

# 苯丙氨酸羟化酶基因c. 158G>A(p. Arg53His)突变患儿随访及突变位点功能评估

王杰<sup>1,2</sup>, 朱博<sup>1</sup>, 张丽春<sup>1</sup>, 赵一桐<sup>3</sup>, 王晓华<sup>1</sup>, 贾跃旗<sup>1</sup>

1. 内蒙古自治区妇幼保健院遗传优生科, 内蒙古 呼和浩特 010020
2. 内蒙古大学省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021
3. 四川省妇幼保健院医学遗传与产前诊断科, 四川 成都 610041

**[摘要]** **目的:**评价苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因c. 158G>A(p. Arg53His)突变的临床意义。**方法:**持续监测2例携带PAH基因p. Arg53His突变的疑似高苯丙氨酸血症患儿血液中苯丙氨酸(Phe)浓度,分析患儿的临床生化特征,应用T-Coffee系统分析PAH蛋白的跨种属保守性,应用Swiss-Model对正常结构及变异结构的PAH进行蛋白质三维结构建模及比对分析突变所致蛋白质空间结构的改变。检索现有数据库及文献统计p. Arg53His突变的人群携带率,应用等位基因表型值(APV)与基因型表型值(GPV)预测系统对该突变相关表型进行预测。**结果:**2例新生儿在PAH基因上分别检出两个突变:c. 611A>G(p. Tyr204Cys)、c. 158G>A(p. Arg53His)和c. 1238G>C(p. Arg413Pro)、c. 158G>A(p. Arg53His)。2例新生儿能耐受正常饮食,在随访期间血Phe水平在正常范围内。例2的母亲为p. Arg53His纯合突变,长期未进行低蛋白质、低Phe饮食干预,血Phe浓度、Phe/酪氨酸比值均在正常范围。突变的氨基酸在13个不同物种间并非高度保守。三维结构建模结果显示,p. Arg53His突变使得PAH第53位和第49位氨基酸之间的氢键由2个减少为1个,降低了二聚体的稳定性。p. Arg53His在高苯丙氨酸血症患者中的等位基因频率为0.015 08,在健康人群中的等位基因频率为0.001 621,其中东亚人群中的携带率最高,为0.013 73。APV与GPV系统预测结果显示,该突变与轻度高苯丙氨酸血症型别相关。**结论:**PAH基因p. Arg53His突变与不同突变组合为复合杂合状态可引起临床表型差异。p. Arg53His突变引起体内酶活性的降低不足以出现苯丙酮尿症临床症状,分类为“可能良性”。



**[关键词]** 高苯丙氨酸血症;苯丙氨酸羟化酶缺乏症;p. Arg53His突变;表型;苯丙氨酸;随访研究

收稿日期:2021-05-03 接受日期:2021-06-15

基金项目:国家自然科学基金(81860168)

第一作者:王杰,主管技师,主要从事遗传病分子诊断工作;E-mail:wangjie8867@163.com;https://orcid.org/0000-0001-5010-2521

通信作者:王晓华,主任医师,硕士生导师,主要从事分子遗传学产前诊断工作;E-mail:wangxiaohua2222@163.com;https://orcid.org/0000-0002-6713-5547. 贾跃旗,主任医师,硕士生导师,主要从事出生缺陷预防工作;E-mail:jyq721027@163.com;https://orcid.org/0000-0002-4761-2878

[ 中图分类号 ] R722. 1;R596 [ 文献标志码 ] A

## Follow-up of two newborns with c. 158G>A (p. Arg53His) mutation in *PAH* gene and assessment of the site function

WANG Jie<sup>1,2</sup>, ZHU Bo<sup>1</sup>, ZHANG Lichun<sup>1</sup>, ZHAO Yitong<sup>3</sup>, WANG Xiaohua<sup>1</sup>, JIA Yueqi<sup>1</sup>

(1. Genetic Eugenic Department of Inner Mongolia Maternity and Child Health Care Hospital, Hohhot 010020, China; 2. State Key Laboratory of Reproductive Regulation & Breeding of Grass Land Livestock, College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; 3. Medical Genetics and Prenatal Diagnosis of Sichuan Provincial Maternity and Child Health Care Hospital, Chengdu 610041, China)

Corresponding author: WANG Xiaohua, E-mail: wangxiaohua2222@163.com, <https://orcid.org/0000-0002-6713-5547>; JIA Yueqi, E-mail: [jyq721027@163.com](mailto:jyq721027@163.com), <https://orcid.org/0000-0002-4761-2878>

