

·临床研究报道·

尿素酶预处理-气相色谱-质谱法在多种羧化酶缺陷病诊断治疗中的应用

宋元宗¹,方素珍²,封志纯²,王自能¹

(1. 暨南大学附属第一医院围产医学中心 & 组织移植与免疫研究中心, 广东 广州 510632; 2. 中国人民解放军第一军医大学附属珠江医院儿科, 广东 广州 510282)

[摘要] 目的 多种羧化酶缺陷病临床表现特异性不强,然而却是一种可用生物素治疗的遗传性代谢病。该文旨在探讨尿素酶预处理气相色谱-质谱法分析尿液成分在多种羧化酶缺陷病诊断和治疗中的应用价值。方法 尿素酶预处理气相色谱-质谱法分析3例多种羧化酶缺陷病患儿生物素治疗前后的尿液成分,并整理分析其临床表现、诊治经过及预后等。结果 3例患儿临床表现特异性不强,但其尿液中均含有大量的3-羟基异戊酸、3-甲基巴豆酰甘氨酸、3-羟基丙酸和甲基枸橼酸,其中2例乳酸含量也高于正常对照。依据以上结果诊断多种羧化酶缺陷病,以生物素治疗后临床表现明显改善,尿液复查上述异常产物恢复到正常水平。结论 尿素酶预处理气相色谱-质谱法分析尿液成分是多种羧化酶确诊的重要方法,对于判断生物素疗效,调整用药剂量也有一定参考价值。

[中国当代儿科杂志,2004,6(2):128-130]

[关键词] 遗传性代谢病;多种羧化酶缺陷病;气相色谱-质谱法

[中图分类号] R394-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1008-8830(2004)02-0128-03

多种羧化酶缺陷病(multiple carboxylase deficiency, MCD)患儿由于生物素代谢异常,体内丙酮酸羧化酶、丙酰辅酶A羧化酶和3-甲基巴豆酰CoA羧化酶等3种生物素依赖酶活性不足,导致乳酸、甲基枸橼酸、3-甲基巴豆酰甘氨酸和3-羟基异戊酸等在体内大量堆积^[1~4],产生严重代谢性酸中毒,并引起皮肤红肿等一系列临床表现,严重时可对心脏和脑造成损伤而致残或致命。近来我们应用尿素酶预处理-气相色谱-质谱法(GC-MS)诊断MCD患儿3例,并对其疗效进行了随访监测,现将有关研究结果报道如下。

1 病例报告

例1,男,1岁2月。因反复皮疹1年、气促半年就诊。患儿生后2月时臀部和双大腿内侧出现红色皮疹,针尖到硬币大小不等,边缘不规则,不高出皮面,可连接成片,伴脱屑。6月时病情加重并出现气促,至某医院诊断为“代谢性酸中毒”,治疗不详,好

转出院。9月时因皮疹气促再次发作,并出现昏迷,在同一医院诊断“代谢性酸中毒,维生素B1缺乏症”,经血液透析等治疗好转出院。出院后皮疹气促仍反复发作,平均每月1次,在多家医院住院治疗,诊断“代谢性酸中毒”、“红皮病”、“念珠菌性皮炎”等,经治疗可暂时缓解,出院后不久即复发。就诊时动作和语言发育落后,不能独立行走,不会讲简单句子。体查:烦躁不安。全身皮肤干燥,皱折处发红脱屑,以面部、颈部、臀部、会阴部及双大腿内侧为甚。气促明显,双肺呼吸音粗,未闻干湿啰音。血气pH 7.28, HCO_3^- 9.1 mmol/L,血生化AG 27 mmol/L。尿GC-MS检查,发现含大量乳酸、3-羟基异戊酸、3-甲基巴豆酰甘氨酸、3-羟基丙酸、丙酰甘氨酸,诊断MCD。立即以生物素3 mg口服,2次/d治疗,3 d内气促及皮肤表现相继迅速消失。治疗半月后尿中上述异常指标含量恢复正常。治疗4月后复查,已能独立行走,可讲“爸爸”“奶奶”等简单的单词。

