

## 云南省迁延性新生儿黄疸与 UGT 1A1 基因多态性的遗传关联性研究

蒋榆辉<sup>1)</sup>, 胡敏<sup>2)</sup>, 刘玲<sup>1)</sup>, 李杨方<sup>1)</sup>, 崔珊<sup>1)</sup>, 张路<sup>1)</sup>

(1) 昆明市儿童医院新生儿科, 云南昆明 650031; 2) 昆明学院昆明分子医学研究中心, 云南昆明 650011)

**[摘要]** **目的** 探讨尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGT1A1) 基因编码序列 (Gly71Arg) 的突变及启动序列 (非编码序列即 TATA) 核苷酸的多态性与云南省迁延性新生儿黄疸遗传关联性. **方法** 289 例迁延性新生儿黄疸作为病例组, 96 例无黄疸新生儿作为对照组. 采用常规方法提取 DNA, 用聚合酶链反应 (PCR) 方法扩增 UGT1A1 第 1 外显子, 琼脂糖凝胶电泳鉴定产物, PCR 产物进行 DNA 测序. **结果** 病例组与对照组 Gly71Arg 等位基因突变率分别为 33% 及 17%, 病例组 Gly71Arg 基因频率显著高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 病例组与对照组 TATA 等位基因突变率均为 8%, 等位基因频率在病例组及对照组间无统计学差异 ( $P > 0.05$ ). **结论** 云南省迁延性新生儿黄疸的发生与 Gly71Arg 突变密切相关, 而与 TATA 的多态性无关.

**[关键词]** 新生儿; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶; 基因突变; 黄疸

**[中图分类号]** R722.17 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 07 - 0015 - 04

## The Heredity Relevance of UGT1A1 Gene Mutation to the Neonate Persisting Jaundice in Yunnan

JIANG Yu - hui<sup>1)</sup>, HU Min<sup>2)</sup>, LIU Ling<sup>1)</sup>, LI Yang - fang<sup>1)</sup>, CUI Shan<sup>1)</sup>, ZHANG Lu<sup>1)</sup>

(1) Kunming Children's Hospital, Kunming Yunnan 650031; 2) Kunming Molecular Medicine Research Center, Kunming University, Kunming Yunnan 650011, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the heredity relevance of UGT1A1 gene mutation in exon (Gly71Arg) and priming (TATA) to the neonate persisting jaundice in Yunnan. **Methods** 289 persisting jaundice neonates were selected in the case group, and 96 neonates without jaundice were selected in the control group. DNA was extracted by regular method, and the first exon of UGT1A1 was amplified by PCR, the PCR product was identified by argrose gel electrophoresis and sequencing. **Results** The allele gene frequency of G71R were 33% and 17% in the case group and the control group, the allele gene frequency of G71R was significantly higher in the case group than the control group, the difference had statistical significance ( $P < 0.01$ ). The allele gene frequency of TATA were 8% and 8% in the case group and the control group, and there was no statistical difference between two groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The persisting jaundice is closely correlated with Gly71Arg mutation, and has no relation with TATA mutation in Yunnan.

**[Key words]** Infant; UGT 1A1 gene; Gene mutation; Jaundice

迁延性新生儿黄疸是指病因不明、临床常规治疗效果不理想、黄疸持续时间大于 2 周的一类新生儿黄疸<sup>①</sup>。这类黄疸往往病情严重或迁延, 易造成

胆红素脑病或多器官功能损害。尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (uridine 5'-diphosphate - glucuronosyltransferase 1A1, UGT 1A1) 是肝脏中

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81060361); 昆明学院科学研究基金资助项目 (XJ11017)

**[作者简介]** 蒋榆辉 (1976 ~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 主治医师, 主要从事儿科临床工作。胡敏和蒋榆辉对本文有同等贡献。

**[通讯作者]** 刘玲. E-mail:948738656@qq.com; 毕之琪. E-mail:81299333@qq.com

惟一具有胆红素葡萄糖醛酸化反应活性的酶,在胆红素代谢中起重要作用.该基因的多态性是先天性非溶血性黄疸的重要原因,与新生儿迁延性黄疸的高发生率有关.本研究旨在探讨 UGT1A1 基因 Gly71Arg 突变和启动子 TATA 突变与云南省迁延性新生儿黄疸遗传关联性,现报告如下.

