doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.10.017

❖临床研究❖

苯丙酮尿症患儿苯丙氨酸羟化酶基因外显子7突变特点及临床研究

周怡,阙敏,王新静
(安徽省妇女儿童保健中心新生儿疾病筛查科,安徽 合肥 230061)

【摘要】**目的:** 探究苯丙酮尿症(PKU)患儿苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因外显子7突变特点及其与临床的关系。**方法:** 选取87例PKU患儿为研究对象。聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析PAH基因外显子7突变与基因测序,分析其与经典型、中间型及轻型PKU之间的关系。**结果:** 87例患儿检出6种PAH基因外显子7位点突变,分别为R243Q、IVS7+2T-A、R241C、G247R、L255S、G247V,其基因频率分别为18.97%、4.02%、1.72%、1.15%、1.15%、0.57%;经典型PKU患儿检出6种突变,中间型PKU检出R243Q、IVS7+2T-A、R241C等3种突变,而轻型PKU仅检出R243Q突变;应用外显子7位点突变情况预测患儿PKU表型显示,经典型、中间型及轻型PKU预测与临床诊断一致性较高,Kappa值分别为0.818、0.781、0.935。**结论:** PKU患儿PAH外显子7突变主要以R243Q、IVS7+2T-A为主,其基因型与PKU表型存在相关性,有助于患儿PKU表型预测。

【关键词】苯丙氨酸羟化酶基因;外显子7突变;聚合酶链反应-单链构象多态性;苯丙酮尿症;临床意义
【中图分类号】R725.8 【文献标志码】A

Characteristics and clinical study of mutations in exon 7 of phenylalanine hydroxylase gene in children with phenylketonuria

ZHOU Yi, QUE Min, WANG Xin-jing
(*Department of Neonatal Disease Screening, Anhui Women and Children's Health Center, Hefei* 230061, *Anhui*, *China*)

【**Abstract**】**Objective**: To investigate the characteristics of mutations in exon 7 of phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in children with phenylketonuria (PKU) and its relationship with clinical practice. **Methods**: 87 children with PKU were selected as study subjects. Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) was used to select mutations in exon 7 of PAH gene for analysis and gene sequencing. The relationship between mutations and classical, intermediate, and mild PKU were analyzed. **Results**: A total of 6 mutations in exon 7 of PAH gene were detected in the 87 children, which were R243Q, IVS7 + 2T-A, R241C, G247R, L255S, and G247V. The gene frequencies were 18.97%, 4.02%, 1.72%, 1.15%, 1.15%, and 0.57%, respectively. 6 mutations were detected in children with classical PKU, 3 mutations (R243Q, IVS7 + 2T-A, R241C) were detected in children with intermediate PKU, and only R243Q mutation was detected in children with mild PKU. Using mutations in exon 7 to predict the phenotype of PKU in children with classical, intermediate and mild PKU could achieve high consistency with clinical diagnosis. The Kappa values were 0.818, 0.781, and 0.935, respectively. **Conclusion**: Mutations in exon 7 of PAH gene in children with PKU mainly include R243Q and IVS7 + 2T-A, and their genotypes are significantly correlated with PKU phenotypes, which is helpful to predict PKU phenotype in children.

【**Key words**】Phenylalanine hydroxylase gene; Characteristics of mutations in exon 7; Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism; Phenylketonuria; Clinical significance

苯丙酮尿症(phenylketonuria,PKU)为苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase,PAH)基因突变导致常染色体隐性遗传病,多诱使肝脏PAH活性缺失或者降低,在我国发病率约为1/11 000[1]。PKU会严重影响儿童脑组织发育,未接受及时治疗会导致患儿出现语言、智力及运动功能障碍,且不可逆[2]。PKU按照血液中苯丙氨酸水平可以分为经典型、中间型以及轻型,其中近90%为经典型。不同国家、地区基因突变存在差异,因此不同地区基因突变特点存在差异[3]。PAH为发挥催化作用四聚体,可以将机体肝脏苯丙氨酸催化为酪氨酸,PAH基因存在12个内含子及13个外显子编码,其中外显子7与

