

• 论 著 •

高通量分子测序技术在男性新生儿 G6PD 缺乏症 筛查中的应用研究*

杨金玲, 陈大宇[△], 黄丽华, 韦江艳

广西科技大学附属妇产医院/广西科技大学附属儿童医院/广西壮族自治区柳州市妇幼保健院
新生儿疾病筛查中心, 广西柳州 545001

摘要:目的 探讨高通量分子测序(NGS)技术在男性新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症筛查中的应用,研究本地区男性新生儿 G6PD 基因多态性及 G6PD 酶活性筛查的截断值。方法 收集男性新生儿足跟干滤纸血片 1 092 例,采用 G6PD 酶活性分析和 NGS 技术进行筛查,采用多色探针荧光聚合酶链反应熔解曲线法进行验证。结果 本地区男性新生儿 G6PD 缺乏症阳性率为 11.08%,NGS 技术的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 95.04%、100.00%、100.00%和 99.39%,与 G6PD 酶活性分析的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。c. 1376G>T、c. 95A>G、c. 1388G>A、c. 1024C>T 突变为本地区男性新生儿 G6PD 基因常见的突变类型,其酶活性依次升高;常见突变类型为Ⅱ型和Ⅲ型,以Ⅱ型为主,占 85.12%。男性新生儿 G6PD 酶活性检测截断值 <4.24 U/gHb,灵敏度为 99.28%,特异度为 100.00%,受试者工作特征曲线下面积为 0.999。结论 NGS 技术是男性新生儿 G6PD 缺乏症筛查的可靠方法,设置合理的 G6PD 酶活性检测截断值,两种检测方法可以互为补充,可为遗传咨询及临床指导用药提供参考依据。

关键词:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症; 高通量分子测序技术; 基因; 男性; 新生儿; 截断值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.23.013 **中图法分类号:**R722.1

文章编号:1673-4130(2021)23-2881-04 **文献标志码:**A

Application of high-throughput molecular sequencing in the screening of male newborns G6PD deficiency*

YANG Jinling, CHEN Dayu[△], HUANG Lihua, WEI Jiangyan

Newborn Disease Screening Center, Affiliated Maternity Hospital of Guangxi University of Science and
Technology/Affiliated Children's Hospital of Guangxi University of Science
and Technology/Liuzhou Maternity and Child Health Care Hospital, Liuzhou, Guangxi 545001, China

Abstract: Objective To explore the application of high-throughput molecular sequencing (NGS) technology in the screening of male newborns glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, to study the G6PD gene polymorphism and the cut-off value of G6PD enzyme activity in male newborns in this area. **Methods** Collected 1 092 cases of male newborns heel dry filter paper blood slices, and used G6PD enzyme activity analysis and NGS technology for screening. The multicolor probe fluorescence polymerase-linked reaction melting curve method was used for verification. **Results** In this area, the positive rate of G6PD deficiency in male newborns was 11.08%. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of NGS technology were 95.04%, 100.00%, 100.00% and 99.39%, respectively. Compared with the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of G6PD enzyme activity analysis, the differences were not statistically significant ($P>0.05$). C. 1376G>T, c. 95A>G, c. 1388G>A, and c. 1024C>T mutations were common mutation types in the G6PD gene of male newborns in this area, and the enzyme activity increases sequentially. Common mutation types were type Ⅱ and type Ⅲ. The cut-off value of G6PD enzyme activity detection in male newborns was less than 4.24 U/gHb, the sensitivity was 99.28%, the specificity was 100.00%, and the area under the receiver operating characteristic curve was 0.999. **Conclusion**

* 基金项目:广西壮族自治区柳州市科技重大专项(2018AF10501);广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(Z20170532)。

作者简介:杨金玲,女,副主任技师,主要从事新生儿疾病筛查方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: cdsoft@163.com。

本文引用格式:杨金玲,陈大宇,黄丽华,等.高通量分子测序技术在男性新生儿 G6PD 缺乏症筛查中的应用研究[J].国际检验医学杂志, 2021, 42(23): 2881-2884.

