

· 论著 · 罕见病 ·

罕见葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症合并原发性肉碱缺乏症的遗传学研究*

祝群 祖宇瑶 邓静 谢丹晨 彭赞平 邬洪梁*

岳阳市妇幼保健院(湖南岳阳 414000)

【摘要】目的 对一例疑似G6PD缺乏症合并原发性肉碱缺乏症患者进行遗传学诊断和家系分析。**方法** (1)应用荧光分析法检测G6PD活性。(2)应用串联质谱检测游离肉碱浓度。(3)应用PCR-导流杂交法进行G6PD基因热点突变检测。(4)应用NGS+Sanger进行基因诊断并行家系分析。**结果** (1)先证者母亲G6PD酶活性降低,为3.54 U/g Hb。(2)先证者母亲游离肉碱降低,值为1.63 $\mu\text{mol/L}$ 。(3)先证者母亲G6PD基因存在c.1388G>A(p.R463H)杂合突变。(4)先证者母亲SLC22A5基因存在c.51C>G(p.F17L)和c.1400C>G(p.S467C)复合杂合突变(分别来源于其父母)。**结论** 某些患者可能合并多种单基因遗传病,故应注重遗传病诊断的全面性;基因突变的检出可为疾病确诊提供病因学证据,为遗传咨询再生育指导提供依据。

【关键词】 G6PD缺乏症;原发性肉碱缺乏症;遗传学诊断

【中图分类号】 R446.9

【文献标识码】 A

【基金项目】湖南省卫健委资助课题(20200921);湖南省卫健委资助课题(C202301039024)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2026.3.009

Genetic Study of Rare G6PD Deficiency Combined with Primary Carnitine Deficiency*

ZHU Qun, ZU Yu-yao, DENG Jing, XIE Dan-chen, PENG Zan-ping, WU Hong-liang*.

Yueyang Maternal and Child Health Care Hospital, Yueyang 414000, Hunan Province, China

Abstract: Objective To conduct genetic diagnosis and family analysis in a patient with suspected G6PD deficiency and primary carnitine deficiency. **Methods** (1) G6PD activity was detected by fluorescence analysis. (2) Tandem mass spectrometry was used to detect the concentration of free carnitine. (3) PCR-conduction hybridization method was used to detect G6PD gene hotspot mutations. (4) NGS+Sanger sequencing was used for genetic diagnosis and family analysis. **Results** (1) The activity of G6PD enzyme in the proband mother was reduced to 3.54 U/g Hb. (2) The free carnitine of the proband mother was reduced, and the value was 1.63 $\mu\text{mol/L}$. (3) The proband mother's G6PD gene had a heterozygous mutation of c.1388G>A (p.R463H). (4) The proband mother SLC22A5 gene has c.51C>G (p.F17L) and c.1400C>G (p.S467C) compound heterozygous mutations (derived from their parents, respectively). **Conclusion** Some patients may have multiple monogenic genetic diseases, so it is essential to pay attention to the comprehensiveness of genetic disease diagnosis. The detection of gene mutations can provide etiological evidence for disease confirmation and serve as a basis for genetic counseling and reproductive guidance.

Keywords: G6PD Deficiency; Primary Systemic Carnitine Deficiency; Genetic Diagnosis

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)缺乏症(OMIM# 300908)是指红细胞G6PD活性降低或性质改变导致的以溶血为主要表现的一种疾病。疾病可引发先天性非球形红细胞性溶血、新生儿黄疸、蚕豆病、药物性溶血、感染诱发溶血等^[1-2],进而导致新生儿乃至成人出现慢性或急性溶血。对于成人,当出现急性溶血时,严重者可伴有休克和急性肾功能衰竭症状;若是孕产妇急性溶血则可能导致胎儿早产甚至死产。对于新生儿,常见溶血性黄疸,严重情况下可能发展为新生儿核黄疸,从而导致患儿智力低下甚至死亡,给患儿家庭带来不幸^[3]。