例2,男,1岁6个月。因反复皮疹、气促1年5个月就诊。生后1月即出现红色斑疹,多发于眼睑、

[收稿日期] 2003-08-13; [修回日期] 2003-12-15

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目(2001CB510306);中国博士后科学基金(2002031286)。

[作者简介] 宋元宗(1970-),男,医学博士,主治医师。主攻方向:小儿神经系统疾病。

颈部、腋下等皮肤皱折处,严重时皮疹融合成片,遍布全身,并伴水肿糜烂,同时有气促,严重时发绀,在“感冒”时以上症状加重。在多家医院住院,诊治不详,病情时有反复。9月时在某医院住院时病情加重,出现意识障碍,并发生心跳呼吸骤停,当时查血气: pH 6.85, $\text{HCO}_3^- < 8.0 \text{ mmol/L}$, $\text{TCO}_2 8.5 \text{ mmol/L}$ 。血乳酸 12.0 mmol/L (正常值 $0.9 \sim 2.3 \text{ mmol/L}$), AG 31.30 mmol/L 。尿常规:尿比重 1.025, pH 5.0, 蛋白 -, 尿糖 + + +, 酮体 + +。经心肺复苏,并补充生物素等多种维生素后病情好转,诊断考虑“生物素代谢缺陷病,继发性维生素 B 族代谢缺陷”。出院后一直服用富含维生素的奶粉(小安素),皮疹气促症状出现间隔较前延长,严重时给予“水乐维它”等治疗后可迅速好转,但皮疹症状一直未彻底消失,近 1 月来有加重趋势。体查:神清,能独坐,可扶椅子站立,但不能独行。会讲“爸爸”,但不能讲简单句子。嘴角皮肤糜烂,躯干部可见数个红斑,边缘不规则。心脏无杂音。呼吸 42 次/min,双肺未闻及啰音。腹软,肝脾不大。四肢活动可,肌张力正常。尿 GC-MS 检查,含大量 3-羟基异戊酸、3-甲基巴豆酰甘氨酸、3-羟基丙酸、甲基枸橼酸。诊断 MCD。以生物素治疗 2.5 mg 口服,2 次/d,气促及皮肤表现消失,随访半年未再出现类似症状。

例 3,女,9月,因咳嗽 4 d,气促 3 d,昏迷 2 d 入院。当地查血气 pH 6.98, $\text{PCO}_2 25 \text{ mmHg}$, $\text{PO}_2 26 \text{ mmHg}$, BE - 24.5 mmol/L, CSF 检查正常。诊断“重症肺炎,呼衰,中毒性脑病,败血症,感染性休克”。曾出现室颤,经治疗恢复室性心率后转院。生后 1 月起颈部、腋窝、肘窝等皮肤皱折处反复发红、脱屑,入院前全身皮肤绷紧、干燥、发红。4 月会翻身,6 月独坐,8 月可站立。体查:深昏迷,危重病容。前囟 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$,膨隆。双侧瞳孔缩小,直径 1 mm,等大等圆,对光反射消失。双肺可闻及痰鸣音及干湿性啰音。肝右肋下 2 cm。四肢肌张力低,腹壁反射、跟腱反射、膝腱反射均消失,病理反射未引出。查尿常规蛋白 + +, 酮体 + +;血气示代谢性酸中毒。头部 CT 示“外部性脑积水,脑干部低密度区”, EEG 重度异常。诊断:重症肺炎;感染性休克;中毒性心肌炎;心源性休克;代谢性酸中毒;MSOF。住院第 10 天清醒,住院 37 d 出院,出院时皮肤仍干燥,脱屑。出院诊断:维生素 B1 缺乏症;重症肺炎;代谢性酸中毒;MSOF。出院后回当地继续治疗,经口服“脑利智宝(中药复