NGS technology is a reliable method for screening male newborns for G6PD deficiency, set a reasonable cut-off value for the detection of G6PD enzyme activity, the two detection methods could complement each other, which could provide a reference for genetic counseling and clinical guidance of medication.

Key words: glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; high-throughput molecular sequencing technology; gene; male; newborns; cut-off value

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症是由于 G6PD 基因缺陷导致红细胞膜的 G6PD 生成障碍。G6PD 缺乏在某些诱因引起急性溶血性贫血,并导致高胆红素血症,新生儿期重症可发展为核黄疸,导致脑瘫^[1-2]。由于 G6PD 基因突变与其表型之间的关系尚未完全明确、G6PD 缺乏症有明显遗传多样、一些特殊病理状态下 G6PD 酶活性并不降低和截断值设置不合理等原因,致使男性新生儿 G6PD 缺乏症并未全部检出^[3-4]。本研究采用高通量分子测序(NGS)技术检测男性新生儿 G6PD 缺乏症,探讨男性新生儿 G6PD 基因型与表型的相关性,并合理设置男性新生儿 G6PD 酶活性筛查截断值,为临床诊疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机收集柳州市妇幼保健院新生儿疾病筛查中心男性新生儿足跟干滤纸血片 1 092 例。本项目通过柳州市妇幼保健院伦理委员会批准,监护人均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 出生 72 h 后采集男性新生儿足后跟血制成干滤纸血片,5 个工作日内送检。

1.2.2 仪器与试剂 G6PD 酶活性分析采用丰华公司的全自动时间分辨荧光免疫分析仪及配套分析试剂盒。采用 Lab Aid 824 核酸提取试剂及提取仪器提取干滤纸血片中的 DNA。采用 NGS 技术对 G6PD 基因外显子 2~13 测序,不一致的结果采用多色探针荧光聚合酶链反应(PCR)熔解曲线法验证(厦门致善生物 G6PD 基因检测试剂盒)。

1.3 评估方法 G6PD 酶活性 <2.6 U/gHb,筛查结果为阳性。本研究检出的 G6PD 基因变异,查询公共数据库 gnomAD、千人项目中国人群、ExAC 数据库等,并通过多种计算机软件预测该变异对基因或基因产物致病结论是否一致。PCR 熔解曲线结果判读按 G6PD 基因检测试剂盒说明书进行。WHO 根据 G6PD 缺乏症患者酶活性等级及临床表现,将 G6PD 缺乏症分为 5 种类型:Ⅰ型酶活性最低,为 0%;Ⅴ型酶活性最高, $>200\%$;Ⅱ型酶活性小于正常酶活性的 10%,患者有间断溶血发作,尤其是在摄食蚕豆及其制品或药物后诱发急性溶血,不伴慢性溶血;Ⅲ型酶活性为正常酶活性的 10%~60%,少数抗疟疾药物(如伯氨喹)或感染(如伤寒、大叶性肺炎、肝炎)可诱