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the clinical significance of *PAH* c.158G>A (p.Arg53His) mutation. **Methods:** The blood phenylalanine (Phe) was continuously monitored in 2 unrelated newborns with suspected hyperphenylalaninemia (HPA) carrying *PAH* c.158G>A mutation. The cross-species conservation of the mutant amino acid was analyzed using T-Coffee. Swiss-Model software was used to construct a 3D protein structure and the impact of candidate mutations on the secondary structure of the protein product was analyzed. The population carrying rate of the p.Arg53His mutation was analyzed by literature searching. Allelic phenotype values (APV) and genotypic phenotype values (GPV) were used to predict the phenotype associated with the mutation. **Results:** Two mutations of *PAH* gene were detected in each newborn: c.611A>G(p.Tyr204Cys), c.158G>A(p.Arg53His) and c.1238G>C(p.Arg413Pro), c.158G>A(p.Arg53His). Two children tolerated normal diet and plasma Phe levels were within the normal range during follow-up. The mother of case 2 was homozygous with p.Arg53His mutation under the condition of long-term normal diet, and the blood Phe concentration and Phe/Tyr were all within the normal range. The mutant amino acids were not highly conserved among the 13 different species. The 3D structural model showed that p.Arg53His mutation reduced the hydrogen bond from 2 to 1 between the 53rd and 49th amino acids of *PAH*. The allele frequency of p.Arg53His was 0.015 08 in HPA patients and 0.001 621 in normal population, while the prevalence of p.Arg53His allele was highest in the East Asian normal population (0.013 73). The APV and GPV system predicted that the mutation was related to mild HPA(MHP) type. **Conclusion:** The different compound heterozygous mutations of p.Arg53His lead to clinical phenotype varieties. The reduction of enzyme activity caused by the mutation of p.Arg53His is not sufficient to cause symptoms of phenylketonuria, so the mutation may be “likely benign”.

[ **Key words** ] Hyperphenylalaninemia; Phenylalanine hydroxylase deficiency; p. Arg53His mutation; Phenotype; Phenylalanine; Follow-up studies

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(4): 444-453.]

[ 缩略语 ] 苯丙氨酸(phenylalanine, Phe);酪氨酸(tyrosine, Tyr);苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH);四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4);苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU);经典型苯丙酮尿症(classic phenylketonuria, cPKU);轻型苯丙酮尿症(mild phenylketonuria, mPKU);轻度高苯丙氨酸血症(mild hyperphenylalaninemia, MHP);美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG);等位基因表型值(allelic phenotype values, APV);基因型表型值(genotypic phenotype values, GPV)

高苯丙氨酸血症是一种常见的氨基酸代谢缺陷疾病,主要表现为血Phe浓度超过 $120\ \mu\text{mol/L}$  ( $2\ \text{mg/dL}$ )及血Phe浓度与Tyr浓度比值超过2.0。临床上,高苯丙氨酸血症分为PAH缺乏症和BH4缺乏症两大类。其中,PAH缺乏症是高苯丙氨酸血症的常见形式,约占所有高苯丙氨酸血症病例的98%<sup>[1]</sup>,该病由PAH基因突变引起,呈常染色体隐性遗传。PAH蛋白以BH4为辅因子,在铁离子催化下将Phe羟化成Tyr,同时将BH4氧化成 $4\alpha$ -羟基-BH4。PAH基因位于12号染色体长臂(12q22~q24.1)区域,包括13个外显子和12个内含子,基因突变种类众多,BIOPKU数据库中已报道的1280多个致病突变主要集中在外显子上。PAH基因突变导致无PAH产物或氨基酸替换影响蛋白质折叠、寡聚化,导致蛋白质不稳定而使蛋白质加速降解或聚集,酶活性丧失或显著下降,影响Phe的正常代谢<sup>[2]</sup>。PAH基因突变分布不均衡,每种突变在不同地区和民族发生率存在很大差异。

根据血Phe值,PAH缺乏症可分为cPKU、mPKU和MHP。研究发现,PAH缺乏症临床表型与PAH基因突变谱之间存在相关性,携带两个PAH致病突变的复合杂合子患者中,对酶活性影响较轻的突变通常决定临床表型的严重程度<sup>[3]</sup>。PAH基因c.158G>A(p.Arg53His)突变最早在韩国1例cPKU患者中报道<sup>[4]</sup>,但后续其他病例和研究不支持这种基因型-表型相关性<sup>[5-15]</sup>。目前,国内外学者对于p.Arg53His突变的临床意义尚无统一意见。与西方人群相比,该突变在东亚人群中发生频率偏高,健康人群中亦发现该突变纯合子的存在<sup>[5]</sup>。本研究拟对2例携带p.Arg53His突变的疑似高苯丙氨酸血症患儿进行跟踪随访,根据临床和生化检查结果,对p.Arg53His突变的临床意义进行评估。同时,检索现有数据库及文献统计p.Arg53His突变的人群携带率,对比携带该突变

基因患者的生化表型,进一步明确该基因突变与表型的相关性。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

2019年1月至2021年3月在内蒙古自治区妇幼保健院经新生儿疾病筛查提示Phe浓度超过 $120\ \mu\text{mol/L}$  ( $2\ \text{mg/dL}$ )或经基因靶向捕获测序法新生儿基因检测/全外显子组测序提示携带2个PAH基因突变的疑似患儿及其父母。标本采集遵循知情同意原则,研究经内蒙古自治区妇幼保健院伦理委员会批准(2019-008-1)。

### 1.2 仪器与试剂

全自动时间分辨荧光免疫分析仪Wallac AutoDELFIA<sup>®</sup> 1235 Automatic Immunoassay System为芬兰PerkinElmer公司产品;MGISEQ-2000测序平台为深圳华大智造科技有限公司产品;Nova6000高通量测序系统为美国Illumina公司产品;API 3200MD三重四极杆质谱仪为美国Applied Biosystems产品。

新生儿Phe试剂盒、非衍生化多种氨基酸、肉碱和琥珀酰丙酮测定试剂盒(串联质谱法)均为芬兰PerkinElmer公司产品;全外显子组测序试剂盒为武汉华大基因科技有限公司产品;血液基因组柱式小量提取试剂盒为德国Qiagen公司产品。

