

• 临床检验研究论著 •

改良 G6PD/6PGD 比值测定与 α 、 β 地中海贫血基因诊断的相关性研究^{*}

向华国, 曾锦婷, 洪文彬, 曾思强

(深圳市宝安区福永人民医院中心实验室, 广东深圳 518103)

摘要:目的 探讨改良葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)/6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD)比值与 α 、 β 地中海贫血基因诊断的相关性。方法 利用跨越断裂点聚合酶链反应(gap-PCR)结合单管多重 PCR 以及 PCR-反向斑点杂交法(RDB)技术对 182 例孕妇分别进行 α 地中海贫血($-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ 缺失型突变)和 β 地中海贫血基因(17 种常见的点突变)检测,并将其分为 α 地中海贫血组、 β 地中海贫血组、 α 复合 β 地中海贫血组和健康对照组。利用全自动生化分析仪检测各组红细胞 G6PD/6PGD。结果 单纯 α 地中海贫血患者缺失型突变类型的构成比依次为 $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ (54.17%)、 $\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$ (20.83%)、 $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ (12.50%)、 $-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$ (8.33%)、 $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$ (4.17%)。 β 地中海贫血患者基因分布情况依次为 CD41-42-TTCT (33.33%)、CD17 A $\rightarrow$ T (20.51%)、IVS- II -654 C $\rightarrow$ T (20.51%)、-28A $\rightarrow$ G (12.82%)、CD27-28+C (5.13%)、 β E GAG $\rightarrow$ AAG (5.13%)、CD43 G $\rightarrow$ T (2.56%)。 α 地中海贫血组、 β 地中海贫血组及 α 复合 β 地中海贫血组的红细胞 G6PD/6PGD 比值分别为 1.69 ± 0.39 、 1.66 ± 0.32 及 1.70 ± 0.27 ,均显著高于健康对照组 (1.36 ± 0.26 , $P<0.05$); α 地中海贫血组、 β 地中海贫血组及 α 复合 β 地中海贫血组的 G6PD/6PGD 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 G6PD/6PGD 测定对地中海贫血初筛有一定的应用价值。

关键词:地中海贫血; 基因型; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3131-02

Correlation research of improved G6PD/6PGD ratio detection and genetic diagnosis of α 、 β -thalassemia^{*}

Xiang Huaguo, Zen Jingting, Hong Wenbin, Zen Siqiang

(Central Laboratory, Yongfu People's Hospital of Baoan, Shenzhen, Guangdong, 518103, China)

Abstract:Objective To investigate the correlation of glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)/6-phosphogluconate dehydrogenase(6PGD) ratio and genetic diagnosis of α 、 β -thalassemia. **Methods** Gap-polymerase chain reaction(gap-PCR) combined with single-tube multiplex PCR and PCR-reverse dot blot(RDB) techniques were employed to detect α thalassemia gene($-\text{SEA}$, $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$ deletion mutants) and β thalassemia gene(17 kinds of common point mutations) of 182 pregnant women which were divided into α thalassemia group, β thalassemia group, α and β thalassemia group and control group. Automatic biochemical analyzer was employed to assay G6PD/6PGD of red blood cells in each group. **Results** The constituent ratios of deletion mutation of patients with pure α thalassemia were $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ (54.17%), $\alpha\alpha/-\alpha^{4.2}$ (20.83%), $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ (12.50%), $-\text{SEA}/-\alpha^{4.2}$ (8.33%), $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$ (4.17%) in sequence. The genetic distribution of patients with β thalassemia were CD41-42-TTCT (33.33%), CD17 A $\rightarrow$ T (20.51%), IVS- II -654 C $\rightarrow$ T (20.51%), -28A $\rightarrow$ G (12.82%), CD27-28+C (5.13%), β E GAG $\rightarrow$ AAG (5.13%), CD43 G $\rightarrow$ T (2.56%) in sequence. The G6PD/6PGD ratios of red blood cells in α thalassemia group, β thalassemia group, α and β thalassemia group were 1.69 ± 0.39 , 1.66 ± 0.32 and 1.70 ± 0.27 , respectively, which were all significantly higher than that in control group (1.36 ± 0.26 , $P<0.05$). Differences of G6PD/6PGD among α thalassemia group, β thalassemia group, α and β thalassemia group showed no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** G6PD/6PGD determination has a certain application value for preliminary screening of thalassemia.

