

· 论著 ·

贵阳地区新生儿G-6-PD缺乏症筛查及基因突变分析*

李林洁 杨 雪 刘兴宇 张晓怡 张禾璇 王侶金 郑 琳*

贵阳市妇幼保健院优生遗传科 (贵州 贵阳 550003)

【摘要】目的 分析贵阳地区出生人群葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)缺乏症筛查情况,了解本地区疾病的发生率以及基因突变情况,为指导新生儿疾病筛查工作提供策略依据。**方法** 选取2020年9月-2021年12月期间送检贵阳市新生儿遗传代谢病筛查中心的干血斑样本,共计69537例(男37276例,女32261例),采用荧光定量法测定干血斑中的G-6-PD酶活性,筛查的可疑阳性新生儿召回使用基因突变分析及酶活性检测进行确诊。**结果** 贵阳地区新生儿G-6-PD缺乏症筛查总体阳性率为1.37%(954/69537),其中男、女阳性率分别为1.81%(674/37276)和0.87%(280/32261),两者阳性率比较,差异具有统计学意义($\chi^2=112.972$, $P<0.001$);可疑阳性新生儿召回594例,召回率62.3%,确诊302例,推算贵阳地区新生儿G-6-PD缺乏症总体发生率为0.70%,345名新生儿中,检测出基因突变238例,共检出10种突变类型:90例(31.5%)c.1024C>T、64例(22.4%)c.1388G>A、52例(18.2%)c.95A>G、50例(17.5%)c.1376G>T、12例(4.2%)c.871G>A、8例(2.8%)c.487G>A、3例(1.0%)c.1004C>A、3例(1.0%)c.392G>T、2例(0.7%)c.592C>T、1例(0.3%)c.1360C>T和一种复合突变。**结论** 贵阳地区最常见的五种G6PD基因突变为c.1024C>T、c.1388G>A、c.95A>G、c.1376G>T、c.871G>A,约占贵阳已鉴定致病等位基因的93.8%,G-6-PD缺乏症属于贵阳地区新生儿疾病筛查的高发病种之一,积极开展新生儿G-6-PD缺乏症筛查具有重要意义。

【关键词】 G-6-PD缺乏症; 新生儿疾病筛查; 基因突变

【中图分类号】 R722.1

【文献标识码】 A

【基金项目】 贵州省卫生健康委员会科学技术基金项目 (gzwjkj2019-1-013)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.03.039

An Analysis of Newborn Screening and Gene Mutation of Diagnosis of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency in Guiyang*

LI Lin-jie, YANG Xue, LIU Xing-yu, ZHANG Xiao-yi, ZHANG He-xuan, WANG Lv-jin, ZHENG Lin*.

Department of Eugenic Genetics, Guiyang Maternal and Child Health Care Hospital, Guizhou Province, Guiyang 550003, China

Abstract: Objective To analyze newborn screening result of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Guiyang, investigate the incidence of G6PDD and its gene mutation, so as to provide decision-making basis for newborn disease screening in the future. **Methods** Chioce on septemper 2020 to December 2021, the sampel of dry blood spots of newborns that received by Neonatal Screening Center of Guiyang city, a total of 69537 cases(including male 37276,female 32261),using the fluoresent method for screening G6PDD, for screening positive recall venous blood was collected, using G6PD/6PGD ratio method and G6PD gene mutation analysis. **Rusult** The study showed that the overall positive rate of screening for G6PDD in newborn in Guiyang was 1.37% (954/69537),and the positive rates of male and female were 1.81%(674/37276) and 0.87%(280/32261), respectively, the difference between the two screening positive rate was statistically significant($\chi^2=112.972$, $P<0.001$); 594 cases of suspicious positive newborn recall, with a recall rate of 62.3%,238 cases confirmed, the overall incidence if G6PDD among newborns in Guiyang was calculated to be 0.7%. Among the 345 newborns diagnosed with G6PDD, 238 were detected with gene mutations, and a total of 10 mutation types were detected: 90 cases (31.5%) of c.1024C>T, 64 cases (22.4%) of c.1388G>A, 52 cases (18.2%) of c.95A>G, 50 cases (17.5%) of c.1376G>T, 12 cases (4.2%) of c.871G>A, 8 cases (2.8%) of c.487G>A, 3 cases (1.0%) of c.1004C>A, 3 cases (1.0%) of c.392G>T, 2 cases (0.7%) of c.592C>T, 1 cases (0.3%) of c.1360C>T and 1 compound mutations. **Conclusion** The five most comm G6PD gene mutations in Guiyang area are c.1024C>T, c.1388G>A, c.95A>Gr, c.1376G>T, c.871G>A, accounting for 93.8% of total creative genetic gene. G-6-PD deficiency is one of the high incidence of newborn disease screening in Guiyang reigion, it is of important significance to actively carry out G-6-PD deficiency screening in newborns.

