

• 短篇论著 •

2015—2017 年新生儿原发性肉碱吸收障碍串联质谱法回顾性分析*

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

中国人民解放军总医院医学创新研究部出生缺陷防控技术研究中心, 北京 100853

摘 要:目的 探讨串联质谱法在新生儿原发性肉碱吸收障碍(CUD)中的应用。方法 使用串联质谱分析技术检测 2015—2017 年在该院进行新生儿游离肉碱及酰基肉碱标本 10.9 万份,并对二次召回游离肉碱(C0)依然降低的患儿肉碱转运蛋白基因进一步测序确诊。结果 串联法初筛发现了 124 例疑似原发肉碱吸收障碍的患儿,通过测序确诊 3 例原发肉碱吸收障碍的患儿均检测到 SLC22A5 基因突变,1 例纯合突变,2 例杂合突变。患儿血游离肉碱水平均低于参考值,且不同种类的酰基肉碱水平均有下降。结论 串联质谱分析技术对新生儿原发性肉碱吸收障碍的诊断有重要的提示意义,联合基因测序技术对新生儿遗传代谢病的早期诊断、治疗及预后意义重大。

关键词:原发性肉碱吸收障碍; SLC22A5; 新生儿; 串联质谱

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.03.026

中图法分类号:R722.1

文章编号:1673-4130(2022)03-0375-03

文献标志码:A

原发性肉碱吸收障碍(CUD)又称原发性肉碱缺乏症或肉碱转运障碍,是常染色体隐性遗传的脂肪酸 β 氧化代谢病,是一种与细胞线粒体有关的疾病^[1]。CUD 是由于 SLC22A5 基因(位于染色体 5q31.1 上,约 30 kb)突变导致细胞膜有机阳离子转运体 2(OC-TN2)缺陷,造成多个组织受累包括骨骼肌、心肌、脑和肾脏等组织内肉碱水平不足以支持长链脂肪酸进入线粒体参与氧化^[2]。CUD 发生率约为 0.8/10 万~2.5/10 万,不同地区发生率存在差异,其为脂肪酸氧化代谢的常见疾病^[3]。

本研究采用血液串联质谱(MSMS)筛查的方法,对 10.9 万份各地标本进行初筛,现对这部分标本的肉碱检测结果作回顾性分析报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015—2017 年于本院出生缺陷防控技术研究中心进行新生儿 MSMS 筛查的 10.9 万份滤纸干血片标本,在新生儿父母签署知情同意书的前提下,用 MSMS 进行多种氨基酸、肉碱和琥珀酰丙酮的检测分析,标本来源于四川、新疆、西藏、贵州、湖北、北京出生的新生儿。

1.2 仪器与试剂 使用美国 Waters Xevo TQD 质谱仪、美国 Waters 2777 自动进样系统、1525u 高效液相仪、孵浴震荡仪、美国 PerkinElmer 流动相和萃取溶剂试剂盒(含甲醇、水和草酸)、美国 PerkinElmer 非衍生化串联质谱试剂盒、琥珀酰丙酮内标液进行前处理并上机检测。

1.3 方法

1.3.1 MSMS 试验分析 用包含稳定同位素标记的氨基酸、酰基肉碱和琥珀酰丙酮的内标准品的溶剂萃取滤纸干血片中的氨基酸、游离肉碱(C0)和酰基肉碱,然后用 MSMS 系统分析。具体操作步骤如下:用 1 mL 萃取液溶解内标干粉制成储备工作液,于 2~8℃保存待用。用直径 3 mm 打孔钳打取滤纸片至 96 孔板中,按照萃取液与内标液 110:1 的比例配制萃取工作液,每孔加入含氨基酸和酰基肉碱同位素内标工作液 100 μ L,45℃,700 r/min 密封孵育震荡 45 min,提取 80 μ L 萃取液转移至 V 型底的 96 孔板内,铝膜覆盖,放置在自动进样器上静置 2 h 后即可检测^[4]。采用美国 Waters 公司 Masslynx 软件处理数据,由已知水平的内标自动计算出所测样品的氨基酸、酰基肉碱和琥珀酰丙酮的水平。同一标本异常指标 2 次结果均超过参考值,判为筛查阳性者立即召回。对 C0 偏低的患儿母亲同时进行血液酰基肉碱水平分析。

