

串联质谱技术新生儿筛查发现甲基丙二酸血症 1 例并文献复习

孙云¹, 杨冰¹, 焦泽霖², 夏涛², 蒋涛^{1*}

(¹南京医科大学附属南京妇幼保健院新生儿筛查中心, 江苏 南京 210004; ²南京医科大学第二附属医院新生儿科, 江苏 南京 210003)

[关键词] 甲基丙二酸血症; 串联质谱技术; 新生儿筛查

[中图分类号] R722.11

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1451-03

doi:10.7655/NYDXBNS20141042

甲基丙二酸血症(methylmalonic acidemia, MMA)是最常见的一种有机酸血症,主要是由于甲基丙二酰辅酶 A 变位酶或其辅酶腺苷钴胺素及甲基钴胺素缺陷,体内缬氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苏氨酸和奇数碳脂肪酸分解代谢过程中的甲基丙二酰辅酶 A 不能转化成琥珀酰辅酶 A,旁路代谢增强,导致甲基丙二酸和甲基枸橼酸等毒性物质异常蓄积,造成多脏器损伤,尤其是神经系统损伤,严重时常危及患儿生命。该病新生儿期临床表现没有特异性,易误诊,串联质谱技术新生儿筛查有助于该病的早期诊断和早期治疗,从而降低病死率,改善预后。南京市新生儿筛查中心在江苏省内首次通过串联质谱新生儿筛查发现 1 例 MMA 患儿,以下是对该患儿的临床资料总结和相关文献复习。

1 临床资料

患儿,女,胎龄 36⁺₆ 周,因“胎膜早破,母亲双角子宫”剖宫产娩出,出生体重 2 650 g,其母曾自然流产 3 次。生后母乳喂养,吃奶少,睡眠多,出生后 3 d 采集足跟血,送检串联质谱技术新生儿筛查(Waters Quattro API 串联质谱仪,试剂购自美国 PE 公司)。出生后 8 d 因“嗜睡,吃奶差”收入南京医科大学第二附属医院新生儿科治疗,诊断:新生儿高胆红素血症,败血症?入院体检:体温 36.0℃,心率 130 次/min,呼吸 35 次/min,体重 2 270 g,反应差,呼吸急促,全身皮肤黄染,余未见异常。

入院后予保暖,补液和光疗退黄治疗。入院第 2

天,患儿皮肤黄染减轻,但精神反应差和呼吸困难较入院时加重,伴有呕吐腹胀,血糖:1.62 mmol/L,尿酮体:1+,肝功能除总胆红素、直接胆红素、间接胆红素增高外无异常,电解质正常,血气分析示 pH 7.27, PCO₂ 13 mmHg, PO₂ 179 mmHg, BE 17.7 mmol/L, HCO₃⁻ 6.0 mmol/L, 乳酸:8.8 mmol/L。提示代谢性酸中毒。给予碳酸氢钠常规纠酸,生理盐水扩容。入院第 3 天,血气分析:pH 7.18, PCO₂ 12 mmHg, PO₂ 121 mmHg, BE 23.9 mmol/L, HCO₃⁻ 4.5 mmol/L, 乳酸:13.7 mmol/L, 代谢性酸中毒持续加重,考虑遗传代谢病可能,给予禁食,暂不予氨基酸、脂肪乳剂。

入院第 4 天(即出生后 11 d),串联质谱技术新生儿筛查结果回报:血丙酰肉碱(propionylcarnitine, C3)23.21 μmol/L, 正常参考值:0.30~3.37 μmol/L, C3/乙酰肉碱(acetylcarnitine, C2)1.40, 正常参考值:0.03~0.19, C3/游离肉碱(free carnitine, CO)0.97, 正常参考值:0.01~0.18, 均增高。立即行尿气相色谱-质谱检测(杭州博圣生物技术有限公司),结果提示尿甲基丙二酸:1 707.97 g/mol 肌酐,正常参考值:< 6.408 g/mol 肌酐,甲基枸橼酸:19.36 g/mol 肌酐,正常参考值:< 4.2 g/mol 肌酐,血同型半胱氨酸:1.5 μmol/L,正常参考值:0~15 μmol/L, MMA 临床诊断明确。给予肌注维生素 B₁₂ 1 mg, 1 次/d; 左旋肉碱 150 mg 口服, 1 次/d; 补充足够热量,低蛋白饮食,给予不含亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸和蛋氨酸的华夏 2 号特殊奶粉。

