

· 病例报告 ·

中链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症的筛查诊断及文献复习

杨宇奇¹, 王淮燕¹, 周红¹, 王璘¹, 刘洪喜², 江丽华¹, 秦志强^{1*}¹南京医科大学附属常州妇幼保健院, 江苏 常州 213003; ²溧阳市妇幼保健院, 江苏 常州 213300[关键词] 中链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症; 新生儿疾病筛查; 串联质谱; ACADM 基因; 脂肪酸 β 氧化

[中图分类号] R722.11

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2019)03-460-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190330

中链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症 (medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, MCADD) 是一种常染色体显性遗传的先天性遗传代谢病, 是由于中链酰基辅酶 A 脱氢酶的功能缺陷, 导致中链脂肪酸 β 氧化不能正常进行, 从而影响到能量利用和导致代谢中间产物蓄积引起的疾病。文献报道 MCADD 发病率与苯丙酮尿症相当^[1], 严重的可导致婴幼儿猝死。串联质谱 (tandem mass spectrometry, MS/MS) 是筛查与诊断该病的有效方法。本中心采用 MS/MS 技术筛查确诊 1 例 MCADD 患儿, 对其进行了基因诊断, 并结合相关文献报道较系统地分析了该病常见的疾病基因频谱。

1 病例资料

患儿, 女, 汉族, 出生 42 d, 系第 1 胎第 1 产。患儿于胎龄 39 周头位自然分娩, 出生体重 3 800 g, 身长 50 cm, 1 min、5 min Apgar 评分为 9 分, 出生情况无异常。家族史, 母亲妊娠期均无异常, 体格检查未见异常。新生儿疾病筛查: 参考文献^[2], 患儿在出生后 3 d 接受本中心的新生儿疾病筛查, 经串联质谱筛查后发现患儿血液中中链酰基 C6、C8、C10 及其相关衍生产物 C6DC、C10:1 值异常增高, 疑似脂肪酸氧化代谢障碍相关疾病, 遂对该新生儿进行召回复查。出生后 12 d 召回复查结果显示中链酰基指标仍高于参考范围数倍, 但和第 1 次初筛值相比略有下降。患儿出生后 42 d 体检时再次对其进

行复查。3 次检测发现患儿的中链酰基及其相关指标呈下降趋势, 但是仍高于正常参考范围。3 次检测显示 C8 及 C8/C10 这两项指标升高最为显著 (表 1)。期间同步进行鉴别诊断和分子遗传学检测以明确诊断。

表 1 患儿串联质谱检测异常指标

| 指标 | 参考范围 | MS 检测结果 | | |
|----------------------------------|-----------|---------|-------|------|
| | | 3 d | 13 d | 42 d |
| 乙酰肉碱(C6, $\mu\text{mol/L}$) | 0.01~0.10 | 0.72 | 0.37 | 0.28 |
| 乙二酰肉碱(C6DC, $\mu\text{mol/L}$) | 0.03~0.18 | 0.31 | 0.20 | 0.11 |
| 辛酰肉碱(C8, $\mu\text{mol/L}$) | 0.01~0.15 | 4.39 | 1.20 | 0.89 |
| 癸酰肉碱(C10, $\mu\text{mol/L}$) | 0.02~0.20 | 0.34 | 0.09 | 0.05 |
| 癸烯酰肉碱(C10:1, $\mu\text{mol/L}$) | 0.01~0.05 | 0.47 | 0.17 | 0.14 |
| 辛酰肉碱/癸酰肉碱(C8/C10) | 0.40~1.50 | 12.91 | 13.33 | 17.8 |
| 辛酰肉碱/乙酰肉碱(C8/C2) | 0~0.10 | 0.41 | 0.25 | 0.16 |

