串联质谱技术选择性筛查遗传代谢病 高危患儿 552 例初步分析

娄燕¹ 尹娜¹ 陈凤琴¹ 程亚颖¹ 徐丽瑾¹ 戴方² 宋晓涛²

(1. 河北省人民医院儿科,河北 石家庄 050051;

2. 中国医学科学院北京协和医学院检验医学研发中心,北京 102206)

[摘要] 目的 应用串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)技术进行遗传代谢病(IEM)高危儿筛查,初步了解我国 IEM 的发病种类和阳性率,为其有效防治提供科学依据。方法 利用 MS/MS 技术对在河北省石家庄市 8 所省、市级医院就医的 552 例可疑 IEM 患儿的血液样本进行 IEM 筛查。结果 发现阳性患儿 64 例,阳性率为 11.6%。其中甲基丙二酸血症或丙酸血症 33 例,苯丙酮尿症 2 例,肉碱棕榈酰转移酶缺乏 I 型 3 例,长链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症 1 例,中链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症 2 例,枫糖尿症 6 例,短链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症 2 例,戊二酸血症 I 型 2 例,异戊酸血症 2 例,同型胱氨酸尿症 2 例,肉碱缺乏症 4 例,酪氨酸血症 1 例,精氨酸琥珀酸尿症 1 例,瓜氨酸血症 2 例,精氨酸血症 1 例。结论 MS/MS 技术是筛查诊断 IEM 的有效工具。

[中国当代儿科杂志,2011,13(4):296-299]

[关键词] 遗传代谢病;串联质谱法;儿童

[中图分类号] R722.19 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)04-0296-04

Selective screening of inborn errors of metabolism by using the tandem mass spectrometry: pilot study of 552 children at high risk

LOU Yan, YIN Na, CHEN Feng-Qin, CHENG Ya-Ying, XU Li-Jin, DAI Fang, SONG Xiao-Tao. Department of Pediatrics, Hebei Provincial Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China (Email: louyanchina@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the application of tandem mass spectrometry (MS/MS) in the selective screening of inborn errors of metabolism (IEM) in high risk children and to understand the positive rate and types of IEM. **Methods** MS/MS was used to examine 552 blood samples from high risk cases of IEM who came from 8 hospitals in Shijiazhuang, Hebei Province. **Results** Sixty-four children (11.6%) were confirmed with IEM by the MS/MS, including 33 cases of methylmalonic acidemia or propionic acidemias, 2 cases of phenylketonuria, 3 cases of carnitine palmitoyl transferase I deficiency, 1 case of long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, 2 cases of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, 6 cases of maple syrup urine disease, 2 cases of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, 2 cases of glutaric acidemia type I, 2 cases of isovaleric acidemia, 2 cases of homocystinuria, 4 cases of carnitine deficiency, 1 case of tyrosinemia, 1 case of argininosuccinic aciduria, 2 cases of citrullinemia and 1 case of argininemia. **Conclusions** MS/MS can be used to screen and classify IEM. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (4):296-299]

Key words: Inborn errors of metabolism; Tandem mass spectrometry; Child

先天性代谢缺陷病(inborn errors of metabolism, IEM)或称遗传代谢病(inherited metabolic diseases, IMD)是指由于基因突变引起酶缺陷、细胞膜功能异常或受体缺陷,从而导致机体生化代谢紊乱,造成中间或旁路代谢产物蓄积,或终末代谢产物缺乏,引起一系列临床症状的一组疾病^[1]。自 1908 年 Garrod 提出 IEM 概念以来,迄今发现的疾病已有 500 余

种,并随着诊断技术的提高而逐渐增加。IEM 虽单一病种发生率较低,但因种类繁多,群体患病率高^[2]。IEM 的诊断较多依赖生化与分子生物学检测方法,对技术和设备要求较高,往往是临床诊治的难点^[3]。本研究利用串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)技术对高危患儿进行筛查诊断,了解该类疾病的发病种类和阳性率,为我国新生儿筛

[收稿日期]2010-08-24;[修回日期]2010-11-10

[基金项目]河北省科技支撑计划项目(No.08276101D-29)。

[作者简介]娄燕,女,博士,教授。

查项目的扩展提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2007年6月至2009年12月河北省石家庄市8所省、市级医院就诊的可疑先天性、遗传代谢性疾病患儿552例,其中男308例,女244例。年龄为生后23h至11岁,其中0d~226例,1月~262例,1岁~31例,3~11岁33例。

