

· 临床研究 ·

四氢生物蝶呤反应性苯丙氨酸羟化酶缺乏症

Haruo SHINTAKU, Shigeo KURE, Toshihiro OHURA, Yoshiyuki OKANO, Misao OHWADA,
Narui SUGIYAMA, Nobuo SAKURA, Ichiro YOSHIDA, Makoto YOSHINO, Yohichi MATSUBARA,
Ken SUZUKI, Kikumaro AOKI, Teruo KITAGAWA

(大阪市立大学医学院儿科, 大阪 日本 545-8585)

[摘要] 目的 四氢生物蝶呤(BH4)可以使BH4缺乏症病人的血液苯丙氨酸水平正常化,但是对苯丙酮酸尿症(PKU)病人无效。最近在新生儿PKU筛查中发现了对BH4有反应的轻度PKU患者。本研究将探讨BH4和苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因突变在对BH4有反应的轻度PKU和轻度高苯丙氨酸血症(HPA)患者中的作用。方法 对经新生儿PKU筛查中发现的生物蝶呤代谢正常的轻度HPA患者,进行单次(10 mg/kg)、4次、1周[20 mg/(kg·d)]的BH4口服负荷试验及长期BH4治疗,评估其对BH4口服负荷试验的反应性。结果 在单剂量BH4口服负荷试验中,典型PKU患者的血苯丙氨酸水平没有降低。在单剂量BH4口服负荷试验中血苯丙氨酸水平下降超过20%的患者,在4次BH4口服负荷试验中下降亦超过20%。1周BH4负荷试验确认在单剂量和4次BH4负荷试验中表现出弱反应性的病人对BH4有反应。许多患轻度PKU和轻度HPA且有R241C基因位点的病人,都对BH4治疗有反应。在无BH4反应性的典型PKU病人中未发现R241C、P407S和A373T基因突变。结论 1周BH4负荷试验用于诊断BH4反应性PAH缺乏症最为有效。等位基因R241C、P407S和A373T与轻度HPA和轻度PKU病人具有H4反应性有关。BH4治疗是针对轻度HPA和轻度PKU的一种新颖、有效的药物治疗,有望代替限制苯丙氨酸饮食的方法。 [中国当代儿科杂志,2005,7(4):301-304]

[关键词] 苯丙氨酸尿症;四氢生物蝶呤;突变;基因;儿童

[中图分类号] R725.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)04-0301-04

Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency

Haruo SHINTAKU, Shigeo KURE, Toshihiro OHURA, Yoshiyuki OKANO, Misao OHWADA, Narui SUGIYAMA, et al.
Department of Pediatrics, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka 545-8585, Japan (Email:shintakuh@med.osaka-cu.ac.jp).

Abstract: Objective Tetrahydrobiopterin (BH4) is known to normalize blood phenylalanine levels in BH4 deficiency, but not in phenylketonuria (PKU). Recently the patients with mild PKU who were responsive to BH4 were found in neonatal screening for PKU. This study aimed to investigate the effect of BH4 and phenylalanine hydroxylase (PAH) gene mutations in patients with BH4 responsive mild PKU and mild hyperphenylalaninemia (HPA). **Methods** The responsiveness of the BH4 loading test was evaluated in HPA patients detected by neonatal PKU screening. All patients were normal in bipterin metabolism and were diagnosed as HPA with PAH gene mutations. A single-(10 mg/kg), and four-time-, one-week-BH4 [20 mg/(kg·day)] loading test and a long-term BH4 treatment were performed for them. **Results** In a single BH4 loading test, no classic PKU patients demonstrated decreases in serum phenylalanine levels. The patients with a decrease greater than 20% in serum phenylalanine levels in the single-BH4-loading test showed a similar decrease in the four-dose-BH4 loading test. The one-week-BH4 administration test clarified the BH4 effect not only in responsive patients, but also in patients who showed low responsiveness in single- or four-dose-BH4 loading test. The majority of patients with mild HPA and mild PKU who had the R241C allele responded to BH4 administration. R241C, P407S and A373T mutation were never found in classic PKU patients without BH4 responsiveness. **Conclusions** The one-week-BH4 administration test is the most effective for the diagnosis of the BH4 responsive PAH deficiency. R241C, P407S and A373T alleles represented the causes of mild HPA or mild PKU in patients with BH4 responsiveness. BH4 treatment is a new and effective pharmacotherapy which replaces the phenylalanine restricted diet for mild HPA and mild PKU patients.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(4): 301-304]

