

• 论 著 •

143 例 Citrin 缺陷导致新生儿肝内胆汁淤积症患儿的血浆氨基酸谱分析*

梅慧芬,蔡燕娜,彭敏芝,卢致琨,林云婷,江敏妍,盛慧英,李秀珍,张 文[△]

广东省广州市妇女儿童医疗中心遗传与内分泌科,广东广州 510623

摘 要:**目的** 探讨 Citrin 缺陷导致的新生儿肝内胆汁淤积症(NICCD)患儿血浆氨基酸谱特点及氨基酸谱与基因型的相关性。**方法** 选取 2004—2019 年在该院确诊的 NICCD 患儿 143 例为 NICCD 组,56 例健康新生儿为对照组,49 例不明原因肝内胆汁淤积症(INH)患儿为 INH 组,对 3 组的各氨基酸水平进行比较,并采用受试者工作特征(ROC)曲线分析部分氨基酸的诊断价值。将 NICCD 患儿分为<6 个月组、6 个月至 1 岁组,比较 2 组瓜氨酸、蛋氨酸、组氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸水平。将 NICCD 患儿按 SLC25A13 基因突变类型分为复合杂合突变组与纯合突变组并进行天冬氨酸、谷氨酸水平比较。**结果** 与对照组、INH 组比较,NICCD 患儿天冬酰胺、组氨酸、瓜氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸水平升高,谷氨酰胺和色氨酸水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与<6 个月的 NICCD 患儿比较,6 个月至 1 岁的 NICCD 患儿瓜氨酸、苏氨酸水平降低,蛋氨酸水平升高($P<0.05$)。瓜氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、酪氨酸用于 NICCD 诊断的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.986(95%CI 0.974~0.998)、0.850(95%CI 0.786~0.915)、0.899(95%CI 0.849~0.949)、0.700(95%CI 0.620~0.781)。瓜氨酸/丝氨酸、瓜氨酸/(亮氨酸+异亮氨酸)、苏氨酸/丝氨酸用于 NICCD 诊断的 AUC 分别为 0.968(95%CI 0.946~0.991)、0.984(95%CI 0.970~0.998)、0.896(95%CI 0.833~0.960)。NICCD 患儿纯合突变组的天冬氨酸、谷氨酸水平比复合杂合突变组高($P<0.05$)。**结论** 血浆氨基酸谱分析是筛查和诊断 NICCD 的一种灵敏、快速的方法,较为灵敏的诊断指标为瓜氨酸、瓜氨酸/(亮氨酸+异亮氨酸)。

关键词:氨基酸类; 新生儿肝内胆汁淤积症; SLC25A13 基因; Citrin 蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.03.004

中图法分类号:R725

文章编号:1673-4130(2022)03-0269-06

文献标志码:A

Analysis of plasma amino acid profile in 143 neonates with neonatal intrahepatic cholestasis caused by Citrin deficiency*

MEI Huifen, CAI Yanna, PENG Minzhi, LU Zhikun, LIN Yunting, JIANG Minyan, SHENG Huiying, LI Xiuzhen, ZHANG Wen[△]

Department of Genetics and Endocrinology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China

Abstract:**Objective** To investigate the characteristics of plasma amino acid profile and the correlation between amino acid profile and genotype in children with neonatal intrahepatic cholestasis (NICCD) caused by Citrin deficiency. **Methods** 143 children with NICCD diagnosed in our hospital from 2004 to 2019 were enrolled as NICCD group, 56 healthy newborns were selected as control group, and 49 children with unexplained intrahepatic cholestasis (INH) children were enrolled as INH group. The amino acid levels of the three groups were compared, and receiver operating characteristic (ROC) curves were used to analyze the diagnostic value of some amino acids. Children with NICCD were divided into <6 months group and 6 months to 1 year old group. The levels of citrulline, methionine, histidine, threonine, leucine and isoleucine were compared between the two groups. Children with NICCD were divided into compound heterozygous mutation group and homozygous mutation group according to the type of SLC25A13 gene mutation, and the levels of aspartate and glutamate were compared. **Results** Compared with normal control group and INH group, the levels of asparagine, histidine, citrulline, methionine, threonine, tyrosine, aspartic acid, ornithine, lysine, arginine and serine in

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81800789、81802125);广东省医学科学技术研究基金项目(A2019376)。

作者简介:梅慧芬,女,主治医师,主要从事儿童遗传代谢性疾病和内分泌疾病相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhw2001zhw@126.com。

本文引用格式:梅慧芬,蔡燕娜,彭敏芝,等. 143 例 Citrin 缺陷导致新生儿肝内胆汁淤积症患儿的血浆氨基酸谱分析[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(3): 269-274.

