

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏致新生儿 黄疸溶血机理探讨

I. 抗氧化红细胞酶活性分析*

王 菁 杜传书

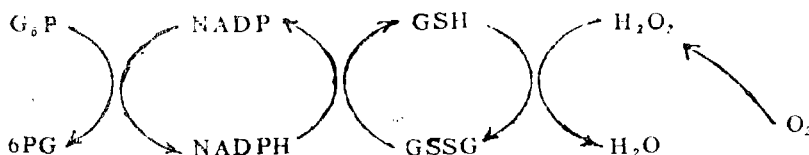
(医学遗传学研究室)

提 要 对红细胞谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px), 谷胱甘肽还原酶(GR)、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽(GSH)含量进行了测定, 结果显示: ①新生儿GSH-Px活性显著低于成人, 这可能与新生儿抗氧化能力低下有一定关系; ②G6PD缺乏的成人GR活性显著高于正常成人, 提示GR活性增高在一定程度上能代偿G6PD活性和GSH含量下降造成的影响; ③G6PD缺乏的成人及新生儿GSH含量均显著低于相应正常对照, 但GSH含量降低可能不是导致新生儿溶血的重要环节。

关键词 G6PD缺乏 红细胞 谷胱甘肽过氧化酶 谷胱甘肽还原酶 超氧化物歧化酶 谷胱甘肽

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PD, E. C. 1.1.1.49)缺乏症是最常见的遗传性红细胞酶缺陷。在G6PD缺乏新生儿中有相当一部分在出生后数天(一般为2~7天)会出现新生儿黄疸, 甚至发展为核黄疸。吴梓樑等调查我国广东省新生儿G6PD缺乏症的发生率为8.7%, 其中发生严重新生儿黄疸者占21.7%^[1]。在G6PD缺乏高发区, G6PD缺乏是新生儿高胆红素血症的重要原因。Doxiadis等报道, 希腊的G6PD正常新生儿高胆红素血症发生率为67.1%, 而G6PD缺乏新生儿高胆红素血症发生率达94.5%。但迄今新生儿黄疸发生确切机制却一直没有弄清。

许多研究都证实新生儿红细胞的许多方面都与成人有所不同, 如胎儿血红蛋白易于氧化变性, 新生儿红细胞膜上巯基基团及不饱和脂肪酸含量较成人少, 红细胞易受氧化性损伤。上述因素均可能与新生儿易发生溶血有一定关系。鉴于红细胞G6PD缺乏会导致NADPH和GSH含量减少, 细胞抗氧化能力下降(见下图)。故本文试图通过测定及比较新生儿与成人间谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)、谷胱甘肽还原酶(GR)、超氧化物歧化酶(SOD)及红细胞GSH含量, 以探讨新生儿红细胞在抗氧化代谢, 尤其是磷酸戊糖旁路代谢方面是否存在有不同于成人的特点。



附图 红细胞抗氧化代谢示意图

材料与方 法

研究对象

测定健康新生儿脐血56例、健康成人外周

静脉血231例, 均用高铁血红蛋白(MHb)还原试验排除G6PD缺乏症(MHb还原率>75%, G6PD缺乏者MHb还原率<75%), 并经本室剔除地中海贫血, 测定血红蛋白含量排除其他原因引起的贫血。

测定46例G6PD缺乏新生儿脐血, 118例

* 本研究课题由国家“七五”攻关课题基金资助

G6PD 缺乏成人外周静脉血。以上病例均用 G6PD 直接法确诊(G6PD 活性 < 7.0 EU/gHb)^[2]

方 法

红细胞 GSH-Px、GR、SOD 测定是采用 Beutler 推荐的方法^[4], GSH 含量测定采用杜传书等改良的 DTNB 显色法^[5]。

结 果

GSH-Px、GR、SOD 及 GSH 正常值 GR 及 SOD 目前国内均未见有正常值报道。本文建立和测定了这 3 种酶的中国人正常值, 并与

ICSH^[6] 及 Beutler^[4] 的参考值进行比较。同时也测定了本组 GSH 的正常对照值(表 1)。

将正常新生儿各测定值与成人比较, 结果显示新生儿 GSH-Px 活性显著低于成人 ($t = 5.108, P < 0.01$), GR 活性显著高于成人 ($t = 6.140, P < 0.01$), SOD 活性及 GSH 含量在成人和新生儿之间则无显著差异。

G6PD 缺乏者 GSH-Px、GR、SOD 及 GSH 值 本实验还对用直接法确定为 G6PD 缺乏的成人和新生儿红细胞 GSH-Px、GR、SOD 及 GSH 进行了测定(表 2)。

表 1 正常中国人红细胞 GSH-Px、GR、SOD 酶及 GSH 含量 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	GSH-Px*	GR*	SOD*	GSH**
成 人 (例数)	36.70 ± 8.57 (44)	5.56 ± 1.40 (45)	1491.46 ± 269.62 (44)	2.32 ± 0.52 (49)
新 生 儿 (例数)	27.04 ± 4.61 (14)	8.46 ± 1.89 (14)	1823.66 ± 353.43 (9)	2.53 ± 0.39 (11)
ICSH	31.35 ± 2.97 (10)	10.4 ± 1.50 (10)	—	—
Beutler	34.2 ± 4.77	10.4 ± 1.50	2254.8 ± 303.0	—