Key words: Phenylketonurias; 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; Mutation; Genes; Child

[收稿日期]2004-11-08; [修回日期]2005-02-26

[作者简介]Haruo SHINTAKU (1952-),男,博士,副教授。主攻方向:遗传代谢性疾病。

轻度高苯丙酸血症 (hyperphenylalaninemia, HPA) 是由苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase, PAH) 或其辅酶——四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin, BH4) 的缺乏引起的^[1]。早期使用 BH4 和神经传递素前体治疗可以预防神经损伤, 因此有必要通过新生儿苯丙酮酸尿症 (Phenylketonurid, PKU) 筛查早期诊断 HPA^[2]。测量尿液中的蝶呤及特异性酶的活性是 BH4 缺乏症的确诊实验, BH4 口服负荷试验 (口服 BH4 后血液苯丙氨酸水平降低) 虽不是确诊实验, 但是作为一种简单的方法仍然推荐使用。与 PKU 病人不同, BH4 缺乏症病人服用单剂量 BH4 (10 mg/kg) 后 4~6 h 内, 血液中的苯丙氨酸 (Phe) 水平就可以恢复正常。由于 BH4 缺乏症病人的 PAH 正常, 服用的 BH4 有可能激活肝脏中的 PAH, 将 Phe 转化成酪氨酸, 从而导致血液 Phe 水平降低, 酪氨酸水平增高。而伴 PAH 缺乏的典型 PKU 病人, 服用 BH4 不能激活 Phe 羟化酶, 因此血液 Phe 水平不会降低。根据这一原理, BH4 口服负荷试验可以将 BH4 辅酶缺乏同 PAH 脱辅酶蛋白缺乏区分开来。但是, 最近有报道显示, 一些伴有 PAH 缺乏的 HPA 病人在服用 BH4 后, 血 Phe 浓度也有所降低^[3]。我们测量了在大规模新生儿 PKU 筛查中发现的所有 HPA 患者的血清蝶呤水平和二氢蝶呤还原酶 (dihydropteridine reductase, DHPR) 活性, 结果发现一些无 BH4 缺乏的 HPA 病人, BH4 口服负荷试验可以降低血 Phe 水平^[4,5]。BH4 可以使 PAH 突变病人血 Phe 水平恢复正常, 这一认识的迟滞意味着 BH4 反应性的准确生化机制还不清楚, 从基因水平来预测 BH4 反应性仍不完善。本研究将重点研究决定 HPA 病人 BH4 反应性的基因型。

1 对象与方法

1.1 对象

在 1997 年到 2000 年间大规模新生儿 PKU 筛查中发现的 25 名 HPA 病人, 给予 BH4 口服负荷试验 (10 mg/kg)^[5]。根据日本 12 所医学中心于 1995 年 6 月到 2001 年 7 月间制定标准^[6], 按治疗前血 Phe 水平, 5 名为轻度 HPA (血 Phe 低于 10 mg/dL), 7 名为中度 PKU (血 Phe 10~20 mg/dL), 13 名为典型 PKU (血 Phe 高于 20 mg/dL)。其中 12 名 HPA 病人, 在 BH4 口服负荷试验之前, 尿液或血液中的蝶呤含量均正常, Guthrie 卡片法测量的 DHPR 活性也正常, 都对 BH4 有反应性, 血 Phe 浓度在 2.0~12.0 mg/dL 之间。所有的病人都诊断为轻度