Keywords: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase; Newborn Screening; Gene Mutation

G-6-PD缺乏症(glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PDD)被认为是最常见的人类酶病,每年影响约4亿成人和1100万新生儿^[1]。G-6-PD缺乏症往往因摄入蚕豆或药物等诱因引发,通常又称“蚕豆病”。临床表型呈多样化,大多数患者无症状,另一部分患者则发生严重的急性溶血性贫血和由此引起的高胆红素血症,新生儿期患儿严重者可发展为核黄疸,进而导致脑瘫伴智力低下。

G-6-PD缺乏症为不完全隐性X连锁遗传病,由X染色体长臂(Xq28)上的G6PD基因突变引起,主要影响男性(半合子)和女性(纯合子),而杂合女性可能由于X染色体的随机失活而发病。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)是一种胞质酶,可催化磷酸戊糖途径的第一步,催化NADP转化还原为NADPH,这一步有助于保护红细胞免收氧化损伤^[2]。世界范围内已发现G6PD基因的近230个亚型变异^[3],尽管它在世界范围内分布广泛,但流行率差异很大,从原始美洲印第安人的零到非洲和亚洲地区的20%^[4]。在中国,G-6-PD缺乏症的发病趋势具有“南高北低”的特点。国内目前已经报道了31种以上的突变类型,其中1388G>A、1376G>T、

95A>G最常见,占总突变类型的70~80%^[5]。目前没有任何药物能够作为该疾病的直接治疗方法,其预防主要依赖于避免诱因,减少溶血发生^[6]。因此在新生儿期对该项疾病开展筛查工作,争取对患儿做到早发现、早确诊、早预防,对提高儿童的健康水平意义重大。

本研究采用荧光定量法(Perkin Elmer)测定了来自贵阳地区的69537例新生儿干血斑样本中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)活性,对于可疑阳性患儿进行16个突变基因位点检测及酶活性测定(比值法),探索G-6-PD缺乏症在贵阳地区的患病率及基因突变特征谱,为本地区出生缺陷防治工作提供真实、准确的科学依据。

1 资料与方法

1.1 对象 2020年8月至2021年12月贵阳地区新生儿G-6-PD缺乏症筛查干血斑样本共计69537例,其中男性37276例,女性32261例。所有新生儿均于出生72h且充分哺乳后采集足跟血,滴于903#滤纸片自然阴干制成干血斑样本,保存于2~8℃冰箱,5个工作日内送达贵阳市新生儿遗传代谢病筛查中心实验室检测。

【第一作者】李林洁,女,主管技师,主要研究方向:新生儿疾病筛查。Email: 2110930013@qq.com

【通讯作者】郑琳,女,副主任医师,主要研究方向:出生缺陷防控。Email: 495039069@qq.com

1.2 仪器与试剂 新生儿初筛检测使用荧光定量法, 仪器使用GSP型时间分辨荧光免疫分析仪, 试剂采用PerKin Elmer公司提供葡萄糖-6-磷酸脱氢酶测定试剂盒(荧光分析法); 基因检测使用荧光定量PCR多色溶解曲线分析法(MMCA), Lab-Aid核酸提取Micro试剂盒和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测试剂盒(荧光PCR多色溶解曲线法)均来自于厦门致善生物科技股份有限公司, 以检测16种常见的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变: c.95A>G、c.383T>C、c.392G>T、c.487G>A、c.517T>C、c.592C>T、c.871G>A、c.1024C>A、c.1004C>A、c.1360C>T、c.1376G>T、c.1388G>A。

1.3 方法 所有样本到达实验室后首先进行新生儿G-6-PD缺乏症荧光定量法筛查, 结果 $\leq 27\text{U/dL}$ 则判定为可疑阳性, 首次筛查结果阳性进行召回复查, 复查结果仍为阳性则判定为筛查阳性, 疑似阳性样本召回进行基因突变检测及酶学诊断测定。

