
苯丙酮尿症尿液生物标志物的研究进展

谭亚琼¹ (综述), 王鷁超², 贾政军², 盛小奇² (审校)

(1.南华大学儿科学院, 湖南 长沙 410007; 2.湖南省妇幼保健院, 湖南 长沙 410008)

摘要 苯丙酮尿症属于常染色体隐性遗传病, 是最常见的氨基酸代谢病之一, 它是由于苯丙氨酸代谢过程中相关酶缺陷, 导致苯丙氨酸及其旁路代谢产物在体内堆积并影响人体正常代谢, 并表现出一系列的临床症状。苯丙酮尿症是我国新生儿筛查主要病种之一, 目前临床上多采用血苯丙氨酸浓度来进行疾病筛查。过多的苯丙氨酸及其旁路代谢产物可经尿液排出, 因此苯丙酮尿症患儿尿液生物标志物检测可用于苯丙酮尿症的筛查和监测, 其标本采集简便且具有无创性, 本文综述了苯丙酮尿症患儿的体内的生物代谢及其尿液中生物标志物检测的研究进展。

关键词 苯丙酮尿症; 尿液; 生物标志物; 气相色谱质谱联用

[中图分类号] [文献标识码] [文章编号]

Latest advances in urinary biomarkers of Phenylketonuria

TAN Yaqiong¹, WANG Yichao², JIA Zhengjun², SHENG Xiaoqi²

(1. College of Pediatrics, The University Of South China, Changsha hunan 410007; 2.The maternal and child health of hunan province, Changsha hunan 410008)

Abstract Phenylketonuria is an autosomal recessive inherited disease and one of the most prevalent amino acid metabolic disorders. It is caused by the deficiency of related enzymes in phenylalanine metabolism, which can lead to accumulation of phenylalanine and other bypass metabolites and disrupt the normal metabolism, thus shows a series of clinical symptoms. Phenylketonuria is one of the major neonatal screening diseases in our country. Current clinical screening of phenylketonuria is based on blood phenylalanine concentration, but superabundant phenylalanine and other bypass metabolites can excreted in urine. So detecting the biomarkers in urine of phenylketonuria can be used for the neonatal screening of phenylketonuria, with an advantage of the easy and non-invasive sample collecting. This paper reviewed the biological metabolism of phenylalanine and the research progress of biomarkers in the urine.

Key words phenylalanine; urinary; biomarker; gas chromatography-mass spectrometry

基金项目：湘科计字[2013]83 号

作者简介：谭亚琼（1988—），女（汉族），湖南，硕士研究生，小儿遗传代谢病方向

通讯作者：盛小奇，主任医师，硕士生导师，E-mail: shengxq999@163.com

引言

苯丙酮尿症(Phenylketonuria, PKU)是由于患者体内编码苯丙氨酸-4 α -羟化酶(Phenylalanine hydroxylase, PAH)或辅酶四氢生物蝶呤(Tetrahydrobiopterin BH₄)的基因发生突变而导致 PAH 缺乏或活性减低,从而使得苯丙氨酸分解代谢障碍,产生大量的苯丙酮酸、苯乳酸、苯乙酸等旁路代谢产物,属于常染色体隐性遗传病,是最常见的遗传代谢性疾病之一^[1]。根据血苯丙氨酸浓度及酶的缺陷程度,可分为轻度高苯丙氨酸血症、轻度 PKU、经典型 PKU 及 BH₄ 缺乏症等。临床上常表现为智力落后、癫痫、精神行为异常、皮肤色素脱失和鼠尿气味等^[2]。根据我国 220 万新生儿筛查资料,我国 PKU 的发病率为 1/11188,按年出生人口 2000 万计算,我国每年约有 1700 名 PKU 患儿出生^[3],相比之下,北方发病率较南方高,湖南地区 PKU 发病率约为 1/33694^[4]。因此,对 PKU 患儿,如能早诊断、早治疗,可减轻或避免神经系统不可逆性的损伤,从而减轻社会及家庭的经济负担和精神压力。

