

970 例新生儿遗传性代谢病筛查及分子诊断结果分析

唐建平¹, 孙红芹¹, 张磊¹, 石聪聪^{2a}, 李雯丽^{2a}, 李菲^{2b}, 肖昕^{2a, 2b}, 郝虎^{2a, 2b}

(1. 广州市增城区妇幼保健院新生儿科, 广东 广州 511300; 2. 中山大学附属第六医院

a. 遗传代谢病实验室, b. 儿科, 广东 广州 510655)

摘要: **目的** 研究新生儿期遗传性代谢疾病(IMD)的发病率、临床特征及诊断方法。**方法** 留取新生儿科 970 例新生儿的尿液样本, 采用尿素酶预处理-气相色谱-质谱联用技术(UP-GC-MS)进行遗传性代谢病的诊断; 对于确诊的患儿, 收集患儿及其父母的外周血样本进行致病基因的 Sanger 测序分析。**结果** 970 例新生儿中通过 UP-GC-MS 技术确诊遗传性代谢病 5 例, 阳性率为 1/194, 包括甲基丙二酸血症 2 例、尿素循环障碍 2 例、枫糖尿症 1 例。5 例患儿相关致病基因的 Sanger 测序结果均发现致病突变。**结论** 对于病因不明的新生儿期患儿应及早进行遗传性代谢疾病筛查, UP-GC-MS 是诊断新生儿遗传性代谢病的快速有效方法, 其检测结果可为患儿的早期诊断和治疗提供依据。对于阳性患儿, 基因检测可进一步探讨其分子水平的致病病因, 为临床医生提供可靠的分子检测结果, 有效地为后续的临床治疗和遗传咨询提供依据。

关键词: 遗传代谢性疾病; 气相色谱质谱技术; 新生儿; 基因

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.05.026

Screening analysis of inherited metabolic disorders in 970 newborns and gene mutation analysis in the positive cases

TANG Jianping¹, SUN Hongqin¹, ZHANG Lei¹, SHI Congcong^{2a}, LI Wenli^{2a}, LI Fei^{2a}, XIAO Xin^{2a, 2b}, HAO Hu^{2a, 2b}

(1. Zengcheng District Maternal and Child Care Hospital, Guangzhou, Guangdong 511300, China;

2a. The Laboratory of Inborn Errors of Metabolism, 2b. Department of Pediatrics,

The Sixth Affiliated Hospital of the Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510655, China)

Abstract: **Objective** To research the incidence, clinical characteristics and diagnostic methods of inherited metabolic disorders (IMD) in the newborns. **Methods** The urine samples from 970 newborns were collected. The urease pretreatment-gas chromatography-mass spectrometry (UP-GC-MS) was taken to diagnosis the metabolic disorders of inherited. The related disease genes from the peripheral blood leukocytes of newborns patients with IMD and parents were analyzed by Sanger sequencing in genomic DNA. **Results** In the 970 cases, there were 5 cases of inherited metabolic diseases (IMD) (1/194), which including 2 cases of Methylmalonic aciduria, 2 cases of abnormal urea cycle and 1 cases of maple syrup urine disease. In addition, there were some pathogenic mutations in tested genes of the 5 cases. **Conclusions** For the newborns of unknown etiology, it is very necessary to diagnosis the possibility of inherited metabolic diseases as soon as possible. UP-GC-MS is an effective method to diagnose inherited metabolic diseases. The results of the tests can provide effective guidance for diagnosis and treatment of suspected newborn. For patient, gene analysis can provide the base for the pathogenesis discussion from molecular level and reliable detection result for later clinical treatment and genetic counselling.

Key words: Inherited metabolic diseases; Gas chromatography mass spectrometry; Newborn; Gene

遗传性代谢病 (IMD) 或称先天性代谢缺陷病 (IEM), 是由于遗传性代谢途径缺陷, 导致异常代谢物质蓄积或必需物质缺乏, 而出现相应的临床症状和实验室检查异常的一类疾病, 包括氨基酸、有机酸、脂肪酸、糖类、嘌呤和嘧啶等多种物质的代谢异常, 其中部分疾病如有机酸血症、尿酸循环障碍、脂肪氧化障碍等通常在新生儿期发病, 且此时期发病的患儿病情一般较为严重, 常累及全身多个器官,

