

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.03.008

论著·临床研究

宁夏苯丙酮尿症患儿苯丙氨酸羟化酶 基因外显子7突变分析

毛新梅¹ 何江² 刘媛¹ 李晓强¹ 余伍忠² 高治会¹ 蔡晶¹

(1. 宁夏回族自治区妇幼保健院儿童保健科, 宁夏 银川 750004;
2. 兰州军区乌鲁木齐总医院临床医学研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的** 探讨宁夏地区苯丙酮尿症(PKU)患儿苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因外显子7突变类型及频率,为该地区PKU的基因诊断和产前诊断提供依据。**方法** 应用PCR产物直接测序方法,对宁夏73例经典型PKU患儿(回族39例,汉族34例)的146个PAH等位基因外显子7及其旁侧内含子区域进行序列分析。**结果** 共检测出6种突变基因型,分别是R243Q(14.4%)、R241C(6.8%)、IVS7+2T→A(2.7%)、L255S(0.7%)、G247V(0.7%)和G247R(0.7%)。外显子7突变基因总频率为26.0%(38/146),包括错义突变和剪接位点突变两种。回族患儿R241C等位基因突变检出率高于汉族(10% vs 3%, $P<0.05$)。**结论** 宁夏地区PKU患儿PAH基因外显子7突变频率最高的是R243Q,其次为R241C;回族和汉族PKU患儿R241C等位基因突变率不同。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(3): 259-262]

[关键词] 苯丙氨酸羟化酶; 基因突变; 回族; 汉族; 儿童

Analysis of mutations in exon 7 of phenylalanine hydroxylase gene among children with phenylketonuria in Ningxia, China

MAO Xin-Mei, HE Jiang, LIU Yuan, LI Xiao-Qiang, YU Wu-Zhong, GAO Zhi-Hui, CAI Jing. Maternal and Child Health Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750004, China (Yu W-Z, Email: yuwz2013@126.com)

Abstract: Objective To investigate the type and frequency of mutations in exon 7 of phenylalanine hydroxylase (PAH) gene among children with phenylketonuria (PKU) in Ningxia, China and to provide a basis for the genetic diagnosis and prenatal diagnosis of PKU in this region. **Methods** Direct sequencing of PCR product was performed to analyze the sequences of exon 7 and its flanking introns of 146 PAH alleles in 73 children with typical PKU (39 cases of Hui nationality and 34 cases of Han nationality) in Ningxia. **Results** Six mutations were detected, including R243Q (14.4%), R241C (6.8%), IVS7+2T→A (2.7%), L255S (0.7%), G247V (0.7%), and G247R (0.7%). The overall frequency of mutations (missense mutation and splice site mutation) in exon 7 was 26.0% (38/146). The detection rate of R241C mutation was significantly higher in children of Hui nationality than in children of Han nationality (10% vs 3%; $P<0.05$). **Conclusions** In Ningxia, R243Q mutation in exon 7 of PAH gene is most common in children with PKU, followed by R241C. The frequency of R241C mutation in exon 7 of PAH gene varies between children with PKU of Hui and Han nationality. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(3): 259-262]

Key words: Phenylalanine hydroxylase; Mutation; Hui nationality; Han nationality; Child

苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是由于肝脏苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)活性减低或缺乏,导致苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)代谢障碍的一种常染色体隐性遗传病,

其主要致病原因是苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因发生突变^[1]。研究发现,我国PKU患者PAH基因外显子7突变检出率最高^[2]。宁夏位于我国西北地区,人口以回族和汉族为主,其中回族约占1/3,PKU

[收稿日期] 2013-09-13; [接受日期] 2013-12-15

[基金项目] 宁夏自然科学基金资助项目(NZ13237);宁夏科技支撑项目(2013ZYS122)。

[作者简介] 毛新梅,女,大学,副主任医师。

[通信作者] 余伍忠,男,主任医师。

发病率为 0.29‰ (1/3423)^[3]。本研究对临床确诊的 73 例经典型 PKU 患儿 PAH 基因外显子 7 进行突变检测分析, 探讨宁夏地区 PAH 基因突变的特点, 为该地区开展 PKU 产前基因诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