* EU/gHb,

** mg/gHb EU (enzyme unit, 酶活性单位)

表 2 G6PD 缺乏者红细胞 GSH-Px、GR、SOD 及 GSH 含量 ($\bar{X} \pm SD$)

组 别	GSH-Px*	GR*	SOD*	GSH**
成 人 (例数)	34.86 ± 11.21 (20)	6.62 ± 1.43 (27)	1671.28 ± 285.41 (20)	1.69 ± 0.51 (30)
新 生 儿 (例数)	25.61 ± 8.68 (11)	7.88 ± 1.73 (11)	1694.32 ± 22.07 (9)	2.10 ± 0.32 (11)

单位: * EU/gHb ** mg/gHb

对表 2 进行统计分析同样发现, G6PD 缺乏新生儿 GSH-Px 活性显著低于 G6PD 缺乏成人 ($t = 2.632, P < 0.01$), 而 GR 活性则显著高于成人 ($t = 2.316, P < 0.05$), SOD 活性和 GSH 含量在 G6PD 缺乏的新生儿与成人间均无显著差异。

G6PD 缺乏组与正常对照组红细胞 GSH-Px、GR、SOD 酶及 GSH 含量比较

表 3 显示 G6PD 缺乏成人 GR 活性显著高于

G6PD 正常成人, G6PD 缺乏成人及新生儿的 GSH 含量则显著低于正常对照组, 其余各测定指标在 G6PD 缺乏组和正常组间均无显著差异。

讨 论

1. 谷胱甘肽过氧化物酶 G6PD 的功能是保护细胞免受 H₂O₂ 等引起的氧化性损伤, 而 GSH-Px 是对 H₂O₂ 解毒的主要酶类, 这两个酶在机体抗氧化方面存在密切关系。本实验显示 G6PD

表3 G6PD 缺乏组与正常对照组红细胞 GSH-Px、GR、SOD 酶及 GSH 含量比较

名称	组别	正常组		G6PD 缺乏组		t	P
		例数	$\bar{X} \pm SD$	例数	$\bar{X} \pm SD$		
GSH-Px*	成人	44	36.70 ± 8.75	20	34.86 ± 11.21	0.891	>0.05
	新生儿	14	27.04 ± 4.61	11	25.61 ± 8.68	0.591	>0.05
GR*	成人	45	5.60 ± 1.40	27	6.62 ± 1.43	2.973	<0.01
	新生儿	14	8.46 ± 1.89	11	7.88 ± 1.73	0.790	>0.05
SOD*	成人	44	1491.46 ± 269.62	20	1671.28 ± 205.41	1.306	>0.05
	新生儿	9	1823.66 ± 353.48	9	1694.42 ± 422.07	0.701	>0.05
GSH**	成人	49	2.32 ± 0.52	30	1.69 ± 0.51	3.015	<0.01
	新生儿	11	2.53 ± 0.39	11	2.10 ± 0.32	2.790	<0.05

单位: * EU/gHb ** mg/gHb

缺乏红细胞(成人及新生儿)GSH-Px活性与相应正常对照比较无显著差异。Anderson等(1987)对三种G6PD变异型(Mediterranean、Ferrari I、电泳慢速类)的GSH-Px活性进行测定,结果发现各变异型该酶活性均正常^[7]。这提示在正常状况下G6PD缺乏红细胞所承受的氧化压力并不过度。本实验还证实新生儿红细胞GSH-Px活性显著低于成人。Gross等也有过类似的报道,并发现不论早产儿或足月产儿GSH-Px活性均同样降低。新生儿该酶活性的降低使新生儿红细胞更易受氧化性毒物的损害。Nitowski等发现,H₂O₂对新生儿红细胞的毒性作用比成人,产生的MHB和Heinz小体也较成人多^[8]。体外实验还证实低浓度H₂O₂长时间作用于红细胞除导致Hb氧化外,还会使细胞渗透脆性增加,红细胞在等渗介质中也会发生溶血^[9],因此新生儿GSH-Px活性低下对于其易发生新生儿溶血性黄疸可能起一定作用。

2. 谷胱甘肽还原酶 GR在磷酸戊糖通路中的作用是将GSSG还原为GSH,以保证细胞有足够的抗氧化能力。本结果显示G6PD缺乏成人GR显著高于正常成人。已知GR在体内的存在形式有两种,即有黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)结合的活性形式和未与FAD结合的非激活形式。Platz等发现,G6PD缺乏者GR的FAD饱和率明显增高,可达95%。而正常人仅