原发性肉碱缺乏症(primary systemic carnitine deficiency, PCD)(OMIM# 212140),亦称肉碱摄取障碍或肉碱转运障碍,是一种由于SLC22A5基因突变引起OCTN2蛋白转运功能缺陷所导致的脂肪酸 β 氧化障碍代谢病^[4]。PCD具有临床异质性,可于任何年龄发病,症状包括脑功能障碍、心肌病、肌病、肝脏损害、消化道症状、呼吸道症状及贫血

等,部分患者不表现任何症状。PCD被认为是一种潜在的致死性疾病,患者可因急性能量代谢障碍危象或急性心衰而猝死。PCD的患病率具有明显的地域及种族差异,本地区PCD发病率为1/14465(数据尚未公开发表),远高于浙江省PCD发病率1/23369^[5],同时也高于东营市的1/14465^[6]和广州市的1/13345^[7]。G6PD缺乏症和PCD均属于相对罕见性疾病,两者同时发生的概率极低,因此国内经遗传学诊断确诊病例的相关研究报道很少。

1 资料与方法

1.1 一般资料 先证者为男性,39周顺产,因患黄疸、溶血症入住我院新生儿科。先证者母亲体格检查无异常,G2P2,无不良妊娠史。先证者行新生儿串联质谱检查:游离肉碱为3.35 $\mu\text{mol/L}$ (正常参考值为9.5~50 $\mu\text{mol/L}$),召回岳阳市新生儿疾病筛查中心,先证者为母乳喂养,无特殊不适,进行复查。母子二人均行串联质谱检查,发现先证者母亲游离肉碱为1.63

【第一作者】祝群,女,副主任技师,主要研究方向:新生儿遗传代谢病诊治。E-mail: zhuqun0701@163.com

【通讯作者】邬洪梁,男,副主任医师,主要研究方向:出生缺陷防控新技术。E-mail: wuhongliang101@163.com

μmol/L, 怀疑其存在脂肪酸代谢异常待排。同时鉴于先证者母亲祖籍广西, 其子新生儿期有黄疸、溶血并有换血治疗史, 高度可疑先证者为G6PD缺乏症, 召回并进行了充分遗传咨询, 经医院伦理委员会同意, 家属签署知情同意后, 采集先证者母亲的父母血样, 对该家系行全面遗传学检测分析。

1.2 方法

1.2.1 G6PD荧光分析法筛查检测 采用广州达瑞生物技术股份有限公司的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶测定试剂盒, 严格按照标准操作规范进行操作, 用PE公司VICTOR 1420型96微孔反应板的多标记荧光检测仪测量。并使用按照本实验室条件制定的切值进行筛查结果判断, 检测样本参考值: 女性≥4.1U/g Hb, 男性≥2.6U/g Hb。超出参考值, 则判断为G6PD缺乏症初筛阳性, 需要进一步基因确诊。

1.2.2 串联质谱检测 经知情同意后, 采集先证者母亲毛细血管血制成合格干血斑, 按规范保存后待检, 采用Waters公司的串联质谱仪, 试剂采用PE公司的非衍生化法多种氨基酸、肉碱和琥珀酰丙酮测定试剂盒。严格按照标准操作规范进行操作, 通过Waters串联质谱系统检测分析物信号强度与对应的内标信号强度计算氨基酸、游离肉碱及多种类型酰基肉碱的浓度。质控品有高低两个水平, 和样品在同样条件下复孔检测。实验结果确保在质控均在控下出具。串联质谱检测选用百分位数法建立参考区间, 以第99.5百分位数与第0.5百分位数作为各检测指标的参考上限和下限。在结果判读时, 结合胎龄(年龄)、用药史、饮食、体重等信息综合评估。

