

[12] Friederichs E, Farley RA, Meiselman HJ. Influence of calcium permeabilization and membrane-attached hemoglobin on erythrocyte deformability[J]. Am J Hemato, 1992, 41: 170-177.

[13] Friederichs E, Meiselman HJ. Effects of calcium permeabilization on RBC rheologic behavior[J]. Biorheology, 1994, 31: 207-215.

[14] Muravyov AV, Tikhomirova IA. Crosstalk between adenyl cyclase signaling pathway and  $Ca^{2+}$  regulatory mechanism under red blood cell microrheological changes[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2010, 45(2-4): 337-345.

[15] Dyrda A, Cytlak U, Ciurazkiewicz A. Local membrane deformations activate  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^{+}$  and anionic currents in intact human red blood cells[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e447.

[16] Li K, Zhao L, Geng G. Increased calcium deposits and decreased  $Ca^{2+}$ -ATPase in erythrocytes of ascitic broiler chickens[J]. Res Vet Sci, 2011, 90(3): 468-473.

[17] 严建新, 陈霞. 患者输血前后血液一氧化氮水平变化[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(1): 69-70.

[18] Doctor A, Platt R, Sheram ML, et al. Hemoglobin conformation couples erythrocyte S-nitrosothiol content to  $O_2$  gradients [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(16): 5709-5714.

[19] 张长虹, 周俊, 庞力. 一氧化氮在贮存红细胞中的重要意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(3): 831-834.

[20] Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A. Evolution of adverse changes in stored RBCs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(43): 17063-17068.

[21] Horn P, Cortese-Krott MM. Nitric oxide influences red blood cell velocity independently of changes in the vascular tone[J]. Free Radic Res, 2011, 45(6): 653-661.

[22] 孙伟, 刘颖芳, 孙跃, 等. 丁咯地尔的临床应用[J]. 社区医学杂志, 2007, 5(24): 18-20.

[23] 沈慧, 王文利. 天麻素对高血压的影响[J]. 中国民间疗法, 2007, 15(4): 24-25.

[24] Chin-Yee IH, Gray-Statchuk L, Milkovich S, et al. Transfusion of stored red blood cells adhere in the rat microvasculature[J]. Transfusion, 2009, 49(11): 2304-2310.

[25] Tinmouth A, Fergusson D, Yee IC, et al. Clinical consequences of red cell storage in the critically ill[J]. Transfusion, 2006, 46(11): 2014-2027.

[26] Henkelman S, Dijkstra-Tiekstra MJ, de Wildt-Eggen J, et al. Is red blood cell rheology preserved during routine blood bank storage [J]. Transfusion, 2010, 50(4): 941-948.

[27] Marik PE, Corwin HL. Efficacy of red blood cell transfusion in the critically ill: a systematic review of the literature[J]. Crit Care Med, 2008, 36(9): 2667-2674.

(收稿日期: 2011-12-08)

# 苯丙氨酸羟化酶基因突变研究进展

杨树法, 赵娟 综述, 王琳琳 审校(首都医科大学附属北京妇产医院北京妇幼保健院 100026)

【关键词】 苯丙氨酸羟化酶; 苯丙酮尿症; 基因; 突变  
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 09. 038 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)09-1097-03

苯丙氨酸羟化酶(PAH)是由苯丙氨酸羟化酶基因编码, 通过将苯丙氨酸转化为酪氨酸, 参与苯丙氨酸的代谢, 该酶主要存在于肝脏中。PAH 基因突变导致 PAH 活性几乎缺失时, 该酶不能将苯丙氨酸转化为酪氨酸, 血液中苯丙氨酸含量升高, 导致高苯丙氨酸血症(HPA), 苯丙氨酸随尿液排出, 尿液具有特殊的鼠尿气味, 因此而得名为苯丙酮尿症(PKU)。PAH 基因突变导致的 PKU 为常染色体隐性遗传, 截至 2011 年 11 月在国际 PAH 数据库(www. pahdb. mcgill. ca)已经发现 564 种突变, 对这些突变进行系统分析, 是进行产前诊断、降低 PKU 患儿出生率、提高人口出生素质的分子遗传学基础。