基金项目:合生元婴营养与健康研究项目(2015FYH017)
作者简介:周怡(1984-),女,主治医师。E-mail:zy15005540350@163.com

PAH 酶活性功能关系密切[4]。因此,PAH 基因外显子 7 突变种类、分布及特点在 PKU 患儿诊断发挥重要作用,也可以为患儿 PAH 基因突变具体机制的研究奠定基础。本研究通过采用聚合酶链反应-单链构象多态性(single strand Cconformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products, PCR-SSCP)及序列技术对 PKU 患儿进行检测,旨在明确 PAH 基因外显子 7 突变特点及其与临床的关系。

1　资料与方法

1.1　一般资料

选取 2016 年 1 月至 2020 年 12 月安徽省妇女儿童保健中心中心诊治的 87 例 PKU 患儿为研究对象。其中男性 49 例,女性 38 例;年龄 0.7 ~ 7 岁,平均(4.13 ± 1.64)岁;依据苯丙氨酸水平分型:轻型(<600 μmol/L)8 例,中间型(600 ~ 1 200 μmol/L)13 例,经典型(>1 200 μmol/L)66 例。纳入标准:(1)参照《高苯丙氨酸血症诊治共识》(2014 年)中对应标准[5]进行诊断;(2)均接受了血二氢蝶啶还原酶、尿蝶呤谱、四氢生物蝶呤负荷试验;(3)初诊时苯丙氨酸水平超过 120 μmol/L;(4)年龄 0.7 ~ 7 岁;(5)患儿研究参与获得其家属知情同意,研究进行符合《赫尔辛基宣言》中伦理学标准。排除标准:(1)酪氨酸血症、四氢生物蝶呤缺乏症、一过性高苯丙氨酸血症患者;(2)近期服用影响苯丙氨酸药物;(3)在入组前已经行对症治疗者;(4)存在心脏、肝肾、肺部等机体重要器官功能异常者。

1.2　方法

收集 3 mL 静脉全血,置于抗凝试管中待测。(1)DNA 提取:应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit(德国 Qiagen 公司)抽提,DNA 抽提浓度可以通过增加洗脱次数并延长高温孵育时间提高,获得基因 DNA 用 1% 琼脂糖电泳予以鉴定,将其置于 -20 ℃保存待测。(2)PCR 扩增:采用 C1000 Touch 型号 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)完成。反应体系:1 × 缓冲液、dNTP、正向引物、反向引物、Taq 酶、扩增反应模板、双蒸水体积分别为 3、1、1、1、1、1、17 μL。PCR 反应测定应用;反应条件:95 ℃预变性 5 min→95 ℃变性 45 s→60 ℃退火 60 s→72 ℃变性 45 s,30 个循环后,72 ℃延伸 10 min,随后将其温度降至 4 ℃。应用 1% 琼脂糖电泳检测扩增 PCR 产物,将扩增产物置于 -80 ℃冰箱保存待测。(3)DNA 序列以及突变位点测定:应用 PCR 产物直接测序法进行检测,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司负责样品纯化以及序列检测,测序获得 PAH 基因 DNA 结果需要与基因库中对应结果予以比对,并依据基因库中结果确定外显子 7 突变情况。(4)基因型与 PKU 表型分析:依据 Guldberg 等[6]提出评分方式评估突变基因人为值(assigning value, AV),其值与突变基因性质关系密切,AV 值为 1 时表示存在突变,而残余酶活性范围低于 10%、10% ~ 30%、30% ~ 70% 及 70% 以上 AV 值分别赋分 1、2、4、8 分,最后将突变等位基因评分 AV 数值相加。依据 AV 数值之和预测患儿 PKU 表型,其中 AV 值之和为 2、3 ~ 8 及 9 以上分别表示为经典型、中间型及轻型 PKU。

1.3　统计学分析

采用 SPSS20.0 软件对数据进行分析与处理。计数资料[n(%)]表示;基因型与 PKU 表型的预测价值应用 Kappa 检验。

2　结果

2.1　患儿 PAH 基因外显子 7 位点突变情况

87 例患儿一共存在 174 个等位基因,最终检出 6 种 PAH 基因外显子 7 位点突变,其基因型分别为 R243Q、IVS7 + 2T-A、R241C、G247R、L255S、G247V。见图 1。