经过患者家属知情同意, 采集新生儿及其父母体静脉外周血 5 mL 于 EDTA 抗凝管中, 提取基因组 DNA, 根据相关串联异常指标, 选择浙江博圣生物定制的遗传代谢病 panel 的捕获 oligo, 通过多重 PCR 方法靶向富集目标区域序列。按照 TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina (Vazyme) 建库试剂盒操作说明书处理纯化产物, 文库经 Qubit 及 2100 Bioanalyzer (Agilent High Sensitivity DNA Kit, Agilent) 进行浓度及片段大小质检分析确定合格后, 利用定量试剂盒 (Illumina DNA Standard and Primer Premix Kit, kapa) 进行文库精确定量, 确定上机样本量, 最后在 MiSeq (MiSeq Reagent Kit v2, 300 cycles, Illumina) 平台进行测序反应, 结果显示患儿 ACADM 基因 c.799G>A 和 c.1085G>A 位点杂合突变; ACADS 基因 c.1054G>A 位点杂合突变。据文献报道, ACADM c.799G>A 与 c.1085G>A 均为致病突变^[3], 与

[基金项目] 江苏省重点研究计划(社会发展)(BE2017650); 常州市科技支撑计划(社会发展)资助(CE20175021); 溧阳市社会发展项目(LC2017001)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: ybcz0519@163.com

MCADD 的发生有关;ACADS c.1054G>A 为疑似致病突变,可能与短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症的发生有关(表2)。

对于发现的变异进行患儿以及父母的验证。ACADM 基因 c.799G>A 突变位点的引物为:ACADM-e9F: 5'-ATGAACAAATAGGCGTGA-3', ACADM-e9R: 5'-ATTA AAAAGAGAAACACACTG-3';ACADM 基因 c.1085G>A 的引物序列为:ACADM-e11F: 5'-GTTTAAAAAATAAAAAGGTC-3', ACADM-e11R: 5'-CTAAATAATCAGAAATCC-3'。使用待测位点的特异性引物,按照 TaKaRa LA PCR™ Kit Ver.2.1 (TaKa-

Ra) 操作流程进行 PCR 反应。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析并使用 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) 切胶回收纯化。回收产物稀释至 10 ng/μL,按照 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 公司,美国) 操作流程进行测序 PCR 反应及纯化,应用 ABI 3500XL (Applied Biosystems 公司,美国) 平台进行测序分析。经家系验证,患儿 ACADM 的 c.799G>A 和 ACADC 的 c.1054G>A 遗传自单基因携带的父亲,ACADM 基因的 c.1085G>A 遗传自单基因携带的母亲(图1)。

该患儿 42 d 体检未见明显异常,无明显 MCADD

表2 患儿基因诊断结果

| 突变基因 | 突变位置 | 转录编号 | 核苷酸改变 | 氨基酸改变 | 变异状态 | 变异类型 |
|-------|-----------------|-------------|-----------|---------|------|--------|
| ACADM | chr1:76215194 | NM_000016.4 | c.799G>A | p.G267R | 杂合突变 | 致病突变 |
| ACADM | chr1:76226946 | NM_000016.4 | c.1085G>A | p.G362E | 杂合突变 | 致病突变 |
| ACADS | chr12:121176967 | NM_000017.2 | c.1054G>A | p.A352T | 杂合突变 | 疑似致病突变 |