方制剂)”等治疗,皮肤症状一度消失。出院后 4 月复查,患儿会阴部皮肤发红、皲裂,胸骨左缘可闻及收缩期杂音 2/6 级。四肢肌张力增高,踝关节活动不灵活。不能翻身,不会独坐,也不能站立,仅会讲个别单词。血 BUN 11.6 mmol/L ,血气示代谢性酸中毒。脑电图复查基本正常。家长拒绝做进一步的检查和治疗。出院后半年皮疹进一步加重,枕部和会阴部皮肤红肿糜烂,同时出现气促。尿 GC-MS 检查,发现含大量 3-羟基异戊酸、3-甲基巴豆酰甘氨酸、3-羟基丙酸、甲基枸橼酸,诊断 MCD。以生物素治疗 5 mg 口服,2 次/d 治疗,气促和皮肤表现迅速消失,但运动能改善不明显。

2 方法

参照文献^[1]进行,具体如下:

2.1 试剂仪器

BSTFA + 1% TMCS 为 Sulpeco 公司产品,十七酸、肌酐等标准品及尿素酶购自 Sigma-Aldrich 公司。美国 Finnigan 公司 GC-MS 联用仪, J & W Scientific 产 DB-5 毛细管柱,载气为高纯氮。

2.2 样品预处理及 GC-MS 分析

尿液样品 50 ~ 100 μL ,以尿素酶除尿素后加入内标十七酸,再加入无水乙醇,混匀后高速离心去蛋白。上清液真空干燥,残余物在微量样品制备瓶(专利号:ZL02227851.6;公开号:2545610)中用 BSTFA/ TMCS 在 90 条件下衍生 40 min。取样 0.5 ~ 1 μL ,分流比进样。进样口温度 250 ,起始温度 60 保留 1 min,以 17 /min 的速度升温至 320 ,保留 10 min 后进入下一个循环。质谱电离方式为 EI,扫描范围为 50 ~ 650 原子质量单位。

3 结果

3.1 MCD 的尿液定性指标及其色谱参数

MCD 定性选用乳酸、甲基枸橼酸(MC)、3-羟基丙酸(3HP)、丙酰甘氨酸(PG)、3-甲基巴豆酰甘氨酸(3MCG)和 3-羟基异戊酸(3HIV),其色谱参数见表 1。

3.2 MCD 患儿生物素治疗前后的尿液指标对比

MCD 患儿治疗前后与正常对照组各尿液指标的对比见表 2。结果显示 3 例患儿生物素治疗前均有定性指标含量的升高,而治疗后恢复正常。

表 1 MCD 分析指标及其特征离子

指标	特征离子 (m/z ,TMS)	绝对保留时间 (min)	相对保留时间 ^a
乳酸	M-15 (219 ,2)	4.91	0.389
甲基枸橼酸 (MC)	M-15 (479 ,4)	10.94 ,10.98	0.868 ,0.871
3-羟基丙酸 (3HP)	M-15 (219 ,2)	5.66	0.449
丙酰甘氨酸 (PG)	M-15 (188 ,1)	7.60	0.603
3-甲基巴豆酰甘氨酸 (3MCG)	M (229 ,1)	9.08	0.720
3-羟基异戊酸 (3HIV)	M-15 (247 ,2)	6.25	0.496

注：a 相对于内标正十七酸保留时间 (12.61 min) 的比值。表格中 m/z 代表质荷比，TMS 表示三甲基硅烷基的数目，M 表示相应物质的分子离子，M-15 则是分子离子经电子轰击失去一个甲基后的子离子