NICCD children increased, and the levels of glutamine and tryptophan decreased ($P < 0.05$). Compared with children with NICCD less than 6 months old, the levels of citrulline and threonine in children with NICCD from 6 months to 1 year were decreased, and the level of methionine was increased ($P < 0.05$). The area under ROC curve (AUC) of citrulline, methionine, threonine and tyrosine for the diagnosis of NICCD were 0.986 (95%CI 0.974–0.998), 0.850 (95%CI 0.786–0.915), 0.899 (95%CI 0.849–0.949) and 0.700 (95%CI 0.620–0.781), respectively. The AUC of citrulline/serine, citrulline/(leucine+isoleucine) and threonine/serine for the diagnosis of NICCD were 0.968 (95%CI 0.946–0.991), 0.984 (95%CI 0.970–0.998) and 0.896 (95%CI 0.833–0.960), respectively. The levels of aspartate and glutamate in the homozygous mutation group were higher than those in the compound heterozygous mutation group ($P < 0.05$). **Conclusion** Plasma amino acid profile analysis is a sensitive and rapid method for screening and diagnosing NICCD. The more sensitive diagnostic indicators are citrulline, citrulline/(leucine+isoleucine).

Key words: amino acids; neonatal intrahepatic cholestasis; SLC25A13 gene; Citrin protein

Citrin 是线粒体内钙结合天冬氨酸/谷氨酸的载体亚型 2 蛋白, 主要功能是将线粒体内的天冬氨酸转运至胞质, 参与尿素循环。Citrin 缺陷会导致患儿在婴儿期出现新生儿肝内胆汁淤积症(NICCD), 为常染色体隐性遗传疾病, 致病基因为 SLC25A13^[1]。该病首先在日本被发现, 在日本、中国、韩国等亚洲国家及欧洲部分国家均有报道, 东亚人群发病率较高, 其中中国发病率为 1/65, 日本发病率为 1/69, 韩国发病率为 1/112^[2]。研究显示 NICCD 在我国是各种伴氨基酸血症的婴儿肝内胆汁淤积症的重要病因^[3]。Citrin 缺陷所致的 NICCD 患儿主要临床表现为持续性黄疸、肝脾肿大、生长迟缓、低血糖、肝功能异常、凝血功能障碍、低蛋白血症等。大多数患儿在 1 岁左右其临床症状会消失, 但是有近 20% 的患儿可逐渐进展为致命性的成人 II 型瓜氨酸血症(CTLN2)^[4]。因此, NICCD 患儿的早诊断, 早治疗对预防 CTLN2 意义重大。

NICCD 患儿在发病期常会检测到血浆氨基酸水平异常, 表现为血浆瓜氨酸、鸟氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、苏氨酸水平升高。目前国内外大多采用干血滤纸片-串联质谱法对 11 种氨基酸水平进行半定量分析, 该法在筛查和诊断 NICCD 的准确性及可靠性上有待进一步评估^[5-6]。有报道指出新生儿进行 NICCD 筛查时的检出率低于 40%^[5]。如此低的检出率与标本采集时间有关: NICCD 患儿大多在 1~4 月龄才因黄疸被注意到, 出生后 3 d 采集的标本可能检测不到氨基酸谱的改变。目前 NICCD 的临床诊断标准尚未确定, 确诊依赖于 SLC25A13 基因检测。为了提高 NICCD 诊断的速度和灵敏度, 本研究分析 NICCD 患儿与健康婴幼儿、不明原因肝内胆汁淤积症(INH) 儿童血浆氨基酸谱改变特点, 氨基酸水平与年龄、基因型的关系, 旨在为临床早期诊断 NICCD 提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2004—2019 年在本院因婴儿肝炎综合征或胆汁淤积症就诊的 143 例 NICCD 患儿作为 NICCD 组。所有患儿均经 SLC25A13 基因测序, 确定患儿存在纯合或复合杂合致病突变。143 例

NICCD 患儿发病年龄在 3 天至 1 岁, 平均年龄 (3.56 ± 0.17) 个月; 男性患儿 74 例, 占 51.7%; 女性患儿 69 例, 占 48.3%。随机选取同期 56 例年龄、性别相匹配的健康婴幼儿作为对照组, 年龄在 1 个月至 1 岁, 经体格检查、血常规、尿常规、大便常规、谷氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转移酶(γ -GGT)、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)、间接胆红素(TBil)水平检测结果均正常。选取同期 49 例年龄、性别相匹配的 INH 患儿作为 INH 组, 排除先天性胆道闭锁、中毒、感染和其他已知遗传代谢性疾病(如进行性家族性肝内胆汁淤积症等), 并经基因测序排除 SLC25A13 基因突变。本研究经本院医学伦理委员会的批准, 征得患儿法定监护人同意。