1.2.3 PCR-导流杂交法 (1)利用凯普公司的血液基因组DNA试剂盒(离心柱型)提取DNA, 取3μL DNA作为模板进行扩增。(2)将扩增后的核酸与杂交液在恒温杂交仪中开泵进行导流杂交, 杂交温度为45°C, 杂交时间为30min。(3)杂交结束后, 先后用封阻液封闭膜5min、酶标液温育5min、洗膜4次, 最后加入显色液显色。(4)参照试剂盒说明书判断实验结果。

1.2.4 基因检测 取检体静脉外周血5mL, 加入EDTA抗凝, 其中2mL利用Qiagen Blood DNA mini kit(Qiagen)提取基因组DNA,

采用安捷伦公司定制PAH、PTS、PCBD1、QDPR、SPR、GCH1等86个遗传代谢病相关基因的捕获探针, 通过多重探针杂交方法靶向富集目标区域序列; 使用Agencourt AMPure XP磁珠(Beckman Coulter)纯化捕获产物。按照TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina(Vazyme)建库试剂盒操作说明书处理纯化产物, 利用定量试剂盒(Illumina DNA Standa ds a nd Primer Premix Kit, kapa)进行文库精确定量确定上机样本量, 最后在HiSeq 2500(Illumina)平台进行测序反应。对所发现的突变使用Sanger测序进行位点验证, 在ABI 3500XL(Applied Biosystems)平台进行测序分析, 引物序列见表1。

2 结果

2.1 G6PD酶活性检测结果 先证者G6PD酶活性为4.2U/gHb(>2.6U/g Hb), 先证者母亲G6PD酶活性为3.54U/gHb(<4.1 U/g Hb), 先证者G6PD酶活性正常, 先证者母亲酶活性降低, 见表1。

2.2 串联质谱检测结果 新筛串联质谱检测显示先证者游离肉碱水平偏低(C0=3.53μmol/L), 召回复查串联质谱游离肉碱水平仍低(C0=7.93μmol/L), 同时先证者母亲串联质谱检测发现游离肉碱水平也偏低(C0=1.63μmol/L), 考虑为母源性肉碱缺乏症或者原发性肉碱缺乏症, 与家属沟通后, 针对先证者母亲家系行基因检测。

2.3 PCR-导流杂交法检测结果 PCR导流杂交法分析结果见图2和表1。先证者检出有G6PD基因(OMIM*305900) c.1388G>A(p.R463H)杂合突变, 父亲为野生型, 未检出12种G6PD基因常见突变。先证者与其母亲及外婆均检出G6PD基因c.1388G>A(p.R463H)突变。

2.4 NGS+Sanger测序 先证者母亲检出SLC22A5基因(OMIM*603377)c.51C>G(p.F17L)和c.1400C>G(p.S467C)复合杂合突变, 见表2, 其中致病性评级见表3。该致病基因分别遗传自先证者外公和外婆, 见图3。SLC22A5基因与原发性肉碱缺乏症相关, 为常染色体隐性遗传。家系系谱图见图3B。

表1 SLC22A5基因扩增各外显子PCR引物序列

外显子	引物序列	扩增区间	序列片段大小
SLC22A5-e1F-9	TGTA AACGACGGCCAGTAACCTTCCTGTCGTG	chr5:131705459+131706162	704bp
SLC22A5-e1R-9	CAGGAAACAGCTATGACCGAGTGACAGCGTCCAGTG		
SLC22A5-e8F-9	TGTA AACGACGGCCAGTTTTGGAGGGAAATCTTGG	chr5:131727965+131728492	528bp
SLC22A5-e8R-9	CAGGAAACAGCTATGACCCATTTGAAAGTGAGGGC		

