

## c. 1311C > T 和 c. 1004C > A 与广西 G6PD 缺乏症的发病风险相关性

石 凤<sup>1,2</sup>, 滕元姬<sup>1,2</sup>, 何丽桥<sup>2</sup>, 李 兰<sup>2</sup>, 李光景<sup>1</sup>, 仇雯丽<sup>2</sup>, 王春芳<sup>1</sup>, 王俊利<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探究广西人群葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)基因单核苷酸多态性(SNP)位点 c. 1311C > T 和 c. 1004C > A 与 G6PD 缺乏症的发病风险相关性。方法 随机选取 417 例 G6PD 缺乏症患者作为病例组, 295 例健康人群作为对照组。使用 SNPscan™ 多重 SNP 方法对 c. 1311C > T 和 c. 1004C > A 进行基因分型, 通过 SHEsis 分析两位点单倍型频率。结果 在病例组和对照组中, c. 1311C > T 位点的基因型 TT, CC + CT 和等位基因 T 的分布频率差异具有统计学意义[TT vs CC: ( $P = 0.001$ ,  $OR = 0.373$ ,  $95\% CI = 0.204 \sim 0.683$ ); TT vs CC + CT: ( $P = 0.001$ ,  $OR = 0.371$ ,  $95\% CI = 0.203 \sim 0.678$ ); T vs C: ( $P = 0.002$ ,  $OR = 0.601$ ,  $95\% CI = 0.435 \sim 0.829$ )] ; 而 c. 1004C > A 位点的基因型和等位基因分布频率差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。速率法检测结果显示: 相对于基因型 CC, c. 1311C > T 位点的基因型 CT 增加 G6PD 酶表达水平, 基因型 TT 降低 G6PD 酶表达水平( $P < 0.05$ ), 单倍型结果显示 C-C 和 T-C 与 G6PD 发病风险有关( $P < 0.05$ )。结论 在广西人群中, c. 1311C > T 位点基因型 TT, CC + CT 和等位基因 T 与 G6PD 缺乏症的发病风险降低具有相关性。

**关键词** 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 单核苷酸多态性; c. 1311C > T; c. 1004C > A

**中图分类号** R 556.61

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0165-04  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.032

先天性溶血性贫血包括红细胞酶异常、红细胞膜异常和血红蛋白异常, 其中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)缺乏症是常见的因红细胞酶异常而引起的溶血性疾病<sup>[1]</sup>。G6PD 是以 X 染色体连锁不完全的显性遗传性溶血性疾病, 俗称“蚕豆病”, 临床表现为 G6PD 酶表达水平降低, 在中国南方广东、广西地区的发病率较高。由于其遗传特性, 在男性患者的发病率明显高

于女性患者<sup>[2]</sup>。G6PD 酶表达水平不足可影响红细胞的不稳定性, 导致红细胞氧化损伤、引起溶血反应, 严重者可引起高胆红素血症进而产生神经毒性, 威胁患者生命健康<sup>[3]</sup>。G6PD 基因突变可能会引起 G6PD 酶表达水平降低, 广西最常见的突变基因位点包括 95A > G、1376G > T、1388G > A<sup>[4]</sup>。该研究分析 G6PD 基因 c. 1311C > T 和 c. 1004C > A 位点突变与 G6PD 缺乏症和酶表达水平的相关性, 探讨该位点突变是否会引起表型改变, 为 G6PD 缺乏症提供实验数据支撑, 为筛查 G6PD 缺乏症患者提供更加全面的检测指标。

### 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 随机选取 2017 年 1 月—2019 年 6 月经确诊的 417 例 G6PD 缺乏症患者作为病例组, 并选取同期进行 G6PD 筛查的 295 例健康人群作为对照组, 其中, 病例组男性 261 例, 女性 156 例; 对照组男性 98 例, 女性 197 例。病例组年龄为 1 ~ 90 (35.05 ± 22.33) 岁, 对照组年龄为 1 ~ 86 (36.11 ± 18.48) 岁, 两组年龄差异不具有统计学意义( $P = 0.491$ )。所有研究样本均于右江民族医学院附属医院检验科检测, 并经临床医师诊断确诊。本研究的所有研究对象均经受试者本人知情同意并签署知情同意书。