若不能及时诊断、合理治疗, 病死率很高, 而存活者也常伴随严重神经系统损害^[1-3]。然而, 由于这类疾病常常只出现惊厥、呕吐、代谢性酸中毒等非特异性症状, 易被漏诊或误诊。因此, 遗传代谢病患儿的早期诊断具有至关重要的临床意义, 是解决临床诊断、提高生存率及生活质量的重要举措。本研究采用尿素酶预处理-气相色谱-质谱联用技术 (UP-GC-MS) 对广州市增城区妇幼保健院新生儿科住院患儿进行遗传性代谢疾病的筛查, 并采用 Sanger 测序技术对阳性患儿进行分子水平检测, 以期能明确

遗传代谢疾病在新生儿中的发病率、临床特征及诊断标准,从而帮助临床早发现、早诊断及早治疗。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015年1月—2016年6月在广州市增城区妇幼保健院新生儿科住院的970例新生儿,其中男542例,女428例,纳入标准:(1)早产儿或巨大儿;(2)极低出生体质量儿、超低出生体质量儿;(3)营养不良患儿;(4)血气分析、生化分析提示代谢异常患儿,如反复出现的严重代谢性酸中毒和(或)阴离子间隙增大者,三氯化铁实验、2,4-二硝基苯脲实验或血氨基酸检查等提示 IEM 者;(5)无明显原因的反复呕吐者;(6)尿液有异常颜色和(或)气味者;(7)母亲有多次不良妊娠和(或)生育史者;(8)顽固性惊厥和(或)癫痫,精神发育异常(如孤独症样表现者),智力和(或)运动发育迟缓,或停滞、甚至倒退者;(9)有“顽固性湿疹”、“红皮病”、“脓皮病”、“牛皮癣”样皮肤表现者。

收集尿液样本5~10 mL进行UP-GC-MS筛查,对于检测结果阳性的患儿,抽取其与父母的外周血样本进行相关致病基因的外显子碱基序列分析。本研究获得广州市增城区妇幼保健院医学伦理委员会的批准,且所有受试患儿家属均知情同意。

1.2 仪器与试剂 气相色谱-质谱联用仪(日本电子, Q1000型)、试管浓缩仪(维新明智科技有限公司, TC-8F)、循环水真空泵(上海亚荣生化仪器, SHZ-ⅢD)、色谱柱(日本 Ultra Alloy + 5 UA5-30M-0.25F)、尿素酶(美国 sigma, sigma Type C Ⅲ)、诱导剂(美国 sigma, BSTFA/TMCS)。

1.3 GC/MS 条件 色谱条件:进样量2 μL ,进样口温度260 $^{\circ}\text{C}$,离子源温度200 $^{\circ}\text{C}$,接口温度220 $^{\circ}\text{C}$ 。程序升温起始温度60 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min,以17 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至220 $^{\circ}\text{C}$,以15 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至325 $^{\circ}\text{C}$,保持10 min。载气为氦气,载气流速1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。质谱条件:电离方式EI;电子能量70 eV;质谱扫描范围:50~650 m/z ;扫描方式为全扫描方式。

1.4 GC/MS 数据处理 检测数据使用先天性代谢病诊断软件和诊断数据库(日本 MILS)进行分析,对检测峰进行定性和定量。由于人体内肌酐浓度相对稳定,我们将肌酐的检测值作为内标,用检测物的峰面积与肌酐的峰面积进行比值,所得到的数据与该项比值的正常值上限进行比较,得到检测物与正常值上限之间的倍率。每个尿液样本检测250种代谢产物,排查141种遗传代谢病。

1.5 基因检测 采集 UP-GC-MS 检测结果为阳性的患儿及其父母外周血2~4 mL,利用 Qiagen 公司的 DNA 提取试剂盒(the QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen)提取基因组 DNA。DNA 产物送上海立菲生物技术有限公司进行指定基因外显子的 Sanger 测序分析。测序结果使用 Chromas 软件与 NCBI 数据库中人类基因组序列进行比较分析。