Key words: thalassemia; genotype; glucose-6-phosphate dehydrogenase; 6-phosphogluconate dehydrogenase

地中海贫血是一组常染色体隐性遗传病。它是由于珠蛋白基因突变,使珠蛋白生物合成受阻、产量不足或缺如所致,是中国长江以南各省发病率最高,影响最大的遗传病之一,广东、广西发病率尤高^[1-2]。红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)是体内参与葡萄糖无氧代谢一种氧化还原酶,主要存在于红细胞膜上,对于红细胞的稳定性具有重要作用,一旦缺乏,则可能红细胞被破坏而溶血。目前,对 G6PD 的研究主要集中在 G6PD 酶活性缺乏的研究上,较少人对 G6PD 与 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD)的比值升高进行研究。本研究利用全自动生化分析仪定量测定产前检查人群的红细胞 G6PD/6PGD,同时利用跨

跃断裂点聚合酶链反应(gap-PCR)结合单管多重 PCR 和 PCR 结合反向斑点杂交法(RDB)对其 α 、 β 地中海贫血基因进行筛查。 α 地中海贫血基因诊断检测 $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ 三种缺失型突变, β 地中海贫血基于多重 PCR-RDB 检测常见的 17 种点突变。探讨改良 G6PD/6PGD 与 α 、 β 地中海贫血基因诊断结果的相关性,从而分析其在地中海贫血的辅助诊断价值及其适且范围。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 1 月 1 日至 2013 年 1 月 31 日在本院产前门诊行优生检查的 182 例孕妇全血标本,孕妇年龄

^{*} 基金项目:深圳市科技计划项目(201202187);深圳市宝安区科技计划项目(2013126)。 作者简介:向华国(1973~),男,硕士,副主任技师,主要从事分子生物学实验诊断的临床及基础研究工作。

18~43 岁。经分子基因诊断后分为 4 组,α 地中海贫血组 48 例,β 地中海贫血组 78 例,α 复合 β 地中海贫血组 12 例,健康对照组 44 例。经过 G6PD 活性检测或家系调查无 G6PD 缺陷,各组年龄无显著性差异,具有可比性。

1.2 主要仪器与试剂 日立 7060 全自动生化分析仪购自日本日立公司。ABI Steponeplus PCR 扩增仪购自美国应用生物系统公司。HEMA G5G-2000 核酸/蛋白凝胶图像分析系统购自珠海黑马医学仪器有限公司。DYY-8C 型电泳仪为北京六一仪器厂生产。FYY-3 分子杂交仪为江苏兴化分析仪器厂生产。改良红细胞 G6PD 定量比值测定试剂盒(双通道、双试剂、速率法)由广州米基公司提供。α、β 地中海贫血基因检测试剂盒为深圳亚能生物技术有限公司产品。

1.3 DNA 提取 按深圳亚能生物公司提供的快速全血 DNA 提取试剂盒操作步骤进行,如不能及时检测用乙二胺四乙酸(EDTA)-Na₂ 抗凝的全血标本置-4℃保存待用。

1.4 基因诊断方法 利用 gap-PCR 以及多重 PCR 检测血液标本 DNA 是否带有 α 地中海贫血缺失型基因,包括——^{SEA}、—^{α^{3.7}}、—^{α^{4.2}}三种缺失型突变。并同时利用 PCR-RDB 对 β 地中海贫血 17 种常见的点突变进行检测,分别为:41-42M、654M、-28M、71-72M、17M、βEM、IVS- I -1M、27/28M、43M、-29M、31M、-32M、-30M、14-15M、CAPM、IntM、IVS-I-5M。以上操作均按试剂盒说明书进行。