所有检测到的突变位点所导致的氨基酸的改变采用 SIFT、PolyPhen2、PROVEAN 和 Mutation Taser 等相关软件进行了致病性预测。

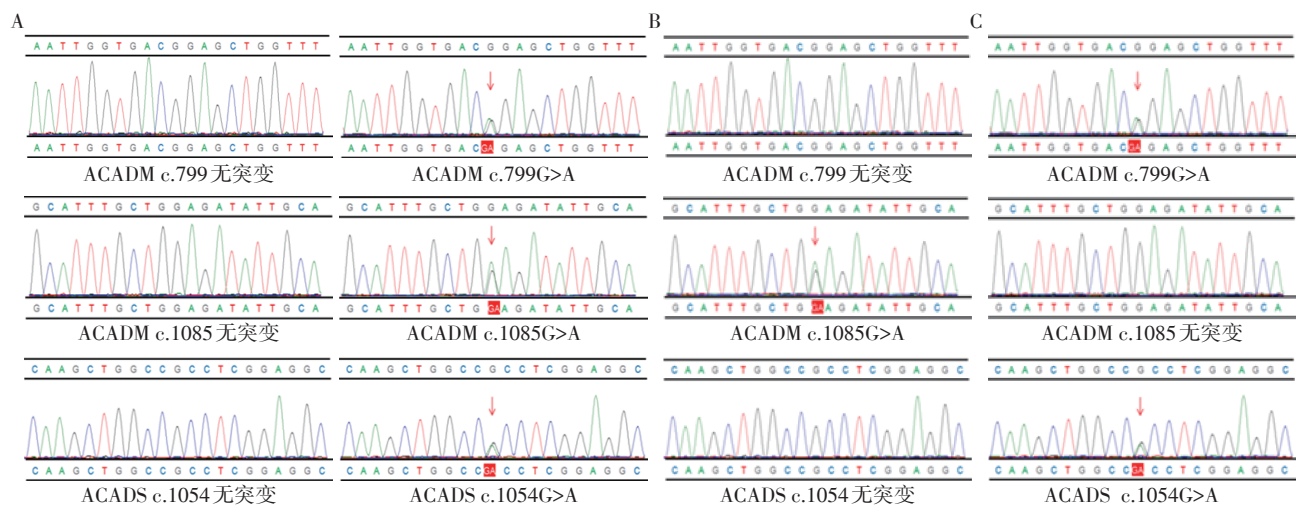


图1 患儿及其父母 Sanger 测序结果
A: 检测到患儿 ACADM 基因上存在 2 个突变位点,分别为 c.799G>A 和 c.1085G>A 两个错义突变,ACADC 基因上存在 c.1054G>A 的错义突变。B: 母亲携带了 ACADM 基因的 c.1085G>A; C: 父亲携带了 ACADM 的 c.799G>A 和 ACADC 的 c.1054G>A。

图1 患儿及其父母 Sanger 测序结果

症状,游离肉碱暂时在正常范围,遂未给予特殊临床治疗,采取随访观察。嘱咐患儿家属避免长期饥饿,避免食用富含中链甘油三酯配方的食品,并发感染性疾病时增加碳水化合物的摄入,严重时入院接受治疗。患儿随访至今,除了血酰基肉碱(C6、C8、C10)高于正常参考范围外尚无相关临床症状,且发育良好。其父母均为无症状携带者。

系统地分析 MCADD 常见的致病基因频谱,特别是在亚洲人群中的热点突变。分别在万方数据库、中国知网、pubmed 数据库中采用“中链酰基辅酶

A 脱氢酶缺乏症”、“medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency”为关键词进行了文献检索。经检索共发现国内相关病例报道 3 篇^[4-6],亚洲地区相关病例报道 7 篇^[7-13]。采集了文献的相关数据发现,亚洲人群中共报道 27 个突变位点,其中 20 种为亚洲人群发现的新型突变(表3)。

