· 临床检验研究论著 ·

东莞地区 469 例 G6PD 缺乏症基因突变类型分析*

李文瑞,叶敏南,彭　琪,黎四平,龙健灵,何月敬,程庆秋,曾小媚,陆小梅△

(东莞市第八人民医院检验科/东莞市儿科研究所,广东东莞 523320)

摘　要:目的　了解东莞地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症的基因突变类型,为 G6PD 缺乏症的临床诊断及预防提供依据。**方法**　收集进行 G6PD 酶活性筛查的患者资料,记录其 G6PD/6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD)比值结果,随机抽取 469 例表型阳性样本,通过反向斑点杂交(RDB)技术检测其基因突变类型。**结果**　采用 G6PD/6PGD 比值法共检测 16 464 例标本,检出阳性标本 672 例(G6PD/6PGD＜1.0),检出率为 4.08%。随机抽取样本中,检出基因突变 460 例,检出率为 98.1%,其中 G1376T 突变 173 例、G1388A 突变 141 例、A95G 突变 82 例、G871A 突变 60 例、G392T 突变 23 例、C1024T 突变 14 例;还检出中国地区 G6PD 少见突变基因型 C1004T 突变 6 例、T517C 突变 2 例、C1360T 突变 1 例;同时检出 C1311T 多态性 65 例和双重杂合突变 96 例。**结论**　东莞地区 G6PD 缺乏症发生率较高,G6PD 基因突变类型具有中国人群普遍代表性,又有该地区的异质性。

关键词:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏;　基因突变;　分子流行病学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.007　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2014)17-2287-02

Gene mutations detection in 469 patients with G6PD deficiency in Dongguan*

Li Wenrui,Ye Minnan,Peng Qi,Li Siping,Long Jianling,

He Yuejing,Cheng Qingqiu,Zeng Xiaomei,Lu Xiaomei△

(1.*Department of Clinical Laboratory,the Eighth People's Hospital of Donguan City/*

Dongguan Institute of Pediatrics,Dongguan,Guangdong 523320,*China*)

Abstract:Objective　To explore the genotype of patients with glucose-6-phosphate dehydrogenas(G6PD) deficiency in Dongguan and provide the basis for the clinical diagnosis and prevention. **Methods**　The clinical data of patients who took G6PD activity screening in the hospital were collected from January 2011 to December 2013,the G6PD/6PGD ratios were recorded. 469 patients with positive G6PD/6PGD ratio were randomly enrolled in the study,whose mutations were detected by reverse dot blot(RDB) assay. **Results**　During this period,we measured G6PD activity of 16 464 cases by G6PD/6PGD ratios,there were 672 positive cases,the positive rate was 4.08%. Randomly selected 469 positive samples,detected their genotye by RDB assay. We detected 173 cases of G1376T,141 cases of G1388A,82 cases of A95G,60 cases of G871A,23 cases of G392T,14 cases of C1024T. In addition to that,we also found some rare mutations,such as 6 cases of C1004T,2 cases of T517C,1 cases of C1360T. 65 cases of C1311T gene polymorphism and 96 cases of dual gene mutations were detected. **Conclusion**　The incidence of G6PD deficiency is high and the gene mutation types in Dongguan are both representative for Chinese population and with local heterogeneity. The study on gene mutations of G6PD deficiency is benefit for diagnosis and prevention.

Key words:glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency;　gene mutation;　molecular epidemiology

