

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2202127

论著·临床研究

## 广西三江侗族新生儿 *UGT1A1* 基因变异分析

姚璇<sup>1</sup> 钟丹妮<sup>1</sup> 彭运聪<sup>2</sup>

(1. 广西医科大学第一附属医院儿科, 广西南宁 530021;

2. 三江县人民医院儿科, 广西柳州 545500)

**[摘要]** **目的** 探讨广西柳州三江侗族新生儿 *UGT1A1* 基因变异特点及其与侗族新生儿高胆红素血症发生的关系。**方法** 前瞻性选取2021年1月至2022年1月于三江县人民医院新生儿科诊断不明原因高胆红素血症的新生儿84例为研究对象;另选取同期健康新生儿60例纳入健康对照组。提取两组新生儿外周血基因组DNA,对*UGT1A1*启动子区TATA盒和外显子1进行PCR扩增并进行基因测序。**结果** 病例组检测出33例G71R错义突变,突变率为39%,A等位基因频率(21%)显著高于健康对照组(10%)( $P<0.05$ )。携带G71R错义突变基因型的侗族新生儿发生高胆红素血症的风险是携带野生型的健康新生儿的2.588倍( $P<0.05$ )。Hardy-Weinberg遗传平衡检验结果提示两组新生儿*UGT1A1*G71R位点基因型符合遗传平衡( $P>0.05$ )。**结论** *UGT1A1*G71R突变是三江侗族新生儿高频基因变异类型,且G71R错义突变与侗族新生儿发生高胆红素血症相关。

[中国当代儿科杂志, 2022, 24(7): 792-796]

**[关键词]** 高胆红素血症; *UGT1A1* 基因; 侗族; 基因变异; 新生儿

### *UGT1A1* gene mutations in Chinese Dong neonates in Sanjiang, Guangxi

YAO Xuan, ZHONG Dan-Ni, PENG Yun-Cong. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China (Zhong D-N, Email: danny5911@163.com)

**Abstract: Objective** To study the characteristics of *UGT1A1* gene mutations in Dong neonates in Sanjiang County of Liuzhou and its association with the pathogenesis of hyperbilirubinemia in Dong neonates. **Methods** A prospective analysis was performed on 84 neonates who were diagnosed with unexplained hyperbilirubinemia in the Department of Neonatology, Sanjiang County People's Hospital, from January 2021 to January 2022. Sixty healthy neonates born during the same period were enrolled as the control group. Peripheral blood genomic DNA was extracted for both groups, and *UGT1A1* exon 1 was amplified by PCR and sequenced. **Results** In the case group, 33 neonates were found to have G71R missense mutation, with a mutation rate of 39%. The case group had a significantly higher frequency of A allele than the healthy control group (21% vs 10%,  $P<0.05$ ). The risk of hyperbilirubinemia in Dong neonates carrying G71R missense mutation was 2.588 times as high as that in healthy neonates carrying wild-type *UGT1A1* gene ( $P<0.05$ ). Hardy-Weinberg equilibrium testing showed that the *UGT1A1* G71R locus was in genetic equilibrium in both groups ( $P>0.05$ ). **Conclusions** *UGT1A1* G71R mutation is a high-frequency gene mutation type in Dong neonates in Sanjiang County, and G71R missense mutation is associated with hyperbilirubinemia in Dong neonates.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2022, 24(7): 792-796]

**Key words:** Hyperbilirubinemia; *UGT1A1* gene; Dong nationality; Gene mutation; Neonate

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (uridine diphosphate-glucuronosyl transferase, UGT) 是1种重要的Ⅱ相药物代谢酶,UGT大家族中的UGT1是由染色体2q37的1个UGT1位点编码,包含了第1

外显子(A1-A13)和4个共同外显子(2~5),分别组成9种亚型,UGT1A1是其中1种,并且目前研究发现UGT1A1是参与调控胆红素结合反应唯一的关键酶<sup>[1-2]</sup>。*UGT1A1*基因发生突变,可能会导致