**1.2 全基因组 DNA 提取** 采集受试者 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝全血 2 ml, 3 000 r/min 离心 5 min, 去掉上清液, 吸取 20 μl 压积红细胞于 1 ml 去离子水完全溶解, 使用 G6PD 酶检测试剂盒(上海执诚生物科技有限公司), 采用日立 7600-series 全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术公司)检测 G6PD 酶活性的表达。再提取全基因组 DNA, 于 -80 °C 超低温冰箱保存待测。

**1.3 多重单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) 分型检测** 使用 SNPscan™ 多重 SNP 方法对 G6PD SNP c. 1311C > T 和 c. 1004C > A 进行分型。操作步骤为: ① 设计 3 条探针引物序列, 包括 5' 端的通用引物序列和等位基因鉴别引物

2021-10-13 接收

基金项目: 广西重点研发计划项目(编号: 桂科 AB18221029)

作者单位: 右江民族医学院<sup>1</sup> 附属医院生殖医学中心、<sup>2</sup> 研究生学院, 百色 533000

作者简介: 石 凤, 女, 技师;

王俊利, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: baisedewangjunli@163.com

序列,以及1条3'端特异性序列、位点鉴别连接序列。两个等位基因特异性鉴别序列与通用引物连接生成产物基因型,引物序列如表1所示。②高温处理短片段基因组DNA并与探针混合物变性复性。③加入连接酶反应体系,特异性连接同一模板上紧邻的配对探针,生成连接产物。④通过荧光标记的通用引物扩增连接产物,使用荧光毛细管电泳鉴别不同长度的扩增产物,通过其峰谱鉴定不同位点的基因型。PCR反应程序为:98℃、2min;94℃、20s,62℃、40s,72℃、1.5min,9个循环;94℃、20s,57℃、40s,72℃、1.5min,25个循环。

表1 c.1311C>T和c.1004C>A引物序列

SNP	引物序列
c.1311C>T	A1: AACGTGAAGCTCCCTGACGCCAAC
	A2: AACGTGAAGCTCCCTGACGCCGAT
	Pc: GAGCGCTCATCCTGGAYGT
c.1004C>A	A1: CCCGCGGGTCCACCACAGC
	A2: CCCGCGGGTCCACCACAGA
	Pc: CACTTTTGCAGCCGTCGTC

A1、A2分别代表等位基因鉴别序列;Pc代表通用引物序列

**1.4 统计学处理** G6PD病例组和对照组的基因型和等位基因频率采用SPSS 22.0统计所得,两组的基因型和等位基因分布差异通过Logistic回归计算,并经年龄和性别校正计算P值和风险值。通过在线SHEsis软件计算两个SNPs位点的单倍型分布频率。检验水准 $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 G6PD病例组与对照组的性别差异比较** 本研究纳入对象共712例,病例组男性261例,占62.6%,女性156例,占37.4%;对照组男性98例,占33.2%,女性197例,占66.8%。与对照组相比,病例组男性发病率升高(62.6%),差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ,  $OR = 3.363$ ,  $95\% CI = 2.459 \sim 4.600$ )。

**2.2 两组G6PD SNP比较** 本研究选取G6PD基因两个多态性位点c.1311C>T和c.1004C>A进行基因型和等位基因比较,如表2所示,在病例组和对照组中,c.1311C>T位点的基因型TT和CC+CT和等位基因T与G6PD缺乏症的发病风险降低有关[TT vs CC:( $P = 0.001$ ,  $OR = 0.373$ ,  $95\% CI = 0.204 \sim 0.683$ ); TT vs CC + CT:( $P = 0.001$ ,  $OR = 0.371$ ,  $95\% CI = 0.203 \sim 0.678$ ); T vs C:( $P = 0.002$ ,  $OR = 0.601$ ,  $95\% CI = 0.435 \sim 0.829$ )。然而,c.1004C>A位点的基因型和等位基因在两组间的分布频率差异无统计学意义。

**2.3 G6PD SNP与G6PD酶表达水平的相关性** 检测G6PD病例组和对照组两组G6PD酶的表达水平,并比较G6PD SNP c.1311C>T不同基因型之间G6PD的表达水平差异,研究结果显示,G6PD病例组的G6PD酶表达水平低于对照组( $P < 0.001$ ),见图1A。在G6PD病例组中,相对于c.1311基因型TT和c.1311基因型CC患者,携带c.1311基因型