一、 苯丙酮尿症的生物代谢

1934 年 Folling 发现 PKU 患者尿液中含有大量的苯丙氨酸并将其命名苯丙酮尿症^[5,6],此后人们对其展开了更深层的研究,揭示了苯丙氨酸在体内的代谢过程,绘制出苯丙氨酸在体内代谢的图谱(见图 1)^[7,8]。在正常人体内,苯丙氨酸在代谢过程中可转化成酪氨酸、色氨酸、苏氨酸等,然后生成各种调节人体生命活动的物质,当这些物质经新陈代谢生成终末代谢产物后,随尿液、汗液等排出体外。如果苯丙氨酸代谢通路受阻,使其在体内大量聚集,过多的苯丙氨酸便通过旁路代谢途径生成多种中间代谢产物,其中一部分代谢产物可通过尿液排出体外。因此,苯丙氨酸代谢异常可影响体内酪氨酸、色氨酸等的正常代谢,从而影响人体的正常生命活动。

(1) 苯丙氨酸旁路代谢途径 过多的苯丙氨酸通过苯丙氨酸转氨酶作用生

1961 年, Guthrie 首次采用枯草杆菌变异菌株 ATCC6633 鉴定苯丙酮尿症。1986 年上海儿科研究所用青霉素来消除 Guthrie 细菌抑制法中产生的抗生素, 进一步提高了实验的准确性, 并在国内外得到了推广, 该检测简单, 成本低,

可用于大范围的人群筛查，但该实验为半定量检测，不能准确定量血苯丙氨酸的浓度，且漏诊率高^[16]。

尿三氯化铁和 2,4 二硝基苯肼实验^[17]是将 PKU 尿液直接与试剂作用，苯丙酮酸可使试剂发生化学反应，生成黄绿色或黄色沉淀，该方法简便易行，但试剂容易受到一些药物影响，且当尿液中苯丙酮酸浓度低时易产生假阴性。

荧光光度法是一种测定血苯丙氨酸的定量分析方法^[18]。通过荧光强度计算 Phe 的量，该方法简单快速，但被检测物——苯丙氨酸-茚三酮-铜盐复合物容易受到溶液 pH 值、温度等的影响。

高效液相色谱法将血斑中的物质溶于试剂，它将混合溶液输入到色谱柱中，从而分离出各个组分，随即进入检测器分析。目前临床上常用此方法测定血中苯丙氨酸的量、尿蝶呤谱分析和红细胞二氢喋呤还原酶活性测定，从而进一步鉴别了经典型 PKU 和 BH4D^[19-21]。

自二十世纪五十年代初期以来，MS 成为 IEM 重要的检测技术之一，质谱技术也得到了飞速发展。至今，串联质谱、液相-质谱-质谱联用技术已成为发达地区新生儿筛查中心的常规诊断工具^[22-24]。质谱分析是将混合物离子化后形成不同的离子碎片，按其荷质比 (m/z) 不同，其在磁场中的轨迹和聚焦位置不同而进行分离测定。质谱技术操作简单，对样品离子选择性好，分析迅速，性能可靠，检测准确，其多应用在血苯丙氨酸浓度测定。

自 1966 年气相色谱质谱联用技术用于遗传代谢性疾病诊断^[25, 26]，人们逐渐将该技术应用到 PKU 的诊断中来。该方法多是将 PKU 患儿尿液中的组分经气化后进入到色谱柱中，通过色谱柱分离物质，经过电子轰击后使得各组分物质带电荷，经过质谱仪后在磁场作用下形成不同轨迹和聚焦点，形成质谱，根据质谱图进行分析。该方法可一次分析多种代谢物质及疾病，常用于检测 PKU 患儿尿液中苯丙酮酸等异常代谢物。

三、苯丙酮尿症尿液中的生物标志物研究进展

目前国内外对苯丙酮尿症的尿液分析研究多采用气相色谱质谱联用 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 技术，GC-MS 是将尿液中的物质组分经气化后进入到色谱柱中，通过色谱柱分离物质，经过电子轰击后使得各组分物质带电荷，经过质谱仪后在磁场作用下形成不同轨迹和聚焦点，形成质谱，根据质谱图进行分析。该方法可一次分析多种代谢物质及疾病，常用于检测 PKU 患儿尿液中苯丙酮酸等异常代谢物^[27,28]。有人报道尿液中苯丙酮酸的浓度与血液中苯丙酮酸有正相关关系^[29]，因此，尿液中苯丙酮酸的检测，可作为苯丙酮尿症筛查和后期检测的重要生物标志物之一，也可用于评价苯丙酮尿症患儿血液中