[收稿日期] 2022-03-01; [接受日期] 2022-05-31

[作者简介] 姚璇,女,硕士研究生。

[通信作者] 钟丹妮,女,教授。Email: danny5911@163.com。

酶活性降低甚至消失,使胆红素正常代谢过程受阻,胆红素积聚而引起新生儿高胆红素血症<sup>[3]</sup>。*UGT1A1*变异可能存在人种和地区差异。柳州三江县是多民族聚居地,以侗族为主,并且新生儿高胆红素血症发病率较高。本研究通过检测三江县侗族新生儿热门基因变异位点,了解三江县侗族新生儿*UGT1A1*基因变异情况,探讨*UGT1A1*基因变异与三江县侗族新生儿不明原因高未结合胆红素血症的关系,以便为当地新生儿黄疸病因诊断及治疗提供更多遗传学依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

前瞻性选取2021年1月至2022年1月于三江县人民医院新生儿科诊断不明原因高胆红素血症的新生儿84例为研究对象。其中男51例,女33例;胎龄 $\geq 37$ 周,日龄2~14 d;出生体重2.5~4.0 kg;三代纯系侗族。根据2014年制定的《新生儿高胆红素血症诊断和治疗专家共识》<sup>[4]</sup>,当总胆红素值大于相应小时龄的胆红素光疗值,以间接胆红素增高为主,可诊断高胆红素血症。排除标准:ABO或Rh血型不合所致溶血性疾病、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏、红细胞增多症、严重败血症、头颅血肿等体内出血、低出生体重儿、小于胎龄儿、早产儿、巨大儿、围生期缺氧窒息、低血糖、甲状腺功能减退、地中海贫血者予以排除。另选取同期在三江县人民医院产科出生的健康新生儿60例纳入健康对照组,其中男36例,女24例;胎龄 $\geq 37$ 周,日龄2~14 d;出生体重2.5~4.0 kg;三代纯系侗族。住院观察3~5 d后出院并随访至生后2周,胆红素水平未达到“光疗”标准。该研究已获得医院伦理委员会批准(2021KY-E-286)。

### 1.2 DNA提取

取两组新生儿外周血2 mL以EDTA抗凝,用血液基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取基因组DNA,置-20℃保存。

### 1.3 PCR反应及电泳鉴定

根据课题组前期研究设计上游引物:5'-GTCACGTGACACAGTCAAAC-3',下游引物:5'-AAGTAGGAGAGGGCGAACC-3'<sup>[5]</sup>,扩增片段主要为*UGT1A1*启动子区TATA盒和外显子1的DNA片段,片段长度999 bp。

PCR体系(总体积50  $\mu$ L): 2  $\times$  Es Taq

MasterMix 25  $\mu$ L,上下游引物各2  $\mu$ L, DNA模板500 ng,无酶水补充至50  $\mu$ L。PCR程序:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环30次;72℃再延伸2 min。产物置于4℃保存。

2%琼脂糖凝胶用I型核酸染料染色,以DNA Marker为分子量参照物,取PCR产物5  $\mu$ L,电压120 V,电泳30 min。利用生物电泳图像分析系统观察DNA电泳条带。不符合要求的PCR产物重新提取血液DNA,直至获得电泳结果符合要求。

### 1.4 基因测序

经电泳检测过的所有合格的PCR产物,送上海生工生物工程股份有限公司进行正向测序。应用Chromas软件分析测序结果,测序结果比对基因文库的*UGT1A1*基因序列,观察波形,发现有碱基变异点的产物重新进行反向测序,以确保结果真实可靠。

### 1.5 统计学分析

用SPSS 20.0软件进行统计学分析。对符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用成组*t*检验;计数资料采用率(%)或例数表示,对两组等位基因频率、基因型频率比较采用卡方检验或Fisher确切概率法;logistic回归方程分析基因变异对新生儿高胆红素血症发生的影响因素; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用SHEsis在线分析平台进行Hardy-Weinberg平衡检验<sup>[6]</sup>, $P > 0.05$ 为符合遗传平衡。

## 2 结果

### 2.1 琼脂糖凝胶电泳结果

经PCR扩增后得到的*UGT1A1*启动子区TATA盒和外显子1的DNA片段产物,经琼脂糖凝胶电泳结果呈单一条带,PCR扩增片段与目的片段长度(999 bp)相符,见图1。