HPA 或轻度 PKU, 随后给予限制 Phe 饮食。

1.2 BH4 口服负荷试验

对正常饮食时血 Phe 浓度持续高于 6 mg/dL 的病人给予 BH4 (Suntory, 东京, 日本) 口服负荷试验, 试验过程中维持正常饮食。单次 BH4 口服负荷试验: 早餐前服用 BH4 (10 mg/kg), 服用后 0, 4, 8 及 24 h 采血检测。与 BH4 缺乏症不同, BH4 反应性 PAH 缺乏症病人血 Phe 水平会在服用后 4~24 h 内恢复正常。4 次 BH4 口服负荷试验: 分别在 0, 24, 36 及 48 h 分别服用 10, 10, 5 及 5 mg/kg 剂量的 BH4, 服用后 0, 4, 8, 24 及 52 h 采血检测, 以确认单次口服负荷试验的结果并评估剂量依赖性作用。1 周 BH4 口服负荷试验: 每天口服 20 mg/kg BH4, 分 3 次服用, 连续 1 周, 于试验前及试验后第 4 d 和第 7 d 采血检测。长期 BH4 口服负荷试验: 从每天 3 次, 每次口服 10~20 mg/kg 开始, 在正常饮食的基础上调整剂量, 使血 Phe 浓度维持在 2~4 mg/dL 之间。服用前及服用后第 1 个月每周采血检测 1 次, 随后每 2 周 1 次或者每月 1 次。

1.3 血 Phe, 蝶呤水平和 DHPR 活性测定

使用自动氨基酸分析仪测定血 Phe 水平。碘氧化后, 使用高效液相色谱测定血液中的蝶呤水平。采用 Guthrie 卡片法测定 DHPR 活性。

2 结果

血 Phe > 20 mg/dL 的典型 PKU 病人对 BH4 没有反应。在 12 名血 Phe < 20 mg/dL 的轻度 HPA 和轻度 PKU 病人中, 5 名病人的血 Phe 水平逐渐降低, 24 h 后最终的 Phe 浓度比初始浓度低 2~5 mg/dL, 且血蝶呤水平及 DHPR 活性均正常。

单次 BH4 口服负荷试验中, 8 名病人的血 Phe 浓度在服用 BH4 后 4~24 h 内较初始浓度逐渐降低 20%~60%。在病例 3、4 和 9 中, 血 Phe 初始浓度约为 5 mg/dL, 病例 3 和 9 如上述, 血 Phe 浓度较初始浓度逐渐降低 50% 以上; 病例 4 的血 Phe 浓度没有降低; 在单次 BH4 口服负荷试验的 11 名病人中, 有 10 名病人血 Phe 浓度降低的程度大于 20% (图 1)。4 次 BH4 口服负荷试验中, 病例 4 的血 Phe 浓度在服药后 8 h 后逐渐降低, 52 h 时降低了 37%; 病例 5 的反应则和单剂量试验相似, 这个病例中, 4 次给药和单次给药的效果一样; 4 次 BH4 口服负荷试验的 8 名病人中, 7 名病人血 Phe 浓度下降大于 30%, 介于 35%~59% 之间 (图 2)。1 周的 BH4 负荷试验中, 6 名病人连续 1 周口服 BH4 (每日 20 mg/kg),