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

病例组为昆明市儿童医院2010年3月至2011年3月收治的迁延性新生儿黄疸289例,日龄为7~28d,男170例,女119例,胎龄均 $\geq 37$ 周,平均胎龄( $272.49 \pm 7.59$ )d,出生体重( $3.15 \pm 0.46$ )kg,总胆红素( $371.64 \pm 112.50$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,间接胆红素( $357.1 \pm 108.9$ ) $\mu\text{mol/L}$ .排除新生儿溶血症、感染、颅内出血、头颅血肿、母乳性黄疸、甲状腺功能低下、红细胞增多症、窒息、缺氧、低出生体重及其他围产因素等病因,入院后经光疗、药物等治疗后黄疸消退欠佳,符合迁延性新生儿黄疸诊断<sup>[1]</sup>.对照组:为同期住院的无黄疸患儿96例.胎龄均 $\geq 37$ 周,平均胎龄( $277.9 \pm 7.52$ )d,男54例,女42例,出生体重( $3.21 \pm 0.62$ )kg,日龄为7~28d的新生儿.与病例组男女比例、胎龄、出生体重、日龄、开奶时间、红细胞压积等比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ).

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 取静脉血 2 mL, EDTA 抗凝,加 3% 明胶生理盐水分离白细胞.酚-氯仿抽提,无水乙醇沉淀 DNA.加 75% 乙醇保存备用,做 PCR 前用 TE 缓冲液充分溶解 DNA.

**1.2.2 引物设计** 根据 UGT1A1 基因第 1 外显子序列和侧翼结构<sup>[2,3]</sup>参考文献<sup>[4]</sup>设计引物.检测 Gly71Arg 基因型 PCR 引物:上游引物 5' CACCT-GACGCCTCGTTGTA3';下游引物 5' GAACAGCC-AGACAAAAGCATAG3'; TATA 盒基因型检测:SSCP.反应体系:10 $\times$ PCR 缓冲液(15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 2.5  $\mu\text{L}$ , 4 $\times$  NTP (10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , 上游引物:5'AGCCAGTTCAACTGTTGTTGC 3';下游引物:5'CTAGGACAACTATTTTCATGTCC 3',模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ , 去离子水 19  $\mu\text{L}$ .

**1.2.3 PCR 产物提取** 反应体系总体积 50  $\mu\text{L}$ , 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$ , 12 min, 变性 94  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 退火 64  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min. 循环 35 次. PCR 产物经 2% Agarose 电泳检测, 溴乙啶染色,

紫外灯观察, 鉴定 PCR 产物. PCR 产物为包含 UGT1A1 基因第 1 外显子在内的 935 bp 片段, 呈单一区带, 用 100 bp DNA Ladder 作 Marker 测定 PCR 产物大小. 1% 琼脂糖电泳, 150 V、100 mA 20 min 电泳观察, 见图 1.

**1.2.4 PCR 产物测序** 进行 PCR 产物直接测序以验证结果.

### 1.3 统计学处理

用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

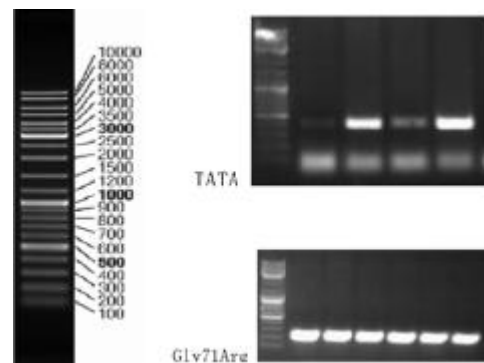


图 1 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis figure

## 2 结果

### 2.1 UGT1A1 Gly71Arg 基因型分布及等位基因突变率分析

2 组 385 例新生儿中 G71R 突变杂合子 (Arg/Gly) 145 例, 突变纯合子 (Arg/Arg) 38 例. 病例组 G71R 基因突变频率 0.33 高于对照组 0.17, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 1.