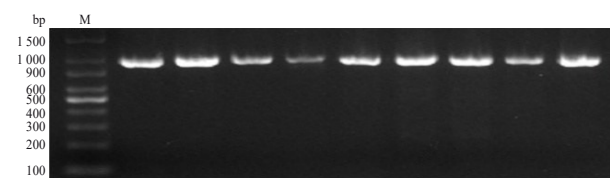


图1 琼脂糖凝胶电泳检测结果 M为Marker;右侧白色条带为*UGT1A1*启动子区TATA盒和外显子1的DNA扩增片段(999 bp)。

## 2.2 一般情况

病例组与健康对照组的出生体重、胎龄、性别比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 具有可比性, 见表1。

## 2.3 UGT1A1基因突变观察结果

第1外显子区: 在病例组中观察到G71R杂合突变30例, 纯合突变3例, 突变频率为39% (33/84); 在健康对照组观察到杂合突变12例, 无纯合突变, 突变频率为20% (12/60)。两组均为错

义突变, 具体情况详见图2。

表1 两组新生儿一般资料比较

组别	例数	出生体重 ( $\bar{x} \pm s, g$ )	胎龄 ( $\bar{x} \pm s, 周$ )	性别 (男/女, 例)
健康对照组	60	3 335 $\pm$ 429	39.1 $\pm$ 1.5	36/24
病例组	84	3 215 $\pm$ 415	39.0 $\pm$ 1.2	51/33
$\chi^2$ 值		1.692	0.277	0.086
P值		0.093	0.783	0.932

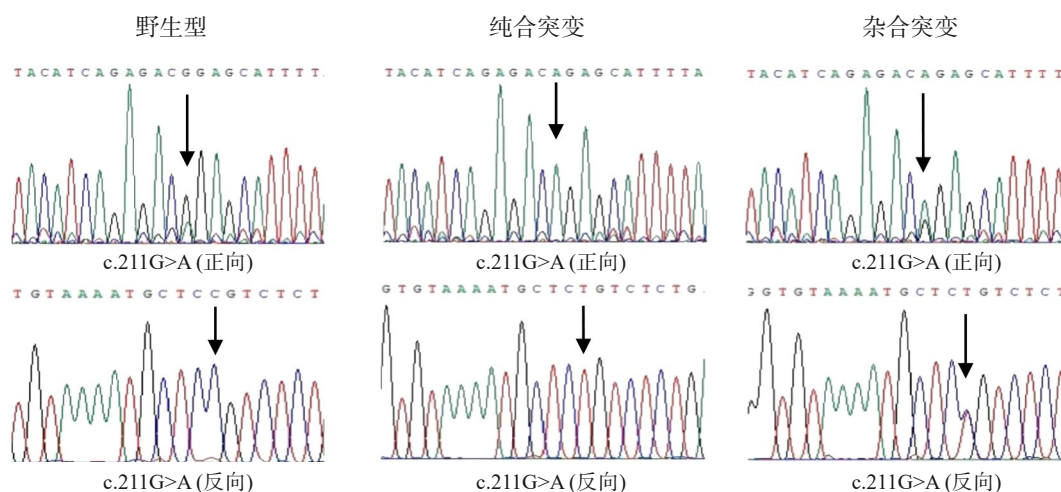


图2 UGT1A1 G71R (c.211G>A) 位点测序图 箭头所示为碱基突变位点。

## 2.4 两组UGT1A1基因突变类型分布及等位基因频率分析

病例组UGT1A1 G71R的AG基因型频率显著高

于健康对照组 ( $P=0.022$ ), 病例组UGT1A1 G71R的A等位基因频率显著高于健康对照组 ( $P=0.010$ ), 见表2。

表2 两组UGT1A1 G71R基因型及等位基因频率的比较 [例(%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		纯合突变 (AA)	杂合突变 (AG)	野生型 (GG)	A	G
健康对照组	60	0(0)	12(20)	48(80)	12(10)	108(90)
病例组	84	3(4)	30(36)	51(61)	36(21)	132(79)
$\chi^2$ 值			6.548		6.583	
P值			0.022		0.010	

## 2.5 UGT1A1基因多态性对柳州三江县新生儿高胆红素血症发生的风险评估

以是否发生高胆红素血症为因变量, 是否发生UGT1A1 G71R突变为自变量, 进行二元logistic回归分析, 结果显示G71R错义突变是新生儿发生高胆红素血症的危险因素, 提示带有G71R错义突变(AA/AG)的新生儿发生高胆红素血症的风险是