入院第 8 天(即维生素 B₁₂ 肌注 4 d 后),复查血串联质谱和尿气相色谱-质谱,血 C3:1.13 μmol/L, C3/C2:0.07, C3/CO:0.02, 尿甲基丙二酸:0 g/mol 肌酐,甲基枸橼酸:2.71 g/mol 肌酐,提示维生素 B₁₂ 有效。复查血气分析:pH 7.45, PCO₂ 35 mmHg, PO₂ 98 mmHg, BE

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科研项目(H201343);南京医科大学科技发展基金重点项目(2012NJMU199)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: jiangzhang784@163.com

0.6 mmol/L, HCO_3^- 24.3 mmol/L, 乳酸:1.6 mmol/L, 尝试普通婴儿配方奶粉喂养, 吸吮好, 无呕吐, 予出院。出院后继续肌注维生素 B_{12} 1 mg, 1 次/d, 左旋肉碱 150 mg 口服, 1 次/d。

出生后 1 个月复查, 普通婴儿配方奶粉喂养, 奶量 500 ml/d, 维生素 B_{12} 1 mg 肌注, 1 周 2 次, 左旋肉碱 200 mg 口服, 体重 3 000 g, 身高 50 cm, 头围 35 cm, 精神反应好。复查血串联质谱和尿气相色谱-质谱, 血 C_3 :7.1 $\mu\text{mol/L}$, C_3/C_2 :0.55, C_3/C_0 :0.28, 尿甲基丙二酸:274.44 g/mol 肌酐, 甲基枸橼酸:6.81 g/mol 肌酐。嘱家长恢复低蛋白饮食, 华夏 2 号特殊奶粉:普通婴儿配方奶粉:1:1, 保证天然蛋白质 1 g/(kg·d), 其余治疗不变并继续随访。

采集患儿外周血, 提取基因组 DNA, 经新一代半导体测序(包括文库构建、乳液 PCR 及磁珠颗粒富集、Ion Torrent PGM 平台测序、Ion Torrent Suite v3.0 软件分析)发现可疑突变位点, 传统 Sanger 测序法验证。检测到患儿 MMAA 基因编码区 2 个突变位点:NM172250:c.586C>T 即 NP758454:p.R196X (位于第 4 外显子) 和 NM172250:c.898C>T 即 NP758454:p.R300X (位于第 6 外显子), 后者为新发现突变, 经检索 PubMed 无文献报道。通过比对患儿父母的基因序列, 证实突变来源于双亲, 非自发突变。具体实验方法另文发表。

2 讨论

串联质谱技术新生儿筛查能通过一滴血检测 20 余种氨基酸和酰基肉碱, 筛查 30 余种遗传代谢病(包括氨基酸、有机酸、脂肪酸代谢紊乱等), 具有一次实验筛查多种疾病的优点^[1]。欧美等发达国家已将其列为法定筛查项目, 我国部分大中城市近年来也相继开展了该项检查, 南京市新生儿筛查中心作为江苏省首批开展串联质谱筛查的单位, 报道了江苏省首例新生儿筛查发现的 MMA 患儿, 并明确了基因诊断, 通过临床诊疗过程的回顾和文献复习以总结经验, 提高诊治水平。

2.1 发病率

MMA 于 1967 年被首次报道, 该病患病率日本约为 1/50 000, 意大利约为 1/61 775, 美国约为 1/48 000, 德国约为 1/169 000, 我国台湾约为 1/85 000^[2]。我国大陆地区目前尚无流行病学统计资料, 但是, 各地高危筛查资料显示该病在我国并不少见, 且 MMA 合并同型半胱氨酸血症是我国大陆地区的主要类型^[3]。浙江省报道对 129 415 例新生儿

进行串联质谱筛查, 发现 MMA 2 例, 初步统计发病率为 1/64 708^[4]。Han^[5]等对 3 070 例临床遗传代谢病高危儿童进行血串联质谱检测, 检出 MMA 58 例^[1]。广东省 748 例高危儿筛查, 检出 MMA 6 例^[6]。