1.2 标本收集与保存

标本采集用干血滤纸片法,手指或足跟采血,滴于专用采血滤纸上,待自然干燥后,放于封口塑料袋内,保存于-20℃冰箱中待检。

1.3 试剂和材料

甲醇、正丁醇、乙酰氯、乙腈等的纯度均为高效液相色谱级,盐酸正丁醇(3 mol/L)由正丁醇和乙酰氯按9:1配制。氮气纯度为99.999%。96孔聚丙烯板,96孔过滤板(滤膜孔径0.45 μm)购自Millipore公司。

1.4 同位素内标

同位素内标购自美国剑桥公司。氨基酸内标12种:15N,2-13C-甘氨酸,2H4-丙氨酸,2H8-缬氨酸,2H3-亮氨酸,2H3-蛋氨酸,2H5-苯丙氨酸,13C6-酪氨酸,2H3-天冬氨酸,2H3-谷氨酸,2H2-瓜氨酸,2H2-鸟氨酸,2H4,13C-精氨酸。酰基肉碱内标8种:2H9-游离肉碱,2H3-乙酰肉碱,2H3-丙酰肉碱,2H3-丁酰肉碱,2H9-异戊酰肉碱,2H3-辛酰肉碱,2H9-肉豆蔻酰肉碱,2H3-棕榈酰肉碱。上述同位素内标用甲醇稀释成工作液,4℃冰箱保存。

1.5 仪器

API 3000型串联质谱仪购自美国生物应用系统公司,高效液相色谱仪采用美国安捷仑公司产品(Agilent 1100)。96孔板加热吹干装置为Technique Dri-Block DB-30。

1.6 测定方法

1.6.1 样品处理方法 将滤纸片用打孔器制直径3 mm的圆形滤纸血片(四个质控,一个空白),置于96孔过滤板中,每孔加入含氨基酸和酰基肉碱同位素内标的甲醇300 μL,室温密封震荡30 min,萃取血片中的氨基酸和酰基肉碱,然后离心至另一个96孔聚丙烯板,50℃加热氮气吹干,再加入50 μL盐酸正丁醇(3 mol/L),Teflon膜覆盖,置65℃恒温箱内15 min,随后50℃氮气吹干,再加入80%乙腈100 μL溶解,铝膜覆盖,即可上样检测。

1.6.2 仪器设置状态 流动相采用80%乙腈,四元泵流速设置为30 μL/min,自动进样器设置为每次进样20 μL。每次测定同时采用3种扫描方式进行检测。中性氨基酸采用中性丢失扫描方式,中性丢失片断质荷比(m/z)为102 Da,扫描范围为m/z 140~m/z 280;酰基肉碱采用母离子扫描,子离子为m/z 85 Da片断,扫描范围为m/z 210~m/z 502;Gly、Orn、Arg、Cit采用多反应监测,一个样品测试约需2 min。

1.6.3 资料分析 定量分析采用软件Chemo View 1.2(美国生物应用系统公司),根据同位素内标和各种丁酯化的氨基酸和酰基肉碱的离子峰强度,由已知浓度的内标,自动计算出所测样品中氨基酸和酰基肉碱的浓度。

1.7 诊断依据

运用液相串联质谱检测到的相应特异指标,根据美国Pediatrix公司所提供的疾病诊断标准(专利号:US07297545B2),结合临床表现,常规实验室检查进行筛查诊断。甲基丙二酸血症或丙酸血症显示丙酰基肉碱浓度以及丙酰基肉碱/乙酰基肉碱和丙酰基肉碱/碳16乙酰基肉碱的浓度比值明显增高;苯丙酮尿症显示苯丙氨酸浓度以及苯丙氨酸/酪氨酸浓度的比值显著增高;肉碱棕榈酰转移酶缺乏I型显示游离肉碱浓度和游离肉碱/16碳酰基肉碱的浓度比值明显增高;长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症显示12碳酰基肉碱浓度和14碳酰基肉碱浓度明显高于正常;中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症显示辛酰基肉碱的浓度明显增高;枫糖尿症显示亮氨酸(异亮氨酸)和缬氨酸等支链氨基酸明显增高;短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症显示酰基肉碱C4OH的浓度明显高于正常;戊二酸血症I型显示戊二酸和三羟基戊二酸明显增高;异戊酸血症显示戊酰基肉碱浓度及戊酰基肉碱/丁酰基肉碱的浓度比值明显高于正常值;同型胱氨酸尿症显示甲硫氨酸浓度升高;肉碱缺乏症显示游离肉碱浓度和短链酰基肉碱浓度均位于临界值;酪氨酸血症显示酪氨酸浓度高于正常;精氨酸代琥珀酸尿症显示瓜氨酸浓度明显升高而精氨酸和延胡索酸浓度明显下降;瓜氨酸血症显示瓜氨酸浓度异常升高;精氨酸血症显示精氨酸浓度明显增高。

