

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.05.006

论著·临床研究

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症 基因启动子甲基化研究

徐丹丹¹ 文飞球² 吕荣钰² 张民³ 陈运生⁴ 陈小文³

(1. 遵义医学院珠海校区, 广东 珠海 519041; 2. 深圳市儿童医院血液肿瘤科, 广东 深圳 518038;
3. 深圳市儿童医院儿科研究所, 广东 深圳 518038; 4. 深圳市儿童医院检验科, 广东 深圳 518038)

[摘要] **目的** 了解葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)基因启动子区甲基化改变特点, 探讨甲基化改变与G6PD缺乏症的关系。**方法** 将2013年8月至2014年7月期间195例贫血查因或体检儿童分为G6PD缺乏组(130例)和对照组(65例)。荧光定量PCR检测G6PD mRNA表达情况。甲基化敏感性高分辨率熔解曲线分析(MS-HRM)结合重亚硫酸盐PCR测序法(BSP)等方法分析G6PD mRNA表达偏低的G6PD缺乏症患者的基因启动子甲基化改变情况, 另对G6PD mRNA表达正常的44例女性标本(G6PD缺乏组7例和正常对照组37例)的G6PD基因启动子甲基化情况进行分析。**结果** 22例(16.9%, 22/130)G6PD缺乏症患者的G6PD mRNA表达偏低, 其中的16例男性均无甲基化、6例女性均存在部分甲基化。44例G6PD mRNA表达正常的G6PD缺乏组及对照组女性中, 40例检测到部分甲基化, 4例无甲基化(G6PD缺乏组1例, 对照组3例)。**结论** 基因启动子区甲基化与男性G6PD缺乏症没有关联。女性人群G6PD基因存在部分甲基化与无甲基化, 提示甲基化改变对女性G6PD缺乏症可能有一定影响。[中国当代儿科杂志, 2016, 18(5): 405-409]

[关键词] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症; 甲基化; X染色体失活; 失活逃逸; 儿童

Gene promoter methylation in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency

XU Dan-Dan, WEN Fei-Qiu, LV Rong-Yu, ZHANG Min, CHEN Yun-Sheng, CHEN Xiao-Wen. Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai, Guangdong 519041, China (Chen X-W, Email: 13510333196@139.com)

Abstract: Objective To investigate the features of methylation in the promoter region of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene and the association between gene promoter methylation and G6PD deficiency. **Methods** Fluorescent quantitative PCR was used to measure the mRNA expression of G6PD in 130 children with G6PD deficiency. Sixty-five children without G6PD deficiency served as the control group. The methylation-sensitive high-resolution melting curve analysis and bisulfite PCR sequencing were used to analyze gene promoter methylation in 22 children with G6PD deficiency and low G6PD mRNA expression. The G6PD gene promoter methylation was analyzed in 44 girls with normal G6PD mRNA expression (7 from G6PD deficiency group and 37 from control group). **Results** Twenty-two (16.9%) children with G6PD deficiency had relatively low mRNA expression of G6PD; among whom, 16 boys showed no methylation, and 6 girls showed partial methylation. Among the 44 girls with normal G6PD mRNA expression, 40 showed partial methylation, and 4 showed no methylation (1 case in the G6PD group and 3 cases in the control group). **Conclusions** Gene promoter methylation is not associated with G6PD deficiency in boys. Girls have partial methylation or no methylation in the G6PD gene, suggesting that the methylation may be related to G6PD deficiency in girls. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(5): 405-409]

Key words: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; Methylation; X chromosome inactivation; Inactivation and escape; Child