发溶血;Ⅳ型酶活性大于正常酶活性的 60%,无特殊临床表现。通过 WHO 的 G6PD 基因突变分型数据库可查询突变基因所属 G6PD 缺乏症的类型。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 和 MedCal19.6.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 ANOVA 检验,对差异有统计学意义的指标继续采用 LSD 法进行组内两两比较。非正态分布的计量资料以中位数或范围表示。组间灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值比较采用 χ^2 检验。G6PD 缺乏症患者酶活性筛查截断值采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NGS 技术与酶活性检测中假阴性结果分析 本研究共检测 1 092 例男性新生儿,121 例检出 G6PD 基因突变;G6PD 缺乏症为 X 连锁不完全显性遗传,男性检测到突变基因即表现为 G6PD 酶活性降低,本地区男性新生儿 G6PD 缺乏症阳性率为 11.08% (121/1 092)。G6PD 缺乏症男性新生儿酶活性为 (1.20 ± 0.72) U/gHb,健康男性新生儿 G6PD 酶活性为 (6.66 ± 0.91) U/gHb。酶活性分析检出 G6PD 酶活性缺乏 114 例,假阴性 7 例;NGS 技术检出 G6PD 基因变异 115 例,假阴性 6 例,见表 1。NGS 技术的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 95.04%、100.00%、100.00%和 99.39%;G6PD 酶活性分析的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 94.21%、100.00%、100.00%和 99.28%。两种检测方法差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 G6PD 基因型与 G6PD 酶活性分析 本研究共检测到 7 种 G6PD 基因突变,所有突变均已被报道。c. 1388G>A 等位基因型检出率最高,占 G6PD 等位基因的 41.32%,c. 1376 G>T、c. 95 A>G、c. 1024 C>T、c. 871 G>A、c. 392 G>T 和 c. 487G>A 检出率依次降低。最常见的 4 种变异位点 c. 1376G>T、c. 95A>G、c. 1388G>A、c. 1024C>T 酶活性依次增高,4 种变异位点酶活性比较差异有统计学意义($F = 16.2, P < 0.05$)。本地男性新生儿 G6PD 酶活性 WHO 分型为Ⅱ型和Ⅲ型,以Ⅱ型为主,占 85.12% (103/121),见表 2。

2.3 ROC 曲线分析男性新生儿 G6PD 缺乏筛查截

断值 对男性新生儿 G6PD 基因正常和基因突变标本的酶活性进行 ROC 曲线分析,约登指数最大为 0.992 8,G6PD 缺乏筛查截断值<4.24 U/gHb 为阳性标本,灵敏度为 99.28%,特异度为 100.00%,曲线下面积(AUC)为 0.999,见图 1。

表 1 NGS 技术与 G6PD 酶活性检测的假阴性结果比较

病例	基因型	G6PD 酶活性 WHO 分型	NGS 技术		酶活性检测	
			基因型	结果判定	酶活性(U/gHb)	结果判定
1	c.1024C>T	Ⅲ型	未检出突变位点	假阴性	1.77	阳性
2	c.1376G>T	Ⅱ型	未检出突变位点	假阴性	0.51	阳性
3	c.95A>G	Ⅱ型	未检出突变位点	假阴性	0.81	阳性
4	c.1024C>T	Ⅲ型	未检出突变位点	假阴性	1.65	阳性
5	c.1024C>T	Ⅲ型	未检出突变位点	假阴性	2.02	阳性
6	c.1388G>A	Ⅱ型	未检出突变位点	假阴性	1.73	阳性
7	c.1024C>T	Ⅲ型	c.1024C>T	阳性	2.71	假阴性
8	c.1024C>T	Ⅲ型	c.1024C>T	阳性	2.77	假阴性
9	c.1024C>T	Ⅲ型	c.1024C>T	阳性	3.00	假阴性
10	c.1024C>T	Ⅲ型	c.1024C>T	阳性	3.27	假阴性
11	c.1024C>T	Ⅲ型	c.1024C>T	阳性	3.54	假阴性
12	c.392G>T	Ⅲ型	c.392G>T	阳性	3.27	假阴性
13	c.392G>T	Ⅲ型	c.392G>T	阳性	4.24	假阴性

注:病例 1~13 为两种检测方法不一致的 13 例病例。

表 2 G6PD 基因型与 G6PD 酶活性检测($\bar{x}\pm s/M/\text{范围}$)

