

pheresis in combination with hemodialysis[J]. J Dermatol, 2014, 41(6):521-524.

[18] MEYER N J, LI M, FENG R, et al. ANGPT2 Genetic variant is associated with trauma-associated acute lung injury and altered plasma angiopoietin-2 isoform ratio[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(10):1344-1353.

[19] KAJIYA K, SAWANE M, HUGGENBERGER R, et al. Activation of the VEGFR-3 pathway by VEGF-C attenuates UVB-induced edema formation and skin inflammation by promoting lymphangiogenesis[J]. J Invest Dermatol, 2008, 129(5):1292-1298.

[20] GUO R, ZHOU Q, PROULX S T, et al. Inhibition of lymphangiogenesis and lymphatic drainage via VEGFR-3 blockade increases the severity of inflammation in chronic inflammatory arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2010, 60(9):2666-2676.

[21] RETO H, MICHAEL D. The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation [J]. J Invest Dermatol Symp Proc, 2011, 15(1):24-32.

(收稿日期:2019-10-22 修回日期:2020-01-26)

• 短篇论著 •

串联质谱技术筛查新生儿甲基丙二酸血症回顾性分析*

朱永阒,张春燕,程昱璇,崔佳奕,蒋 涛,檀旭东,
桑培培,舒 杨,史文杰,张民杰,田亚平[△]

(中国人民解放军总医院转化医学实验室,北京 100853)

摘要:目的 回顾性分析串联质谱技术在新生儿甲基丙二酸血症筛查中的应用。方法 利用液相串联质谱技术筛查 2015 年 10 月至 2017 年 12 月在该院进行 48 项遗传代谢病检测的样本近 10 万例,对初筛为阳性的样本做召回复查,对复查仍为阳性的样本通过气相色谱质谱技术进行尿有机酸分析,并采用基因测序作进一步确诊。结果 通过对近 10 万例样本进行筛查,发现 132 例疑似甲基丙二酸血症、丙酸血症样本,确诊甲基丙二酸血症 1 例,丙酸血症 1 例。结论 串联质谱技术对甲基丙二酸血症的诊断有重要的提示作用,需密切结合气相色谱质谱和测序技术鉴别诊断丙酸血症。

关键词:甲基丙二酸血症; 丙酸血症; 液相串联质谱; 新生儿筛查
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.09.028 **中图法分类号:**R772.11
文章编号:1673-4130(2020)09-1138-04 **文献标识码:**B

甲基丙二酸血症是先天性有机酸代谢缺陷病中最常见的病种,其发病率较高,危害较大,于 1967 年首次被报道^[1]。该病由甲基丙二酸辅酶 A 变位酶缺陷或其辅酶钴胺素代谢异常导致甲基丙二酸、甲基枸橼酸、丙酸等代谢物蓄积,进一步造成肾脏、神经、肝脏等多脏器损害^[2]。此病多从新生儿或婴儿期开始出现症状,致死率高,临床表现存在个体差异,极易漏诊、误诊^[3],因此,早发现、早治疗非常重要。目前,串联质谱技术因其简便廉价、高通量的特点已广泛应用于新生儿遗传代谢的筛查^[4]。本研究采用串联质谱技术筛查 2015 年 10 月至 2017 年 12 月在中国人民解放军总医院进行新生儿筛查的样本,现对这部分样本应用串联质谱筛查甲基丙二酸血症,结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015 年 12 月至 2017 年 12 月在中国人民解放军总医院转化医学实验室进行新生儿 48

项遗传代谢病筛查样本近 10 万例,样本来自四川、贵州、湖北、西藏、新疆、北京,所有参与筛查者家长均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 液相串联质谱分析 参照文献[5],利用非衍生生化串联质谱试剂盒(美国 PerkinElmer 公司)完成样本上机前处理。利用 Waters TQ Dectector 串联质谱仪对样品进行检测,用 Masslynx. V4.0 软件(美国 Waters 公司)处理数据。将数据上传至新生儿疾病筛查系统(杭州博圣公司定制),通过检查和审核生成报告。其中样本的置信区间是以人群指标浓度分布的 0.5%~99.5%作为临床判读截断范围。

1.2.2 气相色谱质谱分析 参照文献[6]中的方法对尿液样本进行处理和检测。所用仪器为 Thermo fisher 公司的气相色谱质谱联用仪(TSQ 8000 Evo)。

1.2.3 基因突变分析 本文筛查样本采用全外显子

* 基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFC1001700);北京市科技新星计划(Z181100006218038)。
[△] 通信作者, E-mail: tianyp@301hospital.com。
本文引用格式:朱永阒,张春燕,程昱璇,等. 串联质谱技术筛查新生儿甲基丙二酸血症回顾性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(9): 1138-1140.

