

论著 · 临床研究

新生儿高未结合胆红素血症 遗传因素的研究

孙玲玲¹ 陈运生² 余珍珠¹ 黄宝兴² 徐刚² 马东礼² 李长钢³ 刘磊¹ 刘晓红¹

(深圳市儿童医院 1. 新生儿科; 2. 检验科; 3. 血液科, 广东 深圳 518026)

[摘要] **目的** 探讨尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (UGT1A1) Gly71Arg、TATA 盒基因突变和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PD) 基因突变与新生儿高未结合胆红素血症的关系。**方法** UGT1A1 TATA 盒、外显子 1、外显子 5 和 G6PD 基因外显子 12 经 PCR 扩增和测序, 构建突变样本的克隆, 对其进行验证。分析病例组及对照组 UGT1A1 Gly71Arg 和 TATA 盒基因多态性频率的差异, 应用 logistic 回归分析基因突变对新生儿高未结合胆红素血症发生的影响。**结果** 病例组 UGT1A1 Gly71Arg 基因多态性的基因型分布与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。病例组 Arg 等位基因频率明显高于对照组 ($P < 0.01$)。病例组 UGT1A1 TATA 盒基因突变型分布与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Logistic 回归分析显示 UGT1A1 Gly71Arg、TATA 盒基因和 G6PD 基因突变对新生儿高未结合胆红素血症发生的 OR 值 (95% CI) 分别为 5.468 (2.274, 12.818)、0.688 (0.266, 1.778) 和 5.081 (1.070, 24.133)。**结论** UGT1A1 Gly71Arg 和 G6PD 基因突变可能是新生儿高未结合胆红素血症发生的原因。

[中国当代儿科杂志, 2012, 14(4): 256-259]

[关键词] 高未结合胆红素血症; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 基因突变; 新生儿

[中图分类号] R722.11 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2012)04-0256-04

Genetic factors in the occurrence of neonatal unconjugated hyperbilirubinemia

SUN Ling-Ling, CHEN Yun-Sheng, YU Zhen-Zhu, HUANG Bao-Xing, XU Gang, MA Dong-Li, LI Chang-Gang, LIU Lei, LIU Xiao-Hong. Department of Neonatology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Liu X-H, Email: lxh040131@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study association of uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) Gly71Arg, UGT1A1 promoter TATA-box and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations with the occurrence of neonatal unconjugated hyperbilirubinemia. **Methods** The TATA-box, exon 1 and exon 5 of the UGT1A1 gene and the exon 12 of G6PD gene were amplified by PCR. The products of PCR were analyzed by direct DNA sequencing. Clones for the mutations of the UGT1A1 gene and the G6PD gene were constructed in order to identify the results of the products of PCR. Seventy-two neonates with unconjugated hyperbilirubinemia (case group) and 65 healthy neonates (control group) were enrolled. The genotypes and allele frequencies of the polymorphisms of UGT1A1 Gly71Arg and UGT1A1 TATA-box were compared between the two groups. The effects of UGT1A1 Gly71Arg, UGT1A1 promoter TATA-box and G6PD gene mutations on the development of neonatal unconjugated hyperbilirubinemia were estimated using logistic regression models. **Results** There were significant differences in the genotype distribution of Gly71Arg polymorphism of UGT1A1 gene between the case and control groups ($P < 0.01$). The Arg allele frequency of the polymorphisms of UGT1A1 gene in the case group was significantly higher than in the control group ($P < 0.01$). There were no significant differences in the genotype distribution of the UGT1A1 promoter TATA-box between the two groups ($P > 0.05$). The OR and 95% CI values of UGT1A1 Gly71Arg, UGT1A1 TATA-box and G6PD gene mutations associated with the development of neonatal unconjugated hyperbilirubinemia were 5.468 (2.274, 12.818), 0.688 (0.266, 1.778) and 5.081 (1.070, 24.133) respectively. **Conclusions** UGT1A1 Gly71Arg and G6PD gene mutations may be involved in the development of neonatal unconjugated hyperbilirubinemia. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(4): 256-259]

Key words: Unconjugated hyperbilirubinemia; Uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1; Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Gene mutation; Neonate