[收稿日期] 2016-01-27; [接受日期] 2016-03-09

[基金项目] 深圳市科技计划(医疗卫生类)重点项目(201201004); 深圳市科技创新委员会基础研究项目(JCYJ20130401114111456)。

[作者简介] 徐丹丹, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 陈小文, 男, 副研究员。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) 缺乏症是最常见的遗传性溶血性红细胞酶缺陷病, 全球约 4 亿人受累^[1], 已报道有近 200 种 G6PD 基因突变^[2], 但仍有众多 G6PD 缺乏症患者难以检出任何基因突变^[3-5]。G6PD 基因处于受甲基化影响较多的 X 染色体上, 其表达可能为启动子 CpG 甲基化所调控, 导致基因沉默、活性下降^[6]。本研究组前期观察发现, G6PD 缺乏症人群 G6PD mRNA 表达水平有下调趋势^[7]。为此, 本研究拟对 G6PD mRNA 表达降低的 G6PD 缺乏症样本的基因启动子甲基化改变情况进行分析, 探讨甲基化改变是否在 G6PD 缺乏症中发挥作用, 为 G6PD 缺乏症的分子诊断提供新的参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2013 年 8 月至 2014 年 7 月期间, 深圳市儿童医院血液专科门诊及儿保科就诊的贫血查因或体检儿童 195 例。根据其外周静脉血测定的四氮唑蓝 G6PD/G6PD 比值 (改良 G6PD 定量比值法试剂盒, 广州市米基医疗器械有限公司生产), 分为 G6PD 缺乏组 (比值 <1.00) 和对照组 (比值

≥ 1.00)。其中, 缺乏组 130 例, 男 117 例、女 13 例, 年龄 32 d 至 193 个月, 中位年龄 26 个月; 对照组 65 例, 男 28 例、女 37 例, 年龄 2 个月至 192 个月, 中位年龄 28 个月。本研究获得医院医学伦理委员会和研究对象监护人的知情同意。

1.2 DNA、总 RNA 提取, cDNA 获取

应用 QIAamp RNA Blood Mini Kit 和 FlexiGene DNA Kit (QIAGEN, 德国) 分别提取样本总 RNA 和 DNA。1 μg 总 RNA 采用逆转录试剂盒 (TaKaRa, 大连) 获取 cDNA, 操作如下: 70 °C 10 min, 冰上孵育 10 min, 加入 Random primer 1 μL、PrimeScript Buffer 4 μL、PrimeScript Reverse Transcriptase 1 μL、Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL、dNTP Mixture 1 μL, RNase-free Water 补至 20 μL, 42 °C 60 min, 90 °C 2 min。RNA 冻存于 -80 °C, DNA、cDNA 冻存于 -20 °C 备用。

1.3 引物设计

根据 G6PD mRNA 序列 (NCBI 号: BC000337) 和 DNA 序列 (NCBI 号: L44140.1), 采用 Prime Premier 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物, MethPrimer 软件鉴定 CpG 岛并进行甲基化敏感性高分辨率熔解曲线分析 (MS-HRM) 及重亚硫酸盐 PCR 测序法 (BSP) 设计引物, 见表 1。

表 1 Real-time PCR、MS-HRM 及 BSP 分析的引物参数

方法	上游引物 (5' → 3')	下游引物 (5' → 3')
定量 PCR (G6PD)	CCAGGGCGATGCCTTCCA	GCAGAAGGCCATCCCGGA
定量 PCR (β-actin)	CGCGGCTACAGCTTCACCAC	GGAAGCAGCCGTGGCCAT
MS-HRM	AAGAGATTGTTAATAGGGTTGGTTTGATT	TCCTCTAAACTATCCCTCAACTCTATAA
BSP	GGGGGAGGAATTAAGAAGAGATTGTTTA	CCAACCCTCCCCTTACCAAACTA

注: [MS-HRM] 甲基化敏感性高分辨率熔解曲线分析; [BSP] 重亚硫酸盐 PCR 测序法。

1.4 G6PD mRNA 表达水平测定

应用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (TaKaRa, 大连), 20 μL 体系 (2 × Master Ex Taq II 10 μL, 上、下游引物各 0.8 μL, RNase-free Water 8.2 μL, 1st cDNA 0.2 μL) 在 LightCycler® 480 II 荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 扩增, 每份标本均进行 3 管平行检测 (即 3 管检测内参 β-actin 基因, 3 管检测目的基因)。扩增参数如下: 95 °C 30 s, 45 循环 (95 °C 5 s, 60 °C 30 s)。扩增后行熔解曲线分析, 95 °C 5 s, 60 °C 60 s, 以 0.1 °C /s 速度升温到 95 °C, 连续监测荧光。用自带软件进行相对定量

