

佛山地区孕产妇 G6PD 基因缺陷调查及干预模式研究*

赵学峰, 李毅坚, 蔡 甜, 梁柏林, 刘春林, 袁晓文(南方医科大学附属南海人民医院, 广东佛山 528200)

【摘要】 目的 调查佛山地区孕产妇葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺陷状况, 探讨干预指导模式的效果。**方法** 选择 2013 年 4~12 月到该院产检的孕产妇及其丈夫各 1 646 例, 以反向膜杂交法检查夫妇双方的 G6PD 基因、以生化仪法检测 G6PD 活性, 分析两性基因突变率、酶活性缺陷率, 给予遗传咨询指导并跟踪随访新生儿 G6PD 基因突变与酶活性低下情况。**结果** G6PD 基因突变率男性 4.7%, 女性 2.3%; G6PD 酶活性缺陷率男性 3.5%, 女性 1.6%; G6PD 基因突变发生较高的位点是 G1376T (36.2%)、G1388A (21.6%)、A95G (13.7%) 和 G1024T (11.2%)。**结论** 佛山地区是 G6PD 缺陷高发地区, G1376T、G1388A、A95G 和 G1024T 是主要的点突变类型。

【关键词】 G6PD 缺陷; 基因突变; 反向膜杂交; 干预模式

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)09-1172-02

The Study for gene mutation and enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and for the effect of intervention action in Foshan city* ZHAO Xue-feng, LI Yi-jian, CAI Tian, LIANG Bo-lin, LIU Chun-lin, YUAN Xiao-wen (The Affiliated Nanhai Hospital of Southern Medical University, Foshan, Guangdong 528200, China)

【Abstract】 Objective To investigate the incidence of gene mutation and enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD) deficiency in Foshan city, and to study the effect of intervention Action. **Methods** Recruit pregnant woman(1 646 cases) and her husband(1 646 cases) who seek antenatal care in our hospital were selected as subject from April to December in 2013, the result of gene mutation by PCR-reverse dot blot(PCR-RDB) and enzyme activity was detected by biochemical analyzer, the rate of gene mutation enzyme deficiency was established which afford information for next step of genetics intervene counsel, as newborn was followed for G6PD status. **Results** A total of 1 646 spouse was brought into our study, the gene mutation rate was 4.7% in husband and 2.3% in pregnant corresponding 3.5% and 1.6% of enzyme deficiency rate, the rate of G1376T, G1388A, A95G, G1024T site was respectively observed 36.2%, 21.6%, 13.7% and 11.2% mutation. **Conclusion** There were popular G6PD deficiency rate in Foshan, the major mutation site occurred in G1376T, G1388A, A95G and G1024T site.

【Key words】 G6PD deficiency; gene mutation; PCR-RDB; intervention

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症全球患病率 4.9%, 约 3.3 亿人受累^[1]。广东省发病率为 3.0%~4.0%, 其中佛山市发病率 5.6%, 东莞市的发病率是 3.2%^[2]。G6PD 缺乏症可引起新生儿黄疸、药物性溶血、感染性急性溶血、蚕豆病和重症慢性非球形细胞溶血性贫血等, 严重者导致新生儿期重症黄疸, 造成病死或永久性神经损伤。G6PD 缺乏症实验室检测包括酶活性表型分析和基因诊断, 但是 saG6PD 缺乏症杂合子的酶活性可以表现正常、中度缺乏或显著缺乏, 表型与基因型之间显著不一致, 有可能使 G6PD 杂合子型人群暴露于个别药物或感染, 存在血管内溶血的风险^[3]。有前瞻性研究表明, G6PD 杂合子发生新生儿高胆红素血症危险显著高于 G6PD 正常纯合子, 相对危险度达到 2.26。当前, 多数医院对 G6PD 缺乏症以表型筛查为主, 仅有表型筛查不能确定 G6PD 基因突变存在与否, 也不利于突变基因携带个体及下一代新生儿溶血风险的防控。本研究旨在调查佛山地区孕产妇人群及其配偶 G6PD 基因及酶活性状况, 为新生儿产后治疗高胆红素血症和预防血管内溶血风险的干预模式提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 4~12 月本院产检的孕产妇, 检测夫妇双方的血型、血细胞分析、G6PD 酶活性、G6PD 和珠蛋白生成障碍性贫血基因, 进行间接和直接人球蛋白抗体试验, 检查丙型肝炎、免疫缺陷病毒抗体、乙型肝炎表面抗原和梅毒特异性抗体等感染性标志物, 排除人球蛋白抗体阳性、珠蛋白生成障碍性贫血基因异常、感染性标志物异常个体, 排除只有孕产妇单方数据的个体。研究方案获得医院学术委员会、伦理委员会批准通过。选取 3 216 例孕产妇参与本研究, 排除 828 例无法获得男性配偶的积极参与, 416 例珠蛋白生成障碍性贫血基因异常, 326 例直接或间接人球蛋白抗体阳性, 最终 1 646 例符合条件纳入研究对象。