1.5 改良红细胞 G6PD 定量比值测定 采用广州米基公司试剂盒,将肝素抗凝全血 50 μL 加入 1.2 mL 蒸馏水中,混匀后,20 min 内置日立 7060 全自动生化分析仪上测试。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用率表示,组间比较采用单因素方差分析,以 α=0.05 为检验水准,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 α 地中海贫血基因型分布情况 经 gap-PCR 检测,48 例单纯 α 地中海贫血育龄妇女中 α 地中海贫血缺失型突变类型的构成比依次为——^{SEA}/αα(54.17%)、αα/—^{α^{4.2}}(20.83%)、αα/—^{α^{3.7}}(12.50%)、——^{SEA}/—^{α^{4.2}}(8.33%)、——^{SEA}/—^{α^{3.7}}(4.17%)。

2.2 β 地中海贫血基因型分布情况 经 gap-PCR 检测,78 例 β 地中海贫血患者基因分布情况依次为 CD41-42-TTCT(33.33%)、CD17 A→T(20.51%)、IVS- II -654 C→T(20.51%)、-28A→G(12.82%)、CD27-28+C(5.13%)、βE GAG→AAG(5.13%)、CD43 G→T(2.56%)。α 复合 β 地中海贫血组基因型分布情况见表 1。

表 1 α 复合 β 地中海贫血组基因型分布			
α 地中海贫血 基因类型	β 地中海贫血基因突变类型		
	CD41-42-TTCT	-28A→G	CD17 A→T
—— ^{SEA} /αα	5	2	1
αα/— ^{α^{3.7}}	2	0	0
αα/— ^{α^{4.2}}	1	1	0
合计	8	3	1

2.3 不同基因型各组的改良红细胞 G6PD 定量比值比较 α 地中海贫血组、β 地中海贫血组及 α 复合 β 地中海贫血组的红

细胞 G6PD/6PGD 比值分别为 1.69±0.39、1.66±0.32 及 1.70±0.27,均显著高于健康对照组(1.36±0.26,P<0.05);α 地中海贫血组、β 地中海贫血组及 α 复合 β 地中海贫血组 G6PD/6PGD 则无统计学差异(P>0.05)。α 地中海贫血组、β 地中海贫血组及 α 复合 β 地中海贫血组 G6PD 含量明显高于健康对照组(P<0.05),而 6PGD 在各组之间的差异无统计学意义(P>0.05),见表 2。

表 2 各组 G6PD、6PGD 及 G6PD/6PGD 比值比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	G6PD (U/L)	6PGD (U/L)	G6PD/ 6PGD
健康对照组	44	3 702.7±792.5	2 752.5±540.0	1.36±0.26
α 地中海贫血组	48	4 810.8±1 260.0	2 920.8±698.6	1.69±0.39
β 地中海贫血组	78	4 634.4±1 083.1	2 830.3±565.6	1.66±0.32
α 复合 β 地中海贫血组	12	4 601.6±1 166.6	2 730.3±554.3	1.70±0.27
<i>P</i>		0.004 0	0.779 3	0.003 0