测序技术进行基因突变分析。流程:核酸提取-超声打断-文库构建(TruSeq DNA Sample Preparation 试剂盒)-捕获全外显子区域(Roche NimblegenSeqCap EZ v5.1 试剂盒)-illumina 平台高通量测序-数据分析(CNV/SV 数据经 in house cohort、1000 Genomes 及公开 CNV 数据库数据过滤携带率,使用 Langya 注释)。

2 结 果

2.1 疑似阳性样本信息 近 10 万份筛查样本中甲

基丙二酸血症、丙酸血症疑似阳性样本信息见表 1。本实验室丙酰基肉碱(C3)参考范围为 0.30~4.00 $\mu\text{mol/L}$,丙酰基肉碱/乙酰基肉碱(C3/C2)参考范围为 0.03~0.24 $\mu\text{mol/L}$ 。共召回 132 例疑似甲基丙二酸血症、丙酸血症样本,其中 C3 增高(4.52~10.72 $\mu\text{mol/L}$)62 例(男 36 例,女 26 例),C3/C2 增高(0.28~0.44 $\mu\text{mol/L}$)10 例(男 8 例,女 2 例),C3 增高(4.04~11.42 $\mu\text{mol/L}$)伴 C3/C2 增高(0.23~1.55 $\mu\text{mol/L}$)60 例(男 33 例,女 27 例)。

表 1 甲基丙二酸血症、丙酸血症疑似阳性患儿信息表(n=132)

指标	C3 ↑ (4.52~10.72 $\mu\text{mol/L}$)	C3/C2 ↑ (0.28~0.44 $\mu\text{mol/L}$)	C3 ↑ (4.04~11.42 $\mu\text{mol/L}$) C3/C2 ↑ (0.23~1.55 $\mu\text{mol/L}$)
女(n)	26	2	27
男(n)	36	8	33
年龄(d)	15	28	14
出生体质量(g)	3 354	3 215	3 147

2.2 串联质谱结果分析 串联质谱结果显示,确诊的例 1 患儿 C3 = 11.63 $\mu\text{mol/L}$ 和 C3/C2 = 1.55 $\mu\text{mol/L}$ 比值显著增高,符合甲基丙二酸血症、甲基丙二酸血症合并同型半胱氨酸血症、丙酸血症的代谢特点,需进一步结合尿气相检测和基因检测进行确诊。确诊的例 2 患儿 C3 = 5.94 $\mu\text{mol/L}$ 和 C3/C2 = 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 比值也增高,符合甲基丙二酸血症、丙酸血症的代谢特点,也需要结合气相色谱质谱联用仪和基因测序进行诊断。

2.3 气相色谱质谱结果分析 尿液气相色谱质谱结果显示,例 1 患儿甲基丙二酸(36.14 $\mu\text{mol/L}$)、甲基

枸橼酸(2.48 $\mu\text{mol/L}$)指标升高,符合甲基丙二酸血症代谢特征。由于例 2 在召回确诊前已死亡,未成功召回进行气相色谱质谱联用仪检测,无检测结果。

2.4 基因突变结果分析 基因突变结果分析显示,例 1 患儿 MMACHC 基因存在 c.609G>A 和 c.658~660del AAG 位点杂合突变,且患儿血同型半胱氨酸增高(63 $\mu\text{mol/L}$,参考值 5~20 $\mu\text{mol/L}$),确诊为 cblC 型合并同型胱氨酸血症。例 2 患儿存在与丙酸血症相关的 PCCA(c.1676)和 PCCB(c.835dupc)2 个基因突变。见表 2。

表 2 2 例患儿基因检测结果

病例	突变基因	染色体位置	变异	杂合性	变异类型	遗传模式
1	MMACHC	1:45974647	c.609G>A(p.W203*)	Het	Pathogenic	AR
	MMACHC	1:45974693	c.658~660 del AAG(p.K220del)	Het	Pathogenic	AR
2	PCCA	13:101020758	c.1676G>T(p.W559L)	Het	Uncertain	AR
	PCCB	3:136016864	c.835d upC(p.L278fs)	Het	Likely Pathogenic	AR