### 1.3 新生儿外周血生化检测

**1.3.1 荧光定量法检测外周血Phe浓度** 按照《新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)》<sup>[16]</sup>及实验室标准化操作规程测定干血斑标本中Phe浓度,浓度值大于本实验室新生儿疾病筛查Phe浓度切值 $108\ \mu\text{mol/L}$  ( $1.8\ \text{mg/dL}$ )召回复查,Phe浓度 $120\ \mu\text{mol/L}$  ( $2\ \text{mg/dL}$ )及以上为筛查阳性。

**1.3.2 串联质谱法检测外周血Phe和Tyr浓度** 按照串联质谱法操作说明测定干血斑标本中的Phe和Tyr浓度,并计算两者比值。当Phe浓度

为120  $\mu\text{mol/L}$ (2 mg/dL)及以上时,Phe/Tyr比值大于2.0为检测阳性。

#### 1.4 候选基因筛选及致病性分析

将标本送检至北京迈基诺医学检验所或使用实验室MGISEQ-2000测序平台,分别经基因靶向捕获测序法新生儿基因检测或全外显子组测序完成基因分析。测序数据经过质量控制,去除低质量的读长,然后根据测序质量、变异质量对检测到的单核苷酸多态性、插入缺失进行过滤和筛选,检索dbSNP数据库、千人基因组(1000 Genomes)数据库和基因组突变频率数据库(gnomAD)中健康人群携带的常见突变,得到高质量可靠突变。参考ACMG联合分子病理协会在2015年提出的“序列变异解读标准和指南”<sup>[17]</sup>对突变位点的致病性进行判读。

#### 1.5 p. Arg53His突变功能评估

**1.5.1 蛋白质功能分析** 应用T-Coffee系统(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>)分析比较p. Arg53His在物种间氨基酸序列的保守性;应用Swiss-Model(<https://swissmodel.expasy.org/>)和Swiss-PdbViewer(<https://spdbv.vital-it.ch/>)软件模拟分析p. Arg53His错义突变对其空间变化和氨基酸相互作用的影响。

**1.5.2 共分离分析** 针对可疑致病基因突变,使用Primer5软件设计引物,对患儿及其父母的目标序列进行桑格-库森法验证,并进行共分离分析。

**1.5.3 基因型与表型预测分析** p. Arg53His突变在BIOPKU数据库中体外PAH残留酶活性为79%(>5%)确认为非0等位基因<sup>[18-20]</sup>。统计文献中携带该突变患儿的不同表型的百分比,计算p. Arg53His的APV值,  $APV = (\%cPKU \times 10 + \%mPKU \times 5 + \%MHP \times 1) / 100$ 。基于中国PKU人群数据优化的PAH缺乏症线性APV和GPV预测系统  $y = 274.795 \times e^{0.195x} (R^2 = 0.823)$ <sup>[18,21]</sup>, 预测

p. Arg53His突变相关的Phe浓度。其中,x为目标突变的APV,y为预测突变的平均Phe水平。参照《苯丙酮尿症的临床实践指南》,根据血Phe浓度判断p. Arg53His突变相关的表型<sup>[2]</sup>。

#### 1.6 统计学方法

采用Excel 2010软件进行统计学分析。正态分布的计量数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结果

### 2.1 p. Arg53His突变患儿临床生化特征

例1出生72 h后足跟血荧光定量法Phe浓度测定未显示明显异常,后经基因靶向捕获测序法基因检测发现PAH基因上存在两个突变,分别为NM\_000277.1c. 611A>G(p. Tyr204Cys)和c. 158G>A(p. Arg53His)。根据ACMG指南,p. Tyr204Cys判定为致病突变(PS3+PM3\_Strong+PM2+PM1+PP4),p. Arg53His判定为临床意义不明突变(PM3\_Very\_strong+PP4\_Moderate+BS1+BS2)。BIOPKU数据库中携带有p. Tyr204Cys、p. Arg53His突变的8例患者临床诊断均为MHP,且均为亚洲人群,其中东亚人群6例、南亚人群2例。例1检出的两个突变分别遗传自父亲和母亲,构成复合杂合状态,父母双方表型正常,且无家族史。例1未进行低蛋白质、低Phe饮食干预(10个月),随访期间内间隔2个月持续监测血液Phe浓度均未提示异常(表1)。同时对高苯丙氨酸血症其他相关基因(PTS、GCHI、QDPR、PCBD1、DNAJC12等)进行分析,未检出其他致病突变和疑似致病突变。

例2新生儿疾病筛查提示血液Phe浓度为122.4  $\mu\text{mol/L}$ ,复查Phe浓度为120  $\mu\text{mol/L}$ 。全外显子组测序在PAH基因上检出两个突变,分别为NM\_000277.1:c. 1238G>C(p. Arg413Pro)和c. 158G>A(p. Arg53His)。根据ACMG指南,

表1 p. Arg53His(p. R53H)突变携带者的特征及随访期间的血Phe水平

Table 1 Characteristics of p. Arg53His (p. R53H) mutation carriers and their plasma phenylalanine levels during follow up