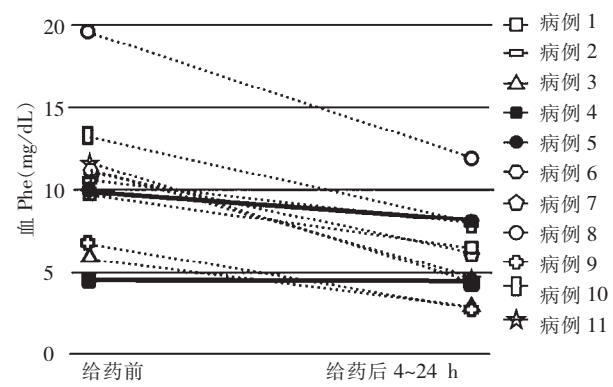


图1 单次BH4口服负荷试验

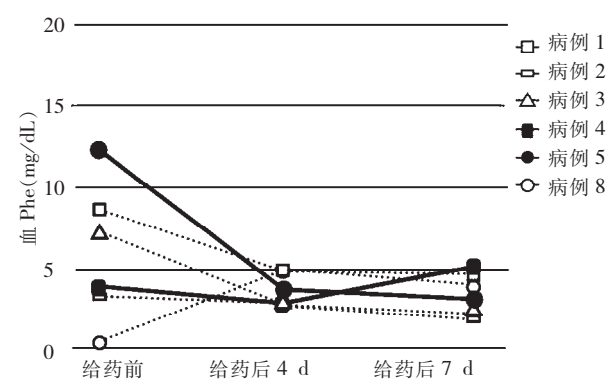


图3 1周BH4口服负荷试验

结果显示,病例3和5的血Phe浓度下降超过50%;病例1连续1周口服BH4(每日15 mg/kg),血Phe浓度下降超过45%;病例2和4的血Phe水平降至3 mg/dL甚至更低,与单次或4次BH4口服负荷试验前的初始浓度相比,下降程度大于50%;病例8中,1周的BH4口服负荷试验开始之前的血Phe水平为0.56 mg/dL,处于正常范围,在试验期间,血Phe浓度稳定保持在4 mg/dL,自由饮食的情况下,浓度也没有升高,与4次的BH4口服负荷试验的前的初始浓度相比,下降程度大于50%(图3,4)。

表1 BH4反应性HPA和PAH基因突变

病例	新生儿筛查	PAH 基因		Phe 降低比例 ^a
	血 Phe (mg/dL)	等位基因 1	等位基因 2	
04	2.0	R241C	R241C	0
11	8.3	R241C	R241C	62
01	6.0	R241C	T278I	34
05	6.2	R241C	P281A	21
07	8.1	R241C	R413P	43
08	4.0-6.0	R241C	R111X	39
10	8.0-10.0	R241C	R413P	42
12	10.0-12.0	R241C	R413P	-
03	5.9	A132V	R413P	51
02	10.0	P407S	R158W	54
06	16.0	P407S	R252W	59
09	4.0	A373T	IVS4-1g>a	59

a 单次BH4口服负荷试验(10 mg/kg)

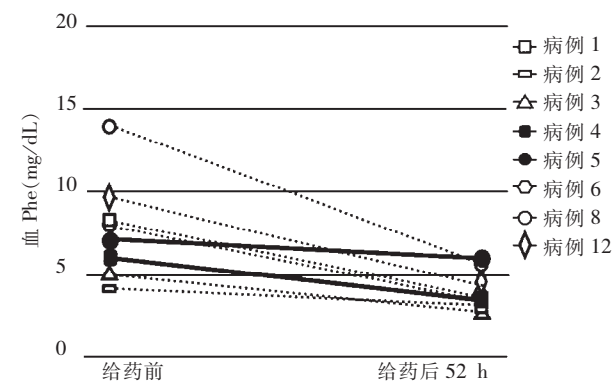


图2 4次BH4口服负荷试验

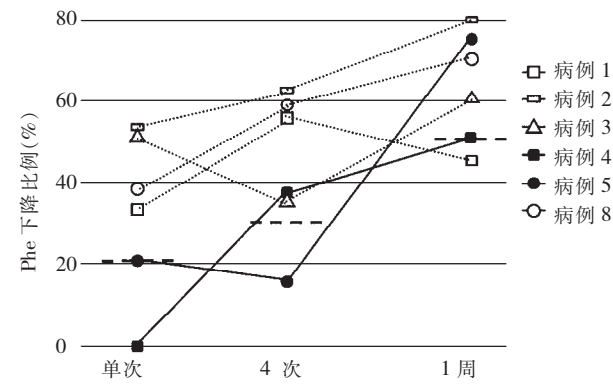


图4 BH4口服负荷试验中Phe下降比例

Phe羟化酶基因突变情况见表1。PAH突变和新生儿筛查的血Phe浓度没有明显联系。但是,日本许多患轻度HPA和轻度PKU且有R241C等位基因的病人,都对服用BH4有反应。我们的遗传分析和他人报道的遗传分析(表2)提示,BH4反应性主要是由Phe羟化酶基因——如R241C的突变决定的。R241C、P407S、A132V和A373T这些等位基因解释了轻度HPA或轻度PKU病人具BH4反应性的原因。