1.2 仪器与试剂 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司 1200 系列, 四元高压泵, 荧光检测器), 氮吹仪(天津奥德赛恩斯仪器公司, MTN2800D-24), 流动相 A 为磷酸盐缓冲液(美国安捷伦公司), 流动相 B 为甲醇、乙腈、水(美国西格玛公司, HPLC 级), 氨基酸混合标准品(美国西格玛公司), 邻苯二甲醛/9-氯甲酸苄甲酯(美国安捷伦公司), Lab-Aid 820 核酸提取试剂盒(厦门致善生物科技股份有限公司), SLC25A13 基因引物(北京六合华大基因科技有限公司), TaKaRa Ex Taq[®] 试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司]。

1.3 方法

1.3.1 血浆氨基酸水平分析 清晨空腹采集受试者外周静脉血 2 mL, 采用乙二胺四乙酸二钠抗凝, 采集后 2 h 内冷藏送检, 常温下 3 000 r/min 离心 5 min, 吸取血浆于 -20°C 冰箱保存待测。甲醇去蛋白, 取上清液, 氮气吹干, 水复溶后上机检测。校准曲线采用氨基酸混合标准品进行校准, 采用邻苯二甲醛/9-氯甲酸苄甲酯对血浆标本进行柱前衍生化, 用 C18 反相氨基酸柱对血浆标本进行梯度洗脱和 22 种氨基酸水平分析^[7]。

1.3.2 SLC25A13 基因突变 抽取患儿静脉全血 2 mL, 置于乙二胺四乙酸二钠抗凝管中, 轻轻摇匀后 -80°C 冰箱冻存备用。采用核酸提取试剂盒提取患儿外周血基因组 DNA, 采用 TaKaRa Ex Taq[®] 试剂盒

进行 PCR 扩增,反应体系为 10 × Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus)2.5 μL,dNTP Mixture 2 μL,Ex Taq 酶 0.125 μL,加双蒸水至总体积 25 μL。扩增条件为 95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 50 s,循环 35 次;72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μL 扩增产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定条带,确定为目的条带后,产物送至北京六合华大基因科技有限公司进行 Sanger 直接测序,方法参考文献[8]。

1.3.3 各组氨基酸水平比较 比较各氨基酸在 NICCD 组、对照组、INH 组间的水平差异。将所有受试者按年龄分为<6 个月,6 个月至 1 岁这两个年龄段,比较不同年龄段各组氨基酸的水平差异,分析氨基酸与年龄的相关性;按突变类型分为纯合突变组和复合杂合突变组,比较各氨基酸水平在两组间的差异。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件对数据进行处理和分析。不呈正态分布的资料以 $M(P_{25},P_{75})$ 表示,组间比较采用秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。对明显升高或降低的氨基酸及比值进一步采用受试者工作特征(ROC)曲线分析。采用 Pearson 相关分析研究患者年龄与氨基酸谱水平的关系。

2 结 果

2.1 143 例 NICCD 患儿基因型结果 通过 SLC25A13 基因检测发现 68.5%(98/143)的患儿携带纯合突变,31.5%(45/143)的患儿携带复合杂合突变。共检出 SLC25A13 基因突变中有 15 种已知致病突变,其中 c.851_854del、c.851_854del/c.1638_1660dup、c.851_854del/IVS6+5G>A 为热点突变,携带率分别为 65.0%、11.9%、11.2%。见表 1。

2.2 对照组、INH 组、NICCD 组 22 种氨基酸水平比较 与对照组、INH 组比较,NICCD 组患儿血浆中天冬酰胺、组氨酸、瓜氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸水平均升高

($P<0.05$),瓜氨酸水平升高尤其明显;谷氨酰胺和色氨酸水平均明显降低($P<0.05$)。见表 2。

2.3 对照组、INH 组、NICCD 组 4 种氨基酸比值比较 与对照组、INH 组比较,NICCD 组患儿血浆中瓜氨酸/丝氨酸、瓜氨酸/(亮氨酸+异亮氨酸)、苏氨酸/丝氨酸明显升高($P<0.05$),见表 3。

2.4 <6 个月、6 个月至 1 岁部分氨基酸水平比较 与<6 个月的 NICCD 患儿比较,6 个月至 1 岁的 NICCD 患儿瓜氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸水平降低($P<0.05$);蛋氨酸、组氨酸水平升高($P<0.05$)。见图 1。