序号	性别	随访时间(月)	互补DNA改变	氨基酸改变	初筛时Phe浓度( $\mu\text{mol/L}$ )	Phe/Tyr比值	随访期间平均Phe浓度( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )	临床表现	干预措施
例1	男	10	c. [158G>A];[611A>G]	p. [R53H];[Y204C]	94.8	1.47	88 $\pm$ 19	无	无
例2	男	12	c. [158G>A];[1238G>C]	p. [R53H];[R413P]	122.4	1.70	110 $\pm$ 20	无	无
例2母亲	女	—	c. [158G>A];[158G>A]	p. [R53H];[R53H]	69.6	1.56	—	无	无

“—”:无相关数据。Phe:苯丙氨酸;Tyr:酪氨酸。



p. Arg413Pro突变被判定为致病突变(PS3+PM2+PM3\_very strong+PP4)。BIOPKU数据库中收录携带有p. Arg413Pro和p. Arg53His突变的20例患者中,5%的患者临床诊断为mPKU,95%诊断为MHP,已检出突变均集中在东亚人群。例2检出的两个突变分别遗传自父亲和母亲,构成复合杂合突变。且例2的母亲为p. Arg53His纯合突变,血Phe浓度、Phe/Tyr比值未见异常。例2未进行低蛋白质、低Phe饮食干预12个月,随访期间间隔4个月后再次监测血Phe浓度未见异常,与例1的结果保持一致。同时对高苯丙氨酸血症其他相关基因(*PTS*、*GCHI*、*QDPR*、*PCBD1*、*DNAJC12*等)进行分析,未检出其他致病突变和疑似致病突变。

临床随访结果提示,携带p. Arg53His突变的2例患儿及其亲属的Phe代谢均正常。

### 2.2 p. Arg53His突变蛋白质结构分析

p. Arg53His突变导致其编码的PAH第53位精氨酸替换成组氨酸,氨基酸残基的保守性分析表明,突变的氨基酸在13个不同物种间并非高度保守(图1)。通过Swiss-Model软件对其编码的PAH建模,与野生型PAH三维结构比对分析发现,p. Arg53His突变导致PAH第53位与第49位氨基酸之间的氢键由2个减少至1个(图2)。结果提示,p. Arg53His突变减弱了二聚体的稳定性。

### 2.3 p. Arg53His突变在不同人群中的等位基因频率

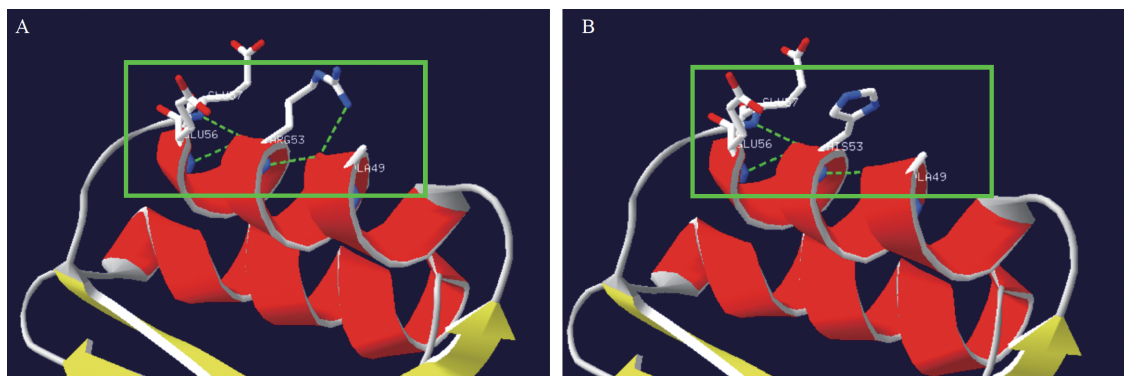
p. Arg53His在高苯丙氨酸血症患者中的等位基因频率为0.015 08(表2),在健康人群中的等位基因频率为0.001 621,其中东亚人群中的携带率最高,为0.013 73(表3),提示东亚健康人群中



红色箭头指示苯丙氨酸羟化酶(PAH)第53号氨基酸位置。

图1 不同物种PAH基因p. Arg53His位点氨基酸进化保守性分析结果

Figure 1 Cross-species conservation of the p. Arg53His mutation



A:野生型苯丙氨酸羟化酶(PAH)53位精氨酸区域蛋白质结构图;B:p. Arg53His突变PAH的结构预测图.绿色方框标示氨基酸之间氢键改变。

图2 PAH野生型和p. Arg53His突变的三维结构预测示意图

Figure 2 3D structure prediction of PAH wild-type and p. Arg53His mutation

p. Arg53His突变相对高频携带。

#### 2.4 p. Arg53His的基因型-表型预测分析

已报道携带有p. Arg53His突变的患儿共43例(表4、表5)<sup>[4-15,26]</sup>,其中cPKU 6例(14.0%)、mPKU 12例(27.9%)、MHP 25例(58.1%),计算得到APV=0.03376。使用基因型和表型拟合公式,预测p. Arg53His突变的平均Phe浓度为0.276 mmol/L,

根据临床诊断,该突变与MHP相关。

基于携带有p. Arg53His突变且明确为复合杂合状态的患儿数据(表4)<sup>[5-7,12-14]</sup>,其中cPKU 3例(12.0%)、mPKU 8例(32.0%)、MHP 14例(56.0%),得APV=0.0336,预测p. Arg53His突变的平均Phe浓度为0.276 mmol/L,根据临床诊断,该突变与MHP相关。