## 1 PAH 基因结构特点

PAH 基因最初由 Woo 等<sup>[1]</sup>发现, 该基因定位于染色体 12q23. 2<sup>[2]</sup>, 所在区域的长度大约为 1. 5 mb, 该区域包含 PAH 基因以及其他 5 个基因<sup>[3]</sup>。PAH 基因组<sup>[2]</sup>由 171 266 个碱基组成, 翻译起始点上游的 5' 端非编码区大约有 27 kb, 下游 3' 端非编码区包含大约 64. 5 kb。PAH 基因是断裂基因, 由 13 个外显子和 12 个内含子组成, 转录形成仅仅包含外显子的长度为 1 353 bp 的编码序列, 翻译形成含有 451 个氨基酸的苯丙氨酸羟化酶单体。以翻译起始密码子(ATG)的腺苷酸作为 +1, 基因组 DNA、cDNA、内含子、外显子的位置见表 1<sup>[2]</sup>。

表 1 PAH 内含子、外显子在基因组 DNA、cDNA 对应位置表

| 外显子 | cDNA        | 基因组 DNA       | 内含子 | 基因组 DNA       |
|-----|-------------|---------------|-----|---------------|
| 1   | 1~60        | 1~60          | 1   | 61~4 232      |
| 2   | 61~168      | 4 233~4 340   | 2   | 4 341~22 214  |
| 3   | 169~352     | 22 215~22 398 | 3   | 22 399~39 585 |
| 4   | 353~441     | 39 586~39 674 | 4   | 39 675~50 549 |
| 5   | 442~509     | 50 550~50 617 | 5   | 50 618~61 889 |
| 6   | 510~706     | 61 890~62 086 | 6   | 62 087~64 271 |
| 7   | 707~842     | 64 272~64 407 | 7   | 64 408~65 465 |
| 8   | 843~912     | 65 466~65 535 | 8   | 65 536~70 272 |
| 9   | 913~969     | 70 273~70 329 | 9   | 70 330~72 792 |
| 10  | 970~1 065   | 72 793~72 888 | 10  | 72 889~73 444 |
| 11  | 1 066~1 199 | 73 445~73 578 | 11  | 73 579~76 708 |
| 12  | 1 200~1 315 | 76 709~76 824 | 12  | 76 825~78 005 |
| 13  | 1 316~1 359 | 78 006~78 049 | —   | —             |

注: —表示无数据

## 2 PAH 基因突变特点

PAH 突变种类多样,截至 2011 年 11 月,在国际 PAH 数据库(www.pahdb.mcgill.ca)已经注册 564 种突变,这些突变包括:错义突变(missense mutation)341 种(60.46%),缺失突变(deletion mutation)76 种(13.48%),剪切突变(splice mutation)62 种(10.99%),静默突变(silent mutation)32 种(5.67%),无义突变(nonsense mutation)28 种(4.96%),插入突变(insertion mutation)18 种(3.19%),静默/剪切突变(sil/splice mutation)3 种(0.53%),未知突变类型(Unknown)4 种(0.71%)。PAH 基因突变种类多样:一方面在 PAH 基因的位置上分布也不均匀,多种突变集中出现在某几个外显子上;另一方面在地区和种族上也存在异质性,在不同地区和种族发现的高频突变位点存在差异。