分析, Ct 值 ≤ 0.5 的样本纳入甲基化分析。

1.5 MS-HRM 及直接测序验证

按 EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN, 德国) 说明书对 500 ng 模板 DNA 进行重亚硫酸盐反应。采用 LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche, 瑞士) 试剂, 20 μL 体系 (Master Mix 1 μL, MgCl₂ 2 μL, H₂O 5.8 μL, 上下游引物各 0.6 μL, 重亚硫酸盐处理后 DNA 1 μL)。扩增参数如下: 预热 95 °C 10 s, 65 循环 (95 °C 10 s, 58 °C 15 s, 72 °C 20 s)。扩增后行熔解曲线分析: 95 °C 60 s, 40 °C 60 s, 65 °C 1 s, 以 1 °C /s 的速度升温到

95℃, 连续监测荧光, 对产物进行特异性分析。通过自带软件 Tm Calling 或 Gene scanning 进行甲基化改变分析。实验中加入甲基化阴性和阳性对照 DNA (TaKaRa, 大连) 作参照。MS-HRM 筛查出的代表性标本多个, 其 MS-HRM 产物直接送测序 (英潍捷基有限公司, 上海) 验证。

1.6 BSP 克隆测序再验证

选取经 MS-HRM 及 DNA 直接测序验证为甲基化和非甲基化的样本各 1 个, 采用 BSP 测序引物对其 PCR 扩增, 扩增产物行 TA 克隆 (均参照相关试剂盒操作程序或分子克隆相关程序进行); 阳性重组质粒进行测序及数据分析 (每种重组质粒至少挑取 6 个克隆进行测序分析)。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料采用 χ^2 检验进行组间比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mRNA 表达水平测定

对 130 例 G6PD 缺乏组的 cDNA 样本进行 Real-time PCR 分析, 其结果为 0.81 ± 0.24 (G6PD/ β -actin), 其中 22 个样本 (男性 16 例, 女性 6 例) 标化后的荧光定量比值 (G6PD/ β -actin) ≤ 0.5 , 纳入甲基化分析, 占比 16.9% (22/130)。

2.2 MS-HRM 分析及 BSP 直接测序验证

MS-HRM 筛查出的代表性标本直接测序与 MS-HRM 分析结果一致, 显示 22 例 G6PD mRNA 表达降低的样本中 16 例男性样本均无甲基化, 6 例女性样本均存在甲基化 (见图 1~2)。由于 6 例女性样本均存在甲基化, 继续分析了 G6PD mRNA 表达正常的缺乏组和对照组女性样本共 44 例 (7 vs 37), 检出缺乏组 6 例、对照组 34 例女性存在甲基化; 由于病例有限, G6PD 缺乏组与对照组的女性, 非甲基化比例差异无统计学意义 (1/7 vs 3/37), P>0.05。

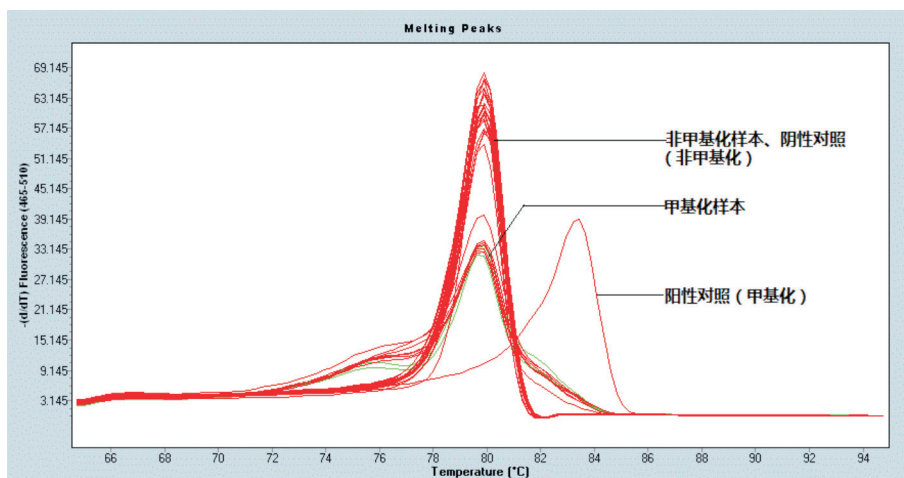


图1 G6PD 基因启动子区的 MS-HRM 分析图 采用 Tm Calling 分析模式, 显示: 男性样本与阴性对照属于同一种峰形, 女性样本的甲基化曲线介于阴性和阳性对照之间, 提示为部分甲基化。