携带野生型(GG)健康新生儿的2.588倍(95%CI: 1.199~5.586)。

## 2.6 UGT1A1基因G71R位点的Hardy-Weinberg平衡检验

Hardy-Weinberg遗传平衡检验结果显示病例组和健康对照组的UGT1A1 G71R位点基因型均符合Hardy-Weinberg平衡 ( $P>0.05$ ), 说明人群代表性



好, 该基因位点基因型在研究人群中符合遗传平衡。

### 3 讨论

胆红素是一种脂溶性激素, 难溶于水, 必须经过肝脏生物转化处理增加其水溶性再由胆汁等排出体外, *UGT1A1* 是参与胆红素代谢过程的关键酶, 其基因5'端的第1外显子编码氨基末端, 决定酶底物的特异性, 3'端是4个共同外显子, 编码羧基末端, 是酶与胆红素-尿苷二磷酸葡萄糖醛酸结合的位点。整个基因如果有发生变异, 有可能会影响基因编码的酶活性, 从而影响胆红素代谢, 最终出现黄疸。截至目前, 全球已发现163个变异位点<sup>[7]</sup>。此外, 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点变异对于mRNA稳定性、氨基酸序列及酶的表达可能也存在影响。*UGT1A1* 基因变异可能还具有人种和地区性差异。在高加索人种中, 以罗马尼亚和俄罗斯为例, *UGT1A1* 变异以启动子TATA盒突变为, 分别有 (TA)<sub>5</sub>、(TA)<sub>7</sub>和 (TA)<sub>8</sub><sup>[8-9]</sup>, 而在黄种人中, 例如中国和日本, *UGT1A1* 变异则以G71R突变为<sup>[10-11]</sup>。除人种外还存在地区因素, 例如同样在亚洲大陆, 地处南亚的印度*UGT1A1* 变异主要表现为启动子TATA盒突变<sup>[12]</sup>, 而在东亚的韩国则主要表现为G71R突变<sup>[13]</sup>。

G71R突变为*UGT1A1*基因第1外显子上的211位碱基出现G>A突变, 使原编码的氨基酸由甘氨酸变为精氨酸, 导致*UGT1A1*葡萄糖醛酸化效率下降至野生型的47%<sup>[14]</sup>。本研究中病例组的G71R突变频率(39%)高于广西来宾地区(37.4%)<sup>[5]</sup>及那坡壮族地区(28.0%)<sup>[10]</sup>, 略低于云南丘北少数民族县(45%)<sup>[15]</sup>, 说明G71R是三江县侗族新生儿高频突变位点。病例组的A等位基因频率(21%)显著高于健康对照组(10%)。上述结果均提示本研究人群*UGT1A1*基因的G71R错义突变与侗族新生儿胆红素水平升高有关。另外Zhang等<sup>[16]</sup>的研究中侗族人群G71R突变频率则是18.9%, A等位基因频率为9.9%, 也进一步证实相同民族在不同地区基因突变频率不同, 这点可能是环境与遗传因素共同作用的结果。结合logistic回归分析可认为*UGT1A1* G71R突变型是广西侗族新生儿发生高未结合胆红素血症的危险因素, 携带突变体的侗族新生儿对高未结合胆红素血症有易感性。

Hardy-Weinberg遗传平衡检验的结果提示该位点各基因型在研究人群中符合遗传平衡, 可能与该地区侗族提倡族内通婚(非近亲婚配)有关, 加上三江县处于重山之中, 自古交通往来不便, 减少了与外来基因的交流, 提示侗族G71R突变体的遗传背景较为原始, 遗传信息上可能出现了遗传稳定性; 另外在某些环境下, 杂合子携带者或许比野生型携带者更适合当前的生存环境, 这也可能是三江县侗族新生儿中G71R杂合突变频率较高的原因。因此G71R错义突变成为当地侗族*UGT1A1*遗传的高频突变类型。