表2 先证者家系相关成员中各技术检测结果明细表

关系	G6PD 酶活性(U/g Hb)	串联质谱结果(μmol/L)	PCR-导流杂交法检测	NGS+Sanger测序
先证母亲	3.54 ↓	C0=1.63 ↓	G6PD基因c.1388G>A(p.R463H) 杂合突变	SLC22A5基因c.51C>G(p.F17L)和c.1400C>G(p.S467C)复合杂合突变
先证者	4.2	C0=3.53 ↓(初筛) C0=7.93 ↓(复查)	G6PD基因c.1388G>A(p.R463H)半合子突变	SLC22A5基因c.51C>G(p.F17L)杂合突变
先证者外公	5.5	C0=22	未检出常见12种突变	SLC22A5基因c.1400C>G(p.S467C)杂合突变
先证者外婆	3.8 ↓	C0=18	G6PD基因c.1388G>A(p.R463H) 杂合突变	SLC22A5基因c.51C>G(p.F17L)杂合突变

表3 ACMG致病性评级

	SLC22A5基因c.51C>G(p.F17L)杂合突变	SLC22A5基因 c.1400C>G(p.S467C)杂合突变
综合评级	致病性变异	致病性变异
致病变异分级标准证据项描述	功能研究显示, PM3_VS 该变异导致蛋白质功能受到影响	功能研究显示, PM3_S 该变异导致蛋白质功能受到影响
	本地数据库显示, PP1_S 多例患者在该变异的反式位置 上检测到致病变异	本地数据库显示, PP1_S 多例患者在该变异的反式位置上检测到致病变异
	该变异与疾病在家系中共分离 PS3	该变异与疾病在家系中共分离 PS3