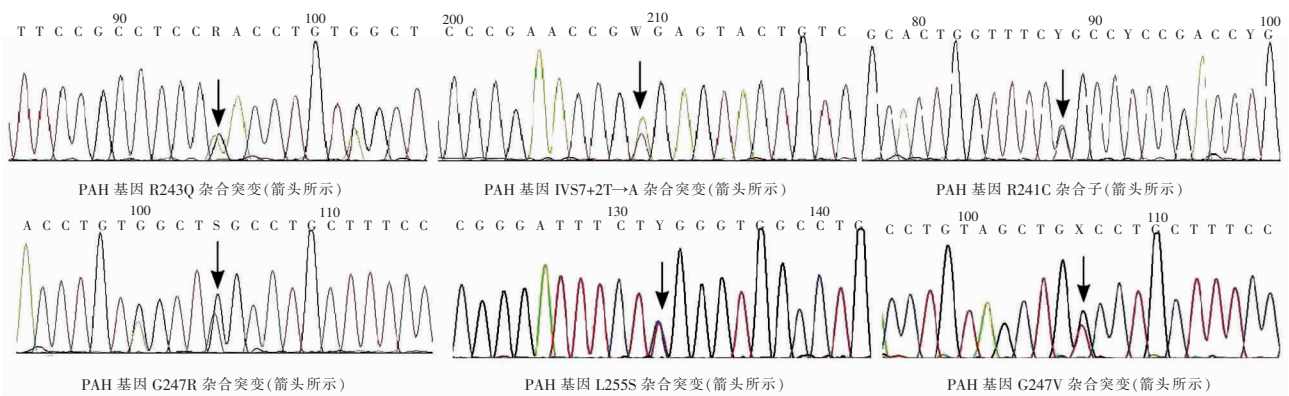


图 1　PAH 基因外显子 7 位点突变基因型

2.2 患儿 PAH 基因外显子 7 位点突变频率

87 例患儿中,40 例外显子 7 位点突变中检出 1 种基因突变,其中 R243Q 基因突变 32 例,IVS7 + 2T-A 基因突变 6 例,R241C 基因突变 2 例;4 例中检出 2 种基因突变,其中 R243Q/IVS7 + 2T-A 基因突变 1 例,R241C/G247V 基因突变 1 例,G247R/L255S 基因突变 2 例。R243Q、IVS7 + 2T-A、R241C、G247R、L255S、G247V 基因突变频率分别为 18.97%、4.02%、1.72%、1.15%、1.15%、0.57%。见表 1。

表 1 患儿 PAH 基因外显子 7 位点突变频率[n(%)]

突变类型	核酸变化	突变基因数	突变类型	突变频率
R243Q	c.728G > A	33	错义突变	18.97(33/174)
IVS7 + 2T-A	c.842 + 2 T > A	7	剪接位点突变	4.02(7/174)
R241C	c.721C > T	3	错义突变	1.72(3/174)
G247R	c739G > C	2	错义突变	1.15(2/174)
L255S	c.764T > C	2	错义突变	1.15(2/174)
G247V	c.740G > T	1	错义突变	0.57(1/174)
合计		48		27.59

2.3 患儿 PAH 基因外显子 7 位点突变情况与表型的关系

经典型 PKU 患儿检出 6 种突变,中间型 PKU 检出 R243Q、IVS7 + 2T-A、R241C 三种突变,而轻型 PKU 仅检出 R243Q 突变。见表 2。

表 2 患儿 PAH 基因外显子 7 位点突变情况与表型的关系[n(%)]

突变类型	例数	轻型 PKU(n = 8)	中间型 PKU(n = 13)	经典型 PKU(n = 66)
R243Q	33	2(6.06)	6(18.18)	25(75.76)
IVS7 + 2T-A	7	0	2(28.57)	5(71.43)
R241C	3	0	1(33.33)	2(66.67)
G247R	2	0	0	2(100)
L255S	2	0	0	2(100)
G247V	1	0	0	1(100)