基因型	rs_ID	n	百分率(%)	G6PD 酶活性(U/gHb)	G6PD 酶活性 WHO 分型
c.1376G>T	rs72554665	30	24.79	0.62±0.28 ^{#△▲}	Ⅱ型
c.95A>G	rs137852340	20	16.53	1.05±0.43 ^{*△▲}	Ⅱ型
c.1388G>A	rs72554664	50	41.32	1.17±0.35 ^{*#▲}	Ⅱ型
c.487G>A	rs137852327	1	0.83	1.20	Ⅲ型
c.871G>A	rs137852314	3	2.48	1.38±0.45	Ⅱ型
c.1024C>T	rs137852342	15	12.40	2.29±0.65 ^{*#△}	Ⅲ型
c.392G>T	rs137852341	2	1.65	3.27~4.24	Ⅲ型

注:与 c.1376G>T 基因型比较,^{*}*P*<0.05;与 c.95A>G 基因型比较,[#]*P*<0.05;与 c.1388G>A 基因型比较,[△]*P*<0.05;与 c.1024C>T 基因型比较,[▲]*P*<0.05。

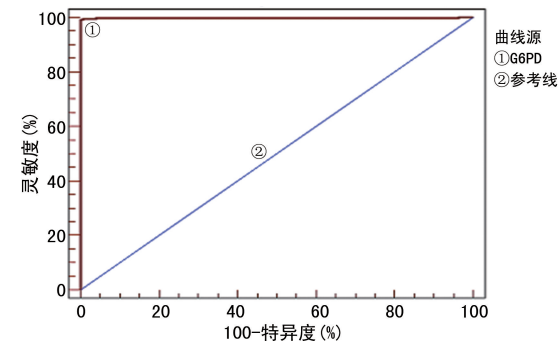


图 1 男性新生儿 G6PD 缺乏症截断值 ROC 曲线分析

3 讨 论

G6PD 缺乏症为 X 连锁不完全显性遗传,男性发病多于女性;G6PD 缺乏症患者临床表现差异极大,重

者可危及生命。有研究报道,本地区人群 G6PD 缺乏阳性率为 7.66%,本研究中男性新生儿 G6PD 缺乏阳性率为 11.08%,在 G6PD 缺乏症发生率高的地区进行新生儿 G6PD 缺乏症筛查具有重要意义^[5-7]。

截至目前,已报道的 G6PD 基因突变超过 210 种,95%为点突变^[8]。本研究中 c.1388G>A、c.1376G>T、c.95A>G 和 c.1024C>T 4 种突变基因型占 95.04%,c.1388G>A 突变基因型检出率最高(41.32%),与其他地区报道的结果相似^[9-10]。按照 WHO 分型,检出的 7 种基因型变异属于Ⅱ型或Ⅲ型^[11]。除Ⅲ型变异 c.487G>A 的酶活性相对较低外,所有Ⅱ型变异的酶活性均远远低于Ⅲ变异,差异

有统计学意义($P<0.05$)。本研究Ⅱ型突变中,酶活性降低程度因基因型而异,c.1376G>T 酶活性最低,c.95A>G、c.1388G>A 和 c.871G>A 酶活性依次升高。Ⅱ型突变酶活性范围 $<10\%$,酶活性降低程度大,在本实验室酶活性检测中未出现假阴性结果^[11]。Ⅲ型突变中检测到 1 例 c.487G>A 变异,其 G6PD 酶活性最低,其余 c.1024C>T、c.392G>T 酶活性依次升高。

本研究中 NGS 技术和 G6PD 酶活性检测中均出现假阴性结果。NGS 技术的假阴性结果经验证为常见的 G6PD 基因突变位点,G6PD 酶活性检测结果为阳性。理论上,NGS 技术可检出 G6PD 基因中常见变异,由于标本质量不合格、实验过程中 DNA 含量不足及生物信息分析人员的熟练程度等亦可能出现假阴性结果。本研究中 G6PD 酶活性检测假阴性结果均为Ⅲ型变异中 c.1024C>T 突变或 c.392G>T 突变。Ⅲ型酶活性缺乏不明显甚至酶活性不缺乏的病例通常无法检出,但这些病例仍然可以因为抗疟疾药物或感染等因素诱发溶血。在做好质量控制的基础上,NGS 技术可以弥补因不同基因突变导致酶缺乏程度不一或其他急性溶血情况下出现酶活性较高所致的漏检。NGS 技术灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值与 G6PD 酶活性检测比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),两种方法可互为补充。

