

· 临床研究 ·

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症患儿 G-6-PD mRNA 表达的研究

李长钢¹, 陈小文², 陈运生³, 王缨¹, 石红松¹, 赵维玲¹, 李成荣²

(深圳市儿童医院, 1. 血液肿瘤科; 2. 儿科研究所; 3. 检验科, 广东 深圳 518026)

[摘要] 目的 检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)缺乏症患者及其家系成员的 G-6-PD mRNA 表达水平, 从转录水平探讨其可能的发病机制。方法 提取 G-6-PD 缺乏症患者及其直系家属(患者父亲和/或母亲等)外周血 RNA, 采用逆转录方法形成 cDNA 后, 运用逆转录实时定量 PCR(Quantitative Real-Time PCR, QRT-PCR)技术, 测定 G-6-PD mRNA 的表达量。使用 SPSS10.0 统计分析软件将 3 组进行组间两两比较。结果 G-6-PD 缺乏症患儿组 mRNA 表达量为 0.57 ± 0.19 , 父系组为 0.74 ± 0.21 , 母系组为 0.67 ± 0.21 , 患儿组与父系组比较 $t = -3.18$, ($P < 0.01$); 与母系组比较 $t = -2.54$, ($P < 0.05$)。结论 G-6-PD 缺乏症患者的 G-6-PD 基因发生突变后其 G-6-PD mRNA 表达量发生了改变, 提示该病的发生与在转录水平上发生变化有关, 在 G-6-PD 缺乏症的发病过程中起到一定的作用。
[中国当代儿科杂志, 2006, 8(5): 385-387]

[关键词] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏; RT-PCR 定量; mRNA

[中图分类号] R556.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)05-0385-03

Expression of G-6-PD mRNA in children with G-6-PD deficiency

LI Chang-Gang, CHEN Xiao-Wen, CHEN Yun-Sheng, WANG Ying, SHI Hong-Song, ZHAO Wei-Ling, LI Cheng-Rong.
Department of Hematology and Oncology, Children's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Email: Licg6336@sina.com)

Abstract: Objective To detect the level of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) mRNA expression in children with G-6-PD deficiency and their lineal family members in order to explore possible mechanisms of the disease at the transcriptional level. **Methods** RNA was extracted from peripheral blood of 41 children with G-6-PD deficiency and of their lineal family members (29 father lineages and 40 mother lineages). cDNA was then harvested using the reverse transcription method. G-6-PD mRNA expression was detected by quantitative real-time PCR (QRT-PCR). The detection results of G-6-PD mRNA expression in three groups (Patient, Father lineage and Mother lineage) were compared using Statistical Software SPSS 10.0 system. **Results** The mean G-6-PD mRNA value in the Patient, Father lineage and Mother lineage groups were 0.57 ± 0.19 , 0.74 ± 0.21 and 0.67 ± 0.21 respectively. The G-6-PD mRNA value in the Patient group was significantly lower than both Father lineage ($t = -3.18$, $P < 0.01$) and Mother lineage groups ($t = -2.54$, $P < 0.05$). **Conclusions** The expression of G-6-PD mRNA decreased in children with G-6-PD deficiency, suggesting that the pathogenesis of this disorder relates to the varying levels of gene transcription.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(5): 385-387]

Key words: G-6-PD deficiency; Real-time PCR quantitation; mRNA

红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)缺乏症, 是全球最常见的一种遗传性血液系统溶血性疾病。据估计, 全球患这种疾病的人数高达四亿之多^[1]。虽然有关 G-6-PD 缺乏症的研究报道已有很多, 但基因发生突变后其在转录水平会发生什么样的变化及其与酶活性改变之间的关系尚不明了, 目前罕见有关研究报道。本研究的目的在于通过测定 G-6-PD 患者及其家系 G-6-PD mRNA 表达水平的变化, 从基因转录水平探讨其在本病中的可能发病机制。

1 材料及方法

1.1 患者来源

41 名患儿, 35 个家系(30 个全家系, 包括患儿及父母等直系亲属), 均来自我院门诊及住院病人。

1.2 诊断标准及依据

根据临床和/或实验室 G-6-PD/6PGD 比值测定结果。比值低于 1.00 者, 诊断为 G-6-PD 缺乏。

[收稿日期] 2006-03-18; [修回日期] 2006-05-29

[基金项目] 深圳市卫生局科研基金项目(编号: 20004009)