2.4 患儿基因型-表型预测分析

应用外显子 7 位点突变情况预测患儿 PKU 表型,经典型、中间型及轻型 PKU 预测与临床诊断一致性较高,Kappa 值分别为 0.818、0.781、0.935。见表 3。

表 3 患儿基因型 - 表型预测分析

基因型预测	临床诊断			合计	灵敏度(%)	特异度(%)	准确度(%)	Kappa 值
	经典型	中间型	轻型					
经典型	62	2	0	64	96.88	82.61	93.10	0.818
中间型	3	11	0	14	84.62	95.95	94.25	0.781
轻型	1	0	8	9	100.00	98.73	98.85	0.935
合计	66	13	8	87				

3 讨论

PKU 主要由 PAH 基因突变所致,PAH 基因主要由位于编码位置 13 个外显子及位于非编码位置 12 个内含子构成,可以发挥转录 mRNA 及翻译氨基酸作用。PAH 基因亚基变化均会导致酶功能及结构变化,对应编码位置基因变化会进一步导致 PAH 功能降低或者缺失,进而使机体出现相应临床表现[7-8]。PAH 基因外显子 7 主要存在于 PAH 酶催化区域,该区域存在氨基酸残基情况与活性位点关系密切,氨基酸碱基变化诱使 PAH 酶活性受到影响。因此,PAH 基因外显子 7 是 PKU 患者 PAH 基因突变重要分析部分[9-10]。

本研究在 PKU 患儿体内发现 6 种 PAH 基因外显子 7 突变,分别为 R243Q、IVS7 + 2T-A、R241C、G247R、L255S、G247V,6 种基因突变频率分别为 18.97%、4.02%、1.72%、1.15%、1.15%、0.57%。有研究[11]显示,84 例患儿中共鉴定出 159 个 PAH 突变等位基因,包括 100 个错义突变、28 个剪切突变、24 个无义突变和 7 个缺失突变,外显子 7 突变频率最高(32.08%),其中 p.R243Q 的突变频率最高,占全部突变的 20.13%,与本研究结果一致。另一研究[12]显示,PAH 基因中最常见遗传变异为 c.1066 - 11G > A 和 c.143t > c,与任何单个外显子相比,外显子 7 携带遗传变异最多,3 例患者 PAH 基因第 7、11 外显子 c.727c > T/c.1066 - 11g > A 杂合。本研究结果显示,大部分患儿均检出 1 种基因突变,且主要为 R243Q 基因突变,少部分患儿可以检出 2 种基因突变。国内研究者[13]也发现,PKU 患儿中检出基因突变也为 1 种,且主要为第 7 号外显子,但是也发现 1 例典型病例出现 2 个杂合基因突变,主要为 p.S70del(缺失突变)c.208 - 210delTCT(缺失突变),与本研究中相关结果相似。另研究[14]者发现,70 例 PKU 患儿中大部分为复合杂合变异,仅有 3 例为纯合变异,原因可能是其研究中除检测外显子 7 号位点突变外,还检测了其他各种外显子以及内含子位点突变,但是本研究中仅检测了外显子 7 位点基因突变。对应基因型中变异位点相对温和位点即剩余酶活性高位点在基因突变中发挥主导作用,即其在基因型表型形成发挥决定作用[15]。经典型 PKU 患儿检出 6 种突变,中间型 PKU 检出 R243Q、IVS7 + 2T-A、R241C 三种突变,而轻型 PKU 仅检出 R243Q 突变,显示 PKU 患儿 PAH 基因突变基因型与患者临床表现存在相关性。本研究应用外显子 7 位点突变情况预测患儿 PKU 表型,经典型、中间型以及轻型 PKU 预测与临床诊断一致

性较高,Kappa 值分别为 0.818、0.781、0.935,显示 PAH 基因型与临床诊断表型存在相关性,可用于患者临床表型诊断。Wang 等[16]研究中,35 例患儿中检出 70 个等位基因中鉴定出 61 个突变,频率为 87.14%,最常见突变为 R243Q(26.23%)、R241C(9.84%)和 V399V(8.20%),生化表型预测与临床表型一致性为 81.25%,其中经典 PKU 的一致性最高(87.50%)。