3 讨 论

地中海贫血作为广东省高发的单基因遗传性病,不仅影响到出生人口素质,特别是重型地中海贫血患儿的出生还给社会及家庭带来沉重的经济及社会负担。目前用于确诊地中海贫血的方法是分子生物学方法,中国对地中海贫血的基因诊断和产前诊断始于 20 世纪 80 年代初,先后经历了 DNA 点杂交、限制性内切酶酶谱分析、限制性片段长度多态性(RFLP)连锁分析,寡核苷酸探针杂交和 PCR 体外基因扩增等几个发展阶段,特别是 PCR 技术的不断发展和改进,已使 PCR 及其衍生物的相关技术成为目前较普遍的基因诊断方法。但分子生物学方法存在耗时长、成本高,操作较复杂等缺点,部分限制了其在临床上的应用。如何选用一些简单易行实验方法对大规模产前检查人群进行地中海贫血筛查,然后对筛查出来的重点人群再进行基因诊断显得尤为重要。目前,应用于成人地中海贫血的筛查项目,如红细胞参数平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、红细胞分布宽度(RDW)、红细胞脆性试验、血红蛋白分析以及可溶性铁蛋白受体等已广泛应用于临床^[3-4],对 G6PD/6PGD 比值测定的研究则较少。但在实际工作中,由于人红细胞戊糖代谢旁路的关键酶 G6PD 催化葡萄糖-6-磷酸转化成 6PG 时,伴有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)转化成还原型辅酶Ⅱ(NADPH),因此,测试 NADPH 的量反映了 G6PD 活性。但是单测 G6PD 活性不能排除因其他原因引起的 G6PD 活性降低,如患者贫血,标本溶血、凝血、陈旧、污染等。同时测定戊糖代谢的另一同工酶 G6P,它也有将 NADP 转化成 NADPH 的作用,目前国内尚无 6PGD 缺乏的个体报道,本研结果也表明 6PGD 含量在地中海贫血各组及健康对照组之间无统计学差异(P>0.05),相当于设置了内质控,与此同时,测定 6PGD 活性,通过测定 2 个酶的活性计算 G6PD/6PGD 的比值,能正确判断 G6PD 的实际含量变化,从而尽可能排除其他干扰因素所致的 G6PD 活性变化。

本研究利用 gap-PCR 结合单管多重 PCR 以及 PCR-RDB 进行孕妇的地中海贫血基因全套检测。结果表明,育龄妇女中 3 种 α 地中海贫血缺失型突变类型的构成比依次为——^{SEA}/αα(54.17%)、αα/—^{α^{4.2}}(20.83%)和 αα/—^{α^{3.7}}(下转第 3135 页)

物被膜的形成过程中起到非常重要的作用,后续研究中,将对这些共同表达差异的蛋白质分子进行功能验证,为细菌耐药机制研究提供理论依据和实验基础。

参考文献

[1] 龚风云,刘丽娜,邢铭友,等.表皮葡萄球菌耐药与生物膜的相关研究[J].中华医院感染学杂志,2011,21(1):20-23.

[2] Lee JY,Ko KS,Peck KR,et al. In vitro evaluation of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections caused by staphylococci[J]. J Antimicrob Chemother,2006,57(6):1110-1115.

[3] Rohde H,Frankenberger S,Zähringer U,et al. Structure,function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to Staphylococcus epidermidis biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections[J]. Eur J Cell Biol,2010,89(1):103-111.

[4] Arciola CR,Campoccia D,Gamberini S,et al. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in Staphylococcus epidermidis clinical isolates genotyped for ica locus[J]. Biomaterials,2002,23(21):4233-4239.

[5] 李敏,高谦,王建平,等.表皮葡萄球菌附属基因调节子对生物膜形成的调节作用[J].中华检验医学杂志,2005,28(11):1172-1177.

[6] He SY. Elicitation of plant hypersensitive response by bacteria[J]. Plant Physiol,1996,112(3):865-869.

[7] 蒲春霞.五倍子药理研究与临床应用进展[J].现代临床医学,2005,31(2):119-121.

[8] Olesen MS,Holst AG,Jabbari J,et al. Genetic loci on chromo-

somes 4q25,7p31,and 12p12 are associated with onset of lone atrial fibrillation before the age of 40 years[J]. Can J Cardiol,2012,28(2):191-195.

[9] Cerqueira GM,McBride AJ,Picardeau M,et al. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic Leptospira species and application of ligB to typing leptospiral isolates[J]. J Med Microbiol,2009,58(Pt 9):1173-1181.

[10] Ghelardini P,Paolozzi L,Liébart JC,et al. Ligase activity of lig-bacteria infected with mu bacteriophage at non-permissive temperatures[J]. C R Seances Acad Sci D,1979,288(2):259-262.