1.8 质量控制

质控样品采用美国疾病控制和预防中心(CDC)IEM筛查质控部门提供的串联质谱酰基肉碱血滤纸片。参加美国疾病控制和预防中心(CDC)IEM筛查质量评价。所有阳性标本,用同一

血片重复检测1次。

2 结果

2.1 检测阳性病种分布

552例可疑 IEM 患儿经血 MS/MS 检测出阳性病例 64 例,涉及常见 IEM 15 种,总筛查阳性率为 11.6%。其中甲基丙二酸血症或丙酸血症 33 例(51.6%),苯丙酮尿症 2 例(3.1%),肉碱棕榈酰转移酶缺乏 I 型 3 例(4.7%),长链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症 1 例(1.6%),中链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症 2 例(3.1%),枫糖尿症 6 例(9.4%),短链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症 2 例(3.1%),戊二酸血症 I 型 2 例(3.1%),异戊酸血症 2 例(3.1%),同型胱氨酸尿症 2 例(3.1%),肉碱缺乏症 4 例(6.3%),酪氨酸血症 1 例(1.6%),精氨酸琥珀酸尿症 1 例(1.6%),瓜氨酸血症 2 例(3.1%),精氨酸血症 1 例(1.6%)。

2.2 临床资料及结果分析

2.2.1 发病年龄 64 例阳性病例中新生儿期发病 23 例(36%),1 月~发病 31 例(48%),1 岁~发病 4 例(6%),3~11 岁发病 6 例(9%)。

2.2.2 临床表现 552 例可疑 IEM 患儿中就诊时主要表现为生长发育不良 94 例次,不明原因的肝脾肿大 21 例次,智力发育落后 64 例次,严重黄疸、肝功能异常 53 例次,反应差、嗜睡或昏迷 85 例次,呼吸困难 32 例次,拒乳或厌食 66 例次,运动障碍或肌张力异常 174 例次,惊厥或癫痫 86 例次,精神行为异常 12 例次,心功能异常 9 例次,反复呕吐 27 例次,不明原因的贫血 18 例次,顽固性低血糖 26 例次,明显的酸中毒 72 例次,很多患儿就诊时有上述两种或多种症状。15 例患儿母亲有宫内死胎史,22 例有家族遗传病史。经过 MS/MS 检测技术筛查诊断的 64 例 IEM 阳性病例中有惊厥或间断抽搐者 10 例次(16%),运动障碍或肌张力异常 16 例次(25%),智力发育落后 7 例次(11%),精神行为异常 1 例次(2%),反应差、嗜睡或昏迷 12 例次(19%),呼吸困难 3 例次(5%),生长发育迟缓 12 例次(19%),拒乳、厌食或营养不良 6 例次(9%),反复呕吐 3 例次(5%),黄疸 5 例次(8%),肝脾肿大 2 例次(3%),化验检查代谢性酸中毒 19 例次(30%),低血糖 6 例次(9%),肝功能损害 5 例次(8%),心肌损害 2 例次(3%),不明原因的贫血 1 例次(2%)。5 例(8%)患儿母亲有宫内死胎史,4 例(6%)有家族遗传病史。

3 讨论

对 IEM 的早期诊断是衡量一个国家医学发展水平的重要指标^[4]。欧美和日本等发达国家或地区一直十分重视对 IEM 的研究,自 20 世纪 80 年代起就利用气相色谱/质谱联用(GC/MS)或 MS/MS 技术开展对 IEM 的研究^[5],使人类不断完善对这类疾病的认识,在新病种的发现以及临床诊疗和发病机制等方面的研究取得了许多成果。