### 2.2 UGT1A1 TATA 基因型分布及等位基因突变频率

本次研究 2 组婴儿中发现 UGT1A1 TATA 突变纯合子 A (TA) 7TAA (7/7) 3 例. 等位基因突变频率在病例组及对照组均为 8%, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2.

## 3 讨论

新生儿黄疸是一个全球儿科医生共同关注的问题. 目前导致新生儿黄疸的部分病因已明确, 但仍有相当一部分病例的病因不明. 资料显示尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 (uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase, UGT) 可

表 1 2 组 UGT1A1 G71R 基因型分布及等位基因突变频率比较 [n(%)]

Tab. 1 Comparison of the genotype distribution and the allele gene frequency of UGT1A1 G71R between two groups [n(%)]

组 别	n	UGT1A1 基因型			等位基因突变频率
		纯合子	杂合子	野生型	
病例组	289	35(12)	118(41)	136(47)	188(33)**
对照组	96	3(3)	27(28)	66(69)	33(17)

与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ .

表 2 2 组 UGT1A1 TATA 基因型分布及等位基因频率比较 [n(%)]

Tab. 2 Comparison of the genotype distribution and the allele gene frequency of UGT1A1 TATA between two groups [n(%)]

组 别	n	UGT1A1 基因型			等位基因突变频率
		纯合子	杂合子	野生型	
病例组	289	3(1)	40(14)	246(85)	46(8)
对照组	96	0(0)	16(17)	80(83)	16(8)

能是引起新生儿原因不明高胆红素血症或迁延性黄疸的原因之一。UGT 存在于大部分脊椎动物的肝微粒体中, 是生物体内进行第 II 相生物转化时最重要的酶之一, 属于糖基转移酶超家族, 最重要的是 UGT1 和 UGT2 家族。其中 UGT1A1 基因主要分布于肝脏, 是肝脏中唯一具有胆红素葡萄糖醛酸化反应活性的酶, 也是调节胆红素清除的关键酶。该基因编码序列的突变可导致 UGT 结构异常, 出现酶结合功能的缺陷或丧失<sup>[5]</sup>, 而启动序列 (非编码序列) 核苷酸的多态性则导致表达能力下降引起酶活性降低, 从而使非结合胆红素在体内蓄积, 是新生儿黄疸发生发展的高危因素<sup>[4,6,7]</sup>。资料表明, UGT1A1 基因突变类型存在人种和地域差异, 欧美多为 (TA) 7 基因突变<sup>[8,9]</sup>, Gly71Arg 突变在白种人和非洲人中尚未发现, 而亚洲多为 Gly71Arg 基因突变<sup>[4,7,10]</sup>, TATA 启动子变异较为罕见。本组研究结果显示病例组 289 例患儿 UGT 1A1 基因 Gly71Arg 多态性的等位基因突变频率为 33%, 与东亚人群中 (日本、韩国和中国台湾人) 为 16% ~ 26%、广西钟丹妮等<sup>[11]</sup>报道为 34% 相一致, 证实云南省新生儿迁延性黄疸的发生和该基因多态性密切相关。另外, 本研究还显示 UGT1A1 基因启动子 TATA 等位基因突变频率病例组 (8%) 与正常组 (8%) 无统计学差异, 表明云南省新生儿迁延性黄疸发生与该基因的突变无明显相关性。而 UGT1A1 TATA 纯合子 A (TA) 7TAA (7/7) 的基因频率为 1%, 与有关资料所示亚洲人群中 UGT1A1 基因的多态性主要表现在编码区, 而罕见 TATA 启动子变异的报道<sup>[12]</sup>相一致。由此可见 UGT1A1 基因的多态

性在不同种族, 或同一种族的不同民族, 甚至同一民族在不同的地理环境中存在差异, 从而导致与该基因有关的新生儿黄疸出现人种、民族、地区之间的差异, 这可能是环境和遗传因素共同作用的结果。因此, 笔者将进一步开展大样本的 UGT1A1 基因多态性的研究以了解云南省不同民族不同地区新生儿黄疸的遗传高危因素。