为69.4%^[10]。并且G6PD缺乏的红细胞中黄素(flavine)含量及其他黄素成分(包括FAD)均明显增高,由此推测G6PD缺乏红细胞在黄素含量增高的基础上通过最大限度地结合FAD来提高GR活性,以保证其功能的完整性。G6PD缺乏者由于酶代谢缺陷对磷酸戊糖通路活性需求增加,GR活性增高在一定程度上可补偿红细胞G6PD活性及GSH含量下降所造成的影响。本实验还证实新生儿脐血GR活性显著高于成人,而G6PD缺乏新生儿GR与正常新生儿无显著差异。据Yawata等的报道,脐血红细胞的黄素水平高于成人红细胞,但脐血GR仅部分被FAD饱和,提示新生儿红细胞可能有一个不同于成人的GR活性调节机制。新生儿GR并未受磷酸戊糖通路中G6PD是否缺乏的影响,G6PD缺乏造成的抗氧化能力下降需经相当长一段时间后才能通过增加GR活性得到部分代偿。

3. 超氧化物歧化酶 SOD是广泛存在于人体各组织的抗氧化酶,对清除由内外因素作用产生的自由基起着重要的作用,并且该酶与氧化性溶血也有一定关系。鉴于G6PD缺乏与机体抗氧化能力缺陷有关,本实验对SOD进行了分析,结果显示G6PD缺乏红细胞该酶活性与正常对照无显著差异。Gerli、Anderson^[7]等也报道过同样的结果。新生儿脐血SOD活性与成人无显著差异,提示尽管该酶在抗膜脂质

过氧化方面起重要作用,但对G6PD缺乏导致的溶血似乎并无明显的保护作用。

4. 还原型谷胱甘肽(GSH) G6PD缺乏使GR之辅酶NADPH生成不足,GSH的产生也随之减少,且稳定性下降。本组实验亦证实G6PD缺乏新生儿及成人GSH含量均显著低于相应正常对照。但新生儿G6PD缺乏组GSH下降幅度并不比成人G6PD缺乏组大,表明GSH下降可能不是G6PD缺乏新生儿易产生溶血的重要发病环节。

综上所述可以看出,红细胞GSH-Px、GR、SOD酶活性在G6PD缺乏新生儿与正常新生儿间均无显著差异。提示刚出生的新生儿在磷酸戊糖通路以及抗氧化酶方面并未因G6PD的缺乏而导致任何差异。在母体内由于胎儿血循环的特殊性,各胎儿面临的氧化压力基本相同。出生后由于受环境因素的作用,G6PD缺乏对红细胞代谢的影响才逐渐显现出来,促发新生儿黄疸。这也许可以解释为什么G6PD缺乏导致的新生儿黄疸多数发生在出生后第2~7天甚至更晚的时间。具体溶血机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 吴梓梁,等. 新生儿黄疸. 第1版. 北京:人民卫生出版社. 1982:134.
 [2] 杜传书,等. 红细胞酶测定法及中国人正常值 I. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶及葡萄糖酸

- 6-磷酸脱氢酶. 中华医学检验杂志 1985, 8(2):111.
 [3] Beutler E, et al. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. 3rd ed Grune & Statton, Orlando, FL 1984: 72~84.
 [4] 杜传书,等. 改良红细胞GSH二硫双硝基苯甲酸定量测定法. 中华医学检验杂志 1985,7(3):172.
 [5] Beutler E, et al. International Committee for Standard in Haematology: Recommended Methods for Red Cell Enzyme Analysis. Br J Haematol 1977,35(2):331.
 [6] Anderson B, et al. Red cell GSH regeneration and glutathione reductase activity in G6PD variants in the errare farca. Br J Haematol 1987,67(4):459.
 [7] Nitowski H, et al. Studies of tocopherol deficiency in infants and children I. Plasma tocopherol and erythrocyte hemolysis in hydrogen peroxide. J Dis Child 1965,92(1):164.
 [8] Cohen G. et al. Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. Biochemistry 1963,2(6):1420.
 [9] Flatz G, et al. Enhanced binding of FAD to GR in G6PD deficiency. Nature 1970; 226(4):755.

STUDIES ON THE MECHANISM OF G6PD DEFICIENCY RELATED NEONATAL JAUNDICE

I: AN ANALYSIS OF ERYTHROCYTE ANTIOXIDATIVE ENZYMES ACTIVITIES

Wang Jing Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics)

In order to explore the mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G₆PD) deficiency related neonatal jaundice, three erythrocyte enzymes and reduced glutathione (GSH) contents were studied. The results showed that (1) neonatal erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was significantly lower than adult's, (2) glutathione reductase (GR) activity in G₆PD deficient adults was significantly higher than those in normal adults, (3) decrease in erythrocyte GSH were found in G₆PD deficient adults and newborns. The results suggested that decreased GSH-Px activity in neonatal erythrocytes might interfere antioxidative activity, the low level of GSH in G₆PD deficient newborns seems not an important factor in causing neonatal jaundice. Increased GR activity in G₆PD deficient adults may compensate diminished G₆PD activity and GSH in erythrocytes.

Key words G₆PD deficiency Erythrocyte Glutathione peroxidase
Glutathione reductase Superoxide dismutase Glutathione