苯丙氨酸控制情况的标准之一。苯丙酮酸在体外易分解，温度越高分解越快^[30]。Teruo Kitagawa指出苯丙酮酸在持续长时间加热的过程中不稳定，容易生成其他的衍生物，例如水解成苯乙酸^[31]；Paik等发现酮酸类物质容易在酸性环境中水解^[32, 33]。在有机酸萃取法和尿素酶预处理法的处理过程中，我们发现在脎化过程中都需要进行60–80℃的加热，加快脎化过程，或者在硅烷化过程中加入强酸，以利于烷基化，但是由于苯丙酮酸本身的特性，加热或强酸性条件下会分解或水解，使得实验假阴性率增高。一种好的预处理法对于苯丙酮尿症来说就很重要了。

1954年，Armstrong MD等在苯丙酮尿症患儿尿液中发现吡啶类衍生物，并对苯丙酮尿症尿液代谢开展了多项研究，取得一系列的研究成果^[34–37]；1955年，Ferrari V等利用色谱技术检测苯丙酮尿症患者尿液时，发现吡啶类衍生物为色氨酸的羟化物^[38]；1958年，Dagliesh CE在研究芳香族氨基酸在尿液中代谢物时发现，这种色氨酸的羟化物为5-羟基吡啶类物质^[39]；Pare CM发现5-羟色胺脱羧酶活性在苯丙酮尿症患儿体内是降低的，它可引起血液中5-羟色胺及尿液中5-羟基吡啶类物质等物质含量降低^[40]；1973年，Cosyil J发现苯丙酮尿症患儿尿液中5-羟基吡啶乙酸为5-羟色胺的代谢物质，可用于检测苯丙酮尿症^[41]。

Rampini等取正常儿童、高苯丙氨酸血症患儿及PKU患儿苯丙氨酸负荷试验前、后尿液，经有机酸萃取后行GC-MS分析，他们发现PKU患儿尿液中苯乳酸、苯乙酸、扁桃酸、2-羟基苯乙酸、苯丙酮酸、4-羟基苯丙酮酸、4-羟基苯乳酸、香草扁桃酸较正常组均有明显增高；PKU组中，苯丙氨酸负荷试验前后尿液中的上述物质均增高明显^[42]。Watts等取1778名智力发育迟缓儿童的尿液进行GC-MS分析，发现在PKU患者的尿液中2-羟基苯乙酸、苯丙酮酸、苯乳酸有显著增高^[43]。Karl Blau分析两名pku患儿尿液，经有机酸萃取法处理后进入GC-MS分析，发现质谱图中多种PHE等有机酸^[44]。高晓岚等采用尿素酶对PKU患者尿液进行处理后行GC-MS分析，发现尿液中苯乙酸、苯乳酸、苯丙酮酸与血Phe浓度密切相关，但是实验过程中苯丙酮酸在体外的化学性质不稳定，可能受到实验方法和仪器的影响，产生假阴性^[29]。刘慎如开展了PKU尿液有机酸GC-MS轮廓普分析，结果表明PKU患儿尿液中苯丙酮酸、苯乙酸、2-羟基苯乙酸、4-羟基苯乙酸均高于正常值10–470倍，可作为苯丙酮尿症的诊断依据^[45]。有机酸萃取法和尿素酶预处理法均已应用到苯丙酮尿症的诊断，也是目前国内

外 GC-MS 分析最常用的两种预处理法，其检测 PKU 尿液中到的生物标志物苯丙酮酸、苯乙酸、苯乳酸报道最多。

总结

目前苯丙酮尿症筛查的主要生化标准物为血苯丙氨酸浓度、血苯丙氨酸与血酪氨酸浓度比值为常用的诊断依据，但是该方法为有创性，存在一定的感染风险，血样本的采集需要专业人员进行，**对于苯丙酮尿患儿来说，后期血苯丙氨酸监测：1. 血苯丙氨酸浓度异常，每周检测 1 次；2. 血苯丙氨酸浓度正常范围内每月检测 1-2 次。**因此，如果能检测尿液中的生物标志物来监测苯丙酮尿症可减少患儿的痛苦，也可进一步加强患儿就诊的依从性，促进对 PKU 患儿的监管。采用尿液中的生化标志物为苯丙酮尿症的筛查手段，标本收集为无创性，且标本采集简单、便捷，非专业人员也可较快速学会标本采集及储存方法。GC-MS 是目前最先进尿液分析技术之一，可一次完成对多样本、同一样本多物质多疾病的检测，但是目前尿液 GC-MS 仪器成本贵，技术相对复杂，专业技术人员少，在全国范围内没有广泛开展。总的来说，GC-MS 以其独特的优势，在苯丙酮尿症尿液分析诊断技术中有巨大的临床应用前景，可服务于更多苯丙酮尿症患者。