1.2 方法

1.2.1 G6PD 酶活性检测 采用广州科方生物科技有限公司的 G6PD 检测试剂盒, 根据说明书所述, 在日立 7600 生化分析仪设置参数, 按照酶活性单位定义计算 K 值, 测定结果以 U/L 为单位。EDTA 抗凝全血标本 4 000 r/min 离心 5 min, 用定量

* 基金项目: 广东省佛山市科技局医学科研项目(201308198)。

作者简介: 赵学峰, 男, 副主任技师, 硕士, 主要从事生物化学与分子诊断检验研究。

毛细吸管吸取 20 μL 离心沉淀红细胞,溶解于 1 mL 试剂盒配备的溶解液中,混匀放置 2 min,3 000 r/min 离心 5 min 后上机检测。

1.2.2 G6PD 基因突变的检测 试剂采用深圳益生堂生物科技有限公司的 G6PD 基因突变试剂盒,G6PD 基因突变涵盖常见 9 个位点,包括 A95G、G487A、A592G、G592T、G871A、C1004T、C1024T、G1376T 和 G1388A,EDTA 抗凝全血,采用凯杰公司全基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,在 ABI7500PCR 仪器扩增仪进行基因扩增,扩增产物在热流杂交仪进行反向膜杂交、洗涤、显色、判定结果。

1.2.3 遗传咨询与干预指导、娩出新生儿的 G6PD 基因和酶活性检测随访 对于夫妻双方任何一方有 G6PD 基因突变或 G6PD 酶活性检测异常,均 2 次采集样本检测验证;对于基因突变检测异常而酶活性处于参考区间内者,判定为 G6PD 基因异常,给出遗传咨询建议;对于基因检测正常而酶活性检测低于参考区间者建议随访观察,不予遗传咨询建议;对于夫妻双方基因检测与酶活性均正常的研究对象,不予遗传咨询建议。

2 结 果

2.1 G6PD 酶活性检测结果 试剂盒标示的参考区间为 1 300~3 600 U/L,以此为判断标准,男性 G6PD 缺陷率 3.5% (57/1 646),女性 G6PD 缺陷率 1.6% (26/1 646);男性 G6PD 缺陷群体的 G6PD 酶活性平均 642 U/L,女性 G6PD 缺陷群体的 G6PD 酶活性平均 591 U/L,两性之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 反向膜杂交法检测 G6PD 基因突变结果 本研究对所有研究对象均进行 G6PD 反向膜杂交检测,阴、阳性对照符合质控要求。本研究采用试剂盒所覆盖的 9 个常见突变位点中,以 G1376T 位点、G1388A 位点和 A95G 位点最为常见,G487A 位点仅发现 3 例,没有发现 A592G 位点和 G592T 位点。见表 1。检出 116 例基因突变研究对象中,男性检出率 4.7% (78/1 646),占比 67.2% (78/116);女性检出率 2.3% (38/1 646),占比 32.8% (38/116)。

表 1 G6PD 基因突变位点分布

突变类型	n(%)
G1376T	42(36.2)
G1388A	25(21.6)
A95G	16(13.7)
G1024T	13(11.2)
G871A	9(7.8)
C1004T	8(6.9)
G487A	3(2.6)
A592G	0(0.0)
C592T	0(0.0)
合计	116(100.0)

2.3 G6PD 酶活性与反向膜杂交基因检测结果间关系分析 以 G6PD 酶活性小于参考区间的下限(小于 1 300 U/L)和出现基因突变阳性为判定标准,低 G6PD 酶活性率 2.52% (83/3 292),基因突变异常率 3.52% (116/3 292),2 种判定方法间差异有统计学意义 ($P<0.05$),基因突变检测阳性率显著高于

酶活性检测异常率。116 例基因突变检测异常对象的 G6PD 酶活性低于参考区间者 94 例,占比 81.0% (94/116),83 例 G6PD 酶活性低下者基因突变异常率 90.0% (75/83)。

2.4 遗传咨询与产后新生儿 G6PD 基因与酶活性检测结果随访 所有检出 G6PD 基因突变或酶活性低下孕产妇接受、理解专业医生给予遗传咨询和干预指导建议。选择同时具有 G6PD 基因异常和酶活性低下 75 例孕产妇跟踪随访至娩出新生儿,得到 25 例完整随访数据。其中,仅有 1 例测得 G6PD 酶活性低下,4 例检出 G6PD 基因突变。