1.3.2 SLC22A5 基因测序分析 筛查出新生儿阳性标本(C0 水平低于 9.5 μ mol/L),采用干血片法提取基因组 DNA,进行全外显子测序(WES),测序结果与人类基因组 SLC22A5 基因序列进行比较^[5]。

1.4 统计学处理 运用 GraphPad Prism 6.0 软件和 Excel2016 软件进行统计分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

在 10.9 万份筛查标本中初次筛查提示 CUD(或继发性肉碱吸收障碍)124 例,其中男 54 例、女 70 例,

* 基金项目:国家重点研发计划项目(SQ2020YFF0426571、2017YFC1001700);北京市科技新星计划(Z181100006218038)。

[△] 通信作者, E-mail: tiany. p@301hospital. com. cn。

平均年龄 (164. 40 ± 16. 18) d, 平均体质量 (3 346. 00± 54. 49) g, 平均 C0 为 (6. 27 ± 0. 16) μmol/L, 本实验室 C0 的参考范围为 9. 5 ~ 48. 0 μmol/L。共召回 39 例患儿标本再次进行二次筛查, 最终对确定 6 例疑似患儿进行基因确诊, 其中 3 例提示基因突变, 对应 C0 及酰基肉碱谱水平见表 1。3 例患儿 SLC22A5 基因诊断到 2 种突变, 2 例 c. 1400C> G(p. S467C) 杂合突变和 1 例 c. 51C> G(p. F17L) 纯合突变, 见表 2。病例 1 患儿因丙二酰基肉碱水平升

高召回, 基因检测发现另有 SLC22A5 基因 c. 1400C> G(p. S467C) 杂合突变, C0 水平为 12. 37 μmol/L。病例 2 患儿 C0 水平为 4. 14 μmol/L, 召回基因检测发现 SLC22A5 基因 c. 1400C> G(p. S467C) 杂合突变, 肉碱及酰基肉碱谱整体降低。病例 3 患儿 C0 水平为 3. 57 μmol/L, 召回基因检测发现 SLC22A5 基因 c. 51C> G(p. F17L) 纯合突变, 肉碱及酰基肉碱谱整体降低明显。

表 1 3 例 CUD 患儿 C0 及酰基肉碱谱水平 (μmol/L)

病例	C0	C2	C3	C4	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
1	12. 37	15. 63	1. 73	0. 16	0. 07	0. 03	0. 04	0. 05	0. 06	0. 11	2. 58	0. 73
2	4. 14	3. 15	0. 48	0. 1	0. 03	0. 01	0. 01	0. 01	0. 02	0. 05	0. 69	0. 29
3	3. 57	1. 23	0. 21	0. 04	0. 01	0. 01	0. 01	0. 01	0. 01	0. 01	0. 16	0. 10

注: C2 为乙酰基肉碱; C3 为 丙酰基肉碱; C4 为 丁酰基肉碱; C5 为 异戊酰基肉碱; C6 为 己酰基肉碱; C8 为 辛酰基肉碱; C10 为 癸酰基肉碱; C12 为 十二烷酰基肉碱; C14 为 十四烷酰基肉碱; C16 为 十六烷酰基肉碱; C18 为 十八烷酰基肉碱。

表 2 3 例 CUD 患儿基因检测结果

病例	突变基因	染色体位置	变异	变异状态	变异类型	遗传模式
1	SLC22A5	Chr5:131728257	c. 1400C> G(p. S467C)	杂合突变	致病突变	AR
2	SLC22A5	Chr5:131728257	c. 1400C> G(p. S467C)	杂合突变	致病突变	AR
3	SLC22A5	chr5:131705715	c. 51C> G(p. F17L)	纯合突变	致病突变	AR

注: AR 为常染色体隐性。

3 讨 论

研究表明在法罗群岛 CUD 的患病率最高为 1 : 300^[6], 日本的患病率约为 1 : 40 000^[7], 澳大利亚为 1 : 37 000 ~ 1:100 000^[8], 美国为 1 : 142 000^[9], 在中国河南省的患病率为 1 : 31 499^[10], 浙江省为 1 : 23 862^[11], 上海市为 1 : 45000^[11], 河北省为 1 : 17 785^[12], 本研究共筛查来自四川、新疆、西藏、贵州、湖北、北京 6 地新生儿标本 10. 9 万例, 通过 MSMS 筛查出 124 例疑似阳性标本, 阳性疑似率约为 1. 14%, 确诊 CUD 3 例, 患病率约为 1 : 36 333, 与报道的中国 CUD 新生儿筛查患病率相符^[12]。MSMS 技术对早期发现 CUD 有提示意义, 但最终确诊需结合其他检测手段, 如尿有机酸检测和基因检测等, 并结合临床明确诊断。