表2 p. Arg53His (p. R53H)突变在高苯丙氨酸血症患者中的等位基因频率

Table 2 Allele frequency of the p. Arg53His (p. R53H) mutation in patients with hyperphenylalaninemia

人种/群	受试者数	等位基因数	p. R53H等位基因数	等位基因频率
韩国 <sup>[22]</sup>	79	158	2	0.0127
日本 <sup>[6]</sup>	203	406	9	0.0222
中国 <sup>[7]</sup>	165	330	8	0.0242
中国 <sup>[22]</sup>	796	1592	40	0.0251
中国北方 <sup>[23]</sup>	185	370	9	0.0243
中国北方 <sup>[22]</sup>	557	1114	33	0.0296
中国南方 <sup>[22]</sup>	239	478	7	0.0146
中国汉族 <sup>[8]</sup>	338	676	3	0.0044
中国北方汉族 <sup>[24]</sup>	285	570	10	0.0175
中国南方汉族 <sup>[24]</sup>	112	224	0	0.0000
中国台湾 <sup>[25]</sup>	71	142	3	0.0211
斯洛伐克 <sup>[9]</sup>	207	414	1	0.0024
以色列(犹太人和阿拉伯人) <sup>[10]</sup>	180	360	2	0.0056
意大利 <sup>[11]</sup>	107	214	1	0.0047
法国 <sup>[26]</sup>	364	728	1	0.0014
德国 <sup>[27]</sup>	226	452	1	0.0022
中国维吾尔族 <sup>[12]</sup>	111	222	12	0.0541
伊朗 <sup>[28]</sup>	81	162	1	0.0062
中国上海 <sup>[18]</sup>	1020	2040	11	0.00005
中国青岛 <sup>[29]</sup>	44	88	8	0.0009
合计	5370	10740	162	0.01508

表3 p. Arg53His (p. R53H)突变在健康人群中的等位基因频率

Table 3 Allele frequency of the p. Arg53His (p. R53H) mutation in the general population

人种/群	受试者数	等位基因数	p. R53H等位基因数	等位基因频率
东亚*	9976	19952	274	0.01373
南亚*	15306	30612	45	0.001470
拉丁美洲*	17719	35438	33	0.0009312
欧洲(除芬兰人)*	64561	129122	86	0.0006660
非洲*	12483	24966	5	0.0002003
欧洲(芬兰人)*	12551	25102	3	0.0001195
犹太人群*	5184	10368	1	0.00009645
浙江省金华市 <sup>[30]</sup>	742	1484	6	0.004
合计	142134	284268	461	0.001621

\*数据来源于基因组突变频率数据库(截至2021年3月25日)。

**表 4** 文献报道携带p. Arg53His (p. R53H)突变的苯丙氨酸羟化酶缺乏症患者(复合杂合)生化表型一览  
**Table 4** Biochemical phenotypes of patients with phenylalanine hydroxylase deficiency carrying the p. Arg53His (p. R53H) mutation (compound heterozygote)

编号	生化分型	互补DNA改变	氨基酸改变	参考文献
1	cPKU	c. [331C>T];[158G>A;842+2T>A]	p. [R111*];[R53H; <sup>a</sup> ]	[7]
2	cPKU	c. [728G>A];[158G>A;842+2T>A]	p. [R243Q];[R53H; <sup>a</sup> ]	[7]
3	mPKU	c. [650G>A];[158G>A;842+2T>A]	p. [C217Y];[R53H; <sup>a</sup> ]	[7]
4	mPKU	c. [1197G>A];[158G>A;842+2T>A]	p. [V399V];[R53H; <sup>a</sup> ]	[7]
5	cPKU	c. [1197G>A];[158G>A;842+2T>A]	p. [V399V];[R53H; <sup>a</sup> ]	[7]
6	mPKU	c. [158G>A;842+2T>A];[158G>A;842+2T>A]	p. [R53H; <sup>a</sup> ];[R53H; <sup>a</sup> ]	[7]
7	MHP	c. [158G>A];[208_210delTCT]	p. [R53H];[S70del]	[6]
8	MHP	c. [158G>A];[498C>G]	p. [R53H];[T166*]	[5]
9	MHP	c. [158G>A];[721C>T]	p. [R53H];[R241C]	[5]
10	MHP	c. [158G>A];[728G>A]	p. [R53H];[R243Q]	[6]
11	MHP	c. [158G>A];[728G>A]	p. [R53H];[R243Q]	[7]
12	mPKU	c. [158G>A];[728G>A]	p. [R53H];[R243Q]	[13]
13	MHP	c. [158G>A];[755G>A]	p. [R53H];[R252Q]	[6]
14	MHP	c. [158G>A];[975C>G]	p. [R53H];[Y325*]	[5]
15	MHP	c. [158G>A];[1068C>A]	p. [R53H];[Y356*]	[5]
16	MHP	c. [158G>A];[1162G>A]	p. [R53H];[V388M]	[13]
17	MHP	c. [158G>A];[1238G>C]	p. [R53H];[R413P]	[5]
18	mPKU	c. [158G>A;311C>A];[311C>A]	p. [R53H;A104D];[A104D]	[12]
19	mPKU	c. [158G>A];[158G>A]	p. [R53H];[R53H]	[12]
20	mPKU	c. [158G>A;1289T>C];[1289T>C]	p. [R53H;L430P];[L430P]	[12]
21	MHP	c. [158G>A;1262T>C];[158G>A;1262T>C]	p. [R53H;I421T];[R53H;I421T]	[12]
22	mPKU	c. [158G>A];[590T>A]	p. [R53H];[L197*]	[12]
23	MHP	c. [158G>A];[898G>T]	p. [R53H];[A300S]	[12]
24	MHP	c. [158G>A];[728G>A]	p. [R53H];[R243Q]	[12]
25	MHP	c. [158G>A];[749C>T]	p. [R53H];[S250F]	[14]