73 例 (回族 39 例, 汉族 34 例) 经典型 PKU 患儿均为宁夏新生儿疾病筛查中心于 2010 年 1 月至 2012 年 12 月确诊, 其中 64 例为新生儿筛查确诊, 9 例为出现症状后确诊。年龄 15 d 至 13 岁, 男性 38 例 (回族 17 例), 女性 35 例 (回族 22 例)。初诊血 Phe 浓度在 582~2940 μmol/L 之间 (正常参考值 <120 μmol/L)。所有患儿均进行了尿喋呤谱分析、血二氢喋啶还原酶测定和四氢生物喋呤负荷实验, 排除了四氢生物喋呤缺乏症。另选取 100 名正常对照者 (回族 50 名, 汉族 50 名, 均为 2012 年宁夏新生儿筛查标本), 其血清 Phe 浓度 <120 μmol/L, 无 PKU 家族史。本研究获得患儿家长或监护人的书面知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取 应用血片卡快速酚/氯仿抽提法, 将带有血样的干滤纸卡片沿血滴 4 周剪下, 用 1×TE500 μL+ NaCl (250 mmol/L) 800 μL 洗涤 1 次, 加入 200 μL 消化缓冲液 (100 mmol/L Tris pH 8.0, 20 mmol/L ED-TA, 150 mmol/L NaCl, 2% SDS), 5 μL 蛋白酶 K, 65℃ 水浴 1 h。不去除纸片直接在消化液中加入 200 μL 饱和酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 PAH 基因外显子 7 区域 PCR 引物, 严格按照引物序列设计原则设计完成^[4], 正

向引物序列: 5'-ATGTCCTGGGCAGTTATGTG-3'; 反向引物序列: 5'-TGAGAACAGGAACAAGTGGCA-3', 产物大小为 512 bp。PCR 反应在 ABI 9700 型扩增仪上进行 (ABI 公司, 美国), 总体积 20 μL, 其中含 1.5 U Taq DNA 聚合酶 (GeneAmp High Fidelity Enzyme, 美国 ABI 公司) 5 U/μL, 2 pmol/L 引物浓度, 2.5 mmol/L LM dNTP。循环条件为 95℃ 预变性 15 min, 先进行 95℃ 变性 45 s, 62℃ 退火或复性 45 s (每个循环降 0.5℃), 72℃ 延伸 60 s, 共循环 11 次; 然后进行 95℃ 变性 45 s, 57℃ 退火或复性 45 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 24 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min 后降温至 4℃ 备用。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 序列测定 应用 PCR 产物直接测序的方法, 样品纯化及序列分析由中国优生优育基因科学专家指导中心应用 ABI 3130 XL 型序列分析仪完成 (ABI 公司, 美国)。

2 结果

2.1 突变类型

对 73 例 PKU 患儿共 146 个 PAH 等位基因外显子 7 及其旁侧内含子区域进行测序分析, 结果检测出 6 种突变基因型, 分别是 R243Q、R241C、IVS7+2T→A、L255S、G247V 和 G247R (图 1), 其等位基因频率分别为 14.4%、6.9%、2.7%、0.7%、0.7% 和 0.7%, 分为错义突变和剪接位点突变两种 (表 1)。73 例患儿中 4 例检测出 2 个基因突变 (R243Q/R243Q 突变 2 例, R243Q/R241C 突变 1 例, IVS7+2T→A/G247R 突变 1 例), 30 例检测出 1 个基因突变, 外显子 7 突变基因总频率为 26.0% (38/146), 其中回族为 28.2%, 汉族为 23.5% ($\chi^2=1.09, P=0.297$)。

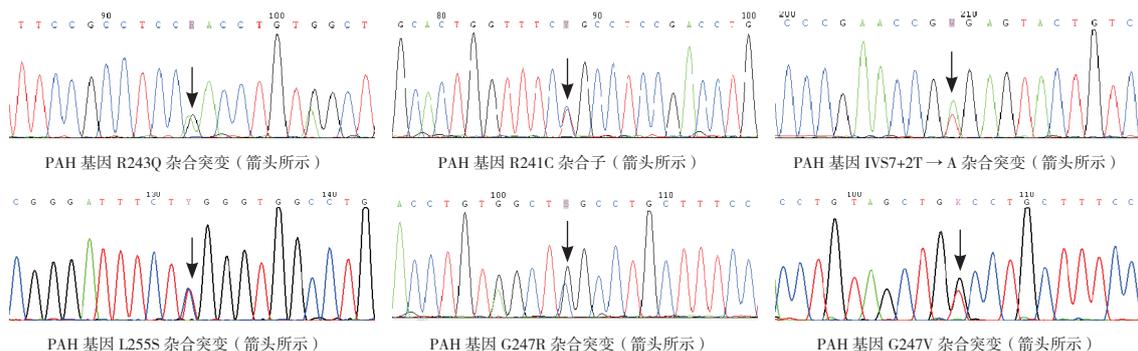


图 1 73 例 PKU 患儿的 6 种 PAH 突变基因型

表1 73例PKU患儿PAH基因外显子7突变结果

突变	核苷酸改变	突变基因数	突变类型	相对频率(%)
R243Q	c.728G>A	21	错义突变	14.4
R241C	c.721C>T	10	错义突变	6.8
IVS7+2T→A	c.842+2 T>A	4	剪接位点突变	2.7
G247V	c.740G>T	1	错义突变	0.7
L255S	c.764T>C	1	错义突变	0.7
G247R	c.739G>C	1	错义突变	0.7
合计		38		26.0