CUD 是由 SLC22A5 基因编码的 OCTN2 肉碱转运蛋白突变引起的常染色体隐性 (AR) 遗传疾病, 有 10 个外显子^[13]。SLC22A5 突变数据库 (http://www.arup.utah.edu/database/OCTN2/OCTN2_display.php) 中描述了 150 多种遗传变异, 其中 86 种具有致病性 (包括错义、无义、插入缺失、移码、剪接位点改变突变和一个大基因缺失)^[13]。大多数研究认为 c. 760C> T(p. R254X) 和 c. 1400C> G(p. S467C) 是中国人最常报道的突变^[14]。本研究结果检测出 2 例 c. 1400C> G(p. S467C) 和 1 例 c. 51C> G(p. F17L), c. 1400C> G(p. S467C) 占比 2/3, 与报道相一致^[15]。基因突变致其编码的肉碱转运蛋白无法锚定细胞膜

而滞留于细胞质中, 或结构及功能域不同程度受损, 导致该蛋白的转运功能缺陷。肉碱 (β-羟基-γ-三甲基丁酸铵) 是一种衍生自氨基酸的必不可少的水溶性分子^[15]。在非素食主义者中, 肉碱的主要来源是红肉, 家禽和奶制品^[16], 几乎占人体总贮存量的 3/4^[17]。肉碱由肠道内转入到血液及由血液内转入到细胞的量减少, 血液及细胞内肉碱缺乏, 尿流失增加, 脂肪酸 β 氧化代谢受阻^[18]。CUD 可于任何年龄发病, 患者表现为心肌疾病、心功能降低、肌无力、肌张力减退及肝功能异常等^[19], 若是不及时医治, 可导致死亡。有些患儿在诊断时通常是完全无症状的, 可通过测量血浆肉碱水平 (游离和总量) 和研究肉碱在成纤维细胞中的转运来确认^[15]。左卡尼汀的治疗, 使越来越多 CUD 患儿的预后得到了改善^[20-21]。CUD 是为数不多的治疗效果良好的遗传病之一, 所以早期诊断、及时治疗是改善患儿预后的关键。

本研究通过足跟采血, 滴于专用滤纸片后晾干, 寄送到本实验室使用 MSMS 方法测定 C0 及其他酰基肉碱, CUD 患儿 C0 及多种酰基肉碱水平降低, C0 水平正常参考值为 9. 5 ~ 48. 0 μmol/L。病例 1 患儿因丙二酰基肉碱水平升高召回, 基因检测发现另有 SLC22A5 基因 c. 1400C> G(p. S467C) 杂合突变, C0 串联检测结果正常。病例 2 患儿 C0 水平为 4. 14 μmol/L, 召回基因检测发现 SLC22A5 基因 c. 1400C> G(p. S467C) 杂合突变, 肉碱及酰基肉碱谱整体降低。病例 3 患儿 C0 水平为 3. 57 μmol/L 召回

基因检测发现 SLC22A5 基因 c. 51C>G(p. F17L) 纯合突变,肉碱及酰基肉碱谱整体降低明显。杂合突变个体的肉碱转运活性为正常个体的 50%,C0 值可处于临界低水平^[22]。此外,C0 能通过胎盘从母体转运给胎儿,若母亲体内肉碱充足,CUD 胎儿可以从母体获得肉碱供给,在生后的一段时间内仍保持较充足的肉碱储备,导致筛查时出现假阴性。若母亲为原发性肉碱缺乏症或各种原因导致血液中肉碱不足,也会导致新生儿筛查时 C0 水平低于正常^[23],导致假阳性,故新生儿筛查阳性者,需要同时测母亲 C0 水平,以便除外因母体原因导致的继发性肉碱缺乏。

CUD 是一种潜在的致死性疾病,早期诊断和治疗是决定预后的关键。本研究使用 MSMS 技术筛查 10.9 万份标本,检测出 124 例 CUD 疑似阳性患儿,对可疑阳性患者的标本进行 SLC22A5 基因测序,进一步确诊了 3 例 CUD 患儿。MSMS 技术的应用使 CUD 的早期诊断成为可能,结合测序技术也为 CUD 的遗传咨询和产前诊断提供了重要信息。