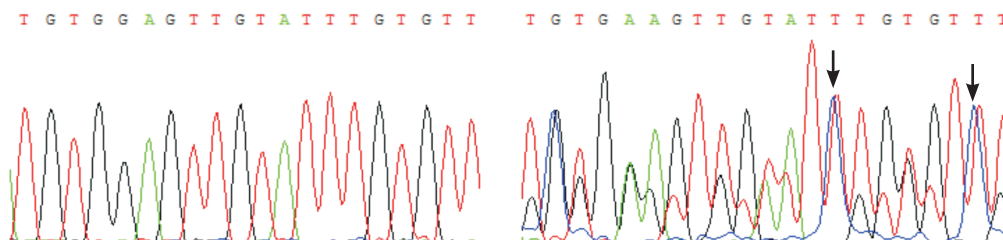


图2 MS-HRM 产物直接测序图 左图: 非甲基化样本; 右图: 部分甲基化样本。箭头所示为甲基化位点 (部分型)。

2.3 BSP 克隆测序再验证

取上述方法检测的非甲基化样本和甲基化样本（均为 G6PD 缺乏组女性）各 1 例行 TA 克隆测

序再验证，结果显示非甲基化样本的 6 个克隆均为非甲基化，而甲基化样本的 6 个克隆中 3 个为非甲基化、3 个为全甲基化，代表性结果见图 3。

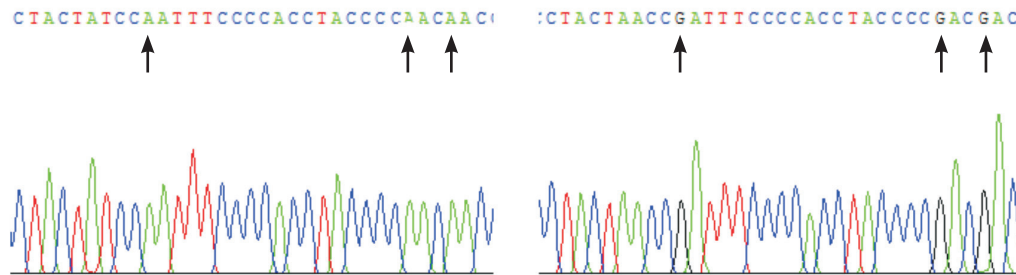


图 3 BSP 克隆测序图 左图：非甲基化 DNA；右图：甲基化 DNA（均为反向测序）。箭头所示为对应的非甲基化或甲基化位点。

3 讨论

G6PD 缺乏症是最常见的 X 连锁不完全显性遗传性红细胞酶缺陷病，主要为 G6PD 基因编码区单个碱基突变导致酶活性改变，目前仍有众多 G6PD 缺乏症患者难以检出任何基因突变^[3-5]。基于 G6PD 基因处于受甲基化影响较多的 X 染色体上，而 DNA 甲基化主要通过启动子区 CpG 岛胞嘧啶甲基化来抑制转录，从而影响 mRNA 的表达及翻译，导致蛋白功能活性的改变。本研究发现 22 例 G6PD mRNA 表达降低的样本中，男性的 G6PD 基因均为非甲基化状态，女性则均为部分甲基化。这与男性仅一条 X 染色体，而女性两条 X 染色体可能存在随机失活现象基本一致，即“莱昂假说”：哺乳动物为保证两性之间转录水平平等，通过雌性个体随机失活一条 X 染色体，并在随后的细胞增殖和分化过程中得以维持和传递。X 染色体失活维持则主要依靠启动子区甲基化^[8]。据此，本研究组推测 G6PD 基因启动子的甲基化与男性患儿无关，但与女性患儿的关系不知是否仅与 X 染色体失活相关。因此，我们对 G6PD mRNA 表达正常的缺乏组以及对照组的女性进行了 G6PD 基因启动子甲基化分析，发现大部分存在部分甲基化（40/44），小部分（4/44）为非甲基化状态；由于病例有限，G6PD 缺乏组与对照组的非甲基化比例差异无显著性，无法评估两个等位基因均非甲基化在 G6PD 缺乏中的独特意义。而本研究发现，女性两个等位 G6PD 基因均无甲基化现象即均不失活，与“莱昂假说”相矛盾。为此进一步查阅相关文献，有研