表2 两组间G6PD SNPs基因型和等位基因分布频率比较[n(%)]

基因名称	病例组(n=417)	对照组(n=295)	P值	OR(95%CI)	P <sup>a</sup> 值	OR(95%CI) <sup>a</sup>
c.1311C>T						
CC	353(84.7)	223(75.6)				
CT	41(9.8)	43(14.6)	0.031	0.602(0.380~0.954)	0.744	1.085(0.665~1.770)
TT	23(5.5)	29(9.8)	0.018	0.501(0.283~0.888)	0.001	0.373(0.204~0.683)
CC+CT			0.031	0.535(0.303~0.946)	0.001	0.371(0.203~0.678)
CT+TT			0.003	0.562(0.385~0.818)	0.092	0.712(0.480~1.056)
C	747(89.6)	489(82.9)				
T	87(10.4)	101(17.1)	<0.001	0.564(0.414~0.768)	0.002	0.601(0.435~0.829)
c.1004C>A						
CC	409(98.1)	295(100.0)				
CA	4(1.0)	0(0)	0.999	-	0.999	-
AA	4(1.0)	0(0)	0.999	-	0.999	-
CC+CA			0.999	-	0.999	-
CA+AA			0.999	-	0.999	-
C	822(98.6)	590(100.0)				
A	12(1.4)	0(0)	0.999	-	0.999	-

<sup>a</sup>:经年龄和性别校正后的值

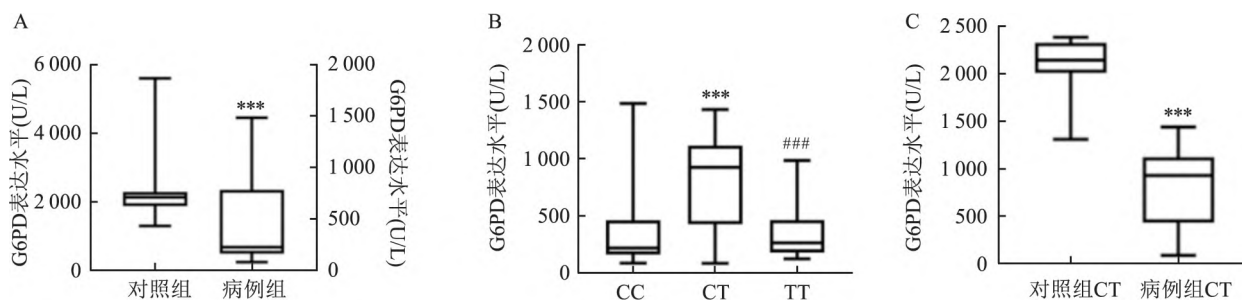


图1 c.1311C &gt; T 基因多态性与 G6PD 酶表达水平

A: 两组的 G6PD 酶表达水平差异; 与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; B: 病例组 G6PD 基因多态性位点 c.1311 不同基因型的 G6PD 酶表达水平差异; C: 对照组和病例组 CT 的 G6PD 酶表达水平差异; 与 CC 组比较:  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ ; 与 CT 组比较: ###  $P < 0.001$ ; 与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

CT 患者有较高 G6PD 酶表达水平 ( $P < 0.001$ ), 见图 1B, 但其仍低于对照组 c.1311 基因型 CT 的表达水平 ( $P < 0.001$ ), 见图 1C。

**2.4 G6PD SNPs 单倍型分析** 将本研究 G6PD 突变的两位点 c.1311C > T 和 c.1004C > A 进行在线 SHEsis 单倍型分型。结果显示, 该两多态性位点有 3 种单倍型组合, 包括 C-C、T-C 和 T-A, 主要为 C-C 单倍型, 在 G6PD 病例组和对照组分别占 89.6% 和 82.9%。C-C 单倍型在两组间差异具有统计学意义, 携带 C-C 单倍型与 G6PD 缺乏症发病风险增加有关 ( $P < 0.001$ ,  $OR = 2.057$ ,  $95\% CI = 1.494 \sim 2.832$ ), 而携带 T-C 单倍型与 G6PD 缺乏症发病风险降低有关 ( $P < 0.001$ ,  $OR = 0.486$ ,  $95\% CI = 0.353 \sim 0.669$ )。见表 3。