参考文献

- [1] Camp KM, Parisi MA, Acosta PB, et al. Phenylketonuria Scientific Review Conference: state of the science and future research needs[J]. Mol Genet Metab. 2014. 112(2): 87-122.
- [2] Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria[J]. Lancet. 2010. 376(9750): 1417-27.
- [3] 顾学范. 苯丙酮尿症防治现状及进展[J]. 实用儿科临床杂志. 2000. (5): 297-299.
- [4] 鄢慧明, 唐华, 王华,等. 2001~2011 年湖南省新生儿苯丙酮尿症(PKU)筛查结果分析及体会[J]. 中国优生与遗传杂志. 2013. (4): 96-98.
- [5] Folling A, Syends S. A method for the estimation of phenylpyruvic acid in urine with some examples of its use in dietary treatment of phenylpyruvic oligophrenia[J]. Scand J Clin Lab Invest. 1958. 10(4): 355-8.
- [6] Centerwall SA, Centerwall WR. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist[J]. Pediatrics. 2000. 105(1): 89-103.
- [7] 吴希如. 苯丙酮尿症(综述) [J]. 国外医学(儿科学分册). 1979. (1): 20-25.
- [8] 吴文彦. 苯丙酮尿病(综述) [J]. 国外医学.医学遗传学分册. 1979. (1): 16-22.
- [9] Seakins JW. The determination of urinary phenylacetylglutamine as phenylacetic acid. Studies on its origin in normal subjects and children with cystic fibrosis[J]. Clin Chim Acta. 1971. 35(1): 121-31.
- [10] Koepp P, Scholtyssek M, Plettner C. Urinary excretion of aromatic acids in hyperphenylalaninemic states: response to a protein challenge[J]. Eur J Pediatr. 1978. 127(4): 269-78.
- [11] Rampini S, Vollmin JA, Bosshard HR, et al. Aromatic acids in urine of healthy infants, persistent hyperphenylalaninemia, and phenylketonuria, before and after phenylalanine load[J]. Pediatr Res. 1974. 8(7): 704-9.
- [12] Sun Z, Ning Y, Liu L, et al. Metabolic engineering of the L-phenylalanine pathway in Escherichia coli for the production of S- or R-mandelic acid[J]. Microb Cell Fact. 10: 71.
- [13] Curtius HC, Baerlocher K, Vollmin JA. Pathogenesis of phenylketonuria: inhibition of DOPA and catecholamine synthesis in patients with phenylketonuria[J]. Clin Chim Acta. 1972. 42(1): 235-9.
- [14] Pare CM, Sandler M, Stacey RS. 5-Hydroxytryptamine deficiency in phenylketonuria[J]. Lancet. 1957. 272(6968): 551-3.