3 讨 论

甲基丙二酸血症是有机酸代谢缺陷病中发病率较高、危害较大的一类常染色体隐性遗传病,在欧美国家的发病率为 1/169 000~1/48 000^[7-8],我国无确切的统计资料,相关报道显示台湾为 1/85 000^[9],浙江为 1/64 708^[10],上海为 1/26 000^[11],山东为 1/3 920^[12],是有机酸血症中最常见的一种类型。本实验室新生儿筛查平台上检测了来自四川、贵州、湖北、西藏、新疆、北京 6 地近 10 万例样本。通过串联质谱技术共筛查出 132 例疑似阳性样本,可疑阳性率约为 1.32‰,进一步通过气相色谱质谱和基因测序分析,确诊甲基丙二酸血症 1 例,发病率约为 1/

100 000。可疑阳性率远高于发病率,国内外也存在这个筛查假阳性率较高的问题,如何在避免漏诊的情况下使假阳性率减少,提高阳性预测值有待进一步研究。

甲基丙二酸血症主要包括 mut0、mut-、cblA、cblB 构成的单纯性甲基丙二酸血症和 cblC、cblD、cblF 构成的血症合并同型胱氨酸血症,且大多为钴胺素有效型^[13]。国外研究发现单纯性甲基丙二酸血症发病率远高于甲基丙二酸血症合并同型半胱氨酸^[14],在我国甲基丙二酸血症合并同型半胱氨酸血症患者占甲基丙二酸血症患者的 59.7%^[15],这潜在提示着甲基丙二酸血症具有种族差异性。甲基丙二酸血症

合并同型胱氨酸血症主要由 cblC 缺陷即 MMACHC 基因突变所致,也是最常见 的钴胺素代谢障碍性疾病^[16]。本研究中的 1 例患儿是 MMACHC 基因突变所致,且确诊患儿血同型半胱氨酸增高(63 $\mu\text{mol/L}$, 参考值 5~20 $\mu\text{mol/L}$),应为 cblC 型合并同型胱氨酸血症,这与我国甲基丙二酸血症常见类型报道相符。国内有学者曾对 79 例中国 cblC 缺陷患者进行研究,发现有 48.1% 的 c. 609G>A (p. W203X) 突变发生率,其次 c. 658~660del AAG 的突变率为 13.9%^[17]。另有报道 16 例合并型甲基丙二酸血症患儿基因检测中发现 81% 的 c. 609G>A 和 c. 658~660del AAG 突变^[18]。在本研究中,确诊患儿 MMACHC 基因存在 c. 609G>A (p. Trp146Ter) 和 c. 658~660del AAG (p. Lys163del) 位点杂合突变,这与报道也相一致。且 c. 609G>A 和 c. 658~660del AAG 曾被报道为致病突变,与甲基丙二酸血症的发生有关,这与确诊患儿的血尿检测结果也相吻合。对该例患儿建议保证足够的天然蛋白质摄入,同时可用钴胺素、叶酸、甜菜碱、左卡尼汀进行治疗^[19]。

丙酸血症是丙酰辅酶 A 羧化酶缺乏引起的丙酸分解代谢异常的遗传学缺陷病,主要以代谢性酮症酸中毒、发育迟缓和惊厥为主要特征,与甲基丙二酸血症有相似的生化特征和临床症状。有研究报道在 55 例丙酸血症患者中,有 20 例是通过新生儿筛查确诊的,通过新生儿筛查早期诊断丙酸血症可以降低病死率^[13]。本研究中通过串联质谱技术筛查新生儿遗传代谢病,发现的 132 例疑似丙酸血症样本中确诊了 1 例,发病率约为 1/100 000。遗憾的是本研究这例样本在召回确诊前已死亡,血液液相串联质谱初筛结果提示为甲基丙二酸血症和丙酸血症。笔者对此样本的干血片做测序,发现其 PCCA 和 PCCB 基因存在突变,这两基因与丙酸血症有关。这说明单纯应用串联质谱无法准确诊断和鉴别甲基丙二酸血症和丙酸血症,需结合气相色谱质谱检测尿中的甲基丙二酸、3-羟基丙酸的值进行确诊^[20]。另外,目前实验室是根据 C3、C3/C2 的值来判定是否召回复查,从初筛-召回复查-召回确诊整个流程需要 5 周时间,后期可以考虑开发试剂盒对初筛提示为甲基丙二酸血症、丙酸血症的样本进行二次筛查,尽早对患儿进行确诊,为患儿的治疗争取时间。