1.4 统计分析 使用SPSS 21.0统计软件进行统计分析, P 值小于0.05被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 筛查情况统计 2020年8月至2021年12月贵阳地区共有69537例(男性37276例, 女性32261例)活产新生儿接受了G-6-PD缺乏症筛查, 如表1所示, 首次筛查中有954例(男性674例, 女性280例)样本结果呈阳性, 初筛阳性率为1.37%, 其中男性初筛阳性率为1.81%(674/37276), 女性初筛阳性率为0.87%(280/32261)。

经非参数检验, 不同性别新生儿的G-6-PD初筛浓度值组间差异显著($P<0.05$), 不同孕周、出生体重G-6-PD初筛浓度值组间差异不

显著($P>0.05$); 经卡方检验, 不同性别、出生体重G-6-PD初筛阳性率组间差异显著($P<0.05$), 不同孕周G-6-PD初筛阳性率组间差异不显著($P>0.05$)。男性新生儿初筛阳性率(1.81%)显著高于女性新生儿初筛阳性率(0.87%)。

2.2 G-6-PD缺乏症新生儿筛查阳性的基因诊断情况 在954名初筛阳性新生儿中, 有233例通过荧光定量法对复采血片进行复查结果正常而排除, 有614例因复筛结果异常或首次筛查结果明显异常, 应召回做进一步诊断检查, 另107名新生儿未能成功召回。在后续诊断中, 345名新生儿(男性274例, 女性71例)进行了基因热点变异检测, 检出野生型样本59例(男性36例, 女性23例), 检出286名新生儿(男性238例, 女性48例)携带半合子、杂合子、纯合子或复查杂合子基因突变, 表明G-6-PD缺乏症筛查阳性与G6PD基因热点变异诊断符合率为82.9%(286/345), 其中, 男性新生儿符合率为86.9%(238/274), 女性新生儿符合率为67.6%(48/71)。

上述286名检出携带基因突变的筛查阳性儿中, 共检测到11种突变, 频率较高的变异是c.1024C>T(31.5%)和c.1388G>A(22.4%), 其次是c.95A>G(18.2%)和c.1376G>T(17.5%), 表2列出每个突变等位基因出现的频率。

2.3 召回确诊情况 954名初筛阳性新生儿共召回594例, 召回率62.3%, 结合G6PD基因诊断和酶学诊断结果最终302例新生儿(248例男性, 56例女性)确诊G-6-PD缺乏症。根据数据统计, 确诊符合率50.84%, 推算贵阳地区新生儿G-6-PD缺乏症总体发生率约为0.70%(总体发生率=贵阳地区新生儿G-6-PD缺乏症初筛阳性率 $\times$ 召回确诊与初筛符合率), 男性新生儿G-6-PD缺乏症总体发生率约为1.13%(1.81 $\times$ 62.63%), 女性新生儿G-6-PD缺乏症总体发生率约为0.25%(0.87 $\times$ 28.28%)。

表1 不同性别、孕周、出生体重G-6-PD指标浓度值及初筛阳性率组间比较

	N	初筛浓度值组间比较			初筛阳性率组间比较	
		G-6-PD浓度值	Z值/H值	P值	初筛阳性	χ^2 值 P值
性别			4.85	<0.001		112.972 <0.001
男	37276	59.1(49.9, 67.9)			674(1.81%)	
女	32261	59.5(50.3, 68.4)			280(0.87%)	
孕周			51.617	<0.001		1.832 0.4
<37周	3806	60.7(50.8, 70.4)			48(1.26%)	
37~41周	65509	59.2(50.1, 68.0)			905(1.38%)	
>41周	226	59.0(50.3, 69.0)			1(0.44%)	
出生体重			0.877	0.645		18.629 <0.001
<2500g	3042	59.5(49.7, 68.6)			46(1.51%)	
2500~3999g	63567	59.3(50.1, 68.1)			864(1.36%)	
$\geq 4000\text{g}$	2932	60.1(51.4, 69.1)			44(1.50%)	