[收稿日期] 2011-10-27; [修回日期] 2011-12-29
[基金项目] 深圳市科技计划项目 (200903092)
[作者简介] 孙玲玲, 女, 本科, 副主任医师。
[通信作者] 刘晓红, 主任医师。

影响新生儿高未结合胆红素血症的遗传因素除主要有血型不合外,近年来的研究主要集中在尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1, *UGT1A1*) 基因突变^[1]、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, *G6PD*) 基因突变^[2] 和有机阴离子转移因素 2^[3] (organic anion transporter 2, *OATP2*) 等方面。在对 *UGT1A1* Gly71Arg、*UGT1A1* TATA 盒和 *G6PD* 基因突变与新生儿高未结合胆红素血症关系的研究中,国内外不同地区的学者所得出的结论有较大的差异^[4-6]。为了解影响深圳地区新生儿高未结合胆红素血症发生的遗传因素,本研究检测了本地区 72 例高未结合胆红素血症患儿及 65 例正常新生儿的 *UGT1A1* 基因启动子 TATA 盒、外显子 1 (Exon 1) 和外显子 5 (Exon 5) 及本地区两种主要 *G6PD* 突变基因型,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

72 例高未结合胆红素血症患儿均为 2008 年 1 月至 2011 年 5 月间入住我院新生儿科的足月新生儿 (病例组),另选取 65 例本市其他医院产科病房的正常足月新生儿为对照组,均为汉族。ABO、Rh 血型不合者,早产、低出生体重儿,巨大儿及有其他疾患如缺氧窒息、败血症等除外。两组间胎龄、母乳喂养率、出生体重等差异无统计学意义。所有病例符合第 4 版《实用新生儿学》新生儿病理性黄疸的诊断标准,并排除高直接胆红素血症^[7]。

1.2 方法

1.2.1 材料 抽取 2 mL EDTA 抗凝静脉血,用 DNA 抽提试剂盒 (QIAGEN 公司) 提取全血白细胞基因组 DNA, -20℃ 保存基因组 DNA。根据人类基因文库数据,采用 Primer Premier 5.0 引物设计软件,设计 *UGT1A1* 基因启动子 TATA 盒、Exon 1 和 Exon 5, *G6PD* 基因 Exon 12 和 β -actin 阳性对照共 5 对引物。引物序列及相关参数见表 1。本研究参考序列 Gen-Bank 登录号为 NC_000002.11 和 NM_000402.3。

1.2.2 TATA 启动子、Exon 1、Exon 5 和 *G6PD* 基因扩增体系及相应程序 PCR 反应体系 (总体积 50 μ L): ddH₂O 36.75 μ L, 10 $\times$ Buffer (含 Mg²⁺) 5.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4.0 μ L, Ex Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, 模板 2.0 μ L。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 10 min; 然后 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸分别为

45 s、45 s、40 s、30 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 10℃ 延时。

表 1 *UGT1A1* 和 *G6PD* 基因扩增及测序引物

基因名称	引物序列 (5'→3')	长度 (bp)	温度 (℃)	GC 量 (%)	产物大小 (bp)
TATA 盒	F: TTATCTCTGAAAAGTGAAGTCCCTGC	25	61.3	44.0	619
	R: AAGGAAAGGGTCCGTCAGCAT	21	60.8	55.0	
Exon 1	F: AAGGACTCTGCTATGCTTTTGTCT	24	59.0	41.7	675
	R: TGCCAAAGACAGACTCAAACCTA	23	59.4	43.5	
Exon 5	F: TTCATACCACAGGTGTTCCAGG	22	59.8	50.0	554
	R: GGGGGCAGATACATATTCAA	21	59.9	47.6	
<i>G6PD</i>	F: GACCTGACCTACGGCAACAGATAC	24	62.0	54.2	369
	R: GCTCAATCTGCTGACGACGTGG	22	65.3	59.1	
β -actin (阳性对照)	F: GTGAAGCTCCCTGACGCCTACG	22	65.9	63.6	260
	R: GCTCAATCTGCTGACGACGTGG	22	65.3	59.1	