本研究 G6PD 酶活性检测中有 7 例男性新生儿使用常规截断值无法检出,可见筛查截断值的设置很重要^[12]。本研究发现,G6PD 缺乏男性新生儿酶活性平均值为 (1.20 ± 0.72) U/gHb,健康男性新生儿 G6PD 酶活性为 (6.66 ± 0.91) U/gHb,二者酶活性基本不存在交叉。本研究取约登指数最大时的截断值 4.24 U/gHb,其灵敏度为 99.28%,特异度为 100.00%,AUC 为 0.999,以提高检测男性新生儿 G6PD 缺乏症检出率。截断值重新设定后,G6PD 酶活性检测可以检出可疑Ⅱ型变异,通过 G6PD 基因检测可确定是否携带致病基因,实现早诊断、早预防。

综上所述,NGS 技术可用于男性新生儿 G6PD 缺乏症检测,精准指导临床早诊断、早预防;G6PD 酶活性检测截断值设置合理时,价格低廉、快速且容易实施;两种检测方法结合临床相关资料综合判断可用于临床用药指导、急性溶血鉴别诊断、预防新生儿核黄疸等。本研究仅探讨 NGS 技术在男性新生儿 G6PD 缺乏症筛查中的应用,女性新生儿 G6PD 缺乏症筛查未做研究。由于女性有 2 条 X 染色体,并且 X 染色体随机失活,存在不完全显性遗传,女性携带者酶活性可完全正常或稍微降低,生化检测漏检率高,今后应

考虑 NGS 技术应用于急性溶血期患者及女性杂合子诊断。

参考文献

[1] LUZZATTO L, NANNELLI C, NOTARO R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2016, 30(2): 373-393.

[2] CHU C S, BANCONE G, NOSTEN F, et al. Primaquine-induced haemolysis in females heterozygous for G6PD deficiency[J]. Malar J, 2018, 17(1): 101-109.

[3] 郭静, 田国力, 王燕敏, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶及其基因突变的研究[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2020, 16(6): 672-679.

[4] CHIU Y H, CHEN H J, CHANG Y C, et al. Applying a multiplexed primer extension method on dried blood spots increased the detection of carriers at risk of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in newborn screening program[J]. Clin Chim Acta, 2019, 495: 271-277.

[5] 谭建强, 黄钧, 潘莉珍, 等. 广西柳州地区新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症 G6PD 基因多态性检测[J]. 中国儿童保健杂志, 2018, 26(11): 1164-1167.

[6] ROPER D, LAYTON M, REES D, et al. Laboratory diagnosis of G6PD deficiency. A British Society for Haematology guideline[J]. Br J Haematol, 2020, 189(1): 24-38.

[7] 俸诗瀚, 耿国兴, 阳奇, 等. 广西地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的分子流行病学分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(15): 1886-1888.

[8] GOMEZ-MANZO S, MARCIAL-QUINO J, VANOYE-CARLO A, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: update and analysis of new mutations around the world [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): 2069-2075.

[9] YANG H, WANG Q, ZHENG L, et al. Incidence and molecular characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency among neonates for newborn screening in Chaozhou, China[J]. Int J Lab Hematol, 2016, 37(3): 410-419.

[10] 唐芳, 唐诚芳, 蒋翔, 等. 广州新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症基因型与酶活性关联分析[J]. 中华预防医学杂志, 2020, 54(11): 1275-1282.

[11] 国家卫生健康委临床检验中心新生儿疾病筛查室间质评专家委员会. 新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症筛查与诊断实验室检测技术专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(3): 181-185.

[12] FU C, LUO S, LI Q, et al. Newborn screening of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Guangxi, China: determination of optimal cutoff value to identify heterozygous female neonates[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 833-836.