2 讨论

MCADD 是脂肪酸氧化代谢障碍疾病中较为常见的遗传代谢病。机体在肝脏、心脏、肾脏、棕色脂

表3 亚洲地区MACDD突变位点

| 参考文献 | 年份 | 核苷酸改变 | 国别/地区 | 变异状态 | 变异类型 | 是否为亚洲地区新发突变 |
|-----------------------------|------|------------------|-------|-----------|--------|-------------|
| 姜涛等 ^[4] | 2016 | C.572G>A | 中国湖南 | 纯合突变 | 致病突变 | 是 |
| 鄢力等 ^[5] | 2017 | c.716G>A | 中国四川 | 杂合突变 | 致病突变 | 否 |
| 鄢力等 ^[5] | 2017 | c.483delG | 中国四川 | 杂合突变 | 临床意义未明 | 是 |
| 谭建强等 ^[6] | 2016 | C.580A>G | 中国广西 | 纯合突变 | 致病突变 | 否 |
| Ensenauer等 ^[7] | 2005 | c.449_452delCTGA | 韩国 | 杂合突变 | 致病突变 | 是 |
| Hye In Woo等 ^[8] | 2011 | c.449_452delCTGA | 韩国 | 杂合突变 | 致病突变 | 是 |
| Purevsuren等 ^[9] | 2009 | c.449-452delCTGA | 日本 | 纯合突变/杂合突变 | 致病突变 | 是 |
| Hye In Woo等 ^[8] | 2011 | c.1189T>A | 韩国 | 杂合突变 | 临床意义未明 | 是 |
| Purevsuren等 ^[9] | 2009 | c.1189T>A | 日本 | 杂合突变 | 临床意义未明 | 是 |
| Hye In Woo等 ^[8] | 2011 | c.461T>G | 韩国 | 杂合突变 | 疑似致病突变 | 是 |
| Ensenauer等 ^[7] | 2005 | c.843T>A | 韩国 | 杂合突变 | 临床意义未明 | 是 |
| Purevsuren等 ^[9] | 2009 | c.275C>T | 日本 | 杂合突变 | 致病突变 | 是 |
| Purevsuren等 ^[9] | 2009 | c.157C>T | 日本 | 杂合突变 | 疑似致病突变 | 否 |
| Purevsuren等 ^[9] | 2009 | c.134A>G | 日本 | 杂合突变 | 疑似致病突变 | 否 |
| Purevsuren等 ^[9] | 2009 | c.820A>G | 日本 | 杂合突变 | 临床意义未明 | 是 |
| Purevsuren等 ^[9] | 2009 | c.1085G>A | 日本 | 杂合突变 | 致病突变 | 是 |
| Purevsuren等 ^[9] | 2009 | c.843A>T | 日本 | 杂合突变 | 致病突变 | 是 |
| Hara等 ^[10] | 2016 | c.811A>G | 日本 | 杂合突变 | 良性突变 | 是 |
| Hara等 ^[10] | 2016 | c.1247T>C | 日本 | 杂合突变 | 临床意义未明 | 否 |
| Purevsuren等 ^[11] | 2012 | c.212G>A | 日本 | 杂合突变 | 临床意义未明 | 是 |
| Tajima等 ^[12] | 2016 | c.1024T>C | 日本 | 杂合突变 | 致病突变 | 是 |
| Tajima等 ^[12] | 2016 | c.216+2T>C | 日本 | 杂合突变 | 致病突变 | 否 |
| Tajima等 ^[12] | 2016 | c.757G>A | 日本 | 杂合突变 | 临床意义未明 | 否 |
| Tajima等 ^[12] | 2016 | c.1121A>G | 日本 | 杂合突变 | 致病突变 | 是 |
| Tajima等 ^[12] | 2016 | c.50G>A | 日本 | 杂合突变 | 临床意义未明 | 是 |
| Tajima等 ^[13] | 2016 | c.1231G>T | 日本 | 杂合突变 | 疑似致病突变 | 是 |
| Chien等 ^[13] | 2013 | c.446_449delTGAC | 中国台湾 | 杂合突变 | 疑似致病突变 | 是 |

肪组织中会高表达中链酰基辅酶A脱氢酶,在长期饥饿或者某些应激状态下会通过脂肪酸氧化功能供应能量,MCADD患儿由于中链酰基辅酶A脱氢酶的缺陷,导致不能正常进行中链脂肪酸 β 氧化反应,以致乙酰辅酶A生成减少,继而ATP和酮体减少,能量缺乏又会导致糖酵解加速,糖异生抑制。同时线粒体中的中链酰基辅酶A无法脱氢造成蓄积,通过与甘氨酸、肉碱和转运到微粒体进行 ω 氧化产生有毒代谢产物如二羧酸等,对患儿造成肝损伤和大脑皮层氧化应激等伤害。

介于这种机制,MCADD的发病受环境因素影响较大,长期饥饿或者需要高能量的状态是诱发因素,MCADD发病时情况比较严重,会有20%的患儿在第1次发作时因代谢失调而死亡,20%的患儿会存在严重神经系统损伤风险^[14]。急性发作时的临床表现多种多样,可表现为低血糖、高氨血症、胃

炎、嗜睡、癫痫昏迷和婴儿猝死综合征等^[15]。

早期发现MCADD的最有效手段为串联质谱筛查,许多无症状患者都是通过新生儿疾病筛查才得以发现。有些国家串联质谱开展较早,对本国的MCADD发病率已经有了初步统计^[16-17],对比这些文献,发现MCADD发病率在北欧地区较高,在亚洲地区较低。所以目前亚洲地区的病例仍较少,中国地区尚未有突变频谱的报道。本研究将目前亚洲地区发现的MCADD病例基因突变进行了汇总分析,以此来了解亚洲人群的基因频谱情况。