**2.1 PAH 突变在基因组分布的不均衡性** PAH 基因的所有位置都存在突变,包括所有的外显子、内含子、5'端非编码区和 3'非编码区。对在 PAH 数据库(www.pahdb.mcgill.ca)已经注册的 564 种突变分析时发现,这些基因突变在整个基因的分布具有不均衡性:(1)位于外显子的突变数量高于内含子,外显子是发现突变种类最多的区域,在外显子发现 478 种突变,占 84.76%,内含子发现 80 种突变,占 14.18%,5'端非编码区发现 6 种突变,占 1.06%,3'端非编码区发现两种突变,占 0.35%,全基因缺失发现 3 种,另外发现一种 U88 突变<sup>[4]</sup>;(2)在某几个外显子发现的突变数量明显高于其他外显子,第 7 有 87 种(15.43%)、第 6 有 78 种(13.83%)、第 11 有 50 种(8.87%)、第 10 有 49 种(8.69%)、第 3 有 44 种(7.80%)外显子是发现突变数量最多的外显子,第 13 外显子仅发现 3 种(0.53%)突变。PAH 突变这些分布特点,能够帮助寻找患者突变位点;在未知患者的突变位点时,可以从突变位点高发的外显子入手,依次排查外显子,将更容易寻找到突变位点。

**2.2 PAH 基因突变异质性** PAH 基因突变种类众多,每种突变在不同地区和民族发生率存在很大差异,具有遗传异质性。R243Q 是中国人<sup>[5-8]</sup>以及朝鲜人<sup>[9]</sup>最常见的突变位点,日本<sup>[10]</sup>以 R413P 发生率最高,R408W 高发于东欧地区<sup>[11]</sup>、不列颠群岛<sup>[12]</sup>以及美国<sup>[13]</sup>,IVS12+1G>A<sup>[12]</sup>常见于丹麦和英国,斯堪的纳维亚<sup>[12]</sup>(半岛)高发位点为 Y4<sup>14</sup>C,I65T<sup>[12]</sup>常见于西欧,M1V 和 R261Q 常见于加拿大地区<sup>[14]</sup>,IVS10-11G>A 在伊朗<sup>[15]</sup>、地中海地区<sup>[12]</sup>以及葡萄牙南部地区<sup>[16]</sup>高发,土耳其地区<sup>[17]</sup>高发 1066-11G>A 突变。综上所述,世界范围内 PAH 突变差异巨大,表现出高度的遗传异质性,同时某些地区高频突变位点是一致的。

## 3 国内 PAH 基因突变研究现状

研究国内 PKU 患者的基因突变类型,对降低 PKU 患儿出生率,提高人口出生素质具有重大意义。国内自 20 世纪 90 年代开始研究 PAH 突变,张眉等<sup>[7]</sup>采用 PCR、变性梯度凝胶电泳及 DNA 直接序列分析等突变分析方法,对南方地区 58 例苯 PKU 患者的苯丙氨酸羟化酶外显子 7 进行了分析,共发现 5 种突变位点:IVS56nt-1、Arg241Cys、Arg243Glu、Val245Val 以及 Arg252Gln,其频率分别为 3/116、1/116、11/116、7/116 以及 4/116。随后国内许多学者对国内不同地区 PKU 患者进行了基因突变分析,发现了许多新的突变位点。

国内 PAH 基因突变具有异质性:(1)存在民族差异。就汉族而言,发生率高于 3% 的高频突变位点有:R243Q、EX6-96A>G、IVS4-1G>A、R413P、Y356X、R111X、R241C 以及 V399V<sup>[18]</sup>;相对于维吾尔族<sup>[19]</sup>,R243Q、EX6-96A>G 和

R111X 为其高频突变位点;R243Q 和 R176X 在回族<sup>[20]</sup>中均具有最高发病率。(2)地区间存在差异:对北京地区<sup>[7-8]</sup>40 例患儿 PAH 突变基因进行检测发现,R243Q 发生率最高,后依次为 Y204C、Y356X、R111X、R413P、R252Q、Y161S;内蒙古地区<sup>[21]</sup>以 R243Q 最高,其后依次为 Y356X、Y204C;河南地区<sup>[6]</sup>R243Q 发生率最高,其次为 V399V、IVS4-1G>A、Y166X、G247R;天津地区<sup>[5]</sup>R243Q 发生率最高,其次为 V399V、R111X、Y204C、R413P、Y356X;甘肃地区<sup>[22]</sup>R243Q 发病率最高,其次为 V399V、EX6-96A>G、R413P、IVS4-1G。