2.2 临床诊断

MMA 婴儿期往往无特异性临床症状, 易误诊。最常见的症状和体征是反复呕吐、嗜睡、惊厥、运动障碍、智力及肌张力低下、严重代谢性酸中毒。除此外, 还可有肝肾损害, 血液系统异常, 免疫功能低下等并发症。根据维生素 B_{12} 负荷试验, 即连续 3 d 肌内注射维生素 B_{12} 。若症状好转, 生化异常改善, 则为维生素 B_{12} 有效型。无改善者则为无效型。cb1C、cb1D、cb1F 型多为维生素 B_{12} 有效型, cb1A、cb1B 型部分有效。其中 cb1C 型患儿最常见, mut 型多为无效型。本例患儿维生素 B_{12} 有效, 但普通奶粉喂养后出现血 C_3 及其比值、尿甲基丙二酸水平显著升高, 故给予维生素 B_{12} 和低蛋白饮食联合治疗, 结合基因诊断结果, 本例患儿应属于维生素 B_{12} 部分有效型。

2.3 基因突变

甲基丙二酰辅酶 A 变位酶缺陷及辅酶钴胺素的代谢缺陷共 7 种亚型, 均为常染色体隐性遗传, 其中甲基丙二酰辅酶 A 变位酶编码基因命名为 MUT, 可分为 mut⁰ 型(完全无活性)及 mut 型(有残余活性者), 对维生素 B_{12} 无反应; 钴胺素代谢缺陷包括: 线粒体钴胺素还原酶缺乏(cb1A), 线粒体钴胺素腺苷转移酶缺乏(cb1B); 以及 3 种为胞浆和溶酶体钴胺素代谢异常所致羟甲基钴胺素和甲基钴胺素合成缺陷(cb1C、cb1D、cb1F)^[7-8], 合并高同型半胱氨酸血症, 多为维生素 B_{12} 反应型。基因突变的检测有助于 MMA 的类型鉴别, 从而指导临床治疗和判断预后。

MMA 基因多达 7 种, 突变类型多, 既往多通过一代测序技术进行基因诊断, 实验过程繁琐且耗费时间较长。本例采用了目前先进的高通量测序技术, 检测出患儿 cb1A 基因复合杂合突变, 即 R196X/R300X, 其中 R300X 为新发现的突变。该基因型提示为线粒体钴胺素还原酶缺乏, 多为维生素 B_{12} 部分反应型, 与患儿的临床表型相符。

2.4 串联质谱技术新生儿筛查

串联质谱技术新生儿筛查血 C_3 和 C_3/C_2 、 C_3/C_0 指标增高是诊断 MMA 的重要方法, 气相色谱-质谱检测尿甲基丙二酸及甲基枸橼酸水平增高是诊断 MMA 较为特异的指标。也有学者提出部分患儿血 C_3 水平处于正常参考值范围内, 仅 C_3/C_2 增高, 结合气相色谱质谱检测尿甲基丙二酸水平增高, 并

经基因检测诊断为甲基丙二酸血症,究其原因可能是由于急性期患儿进食少或呕吐,肉碱摄入不足,此病又消耗大量肉碱,导致体内C0水平降低,结合的肉碱相应降低,此时血C3可在正常范围,但与其他酰基肉碱的比值仍增高。上海统计162例MMA患儿,尿甲基丙二酸和甲基枸橼酸水平显著高于对照组,其中15例患儿血C3在正常范围内,而C3/C2高于正常。提示尿甲基丙二酸及血C3/C2显著增高对诊断MMA最具有特异性^[7]。

MMA患儿往往起病急骤,病情凶险,常因严重的酸中毒和代谢紊乱在新生儿期夭折,因此早期诊断有利于降低病死率并改善长期预后。本例患儿在新生儿串联质谱筛查结果之前已出现严重代谢性酸中毒,新生儿筛查实验室在发现可疑阳性结果后立即与患儿家长及其主管医生联系,予禁食,避免氨基酸输入,供给足够热量等并留尿行气相色谱-质谱检测以明确诊断,使患儿病情得到了缓解,说明筛查实验结果的及时回报有助于临床早期诊断,一定程度上可以挽救患儿生命;对于个别病情极其危重,早期夭折的新生儿,串联质谱筛查有助于明确死亡原因,为下一胎的产前诊断提供可能性。