2.2 突变频率

在检出的6种PAH突变基因中,突变频率最高的是R243Q(14.4%),其中回、汉族儿童分别为14.1%和14.7%($\chi^2=0.01, P=0.91$)。突变频率居第二位的是R241C(6.8%)。R241C等位基因突变的10例患儿中,有8例为回族儿童,回族患儿检出率为10%,高于汉族儿童(3%),差异有统计学意义($\chi^2=4.22, P=0.04$)。IVS7+2T→A突变频率居第三位,G247V、G247R和L255S少见。

3 讨论

PKU的病理基础是PAH基因突变,正常PAH基因由编码区的13个外显子和非编码区的12个内含子组成,转录1353bp的mRNA,翻译成含451个氨基酸的酶单体,PAH每个亚基的改变都会引起酶结构和功能的改变,当编码区及其两侧

内含子有基因突变发生时,就会引起PAH的功能缺失或减低,导致相应的临床表现^[5]。PAH基因第7外显子编码PAH蛋白核心功能区,对保持该酶活性起关键性作用^[6],是基因分析的重点区域。在13个外显子中,我国最为常见的PAH基因突变区域发生于外显子7,以台湾地区为最高,达到了42.0%^[7],中国南方地区较低,为16.4%^[8]。本研究中外显子7及其旁侧内含子区域检出率为26.0%,与河北、河南、内蒙古、山西接近^[9-12],但低于北方地区^[2]、新疆地区^[13]和天津地区^[14]的相关报道。因此在宁夏地区开展PAH基因突变研究时应更多关注外显子7及其旁侧内含子区域。

本研究在宁夏地区PAH基因外显子7中共检出了6种突变类型,其中R243Q等位基因频率最高(14.4%),但与其他北方地区相比仍属较低频率。现有报道显示,R243Q主要存在于亚洲,多集中于我国北方地区,而在河南的频率达到了20.5%^[10]。处于第二位的R241C以台湾地区最普遍(32.0%)^[7],日本(7.3%)^[15]和韩国(6.0%)^[16]也较为常见。但在大陆,宁夏地区R241C突变比率高于其他地区。另外4种突变IVS7+2T→A、L255S、G247R和G247V近几年在国内一些地区逐渐被报道,IVS7+2T→A以山西、内蒙古多见^[11-12],L255S河南、新疆多见^[10,13],G247V河南、天津多见^[10,14]。值得关注的是G247R仅散在分布于我国京津冀及宁夏地区^[2,8,14],极为少见,似是我国北方地区特有的一种突变基因类型(表2)。

表2 宁夏地区PAH基因外显子7突变型频率与其他地区比较 (%)

突变类型	宁夏	新疆 ^[13]	北方 ^[2]	天津 ^[14]	河北 ^[9]	内蒙 ^[11]	山西 ^[12]	河南 ^[10]	南方 ^[8]	台湾 ^[7]	日本 ^[15]	韩国 ^[16]	欧洲 ^[17]	巴西 ^[18]
R243Q	14.4	21.3	21.7	18.2	12.7	18.8	12.7	20.5	9.5	6.0	7.3	12.0	0	1.3
R241C	6.8	0	2.2	1.5	3.6	0	0	0	0.9	32.0	7.3	6.0	0	0.4
IVS7+2T>A	2.7	0	2.2	0.5	1.8	3.1	5.1	0	0	0	0	0	0	0
L255S	0.7	2.5	0.7	0	0	0	0.8	2.4	0	0	0	0	0	0
G247R	0.7	0	0.2	0.5	0.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G247V	0.7	0.8	1.1	1.5	0.9	0	0.8	2.4	0	0	0	0	0	0

注:“北方”包括北京、吉林、辽宁等;“南方”包括上海、江苏、浙江、安徽等。

有关PAH基因外显子7的报道各有差异,本研究表明,宁夏地区PAH外显子7中基因突变与其他地区相比有所不同。因此,掌握宁夏回族和汉族中的PAH基因第7外显子突变规律和特征,将为宁夏地区深入开展PKU的基因诊断、产前诊断提供依据,为实现该地区的优生优育奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] 顾学范. 新生儿代谢性疾病筛查[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 92-106.
- [2] 宋防, 瞿宇晋, 杨艳玲, 等. 中国北方地区苯丙氨酸羟化酶基因的突变成[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(3): 241-246.

