· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.01.001

高苯丙氨酸血症检测技术联合应用及家系基因研究*

李雨雨, 许佳, 刘娜, 李洪俞, 王燕, 牟凯[△]

淄博市妇幼保健院医学遗传科, 山东淄博 255000

摘要:目的 通过分析该院近 3 年新生儿高苯丙氨酸血症(HPA)筛查结果,了解该地区 HPA 筛查技术应用及家系基因变异情况,可进一步提高筛查、诊治、产前诊断的能力。**方法** 采用荧光法和串联质谱法检测 2018 年 1 月至 2020 年 12 月自愿接受筛查的 128 997 例新生儿足跟血苯丙氨酸(Phe)浓度,对筛查阳性者进行血串联质谱、生化、尿气相色谱、基因等相关检测进行确诊。**结果** 两种检测方法均能有效检出 11 例确诊 HPA 患儿。筛查的 128 997 例新生儿中有 11 例确诊为 HPA 患儿,其中轻度 HPA 患儿 2 例,经典型 PKU 患儿 9 例;由 2 例家系基因结果发现新发变异 c.155T>G。**结论** 该研究综合分析了 HPA 发病率、家系基因变异及荧光法、串联质谱法和基因检测 3 种主要方法联合应用的最新情况,有助于新生儿遗传代谢病筛查质量的提高、HPA 患儿的早期诊治、遗传咨询等。

关键词:高苯丙氨酸血症; 荧光法; 串联质谱法; 基因变异

中图法分类号:R174.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)01-0001-04

Analysis of the combined techniques and family studies of hyperphenylalaninemia*

LI Yuyu, XU Jia, LIU Na, LI Hongyu, WANG Yan, MOU Kai[△]

Department of Medical Genetics, Zibo Maternal and Child Health

Hospital, Zibo, Shandong 255000, China

Abstract: Objective To analyze the results of neonatal hyperphenylalaninemia (HPA) screening in the past three years in a hospital to understand the application of HPA screening technology and family gene mutations in this region, which can further improve the ability of screening, diagnosis and treatment, and prenatal diagnosis. **Methods** Fluorescence and tandem mass spectrometry were used to detect the heel blood phenylalanine concentration of 128 997 newborns who were voluntarily screened from January 2018 to December 2020. Those who were screened positive were subjected to blood tandem mass spectrometry, biochemistry, gas chromatography and mass spectrometry, gene and other related tests were used to confirm the diagnosis. **Results** The two methods were effective in detecting 11 children with HPA. 11 of the 128 997 newborns screened were diagnosed with HPA, including 2 children with mild HPA and 9 children with classic PKU. A new mutation c.155T>G was found from the gene results of 2 cases. **Conclusion** This study comprehensively analyzed the latest situation of the HPA incidence, family gene variation and the combined application of the three main methods, including fluorescence, tandem mass spectrometry and gene detection, which will help improve the quality of new screening, early diagnosis and treatment of children with HPA, genetic counseling and so on.

Key words: hyperphenylalaninemia; fluorescence method; tandem mass spectrometry; gene mutation

高苯丙氨酸血症(HPA)是一种常染色体隐性单基因遗传病,主要分为两类:一类是由于苯丙氨酸羟化酶(PAH)缺乏导致的苯丙酮尿症(PKU)和轻度 HPA,其中 PKU 最为常见;另一类是由于 PAH 的辅酶四氢生物蝶呤缺乏导致的四氢生物蝶呤缺乏症^[1-3]。上述酶的缺陷会导致血液苯丙氨酸(Phe)代

谢障碍和旁路毒性代谢产物积累,进而引发智力障碍、发育迟缓、运动失调、黑色素缺乏、癫痫等不同程度且不可逆损伤^[4-5]。HPA 患儿早期多无明显的临床症状,不同的疾病类型其诊断和治疗方法也不同。因此,不同 HPA 检测方法的联合应用有利于对疾病进行鉴别诊断和对症治疗。我国北方尤其是西北地

* 基金项目:科技部国家重点研发计划项目(2018YFC0114703)。

作者简介:李雨雨,女,主管技师,主要从事生化分子与遗传代谢病研究。 [△] 通信作者, E-mail:mk214@163.com。

本文引用格式:李雨雨,许佳,刘娜,等.高苯丙氨酸血症检测技术联合应用及家系基因研究[J].检验医学与临床,2022,19(1):1-4.

