2 G6PD 缺乏症的分子机制

2.1 基因突变与表型 G6PD 缺乏症属 X 连锁不完全显性遗传病, 目前全世界已报道了 180 多种 G6PD 基因突变类型^[7], 绝大多数为单碱基置换错义突变的氨基酸置换, 从而导致酶结构域活性中心改变, 或酶蛋白空间结构改变, 使 G6PD 酶活性降低。突变类型的分布具有种族地区异质性, 迄今为止在中国人群中发现的突变有 33 种, 其中 1388G>A、1376G>T 和 95A>G 是最常见的突变类型。人群中 G6PD 基因型有 5 种: 男性只有 1 条 X 染色体(又称为半合子), 可根据是否携带 G6PD 突变基因而分为正常基因型和 G6PD 缺陷患者; 女性则根据两条 X 染色体是否携带突变基因而分为正常基因型、杂合子、突变纯合子。突变纯合子女性为 G6PD 缺陷患者; 杂合子女性为突变基因携带者, 但由于存在 X 染色体随机失活现象(Lyon 假说), G6PD 缺乏与正常的红细胞呈一定比例的嵌合状态, 不同个体嵌合比例不同而 G6PD 酶缺陷的程度也不同, 相关的研究结果显示, 10%左右的女性杂合子具有 G6PD 缺乏症状, 同时 10%左右的女性杂合子则无 G6PD 缺乏症状,

* 基金项目: 盐田区科技计划资助项目(201111)。

因此,女性杂合子人群的 G6PD 酶的活性变化范围大而难于根据酶活性进行准确诊断。

2.2 基因调控

2.2.1 DNA 甲基化对 G6PD 基因表达调控

启动子区 CpG 岛甲基化对基因表达调控有着举足轻重的作用^[8]。G6PD 基因是一典型的看家基因,其启动子区域是一个大的 CpG 岛,关于此区域甲基化的研究结果显示:未失活的 X 染色体上 G6PD 基因 5' 端启动子区域 CpG 位点未或低甲基化,而失活的 X 染色体上则是高甲基化^[9]。由于 X 染色体失活是导致女性杂合子 G6PD 酶表达差异的关键,可以推测 G6PD 基因中部分位点的甲基化影响 G6PD 缺乏症表型,甚至可以通过分析个体的 G6PD 基因甲基化程度判断其 G6PD 酶表达状况。

2.2.2 转录调节因子对 G6PD 基因表达调控

有研究证明,花生四烯酸通过 p38 丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)使胰岛素受体底物-1(IRS-1)的 307 位丝氨酸的磷酸化,抑制胰岛素激活的磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)通路,同时抑制了 G6PD 基因的表达^[10]。也有学者也提出,花生四烯酸依赖 p38 MAPK 激活 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)可减少胰岛素的信号传导,而抑制 G6PD 和其他脂类生成酶的表达^[11]。由此可见,脂质代谢紊乱等因素所导致的转录调节变化,直接或间接影响了 G6PD 酶的表达,从而使 G6PD 酶缺乏的程度也发生变化,同时也提示通过控制饮食和使用药物等改善转录因子的表达可以提高 G6PD 酶的表达而减轻患者的症状。

2.2.3 外显子剪接对 G6PD 基因表达调控

外显子剪接增强子是基因进行有效剪切为可缺少的 DNA 基序,如果点突变导致此基序的改变,剪切复合体无法正常形成,进而影响 RNA 的剪接、蛋白表达;外显子剪接沉默子则抑制前体 mRNA 的剪接,对成熟 mRNA 的表达进行调控。研究发现,G6PD mRNA 剪接调节的 RNA 顺式作用元件位于外显子 12 的第 43-72 位核苷酸,并且多以外显子剪接沉默子方式参与 G6PD mRNA 剪接的抑制^[12]。有学者在动物实验中发现多不饱和脂肪酸可激活剪接沉默子而减少 G6PD 基因前体 mRNA 的表达。由此可见,当食用多不饱和脂肪酸类食物时,如果外显子 12 的剪接沉默子区段发生变异,那么 G6PD 患者的临床症状不会变化,同时也提示,可以通过基因修饰,如剪接沉默子的失活等,而改善患者的临床症状。