3 讨 论

G6PD 缺乏症又称蚕豆病,属于 X 连锁不完全显性遗传,在我国呈现南方高发、北方低发的特征,以广西、广东、海南及云贵川地区为高发地区。G6PD 催化 6-磷酸葡萄糖脱氢,生成 NADPH 而参与呼吸链能量代谢,当 G6PD 基因突变而致活性缺乏时,导致 NADPH 生成减少,H₂O₂ 堆积,引起 RBC 膜氧化损伤,易形成血管内溶血,临床上常表现为新生儿黄疸、蚕豆病、药物性溶血、感染性溶血等。该病多数患者(尤其是杂合子女性)平时不发病,但是一旦接触到蚕豆花、维生素 K、樟脑,服用奎宁、阿司匹林等某些药物,或受到病毒与细菌感染时极易诱发急性溶血性贫血,破坏过多 RBC,生成游离血红蛋白,引起心肝肾等器官衰竭、死亡。该病也是新生儿人群黄疸的主要病因,持续升高的胆红素可引起脑部损害和神经系统永久性损伤、智力低下等^[3]。因此,及早明确风险状态,进行产前遗传咨询与诊断,采取预防治疗措施具有重要意义。

G6PD 基因位于 Xq28,含有 13 个外显子和 12 个内含子,编码 515 个氨基酸,是典型的看家基因。G6PD 基因突变绝大多数为单个碱基置换的错义突变导致氨基酸置换,使 G6PD 活性降低。目前,全世界已报道 180 多种 G6PD 基因突变类型,突变分布具有种族地区异质性。中国人群相继发现 17 个突变位点^[4],目前还未发现整个基因或大片段缺失。本研究采用基因检测试剂盒涵盖我国常见突变类型,占总突变率 97.0% 以上。反向膜杂交是较为成熟的基因检测技术,尤其在检测统一基因存在多个点突变方面具有较大优势,是我国主流基因突变检测平台。G6PD 缺乏症实验室检测包括表型分析和基因诊断。国内常用 G6PD 酶活性检测基于 G6PD 酶活性测定,没有对轻度、中度和显著缺乏划分出明确的界限值。此外,基因型与酶活性通常没有完全的对对应性,G6PD 缺乏杂合子酶活性可以表现正常、中度缺乏或显著缺乏,使杂合子(女性)个体基因型的确定相当困难,在临床采用酶活性检测与基因检测联合使用,减少漏诊。本研究结果显示,基因突变 116 例研究对象中,22 例酶活性表型正常,仅检测酶活性会使其暴露于诱发风险之下。基于酶活性方法检出 83 例,但酶活性低下可能与操作过程中某一环节有关,单以酶活性判定将使医务人员谨慎、保守地使用药物,使患者暴露于保守治疗的疾病失控风险之下。

结直肠癌基因组与蛋白质组数据研究中发现,基因表达异常显著高于蛋白质表达异常^[5],可能由于基因表达受启动子等调控元件和翻译后剪接等因素影响,合理解释本研究中基因突变与酶活性低下之间数据不一致;杨发达等^[6]对生化分析仪检测 G6PD 影响因素分析揭示,应用 U/Hb(g)能更科学地评估 G6PD 酶活性水平。本研究采用深圳益生堂反向杂交试剂盒,能覆盖约 97.0% 我国常见 G6PD 突变类型,所得数据基本与王霞等^[7]报道类似,仅检出阳性率偏低,是否(下转第 1176 页)

细胞向 Th2 细胞的偏移,且 IL-10 是介导 Th2 细胞发育的主要细胞因子,可以促使 Th2 细胞分泌 IL-4 增多。Th2 细胞的优势状态将导致细胞免疫抗肿瘤的免疫功能减弱,保护肿瘤细胞,发生免疫逃逸。Treg 在外周血的表达水平与 IFN- γ 及 IL-4 水平存在不同的相关性,提示 Treg 与 Th 细胞因子可能共同参与了子宫颈癌的发病机制。

总之,Treg 和 Th 细胞因子在恶性肿瘤的发生和发展的多个环节中发挥重要的调节作用,随着研究的深入,越来越多的证据表明 Treg 和 Th 细胞因子失衡与 CIN 的进展及子宫颈癌的发病密切相关。同时,也提示临床如果能将抑制机体的 Treg 细胞与增强抗肿瘤的免疫功能手段相结合,将有可能为相关疾病的治疗和干预提供新的思路。

参考文献

[1] 杨玲,皇甫梅,张思维. 中国 20 世纪 70 年代与 90 年代子宫颈癌病死率及其变化趋势[J]. 中国医学科学院学报, 2003,25(4):386-390.