综上,PKU 患儿 PAH 基因外显子 7 位点突变有 6 种类型,其突变类型主要为 R243Q,患儿临床表型与突变基因型存在相关性,突变基因型用于预测临床表型价值优异,可以为其后患儿诊断以及预后评价提供参考依据。但是基因突变容易受种族、地区等诸多因素影响,因此后期需要进一步扩大研究样本量,明确不同种族以及地区对 PKU 患儿 PAH 基因突变影响。

参考文献

[1] 陈晨,赵振华,任依琳,等. 河南地区 113 例苯丙酮尿症患者 PAH 基因的变异特点[J]. 中华医学遗传学杂志,2018,35(6):791 – 795.

[2] Wiedemann A,Oussalah A,Jeannesson é,*et al*. La phénylcétonurie-De la diététique à la thérapie génique[J]. Med Sci (Paris),2020,36(8):725 – 734.

[3] Vardy ERLC,MacDonald A,Ford S,*et al*. Phenylketonuria,comorbidity,and ageing:A review[J]. J Inherit Metab Dis,2020,43(2):167 – 178.

[4] Mahan KC,Gandhi MA,Anand S. Pegvaliase:a novel treatment option for adults with phenylketonuria[J]. Curr Med Res Opin,2019,35(4):647 – 651.

[5] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组,中华预防医学会中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业. 高苯丙氨酸血症的诊治共识[J]. 中华儿科杂志,2014,52(6):420 – 425.

[6] Guldberg P,Rey F,Zschocke J,*et al*. A European multi-center study of phenylalanine hydroxylase deficiency:classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype[J]. Am J Hum Genet,1998,63(1):71 – 79.

[7] 陆清,刘艳秋,杨必成,等. 苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因的变异研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2019,36(11):1057 – 1061.

[8] 夏俊珂,代鹏,王晓锋,等. 基于游离 DNA 单分子标签检测技术的苯丙酮尿症无创产前检测:4 例分析[J]. 中华围产医学杂志,2021,24(2):126 – 130.

[9] Qiang R,Wang L,He J,*et al*. Development of a mutation hotspot detection kit for the phenylalanine hydroxylase gene by ARMS-PCR combined with fluorescent probe technology[J]. Biosci Rep,2021,41(2):1 – 14.

[10] 赵振东,黄慈丹,许海珠,等. 海南省 380 996 名新生儿苯丙酮尿症筛查及苯丙氨酸羟化酶基因分析[J]. 中华医学杂志,2020,100(26):2054 – 2058.

[11] Jafarzadeh-Esfehani R,Vojdani S,Hashemian S,*et al*. Genetic variants of the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in the northeast of Iran[J]. J Pediatr Endocrinol Metab,2020,33(3):355 – 359.

[12] 鲁程绯,郭志义,鲁弼嘉,等. 唐山市苯丙酮尿症患儿筛查及 PAH 基因突变情况分析[J]. 天津医药,2020,48(10):1006 – 1009.

[13] 张璋,张立琴,杜玮,等. 苯丙氨酸羟化酶缺乏症患儿基因型和表型关系及其临床应用的研究[J]. 临床儿科杂志,2020,38(9):37 – 44.

[14] Hillert A,Anikster Y,Belanger-Quintana A,*et al*. The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria[J]. Am J Hum Genet,2020,107(2):234 – 250.

[15] 孙云,王彦云,马定远,等. 南京地区 175 767 例串联质谱技术新生儿筛查结果分析[J]. 中华围产医学杂志,2020,23(4):224 – 231.

[16] Wang ZW,Jiang SW,Zhou BC. PAH mutation spectrum and correlation with PKU manifestation in north Jiangsu province population[J]. Kaohsiung J Med Sci,2018,34(2):89 – 94.

(**收稿日期**:2021 – 04 – 07　　**修回日期**:2021 – 07 – 14)