论著

文章编号:1000-5404(2014)23-2408-05

8个Gilbert综合征家系UGT1A1变异谱调查及分析

李露锋,邓国宏,谭文婷,郭鑫武,但芸婕,李艳华,唐 怡,毛 青 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所)

[摘要] **目的** 研究中国人群Gilbert综合征与UGT1A1基因变异的关系。**方法** 选取8个Gilbert综合征家系成员外周静脉血提取基因组DNA,采用聚合酶链反应(PCR)扩增UGT1A1基因上游的启动子TATA盒及第1~5外显子序列,PCR产物测序后行遗传变异分析;并对先症者进行1年以上的随访观察。**结果** 在6个完整的核心家系中,先症者双亲的发病率仅为25%(<50%)。4例先症者各有1名兄妹,其中1例先症者的同卵双胎也发病,而其余3例先症者只有1例的弟弟发病。1个家系第2代4名女性中只有1人发病。共检测到3个错义突变位点(c.211G>A,p.G71R,rs4148323;c.686C>A,p.P229Q,rs35350960;c.1091C>T,p.P364L,rs34946978)和1个位于启动子区TATA盒的2个额外碱基TA插入变异(c.-40_-39insTA,rs3064744)。所有15例患者中(包括8例先症者和7个家系成员),12例携带UGT1A1的纯合变异或2个无连锁(1个来自父亲,1个来自母亲)的杂合变异(12/15),3例患者仅携带单个UGT1A1基因的杂合变异;而携带单个杂合变异的14个家系成员中仅有1人表现为Gilbert综合征,其余13人胆红素水平均正常。**结论** Gilbert综合征与UGT1A1的变异相关,并呈现出叠加效应,携带纯合变异或2个不连锁杂合(c.-40_-39insTA/c.211G>A;c.211G>A/c.1091C>T)变异者容易表现为Gilber综合征,而大多数携带单个杂合变异者则表现为正常。

[关键词] Gilbert综合征;家系分析;UGT1A1;变异
[中图法分类号] R575.5;Q39;Q31 [文献标志码] A

Investigation and analyses of UGT1A1 variant spectrum for 8 Gilbert syndrome families

Li Lufeng, Deng Guohong, Tan Wenting, Guo Xinwu, Dan Yunjie, Li Yanhua, Tang Yi, Mao Qing (Institute of Infection Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the correlation of Gilbert syndrome (GS) and UGT1A1 variations. Methods The genome DNA was extracted from the peripheral blood samples of 8 probands (subjected in our outpatient department from August 2011 to March 2014) and their family members. The promoter and coding regions of UGT1A1 were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The amplified DNA fragments was sequenced and then family pedigree analysis was analyzed. Bilirubin levels of all probands were followed up for at least 1 year. Results The incidence of GS was only 25% (less than 50%) among the probands' parents in the 6 complete nuclear families. The twin brother of a proband was also a GS patient. Only one brother of the proband was affected in other 3 families in which the probands had a brother or sister. Only a sister was detected with unconjugated hyperbilirubinemia in 4 sisters of the second generations. Three missense variants in coding regions (c.211G>A, p.G71R in exon 1; c.686C>A, p.P229Q in exon 1; c.1091C>T, P364L in exon 4) and 2 extra bases insertion variant in promoter (c.-40_-39insTA) were identified. Twelve of 15 affected subjects carried homozygous or compound heterozygous variations which contained at least 2 unlinked variants (0.80) and the other 3 carried single UGT1A1 heterozygous variations, while 13 of 14 family members carrying single heterozygous variations kept normal bilirubin levels. Conclusion GS is strongly associated with UGT1A1 variations in an additive effect. Those carrying homozygous or compound unlinked heterozygous UGT1A1 variations (c.-40_-39insTA/c.211G>A; c.211G>A/c.1091C>T) are more common suffering from GS, while those carrying single heterozygous variations are healthy.