本研究利用串联质谱技术筛查了近 10 万份样本,甲基丙二酸血症、丙酸血症疑似阳性样本 132 例,进一步结合气相色谱质谱技术和基因测序确诊了 1 例 cblC 型合并同型胱氨酸血症患儿,1 例丙酸血症患儿。串联质谱技术的应用能够为甲基丙二酸血症的初筛提供参考,需密切结合气相色谱质谱和测序技术鉴别诊断丙酸血症,为疾病的早发现、早诊断、早治疗提供指导。

参考文献

- [1] MATSUI S M, MAHONEY M J, ROSENBERG L E. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias[J]. N Engl J Med, 1983, 308(15): 857-861.
- [2] RICHARD E, ALVAREZ-BARRIENTOS A, PEREZ B, et al. Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway[J]. J Pathol, 2007, 213(4): 453-461.
- [3] FRASER J L, VENDITTI C P. Methylmalonic and propionic acidemias: clinical management update[J]. Curr Opin Pediatr, 2016, 28(6): 682-693.
- [4] OZBEN T. Expanded newborn screening and confirmatory follow-up testing for inborn errors of metabolism detected by tandem mass spectrometry[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(1): 157-176.
- [5] 田国力, 王燕敏, 许洪平, 等. 非衍生化串联质谱技术筛查上海部分地区新生儿遗传代谢病的回顾性分析[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(12): 909-912.
- [6] 张万巧, 彭薇, 杨尧, 等. 气相色谱质谱法筛查先天性代谢缺陷方法及诊断标准的建立[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(11): 1059-1062.
- [7] DEODATO F, BOENZI S, SANTORELLI F M, et al. Methylmalonic and propionic aciduria [J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2006, 142(2): 104-112.
- [8] MELO D R, KOWALTOWSKI A J, WAJNER M, et al. Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia [J]. J Bioenerg Biomembr, 2011, 43(1): 39-46.
- [9] CHENG K H, LIU M Y, KAO C H, et al. Newborn screening for methylmalonic aciduria by tandem mass spectrometry: 7 years' experience from two centers in Taiwan[J]. J Chin Med Assoc, 2010, 73(6): 314-318.
- [10] TU W J, CHEN H, HE J. Methylmalonic aciduria: newborn screening in mainland China [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2013, 26(3/4): 399-400.
- [11] 黄新文, 杨建滨, 童凡, 等. 串联质谱技术对新生儿遗传代谢病的筛查及随访研究[J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(10): 765-770.
- [12] HAN B, CAO Z, TIAN L, et al. Clinical presentation, gene analysis and outcomes in young patients with early-treated combined methylmalonic acidemia and homocystinemia (cblC type) in Shandong province, China [J]. Brain Dev, 2016, 38(5): 491-497.
- [13] BAUMGARTNER M R, HORSTER F, DIONISI-VICI C, et al. Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia [J]. Orphanet J Rare Dis, 2014, 9(1): 130.
- [14] MOREL C F, LERNER-ELLIS J P, ROSENBLATT D S. Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): phenotype-genotype correlations and ethnic-specific observations [J]. Mol Genet Metab, 2006, 88(4): 315-321.