究报道某些基因存在 X 染色体失活逃逸，即女性 X 染色体上某些基因逃脱 X 染色体而失活，在失活和有活性的 X 染色体均有表达^[9]。另有多项研究显示失活基因在男性未甲基化，在女性则为部分甲基化，这反映出女性失活 X 染色体上启动子 CpG 处于甲基化，未失活 X 染色体上启动子 CpG 处于非甲基化，而失活逃逸基因则在失活与未失活 X 染色体上均非甲基化^[10-11]。一项基于第二代测序技术的 RNA 测序研究分析了欧洲和西非约鲁巴正常人群的 B 淋巴细胞系，发现 G6PD 基因存在 X 染色体失活逃逸现象^[12]，这是目前报道 G6PD 基因存在 X 染色体失活逃逸现象的唯一文献。据此，我们推测本次研究发现的非甲基化状态很可能与 X 染色体失活逃逸有关。由于女性 G6PD 基因存在 X 染色体失活与失活逃逸，而甲基化改变是其主要分子机制，因此可以说甲基化改变对女性 G6PD 缺乏症可能有一定的影响。

另外，值得一提的是，本研究采用的 MS-HRM 技术是基于 HRM 分析的新技术，具有高通量、快速、低成本、可同时检测甲基化的优势^[13-15]。HRM 技术是一种近年来兴起的用于突变扫描、甲基化分析、基因型分型的最新遗传学分析方法，根据 DNA 序列的长度，GC 含量及碱基互补性差异，应用 HRM 对样品进行分析，其极高的温度均一性和温度分辨率可以区分单个碱基的差异。重亚硫酸盐处理后的 DNA 样本其甲基化和未甲基化 PCR 产物存在 C 和 T 碱基的差异，从而可利用 HRM 原理进行是否甲基化识别。有研究报道 HRM 方法检测 MGMT 启动子区域内的甲基化状态，可检测到

低达 0.1% 的甲基化程度,与焦磷酸测序结果基本一致并且可以根据已经甲基化程度的标准曲线对未知样品的甲基化百分比进行测定^[13]。另外,结合 MS-HRM 产物直接测序则可对相关标本进行快速验证。本次研究的 MS-HRM 筛查分析结果高效地将甲基化与非甲基化区分开来,为该方法提供了佐证,其产物直接测序以及 BSP 克隆测序也证实了该方法的有效性。本课题组认为该方法在单基因甲基化检测中具有较大应用价值,值得进一步推广应用。

[参 考 文 献]

- [1] Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. Lancet, 2008, 371(9606): 64-74.
- [2] Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations[J]. Blood Cells Mol Dis, 2012, 48(3): 154-165.
- [3] 潘美晨, 蔡应木. G6PD 缺乏症基因型检测新方法的建立及分子流行特征分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(4): 222-226.
- [4] Jiang W, Yu G, Liu P, et al. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population[J]. Hum Genet, 2006, 119(5): 463-478.
- [5] Yan JB, Xu HP, Xiong C, et al. Rapid and reliable detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations in Han Chinese using high-resolution melting analysis[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(3): 305-311.
- [6] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease[J]. Nat Biotechnol, 2010, 20(8): 1057-1068.
- [7] 李长钢, 陈小文, 陈运生, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏患儿 G6PD mRNA 表达的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(5): 385-387.
- [8] Gendrel AV, Heard E. Fifty years of X-inactivation research[J]. Development, 2011, 138(23): 5049-5055.
- [9] Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females[J]. Nature, 2005, 434(7031): 400-404.
- [10] Cotton AM, Lam L, Affleck JG, et al. Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation[J]. Hum Genet, 2011, 130(2): 187-201.
- [11] Cotton AM, Avila L, Penaherrera MS, et al. Inactive X chromosome-specific reduction in placental DNA methylation[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(19): 3544-3552.
- [12] Zhang Y, Castillo-Morales A, Jiang M, et al. Genes that escape X-inactivation in humans have high intraspecific variability in expression, are associated with mental impairment but are not slow evolving[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2588-2601.
- [13] Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(6): e41.
- [14] Mastoraki S, Chimonidou M, Dimitrakopoulos L, et al. A rapid and accurate closed-tube Methylation-Sensitive High Resolution MeltingAnalysis assay for the semi-quantitative determination of SOX17 promoter methylation in clinical samples[J]. Clin Chim Acta, 2015, 444: 303-309.
- [15] Candiloro IL, Mikeska T, Dobrovic A. Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation[J]. Epigenetics, 2011, 6(4): 500-507.

(本文编辑: 俞燕)