[**Key words**] Gilbert syndrome; family pedigree analyses; UGT1A1; variation

Corresponding author: Mao Qing, Tel: 86-23-68754141, E-mail: qingmao@tmmu.edu.cn

[通信作者] 毛 青,电话:(023)68754141,E-mail:qingmao@tmmu.edu.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1106.002.html (2014-11-06)

Gilbert综合征(Gilbert syndrome,GS)于1901年首先被Gilbert等描述,临床表现为以轻中度非结合型胆红素(unconjugated bilirubin,UCB)增高为主的胆红素血症,无肝脏炎症、溶血等表现。其发生机制为UDP-葡萄糖醛酸基转移酶(UDP- glucuronyl transferase,UGTs)缺陷,GS患者该酶的活性仅为正常对照组的25%,该酶由UDP-葡萄糖醛酸基转移酶基因1A1(UGT1A1)编码。基于散发病例的关联研究则表明亚洲人GS患者存在UGT1A1启动子区TATA盒2个碱基TA的插入变异(c. -30_ -40insTA)及外显子区的错义突变(c.211G>A,p.G71R;c.1091C>T,P364L)等变异类型[1-2]。但中国GS患者中,这些变异位点的交互作用及效应尚缺乏系统的家系研究。为进一步明确GS的遗传机制,本研究对8例GS先症者及其家系成员的UGT1A1基因进行突变分析,并对先症者进行为期1年以上的临床随访观察。通过完整的家系研究及UGT1A1基因的突变分析表明:Gilbert综合征主要与UGT1A1的变异相关,并呈现出叠加效应,携带纯合变异或2个不连锁杂合变异者容易表现为Gilbert综合征,而大多数携带单个杂合变异者则表现为正常。

1 资料与方法

1.1 研究对象

8例GS先症者,均为2011年8月至2014年3月期间在西南医院感染科门诊部就诊的患者,男女比例为7∶1,年龄(28.04±10.69)岁,均以无症状的黄疸为就诊原因,黄疸发生年龄不详,无不适,除巩膜、皮肤黄染外无阳性体征。在进行调查研究前,本研究已经第三军医大学伦理委员会审批,并详细告知患者及其家系成员研究目的和方法,征得全部先证者及其相关家系成员的同意,并签署知情同意书,未成年患者获得其监护人的书面同意。

1.1.1 诊断标准及排除标准 诊断标准:(1)总胆红素超过1.5 mg/dL(25.65 μmol/L),且以UCB为主;(2)丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)正常,以排除肝脏炎症;(3)红细胞计数(red blood cell,RBC)、血红蛋白(hemoglobin,Hgb)及网织红细胞计数(reticulocyte count,RT)正常,以排除潜在的溶血可能。

排除标准:(1)合并其他疾病;(2)有饮酒史,且超过5年,酒精量男性≥40 g/d,女性≥20 g/d,或2周内有大量饮酒史,折合酒精量>80 g/d;(3)首次检查发现胆红素升高前90 d之内任何的用药史;(4)腹部超声提示肝大、脾大或胆道系统疾病等异常者。

1.1.2 随访流程及家系调查 先症者在我院进行1年以上随访,3~6个月进行1次肝功检测。先症者的家庭成员视具体情况可在我院进行至少1次肝功检测并进行UGT1A1基因分析。

1.2 UGT1A1分子遗传学分析

1.2.1 引物设计及合成 扩增引物用software Primer3.0(Whitehead Institute,Cambridge, MA)设计。UGT1A1基因的序列号为:GenBank accession number NT_005120.16。UGT1A1基因包含一个启动子TATA盒及5个外显子[3]。引物序列及其对应的靶序列见表1。

表1 引物序列及其对应的靶序列片段长度

序号	序列(5′→3′)	靶序列	扩增片段长度(bp)
1	TCCCTGCTACCTTTGTGGACT TGCCAAAGACAGACTCAAACC	TATA盒 外显子1	1 165
2	CAAACACGCATGCCTTTAATC CAGGGAAAAGCCAAATCTAAGG	外显子2	365
3	AAGTTGCCAGTCCTCAGAAGC GTTACTCACATGCCCTTGCAG	外显子3	436
4	CTGCAAGGGCATGTGAGTAAC GAGGCAGAACTGCTTGAACG	外显子4	595
5	CAGCCATGAGCATAAAGAGAGG TTCTGGGCGATGTGATTACTG	外显子5	1 298

1.2.2 基因组DNA制备及PCR扩增 采用Wizard® Genomic DNA Purification kit(Promega,USA)从5 mL新鲜全血中抽提DNA。按鼎国DNA *Taq* 聚合酶(Beijing Dingguo Changsheng Biotech CO. LTD, China)说明书配制成50 μL PCR反应体系,扩增条件如下:95 ℃ 2 min后,以94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 40 s进行35个循环。