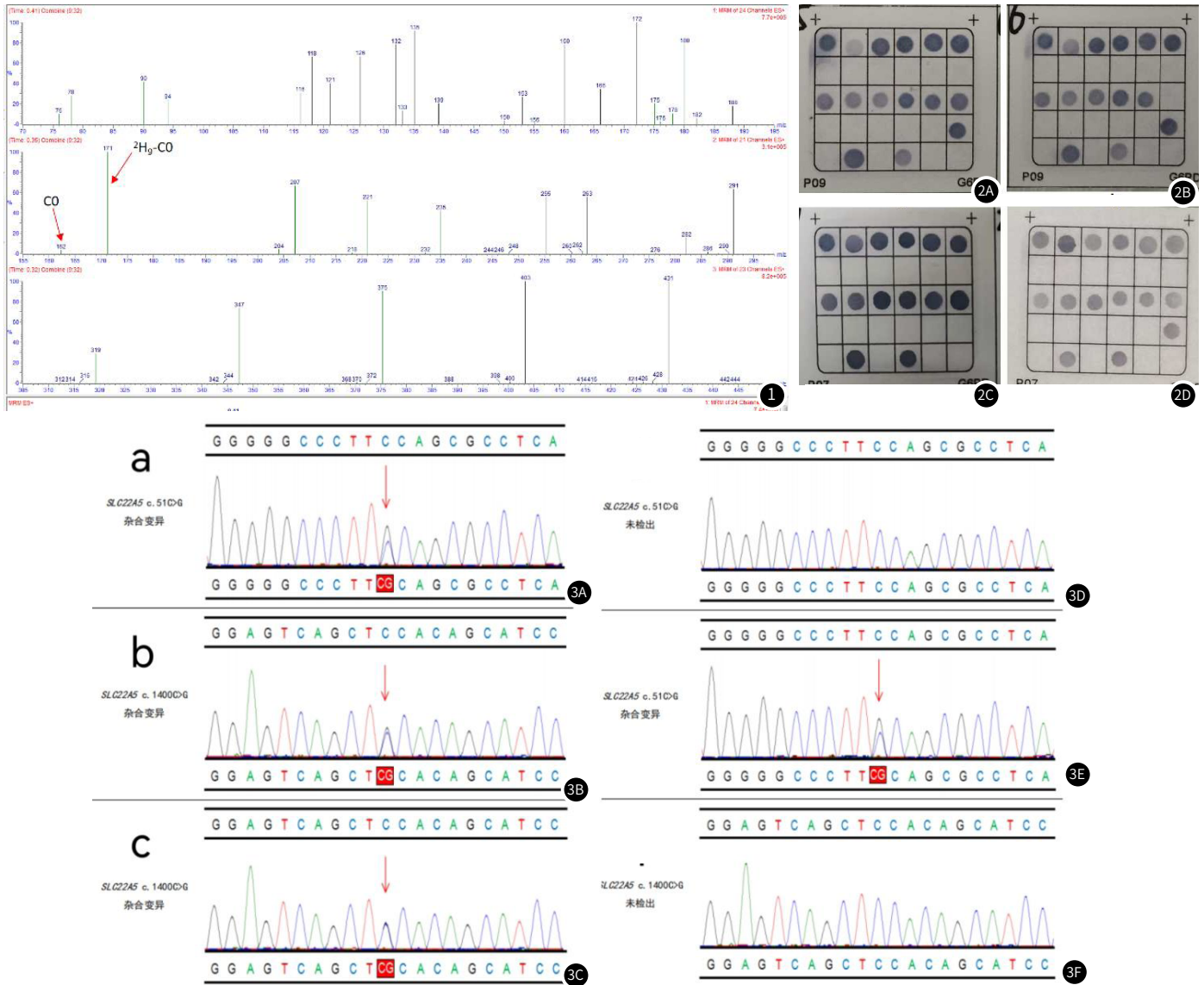


图1 先证者母亲串联质谱棒状图。图2 先证者家系PCR导流杂交法结果图。图2A: 先证者母亲c.1388G>A(p.R463H)杂合突变; 图2B: 先证者c.1388G>A(p.R463H)半合子突变; 图2C: 先证者外公未检出14种常见突变; 图2D: 先证者外婆c.1388G>A(p.R463H)杂合突变。图3 NGS+Sanger测序检测结果。图3A: 先证者母亲SLC22A5 c.51C>G(p.F17L)杂合突变; 图3B: 先证者母亲SLC22A5基因c.1400C>G(p.S467C)杂合突变; 图3C: 先证者外公SLC22A5 c.1400C>G(p.S467C)杂合突变; 图3D: 先证者外公SLC22A5基因c.51C>G(p.F17L)未检出; 图3E: 先证者外婆SLC22A5 c.51C>G(p.F17L)杂合突变; 图3F: 先证者外婆SLC22A5基因c.1400C>G(p.S467C)未检出。

3 讨论

G6PD缺乏症遗传模式为X染色体连锁不完全显性遗传,其发病率有地域差异,一般在广东、广西等长江以南的区域发病率较高^[8]。它是G6PD基因突变引起的遗传性代谢性障碍,临床上分为新生儿黄疸、蚕豆病、药物性溶血和先天性非球形细胞溶血等亚型。本病一般来势急剧,患者如不及时进行治

疗,可因缺氧引起抽搐,肾功能衰竭,甚至死亡。患G6PD缺乏症的新生儿出生时多无特殊表现,通常在出生后2~3d出现黄疸,3.4~6.1d可出现核黄疸,导致智力下降甚至死亡。

岳阳地区自2014年起将G6PD缺乏症纳入新生儿疾病筛查范围,沈玉燕^[9]研究表明此病以男性发病为主。黄婵^[10]研究显示三亚地区该病在男性当中发病率约5.52%,女性当中发病率