参考文献

- [1] 韩连书,叶军,邱文娟,等.原发性肉碱缺乏症 17 例诊治与随访[J].中华儿科杂志,2012,50(6):405-409.
- [2] 谭建强,陈大宇,李哲涛,等.10 例原发性肉碱缺乏症新生儿的基因诊断[J].中国当代儿科杂志,2017,19(11):1150-1154.
- [3] FILIPPO C, TAYLOR M, MESTRONI L, et al. Cardiomyopathy and carnitine deficiency[J]. Mol Genet Metab, 2008, 94(2):162-166.
- [4] 杨宇奇,蒋曙红,韩小亚,等.20 027 例新生儿遗传代谢病串联质谱筛查的初步报告[J].重庆医学,2018,47(2):246-249.
- [5] 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.
- [6] RASMUSSEN J, NIELSEN O W, JANZEN N, et al. Carnitine levels in 26 462 individuals from the nationwide screening program for primary carnitine deficiency in the Faroe Islands[J]. J Inherit Metab Dis, 2014, 37(2):215-222.
- [7] KOIZUMI A, NOZAKI J, OHURA T, et al. Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(12):2247-2254.
- [8] WILCKEN B, WILEY V, SIM K G, et al. Carnitine transporter defect diagnosed by newborn screening with electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Pediatr, 2001, 138(4):581-584.
- [9] THERRELL B L J R, LLOYD-PURYEAR M A, CAMP

K M, et al. Inborn errors of metabolism identified via newborn screening: ten-year incidence data and costs of nutritional interventions for research agenda planning[J]. Mol Genet Metab, 2014, 113(1/2):14-26.

- [10] 马胜举,赵德华,马坤,等.河南省 2013—2019 年新生儿遗传代谢病筛查回顾性分析[J].检验医学与临床,2020,17(14):1965-1968.
- [11] 郑静,张玉,洪芳,等.浙江省新生儿脂肪酸氧化代谢疾病筛查及随访分析[J].浙江大学学报(医学版),2017,46(3):248-255.
- [12] 贾立云,封纪珍,王熙,等.石家庄地区新生儿原发性肉碱缺乏症串联质谱筛查结果分析[J].河北医科大学学报,2021,42(3):309-313.
- [13] FRIGENI M, BALAKRISHNAN B, YIN X, et al. Functional and molecular studies in primary carnitine deficiency[J]. Hum Mutat, 2017, 38(12):1684-1699.
- [14] 马平悦. 50 例新生儿原发性肉碱缺乏症的基因谱及临床特征分析[D].浙江:浙江大学,2015.
- [15] LONGO N, AMAT DI SAN FILIPPO C, PASQUALI M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2006, 142(2):77-85.
- [16] LONGO N. Primary carnitine deficiency and newborn screening for disorders of the carnitine cycle[J]. Ann Nutr Metab, 2016, 68(3):5-9.
- [17] ALMANNAI M, ALFADHEL M, EL-HATTAB A W. Carnitine inborn errors of metabolism[J]. Molecules, 2019, 24(18):3251.
- [18] ADEVA-ANDANY M M, CALVO-CASTRO I, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ C, et al. Significance of l-carnitine for human health[J]. IUBMB Life, 2017, 69(8):578-594.
- [19] MAGOULAS P L, EL-HATTAB A W. Systemic primary carnitine deficiency: an overview of clinical manifestations, diagnosis, and management[J]. Orphanet J Rare Dis, 2012, 18, 7:68.
- [20] 吴剑姿,谭建强,韦笑宝,等.左卡尼汀治疗新生儿原发性肉碱缺乏症临床疗效评价[J].儿科药理学杂志,2020,26(7):7-10.
- [22] VIJAY S, PATTERSON A, OLPIN S, et al. Carnitine transporter defect: diagnosis in asymptomatic adult women following analysis of acylcarnitines in their newborn infants[J]. J Inherit Metab Dis, 2006, 29(5):627-630.
- [23] LEE N C, TANG N L, CHIEN Y H C, et al. Diagnoses of newborns and mothers with carnitine uptake defects through newborn screening[J]. Mol Genet Metab, 2010, 100(1):46-50.

(收稿日期:2021-06-04 修回日期:2021-10-08)