1.2.3 PCR产物纯化和测序 PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定后送北京华大基因纯化特异性片段并使用原PCR扩增引物测序。

1.3 UGT1A1基因分型及统计分析

所有测序结果采用BLAST程序及PolyPhred program软件(Stephens *et al*. 2006, available at http://www.genome.washington.edu)进行比对分析。SNP的分型由两个独立的实验人员分别读取。统计分析用SPSS PASW Statistics(version 18.0)进行。

2 结果

2.1 先症者一般临床特征及随访结果

8例先症者中,男性患者(7例)多于女性患者(1例),年龄从14~44岁不等。其发生年龄不详,均无任何不适及除巩膜、皮肤黄染外的任何阳性体征。在随访过程中,只有2例患者的胆红素水平可自行下降至正常并反复(占25%),其余6例患者表现为顽固且持续的高胆红素血症,且均以间接胆红素升高为主。该8例先症者的总胆红素水平的最高值为(49.32±10.40) μmol/L。此外,2例胆红素水平能恢复到正常的患者的总胆红素水平的最高值并不比表现为持续性胆红素血症患者低(52.93 μmol/L和43.75 μmol/L)。见表2。

表2 Gilbert综合征先症者一般临床特征及随访结果

编号	性别	年龄(岁)	随访时间(年)	随访周期(周)	随访次数	总胆红素/直接胆红素(μmol/L)		
						最高值	最低值	是否自行恢复正常
G1	女	23	1	27	2	33.7/7	30/6.5	否
G2	男	20	1	27	2	36.3/8.6	27.8/6.5	否
G3	男	44	1	27	2	39.9/8.8	38/11.2	否
G4	男	24	1	18	3	43.5/11.5	19.5/5.5	是
G5	男	17	1	27	2	48/12.9	30/7.6	否
G6	男	17	1	18	3	51.3/6	36.1/11.3	否
G7	男	14	4	27	8	59.8/11.7	12.1/7.3	是
G8	男	35	1	18	3	64.3/17.1	29/8.1	否

2.2 家系成员的胆红素水平调查结果

8个家系中除家系G1及G4的先症者无父亲的确切资料外,其余6个为完整的核心家系,共33人参加了家系调查。先症者随访过程中的胆红素水平的最高值及家系成员的胆红素水平的具体值详见图1。按所调查的胆红素水平,结果如下:在6个完整的核心家系中,先症者双亲的发病率为25%;家系G1、G2、G4、G8的先症者(均携带纯合变异或至少2个不连锁的杂合变异)各有1名兄妹,其中家系G2的同卵双胎也发病;而其余3例只有家系G4的弟弟(为G71R纯合)发病,2例携带单个杂合变异的同胞均未发病;在家系G1的第2代4名女性中只有1人发病。

2.3 UGT1A1基因分型结果

针对UGT1A1基因启动子TATA盒及5个外显子测序后共检测到4个SNP(表3)。其中,在8例先症者中,有6例先症者(先症者G1、G2、G3、G5、G6、G8)携带纯合变异或至少2个杂合变异(75%),而只有2例先症者(先症者G3和G7)携带单个的杂合变异(25%);所有15例患者中(包括8例先症者和7个家系成员),12例携带UGT1A1的纯合变异或两个无连锁(1个来自父亲,1个来自母亲)的杂合变异(12/15),3例患者仅携带单个UGT1A1基因的杂合变异;而携带单个杂合变异的14个家系成员中仅有1例表现为Gilbert综合征,其余13例胆红素水平均正常(图1)。

表3 UGT1A1基因分型结果及其在15例Gilbert综合征患者中的等位基因频率分析

位置	等位基因名称	核酸的改变	蛋白质的改变	等位基因频率(纯合子/杂合子)	dbSNP
TATA盒	UGT1A1*28	c.-40_-39insTA	-	0.200(0/6)	rs3064744
外显子1	UGT1A1*6	c.211G>A	p.G71R	0.667(7/6)	rs4148323
外显子1	UGT1A1*27	c.686C>A	p.P229Q	0.033(0/1)	rs35350960
外显子4	UGT1A1*63	c.1091C>T	p.P364L	0.033(0/1)	rs34946978