2.3 G6PD 缺乏与其他疾病的关系

2.3.1 疟疾与 G6PD 缺乏症

疟疾仍然是全球最流行的寄生虫病之一,人类在进化过程中,产生了几个抗疟疾的遗传改变,G6PD 缺乏症即是其中之一,但是严重的 G6PD 缺乏症使疟疾的发病更加复杂化,氧化性药物伯氨喹或氨苯砜的治疗会导致致命的急性血管内溶血,而发展成严重贫血和急性肾衰竭^[13]。所以,在应用此类药物治疗疟疾时,必须进行 G6PD 缺乏症的筛查。

2.3.2 高铁血红蛋白血症与 G6PD 缺乏症

高铁血红蛋白血症主要是由于氧化剂类毒物等使红细胞内血红蛋白的氧化作用超过细胞内抗氧化和还原能力,血中高铁血红蛋白迅速增多,这与 G6PD 缺乏症临床表现产生的病理生理基本一致。相关的病例报道显示,G6PD 缺乏症患者伴随有高铁血红蛋白血症,而高铁血红蛋白血症患者不一定均为 G6PD 缺乏症^[14]。对于严重高铁血红蛋白血症的治疗,首选治疗方式是亚甲蓝,然而,如为 G6PD 患者用,氧化性药物亚甲蓝不但无效,且可引起急性溶血^[15]。所以,治疗高铁血红蛋白血症之前,进行准确诊断非常重要。

2.3.3 地中海贫血(地贫)与 G6PD 缺乏症

地贫合并 G6PD 缺陷症的情况下,由 G6PD 缺陷导致的慢性溶血使骨髓红系增生,一定数量新生红细胞被释放到外周血中,且由于新生红细胞的体积较外周血中存在的成熟红细胞要大,这正好中和了小细胞低色素的地贫表型,所以在日常工作中,如果遇到 G6PD 缺陷症个体,其各项红细胞参数均正常的情况下,仍需进一步检测其地贫基因以免漏检;另外,如果遇到各项红细胞参数均正常的地贫杂合子,也须进一步检测 G6PD 酶缺陷。

有研究显示^[16],地贫个体的 G6PD 活性均有不同程度增高,轻型 α 地贫是正常值的 1.5 倍;轻型 β 及 α 复合 β 地贫是正常的两倍左右,血红蛋白 H 病是正常的 2 到 3 倍,重型 β 地贫是正常的 3 倍以上。这很可能是由于地贫患者体内慢性溶血所至新生 RBC 增多导致 G6PD 活性增高之故,因此,根据酶活性进行 G6PD 缺乏症临床诊断时,须考虑是否合并地贫而避免假阴性漏检。

2.3.4 其他相关疾病

G6PD 缺乏是糖尿病的危险因素,两因素相互作用而加重病情^[17]。还有研究显示 G6PD 的超表达与胃癌进展紧密相关,可能是胃癌预后不良的预测因子^[18];由于 G6PD 的抗氧化作用所以与衰老有关,同时也是退化性疾病的危险因素^[19];此外,还有学者研究也证实了 G6PD 缺乏与心脏病相关^[20]。