[11] Cogdell RJ,Fyfe PK,Barrett SJ,et al. The purple bacterial photosynthetic unit[J]. Photosynth Res,1996,48(1/2):55-63.

[12] Aseev LV,Levandovskaya AA,Tchufistova LS,et al. A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the rpsB-tsif expression in vivo[J]. RNA,2008,14(9):1882-1894.

[13] Madern D. Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family[J]. J Mol Evol,2002,54(6):825-840.

[14] Iciek M,Włodek L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur[J]. Pol J Pharmacol,2001,53(3):215-225.

[15] Landini P,Bandera M,Soffientini A,et al. Sensitivity of elongation factor Tu (EF-Tu) from different bacterial species to the antibiotics efrotomycin,pulvomycin and MDL 62879[J]. J Gen Microbiol,1993,139(4):769-774.

(收稿日期:2013-06-19)

(上接第 3132 页)

(12.50%) ;β地中海贫血居于前位的分别是:CD41-42-TTCT、CD17 A→T、IVS-Ⅱ-654 C→T、-28A→G;与中国南方地中海贫血人群分布特点相符^[5]。广东是β地中海贫血高发区,与其他地区β地中海贫血基因突变类型有所不同,且α复合β地中海贫血的情况也时常出现^[6-7]。本研究表明α地中海贫血组、β地中海贫血组及α复合β地中海贫血组的红细胞 G6PD/6PGD 的比值明显高于健康对照组,而α地中海贫血组、β地中海贫血组及α复合β地中海贫血组的 G6PD/6PGD 则无明显差异。表明红细胞 G6PD/6PGD 升高与α、β地中海贫血基因密切相关,可以作为地中海贫血诊断的辅助指标。由于 G6PD/6PGD 测定操作简单、快速,成本较低,在大规模人群中地中海贫血筛查方面具有一定的应用价值。但推测 G6PD/6PGD 比值高低与地中海贫血基因类型无关,不能作为诊断地中海贫血类型的特异性诊断方法。目前分别利用 gap-PCR 及 RDB 对缺失型和非缺失型(点突变)地中海贫血进行分子诊断是国内主流技术,其他,如基因芯片技术、实时荧光 PCR 以及能同时检测中国人常见缺失型和非缺失型的地中海贫血突变型的 RDB 技术也具有较广阔的应用前景^[8-9]。

参考文献

[1] 王辉林,郭华,熊礼宽.α地中海贫血研究进展[J].中国热带医学,

2011,11(9):1158-1160.

[2] Liao C,Zhou JY,Xie XM,et al. Screening for Hb constant spring in the Guangdong province,South China,using the sebia capillary electrophoresis system[J]. Hemoglobin,2011,35(1):87-90.

[3] 区丽群,蔡早育,崔金环,等. MCV,MCH,RDW 及红细胞脆性试验联合应用在地中海贫血诊断中的作用[J]. 中国优生与遗传杂志,2002,10(4):120-121.

[4] Jayaranee S,Sthaneshwar P. Serum soluble transferrin receptor in hypochromic microcytic anaemia[J]. Singapore Med J,2006,47(2):138-142.

[5] 钟萍,朱春江.桂林地区育龄妇女地中海贫血的流行病学调查研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,18(10):108-109.

[6] 徐葵,曾瑞萍.对 142 例β地中海贫血基因携带者进行缺失型α地中海贫血 1 基因分析[J]. 中华血液学杂志,1999,20(4):206.

[7] 张力,区小冰,余一平.广东地区β地中海贫血的基因分析与临床观察[J]. 临床血液学杂志,2008,21(1):5-8.

[8] Xiong F,Huang Q,Chen X,et al. A melting curve analysis-based PCR assay for one-step genotyping of β-thalassemia mutations a multicenter validation[J]. J Mol Diagn,2011,13(4):427-435.

[9] 周玉球.地中海贫血表型筛查和基因诊断的现状 & 展望[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(5):394-398.

(收稿日期:2013-06-08)