表2 286例G6PD基因突变结果

突变类型	男性半合子(例)	女性杂合子(例)	女性纯合子(例)	合计(例)	占比(%)
c.1024C>T	78	12		90	31.5%
c.1388G>A	59	5		64	22.4%
c.95A>G	38	14		52	18.2%
c.1376G>T	41	8	1	50	17.5%
c.871G>A	7	5		12	4.2%
c.487G>A	8	0		8	2.8%
c.1004C>A	2	1		3	1.0%
c.392G>T	2	1		3	1.0%
c.592C>T	1	1		2	0.7%
c.1360C>T	1	0		1	0.3%
c.1024C>T.519C>T	1			1	0.3%
合计	238	47	1	286	100.0%

表3 594例G-6-PD缺乏症初筛阳性新生儿确诊情况

性别	召回例数	确诊阳性(例)	确诊符合率(%)
男	396	248	62.63%
女	198	56	28.28%
合计	594	304	51.18%

3 讨论

3.1 筛查情况分析 G-6-PD缺乏症是一种我国常见的遗传代谢病,是引发严重高胆红素血症的主要危险因素之一,并增加了胆红素神经毒性的风险,新生儿期筛查和预防对公众健康至关重要。我国G-6-PD缺乏症多发于华南地区,尤其是南方地区。在最近的一项全国性调查中^[7],中国G-6-PD缺乏症的发病率为0.008-3.387%,山西省最低,广西省最高,其中报道贵州G-6-PD发病率为0.486%(所选人群不明),在另一研究中,G-6-PD缺乏症基因携带者频率为1.94%^[8]。在本研究中,贵阳市地区G-6-PD缺乏症的发病率估计为0.70%,与上述报道数据有差异,这可能与研究所选取的人群差异导致。贵州是一个多民族省份,境内有49个民族,三个少数民族自治州,而贵阳市作为贵州的省会城市,地处贵州地理要道,明朝就进行过“移民实边”的举措,近代全面抗战期间又有大规模的移民,大批的移民促进了贵阳的发展,也形成了贵阳地区特有的人群结构,贵阳地区以汉族为主,在本研究的新生儿人群中,汉族占98.75%,其他少数民族仅占1.25%,在本次检出的致病基因携带者中,仅有4名为少数民族(布依族2,穿青人1,彝族1)。因此贵阳地区虽属贵州省,但由于其民族结构以汉族为主,G-6-PD缺乏症发病率明显低于已报道的贵州少数民族地区(6.5-8.9%)^[9-11]。

G-6-PD缺陷是一种X染色体连锁不完全显性遗传病,男性只有一条X染色体,因此男性群体中仅存在正常或者显著缺乏的半合子两类人群,女性因具有两条X染色体,存在纯合子、杂合子和健康者三类人群,此外,具有半合子女性杂合子也可能由于X染色体的随机失活而缺陷。本研究结果显示,贵阳地区G-6-PD缺乏症男性发病率估计为1.13%,女性发病率为0.25%,结果符合G-6-PD缺乏症伴性不完全显性遗传的一般规律。虽然贵阳地区的发病率处于本省较低水平,但与本地的甲状腺功能减低症及苯丙酮尿症的患病率相比(CH为1:2145,PKU为1:9553),该病仍属于贵阳地区的高发病种之一,应用荧光定量法在新生儿中开展G-6-PD缺乏症筛查,贵阳地区新生儿筛查阳性率为1.37%,男性新生儿初筛阳性率为1.81%,女性新生儿初筛阳性率为0.87%,与已报道的贵阳地区荧光斑点定性筛查阳性率1.21%接近^[12]。据文献报道,四川地区新生儿G-6-PD缺乏症筛查阳性率为0.51%^[13],广西地区筛查阳性率为7.36%^[14],重庆地区筛查阳性率为2.4%^[15],云南10个民族筛查阳性率为0~8.6%^[16],贵阳地区的筛查阳性率高于邻省四川地区,低于广西、重庆、云南地区。

遗传背景差异是影响G6PD变异谱的因素之一,G6PD的基因分型不仅对诊断至关重要,而且对流行病学调查和基因型-表型相关性研究也是必不可少的。本研究共鉴定出11种基因型,其中最常见5种基因型为c.1024C>T、c.1388G>A、c.95A>G、c.1376G>T、c.871G>A,约占贵阳已鉴定致病等位基因的93.8%,这五种常见致病变异与2019年Liu报道的四川、重庆、贵州、湖南、广西、广东和海南等省的常见五种致病变异一致^[7],显示遗传背景的区域一致性。G-6-PD缺乏症因其遗传多样性