3 G6PD 缺乏症的实验室诊断

3.1 表型分析

目前常用的方法是 G6PD 酶活性检测,包括高铁血红蛋白还原试验、荧光斑点试验、硝基四氮唑蓝(NBT)定量法、G6PD/6PGD 比值法等,这些均属于表型分析。然而,这种基于 G6PD 酶活性的测定方法,只是用($\bar{x} \pm s$)表明该种方法的参考值,没有对正常、中度缺乏和显著缺乏划分出明确的界限值;并且 G6PD 缺乏杂合子的酶活性可以表现正常,中度缺乏或显著缺乏。正是由于这种表型与基因型之间的明显不一致,使得女性杂合子个体的准确诊断相当困难。国内外早就证实 G6PD 缺乏杂合子可以发病,而且最近的前瞻性研究表明 G6PD 杂合子发生新生儿高胆红素血症的危险要显著高于 G6PD 正常纯合子,而且相对危险度达到了 2.26。这就说明 G6PD 缺乏杂合子是新生儿高胆红素血症发生的独立危险因素之一,通常使用的表型筛查方法很难在人群中有效检出杂合子,而女性杂合子有可能发展为有症状 G6PD 缺陷的可能。

3.2 基因诊断

G6PD 突变携带者的表型变化大,但不影响其基因突变的检测。目前 G6PD 基因检测方法主要有等位基因特异性寡核苷酸探针杂交法(ASO)、PCR 限制性内切酶分析、等位基因特异性扩增(ARMS)、单链构象多态性分(SS-CP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、直接测序法等检测已知突变。这些方法各有各的优点,但是也存在一些局限性。ASO 探针斑点杂交法虽然简单易行,但若杂交或洗脱的条件控制不好则经常出现假阴性或假阳性;PCR 限制性内切酶分析的特异性虽高,但方法繁琐,且其筛查突变时常出现酶切不全的现象;ARMS 是比较简单的方法,不需要同位素标记,但扩增条件难于控制、检测通量小且只能检测已知突变;SSCP 和 DGGE 都需要铺置凝胶、电泳、显色等步骤,耗时长,且有假阴性和假阳性现象。

随着分子诊断技术的不断发展,更多的检测方法应用于 G6PD 基因突变的检测。变性高效液相色谱(DHPLC) G6PD 基因突变筛查方法,具有高度灵敏性特异性、高效性和准确性并且相对经济、半自动化等优点^[8,21],但需相应的仪器设备。Zhao 等^[22]运用了飞行时间质谱分析技术对中国人最常见的 6

种 G6PD 基因突变进行检测,为 G6PD 缺乏症的诊断提供了一个新的手段。此外,也有学者采用微阵列技术对中国人 12 种 G6PD 基因突变进行检测^[23]。Yan 等^[24]运用高分辨率熔解曲线(HRM)对 G6PD 基因进行未知突变检测,此项技术有一定的优越性与易操作性。Farez-Vidal 等^[25]运用毛细管电泳技术对 15 种常见 G6PD 基因突变位点进行检测,这种方法准确度高、快速灵敏,易于实现自动化。

4 展 望

G6PD 缺乏症是我国华南地区最常见的遗传性溶血性疾病,是蚕豆病、伯喹类药物性溶血、新生儿溶血及某些感染性溶血疾病的遗传基础,其中 G6PD 缺乏导致的新生儿黄疸可造成核黄疸死亡或智力低下,对提高我国人口素质极为不利。有关此病分子机制的深入研究,有助于指导临床干预与治疗。由于 G6PD 缺乏症没有根治的方法,开展孕妇产前以及新生儿筛查,及早采取预防和治疗措施,具有重要的现实意义。简单快速、准确灵敏、低成本、易于实现自动化和标准化的 G6PD 缺乏症检测技术和诊断方法,是实现有效干预及控制的技术支撑前提。

参考文献

[1] 程正江,田兴亚,余果宇. G6PD 缺乏患者红细胞膜蛋白质的改变[J]. 中华血液学杂志,2001,22(4):211-212.

[2] Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria [J]. J Mol Med, 1998, 76(8): 581-588.

[3] Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, et al. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis[J]. Blood Cells Mol Dis, 2009, 42(3):267-278.

[4] Al-Sweedan SA, Awwad N. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Tunisia: molecular data and phenotype-genotype association[J]. Acta Haematol, 2012, 128(4): 195-202.