表 1 143 例 NICCD 患儿基因型结果[n(%)]		
基因突变	类型	携带率
纯合突变		
c.851_854del	移码	93(65.0)
c.1638-1660dup	移码	4(2.8)
IVS6+5G>A homozygous	剪切	1(0.7)
复合杂合突变		
c.851_854del/IVS6+5G>A	移码+剪切	16(11.2)
c.851_854del/c.1638_1660dup	移码	17(11.9)
c.851_854del/c.631delA (p. Thr211Hisfs*)	移码	1(0.7)
c.851_854de/c.1095delT (p. Phe365Leufs*)	移码	1(0.7)
c.851_854del/c.1231G>A(p. Val411Met)	移码+错义	1(0.7)
c.851_854del4/c.475C>T(p. Gln159*)	移码+无义	1(0.7)
c.851_854del/c.640C>T(p. Gln214*)	移码+无义	1(0.7)
c.851_854del/c.1775A>C(p. Gln592Pro)	移码+错义	1(0.7)
c.851_854del/c.1402C>T(p. Arg468*)	移码+无义	1(0.7)
c.1638_1660dup/IVS6+5G>A	移码+剪切	3(2.1)
IVS11+1G>A/c.1638_1660dup	移码+剪切	1(0.7)
IVS6+5G>A/c.1763G>A(p. Arg588Gln)	剪切+错义	1(0.7)

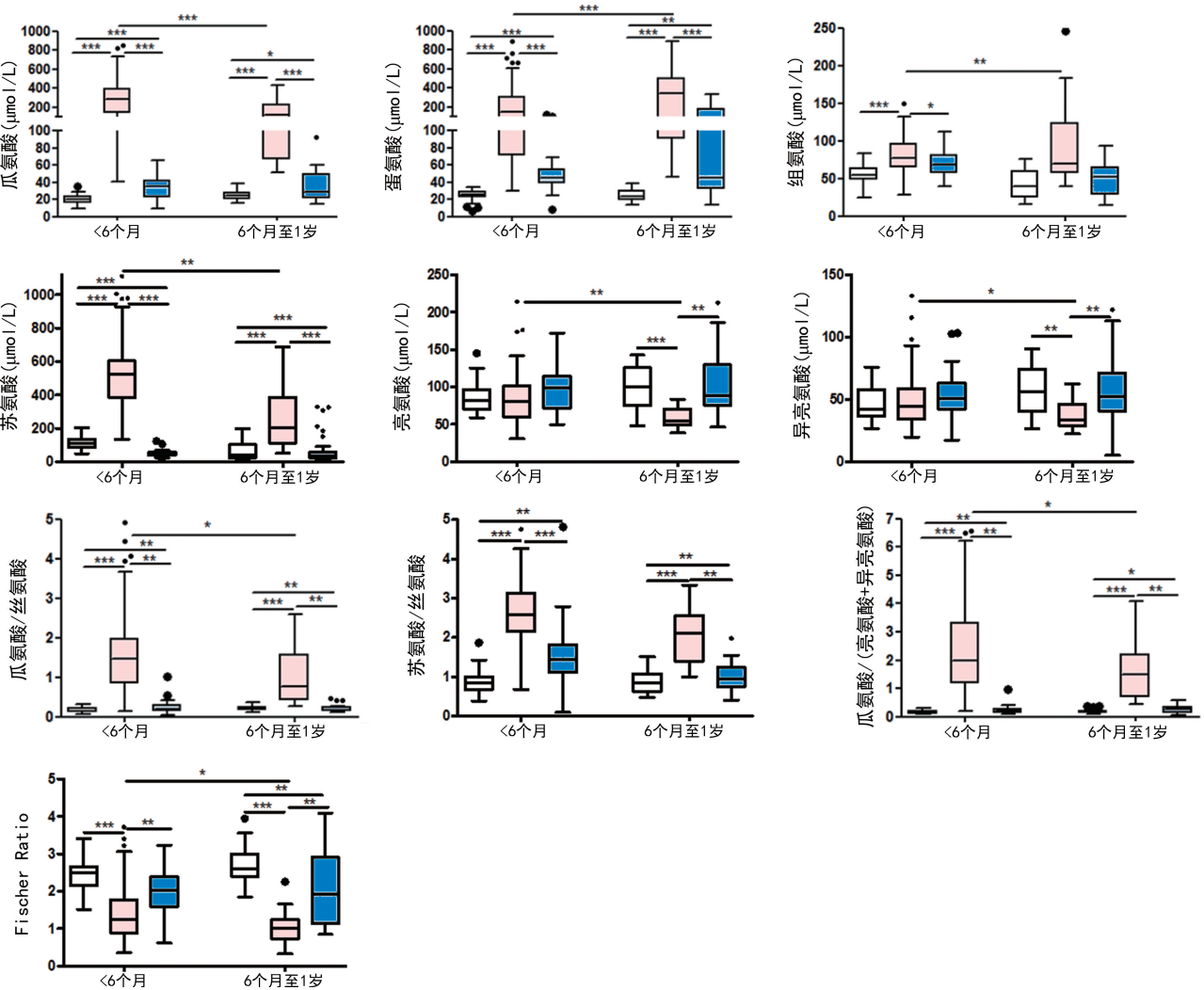
表 2 对照组、INH 组、NICCD 组 22 种氨基酸水平比较[M(P₂₅,P₇₅),μmol/L]