国内 PAH 基因突变具有异质性,但同时也具有相似性,R243Q 在多个地区发生率均最高,其他的一些位点,例如:R111X、Y161S、Y166X、R176X、Y204C、R241C、R243Q、G247R、R252Q、Y356X、V399V、R413P、EX6-96A>G、IVS4-1G>A 等均为高频位点的候选。对这些候选高频突变位点进行大样本的分子流行病学调查,将有助于弄清我国人群 PAH 基因突变构成,为进行产前 PAH 突变位点筛查,降低我国 PKU 患儿出生率奠定基础。

## 4 PAH 基因突变研究展望

当人体 2 条染色体均携带致病性 PAH 突变时,就会导致 PKU,患儿体内苯丙氨酸升高,若不能得到及时治疗,会引起中枢神经系统的损伤,同时造成酪氨酸、多巴、肾上腺素、黑色素等生理活性物质的合成障碍,带来一系列的病理改变。目前对 PAH 突变导致的 PKU 的治疗仍然是终生低/无苯丙氨酸饮食治疗,这给患儿、患儿家庭以及社会带来了严重的经济和心理负担。降低 PKU 患儿的出生率、提高人口出生素质是降低家庭经济和社会负担的重要途径。

由于 PAH 基因突变具有突变种类多、种族和地区差异大等特点,导致传统基因诊断方法(如:变性凝胶梯度电泳、单链构象多态性等)不适用于进行群体的产前筛查,不能满足降低 PKU 患者出生率的要求。寻找高通量、简便、准确的方法成为 PKU 产前基因诊断的需求。基因芯片可以将几十种甚至几百种突变制成探针,固定在基因芯片上,可一次性检测这些突变。因此 PKU 产前诊断芯片成为未来 PKU 产前筛查诊断的发展方向,也是产前筛查 PKU 的较好的方法。

由于基因芯片检测位点过多会提高芯片成本并且降低基因芯片的准确度,所以必须对 PAH 突变进行选择,将数量和种类合适的突变位点作为 PKU 产前诊断基因芯片的检测位点。因此分析国内研究的现状,确定候选高频突变位点,进行分子流行病学调查,从候选位点中确定高频突变位点作为探针制作基因芯片,以此类芯片为检测工具,进行产前筛查,这将是未来 PKU 研究和防治中的重要内容。

## 参考文献

- [1] Woo SL, Lidsky AS, Guttler F, et al. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria[J]. Nature, 1983, 306: 151-155.
- [2] Scriver CR, Hurtubise M, Konecki D, et al. PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do[J]. Hum Mutat, 2003, 21: 333-344.
- [3] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome[J]. Sci, 2001, 291: 1304-1351.
- [4] Trefz FK, Yoshino M, Nishiyori A, et al. RFLP-patterns in Japanese PKU families: new polymorphisms for the

mutant phenylalanine hydroxylase gene[J]. Hum Genet, 1990, 85:121-122.

[5] 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.

[6] 王凤羽,邵诸君,丰慧根,等. 河南省苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变的构成[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(6):644-649.

[7] 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.

[8] Song F, Qu YJ, Zhang T, et al. Phenylketonuria mutations in Northern China[J]. Mol Genet Metab, 2005, 86(Suppl 1):107-118.

[9] Lee DH, Koo SK, Lee KS, et al. The molecular basis of phenylketonuria in Koreans[J]. J Hum Genet, 2004, 49: 617-621.

[10] Okano Y, Asada M, Kang Y, et al. Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients[J]. Hum Genet, 1998, 103:613-618.

[11] Tighe O, Dunican D, O' Neill C, et al. Genetic diversity within the R408W phenylketonuria mutation lineages in Europe[J]. Hum Mutat, 2003, 21:387-393.