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症是常见的 X 染色体隐性遗传性酶缺乏性疾病,全世界大概有 4 亿人患有该病[1]。G6PD 缺乏症的主要特点是 G6PD 酶活性降低,该病多数患者,特别是女性杂合子者,平时不发病,无症状,仅部分患者表现为慢性溶血性贫血症状[2]。这些患者常因接触蚕豆或具有氧化作用的药物如奎宁、磺胺等发生急性溶血性贫血,导致红细胞破坏过多,引起肝、肾或心功能衰竭,甚至死亡[3]。同时,G6PD 缺乏症还是导致新生儿病理性黄疸的主要病因,约 50%的患儿会出现新生儿黄疸,约 12%可发展为核黄疸,如不及时处理将会导致脑部损害,引起智力低下[4]。因此,对该病及早做出诊断、预防具有重要意义。本研究采用反向点杂交(RDB)技术同时对东莞地区 469 例 G6PD 缺乏症患者进行了 17 个基因突变位点的 20 种基因突变型的检测,现报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集 2011 年 1 月至 2013 年 12 月于东莞市第八人民医院通过 G6PD/6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD)比值法检测为 G6PD 酶活性缺乏的患者标本,从中随机抽取 469 例采用 RDB 法检测 G6PD 突变基因型,其中男性 165 例、女性 304 例,年龄从刚出生 1 h 至 51 岁,平均年龄 26.5 岁。

1.2　仪器与试剂　血液 DNA 提取试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;RDB 检测试剂盒包括了杂交液 A、B、C,孵育液及显色液,为亚能生物技术(深圳)公司产品;PCR 仪为珠海黑马公司产品;分子杂交仪为美国 HSELLAB 公司产品。

1.3　方法

1.3.1　标本采集　上述患者于空腹时抽取外周静脉血 2 mL,EDTA 抗凝,置于 4 ℃保存备用。

*　基金项目:东莞市科技计划医疗卫生类科研重点项目(2011105102017)。　作者简介:李文瑞,男,主管技师,主要从事临床检验基础的研究。　△　通讯作者,E-mail:lxm020@126.com。

1.3.2 基因组 DNA 抽提 按照爱思进 AxyPrep 血液基因组 DNA 提取试剂盒说明抽提外周血基因组 DNA,－70 ℃保存备用。

1.3.3 PCR 反应体系及条件 引物设计参照文献[5-6]。多重 PCR 采用 50 μL 扩增体系,包含 1× PCR 缓冲液 1.5 mmol/L $MgCl_2$,引物各 0.2 mmol/L,每种 dNTP 各 0.2 mmol/L,0.1 μmol/L Taq DNA 聚合酶,1 μg 基因组 DNA。PCR 反应条件:50 ℃ 2 min,95 ℃预变性 15 min;然后 95 ℃,变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 35 次循环;最后 72 ℃延伸 5 min。PCR 反应结束后取 2 μL 扩增产物上样于 1%的琼脂糖凝胶 100 V 电泳 30 min,紫外检测扩增片段,出现目的条带,扩增样本进行后续实验。

1.3.4 杂交显色程序 17 种 G6PD 突变位点检测探针在膜条上的排列顺序见附表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页"论文附件")。G6PD 膜条上编号,放入 15 mL 塑料离心管中,然后严格按照斑点杂交法试剂盒说明书进行操作,观察结果。

2 结 果

采用 G6PD/6PGD 比值法共进行了 16 464 例筛查,检出阳性患者 672 例看,其中男性 295 例、女性 377 例。本地区人群 G6PD 缺乏发生率为 4.08%(672/16 464)。随机抽取 469 例酶活性缺乏阳性样本采用 RDB 进行 G6PD 突变基因型分析,检出基因突变 460 例,其余 9 例未检出突变,检出率为 98.1%。其中 G1376T 突变占 37.61%(173/460),G1388A 突变占 30.65%(141/460)、A95G 突变占 17.83%(82/460)、G871A 突变占 13.04%(60/460)、G392T 突变占 5.00%(23/460)、C1024T 突变占 3.04%(14/460)。除以上 6 种已报道的广东地区常见 G6PD 突变类型以外,还检出了中国地区 G6PD 少见突变 C1004T 突变 6 例(占 1.30%)、T517C 突变 2 例(占 0.43%)、C1360T 突变 1 例(占 0.22%);同时检出 C1311T 多态性 65 例(占 14.13%)和双重杂合突变 96 例(占 20.87%)。见附表 2(见《国际检验医学杂志》网站主页"论文附件")。