[作者简介] 李长钢, 男, 大学, 主任医师。主攻方向: 小儿血液及肿瘤。

1.3 G-6-PD/6PGD 比值测定

采用广州市天一医药保健品有限公司生产的改良 G-6-PD 定量比值法试剂盒。检测方法按试剂盒说明书进行。

1.4 G-6-PD mRNA 的测定

1.4.1 RNA 的提取及 cDNA 的制备 RNA 提取: 1.5 mL 全血, 按德国 QIAGEN 公司 RNA 提取试剂盒 (QIAamp RNA Blood Mini Kit) 说明书操作。提取的 RNA 质量由 OD 260/OD 280 比值 (> 1.9) 和 0.7% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。cDNA 合成: 取 1 μ g RNA, 以 poly(N) 6 为引物进行反转录。20 μ L 体系中含有 $MgCl_2$ 5 mM, dNTP 10 mM, Rnase 抑制剂 0.8 U, AMV 逆转录酶 0.2 U, poly(N)₆ 20 pmol, RNA 1 μ g。逆转录反应条件为: 70 $^{\circ}C$ 10 min, 42 $^{\circ}C$ 60 min。逆转录制备成 cDNA 后置 -20 $^{\circ}C$ 冰箱保存备用。

1.4.2 G-6-PD mRNA 定量检测 采用改良荧光定量 PCR (QRT-PCR) 检测方法: 应用 QuantiTect SYBR Green PCR Kit, 总反应体系 20 μ L, 2XQuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L, 上游引物各 0.5 μ L, RNase-Free Water 8 μ L, RT 反应产物 1 μ L。引物参数分别为: β -actin (上游引物: 5' CGCGGCTACAGCTTCACAC 3', 下游引物: 5' GGAAGCAGCCGTGCCAT3', 扩增片段长度 111 bp); G-6-PD (上游引物: 5' CCAGGGCGATGCCTTCA3', 下游引物 5' GCAGAAGGCCATCCCGGA3' 扩增片段长度 122 bp); 在 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪上进行 DNA 扩增和分析。每份标本均做 2 管平行检测 (即 2 管检测 β -actin 基因作为内参, 2 管检测目的基因 G-6-PD), 扩增参数为: 95 $^{\circ}C$ 15 min 后, 再 94 $^{\circ}C$ 15 s, 55 $^{\circ}C$ 25 s, 72 $^{\circ}C$ 20 s, 50 次循环。扩增完毕后, 进行熔解曲线分析, 95 $^{\circ}C$ 5 s, 65 $^{\circ}C$ 5 s, 以 0.1 $^{\circ}C$ / s 的速度升温到 95 $^{\circ}C$, 连续监测荧光。对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析特异性。使用 Light Cycler 自带的相对定量分析软件 Rel Quant 进行相对定量分析^[1-3]。

1.5 统计方法

采用 SPSS 10.1 软件进行统计学处理, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两组间比较进行检验。比较结果的差异性以 $P < 0.05$ 为标准。

2 结果

2.1 G-6-PD mRNA 定量检测质量评估

熔解曲线分析显示, 内参基因 β -actin 和目的基

因 G-6-PD 均表现为单一的熔解曲线峰 (图 1 为代表性熔解曲线分析图), 表明定量 PCR 检测到的是特异性扩增结果。琼脂糖凝胶电泳结果也证实了这一点 (见图 2)。取一 G-6-PD 基因具有较高值的正常标本 cDNA 1 μ L 和 1/10⁴ μ L 为模板, 批内重复测定 16 次, cDNA 1 μ L 模板批间测定 16 次, 测得批内变异系数 ($CV = s / X$) 分别为 1.9%, 1.5%; 批间变异系数 ($CV = s / X$) 为 2.1%。

2.2 各组间 mRNA 的比较

分别检测了 41 名 G-6-PD 缺陷患儿、29 名父系、40 名母系的 mRNA 表达量。结果显示: 患儿组 mRNA 表达量平均为 0.57 ± 0.19 , 父系组表达量为 0.74 ± 0.21 , 两两比较, $t = -3.18$, ($P < 0.01$)。母系组为 0.67 ± 0.21 , 与患儿组比较 $t = -2.54$, ($P < 0.05$)。结果显示: 父系组与母系组相比, 母系组 mRNA 表达量均数较父系组的为低, 但无统计学差异 ($t = 1.21$, $P > 0.05$)。患儿组 mRNA 的表达量与父系组及母系组相比较均较低, 经统计学处理差异均有显著性。

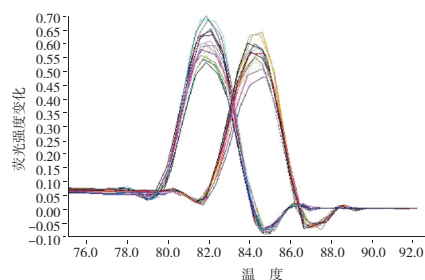


图1 熔解曲线分析图

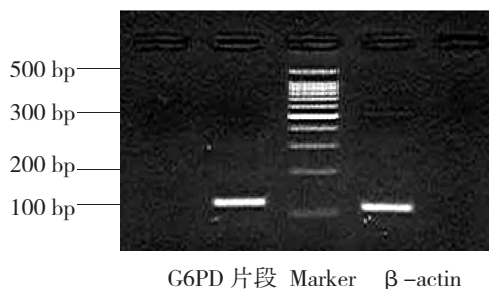


图2 琼脂糖凝胶电泳结果

3 讨论

G-6-PD 属于 X 连锁看家基因的一个催化酶, 主要功能是产生 NADPH, 后者在还原性生物合成反应中, 是抵抗氧化剂的一个关键电子供给体。其催化磷酸戊糖通路 (HMP) 的第一步代谢, 氧化 G6P, 使 NADP 还原为 NADPH。其可将氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 还原成氧化还原型谷胱甘肽 (GSSH), 后者