表 2 MCD 各尿液指标的定量分析结果 *

分组	标本	分析指标					
		乳酸	3HIV	3MCG	3HP	PG	MC
对照组	$\bar{x}$	0.708	0.703	0.699	0.700	0.699	0.700
	SD	0.005	0.006	0	0.002	0	0.002
患儿 (生物素治疗前)	1	1.244 ^a	1.829 ^a	1.581 ^a	1.023 ^a	1.587 ^a	0.724
	2	0.998 ^a	1.884 ^a	1.940 ^a	0.758 ^a	0.699	0.824 ^a
	3	0.710	0.849 ^a	0.853 ^a	0.769 ^a	0.699	0.735 ^a
患儿 (生物素治疗后)	1	0.722	0.715	0.699	0.704	0.699	0.701
	2	0.707	0.710	0.699	0.703	0.699	0.704
	3	0.711	0.714	0.699	0.699	0.699	0.706

注：* 以相应指标特征离子峰面积与肌酐特征离子峰面积两者的比值来表示，所有数据经 lg(x + 5) 转化，“x”代表原始数据。a 超出对照组均值三个标准差

4 讨论

本文 3 例患儿皮肤红肿、脱屑、溃烂等表现突出，气促、血 pH 值降低、阴离子间隙增大等代谢性酸中毒表现也很明显，病程反复迁延，严重时已经因心脑血管障碍危及生命，例 3 甚至因脑干部器质性病变而遗留下严重的神经系统后遗症。患儿上述临床表现特异性不强，具体病因诊断难以明确，故难以采取针对性治疗措施，疗效欠佳。直至尿素酶预处理法发现患儿尿中存在大量甲基枸橼酸、3-羟基丙酸、丙酰甘氨酸、3-羟基异戊酸、3-甲基巴豆酰甘氨酸等异常成分，才最终确定了 MCD 诊断，并采取生物素治疗病情才得以缓解。因此，尽早送尿液标本进行尿素酶预处理分析，对确诊 MCD、改善其预后是非常必要的。

MCD 系由于全羧化酶合成酶和生物素基酶缺陷而导致羧化酶辅基生物素代谢异常，羧化酶蛋白自身并无缺陷，补充大剂量的生物素可提高其活性，纠正体内相应的代谢紊乱。不同 MCD 患儿生物素治疗剂量差异较大，国外经验其口服参考剂量波动于 5 ~ 100 mg/d^[5]，近来国内文献报告以 10 ~ 40 mg/d 的剂量治疗取得较好效果^[6]。本文 3 例患儿以生物素 5 ~ 10 mg/d 治疗，临床表现即获明显缓解，尿液复查代谢异常得以纠正。这种现象的出现

一方面可能与本文患儿年龄小而体重轻有关，另一方面本文患儿残存全羧化酶合成酶或生物素基酶活性较高的可能性也不能排除，具体的分子生物学病因有待深入探讨。

参 考 文 献

[1] 宋元宗,吴本清,王自能. 多种羧化酶缺陷病患者尿液标志物的 GC-MS 分析 [J]. 基础医学与临床,2004,24(2): (in press).

[2] Jitrapakdee S, Wallace J. Structure,function and regulation of pyruvate carboxylase [J]. Biochem J, 1999,340(Pt 1): 1-16.

[3] Kuhara T, Ohse M, Inoue Y, Yorifuji T, Sakura N, Mitsubuchi H, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric newborn screening for propionic acidemia by targeting methylcitrate in dried filter-paper urine samples [J]. J Inherit Metab Dis, 2002,25(2): 98-106.

[4] Holzinger A, Roschinger W, Lagler F, Mayerhofer PU, Lichtner P, Kattenfeld T, et al. Cloning of the human MCCA and MCCB genes and mutations therein reveal the molecular cause of 3-methylcrotonyl-CoA: carboxylase deficiency [J]. Hum Mol Genet, 2001,10(12): 1299-1306.

[5] Pacheco-Alvarez D, Sol Ózanor-Vargas RS, Del R ó AL. Biotin in metabolism and its relationship to human disease [J]. Arch Med Res, 2002,33(5): 439-447.

[6] 杨艳玲,山口清次,田上泰子,张月华,熊晖,长谷川有纪,等. 生物素酶缺乏症的诊断与治疗六例分析 [J]. 中华儿科杂志, 2003,41(4): 249-251.

(本文编辑:吉耕中)