2.5 治疗及预后

MMA中维生素B₁₂无效型以低蛋白高热量饮食为主,予不含亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸和蛋氨酸的特殊配方奶粉喂养,由于这些氨基酸为必需氨基酸,故特殊配方奶粉不能作为蛋白质的唯一来源,应进食少量天然蛋白质;维生素B₁₂有效型则以长期坚持维生素B₁₂治疗为主,急性期以肌肉注射为主,每周1~2次,每次1mg,部分患儿病情稳定后可改成口服,辅以左旋肉碱[50~100mg/(kg·d)]和叶酸治疗(10~30mg/d),补充肉碱有助于急性期病情控制和有效地改善预后^[8]。

MMA的预后取决于其分型、早期诊断及治疗3方面。确诊后坚持长期合理治疗可有效地改善预后。近年来,随着新生儿串联质谱技术的普及,MMA患儿得以早发现早治疗,病死率下降,预后改善,有文献指出^[9-11],cblA型预后最好,70%健康生存;维生素B₁₂无效型预后不佳,mut⁰型预后最差,60%死亡,40%发育显著迟缓。新生儿发作型患儿病死率达80%。

本例系江苏省内首次报道的通过新生儿筛查发现并及时确诊治疗的MMA阳性患儿,并通过目前国际上较为先进的下一代半导体测序技术^[12]完成了

基因诊断,经过精心治疗和随访,患儿目前一般情况良好,还将继续密切随访以观察预后。遗传代谢病除生化诊断外,基因诊断有助于明确疾病类型,指导治疗和判断预后,意义重大。本研究初步建立了基因诊断的方法并积累了一定的经验,对各地开展串联质谱筛查和遗传代谢病诊疗工作有一定的指导作用。

[参考文献]

- [1] 顾学范,叶军. 新生儿疾病筛查[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2003:129-137
- [2] Cheng KH,Liu MY,Kao CH,et al. Newborn Screening for methylmalonic acidemia by Tandem Mass Spectrometry:7 Years' Experience From Two Centers in Taiwan[J]. J Chin Med Assoc,2010,73(6):314-318
- [3] Liu MY,Yang YL,Chang YC,et al. tation spectrum of MMACHC in Chinese patients with combined methylmalonic acidemia and homocystinuria[J]. J Hum Genet, 2010,55(9):621-626
- [4] 黄新文,杨建滨,童凡,等. 串联质谱技术对新生儿遗传代谢病的筛查和随访研究[J]. 中华儿科杂志,2011,49(10):765-770
- [5] Han LS,Ye J,Qiu WJ,et al. Selective screening for inborn errors of metabolism on clinical patients using tandem mass spectrometry in China;a four-year report[J]. J Inherit Metab Dis,2007,30(4):507-514
- [6] 江剑辉,曹伟锋,姜迪刚. 748例遗传性代谢病高危儿童串联质谱筛查研究[J]. 广东医学,2008,29(3):357-359
- [7] 王斐,韩连书,胡宇慧,等. 甲基丙二酸血症伴同型半胱氨酸血症患儿基因突变分析[J]. 中华儿科杂志,2009,47(3):189-193
- [8] 张尧,宋金青,刘平,等. 甲基丙二酸尿症合并同型半胱氨酸血症57例临床分析[J]. 中华儿科杂志,2007,45(7):513-517
- [9] 王斐,韩连书,叶军,等. 甲基丙二酸血症患儿MUT基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2009,26(5):485-489
- [10] 刘玉鹏,马艳艳,吴桐菲,等. 早发型甲基丙二酸尿症160例新生儿期异常表现[J]. 中华儿科杂志,2012,50(6):410-414
- [11] de Baulny HO,Benoist JF,Rigal O,et al. Methylmalonic and propionic acidemias;management and outcome [J]. Inherit Metab Dis,2005,28(3):415-423
- [12] 卢超霞,吴炜,肖继芳,等. 应用下一代半导体靶向测序技术检测Marfan综合征致病突变[J]. 中华医学遗传学杂志,2013,30(3):301-304

[收稿日期] 2013-12-18