[2] Kuss I, Hathway B, Ferrs RL, et al. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Clinical Cancer Research, 2004,10(11):3755-3762.

[3] Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance[J]. Cell, 2000,101(5):455-458.

[4] Shevach EM. Certified professionals: CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells [J]. Experimental Medicine, 2001, 193 (11):41-46.

[5] HanY, Wu J, Bi L, et al. Malignant B cells induce the con-

version of CD4⁺ CD25⁻ T cells to regulatory T cells in B-cell non-hodgkin lymphoma[J]. PLoS One, 2011, 6(12): 28649-28652.

[6] Lee WC, Wu TJ, Chou HS, et al. The impact of CD4⁺ CD25⁺ T cells in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma[J]. Surgery, 2012, 151(2):213-222.

[7] Wu TN, Lin KH, Chang YJ, et al. Avidity of CD1d-ligand-receptor ternary complex contributes to T-helper 1(Th1) polarization and anticancer efficacy[J]. Proceedings National Academy Sciences USA, 2011, 108(42): 17275-17280.

[8] Li CH, Kuo WH, Chang WC, et al. Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer[J]. Immunologic Research, 2011, 51(1):71-79.

[9] Gao YW, Chen YX, Wang ZM, et al. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and the presence of CD4⁺ infiltrating T-lymphocyte in human primary hepatocellular carcinoma [J]. Hepato-gastroenterology, 2008, 55 (82/83):345-350.

[10] Kitajima M, Ito T, Tumes DJ, et al. Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells [J]. Cancer Research, 2011, 71 (14):4790-4798.

(收稿日期:2015-10-25 修回日期:2016-01-12)

(上接第 1173 页)

属于试剂盒覆盖范围之外的突变类型造成基因突变结果与酶活性结果之间的不一致,还需测序等其他高敏感性、高准确性方法验证。

所有 G6PD 基因突变或酶活性低下孕产妇接受了专业医生提供的遗传咨询与干预指导建议,包括^[8-9]:建议孕妇分娩后尽快检测新生儿 G6PD 活性及是否存在基因突变;列出文献报道的可诱发 G6PD 缺乏相关症状的药物如解热镇痛类、中药、抗菌药物;提供权威流行病学数据、临床表现及规避措施;检测报告单予以显著警示标志。佛山地区外来年轻务工人员较多,选择回原籍分娩和改变分娩医院变数较大,这是本研究对 G6PD 基因突变和酶活性低下孕产妇后续跟踪数据较少的主要原因。与文献报道相比,本研究获得的 G6PD 缺乏症流行病学数据较低,可能也与佛山地区人口高流动性相关。

南方地区是 G6PD 缺乏症高发地带,研究获取佛山地区 G6PD 缺乏症流行病学数据对指导优生优育、提高出生人口素质有重要意义,对高危人群给予干预指导建议能显著减少血管内溶血事件发生,避免给患者造成更大经济与精神负担。

参考文献

[1] Ella T. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis[J]. Blood Cells Molecules and Diseases, 2009, 42 (3):267-278.

[2] 张玉琼. 东莞地区新生儿 G6PD 缺乏症的筛查研究[J]. 广州医药, 2004, 35(2):69-72.

[3] Carlson PE, Flanagan CL, Ickes CE, et al. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes [J]. Science, 1956, 124(3220):484-485.

[4] 张力, 区小冰, 佟莉贞, 等. 广东地区 G6PD 缺陷的基因型与临床表现[J]. 临床血液学杂志, 2000, 2(13):51-53.

[5] Jimenezl CR, Fijneman R. Proteomics of colorectal cancer in a genomic context: first large-scale mass spectrometry-based analysis from the cancer genome atlas[J]. Clinical Chemistry, 2015, 61(9):1126-1128.

[6] 杨发达, 贾章林. 葡萄糖-6-磷酸活性检测标本的初步探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 3(7):639-642.

[7] 王霞, 江帆, 唐盈, 等. 广州地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷症基因突变的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21 (7):17-18.

[8] 江帆, 冯善伟, 王耀强, 等. 基于广州市计生网络的唐氏综合征群体干预模式的建立与管理[J]. 中国妇幼保健, 2010, 27:3853-3856.

[9] 冯善伟, 辜俊梅, 李华, 等. 依托人口和计划生育体系建立珠蛋白生成障碍性贫血群体干预模式的实践与体会[J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(2):223-226.

(收稿日期:2015-11-12 修回日期:2016-01-28)