项目	对照组(n=56)	NICCD 组(n=143)	INH 组(n=49)	U	P
丙氨酸	305.20(269.20,366.40)	274.60(220.90,336.90)	369.60(286.40,491.70)	26.85	<0.001
精氨酸	44.05(34.28,53.68)	108.40(80.90,148.10)	51.50(41.45,66.85)	111.60	<0.001
天冬酰胺	46.60(39.45,52.43)	64.80(53.53,80.43)	52.90(48.25,72.20)	63.16	<0.001
天冬氨酸	4.20(2.78,5.40)	7.05(5.10,10.68)	6.60(5.40,9.55)	48.95	<0.001
瓜氨酸	21.45(17.30,26.05)	268.10(130.40,387.20)	31.80(21.65,43.00)	180.80	<0.001
谷氨酰胺	430.70(381.70,485.10)	224.80(168.70,282.40)	479.40(380.90,584.20)	146.40	<0.001
谷氨酸	84.45(66.68,105.50)	105.20(81.30,146.20)	106.20(77.80,132.60)	15.17	<0.001
甘氨酸	141.30(127.20,167.20)	160.00(134.00,196.20)	202.40(149.00,241.80)	22.08	<0.001
组氨酸	57.10(50.35,64.38)	76.20(63.05,92.52)	64.20(54.60,77.80)	47.25	<0.001
羟脯氨酸	28.10(22.18,36.30)	26.75(18.38,40.60)	28.20(18.50,55.25)	1.73	0.421
异亮氨酸	45.80(37.80,60.70)	43.65(33.18,57.63)	51.70(42.50,68.45)	9.32	0.009
亮氨酸	84.35(71.65,102.60)	77.20(59.15,100.40)	94.10(73.80,114.60)	13.38	0.001
赖氨酸	90.30(73.30,120.90)	255.00(190.60,357.50)	156.90(102.50,227.30)	109.30	<0.001
蛋氨酸	24.55(20.20,28.90)	157.10(74.98,335.30)	45.10(34.50,62.90)	154.70	<0.001
鸟氨酸	56.80(45.78,71.15)	135.30(96.10,177.00)	90.10(54.70,144.50)	89.00	<0.001

续表 2 对照组、INH 组、NICCD 组 22 种氨基酸水平比较[M(P ₂₅ , P ₇₅), μmol/L]					
氨基酸	对照组(56)	NICCD 组(143)	INH 组(49)	U	P
苯丙氨酸	49.50(43.18, 53.70)	58.95(42.40, 74.63)	59.80(47.95, 72.30)	12.54	0.002
脯氨酸	143.60(127.10, 194.50)	197.50(144.70, 265.90)	173.20(152.60, 287.70)	18.01	<0.001
丝氨酸	121.70(110.80, 138.90)	184.70(150.70, 232.80)	150.40(130.50, 196.10)	76.27	<0.001
苏氨酸	107.20(82.43, 134.60)	513.50(366.70, 601.40)	200.90(139.60, 241.10)	157.70	<0.001
色氨酸	51.45(42.10, 58.40)	22.50(16.70, 31.80)	51.60(36.90, 62.05)	117.20	<0.001
酪氨酸	57.45(49.28, 68.65)	161.90(109.00, 235.80)	89.30(72.40, 148.30)	84.16	<0.001
缬氨酸	134.30(111.40, 162.30)	140.20(107.90, 168.80)	145.90(120.20, 184.20)	3.50	0.174

表 3 对照组、INH 组、NICCD 组 4 种氨基酸比值比较[M(P ₂₅ , P ₇₅)]					
项目	对照组(n=56)	NICCD 组(n=143)	INH 组(n=49)	U	P
瓜氨酸/丝氨酸	0.18(0.14, 0.22)	1.40(0.78, 1.95)	0.18(0.14, 0.28)	167.0	<0.001
瓜氨酸/(亮氨酸+异亮氨酸)	0.16(0.11, 0.20)	1.93(1.12, 3.22)	0.24(0.14, 0.30)	176.8	<0.001
苏氨酸/丝氨酸	0.85(0.64, 1.05)	2.56(2.08, 3.11)	1.22(0.87, 1.66)	150.2	<0.001
Fischer Ratio	2.51(2.29, 2.92)	1.24(0.88, 1.74)	2.02(1.34, 2.44)	91.4	<0.001