2.4 系谱图绘制和家系分析

遗传作图显示,TA插入变异和G71R变异来自不同的亲源染色体;先症者G8所携带的G71R变异和P364L变异亦来自不同的亲源染色体;而家系G4中,P229Q变异及TA插入变异存在连锁,该2个变异均来自先症者的父亲。

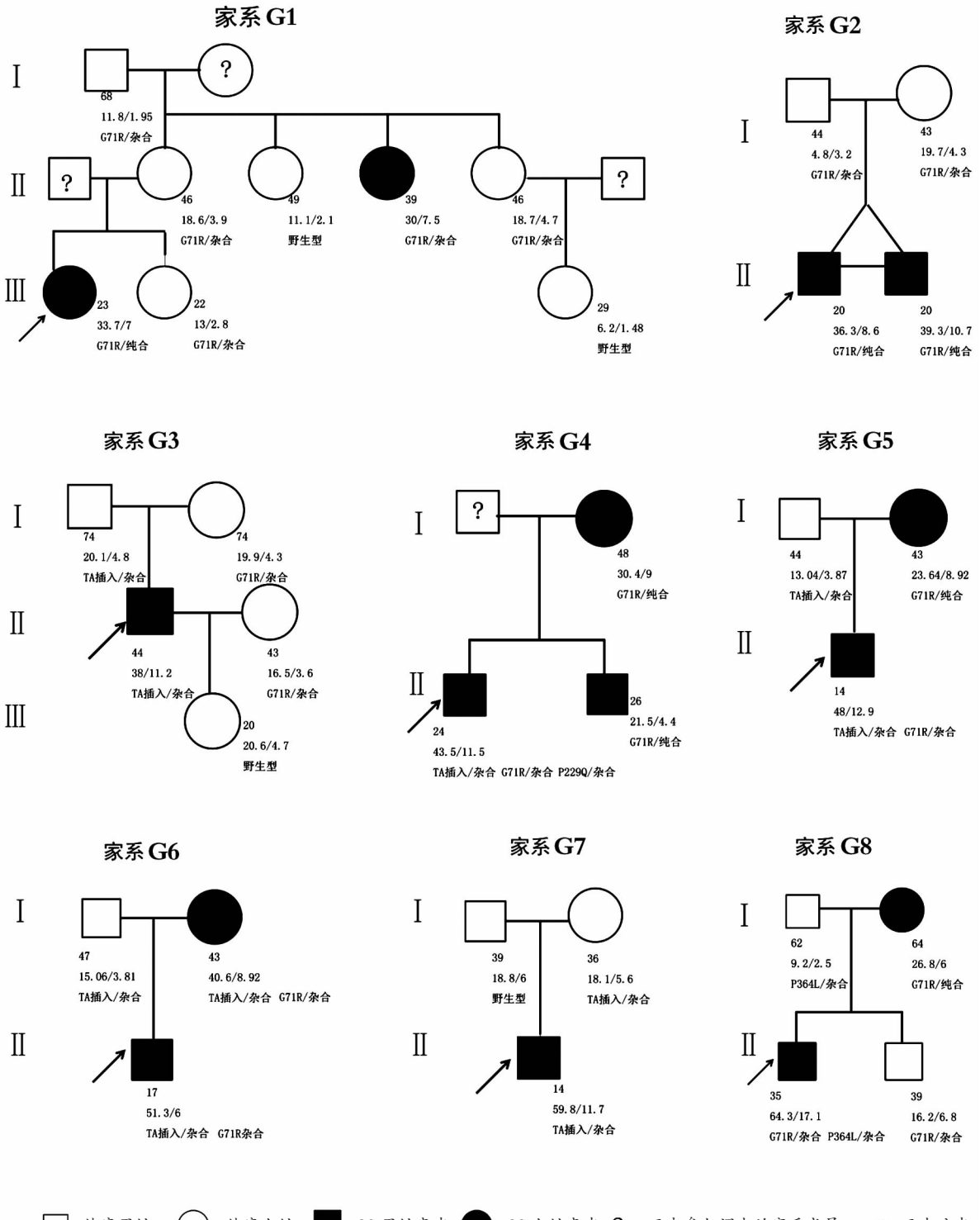
家系G2、G4、G5、G6及8家系的先症者均携带了上述纯合变异或2个不连锁的杂合变异。家系G2中,先症者的双胞胎弟弟同样表现为GS,携带G71R纯合变异;其余家系中,表现为胆红素血症的5个家系成员亦携带上述纯合变异或2个不连锁的杂合变异;而其余胆红素水平正常的家系成员均只携带单个杂合变异。