表2 文献报道的BH4反应性PAH缺乏病人的PKU基因型

编号	参考文献	BH4 剂量	PAH 基因		Phe 降低比例 ^c
		(mg/kg)	allele 1	allele 2	
1 ⁷		20	A104D	K320N	42
2 ⁷		20	Y414C	Y414C	72
3 ⁸		20	Y414C	Del194	85
4 ⁹		20	A313T	L367fsinsC	90
5 ⁹		20	VI90A	R243X	61
6 ⁹		20 + Phe ^b	A300S	A403V	92
7 ⁹		20 + Phe ^b	R241C	A403V	93
8 ¹⁰		20	E390G	IVS10-11g>a	93
9 ¹¹		20	Y414C	R408W	56
10 ¹²		7.5	A395P	IVS12 + 1g>a	-14
11 ¹²		7.5	R261Q	I65T	-9

b 联合给予100 mg/kg Phe; c 从图或表中的Phe值计算得来

3 讨论

本研究显示,在12名轻度HPA或轻度PKU病人中,有5名病人血Phe水平在口服BH4后24h下降。这些反应和BH4缺乏症的病人不同。这些病人的血蝶呤水平或DHPR活性都没有异常,因此他们被诊断为PAH缺乏。最近有报道提示BH4反应性的机制可由PAH基因突变来解释^[3]。简言之,服用超过米氏常数(K_m)量的BH4可降低血Phe水平,其原因可能是PAH基因突变造成K_m值的增加。重复和反复确认对BH4的反应性非常重要,如果血Phe降低超过2 mg/dL或者初始值的20%,那么BH4就可用于治疗伴PAH缺乏的HPA。

轻度HPA和轻度PKU病人的血Phe浓度在单次BH4口服负荷试验中下降超过20%的,在4次BH4口服负荷试验中下降超过30%;短期试验中显示对BH4反应差的病人,可经1周试验发现其对BH4的反应性(图5)。对BH4有反应的轻度HPA病人中有许多人具R241C等位基因。在单次或4次剂量试验中,血Phe的降低程度和特异的PAH变异之间未发现明显的联系。1周BH4口服负荷试验是诊断的BH4反应性PAH缺乏症最灵敏的试验(图5)。R241C、P407S、A132V和A373T这些等位基因说明了轻度HPA或轻度PKU病人具BH4反应性的原因(表1)。不具BH4反应性的典型PKU病人中从未发现这四种基因的突变。试验证明BH4

是一种有效的治疗,有望取代或解除对许多轻度HPA和轻度PKU病人控制Phe饮食的限制。

PAH缺乏症中BH4反应性的机制尚不完全清楚。尽管以基因型预测BH4反应性可能仍不完善,但是对准确诊断BH4反应性仍然很重要。因为BH4服用方便,且服用足量的BH4可以解除Phe饮食的限制,因此,我们建议对所有HPA病人进行BH4口服负荷试验和基因分析。

[参 考 文 献]

- [1] Shintaku H. Disorders of tetrahydrobiopterin metabolism and their treatment [J]. Curr Drug Metab, 2002, 3(2): 123-131.
- [2] Shintaku H. Early diagnosis of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency [J]. Pteridines, 1994, 5(1): 18-27.
- [3] Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency [J]. J Pediatr, 1999, 135(3): 375-378.
- [4] Shintaku H, Asada M, Sawada Y, Yamano T. Tetrahydrobiopterin responsive hyperphenylalaninemia without biopterin deficiency [J]. Pteridines, 2000, 11(3): 83-84.
- [5] Shintaku H, Kure S, Ohura T, Okano Y, Ohwada M, Sugiyama N, et al. Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene [J]. Pediatr Res, 2004, 55(3): 425-430.
- [6] Arai N, Narisawa K, Hayakawa H, Tada K. Hyperphenylalaninemia due to dihydropteridine reductase deficiency: Diagnosis by enzyme assays on dried blood spots [J]. Pediatrics, 1982, 70(3): 426-430.

(本文编辑:王霞)