约1.09‰。由于大部分女性杂合突变由于酶缺失程度不一，其酶活性介于缺失到正常之间，因此仅凭酶活性难以对女性杂合突变进行准确诊断^[11]。李磊等^[12]研究显示，采用酶活性检测的方法，携带G6PD基因突变的女性漏检率达70.2%，且均为单一G6PD基因杂合突变。本中心为增加对女性G6PD基因杂合突变的检出，设置了男女切值。本研究中先证者母亲G6PD酶活性为3.54U/g Hb(<4.1U/g Hb)，按照本中心所制订女性切值范围属于G6PD缺乏症可疑阳性，若以男女统一切值范围进行判读则为初筛阴性，从而漏诊。先证者母亲同时应用PCR-导流杂交法检测，证实存在G6PD基因c.1388G>A(p.R463H)杂合突变。因此针对男女分别设置切值，有利于提高女性G6PD缺乏症杂合突变的检出率，这与Jing-King等^[13]的研究结论相一致。张钰等^[14]则认为切值的设置需因地制宜，兼顾筛查效率与检出率。本中心的女性新生儿切值范围基于本地区数据库建立，事实表明该方法显著提高了女性杂合子的检出率。先证者新生儿期有黄疸、溶血等临床特征，新筛G6PD酶活性为4.2U/g Hb(>2.6U/g Hb)，为阴性。由此可见新生儿G6PD检测时，若仅依据G6PD酶活性结果进行判读会导致漏诊，因此应充分结合临床资料进行诊断，降低漏诊率。

PCD为常染色体隐性遗传，是一种由于编码细胞膜上高亲和力的肉碱转运体肉碱转运蛋白基因突变所致的脂肪酸代谢异常病，患者常表现为血浆肉碱水平明显下降及组织细胞内肉碱缺乏，从而引起心脏、肝脏、骨骼肌等多系统损害^[15]。胎儿肉碱来源于母体，若母亲为PCD患者，胎儿娩出后会表现为肉碱水平低下，但随着婴儿自身代谢途径逐渐成熟，肉碱水平可逐步自行恢复。本研究中先证者的母亲为成年女性，通过其子新生儿疾病筛查异常结果最终确诊为PCD。多种遗传代谢病检测起步晚于传统新筛项目，成年人普遍在新生儿期未行遗传代谢病检测，另外，部分遗传代谢病有隐匿性，部分为晚发型。因此在临床诊治中，成年人遗传代谢病往往易漏诊误诊，故针对临床表现复杂的情况要采取多种遗传学检测方法，增加遗传性疾病的检出率，避免因遗传代谢病而导致不良结局。我们在先证者母亲样本中检出SLC22A5基因c.51C>G(p.F17L)和c.1400C>G(p.S467C)复合杂合突变，其中c.51C>G(p.F17L)突变导致基因第17位上的苯丙氨酸改变为亮氨酸，影响了肉碱转运蛋白的功能。c.1400C>G(p.S467C)突变导致第467位的丝氨酸变成半胱氨酸，影响了肉碱的吸收^[16]。两个突变位点均为热点突变^[17-19]，其中c.1400C>G(p.S467C)是一个常见的母源性PCD突变^[20]，与我们的研究结果一致。

尽管G6PD缺乏症和PCD在我国人群的发病率相对较高，但G6PD缺乏症合并PCD发生的概率极为罕见，国内鲜有资料可以查证。Yiming等^[21]报道了一例PCD合并希特林蛋白缺乏症的病例，并认为新生儿生化代谢筛查异常进行基因诊断是非常有必要的。陈嵘等^[22]报道了G6PD缺乏症合并地中海贫血的病例，并发现当G6PD缺乏症合并地贫发生时，G6PD活性结果可能受到影响，从而导致漏检，尤其是女性杂合子，因此需要进行基因检测诊断并行家系分析。而国内关于G6PD缺乏症合并PCD的病例鲜有报道，这两种疾病的互作关系尚不清晰，

