

## 云南省重症新生儿黄疸与 Gly71Arg 基因多态性研究

刘玲<sup>1)</sup>, 胡敏<sup>2)</sup>, 毕之琪<sup>2)</sup>, 张路<sup>1)</sup>, 蒋榆辉<sup>1)</sup>, 李杨方<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 650214)

**[摘要]** **目的** 探讨尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶基因 (UGT 1A1) 编码序列 Gly71Arg 的多态性与云南省重症新生儿黄疸的关联性. **方法** 78 例重症新生儿黄疸作为病例组, 30 例无黄疸新生儿作为对照组. 采用常规酚氯仿法提取 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 等位基因多态性率分别为 32.1% 及 13.3%, 病例组 Gly71Arg 基因频率显著高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 病例组中 Gly71Arg 突变型与野生型总胆红素值比较, 结果提示突变型总胆红素值高于野生型, 但差值无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). **结论** 云南省重症新生儿黄疸的发生与 Gly71Arg 多态性密切相关, 但总胆红素值在 Gly71Arg 多态性中差异无统计学意义.

**[关键词]** 新生儿; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶; 基因多态性; 黄疸; Gly71Arg

**[中图分类号]** R722.17 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 07 - 0018 - 03

## The Heredity Relevance of Gly71Arg Gene Polymorphism to Severe Neonatal Jaundice in Yunnan

LIU Ling<sup>1)</sup>, HU Min<sup>2)</sup>, BI Zhi - qi<sup>2)</sup>, ZHANG Lu<sup>1)</sup>, JIANG Yu - hui<sup>1)</sup>, LI Yang - fang<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 Gly71Arg gene mutation to severe neonatal jaundice in Yunnan. **Methods** 78 cases of severe neonatal jaundice were selected into the case group, and 30 neonates without jaundice were enrolled into the control group. Routine phenol- chloroform method was used to extract DNA, and PCR was used to amplify the first exon of UGT1A1, PCR products were indentified by argrose gel electrophoresis and sequencing. **Results** The allele gene frequency of Gly71Arg was 32.1% and 13.3% in the case group and the control group, respectively, and there was a statistically significant difference between the two groups ( $P < 0.01$ ). In the case group, the total bilirubin of mutation was higher than wild type, but it had no statistical difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Severe neonatal jaundice is intimately correlated with Gly71Arg mutation, but the total bilirubin is independent with Gly71Arg mutation in Yunnan.

**[Key words]** Neonate; UGT 1A1; Gene polymorphism; Jaundice; Gly71Arg

重症新生儿黄疸是指病因不明, 临床常规治疗效果不理想, 黄疸持续时间长, 总胆红素值  $> 342 \mu\text{mol/L}$  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'-diphos-phate-glucuronosy ltransferase 1A1, UGT 1A1) 是肝脏中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, 与新生儿重症黄疸的高发生率有关. 广西钟丹妮等<sup>[2]</sup>报

**[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 (XJ11.017)

**[作者简介]** 刘玲 (1971 ~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事儿科临床工作. 胡敏和刘玲对本文有同等贡献.

**[通讯作者]** 蒋榆辉. E-mail:943028789@qq.com; 毕之琪. E-mail:81299333@qq.com

道,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶基因 Gly71Arg 多态性与广西新生儿黄疸的发病密切相关,该研究旨在探讨 UGT1A1 基因 Gly71Arg 多态性与云南省重症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新生儿科2011年6月至2011年11月收治的重症新生儿黄疸78例,日龄为7~28d,男48例,女30例,胎龄均 $\geq 37$ 周,平均胎龄( $272.49 \pm 7.59$ )d,出生体重( $3.05 \pm 0.53$ )kg,总胆红素( $471.64 \pm 112.50$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,间接胆红素( $457.1 \pm 108.9$ ) $\mu\text{mol/L}$ 。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,符合重症新生儿黄疸诊断<sup>[1]</sup>。对照组:为同期住院的无黄疸患儿30例。胎龄均 $\geq 37$ 周,平均胎龄( $277.9 \pm 7.52$ )d,男17例,女13例,出生体重( $3.11 \pm 0.42$ )kg,日龄为(7~28)d的新生儿。与病例组在男女比例、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( $P > 0.05$ ),具有可比性。

### 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>[3,4]</sup>参考文献<sup>[5]</sup>设计引物。检测 G71R 基因型 PCR 引物:上游引物 5' CACCTGAC-GCCTCGTTGTA 3';下游引物 5' GAACAGCCAGA-