<sup>a</sup>该突变在基因或蛋白质水平的影响未知。cPKU:经典型苯丙酮尿症;mPKU:轻型苯丙酮尿症;MHP:轻度高苯丙氨酸血症。

以上基因型-表型预测结果提示,p. Arg53His突变仅与MHP相关。

### 3 讨论

高通量测序能识别更多的遗传变异,但同时也给临床诊疗提出了新的挑战。基因型是决定表型的主要因素,PAH缺乏症由于其基因型在不同人群中分布不同,代谢表型也存在较大差异。评估不同突变与表型的相关性对精准治疗至关重要。PAH基因的p. Arg53His突变是临床中重点关注的临床意义不明突变之一。Tao等<sup>[7]</sup>最早在165例中国PKU患者的研究中发现携带p. Arg53His的患者临床分型并不唯一,cPKU、mPKU、MHP三种型别均有发现,临床表型具有差异。

本研究分析了内蒙古自治区妇幼保健院2例携带有p. Arg53His突变新生儿的表型和临床随访资料,并对文献报道中携带该突变的患者表型进行系统的回顾性分析。2例新生儿虽然在PAH基因上均检出复合杂合变异,但血液Phe浓度与Phe/Tyr比值均未达到PAH缺乏症的临床诊断标准,与此前发现携带有该突变的患儿表型不一致。此外2例患儿均能耐受正常膳食摄入的Phe,随访期间血Phe水平正常,与Choi等<sup>[5]</sup>报道的7例携带该突变的患者表型一致。例2的母亲检出p. Arg53His纯合突变,长期(30年)正常饮食下血Phe浓度、Phe/Tyr均在正常范围,未表现出皮肤白皙、毛发和虹膜变浅表型,智力发育、行为均未见明显异常,提示p. Arg53His突变并未对其体内的

表 5 文献报道携带p. Arg53His(p. R53H)突变的苯丙氨酸羟化酶缺乏症患者(合子信息不明)生化表型一览

Table 5 Biochemical phenotypes of patients with phenylalanine hydroxylase deficiency carrying the p. Arg53His (p. R53H) mutation (Zygosity of other mutation phase unknown)

编号	生化分型	互补DNA改变	氨基酸改变	参考文献
26	MHP	c. [158G>A(;);331C>T]	p. [R53H(;);R111*]	[15]
27	MHP	c. [158G>A(;);331C>T]	p. [R53H(;);R111*]	[15]
28	MHP	c. [158G>A(;);521T>A]	p. [R53H(;);I174N]	[15]
29	mPKU	c. [158G>A(;);728G>A]	p. [R53H(;);R243Q]	[8]
30	MHP	c. [158G>A(;);782G>A]	p. [R53H(;);R261Q]	[11]
31	MHP	c. [158G>A(;);842C>T]	p. [R53H(;);P281L]	[15]
32	MHP	c. [158G>A(;);975C>G]	p. [R53H(;);Y325*]	[5]
33	cPKU	c. [158G>A(;);1162G>C]	p. [R53H(;);V388L]	[4]
34	MHP	c. [158G>A(;);1222C>T]	p. [R53H(;);R408W]	[9]
35	cPKU	c. [158G>A(;);1222C>T]	p. [R53H(;);R408W]	[8]
36	mPKU	c. [158G>A(;);842+2T>A]	p. [R53H(;)] <sup>a</sup>	[8]
37	mPKU	c. [158G>A];[?]	p. [R53H(;)] <sup>a</sup>	[26]
38	MHP	c. [158G>A];[?]	p. [R53H(;)] <sup>a</sup>	[10]
39	MHP	c. [158G>A];[?]	p. [R53H(;)] <sup>a</sup>	[10]
40	MHP	c. [158G>A(;);1066-14C>G]	p. [R53H(;)] <sup>a</sup>	[5]
41	mPKU	c. [158G>A(;);1238G>C(;);842+2T>A(;);IVS7+2T>A]	p. [R53H(;);R413P(;)] <sup>a</sup>	[12]
42	cPKU	c. [158G>A(;);308G>A(;);1066-11G>A(;);IVS10-11G>A]	p. [R53H(;);G103D(;)] <sup>a</sup>	[12]
43	MHP	c. [158G>A(;);688G>A(;);842+2T>A(;);IVS7+2T>A]	p. [R53H(;);V230I(;)] <sup>a</sup>	[12]

<sup>a</sup>表示该突变在基因或蛋白质水平的影响未知. cPKU;经典型苯丙酮尿症;mPKU;轻型苯丙酮尿症;MHP;轻度高苯丙氨酸血症.