#### [参考文献]

- [1] 诸福棠, 吴瑞萍, 胡亚美主编. 实用儿科学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 467.
- [2] RITTER J K, CRAWFORD J M, OWENS I S. Cloning of two human liver bilirubin UDP glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS 1 cells [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 1 043 - 1 047.
- [3] BOSMA P J, CHOWDHURY N R, GOLDHOORN B G, et al. Sequence of exons and the flanking regions of human bilirubin UDP glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome, type I [J]. Hepatology, 1992, 15: 941 - 947.
- [4] AKABA K, KIMURA T, SASAKI A, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and mutation of the bilirubin uridine diphosphat e-glucuronosyl transferase gene: a common missense mutation among [J]. Japanese, Koreans and Chinese Biochem Mol Biol Intl, 1998, 46: 21 - 26.
- [5] COSTA E. Hematologically important mutations: Bilirubin UDP-glucuronosyl transferase gene mutations in Gilbert and

(下转第 27 页)

单, 疗效显著, 能够明显缩短疗程, 起效快且不易复发, 该治疗方法无创伤, 无毒副作用, 容易被接受, 值得我们临床进一步推广应用.

### [参考文献]

- [1] 中华妇产科学分会感染性疾病协作组. 外阴阴道念珠菌病诊治规范(草案) [J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39: 430 - 431.
- [2] SOBEL J D, WIESENFEID H C, MARTENSM, et al. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvo vaginal candidiasis [J]. *New Engl J Med*, 2004, 351: 876 - 883.
- [3] WENDLING W, POLI A, MAGNANI P. Clinical effects of nifuratel in vulvovaginal infection: A meta-analysis of metronidazole-controlled trials [J]. *A Rzneim Forsch Drug Res*, 2002, 52: 7 255 - 7 273.
- [4] 刘睿. 硝咪太尔制霉素阴道软胶囊治疗复发性外阴阴道念珠菌病的临床研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2009, 18(10): 794 - 795.
- [5] 蒋学风, 罗新. 生物膜与阴道炎症 [J]. *现代妇产科进展*, 2011, 20(2): 146 - 147.
- [6] 宋志琴, 王蔼明. ATP-红外生物效应技术用于治疗慢性宫颈炎的临床观察 [J]. *医学综述*, 2011, 9(17): 2 697 - 2 700.

(2012 - 02 - 10 收稿)

(上接第 17 页)

- Crigler -Najjar syndromes [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2006, 36(1): 77 - 80.
- [6] AKABA K, KIMUR A T, SASAKI A, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and a common mutation of the bilirubin uridine diphosphate glucuronosyl transferase gene in Japanese [J]. *J Hum Genet*, 1999, 44(1): 22 - 25.
- [7] MARUO Y, NISHIZAWA K, SATO H, et al. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP glucuronosyl transferase polymorphism [J]. *Pediatrics*, 1999, 103(6): 1 224 - 1 227.
- [8] BOSMA P J, GOLDHOORN B, OUDE ELFERINK R P, et al. A mutation in bilirubin uridine 5'-diphosphate glucuronosyl transferase isoform causing Crigler-Najjar type II [J]. *Gastroenterology*, 1993, 105: 216 - 220.
- [9] MONAGHAN G, MCLELLAN A, MCGEEHAN A, et al. Gilbert-syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn [J]. *J Pediatr*, 1999, 134: 441 - 446.
- [10] AONO S, ADACHI Y, UYAMA E, et al. Analysis of genes for bilirubin UDP glucuronosyl transferase in Gilbert-syndrome [J]. *Lancet*, 1995, 345: 958 - 959.
- [11] 钟丹妮, 刘悠南. 广西新生儿胆红素·尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶基因 G ly71A 突变的研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2002, 40(10): 579 - 581.
- [12] 孙革, 杜立中. 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 基因与新生儿黄疸 [J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(1): 71 - 73.

(2012 - 03 - 17 收稿)