1.2.3 PCR 产物测序 *UGT1A1* 基因 (Exon 5、Exon 1) 和 *G6PD* 基因采用 PCR 产物正向测序, *UGT1A1* (TATA 盒) 则采用 PCR 产物反向测序, 对于发现突变位点的 A (TA) 6TAA > A (TA) 7TAA、Exon 1 211G > A、*G6PD* 1376 G > T 和 *G6PD* 1388 G > A 4 个基因, 分别重复测序。

1.2.4 克隆验证 针对突变位点 Exon 1 211G > A 和 TATA 盒插入突变各选 5 例样本, *G6PD* 1376 G > T 和 *G6PD* 1388 G > A 各选 2 例样本进行克隆构建。连接使用 Promega pGEM-T easy vector, 连接反应体系为 2 $\times$ Ligation Buffer 5 μ L, pGEM-T easy vector 0.5 μ L, T4 Ligase (3 U/ μ L) 1 μ L, PCR 产物 3.5 μ L。上述连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取单个克隆子并进行测序, 测序结果与 PCR 产物测序结果进行对比。

1.3 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。基因型频率、等位基因频率采用 χ^2 检验。 *UGT1A1* Gly71Arg 基因多态性、*UGT1A1* TATA 盒基因多态性和 *G6PD* 基因突变对新生儿高未结合胆红素血症影响的优势比 (odds ratio, *OR*) 和 95% 可信区间 (*CI*) 用二分类变量 logistic 回归分析, $P < 0.05$, $OR > 3$, 95% *CI* 值不包含 1 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 产物分析

病例组 and 对照组样本的基因型通过 PCR 产物测序确定, 有突变位点的样本进行克隆构建, 其克隆子测序结果与 PCR 产物测序结果完全一致。

2.2 两组 *UGT1A1* Gly71Arg 多态性基因型分布及等位基因频率的比较

病例组 and 对照组 *UGT1A1* Gly71Arg 多态性的基

因型分布差异有统计学意义 ($\chi^2 = 22.278, P < 0.01$) ; 病例组 Arg 等位基因频率明显高于对照组 ($\chi^2 = 9.584, P = 0.002$) 。见表 2。

表 2 两组 UGT1A1 Gly71Arg 多态性基因型分布及等位基因频率的比较 [n(%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		Arg/Arg	Arg/Gly	Gly/Gly	Arg	Gly
对照组	65	4(6)	5(7)	56(86)	13(10)	117(90)
病例组	72	4(5)	30(42)	38(53)	38(27)	106(73)
χ^2 值		22.278			9.584	
P 值		<0.001			0.002	

2.3 两组 UGT1A1 TATA 盒多态性基因型分布及等位基因频率的比较

病例组和对照组 UGT1A1 TATA 盒多态性的基因型分布差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.887, P = 0.394$) ; 病例组 A(TA)7TAA 等位基因频率与对照组比较差异亦无统计学意义 ($\chi^2 = 0.790, P = 0.374$) 。见表 3。

表 3 两组 UGT1A1 TATA 盒多态性基因型分布及等位基因频率的比较 [n(%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		纯合子	杂合子	野生型	(TA)7	(TA)6
对照组	65	0	15(23)	50(77)	15(11)	115(89)
病例组	72	0	12(17)	60(83)	12(8)	132(92)
χ^2 值		0.887			0.790	
P 值		0.394			0.374	

注:表中(TA)7 为 A(TA)7TAA 的简写;(TA)6 为 A(TA)6TAA 的简写。

2.4 UGT1A1 Gly71Arg 基因多态性对新生儿高未结合胆红素血症发生的影响

UGT1A1 Gly71Arg 基因多态性对新生儿高未结合胆红素血症发生的 OR 值为 5.468,95% CI 为 2.274 ~ 12.818, $P < 0.001$, 提示 UGT1A1 Gly71Arg 基因突变是新生儿高未结合胆红素血症发病的危险因素。见表 4。

表 4 UGT1A1 Gly71Arg 基因多态性对新生儿高未结合胆红素血症发生的影响 [n(%)]