注:Fischer Ratio 为(缬氨酸+异亮氨酸+亮氨酸)/(酪氨酸+苯丙氨酸)。



注:Fischer Ratio 为(缬氨酸+异亮氨酸+亮氨酸)/(酪氨酸+苯丙氨酸); * 为 $P<0.05$; ** 为 $P<0.01$; *** 为 $P<0.001$; • 为极端值; 各年龄段从左至右依次为对照组、NICCD 组、INH 组。

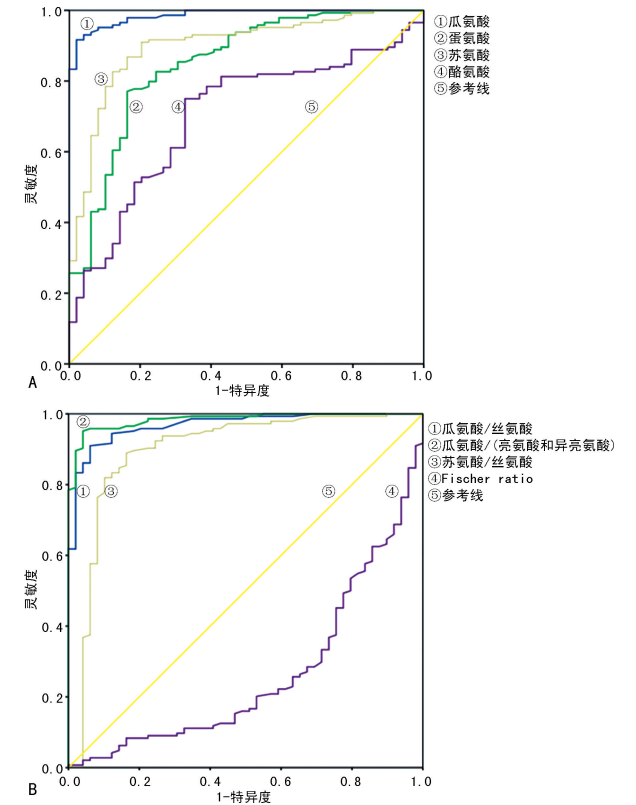
图 1 <6 个月、6 个月至 1 岁 NICCD 患儿部分氨基酸水平及比值的比较

2.5 瓜氨酸与年龄的相关性 结果显示瓜氨酸与年龄呈负相关($r=-0.31, P<0.01$)。

2.6 部分氨基酸及比值用于 NICCD 诊断的 ROC 曲

线分析 对瓜氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、酪氨酸用于 NICCD 诊断的 ROC 曲线分析,曲线下面积(AUC)分别为 0.986(95%CI 0.974~0.998)、0.850(95%CI

0.786~0.915)、0.899(95%CI 0.849~0.949)、0.700(95%CI 0.620~0.781);最佳临界值分别为66.40、70.75、329.55、111.00 μmol/L;灵敏度分别为91.0%、77.1%、82.6%、75.0%;特异度分别为98.0%、83.7%、87.8%、67.3%,见图2A。对瓜氨酸/丝氨酸、瓜氨酸/(亮氨酸+异亮氨酸)、苏氨酸/丝氨酸用于NICCD诊断进行ROC曲线分析,AUC分别为0.968(95%CI 0.946~0.991)、0.984(95%CI 0.970~0.998)、0.896(95%CI 0.833~0.960);最佳临界值分别为0.415、0.465、1.785;灵敏度分别为91.0%、95.1%、88.9%;特异度分别为93.9%、95.9%、83.7%。Fischer Ratio的AUC为0.262(95%CI 0.182~0.342);灵敏度和特异度分别为44.4%、24.5%。见图2B。



注:A为部分氨基酸用于NICCD诊断的ROC曲线分析;B为部分氨基酸比值用于NICCD诊断的ROC曲线分析。

图2 NICCD组部分氨基酸及比值的ROC曲线分析

2.7 NICCD患儿纯合突变组和复合杂合突变组天冬氨酸、谷氨酸水平比较 NICCD患儿纯合突变组的天冬氨酸、谷氨酸水平比复合杂合突变组高($P<0.05$),见表4。

表4 NICCD患儿纯合突变组和复合杂合突变组天冬氨酸、谷氨酸水平比较[$M(P_{25}, P_{75})$, μmol/L]

组别	n	天冬氨酸	谷氨酸
纯合突变组	98	7.50(5.40,11.30)	111.70(86.45,153.00)
复合杂合突变组	45	6.10(4.53,8.58)	90.20(67.45,116.50)
U		1297	1309
P		<0.001	<0.001