Phe代谢造成严重影响。

体外功能研究发现,p. Arg53His突变可以使PAH活性降低至野生型水平的79%<sup>[19-20]</sup>。PAH四聚体的复合模型结构显示,p. Arg53His突变位于BH4结合口袋的对侧,非常接近二聚体界面,该错义突变可以将p. 53和p. 49之间的氢键由2个变成1个,降低二聚体的稳定性,但可能并未影响酶的功能。该结果或许可以从蛋白质功能角度阐明携带p. Arg53His突变的患者并未出现临床表现或临床表型较轻的原因。

进一步检索p. Arg53His突变在不同种族之间的等位基因频率,根据最近更新的基因组突变频率数据库,该突变在不同种族之间等位基因频率存在差异,东亚人群最高(约为1.3%),高于PKU在东亚人群中的发病率(约为1/10 000),且在东亚健康对照人群中观察到3例纯合子个体,在犹太人中最低(约为0.009%)<sup>[3]</sup>。

对携带p. Arg53His突变的PAH缺乏症患者的生化表型统计后发现,携带有p. Arg53His突变的患儿中MHP临床表型占比最高。使用优化后的基因型和表型拟合公式,预测得出p. Arg53His突

变与MHP相关。上述结论与BIOPKU数据库中检索c. 158G>A(p. Arg53His)突变相关的表型为MHP一致。但此前已报道携带p. Arg53His突变且明确复合杂合状态的患儿临床表型不一致,除检出14例MHP外,还包括11例cPKU和mPKU,其中8例在p. Arg53His突变顺式位置上同时还检出存在其他致病突变:c. 842+2T(6/8)、c. 311 C>A(1/8)、c. 1289T>C(1/8),推测由于这些其他致病突变的存在使得此类患者表型更为严重<sup>[22]</sup>,即当p. Arg53His突变与其他致病位点构成反式结构,且在p. Arg53His突变的顺式位置无第三个致病性突变,其临床表型更多表现为MHP。

综上所述,根据收集的病例并结合已有报道,证明PAH基因p. Arg53His突变与不同突变组合为复合杂合状态可引起临床表型差异。本文资料中患者均能够耐受正常膳食摄入的Phe,提示p. Arg53His突变导致体内酶活性降低尚不足以出现PKU疾病症状,结合数据库中收录健康人群具有该位点纯合突变,支持该突变最终分类为“可能良性”。随着扩展性新生儿基因检测和孕前携带者筛查的推广,更多无表型纯合突变的检出有



助于提高我们对PAH基因不同突变与表型的相关性的认识,为进一步干预提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] BERCOVICH D, ELIMELECH A, YARDENI T, et al. A mutation analysis of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in the Israeli population[J]. *Ann Hum Genet*, 2008, 72(3): 305-309.
- [2] 中华医学会医学遗传学分会遗传病临床实践指南撰写组, 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, 37(3): 226-234. Writing Group for Practice Guidelines for Diagnosis and Treatment of Genetic Diseases, Medical Genetics Branch of Chinese Medical Association, HUANG Shangzhi, SONG Fang. Clinical practice guidelines for phenylketonuria[J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2020, 37(3): 226-234. (in Chinese)
- [3] REGIER D S, GREENE C L. Phenylalanine hydroxylase deficiency[J/OL]. (2017-01-05)[2021-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1504/>.
- [4] PARK Y S, SEOUNG C S, LEE S W, et al. Identification of three novel mutations in Korean phenylketonuria patients: R53H, N207D, and Y325X[J]. *Hum Mutat*, 1998, 11(S1): S121-S122.
- [5] CHOI R, LEE J, PARK H D, et al. Reassessing the significance of the PAH C.158g>a (P.Arg53His) variant in patients with hyperphenylalaninemia[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2017, 30(11): 1211-1218.
- [6] OKANO Y, KUDO S, NISHI Y, et al. Molecular characterization of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Japan[J]. *J Hum Genet*, 2011, 56(4): 306-312.
- [7] TAO J, LI N, JIA H, et al. Correlation between genotype and the tetrahydrobiopterin-responsive phenotype in Chinese patients with phenylketonuria[J]. *Pediatr Res*, 2015, 78(6): 691-699.
- [8] ZHU T, YE J, HAN L, et al. Variations in genotype-phenotype correlations in phenylalanine hydroxylase deficiency in Chinese Han population[J]. *Gene*, 2013, 529(1): 80-87.
- [9] POLAK E, FICEK A, RADVANSZKY J, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency in the Slovak population: genotype-phenotype correlations and genotype-based predictions of BH4-responsiveness[J]. *Gene*, 2013, 526(2): 347-355.
- [10] BERCOVICH D, ELIMELECH A, ZLOTOGORA J, et al. Genotype-phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene[J]. *J Hum Genet*, 2008, 53(5): 407-418.
- [11] FIORI L, FIEGE B, RIVA E, et al. Incidence of Bh4-responsiveness in phenylalanine-hydroxylase-deficient Italian patients[J]. *Mol Genet Metab*, 2005, 86: 67-74.
- [12] 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.
- [13] LEE D H, KOO S K, LEE K S, et al. The molecular basis of phenylketonuria in Koreans[J]. *J Hum Genet*, 2004, 49(11): 617-621.
- [14] WETTSTEIN S, UNDERHAUG J, PEREZ B, et al. Linking genotypes database with locus-specific database and genotype-phenotype correlation in phenylketonuria[J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23(3): 302-309.
- [15] DATEKI S, WATANABE S, NAKATOMI A, et al. Genetic background of hyperphenylalaninemia in Nagasaki, Japan[J]. *Pediatr Int*, 2016, 58(5): 431-433.
- [16] 中华人民共和国卫生部. 新生儿疾病筛查技术规范(2010年版) [A/OL]. (2010-11-10)[2020-06-11]. <http://www.nhc.gov.cn/cmsresources/mohfybjysqwss/cmsrsdocument/doc10798.doc>. Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical guide of newborn screening in China(2010)[A/OL]. (2010-11-10)[2020-06-11]. <http://www.nhc.gov.cn/cmsresources/mohfybjysqwss/cmsrsdocument/doc10798.doc>. (in Chinese)
- [17] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the american college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology[J]. *Genet Med*, 2015, 17(5): 405-423.
- [18] 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: 132-138.
- [19] KIM S W, JUNG J, OH H J, et al. Structural and functional analyses of mutations of the human phenylalanine hydroxylase gene[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 365(1-2): 279-287.
- [20] PEY A L, STRICHER F, SERRANO L, et al. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(5): 1006-1024.
- [21] GULDBERG P, REY F, ZSCHOCKE J, et al. A european multicenter 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.
- [22] LI N, JIA H, LIU Z, et al. Molecular characterisation of phenylketonuria in a Chinese mainland population