本次研究主要在*UGT1A1*启动子区域及第1外显子, 其余区域未涉及到, 至于侗族新生儿是否存在其他高频基因变异, 有待扩大样本进行下一步研究。本文研究的三江县纯系侗族新生儿*UGT1A1*基因变异情况对今后该地区制定*UGT1A1*高频突变位点遗传检测和新生儿高胆红素血症发生早诊断、早治疗有一定指导作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, et al. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man[J]. J Biol Chem, 1994, 269(27): 17960-17964. PMID: 8027054.
- [2] Chen S, Beaton D, Nguyen N, et al. Tissue-specific, inducible, and hormonal control of the human UDP-glucuronosyltransferase-1 (*UGT1*) locus[J]. J Biol Chem, 2005, 280(45): 37547-37557. PMID: 16155002. DOI: 10.1074/jbc.M506683200.
- [3] Chowdhury JR, Jansen PL, Fischberg EB, et al. Hepatic conversion of bilirubin monoglucuronide to diglucuronide in uridine diphosphate-glucuronyl transferase-deficient man and rat by bilirubin glucuronoside glucuronosyltransferase[J]. J Clin Invest, 1978, 62(1): 191-196. PMID: 96142. PMCID: PMC371753. DOI: 10.1172/JCI109105.
- [4] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 新生儿高胆红素血症诊断和治疗专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(10): 745-748. PMID: 25537539. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2014.10.006.
- [5] 钟勇, 蒋晓梅, 冯于玲, 等. *UGT1A1* 基因多态性与不同民族间新生儿高胆红素血症的关系[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(4): 324-327. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3606.2013.04.007.
- [6] Li Z, Zhang Z, He Z, et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>)[J]. Cell Res, 2009, 19(4): 519-523. PMID: 19290020. DOI: 10.1038/cr.2009.33.
- [7] 梁晨, 罗磊, 白洁, 等. Gilbert综合征和Crigler-Najjar综合征相

- 关尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶A1基因突变位点特征分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28(5): 428-433. PMID: 32536060. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20200217-00051.
- [8] Radoi VE, Ursu RI, Poenaru E, et al. Frequency of the *UGT1A1*\*28 polymorphism in a Romanian cohort of Gilbert syndrome individuals[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2017, 26(1): 25-28. PMID: 28338110. DOI: 10.15403/jgld.2014.1121.261.ugt.
- [9] Ivanov A, Semenova E. Gilbert's syndrome, bilirubin level and *UGT1A1*\*28 genotype in men of north-west region of Russia[J]. J Clin Exp Hepatol, 2021, 11(6): 691-699. PMID: 34866848. PMID: PMC8617539. DOI: 10.1016/j.jceh.2021.01.006.
- [10] Wu XJ, Zhong DN, Xie XZ, et al. *UGT1A1* gene mutations and neonatal hyperbilirubinemia in Guangxi Heiyi Zhuang and Han populations[J]. Pediatr Res, 2015, 78(5): 585-588. PMID: 26200705. DOI: 10.1038/pr.2015.134.
- [11] Sato H, Uchida T, Toyota K, et al. Association of breast-fed neonatal hyperbilirubinemia with *UGT1A1* polymorphisms: 211G>A (G71R) mutation becomes a risk factor under inadequate feeding[J]. J Hum Genet, 2013, 58(1): 7-10. PMID: 23014115. DOI: 10.1038/jhg.2012.116.
- [12] Farheen S, Sengupta S, Santra A, et al. Gilbert's syndrome: high frequency of the (TA)<sub>n</sub> TAA allele in India and its interaction with a novel CAT insertion in promoter of the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 gene[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(14): 2269-2275. PMID: 16610035. PMID: PMC4087660. DOI: 10.3748/wjg.v12.i14.2269.
- [13] Ko JS, Chang JY, Moon JS, et al. Molecular analysis of the *UGT1A1* gene in Korean patients with Crigler-Najjar syndrome type II[J]. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr, 2014, 17(1): 37-40. PMID: 24749086. PMID: PMC3990781. DOI: 10.5223/pghn.2014.17.1.37.
- [14] Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, et al. Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), an active metabolite of irinotecan (CPT-11), by human *UGT1A1* variants, G71R, P229Q, and Y486D[J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(1): 108-113. PMID: 12485959. DOI: 10.1124/dmd.31.1.108.
- [15] 姚建敏, 王华恩, 常建兵, 等. 云南省丘北县多个民族新生儿高胆红素血症患儿 *UGT1A1* 基因多态性分析[J]. 中国小儿急救医学, 2020, 27(7): 540-544. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4912.2020.07.014.
- [16] Zhang A, Xing Q, Qin S, et al. Intra-ethnic differences in genetic variants of the UGT-glucuronosyltransferase 1A1 gene in Chinese populations[J]. Pharmacogenomics J, 2007, 7(5): 333-338. PMID: 17060921. DOI: 10.1038/sj.tpj.6500424.

(本文编辑: 万静)