[12] Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe[J]. Hum Mutat, 2003, 21:345-356.

[13] Eisensmith RC, Martinez DR, Kuzmin AI, et al. Molecular basis of phenylketonuria and a correlation between genotype and phenotype in a heterogeneous southeastern US population[J]. Pediatrics, 1996, 97:512-516.

[14] Carter KC, Byck S, Waters PJ, et al. Mutation at the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) and its use to document population genetic variation; the Quebec experience[J]. Eur J Hum Genet, 1998, 6(1):61-70.

[15] Zare-Karizi S, Hosseini-Mazinani SM, Khazaei-Koohpar Z, et al. Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population[J]. Mol Genet Metab, 2011, 102(1):29-32.

[16] Rivera I, Mendes D, Afonso A, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: Molecular epidemiology and predictable BH(4)-responsiveness in South Portugal PKU patients[J]. Mol Genet Metab, 2011, 104(suppl 1):86-92.

[17] Dobrowolski SF, Heintz C, Miller T, et al. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population[J]. Mol Genet Metab, 2011, 102(2):116-121.

[18] 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.

[19] 余伍忠,仇东辉,宋昉,等. 新疆维吾尔族苯丙氨酸羟化酶基因突变分析[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(11):1362-1365.

[20] 余伍忠,仇东辉,何江,等. 新疆回族中苯丙酮尿症基因的突变鉴定[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(15):38-39.

[21] 张军力,孟峻,翟晓萍,等. 内蒙古地区苯丙酮尿症苯丙氨酸羟化酶基因突变的检测[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(3):144-147.

[22] 闫有圣,王铮,郝胜菊,等. 甘肃地区苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(4):419-422.

(收稿日期:2011-12-09)

# 幽门螺杆菌检测方法研究进展

金明哲<sup>1</sup>综述,刘 瑜<sup>2</sup>,孔伟圣<sup>2</sup>审校(1. 遵义医学院珠海校区,广东珠海 519041;2. 珠海贝索生物技术有限公司,广东珠海 519000)

【关键词】 幽门螺杆菌; 感染; 检测  
DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 09. 039 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)09-1099-03

幽门螺杆菌(Hp),是一种菌体细长弯曲呈螺旋形的细菌。研究发现 Hp 不仅与慢性胃炎、消化性溃疡病、胃癌等胃肠道疾病密切相关,而且与口腔、皮肤、血液、心血管及呼吸系统疾病的发生也有相关性。所以 Hp 的研究已受到人们广泛关注,而 Hp 感染的诊断检测也是 Hp 研究领域中的重点课题。自 1983 年通过胃镜取活检标本分离培养成功以来,对 Hp 感染的检测已发展出了许多方法,包括有细菌学、病理学、免疫学、分子生物学等技术,现综述如下。

## 1 细菌学检测

经胃镜钳取胃黏膜作细菌培养来检测 Hp,是诊断 Hp 最可靠的方法。此法具有 100%特异性,可作为验证其他诊断性试验的“金标准”,同时又能进行药敏试验,指导临床用药。但

因 Hp 培养条件较为严格,且培养过程易受杂菌污染,故细菌培养常不能获得理想结果,使之成为 Hp 检测中敏感性最低的一种方法。徐帆等<sup>[1]</sup>采用正交试验,优选出 Hp 的最佳固体培养条件为 92%哥伦比亚琼脂或脑心浸液琼脂加 5%牛血清和 2.5%混合抗生素,严格控制气体条件、温度、湿度和 pH 值,72 h 后可培养出 Hp,菌落和细菌形态均典型。由于细菌培养法检测 Hp,费时、价高、培养条件苛刻、敏感度低,所以临床应用较少。

## 2 病理学检测

胃活检组织作直接涂片或切片后,染色镜检,发现 Hp 即可确诊。

### 2.1 胃黏膜涂片 将活检胃黏膜直接涂片,干燥后染色,油镜