表3 病例组和对照组的 G6PD SNP 单倍型分析 [n(%)]

单倍型	病例组 (n=834)	对照组 (n=590)	$\chi^2$ 值	P 值	OR (95% CI)
C-C	747 (89.6)	488 (82.9)	20.12	<0.001	2.057 (1.494 ~ 2.832)
T-C	75 (9.0)	101 (17.1)	20.12	<0.001	0.486 (0.353 ~ 0.669)
T-A	12 (1.4)	0 (0.0)	-	-	-

### 3 讨论

G6PD 酶是在磷酸戊糖途径中的关键酶, 能使反应产物还原型辅酶 II 作为保持谷胱甘肽还原性的供氢体, 维持红细胞的稳定性。2017 年, 中国 G6PD 缺乏症的总体发病率达到 0.77%, 而新生儿 G6PD 缺乏症发病率高达 3.39%, 其中山西的发病率最低, 而广西的发病率最高<sup>[5]</sup>。G6PD 酶缺陷引起患者严重溶血反应、高胆红素血症和神经性脑病。既往研究<sup>[6]</sup>表明 SNP 影响基因功能。G6PD 缺乏症主要是由于基因突变以及遗传因素导致 G6PD 酶表达活性或表达水平降低引起, G6PD 位于 X 染色体长臂, 遗传方式呈 X 连锁不完全显性遗传。男性只有

一条 X 染色体, 女性有两条 X 染色体。因此, 男性只要发生 G6PD 染色体变异即呈致病表现。男性发病率较女性高。然而, G6PD 酶缺陷患者在没有外源诱导发病机制时不发病, 如蚕豆、某些化学药物等<sup>[7]</sup>。在广西人群中, 常见的 G6PD 突变位点包括 c.95A > G、c.871G > A、c.1024C > T、c.1376G > T 和 c.1388G > A<sup>[5]</sup>。c.1311C > T 是指 G6PD 基因 11 外显子发生 C → T 突变。近年来, 研究<sup>[8-10]</sup>表明 c.1311C > T 联合其他多态性位点的单倍型分型与 G6PD 酶活性降低有关。广西地区处于多种遗传性疾病的高发地区。因此, 研究广西群体的基因多态性具有重要价值。

该研究检测了 G6PD 酶缺陷患者的 c.1311C > T 和 c.1004C > A 两位点。结果显示, 在该研究群体中, 男性 G6PD 发病风险高于女性患者, 相对于对照组, G6PD 缺乏症患者的 G6PD 酶表达水平显著降低; 相对于 c.1311 基因型 TT 和 CC 患者, 携带 c.1311 基因型 CT 患者有较高的 G6PD 酶表达水平, 然而, c.1311 基因型 CT 患者的 G6PD 酶表达水平仍比正常组人群的 G6PD 表达水平低。该研究显示 c.1004C > A 与 G6PD 的发病风险无关。将 c.1311C > T 和 c.1004C > A 位点联合进行单倍型分析, 结果显示, 单倍型 C-C 与 G6PD 发病风险增加有关, 而单倍型 C-T 与 G6PD 发病风险降低有关。c.1004C > A 是国内少见的 G6PD 基因突变类型, 在李文瑞等<sup>[11]</sup>研究结果中, 672 例 G6PD 缺乏症患者出现 c.1004C > A 基因突变例数仅有 6 例。在该研究中, 共检出 c.1004C > A 基因突变 8 例, 其中包括 4 例杂合子突变 CA 和 4 例纯合子突变 AA。以往研究<sup>[12]</sup>表明 G6PD 基因 c.1311 的等位基因 C 突变为 T, 其氨基酸及蛋白并未发生改变, 属于同义突变, 与 G6PD 缺乏无关, 并且该基因突变位点主要出现于地中海贫血性疾病中。然而, 该研究 c.1311C > T