组别	例数	UGT1A1 Gly71Arg 基因多态性	
		野生型	突变型
对照组	65	56(86)	9(14)
病例组	72	38(53)	34(47)
OR 值(95% CI)		5.468(2.274,12.818)	
P 值		<0.001	

2.5 UGT1A1 TATA 盒基因多态性对新生儿高未结合胆红素血症发生的影响

UGT1A1 TATA 盒基因突变多态性对新生儿高未结合胆红素血症的 OR 值为 0.668,95% CI 为 0.266 ~ 1.778, $P = 0.440$, 提示 UGT1A1 TATA 盒基因突变不是新生儿高未结合胆红素血症发病的危险因素。见表 5。

表 5 UGT1A1 TATA 盒基因突变对新生儿高未结合胆红素血症发生的影响 [n(%)]

组别	例数	UGT1A1 TATA 盒基因多态性	
		野生型	突变型
对照组	65	50(77)	15(23)
病例组	72	60(83)	12(17)
OR 值(95% CI)		0.688(0.266,1.778)	
P 值		0.440	

2.6 G6PD 基因突变对新生儿高未结合胆红素血症发生的影响

G6PD 基因突变对新生儿高未结合胆红素血症的 OR 值为 5.081,95% CI 为 1.070 ~ 24.133, $P = 0.041$, 提示 G6PD 基因突变是新生儿高未结合胆红素血症发病的危险因素。见表 6。

表 6 G6PD 基因突变对新生儿高未结合胆红素血症发生的影响 [n(%)]

组别	例数	G6PD 基因多态性	
		野生型	突变型
对照组	65	63(97)	2(3)
病例组	72	62(86)	10(14)
OR 值(95% CI)		5.081(1.070,24.133)	
P 值		0.041	

3 讨论

通常认为 UGT1A1 活性的缺陷是引起新生儿高未结合胆红素血症的一个关键因素^[1]。未结合胆红素进入肝细胞后,需要在肝细胞内经清除胆红素的关键酶,即 UGT1A1 的作用下,与葡萄糖醛酸结合成为水溶性的结合胆红素而排出体外^[8-9],若 UGT1A1 活性下降,导致肝脏内未结合型胆红素向结合型胆红素的转化过程发生障碍,从而引起以血清未结合型胆红素水平升高为主的临床症状。UGT1A1 的编码基因定位于染色体 2q37,现已发现 30 多个 UGT1A1 基因突变位点,分别位于启动子区域和 5 个外显子中^[10-12]。UGT1A1 基因变异包括两种类型:(1)TATA 盒 TA 突变型,欧洲和亚洲人常

见有TA插入,使正常A(TA)6TAA突变为A(TA)7TAA^[10,13],非洲血统人群中存在5个和8个TA重复子。(2)单碱基突变中*UGT1A1*的Gly71Arg(即Exon 1 211G>A)较为多见,另外*UGT1A1* Pro229Gln、第4外显子Arg367Gly、第5外显子Tyr486Asp的突变等也有报道^[9,14]。

国外Akaba等^[1]报道Gly71Arg突变高频率与日本、朝鲜及中国人中较高的新生儿高胆红素血症发生率有关。2002年Yamamoto等^[15]报道日本新生儿高胆红素血症Gly71Arg突变等位基因频率明显高于对照组,但此突变在高加索白人中很少见^[16]。本研究表明*UGT1A1* Gly71Arg突变等位基因频率明显高于对照组的基因频率,表明*UGT1A1* Gly71Arg基因突变对新生儿高未结合胆红素血症的发生有显著性影响。

1998年Beutler等^[17]对欧洲血统的高加索白人、亚洲人、非洲血统美国人进行*UGT1A1*启动子区TA重复数的研究,发现白种人A(TA)7TAA等位基因频率为0.387,亚洲人为0.16,非洲血统人群中存在5个和8个TA重复子的启动子突变。本研究中病例组A(TA)7TAA等位基因频率与对照组差异无统计学意义。