[5] 杜传书. 我国葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症研究 40 年的回顾和展望[J]. 中华血液杂志, 2000, 21(4): 174.

[6] Shanthala Devi AM, Helen R, Vanamala A, et al. Screening for G6PD Deficiency in Blood Donor Population[J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2010, 26(3): 122-123.

[7] Liu WL, Li F, He ZX, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase qingzhen; Identification of a novel splice mutation (IVS5-1 G>A) [J]. Pediatr Blood Cancer, 2011, 58(5): 825-826.

[8] Garaud S, Youinou P, Renaudineau Y. DNA methylation and B-cell autoreactivity[J]. Adv Exp Med Biol, 2011, 711(1): 50-60.

[9] Huppke P, Bohlander S, Krämer N, et al. Altered methylation pattern of the G6PD promoter in Rett syndrome[J]. Neuropediatrics, 2002, 33(2): 105-108.

[10] Talukdar I, Szeszel-Fedorowicz W, Salati LM. Arachidonic acid inhibits the insulin induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase via p38 MAP kinase[J]. J Biol Chem, 2005, 280(49): 40660-40667.

[11] Kohan AB, Talukdar I, Walsh CM, et al. A role for AMPK in the inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by polyunsatur-

ated fatty acids[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(1):117-121.

[12] Szeszel-Fedorowicz W, Talukdar I, Griffith BN, et al. An exonic splicing silencer is involved in the regulated splicing of glucose 6-phosphate dehydrogenase Mrna[J]. J Biol Chem, 2006, 281(45): 34146-34158.

[13] Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2000, 13(2): 277-299.

[14] Schuurman M, van Waardenburg D, Da Costa J, et al. Severe hemolysis and methemoglobinemia following fava beans ingestion in glucose-6-phosphatase dehydrogenase deficiency-case report and literature review[J]. Eur J Pediatr, 2009, 168(7): 779-782.

[15] Wright RO, Lewander WJ, Woolf AD. Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management [J]. Ann Emerg Med, 1999, 34(5): 646-656.

[16] 陈冬, 陈和平, 梁玲, 等. G6PD 活性检测在地中海贫血诊断中的意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(1): 27-28.

[17] Carette C, Dubois-Laforgue D, Gautier JF, et al. Diabetes mellitus and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: From one crisis to another[J]. Diabetes Metab, 2011, 37(1): 79-82.

[18] Wang J, Yuan W, Chen Z, et al. Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2012, 33(1): 95-101.

[19] Cheng ML, Ho HY, Wu YH, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient cells show an increased propensity for oxidant-induced senescence[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(5): 580-591.

[20] Meloni L, Manca MR, Loddo I, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency protects against coronary heart disease[J]. J Inherit Metab Dis, 2008, 31(3): 412-417.

[21] Frueh FW, Noyer-Weidner M. The use of denaturing high-performance liquid chromatography(DHPLC) for the analysis of genetic variations; impact for diagnostics and pharmacogenetics[J]. Clin Chem Lab Med, 2003, 41(4): 452-461.

[22] Zhao F, Ou XL, Xu CC, et al. Rapid detection of six common Chinese G6PD mutations by MALDI-TOF MS[J]. Blood Cells Mol Dis, 2004, 32(2): 315-318.

[23] Bang-Ce Y, Hongqiong L, Zhensong L. Rapid detection of common Chinese glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations by microarray-based assay[J]. Am J Hematol, 2004, 6(4): 405-412.

[24] Yan JB, Xu HP, Xiong C, et al. Rapid and Reliable Detection of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Gene Mutations in Han Chinese Using High-Resolution Melting Analysis[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(3): 305-311.

[25] Farez-Vidal ME, Gandia-Pla S, Blanco S, et al. Multi-mutational analysis of fifteen common mutations of the glucose 6-phosphate dehydrogenase gene in the Mediterranean population [J]. Clin Chim Acta, 2008, 395(1/2): 94-98.