- using next-generation sequencing[J]. **Sci Rep**, 2015, 5(1): 15769.
- [23] SONG F, QU Y J, ZHANG T, et al. Phenylketonuria mutations in northern China[J]. **Mol Genet Metab**, 2005, 86: 107-118.
- [24] ZHU T, QIN S, YE J, et al. Mutational spectrum of phenylketonuria in the Chinese Han population: a novel insight into the geographic distribution of the common mutations[J]. **Pediatr Res**, 2010, 67(3): 280-285.
- [25] LIANG Y, HUANG M Z, CHENG C Y, et al. The mutation spectrum of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene and associated haplotypes reveal ethnic heterogeneity in the Taiwanese population[J]. **J Hum Genet**, 2014, 59(3): 145-152.
- [26] JEANNESSON-THIVISOL E, FEILLET F, CHÉRY C, et al. Genotype-phenotype associations in French patients with phenylketonuria and importance of genotype for full assessment of tetrahydrobiopterin responsiveness[J]. **Orphanet J Rare Dis**, 2015, 10(1): 158.
- [27] AULEHLA-SCHOLZ C, HEILBRONNER H. Mutational spectrum in german patients with phenylalanine hydroxylase deficiency[J]. **Hum Mutat**, 2003, 21(4): 399-400.
- [28] RAZIPOUR M, ALAVINEJAD E, SAJEDI S Z, et al. Genetic study of the PAH locus in the Iranian population: familial gene mutations and minihaplotypes[J]. **Metab Brain Dis**, 2017, 32(5): 1685-1691.
- [29] 杜 玮, 杨桂芸, 陆薇冰, 等. 青岛市苯丙氨酸羟化酶缺乏症患儿基因突变分析[J]. **发育医学电子杂志**, 2020, 8(1):30-34.  
DU Wei, YANG Guiyun, LU Weibing, et al. Study on mutations of gene in children with phenylalanine hydroxylase deficiency in Qingdao[J]. **Journal of Developmental Medicine**, 2020, 8(1): 30-34. (in Chinese)
- [30] 金克勤, 胡 苑. 742例育龄妇女PAH基因突变筛查结果分析[J]. **中国优生与遗传杂志**, 2020, 28(7): 15-17.  
JIN Keqin, HU Yuan. Analysis of screening results of mutation of PAH gene in 742 fertile woman[J]. **Chinese Journal of Birth Health & Heredity**, 2020, 28(7): 15-17. (in Chinese)

[本文编辑 沈 敏 余 方]

## · 学术动态 ·

### 周以佺教授团队研究成果阐明调控葡萄糖吸收的新机制

2021年5月27日,浙江大学周以佺教授团队和郑莉灵副教授团队在《细胞死亡和分化》(*Cell Death and Differentiation*)杂志在线发表了研究论文“AMPK-mediated phosphorylation enhances the auto-inhibition of TBC1D17 to activate Rab5-dependent glucose uptake”(https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34045668/)。该研究揭示了能量感受器分子AMP活化蛋白激酶(AMPK)介导的磷酸化会促进TBC1D17蛋白的自我抑制效果,从而激活Rab5依赖的葡萄糖转运体4(Glut4)的转运上膜及葡萄糖吸收。该研究为运动促进机体胰岛素敏感的现象提供了可信的解释,也为开发糖尿病等代谢紊乱相关疾病的新治疗手段提供了潜在的信号靶点。

小G蛋白Rab5是影响葡萄糖转运体上膜、促进葡萄糖吸收的重要蛋白之一。研究人员继前期发现Rab5在促进肌肉再生方面的重要功能后,又发现运动可通过细胞内AMPK来促进Rab5的活性,并鉴定出TBC1D17是Rab5的新上游负调控因子。借助生物信息学及生化手段,研究人员解析出AMPK磷酸化TBC1D17的关键位点是第257位的丝氨酸。重要的是,AMPK介导的这一Ser257位点磷酸化会促进TBC1D17的分子内互作,从而增强TBC1D17的自我抑制作用,达到激活Rab5及促进Glut4转运上膜的效果。

研究工作主要由饶锡生博士完成,从晓霞和高修奎博士为共同第一作者。研究得到国家重点研发计划、国家自然科学基金、浙江省自然科学基金和浙江省博士后科研项目等资助。