3 讨论

有研究发现NICCD患儿血浆多种氨基酸水平异常,包括瓜氨酸水平异常升高,可作为诊断NICCD的重要线索之一^[1]。但是其他原因引起的肝病也可造成继发性血浆氨基酸谱异常,因此要制订NICCD氨基酸谱的诊断标准。本研究显示与正常对照组、INH组比较,NICCD组患儿与尿素循环有关的氨基酸,包括鸟氨酸、瓜氨酸、精氨酸、天冬酰胺,天冬氨酸水平均明显升高,谷氨酰胺水平降低($P<0.05$),与相关研究相符^[6,9]。有研究表明,谷氨酸、谷氨酰胺水平降低与谷氨酸在三羧酸循环中的柠檬酸前体利用有关^[10]。与对照组、INH组比较,NICCD组患儿生糖氨基酸,包括丝氨酸、苏氨酸、组氨酸、蛋氨酸水平均明显升高($P<0.05$),与相关研究相符^[6,9]。NICCD组患儿甘氨酸、丙氨酸水平较INH组降低,可能与NADH大量堆积可抑制乳酸等还原物质的糖异生过程有关,也可能与柠檬酸缺乏时丙氨酸代谢成丙酮酸,从而导致NICCD患儿低血糖有关^[11-12]。与对照组、INH组比较,NICCD组患儿生酮氨基酸包括赖氨酸、酪氨酸水平升高($P<0.05$),与相关研究相符^[6];与对照组比较,NICCD组患儿苯丙氨酸水平升高,但与INH组比较,NICCD组患儿苯丙氨酸水平无明显变化,但NICCD组患儿色氨酸水平降低,可能与丙氨酸水平降低,需要色氨酸代谢补偿作用有关^[10]。

缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸这些支链氨基酸降解为琥珀酰辅酶A和(或)乙酰辅酶A,主要在骨骼肌中产生能量。SAHEKI等^[12]报道NICCD患儿支链氨基酸水平降低。本研究中与对照组比较,NICCD组患儿缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸水平无明显变化,可能与研究对象大部分年龄<6个月,处于疾病早期有关,未出现支链氨基酸分解代谢。NICCD患儿的异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸水平较INH组明显降低,提示NICCD患儿支链氨基酸水平的特征性变化可能与患儿长期低血糖出现代谢补偿作用有关^[12]。本研究的NICCD患儿瓜氨酸水平与年龄呈负相关,与SAHEKI等^[12]研究相符。但本研究NICCD患儿苏氨酸水平在6个月至1岁较<6个月水平降低,而蛋氨酸水平在6个月至1岁较<6个月升高。CHEW等^[13]研究发现,有部分患儿分别在14个月、16个月甚至在22个月蛋氨酸水平才出现缓解。因此,在分析氨基酸谱时,若瓜氨酸水平没明显升高,但蛋氨酸、苏氨酸水平出现明显变化仍需结合年龄考虑NICCD的可能,进一步行SLC25A13基因分析。

本研究显示瓜氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、酪氨酸具有较好的诊断价值,能区分NICCD和其他疾病因引起的婴儿胆汁淤积症,与相关研究相符^[9]。其中以瓜氨酸诊断价值最高,瓜氨酸水平为66.40 μmol/L时,灵敏度和特异度分别为91.0%、98.0%。TAMAMORI等^[14]发现在进行新生儿筛查时瓜氨酸/丝氨酸、瓜氨

酸/(亮氨酸+异亮氨酸)有更好的诊断价值。而本研究也发现瓜氨酸/(亮氨酸+异亮氨酸)的诊断价值较高。由此可见,氨基酸比值可提高诊断灵敏度和特异度。本研究共检出 SLC25A13 基因突变 15 种,其中 c. 851_854del 占比为 65.0%,该突变目前在我国南方是 SLC25A13 突变携带者最常见的突变类型^[2]。纯合突变组的 NICCD 患儿天冬氨酸、谷氨酸水平较复合杂合突变组高($P<0.05$),其原因可能为不同的 SLC25A13 基因突变对 Citrin 蛋白功能造成的影响不同,下一步需从蛋白水平证实以上假设。

综上所述,血浆氨基酸谱分析是筛查和诊断 NICCD 的一种灵敏、快速的方法,其中较为灵敏的诊断指标为瓜氨酸和瓜氨酸/(亮氨酸+异亮氨酸);NICCD 患儿瓜氨酸水平变化与年龄有关。

参考文献

[1] ABUDUXIKUER K, CHEN R, WANG Z L, et al. Risk factors associated with mortality in neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD) and clinical implications[J]. BMC Pediatr, 2019, 19(1): 18.

[2] LIN W X, ZENG H S, ZHANG Z H, et al. Molecular diagnosis of pediatric patients with citrin deficiency in China; SLC25A13 mutation spectrum and the geographic distribution[J]. Sci Rep, 2016, 11: 1-12.