- Biochem, 2017, 54(2): 230-239.
- [4] SHIRLEY V C. Standardization and implementation of lab policies ensure hemostasis sample quality[J]. MLO Med Lab Obs, 2016, 48(11): 32.
 - [5] 钟杰, 张国坤, 陈增会. 加强临床检验质量控制提高检验质量[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(6): 757-758.
 - [6] 王莎萍, 王淑琴. 1997—2000 年重庆市临床常规化学室间质评结果分析[J]. 重庆医学, 2001, 30(5): 443-444.
 - [7] 李康, 贺佳. 医学统计学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 127-131.
 - [8] 陈荣剑, 胡炜, 王占科, 等. 重视检验科标本生物安全控制和全程管理[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(17): 2081-2084.
 - [9] 张曼. 积极迎接检验医学发展的挑战: 检验诊断报告相关问题探讨[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(14): 1073-1074.
 - [10] 秦永方. 工作量绩效在公立医院的应用[J]. 中国卫生经济, 2014, 33(11): 79-80.
 - [11] PLEBANI M. Quality in laboratory medicine: 50 years on [J]. Clin Biochem, 2017, 50(3): 101-104.
 - [12] DOLCI A, GIAVARINA D, PASQUALETTI S, et al. Total laboratory automation: do stat tests still matter [J]. Clin Biochem, 2017, 50(10/11): 605-611.
 - [13] 申子瑜. 我国临床实验室质量管理的基本要求[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(11): 700-701.
 - [14] 葛均波, 徐永健, 王辰. 内科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 16.
 - [15] 中国医师协会检验医师分会造血与淋巴瘤组织肿瘤检验医学专家委员会. 造血与淋巴瘤组织肿瘤检验诊断报告模式专家共识[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(12): 918-929.
 - [16] 蒋雁, 杨晓岚, 马红松. 网络化管理下检验科收费误差分析及对策[J]. 中医药管理杂志, 2009, 17(7): 637-638.
 - [17] 叶凯, 何芬莉, 杨小娟, 等. 阳和汤含药血清对乳腺癌干细胞增殖的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2019, 41(1): 49-52.
 - [18] 祝仲珍, 傅颖媛, 腾召纯, 等. IL-12 和 IL-15 对外周血 CIK 细胞增殖和对 SMMC-7721 肝癌细胞杀瘤效果研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5): 521-525.
 - [19] TAN L M, LONG T T, GUAN X L, et al. Diagnostic value of vitamin D status and bone turnover markers in rheumatoid arthritis complicated by osteoporosis[J]. Ann Clin Lab Sci, 2018, 48(2): 197-204.
 - [20] WANG Z K, CHEN R J, WANG S L, et al. Clinical application of a novel diagnostic scheme including pancreatic cell dysfunction for traumatic multiple organ dysfunction syndrome[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 683-693.
 - [21] DEEJAI N, WISANUYOTIN S, NETTUWAKUL C, et al. Molecular diagnosis of solute carrier family 4 member 1 (SLC4A1) mutation-related autosomal recessive distal renal tubular acidosis[J]. Lab Med, 2019, 50(1): 78-86.
 - [22] FAKHR Z A, MEHRZAD V, IZADITABAR A A. Evaluation of the utility of peripheral blood *vs.* bone marrow in karyotype and fluorescence in situ hybridization for myelodysplastic syndrome diagnosis[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(9): e22586.
 - [23] 谢而付, 颜承靖, 戎国栋, 等. 系科合一模式下《临床检验仪器与技术》教学特点及体会[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(6): 765-766.
 - [24] 张巧丹, 尹一兵, 周钦, 等. 医学检验技术专业人才培养模式初步探索[J]. 中华医学教育探索杂志, 2016, 15(3): 230-233.
 - [25] 张红, 金家贵, 彭克军, 等. 四年制医学检验技术专业人才培养模式探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(12): 1742-1743.
 - [26] 王丹丹, 余学飞. 生物医学工程专业《医学检验仪器》课程改革的思考[J]. 继续医学教育, 2016, 30(1): 20-22.
 - [27] 冯络珠, 付玉荣, 伊正君. 医学检验专业基础医学课堂学习效果现状分析[J]. 医学教育研究与实践, 2018, 26(1): 96-100.
 - [28] 乔晋娟, 付玉荣, 高昆山, 等. 信息化技术平台在临床检验仪器学教学中的应用[J]. 卫生职业教育, 2018, 36(16): 79-81.

(收稿日期: 2019-09-28 修回日期: 2020-01-10)

(上接第 1140 页)

- [15] YANG Y, SUN F, SONG J, et al. Clinical and biochemical studies on Chinese patients with methylmalonic aciduria[J]. J Child Neurol, 2006, 21(12): 1020-1024.
- [16] CARRILLO-CARRASCO N, CHANDLER R J, VENDITTI C P. Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type I. Clinical presentations, diagnosis and management [J]. J Inherit Metab Dis, 2012, 35(1): 91-102.
- [17] LIU M Y, YANG Y L, CHANG Y C, et al. Mutation spectrum of MMACHC in Chinese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria [J]. J Hum Genet, 2010, 55(9): 621-626.
- [18] 宇亚芬, 黎芳, 麻宏伟. cblC 型甲基丙二酸血症基因型与临床表型及疗效的关系[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(8): 769-774.
- [19] ZHANG Y, YANG Y L, HASEGAWA Y, et al. Prenatal diagnosis of methylmalonic aciduria by analysis of organic acids and total homocysteine in amniotic fluid[J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(3): 216-219.
- [20] KEYFI F, TALEBI S, VARASTEHE A R. Methylmalonic acidemia diagnosis by laboratory methods[J]. Rep Biochem Mol Biol, 2016, 5(1): 1-14.

(收稿日期: 2019-10-08 修回日期: 2020-02-30)