- [3] 毛新梅, 马晓燕, 李宏艳, 等. 宁夏回族自治区新生儿疾病筛查现状调查 [J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(36): 5988-5990.
- [4] Guldberg P, Romano V, Ceratto N, et al. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase Europe[J]. Hum Mol Genet, 1993, 2(10): 1703-1707.
- [5] Scriver CR, Waters PJ, Sarkissian C, et al. PAHab: a locus-specific knowledge base[J]. Hum Mutat, 2000, 15(1): 99-104.
- [6] Abadie V, Lyonnet S, Maudfin N, et al. CpG dinucleotides are mutation hot spots in phenylketonuria[J]. Genomics, 1989, 5(4): 936-940.
- [7] Chien YH, Chiang SC, Huang A, et al. Mutation spectrum in Taiwanese patients with phenylalanine hydroxylase deficiency and a founder effect for the R241C mutation[J]. Hum Mutat, 2004, 23(2): 206.
- [8] 张眉, 顾学范, 张美华, 等. 中国南方人苯丙氨酸羟化酶基因外显子7点突变及其频率分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 1995, 12(6): 324-326.
- [9] 卢超霞, 高峡, 王金玮, 等. 河北地区55例苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变的检测与分析 [J]. 中华医学杂志, 2011, 91(42): 2971-2976.
- [10] 郭红军, 赵振华, 江森, 等. 河南地区苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(2): 142-146.
- [11] 张力军, 孟峻, 翟晓萍, 等. 经典型苯丙酮尿症丙氨酸羟化酶基因的新突变鉴定 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(2): 134-137.
- [12] 高伟华, 张全斌, 刘建平, 等. 山西省经典型苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(4): 393-396.
- [13] 余伍忠, 仇东辉, 宋昉, 等. 新疆地区苯丙氨酸羟化酶基因的突变研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(1): 26-30.
- [14] 宋力, 党利亨, 孟英韬, 等. 天津及周边地区苯丙氨酸羟化酶基因突变谱和新突变分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(1): 7-12.
- [15] Okano Y, Asada M, Kang Y, et al. Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients[J]. Hum Genet, 1998, 103(5): 613-618.
- [16] Lee DH, Koo SK, Lee KS, et al. The molecular basis of phenylketonuria in Koreans[J]. J Hum Genet, 2004, 49(11): 617-621.
- [17] Zschocke J. Phenylketonuria mutation in Europe[J]. Hum Mutat, 2003, 21(4): 345-356.
- [18] Acosta A, Silva W Jr, Carvalho T, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria[J]. Hum Mutat, 2001, 17(2): 122-130.

(本文编辑: 王庆红)

· 消息 ·

“新生儿热点问题”研讨班通知 国家继续医学教育项目 (2014-06-03-034)

为进一步提高新生儿诊疗水平, 广东省继续医学教育委员会、暨南大学医学院附属东莞医院, 拟于2014年8月20~23日在中外闻名的东莞市虎门镇举办国家级继续医学教育项目: “新生儿热点问题”研讨班。

将邀请全国著名新生儿学专家讲授国内外新生儿医学领域的热点问题, 如新生儿严重呼吸衰竭的体外循环膜充氧 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 治疗技术, 新生儿缺氧缺血性脑病高压氧治疗作用机制研究的最新进展和最佳治疗方案, 亚低温疗法国内多中心研究最新成果及国外五项大型多中心研究结果, 严重高未结合胆红素血症、败血症、中毒性疾病的中心静脉快速、高效、同步换血术, 能查110余种新生儿先天性代谢缺陷病最新筛查技术, 支气管肺发育不良 (BPD)、早产儿视网膜病 (ROP)、早产儿动脉导管未闭、新生儿肺动脉高压、坏死性小肠结肠炎等国内外研究的最新进展, 新生儿医患纠纷的原因及对策, 以及医学科研的选题、论文写作和投稿等问题。搭建一个相互交流和学习的平台, 进一步提高新生儿科的整体医疗、科研水平。参加学员每人赠送人民卫生出版社出版的我国26位著名围产新生儿学专家的科研成果和临床经验结集《围生儿窒息及多脏器损伤诊疗进展》一册。

招收对象: 适合各医药院校附属医院、综合性医院、儿童医院、妇幼保健院新生儿科、儿科、妇产科医师、护师参加学习, 建议各单位选派1名医师和1名护师参加。

地点: 广东省东莞市虎门镇虎门大道154号暨南大学医学院附属东莞医院

联系人: 暨南大学医学院附属东莞医院新生儿科

联系地址: 广东省东莞市虎门镇虎门大道 邮编: 523900

会务组: 李薇 电话: 0769-85010147; 13600281216; 电子邮箱: dr.li.wei@163.com

王德胜 电话: 0769-85010147; 13622690778; 电子邮箱: wds197606@163.com