1986年Matsubara等^[18]发现,MCADD的编码基因ACADM位于常染色体1p31.1上,包含12个外显子。随后几年又发现检测的34个突变等位基因中,31个为c.985A>C的错义突变,该突变位点为MCADD的优势突变位点,且多为纯合突变,后又被多位学者证实^[19-20]。2008年Nichols等^[21]在美国纽

约州筛查18个月以上的幼儿,发现c.199T>C为第2常见的突变位点,占ACADM等位基因的47%。而这两个在西方国家MCADD患儿中常见的优势突变位点在亚洲地区较为少见。有研究发现日本地区ACADM基因的优势突变为c.449_452delCTGA^[9-10],这个突变同样也在韩国有过病例报道^[7],在中国尚未出现过。同样在韩国和日本患者都出现过的突变基因还有c.1189T>A。患儿同样都是携带c.449_452delCTGA和c.1189T>A的复合杂合突变,日本患儿初次发病在出生后7个月,韩国患儿是通过串联质谱筛查得以检出,目前尚未有临床表现。在中国,鄢力等^[5]发现了2例c.483delG移码突变,是目前国内MCADD报道中最常见的1个突变。

目前国内外研究报道均未发现MCADD基因型与临床表型存在明显联系。这可能与该疾病受环境影响和新生儿疾病筛查较为普及,疾病得到了及时干预等因素有关。本研究确诊的MCADD患儿存在3个致病突变,其中2个是ACADM基因的错义突变,分别为c.799G>A和c.1085G>A。其中c.799G>A最早被日本发现并报道为致病突变。c.1085G>A最早在日本通过新生儿疾病筛查发现,患儿生长到5岁仍未有特异的临床表现。Hara等^[10]发现该位点的错义突变导致蛋白酶活性只有正常人的0.8%。这个和最早发现的1例没有发病的患儿临床表现相违背。这一现象也可以侧面验证MCADD受环境因素影响较大,及时干预会影响疾病的自然进程。由于亚洲地区的病例尚少,因此较为可靠的流行病学数据仍需长期积累和研究。

[参考文献]

[1] 张惠文,顾学范.中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症研究进展[J].国外医学(儿科学分册),2003,30(4):218-220
[2] 杨宇奇,蒋曙红,韩小亚,等.20027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
[3] Yokota I,Coates PM,Hale DE,et al. Molecular survey of a prevalent mutation,985A-to-G transition, and identification of five infrequent mutations in the medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene in 55 patients with MCAD deficiency [J]. Am J Hum Genet, 1991, 49(6): 1280-1291
[4] 姜涛,欧阳文献,谭艳芳,等.中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症1例肝脏病理分析及基因检测[J].临床儿科杂志,2016,34(4):249-252
[5] 鄢力,杨凡.2例ACADM基因复合杂合突变所致的中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症[J].重庆医科大学学