家系G1的1名表现为GS的亲属及家系G3和G7的先症者只携带了UGT1A1的杂合变异。家系G1的先症者携带G71R纯合变异,但其姨妈携带单个G71R杂合变异,仍表现为胆红素血症;而家系G3和G7的先症者均只携带单个TA插入杂合变异,而他们的胆红素水平均值并不比其他携带纯合变异或2个不连锁杂合变异者低(46.32±13.02)μmol/L和(41.96±12.30)μmol/L。

3 讨论

与GS关联的UGT1A1变异谱存在明显的种群差异。在亚洲人群的研究中,近年虽然对以UGT1A1为候选基因的散发病例进行了关联研究,但缺乏系统的家系研究,又未行连锁分析。本研究通过完整的家系调查表明,在亚洲人群中最常见的c.-40_-39insTA变异和c.211G>A变异存在于不同的同源染色体上。80%的病例(包括先症者及其家系成员7例,总共15例患者中)携带UGT1A1的纯合变异或无连锁的两个杂合变异,3例患者仅携带单个UGT1A1基因的杂合变异;而携带单个杂合变异的14个家系成员中仅有1人表现为GS,其余13例胆红素水平均正常。这样的研究结果表明GS与UGT1A1的变异相关,并呈现出叠加效应,携带纯合变异或2个不连锁杂合变异者容易表现为GS,而大多数携带单个杂合变异者则表现为正常。

在本研究中,家系G1的1名表现为GS的家系成员、先症者G3及G7仅只携带了单个的杂合变异,但其亲代、子代及兄弟姐妹均未发病,而酒精、低卡饮食、药物等明确影响胆红素水平的干扰因素均已被排除,且获得性因素大多是短暂的和可察的,而GS不是一过性的和短暂的,且从我们的随访过程中可知,大多数患者(75%)其胆红素水平表现为持续性的升高,只有少部分患者可自行下降至正常水平,表现为胆红素水平



□:健康男性; ○:健康女性; ■:GS 男性患者; ●:GS 女性患者; ? :示未参与调查的家系成员; ↗:示先症者

注:①每一图标下 3 栏数据分别表示该成员的年龄(岁)、总胆红素/结合型胆红素(μmol/L)、*UGT1A1* 基因型;②对家庭成员的诊断为总胆红素高于我院试剂所给的参考值上限 21 μmol/L,其余标准同先症者

图 1 Gilbert 综合征患者家系图及 UGT1A1 变异谱

的反复波动。因此考虑存在其他影响亚铁血红素代谢而导致胆红素累积、肝细胞摄取胆红素障碍等位于胆红素代谢的其他环节的基因的变异。近年来,UGT1A1 的单个杂合变异联合其他影响上述代谢环节基因的杂合变异可导致胆红素水平升高的案例时有报道[4-6]。也正是这种多基因变异的影响使部分 GS 患者单从某个基因的角度看呈现出“显性遗传”或“显性遗传不完全外显”的特点。特别是在多基因的变异位点连锁的

情况下,GS的发病概率会高于隐性遗传的预期发病率;但因GS的致病原因大部分为UGT1A1这样的单基因变异导致,从而使其发病概率始终低于显性遗传的预期发病率。尽管早期以GS的生化改变、亲子代的胆红素水平和发病率等方面进行的家系研究认为GS的遗传模式有显性、显性遗传不完全外显、隐性等争论,但其调查结果均表明,其亲代的(先症者父母)发病率均小于显性遗传模式的亲代最低发病率50%,而先症者及其兄弟姐妹的发病率也均小于显性遗传的最低预计发病率50%[7]。另外,在这3例患者中,1例携带的是G71R杂合变异,2例携带的是TA插入杂合变异,G71R和TA插入变异对GS这一表型的影响是否存在强弱的差别,值得进一步研究。