在国内,研究*UGT1A1* Gly71Arg、*UGT1A1*启动子区TA重复数、*G6PD*基因突变与新生儿高未结合胆红素血症发生间的关系的课题较少。2005年傅雯萍等^[4]报道*G6PD*缺陷同时存在Gly71Arg突变使新生儿高胆红素血症发病增加,而单一*G6PD*缺陷或单一存在Gly71Arg突变与高胆红素血症发病无关。2008年傅雯萍等^[5]报道*UGT1A1* TATA盒基因突变与新生儿高胆红素血症的发病无关。田桂英等^[6]认为*UGT1A1*基因Gly71Arg变异可能是汉族母乳性新生儿黄疸的发病原因之一。本研究显示*UGT1A1* Gly71Arg突变和*G6PD*突变两者可能都是新生儿高未结合胆红素血症的发病原因,而*UGT1A1*基因启动子TATA盒基因突变与之无关。本研究结果与上述国内研究报道类似,但不尽相同,可能因研究对象的地域分布不同而略有差异。

[参 考 文 献]

[1] Akaba K, Kimura T, Sasaki A, Tanabe S, Ikegami T, Hashimoto M, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and mutation of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene: a common missense mutation among Japanese, Koreans and Chinese[J].

Biochem Mol Biol Int, 1998, 46(1): 21-26.

[2] Huang CS, Hung KL, Huang MJ, Li YC, Liu TH, Tang TK. Neonatal jaundice and molecular mutations in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient newborn infants[J]. Am J Hematol, 1996, 51(1): 19-25.

[3] Huang MJ, Kua KE, Teng HC, Tang KS, Weng HW, Huang CS. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates[J]. Pediatr Res, 2004, 56(5): 682-689.

[4] 傅雯萍, 刘义. 遗传因素在广西新生儿高胆红素血症中的作用[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(10): 743-747.

[5] 傅雯萍, 刘义. *UGT1A1* TATA 突变对 *G6PD* 缺乏新生儿高胆红素血症的影响[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(2): 262-263.

[6] 田桂英, 徐放生, 朱凤霞, 蓝常肇, 韩颖. 新生儿迁延性黄疸与尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶基因突变的关系[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(2): 129-130.

[7] 罗凤珍. 新生儿黄疸[M]//邵肖梅, 叶鸿瑁, 丘小汕. 实用新生儿学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 273.

[8] Kaplan M, Hammerman C, Maisels MJ. Bilirubin genetics for the nongeneticist: hereditary defects of neonatal bilirubin conjugation[J]. Pediatrics, 2003, 111(4 Pt 1): 886-893.

[9] Pirulli D, Giordano M, Puzzer D, Crovella S, Rigato I, Tiribelli C, et al. Rapid method for detection of extra(TA) in the promoter of the bilirubin-UDP-glucuronosyl transferase 1 gene associated with Gilbert syndrome[J]. Clin Chem, 2000, 46(1): 129-131.

[10] Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome[J]. N Engl J Med, 1995, 333(18): 1171-1175.

[11] Sampietro M, Iolascon A. Molecular pathology of Crigler-Najjar type I and II and Gilbert's syndromes[J]. Haematologica, 1999, 84(2): 150-157.

[12] Raijmakers MT, Jansen PL, Steegers EA, Peters WH. Association of human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the *UGT1A1* gene[J]. J Hepatol, 2000, 33(3): 348-351.

[13] Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome[J]. Lancet, 1996, 347(9001): 578-581.

[14] Iyanagi T, Emi Y, Ikushiro S. Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1407(3): 173-184.

[15] Yamamoto A, Nishio H, Waku S, Yokoyama N, Yonetani M, Uetani Y, et al. Gly71Arg mutation of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene is associated with neonatal hyperbilirubinemia in the Japanese population[J]. Kobe J Med Sci, 2002, 48(3-4): 73-77.

[16] Ferraris A, D'Amato G, Nobili V, Torres B, Marcellini M, Dal-lapiccola B. Combined test for *UGT1A1*-3279T>G and A(TA)nTAA polymorphisms best predicts Gilbert's syndrome in Italian pediatric patients[J]. Genet Test, 2006, 10(2): 121-125.

[17] Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (*UGT1A1*) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(14): 8170-8174.

(本文编辑:王庆红)