[3] FU H Y, ZHANG S R, WANG X H, et al. The mutation spectrum of the SLC25A13 gene in Chinese infants with intrahepatic cholestasis and aminoacidemia[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(4): 510-518.

[4] NUMAKURA C, TAMIYA G, UEKI M, et al. Growth impairment in individuals with citrin deficiency[J]. J Inherit Metab Dis, 2019, 42(3): 501-508.

[5] 唐诚芳, 冯毅, 徐伟, 等. 广州市 Citrin 缺乏症新生儿筛查及 SLC25A13 基因变异分子流行病学特征[J]. 中华实用

儿科临床杂志, 2020, 35(11): 4.

[6] HEE-OH S, LEE B H, KIM G H, et al. Biochemical and molecular characteristics of citrin deficiency in Korean children[J]. J Hum Genet, 2017, 62(2): 305-307.

[7] PENG Y, LIU L, MEI H F, et al. Establishment of reference range of plasma amino acids for younger Chinese children by reverse phase HPLC[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2011, 24(9/10): 733-738.

[8] 卢致琨, 刘丽, 李端, 等. Citrin 蛋白缺陷所致新生儿肝内胆汁淤积症患儿 SLC25A13 基因突变分析[J]. 中华实用儿科杂志, 2018, 33(8): 615-617.

[9] 付海燕, 王晓红, 陆怡. Citrin 缺陷导致婴儿肝内胆汁淤积症的血浆氨基酸谱特点[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(12): 934-939.

[10] DANG C V. Glutaminolysis: supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells[J]. Cell Cycle, 2010, 9(19): 3884-3886.

[11] OKANO Y, OHURA T, SAKAMOTO O, et al. Current treatment for citrin deficiency during NICCD and adaptation/compensation stages: strategy to prevent CTLN2[J]. Mol Genet Metab, 2019, 127(3): 175-183.

[12] SAHEKI T, KOBAYASHI K, TERASHI M, et al. Reduced carbohydrate intake in citrin-deficient subjects[J]. J Inherit Metab Dis, 2008; 31(3): 386-394.

[13] CHEW H B, NGU L H, ZABEDAH M Y, et al. Neonatal intrahepatic cholestasis associated with citrin deficiency (NICCD): a case series of 11 Malaysian patients[J]. J Inherit Metab Dis, 2010, 33(3): 489-495.

[14] TAMAMORI A, FUJIMOTO A, OKANO Y et al. Effects of citrin deficiency in the perinatal period: feasibility of newborn mass screening for citrin deficiency[J]. Pediatr Res, 2004, 56(4): 608-614.

(收稿日期: 2021-05-22 修回日期: 2021-11-08)

(上接第 268 页)

[5] 孙琳, 尹青琴, 苗青, 等. 干扰素 γ 释放试验和结核菌素皮肤试验诊断筛查儿童结核病和潜伏结核感染研究 Meta 分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2012, 27(11): 825-829.

[6] 陈晶, 张裕娴, 芮勇宇. γ -干扰素释放试验在结核病诊断中的应用价值[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(3): 255-258.

[7] 殷晓云, 朱晓燕, 朱捷, 等. 多种免疫学检测方法在诊断肺结核与肺外结核时的效能分析[J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(9): 1660-1664.

[8] 李强, 饶常红, 黄渤. γ -干扰素释放试验、荧光定量 PCR、结核菌素皮肤试验联合检测对涂阴性肺结核的诊断价值[J]. 中国医学创新, 2017, 14(33): 4-8.

[9] TANG Y, YIN L, TANG S, et al. Application of molecular, microbiological, and immunological tests for the diagnosis of bone and joint tuberculosis[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(2): e22260.

[10] LI S, LIN L, ZHANG F, et al. A retrospective study on Xpert MTB/RIF for detection of tuberculosis in a teach-

ing hospital in China[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 362.

[11] 李晓伟, 杨伟, 赵先进. 环介导等温扩增技术在肺结核诊断中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(18): 2613-2614.

[12] 刘兰瑞, 张永强, 张原, 等. 3 种分子新诊断技术与传统培养技术检测结核分枝杆菌阳性率比较[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(11): 1854-1855.

[13] 马进宝, 马婷婷, 任斐. 涂阳肺结核患者干扰素释放试验假阴性的影响因素分析[J]. 中国防痨杂志, 2020, 42(12): 1299-1304.

[14] 尹诗林, 徐祖辉, 徐慧, 等. 湘潭农村居民结核潜伏感染现状 & 影响因素研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(6): 509-513.

[15] 边泽源, 杨云红, 吴芝炜, 等. γ 干扰素释放试验在 HIV 合并 TB 感染中的应用价值[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(20): 1012-1014.

(收稿日期: 2021-04-12 修回日期: 2021-09-28)