国内由于受实验室诊断技术条件的限制,诊断和研究的总体水平与国外还有差距,但近些年国内相继开展了 GC/MS 或 MS/MS 技术的应用,使国内 IEM 的疾病谱日益增多^[6]。国内华中科技大学同济医院对 356 名原因不明的智力运动发育迟缓、惊厥及疑有 IEM 的婴幼儿,采用 GC/MS 方法进行尿液化学分析,34 例患儿确诊为 IEM,占 9.7%^[7];广州暨南大学附属第一医院对 331 例高危患儿的尿液检查发现阳性患者 31 例,涉及 IEM 17 种,总诊断阳性率为 9.4%^[8];上海儿科医学研究所用 MS/MS 对 104 例高危患儿的检查发现阳性患者 10 例,涉及 IEM 8 种,总诊断阳性率为 9.6%^[9]。本研究应用 MS/MS 技术对 552 例高危患儿血滤纸片进行检测分析发现阳性病例 64 例,涉及 IEM 15 种,总诊断阳性率为 11.6%,远高于常态人群中的发病率,也略高于国内相关的研究报道。研究显示 MS/MS 技术的应用证实氨基酸、有机酸和脂肪酸代谢异常等 IEM 并不罕见。对有非特异临床表现并且反复发作的患儿应警惕 IEM 的可能。由于 IEM 存在分子和基因缺陷引起代谢通路出现障碍,导致机体能量和营养利用障碍可出现营养不良或生长发育迟缓,常常影响神经系统发育^[10]。本研究诊断的病例中神经系统功能异常如嗜睡、反应低下、意识障碍以及惊厥、运动功能障碍或智力发育异常的有 46 例(72%),营养不良,反复呕吐或生长发育迟缓 21 例(33%)。有机酸代谢障碍是由于代谢途径中某种酶的缺陷,致使机体内中间代谢产物和旁路代谢产物增加,导致有机酸蓄积造成神经系统及其他脏器损害,严重时出现酮症酸中毒、低血糖和高血氨等。甲基丙二酸血症和丙酸血症在有机酸代谢障碍中最常见,本组资料也显示其阳性率最高(51.6%)。很多 IEM 均存在代谢性酸中毒,且常为顽固性。本组病例中 19 例(30%)有明显的代谢性酸中毒。

IEM 的发病年龄可发生于各个年龄阶段,但以新生儿和婴幼儿期多见,本研究显示新生儿期和婴

儿期发病患儿共有 54 例(84%)也证实这一点。在婴幼儿期发病的儿童中又常因感染、腹泻及饥饿等诱发急性反复发作,治疗不当或不及时,常可使病情加重甚至死亡。若在患儿首次发作时能进行及时的 IEM 筛查,得到早期诊断,以利正确治疗和预防,则可大大降低致残率和病死率。目前许多常见的 IEM 可用简单的药物治疗,即可得到比较满意的疗效。应用生化方法测定异常代谢产物仍是目前诊断 IEM 的最主要方法,而 GC/MS 和 MS/MS 技术是目前对 IEM 进行高危筛查最为有效和广泛应用的方法^[11],质谱技术联合相关酶学检测将成为 IEM 检测的重要手段^[12]。因此对疑有上述疾病的患儿,应在进行相应常规生化检查的同时及时留存标本,转送至有相关技术条件的实验室确定诊断,有助于发现更多的遗传性代谢病。

[参 考 文 献]

[1] Saudubray JM, Nassogne MC, de Lonlay P, Touati G. Clinical approach to inherited metabolic disorders in neonates: an overview [J]. *Semin Neonatol*, 2002, 7 (1): 3-15.
[2] 罗小平,张李霞. 遗传代谢性疾病的临床诊治进展[J]. *中国新生儿科杂志*, 2006, 21(4): 249-251.

[3] 穆莹. 遗传性代谢病诊治的过去和未来[J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41(4): 241-242.
[4] 宋力,孟英韬,张玉琴,郭静,党利亨,单忠敏. 小儿遗传代谢缺陷病的筛查诊断[J]. *天津医药*, 2006, 34(11): 759-761.
[5] Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, Koeberl DD, Weavil SD, Chaing SH, et al. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005 [J]. *J Inherit Metab Dis*, 2006, 29(1): 76-85.
[6] 梁雁,罗小平. 儿童内分泌遗传代谢病研究进展[J]. *中国实用儿科杂志*, 2010, 25(5): 332-336.
[7] 罗小平,王慕逖,魏虹,梁雁,王宏伟,林汉华,等. 尿滤纸片气相色谱-质谱分析技术在遗传性代谢病高危筛查诊断中的应用[J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41(4): 245-249.
[8] 宋元宗,张霆,张春花,王自能. 尿素酶预处理-气相色谱-质谱法选择性筛查遗传代谢病高危患儿 327 例初步研究[J]. *实用儿科临床杂志*, 2005, 20(2): 142-144.
[9] 顾学范,韩连书,高晓岚,杨艳玲,叶军,邱文娟. 串联质谱技术在遗传性代谢病高危儿童筛查中的初步应用[J]. *中华儿科杂志*, 2004, 42(6): 401-404.
[10] Cleary M, Green A. Developmental delay: when to suspect and how to investigate for an inborn error of metabolism [J]. *Arch Dis Child*, 2005, 90(11): 1128-1132.
[11] 宋元宗,方素珍,封志纯,王自能. 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[J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 6(2): 128-129.
[12] 应艳琴,罗小平. 儿科内分泌遗传代谢疾病研究进展[J]. *中国实用儿科杂志*, 2008, 23(5): 343-344.

(本文编辑:王霞)