区 HPA 发病率普遍高于南方,具有人群和地域差异性^[5-6]。大多数 HPA 患儿是由于 PAH 基因突变所致,种类繁多,区域分布不同。本研究通过对本院近 3 年新生儿足跟血 Phe 筛查情况进行回顾性分析,了解本地区 HPA 主要检测技术的联合应用、发病率及患儿家系基因变异等最新情况,为新生儿遗传代谢病筛查质量的提高、产前诊断、扩充基因突变谱及遗传咨询等提供参考依据。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 1 月至 2020 年 12 月在本院进行 HPA 筛查的 128 997 例新生儿作为研究对象,新生儿家属均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 按照《新生儿遗传代谢病筛查技术规范》要求,新生儿出生 2~7 d 并充分哺乳,最迟不超过出生后 20 d,采集足跟血滴于专用滤纸片上。血斑要求至少 3 个且直径均大于 8 mm,自然渗透无污染。血斑晾干后于 2~8 °C 冷藏,及时递送至淄博市医学遗传科新生儿疾病筛查中心。

1.2.2 检测方法 荧光法:采用美国 Perkin Elmer (PE)公司的全自动 P9 打孔仪,打取直径 3.2 mm 干血片于 96 孔 U 型板中,将 PE 公司的 Phe 测定试剂和样品微孔板装载入全自动免疫荧光分析仪(GSP)进行检测。串联质谱法:采用美国 Waters-TQ Detector 串联质谱仪、Waters 2777c 自动进样器、Waters 1525 高效液相色谱泵,PE 公司的非衍生化多种氨基酸、肉碱和琥珀酰丙酮测定试剂盒进行检测。打取 3.2 mm 干血片于 96 孔 U 型板中,每孔加入 100 μ L 含氨基酸、肉碱和琥珀酰丙酮内标的萃取液,贴上封口膜。然后,45 °C 恒温振荡孵育 45 min,吸取 75 μ L 至 96 孔 V 型板中,铝箔纸覆盖,琥珀酰丙酮衍生 2 h 后上机检测。基因检测:应用基因捕获配合高通量测序分析技术进行 PAH 基因检测,Sanger 测序进行结果验证。

1.3 结果判断 初筛阳性标本立即召回复查,复查结果仍为阳性者通过血串联质谱、尿气相-色谱质谱、

尿蝶呤谱、红细胞二氢蝶啶还原酶测定、下一代测序技术(NGS)等相关检测进行诊断,一旦确诊为 HPA 患儿,由本院专家负责建档案统一管理,并进行治疗与随访。除四氢生物蝶呤缺乏症,按照血 Phe 浓度可分为经典型 PKU(Phe $\geq$ 1 200 μ mol/L)、中度 PKU(360~<1 200 μ mol/L)、轻度 HPA(120~<360 μ mol/L)。

1.4 质量控制 室内质量控制:每板均做低、高质控品进行质量监测,结果均在允许误差范围内发放报告。室间质评,本科室每年都会参加国家卫生健康委临床检验中心和美国疾病控制与预防中心的室间质量评价,成绩均合格。