3 讨 论

G6PD 缺乏症是人类常见的酶缺陷病,G6PD 基因全长 201 146 bp,由 l3 个外显子和 12 个内含子组成,目前发现全世界大约有 140 个基因突变型,我国发现约 17 种突变位点,20 种突变基因型,该病多数为点突变引起的单个氨基酸置换[7]。本研究首先采用 G6PD/6PGD 比值法共筛查了 16 464 人,检出阳性患者 672 例,本地区人群 G6PD 缺乏发生率是 4.08%,与文献[8]的报道相符。随机抽取 469 例酶活性缺乏的阳性标本,采用 PCR/RDB 技术进行 G6PD 缺乏症 17 个突变位点 20 种基因型的检测,发现东莞地区 G6PD 缺乏症常见的突变基因型依次为 G1376T 突变(占 37.61%)、G1388A 突变(占 30.65%)、A95G 突变(占 17.83%)、G871A 突变(占13.04%)、G392T 突变(占 5.00%)、C1024T 突变(占 3.04%)。这与 Yan 等[9]的研究基本一致。除以上 6 种已报道的广东地区常见 G6PD 突变类型以外,还检出中国地区 G6PD 少见突变:C1004T 突变 6 例、T517C 突变 2 例、C1360T 突变 1 例。同时检出 C1311T 多态性 65 例(占 14.13%)和双重杂合突变 96 例(占 20.87%)。

本研究采用 RDB 对 G6PD 缺乏症阳性的标本进行基因突变类型分析,该方法是一种成熟的基因检测方法,可同时用于检测样本中存在的多个基因改变,尤其在同时检测样本中存在的多个点突变方面具有很强的优势。该方法将多种探针同时预先固定于膜上,然后用扩增的靶 DNA 与之杂交。每个样品均只需扩增一次然后杂交一次即可,故既适用于少量标本的分型检测,也适用于大量标本的同时分型,无需特殊仪器设备。本研究中建立的 RDB 检测体系可同时检测 G6PD 缺乏症 17 个突变位点的 20 种基因突变类型,检出率为 98.1%,与以往的方法相比,大大提高了检出率。

本研究 469 例 G6PD 缺乏症阳性样本中,有 9 例未确定基因突变类型,但其 G6PD 酶活性低于正常参考范围,笔者认为有以下几个原因:(1)G6PD 在标本收集、运送或处理过程中失活,导致其活性降低;(2)其他一些疾病或者药物影响而引起 G6PD 酶活性降低;(3)17 个突变位点以外的基因突变类型,需要进一步通过基因测序法进行检测,此项工作正在进行中。

综上所述,东莞地区 G6PD 缺乏发生率较高,G6PD 基因突变类型具有中国人群普遍代表性,又有本地区的特征。研究其突变基因类型有利于 G6PD 缺乏症的诊断及预防。

参考文献

[1] 李梨平,祝兴元,邹爱军,等.湖南长沙地区 G6PD 基因突变型研究[J].中国医师杂志,2005,7(5):652-653.

[2] Minucci A,Moradkhani K,Hwang MJ,et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations[J]. Blood Cells Mol Dis,2012,48(3): 154-165.

[3] Li L,Zhou YQ,Xiao QZ,et al. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of six common Chinese G6PD mutations and one polymorphism[J]. Blood Cells Mol Dis,2008,41(1): 17-21.

[4] 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.

[5] 华亮,朱冰,李婉玲,等.反向点杂交检测中国人群常见 4 种 G6PD 突变方法的建立及评价[J].中国优生与遗传杂志,2010(8):26-29.

[6] Lu X,Hua L,Zhang T,et al. A reverse dot blot assay for the expanded screening of eleven Chinese G6PD mutations[J]. Clin Chim Acta,2013,418(1):45-49.

[7] 潘尚领.东亚及东南亚地区 G6PD 缺陷的地域分布以及疟疾的正选择作用[J].中国优生优育现代人类学通讯,2007,13(Z1):42-45.

[8] 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.

[9] Yan T,Cai R,Mo O,et al. Incidence and complete molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Guangxi Zhuang autonomous region of southern China: description of four novel mutations[J]. Haematologica,2006,91(10): 1321-1328.

(收稿日期:2014-04-16)