因此我们将持续对该患者进行长期随访。

参考文献

- [1] 魏庆玲. 中山地区近十年新生儿G6PD缺乏症筛查、检测方法及部分患儿基因检测结果分析[D]. 南方医科大学, 2023.
- [2] 汤文建, 黄裕斌, 李莉, 等. 基于高胆红素血症新生儿苍白球/壳核T1WI信号强度比值模型构建及其对胆红素脑病的预测价值[J]. 中国CT和MRI杂志, 2024, 22(4): 23-25.
- [3] 李林洁, 杨雪, 刘兴宇, 等. 贵阳地区新生儿G-6-PD缺乏症筛查及基因突变分析[J]. 罕少疾病杂志, 2023, 30(3): 90-92.
- [4] Magoulas PL, El-Hattab AW. Systemic primary carnitine deficiency: an overview of clinical manifestations, diagnosis, and management[J]. Orphanet J Rare Dis, 2012, 7: 68.
- [5] 杨茹莱, 童凡, 郑静. 原发性肉碱缺乏症筛查诊断及治疗[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(1): 14-18.
- [6] 王长勇, 任玉宝, 耿萌. 东营市115720例新生儿原发性肉碱缺乏症筛查及诊治分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2021, 29(7): 1007-1010.
- [7] 黄永兰, 唐诚芳, 刘思迟, 等. 广州市原发性肉碱缺乏症新生儿筛查评估及SLC22A5基因突变谱特征[J]. 中华儿科杂志, 2020, 58(6): 476-481.
- [8] 侯伟, 付晓琳, 谢潇潇, 等. 中国人群33104例单基因病携带者筛查的多中心研究[J]. 南方医科大学学报: 1-9.
- [9] 沈玉燕, 黎剑, 肖刚. 怀化市266408例新生儿G6PD缺乏症筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(7): 86, 98.
- [10] 黄婵, 莫李媚, 赵玉梅, 等. 三亚地区新生儿G6PD缺乏症筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2020, 28(5): 615-617.
- [11] 刘佳欣, 刘荣秋, 李婷, 等. 新生儿G6PD缺乏症的风险预测模型的构建及验证[J]. 中国优生与遗传杂志, 2024, 32(2): 237-246.
- [12] 李磊, 郭洪创, 肖奇志, 等. 逆遗传方向研究男性G6PD缺乏症及其母亲的表型与基因型[J]. 中国生育健康杂志, 2019, 30(3): 232-236
- [13] Miao J K, Chen Q X, Bao L M, et al. Determination of optimal cutoff value to accurately identify glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient heterozygous female neonates[J]. Clinica Chimica Acta, 2013, 424: 131-135.
- [14] 张钰, 欧明才, 胡琦, 等. 四川省新生儿G6PD缺乏症筛查切值的探讨[J]. 中国妇幼保健研究, 2018, 29(3): 337-341.
- [15] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会新生儿遗传代谢病筛查学组, 中华医学会儿科分会出生缺陷预防与控制专业委员会, 中国医师协会医学遗传医师分会临床生化遗传专业委员会, 等. 原发性肉碱缺乏症筛查与诊治共识[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(2): 88-92.
- [16] 杨金玲, 陈大字, 谭建强, 等. 新生儿原发性肉碱缺乏症基因携带者生化和遗传特征研究[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(3): 369-372.
- [17] Li X, He J, He L, et al. Spectrum analysis of inherited metabolic disorders for expanded newborn screening in a central Chinese population[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12.
- [18] Zhou M, Deng L, Huang Y, et al. Application of the artificial intelligence algorithm model for screening of inborn errors of metabolism[J]. Frontiers in Pediatrics, 2022, 10.
- [19] Lin Y, Lin B, Chen Y, et al. Biochemical and genetic characteristics of patients with primary carnitine deficiency identified through newborn screening[J]. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2021, 16(1): 1-7.
- [20] Lee N C, Tang N L S, Chien Y H, et al. Diagnoses of newborns and mothers with carnitine uptake defects through newborn screening[J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2010, 100(1): 46-50.
- [21] Lin Y, Lin W, Chen Y, et al. Combined primary carnitine deficiency with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency in a Chinese newborn[J]. BMC Pediatrics, 2020, 20(1): 1-5.
- [22] 陈嵘, 陈桂兰, 屈艳霞, 等. G6PD缺乏症合并地中海贫血患者G6PD活性和基因突变类型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(6): 26-27, 11.

(收稿日期: 2024-11-02)

(校对编辑: 韩敏求)

(排版编辑: 刘维嘉)