位点突变降低 G6PD 疾病的发病风险,并且本研究群体的疾病诊断排除了地中海贫血。然而,该基因位点不同基因型的 G6PD 表达水平存在统计学差异,与以上研究结果不一致。其可能原因:第一,G6PD 病例组研究群体所选样本均来自长期居住在广西地区,可能存在影响该位点的遗传特异性;第二,病例组人群可能存在其他位点的基因突变,影响 c.1311C>T 位点突变结果以及干扰 G6PD 表达水平。

### 参考文献

- [1] Gallagher P G. Diagnosis and management of rare congenital non-immune hemolytic disease[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2015, 2015(1): 392-9.
- [2] 俸诗瀚, 耿国兴, 陈少科, 等. 广西地区 G6PD 新生儿筛查情况分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(8): 79-80.
- [3] Haley K. Congenital hemolytic anemia[J]. *Med Clin North Am*, 2017, 101(2): 361-74.
- [4] 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): 1886-8.
- [5] 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): 212-21.
- [6] 李曼云, 陶金辉, 方 璇, 等. 高尿酸背景下 P2X7R 的 Arg 307>Gln 位点基因型的功能研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(6): 911-5.
- [7] Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2016, 30(2): 373-93.
- [8] Amini F, Ismail E. 3'-UTR variations and G6PD deficiency[J]. *J Hum Genet*, 2013, 58(4): 189-94.
- [9] Sirdah M M, Shubair M E, Al-Kahlout M S, et al. Possible association of 3' UTR +357 A>G, IVS11-nt 93 T>C, c.1311 C>T polymorphism with G6PD deficiency[J]. *Hematology*, 2017, 22(6): 370-4.
- [10] 何永蜀, 李 清, 杨 芳, 等. 云南彝族人群 G6PD 基因 C1311T 突变及单体型研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(18): 16-20.
- [11] 李文瑞, 叶敏南, 彭 琪, 等. 东莞地区 469 例 G6PD 缺乏症基因突变类型分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(17): 2287-8.
- [12] Menziletoglu Y S, Yuzbasioglu A S, Tahiroglu M, et al. Detection of 1311 polymorphism in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by microarray technique[J]. *Arch Med Sci*, 2011, 7(4): 586-91.

## Association between c.1311C>T and c.1004C>A and the risk of G6PD deficiency in Guangxi population

Shi Feng<sup>1,2</sup>, Teng Yuanji<sup>1,2</sup>, He Liqiao<sup>2</sup>, Li Lan<sup>2</sup>, Li Guangjing<sup>1</sup>, Qiu Wenli<sup>2</sup>, Wang Chunfang<sup>1</sup>, Wang Junli<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Reproductive Medicine Center, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000; <sup>2</sup>Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000)

**Abstract Objective** To investigate the association between c.1311C>T and c.1004C>A of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene single nucleotide polymorphism (SNP) with the risk of G6PD deficiency in Guangxi population. **Methods** 417 patients with G6PD deficiency were randomly selected as case group, and 295 healthy patients were selected as control group. The c.1311C>T and c.1004C>A were genotyped using the SNPscanTM multiple SNP method, and the haplotype frequency of two sites were analyzed by SHEsis. **Results** In the case and control group, there were statistically significant differences in the distribution frequency of genotype TT, CC+CT and allele T at c.1311C>T locus [TT vs CC: ( $P=0.001$ ,  $OR=0.373$ ,  $95\% CI=0.204-0.683$ ); TT vs CC+CT: ( $P=0.001$ ,  $OR=0.371$ ,  $95\% CI=0.203-0.678$ ); T vs C: ( $P=0.002$ ,  $OR=0.601$ ,  $95\% CI=0.435-0.829$ )]; however, there was no significant difference in genotype and allele distribution frequency at c.1004C>A locus ( $P>0.05$ ). The results of the rate method showed that compared with genotype CC, the genotype CT at c.1311C>T increased the expression level of G6PD enzyme, while the genotype TT decreased the expression level of G6PD enzyme ( $P<0.05$ ), the haplotype analysis showed that C-C and T-C were associated with G6PD risk ( $P<0.05$ ). **Conclusion** In Guangxi population, c.1311C>T locus genotypes TT, CC+CT and allele T were related to the decreased risk of G6PD deficiency.

**Key words** glucose-6-phosphate dehydrogenase; single nucleotide polymorphism; c.1311C>T; c.1004C>A