-
- [15] Paer CM, Sandler M, Stacey RS. Decreased 5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in phenylketonuria[J]. *Lancet*. 1958. 2(7056): 1099-101.
- [16] 王斌. Guthrie 细菌抑制法检测苯丙酮尿症漏诊原因的研究[J]. *医学研究通讯*. 2000. (05): 37-38.
- [17] 周小棉, 康佳丽, 邹晓,等. 苯丙酮尿症实验室诊断研究进展[J]. *现代医院*. 2007. (10): 15-17.
- [18] 叶军. 高苯丙氨酸血症的诊治及研究进展[J]. *临床儿科杂志*. 2010. (2): 197-200.
- [19] Pecce R, Scolamiero E, Ingenito L, et al. Optimization of an HPLC method for phenylalanine and tyrosine quantization in dried blood spot[J]. *Clin Biochem*. 2013. 46(18): 1892-5.
- [20] Zhao Y, Cao J, Chen YS, et al. Detection of tetrahydrobiopterin by LC-MS/MS in plasma from multiple species[J]. *Bioanalysis*. 2009. 1(5): 895-903.
- [21] Allegri G, Costa NHJ, Ferreira GLN, et al. Determination of six pterins in urine by LC-MS/MS[J]. *Bioanalysis*. 2012. 4(14): 1739-46.
- [22] Wang C, Zhang W, Song F, et al. A simple method for the analysis by MS/MS of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening[J]. *Amino Acids*. 2012. 42(5): 1889-95.
- [23] Ahring K, Belanger-Quintana A, Dokoupil K, et al. Blood phenylalanine control in phenylketonuria: a survey of 10 European centres[J]. *Eur J Clin Nutr*. 2011. 65(2): 275-8.
- [24] Heintz C, Troxler H, Martinez A, et al. Quantification of phenylalanine hydroxylase activity by isotope-dilution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Mol Genet Metab*. 2012. 105(4): 559-65.
- [25] Tanaka K, Budd MA, Efron ML, et al. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966. 56(1): 236-42.
- [26] Xu K, Wang L, Matsumoto I, et al. Screening for inborn errors of metabolism using gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001. 758(1): 75-80.
- [27] Deng C, Deng Y, Wang B, et al. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002. 780(2): 407-13.
- [28] Kuhara T, Shinka T, Inoue Y, et al. Pilot study of gas chromatographic-mass spectrometric screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after treatment with urease[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999. 731(1): 141-7.
- [29] 高晓岚, 金晶, 李筱燕等. 高苯丙氨酸血症患儿尿中代谢物水平分析[J]. *临床儿科杂志*. 2012. (12): 1119-1121.
- [30] 黄世若. 尿液分析前各因素对检验结果影响的探讨[J]. *实用医技杂志*. 2013. (2): 161-162.
- [31] Kitagawa T. Gas-liquid chromatography of phenylalanine metabolites in urine and sera of hyperphenylalaninemic and phenylketonuric patients[J]. *Clin Chem*. 1974. 20(12): 1543-7.
- [32] Paik MJ, Kim KR. Sequential ethoxycarbonylation, methoximation and tert-butyldimethylsilylation for simultaneous determination of amino acids and carboxylic acids by dual-column gas chromatography[J]. *J Chromatogr A*. 2004. 1034(1-2): 13-23.
- [33] Paik MJ, Cho EY, Kim H, et al. Simultaneous clinical monitoring of lactic acid, pyruvic acid and ketone bodies in plasma as methoxime/tert-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode[J]. *Biomed Chromatogr*. 2008. 22(5): 450-3.
- [34] Armstrong MD, Robinson KS. On the excretion of indole derivatives in phenylketonuria[J]. *Arch Biochem Biophys*. 1954. 52(1): 287-8.
- [35] Armstrong MD, Tyler FH. Studies on phenylketonuria. I. Restricted phenylalanine intake in phenylketonuria[J]. *J Clin Invest*. 1955. 34(4): 565-80.
- [36] Armstrong MD, Shaw KN, Robinson KS. Studies on phenylketonuria. II. The excretion of o-

-
- hydroxyphenylacetic acid in phenylketonuria[J]. J Biol Chem. 1955. 213(2): 797-804.
- [37] Armstrong MD, Shaw KN. Studies on phenylketonuria. III. The metabolism of o-tyrosine[J]. J Biol Chem. 1955. 213(2): 805-11.
- [38] Ferraei V, Campagnari F, Guida A. Phenylpyruvic oligophrenia: further chemico-pathological findings[J]. Minerva Med. 1955. 46(55): 119-27.
- [39] Dalglish CE. The 5-hydroxyindoles[J]. Adv Clin Chem. 1958. Vol. 1(2): 193-235.
- [40] Pare CM, Sandler M, Stacey RS. Decreased 5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in phenylketonuria[J]. Lancet. 1958. 2(7056): 1099-101.
- [41] Costil J, Galli J, Richardet JM, Brissaud HE. Urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. II. In children with phenylketonuria, effects of 5-hydroxytryptophan[J]. Nouv Presse Med. 1973. 2(32): 2118-22.
- [42] Rampini S, Vollmin JA, Bosshard HR, Muller M, Curtius HC. Aromatic acids in urine of healthy infants, persistent hyperphenylalaninemia, and phenylketonuria, before and after phenylalanine load[J]. Pediatr Res. 1974. 8(7): 704-9.
- [43] Watts RW, Chalmers RA, Lawson AM. Abnormal organic acidurias in mentally retarded patients[J]. Lancet. 1975. 1(7903): 368-72.
- [44] Blau K. Aromatic acid excretion in phenylketonuria. Analysis of the unconjugated aromatic acids derived from phenylalanine[J]. Clin Chim Acta. 1970. 27(1): 5-18.
- [45] . 郭勃, 余兆楼, 常理文, 刘慎如. 尿中有机酸的毛细管气相色谱-质谱轮廓分析——用于苯丙酮尿症的诊断[J]. 分析化学. 1993. (09): 1075-1077.