2 结果

2.1 荧光法和串联质谱法在 HPA 检测中的应用 本科室利用 GSP 荧光法共检测 128 997 例新生儿足跟血 Phe 浓度,其中 79 732 例同时利用串联质谱法检测 Phe 浓度、Phe/酪氨酸(Tyr)比值和其他 10 种氨基酸及 31 种肉碱水平。两种检测方法均能有效检出 11 例确诊 HPA 患儿,均可用于新生儿 HPA 的筛查。2019 年下半年,由于 PE 公司 GSP-Phe 试剂盒生产工艺改变导致初筛阳性率明显降低,综合 99.00%百分位数 1.75 和 2018 年度初筛阳性率 1.10%,将 GSP-Phe 项目切值由 2.00 mg/dL 重设定为 1.70 mg/dL,2020 年初筛阳性率为 1.22%。见表 1、2。

2.2 2018—2020 年新生儿 HPA 筛查结果分析 鲁中地区近 3 年接受 HPA 筛查的 128 997 例新生儿,初次筛查可疑阳性数为 1 212 例,召回 1 135 例,召回率为 93.65%。HPA 最终确诊 11 例,其中 PKU 9 例,轻度 HPA 2 例,无四氢生物蝶呤。见表 2。

表 1 2018—2020 年 Phe 浓度百分位数(mg/dL)

百分位数	2018 年	2019 年 1—8 月	2019 年 9—12 月	2020 年
50.00%	1.09	1.01	0.91	0.74
99.00%	1.94	1.89	1.75	1.74
99.20%	2.01	1.93	1.80	1.79

表 2 2018—2020 年新生儿 HPA 筛查情况

年份(年)	筛查人数(n)	可疑阳性数(n)	初筛阳性率(%)	召回数(n)	召回率(%)	召回确诊数(n)	最终确诊数(n)
2018	46 435	512	1.10	470	91.80	48	2
2019	47 873	277	0.58	261	94.22	20	5
2020	34 689	423	1.22	404	95.51	28	4
合计	128 997	1 212	0.94	1 135	93.65	96	11

2.3 HPA 患儿基因家系验证结果分析 11 例 HPA 确诊患儿中有 2 例进行了高通量测序和 Sanger 测序

变异位点的家系验证。先证者 1 PAH 基因检测出 3 个杂合变异,根据家系验证结果表明,明确致病变异

c. 842+2T>A 和意义未明变异 c. 158G>A 均遗传自父亲;意义未明变异 c. 155T>G 遗传自母亲。其父亲、母亲、姐姐表型均正常,表明 c. 155T>G 基因突变可能具有致病性,与 c. 842+2T>A 致病变异组成 PAH 基因复合杂合突变,影响 PAH 基因功能,进而导致先证者 1 表现 PKU。见表 3。先证者 2 PAH

基因检测出两个杂合致病变异,致病变异 c. 728G>A 来源于其父亲,致病变异 c. 740G>T 来源于其母亲。其父亲、母亲表型均正常,先证者 2 来源于父母双方的两个致病变异组成 PAH 基因复合杂合突变,进而表现出 PKU。见表 4。

表 3 先证者 1 PAH 基因变异验证结果

人员	变异位点	氨基酸改变	变异类型	ACMG 致病等级	变异来源	临床表型
先证者 1	c. 842+2T>A	—	杂合变异	致病变异	父源	PKU 确诊患者
	c. 158G>A	p. R53H	杂合变异	临床意义未明变异	父源	
	c. 155T>G	p. L52W	杂合变异	临床意义未明变异	母源	
父亲	c. 842+2T>A	—	杂合变异	致病变异	—	正常
	c. 158G>A	p. R53H	杂合变异	临床意义未明变异	—	
	c. 155T>G	p. L52W	未检出	—	—	
母亲	c. 842+2T>A	—	未检出	—	—	正常
	c. 158G>A	p. R53H	未检出	—	—	
	c. 155T>G	p. L52W	杂合变异	临床意义未明变异	—	
姐姐	c. 842+2T>A	—	未检出	—	—	正常
	c. 158G>A	p. R53H	未检出	—	—	
	c. 155T>G	p. L52W	杂合变异	临床意义未明变异	母源	