报,2017,42(5):601-605

[6] 谭建强,陈大宇,李哲涛,等.中、短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症患儿临床特点分析及基因突变研究[J].中国当代儿科杂志,2016,18(10):1019-1025
[7] Ensenauer R, Winters JL, Parton PA, et al. Genotypic differences of MCAD deficiency in the Asian population: novel genotype and clinical symptoms preceding newborn screening notification [J]. Genetics in Medicine, 2005, 7(5):339-343
[8] Hye In Woo, Hyung-Doo Park, Yong-Wha Lee, et al. Genotypic differences of MCAD deficiency in the Asian population: novel genotype and clinical symptoms preceding newborn screening notification [J]. Korean J Lab Med, 2011, 31:5460
[9] Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, et al. A novel molecular aspect of Japanese patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD): c.449-452delCTGA is a common mutation in Japanese patients with MCADD [J]. Mol Genet Metab, 2009, 96(2):77-79
[10] Hara K, Tajima G, Okada S, et al. Significance of ACADM mutations identified through newborn screening of MCAD deficiency in Japan [J]. Mol Genet Metab, 2016, 118(1):9-14
[11] Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, et al. Clinical and molecular aspects of Japanese children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency [J]. Mol Genet Metab, 2012, 107(1/2, SI):237-240
[12] Tajima G, Hara K, Tsumura M, et al. Screening of MCAD deficiency in Japan: 16 years' experience of enzymatic and genetic evaluation [J]. Mol Genet Metab, 2016, 119(4):322-328
[13] Chien YH, Lee NC, Chao MC, et al. Fatty acid oxidation disorders in a Chinese population in Taiwan [J]. JIMD Rep, 2013, 11:165-172
[14] Gramer G, Haegi G, Fang-Hoffmann J, et al. Medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: evaluation of genotype-phenotype correlation in patients detected by newborn screening [J]. JIMD Rep, 2015, 23:101-112
[15] Iafolla AK, Tompson RJ, Roe CR. Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children [J]. J Pediatr, 1994(124):409-415
[16] Andresen BS, Dobrowolski SF, O'reilly L, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency [J]. Am J Hum Genet, 2001(68):1408-1418
[17] Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, et al. Newborn mass

- screening and selective screening using electrospray tandem mass spectrometry in Japan [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 776(1): 39-48
- [18] Matsubara Y, Kraus JP, Yang-Feng TL, et al. Molecular cloning of cDNAs encoding rat and human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human chromosome 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(17): 6543-6547
- [19] Yokota I, Saijo T, Vockley J, et al. Molecular basis of medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. An A to G transition at position 985 that causes a lysine-304 to glutamate substitution in the mature protein is the single prevalent mutation [J]. *J Clin Invest*, 1990, 86(3): 1000-1003
- [20] Gregersen N, Andresen BS, Bross P, et al. Molecular characterization of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency; identification of a lys329 to glu mutation in the MCAD gene, and expression of inactive mutant enzyme protein in *E.coli* [J]. *Hum Genet*, 1991, 86(6): 545-551
- [21] Nichols M, Saavedra-Matiz CA, Pass KA, Caggana M. Novel mutations causing medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: under-representation of the common c.985 A>G mutation in the New York state population [J]. *Am J Med Genet A*, 2008, 146A(5): 610-619
- [收稿日期] 2018-05-10

(上接第452页)

- al thrombi after thoracoscopic ablation in absence of heparin and appendage closure [J]. *Ann Thorac Surg*, 2017, 104(3): 790-796
- [30] Panikker S, Lord J, Jarman JW, et al. Outcomes and costs of left atrial appendage closure from randomized controlled trial and real-world experience relative to oral anticoagulation [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(46): 3470-3482
- [31] Pison L, Gelsomino S, Luca F, et al. Effectiveness and safety of simultaneous hybrid thoracoscopic and endocardial catheter ablation of lone atrial fibrillation [J]. *Ann Cardiothorac Surg*, 2014, 3(1): 38-44
- [32] Tahir K, Kiser A, Caranasos T, et al. Hybrid epicardial-endocardial approach to atrial fibrillation ablation [J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2018, 20(3): 25
- [33] Edgerton Z, Perini AP, Horton RA, et al. Hybrid procedure (Endo/epicardial) versus standard manual ablation in patients undergoing ablation of longstanding persistent atrial fibrillation: results from a single center [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2016, 27(5): 524-530
- [34] Pearman CM, Poon SS, Bonnett LJ, et al. Minimally invasive epicardial surgical ablation alone versus hybrid ablation for atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis [J]. *Arrhythm Electrophysiol Rev*, 2017, 6(4): 202-209
- [35] Kuck KH, Hoffmann BA, Ernst SA, et al. Impact of complete versus incomplete circumferential lines around the pulmonary veins during catheter ablation of paroxysmal atrial fibrillation results from the gap-atrial fibrillation-German atrial fibrillation competence network 1 trial [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2016, 9(1): e3337
- [36] Toplisek J, Pernat A, Ruzic N, et al. Improvement of atrial and ventricular remodeling with low atrial fibrillation burden after hybrid ablation of persistent atrial fibrillation [J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2016, 39(3): 216-224
- [收稿日期] 2018-05-20