可以保持巯基(-SH)酶处于还原状态,从而保护细胞膜不受 H_2O_2 等化合物损害,而发挥其保护红细胞免受氧化损害的作用^[1]。目前已发现126种以上的基因位点突变,400余种生化变异型。虽然有关G-6-PD缺乏的研究已有很多报道,我国也已发现至少21种基因突变位点,其中以G1388A, G1376T及A95G为多见,同时也发现:当基因发生突变或缺失时其活性可发生或不发生变化,临床表现的差异也大^[1]。有些研究发现G-6-PD缺乏症患者临床表现与基因突变位点有关^[8,9]。为何出现上述现象,目前从理论上尚未能完全阐明。有关G-6-PD缺乏症的诊断及研究已有很多^[5],但主要限于该病的诊断,限于有关酶学及基因突变位点的诊断方面。在基因发生突变后其在转录水平将会发生什么变化,与该病的发生是否相关,目前尚未见有关的研究报道。

实时荧光定量PCR技术(QRT-PCR)为基因的表达(转录水平)提供了一个重要的研究手段^[3~7]。但有关该病发生基因突变后其转录水平(mRNA表达)是否发生变化,罕见有关报道。我们采用该法对G-6-PD缺乏症患者及其家系的G6PD的mRNA表达水平进行了研究。本组资料显示,G-6-PD缺乏患者组的mRNA表达量较父系及母系组的表达量明显降低,提示G-6-PD缺乏症患儿的基因发生突变后,在转录水平上发生了变化,mRNA表达水平的降低可以直接影响到G-6-PD的翻译效能,使G-6-PD合成量降低,在本病的发生中可能起到一定的作用。另一方面,由于基因的改变,也使G-6-PD酶的蛋白结构也发生了变化,从而也使其生物学功能发生了改变^[10]。但研究发现有些基因位点发生突变后,其活性并未降低,临床上也无症状^[1]。另外,本组研究还发现:患儿个体间mRNA的表达量存在较大的差异,初步基因序列检测发现其基因突变位点不同的患者间mRNA的表达水平及酶活性水平也不一样,提示不同类型的基因突变可能与临床表现存在差异有关,值得进一步深入研究。由于本病系性联X染色体隐性遗传性疾病,由于男性只有一条X染

色体,因此该病在临床上主要见于男性患者。而母系大多为该病基因突变的杂合子状态,另一正常G-6-PD基因可以发挥其正常功能,从而其G-6-PD mRNA可以维持在正常的水平。因此,临床上往往无临床表现,且G-6-PD/6PGD比值测定正常。

本项研究显示,G-6-PD缺乏患者在基因发生突变后在其转录水平上发生了改变。可能是导致G-6-PD酶活性缺乏/降低的原因之一。但基因突变类型间的差异与mRNA表达量、G-6-PD活性间及临床表现形式的关系有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 朱平. 临床分子遗传学[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2002, 250-273.
- [2] 郑敏, 罗建明. 葡萄糖-6-磷酸缺乏症基因突变的研究进展[J]. 医学综述, 2005, 11(3): 266-268.
- [3] Marino JH, Cook P, Miller KS. Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR [J]. J Immunol Methods, 2003, 283(1-2): 291-306.
- [4] 张蓓, 沈立松. 实时荧光定量PCR的研究进展及其应用[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2003, 24(6): 327-329.
- [5] Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics [J]. Clin Chem, 2002, 48(8): 1178-1185.
- [6] 陈英剑, 胡成进. 荧光实时逆转录PCR定量研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(4): 348-351.
- [7] Straub B, Muller M, Krause H, Schrader M, Goessl C, Heicappell R, et al. Detection of prostate-specific antigen RNA before and after radical retropubic prostatectomy and transurethral resection of the prostate using "Light-Cycler"-based quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. Urology, 2001, 58(5): 815-820.
- [8] 杜传书, 任晓琴, 江悦华, 陈路明, 蒋玮莹. 应用ARMS法检测广东省常见的三种葡萄糖-6-磷酸缺乏症基因点突变[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(4): 199-193.
- [9] 李梨平, 邹爱军, 祝兴元. 湖南长沙地区G6PD基因突变与新生儿黄疸关系的研究[J]. 医学临床研究, 2005, 22(3): 299-302.
- [10] Kotaka M, Gover S, Vandeputte-Rutten L, Au SW, Lam VM, Adams MJ. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP + binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2005, 61(Pt 5): 495-504.

(本文编辑: 吉耕中)