注:—表示无数据。

表 4 先证者 2 PAH 基因变异验证结果

人员	变异位点	氨基酸改变	变异类型	ACMG 致病等级	变异来源	临床表型
先证者 2	c. 728G>A	p. R243Q	杂合变异	致病变异	父源	PKU 确诊患者
	c. 740G>T	p. G247V	杂合变异	致病变异	母源	
父亲	c. 728G>A	p. R243Q	杂合变异	致病变异	—	正常
	c. 740G>T	p. G247V	未检出	—	—	
母亲	c. 728G>A	p. R243Q	未检出	—	—	正常
	c. 740G>T	p. G247V	杂合变异	致病变异	—	

注:—表示无数据。

3 讨 论

HPA 是一种常见的常染色体隐性遗传代谢病,可通过检测新生儿足跟血 Phe 浓度达到早筛查、早诊断、早治疗,避免神经系统等不可逆损伤。常采用的 HPA 检测方法有荧光法、串联质谱法、基因测序等,通过不同检测方法的联合应用,使得 HPA 疾病研究更为透彻深入,更有利于疾病的早期诊断。不同国家和地区 HPA 发病率不同,具有明显的人群和地域差异性,了解 HPA 发病率和分子流行病学特征可为本地区 HPA 诊断、治疗提供参考依据^[7-9]。在 HPA 中 PKU 发病率较高,轻度 HPA 较少,PAH 基因复合杂合变异或纯合变异是 PKU 重要的致病因素,其中 76%PKU 患者具有 PAH 基因复合杂合变异,纯和变异较少^[10]。目前,国内外数据库收录的 PAH 基因变

异达 1 000 多种,但其基因型与表型相关性也较为复杂,尚需继续进行该临床数据和功能机制的收集与研究^[11-12]。

本研究采用荧光法、串联质谱法检测新生儿足跟血 Phe 浓度来进行 HPA 筛查。不同 HPA 检测方法因仪器、实验原理、试剂工艺和厂家等不同,具有不同的参考范围。因此,不同地区、不同实验室应建立并适时调整符合自身的切值范围,避免 HPA 患儿的漏筛和假阳性率过高等^[13]。2019 年下半年,本研究发现因 GSP-Phe 试剂盒生产工艺改变,初筛阳性率明显降低。综合分析后将切值由 2.00 mg/dL 重设定为 1.70 mg/dL,同时利用串联质谱法检测近期 Phe 浓度处于临界范围的标本,未发现患儿漏筛。本地区近 3 年 HPA 确诊患儿 11 例,发病率与文献^[3,14]结果

基本一致,高于文献[15]的结果。其中 2 例 PKU 患儿通过基因检测和家系验证结果发现:PAH 基因变异为复合杂合变异;PAH 致病变异 c. 842+2T>A, c. 728G>A, c. 740G>T 和意义未明变异 c. 158G>A 在中国比较常见^[16];PAH c. 155T>G 变异为新发变异,文献鲜少报道。家系验证结果表明 PAH c. 155T>G 很可能具有致病性,这对于生化表型不明显患者、疾病鉴别诊断、再生育的遗传咨询等具有重要意义,有利于丰富 PKU 基因型和表型相关性数据库。本研究不足之处在于家系分析标本较少,应加大 HPA 确诊患儿家系验证标本量,明确致病基因变异,提高遗传咨询、出生缺陷防控能力。

随着分子检测技术的发展,NGS 在新生儿遗传代谢病中的应用越来越广泛,对于生化检测和串联质谱不能明确分型、不能筛查的疾病更具优势^[17]。但是,NGS 中的靶基因测序和全外显子测序可检出大量基因突变位点,报告解读需结合生化和串联质谱等检测结果,综合分析基因型和表型相关性。尤其对于致病突变不明确的,通过基因检测其家系基因变异情况,更有利于疾病的追根溯源,实现早诊断、早治疗。