CAAAAGCATAG 3'。

**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

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

## 2 结果

### 2.1 UGT1A1 Gly71Arg 基因型分布及等位基因多态性率分析

两组 108 例新生儿中 G71R 多态性杂合子 (Arg/Gly) 48 例,多态性纯合子 (Arg/Arg) 5 例。病例组 Gly71Arg 基因多态性频率 0.321 高于对照组 0.133,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),见表 1。

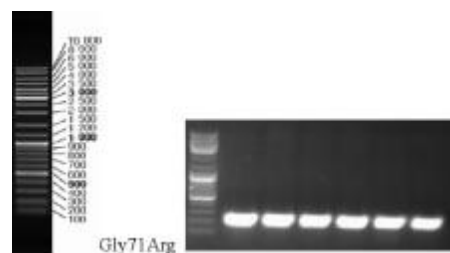


图 1 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis picture

表 1 2 组 UGT1A1 G71R 基因型分布及等位基因多态性频率比较 [n(%)]

Tab. 1 Comparison of UGT1A1 G71R genotype distribution and gene polymorphism frequencies 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	78	5(6.4)	40(51.3)	33(42.3)	32.1**
对照组	30	0(0)	8(26.7)	22(73.3)	13.3

与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

## 2.2 病例组中总胆红素值比较

78 例重症新生儿黄疸病例中, Gly71Arg 野生型 33 例总胆红素值 ( $452.06 \pm 60.61$ )  $\mu\text{mol/L}$ , Gly71Arg 突变型 45 例 ( $489.23 \pm 59.58$ )  $\mu\text{mol/L}$ , 提示重症新生儿黄疸伴 Gly71Arg 突变型患儿总胆红素值高于野生型, 但差值无统计学意义 ( $P > 0.05$ ).

## 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. 该基因编码序列的多态性可导致 UGT 结构异常, 出现酶结合功能的缺陷或丧失<sup>[6]</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>[5,7,8]</sup>. 资料表明, UGT1A1 基因多态性类型存在人种和地域差异, Gly71Arg 多态性在白种人和非洲人中尚未发现, 而亚洲多为 Gly71Arg 基因多态性<sup>[5,8,9]</sup>. 本组研究结果显示病例组 78 例患儿 UGT 1A1 基因 Gly71Arg 多态性的等位基因多态性频率为 32.1%, 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>[2]</sup>报道为 34%相一致, 证实云南省新生儿重症黄疸的发生和该基因多态性密切相关. 本组研究数据同时显示重症新生儿黄疸伴 Gly71Arg 突变型患儿平均总胆红素值高于野生型, 但差值不具有统计学意义 ( $t = 1.935$ ,  $P = 0.069$ ), 说明 Gly71Arg 多态性虽然和新生儿重症黄疸密切相关, 但不是新生儿重症黄疸的唯一原因.

有文献报道 Gly71Arg 基因多态性在不同种族, 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<sup>[10]</sup>. 本次研究我们也发现云南地区部分少数民族存在这种

差异, 但是由于本次研究收集样本数量有限, 地域性不强, 不能全面代表云南省不同地区的各种少数民族难治性或迁延性黄疸 Gly71Arg 基因的多态性, 笔者将进一步开展地域性强的大样本 Gly71Arg 基因多态性的研究, 以了解云南省部分少数民族新生儿重症黄疸的遗传高危因素.

## [参考文献]

- [1] 诸福棠, 吴瑞萍, 胡亚美. 实用儿科学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 467.
- [2] 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 Gly71Arg 多态性的研究[J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(10): 579-581.
- [3] 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: 1043-1047.
- [4] 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.
- [5] AKABA K, KIMURA T, SASAKI A, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and mutation of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyl transferase gene: a common missense mutation among Japanese, Koreans and Chinese [J]. Biochem Mol Biol Intl, 1998, 46: 21-26.
- [6] COSTA E. Hematologically important mutations: Bilirubin UDP-glucuronosyl transferase gene mutations in Gilbert and Crigler - Najjar syndromes [J]. Blood Cells Mol Dis, 2006, 36(1): 77-80.
- [7] AKABA K, KIMURA 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.
- [8] MARUO Y, NISHIZAWA K, SATO H, et al. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP glucuronosyl transferase polymorphism [J]. Pediatrics, 1999, 103(6): 1224-1227.
- [9] 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.
- [10] 钟丹妮, 刘义, 林伟雄, 等. 胆红素-尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶基因突变类型对广西新生儿高胆红素血症发病的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(6): 838-840.

(2012-04-03 收稿)