与GS关联的UGT1A1的变异类型存在明显的种群差异,Bosma[8]对10例GS白人患者进行了UGT1A1测序后发现,这些患者都携带了纯合的c.-40_-39insTA变异,且该变异可使该基因的转录活性下降到正常对照组的30%。但在亚洲人的研究中,GS患者除了纯合的c.-40_-39insTA变异外,尚存在复合的杂合变异甚至单个的杂合变异[1-2],但这些研究都是基于散发病例的研究,又未行连锁分析,其性状传递比率和复合变异位点之间的连锁关系未知,而本研究通过完整的家系分析和基因突变分析得出了亚洲人群中大多数GS携带纯合变异或来自不同亲本的2个变异,在UGT1A1作为控制胆红素水平这一性状上与白种人的研究相互印证。

总的来说,GS发病主要与UGT1A1的变异相关,而少部分患者可能存在其他的基因缺陷。本研究因未能收到3代均有患者的大家系病例,所以未能进行全基因组扫描及纯合子作图分析等,对于除UGT1A1基因以外的基因缺陷未能进一步明确,有待进一步研究。

GS虽然是一个预后良好的疾病,并不需要治疗。但GS是最常见的遗传性非结合型胆红素血症,据国外报道,其发病率为3%~10%。胆红素作为一个抗氧化剂,其适度升高有可能降低冠心病等动脉粥样硬化性疾病的发生[9],GS的高发病率有可能是自然选择的结果。但值得注意的是GS患者携带的UGT1A1基因的变异,可影响多种药物的代谢,特别是对于那些安全剂量较窄的药物,则容易引起中毒[10]。而对于患者而言,这种不明原因的黄疸也给他们带来焦虑。且GS如合并其他内科疾病,尤其是乙型肝炎等慢性疾病,其诊断则更加困难。从GS作为一个特殊的代谢群及明确诊断的需要来讲,对GS的分子遗传的进一步研究均具有重大的现实意义,本研究初步描绘了中国人群GS的UGT1A1基因变异情况,有待后续更大样本量病例对照研究及变异位点的功能验证。明确不同变异功能的效应,有助于对GS患者的分子诊断。

参考文献:

[1] Hsieh S Y, Wu Y H, Lin D Y, *et al*. Correlation of mutational analysis to clinical features in Taiwanese patients with Gilbert's syndrome [J]. Am J Gastroenterol, 2001, 96(4): 1188-1193.

[2] Takeuchi K, Kobayashi Y, Tamaki S, *et al*. Genetic polymorphisms of bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene in Japanese patients with Crigler-Najjar syndrome or Gilbert's syndrome as well as in healthy Japanese subjects[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2004, 19(9): 1023-1028.

[3] Ritter J K, Chen F, Sheen Y Y, *et al*. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini[J]. J Biol Chem, 1992, 267(5): 3257-3261.

[4] Dabke P S, Colah R B, Ghosh K K, *et al*. Role of co-inherited Gilbert syndrome on hyperbilirubinemia in Indian beta thalassemia patients [J]. Hematology, 2014, 19(7): 388-392.

[5] Rawa K, Adamowicz-Salach A, Matysiak M, *et al*. Coexistence of Gilbert syndrome with hereditary haemolytic anaemias[J]. J Clin Pathol, 2012, 65(7): 663-665.

[6] Zahedpasha Y, Ahmadpour M, Niaki H A, *et al*. Relation between Neonatal Icter and Gilbert Syndrome in Gloucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Subjects[J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(3): 63-65.

[7] Owens I S, Ritter J K. The novel bilirubin/phenol UDP-glucuronosyltransferase UGT1 gene locus: implications for multiple nonhemolytic familial hyperbilirubinemia phenotypes[J]. Pharmacogenetics, 1992, 2(3): 93-108.

[8] Bosma P J, Chowdhury J R, Bakker C, *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.

[9] Hunt S C, Kronenberg F, Eckfeldt J H, *et al*. Association of plasma bilirubin with coronary heart disease and segregation of bilirubin as a major gene trait: the NHLBI family heart study[J]. Atherosclerosis, 2001, 154(3): 747-754.

[10] Bock K W. Homeostatic control of xeno- and endobiotics in the drug-metabolizing enzyme system[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 90(1): 1-6.

(**收稿**:2014-09-01;**修回**:2014-09-17)

(编辑 王 红)