的表现,不同的基因突变导致不同程度的酶缺乏和疾病表现,这5种常见的基因突变都属于WHO分型II类或III类^[17],具有II类突变的新生儿的酶活性远低于III类突变的,即使在同一II类中,不同的突变有可能导致具有统计学意义的不同程度的酶缺乏^[18]。

综上所述,目前在贵阳地区开展新生儿G-6-PD缺乏症筛查工作是具有可行性的,应用荧光定量法对新生儿干血斑标本进行G-6-PD缺乏症筛查,样本易于采集与运输,检测灵敏且快捷,筛查阳性患儿的及时诊断在筛查工作中也至关重要,酶活性检测简单快速,基因检测可以防止女性杂合子的漏诊,有条件在确诊时可酶活性检测及基因检测同时进行。本研究从新生儿筛查的角度探讨贵阳地区G-6-PD缺乏症的遗传学特点,初步统计了本地地区的G-6-PD缺乏症的发病率和基因突变情况,可为贵阳遗传咨询和预防该病提供参考。

参考文献

- [1] Zahed Pasha, Yadollah. Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme deficiency in Iranian newborns: A systematic review and meta-analysis [J]. Caspian J. Pediatr, 2020, 6 (1), 376-386.
- [2] Maysaa Alakbar, Sayazwani Amran, Mohd Shamsir, et al. Human G6PD variant structural studies: Elucidating the molecular basis of human G6PD deficiency [J]. Gene Reports, 2022, 27: 101634.
- [3] Janwal M, Aggarwal A, Das A, et al. Next-generation sequencing unravels homozygous mutation in glucose-6-phosphate isomerase, GPIc. 1040G>A (p. Arg347His) causing hemolysis in an Indian infant [J]. Clinica Chimica Acta, 2017, 468: 81-84.
- [4] Luzzatto L, Ally M, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency [J]. Blood, 2020, 136 (11): 1225-1240.
- [5] 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): 143-145.
- [6] Kaitlyn Ryan, Babu L. Tekwani, et al. Current investigations on clinical pharmacology and therapeutics of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2021, 222: 107788.
- [7] Liu Z, Yu C, Li Q, et al. Chinese Newborn Screening for the Incidence of G6PD Deficiency and Variant of G6PD Gene from 2013 to 2017 [J]. Hum Mutat, 2020, 41 (1), 212-221.
- [8] Shengwen Huang, Yin Xu, Xingmei Liu, et al. Molecular newborn screening of four genetic diseases in Guizhou Province of South China [J]. Gene, 2016, 591 (1): 119-122.
- [9] 修瑾, 齐晓岚, 单可人. 贵州三都水族居民葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症基因突变研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13 (1): 147-150.
- [10] 单可人, 修瑾, 吴昌学, 等. 贵州西江苗族葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变分析 [J]. 地方病学杂志, 2004, 23 (4): 327-329.
- [11] 吴昌学, 何燕, 单可人, 等. 贵州荔波县瑶族葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷症基因突变研究 [J]. 中华地方病学杂志, 2006, 4: 402-404.
- [12] 厉勇, 杨明, 菲肖琨, 等. 贵阳地区新生儿G6PD酶筛查结果分析 [J]. 中国实验诊断学, 2014, 18 (7): 1171-1172.
- [13] 周婧瑶, 张钰, 胡琦, 等. 四川地区新生儿G6PD缺乏症筛查及确诊情况分析 [J]. 中国妇幼健康研究, 2020, 31 (2): 263-266.
- [14] 赖春慧, 李荣, 蒙春华. 4296例新生儿G6PD筛查结果分析 [J]. 医学检验与临床, 2019, 30 (3): 3.
- [15] 苗静琨, 万科星, 张娟, 等. 重庆地区开展新生儿CAH和G6PD筛查的初步报告 [C]// 中华医学会第十五次全国儿科学术大会. 230-231.
- [16] 王兴田, 姚莉琴, 约团标, 等. 云南10种特有少数民族学龄前儿童葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症调查 [J]. 中国生育健康杂志, 2011, 22 (4): 199-201.
- [17] Weiying Jiang, Guolong Yu, Peng Liu, et al. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population [J]. Human Genetics, 2006, 119: 463-478.
- [18] 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.

(收稿日期: 2023-01-08)

(校对编辑: 姚丽娜)