本项目创新之处在于探讨了 HPA 检测技术的联合应用及其存在的相关问题,以及家系基因的发现和新发变异 PAH c. 155T>G 为致病变异。目前,有研究报道中国人群中有 100 多种 PAH 基因变异,但未发现此类型变异^[18-19]。通过不断累积 PAH 新发变异,可进一步扩充 PAH 基因变异及致病性的数据量,有助于分子诊断报告的解读。

综上所述,本研究系统分析了近 3 年 HPA 筛查应用情况,荧光法、串联质谱法、分子检测相结合将是本地区新生儿 HPA 筛查的有效策略。综合分析 HPA 发病率、家系基因验证等最近相关数据,可进一步为新生儿遗传代谢病筛查、诊治和遗传咨询等提供相关参考依据。

参考文献

- [1] WANG R, SHEN N, YE J, et al. Mutation spectrum of hyperphenylalaninemia candidate genes and the genotype-phenotype correlation in the Chinese population[J]. Clin Chim Acta, 2018, 481(1): 132-138.
- [2] LICHTER-KONECKI U, VOCKLEY J. Phenylketonuria: current treatments and future developments[J]. Drugs, 2019, 79(5): 495-500.
- [3] 黄尚志, 宋昉. 苯丙酮尿症的临床实践指南[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020(3): 226-234.
- [4] SHINTAKU H, OHURA T, TAKAYANAGI M, et al.

Guide for diagnosis and treatment of hyperphenylalaninemia[J]. Pediatr Int, 2021, 63(1): 8-12.

- [5] PLANA J C. Early diagnosis of phenylketonuria: pathophysiology of the neuronal damage and therapeutic options[J]. Medicina (B Aires), 2019, 79(3): 2-5.
- [6] 杨艳玲, 叶军. 高苯丙氨酸血症的诊治共识[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(6): 420-425.
- [7] SU Y, WANG H, REJIAFU N, et al. The molecular epidemiology of hyperphenylalaninemia in Uygur population: incidence from newborn screening and mutational spectra[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(12): 258-261.
- [8] 严庆庆, 汪晓莺, 徐爱萍, 等. 南通地区新生儿高苯丙氨酸血症研究结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(4): 474-476.
- [9] 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.
- [10] BLAU N. Genetics of phenylketonuria: then and now[J]. Hum Mutat, 2016, 37(6): 508-515.
- [11] 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.
- [12] RAJABI F, ROHR F, WESSEL A, et al. Phenylalanine hydroxylase genotype-phenotype associations in the United States: a single center study[J]. Mol Genet Metab, 2019, 128(4): 415-421.
- [13] 贾晨路, 赵德华, 吕书博, 等. GSP 分析仪检测新生儿苯丙氨酸参考限的建立[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(8): 1314-1316.
- [14] 张延娜, 梁思颖, 陆薇冰, 等. 青岛地区 29 万例新生儿苯丙酮尿症筛查结果及患者 PAH 基因突变研究分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(6): 97-99.
- [15] WANG X, HE Y, JIANG Y, et al. Screening and mutation analysis of hyperphenylalaninemia in newborns from Xiamen[J]. Clin Chim Acta, 2019, 498(1): 161-166.
- [16] LIU N, HUANG Q, LI Q, et al. Spectrum of PAH gene variants among a population of Han Chinese patients with phenylketonuria from northern China[J]. BMC Med Genet, 2017, 18(1): 108-111.
- [17] 应艳琴, 罗小平. 新生儿遗传代谢病筛查与基因诊断的现状与展望[J]. 中华围产医学杂志, 2021, 24(2): 85-88.
- [18] 周伟, 李惠中, 杨丽, 等. 徐州地区苯丙酮尿症筛查及致病基因谱特征研究[J]. 中华新生儿科杂志, 2021, 36(2): 16-21.
- [19] 徐龙芳, 李木祺, 汪玉锋, 等. 菏泽市苯丙酮尿症患儿苯丙氨酸羟化酶基因突变特点[J]. 中国儿童保健杂志, 2021, 29(4): 381-384.