1.6 统计学方法 遗传代谢病在研究对象和性别等方面的发病概率采用统计描述,遗传代谢病在性别中的差异表达采用 SPSS 19.0 软件进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料分析 970例新生儿中男542例,女428例,年龄1~28 d。经UP-GC-MS技术确诊的5例患儿中男2例,女3例,年龄8~17 d,胎龄35~39周,体质量2 700~4 800 g。遗传代谢病在新生儿中的发病率为1/194;其中男性发病率为1/271,女性发病率为1/143,比较阳性发病率在性别间的差异,其 $\chi^2 = 0.068$, $P = 0.794$,差异无统计学意义。

阳性患儿中4例均无家族史,仅例5尿素循环障碍患儿表现出家族史,其母亲曾生育一男性患儿,5 d不明原因死亡;其外婆曾生育3个男孩儿,其中有2个分别于14 d和42 d不明原因死亡,第3个至今无类似异常。5例患儿发病期的主要临床症状见表1。

2.2 UP-GC-MS 技术筛查结果及阳性指标 通过UP-GC-MS技术进行筛查,970例新生儿中5例被诊断患有遗传代谢病,分别为枫糖尿症1例、甲基丙二酸血症2例、尿素循环障碍2例。UP-GC-MS检测结果显示:甲基丙二酸患儿的尿液中甲基丙二酸、甲基枸橼酸及3-羟基丙酸均明显增高;尿素循环障碍患儿的尿液中乳清酸、尿嘧啶、乳酸均明显增高;枫糖尿症患儿的尿液中2-羟基异戊酸、2-羟基异己酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、3-羟基异戊酸明显增高,见表1。

2.3 Sanger 测序结果 采用 Sanger 测序技术分别对5例阳性患儿发病相关的已知致病基因外显子进行测序。其中枫糖尿症患儿检测的致病基因为 *BCKDHA*、*BCKDHB*、*DBT*、*DLD*;甲基丙二酸患儿的检测基因为 *MUT*、*MMAA*、*MMAB*、*MCEE*、*MMACHC*;尿素循环障碍患儿检测的基因为 *OTC*、*AS*、*AL*。测序结果显示:例1患儿的致病基因为 *BCKDHB*,例2患儿的致病基因为 *MUT*,例3患儿的致病基因为

表 1 5 例患儿的临床症状及尿素酶预处理-气相色谱-质谱联用技术的检测结果

编号	性别	日龄/d	主要临床症状	阳性指标	诊断
1	女	16	嗜睡、酸中毒、尿焦糖样气味	2-羟基异戊酸、2-羟基异己酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、乳酸、酮体、3-羟基异戊酸 ↑	枫糖尿症
2	女	9	嗜睡、酸中毒、抽搐、昏迷、喂养困难	甲基丙二酸、甲基枸橼酸、3-羟基丙酸 ↑	甲基丙二酸血症
3	女	17	酸中毒、抽搐	甲基丙二酸、甲基枸橼酸、乳酸、3-羟基丙酸 ↑	甲基丙二酸血症
4	男	10	高乳酸、高血氨、黄疸、抽搐	乳清酸、尿嘧啶、乳酸 ↑	尿素循环障碍
5	男	8	高乳酸、高血氨、抽搐	乳清酸、乳酸、酮体、甘油、尿嘧啶、嘧啶类代谢产物 ↑	尿素循环障碍

注：↑表示浓度增高。

表 2 5 例患儿及其父母 Sanger 测序结果

编号	基因	染色体	转录本	外显子	核苷酸改变	氨基酸改变	纯合/杂合
1	<i>BCKDHB</i>	Chr6	NM_000056	Exon8	c. 853C > T ^a	p. R285X	杂合
	<i>BCKDHB</i>	Chr6	NM_000056	Exon9	c. 1006G > A ^b	p. G336S	杂合
2	<i>MUT</i>	Chr6	NM_000255	Exon6	c. 1159T > G ^a	p. T387P	杂合
	<i>MUT</i>	Chr6	NM_000255	Exon6	c. 1106G > A ^b	p. R369H	杂合
3	<i>MMAB</i>	Chr12	NM_052845	Exon3	c. 289_290 del GG ^b	p. G97V fs X120	杂合
	<i>MMAB</i>	Chr12	NM_052845	Exon7	c. 566G > A ^a	p. C189Y	杂合
4	<i>OTC</i>	ChrX	NM_000531	Exon2	c. 148 G > T ^c	p. G50X	纯合
5	<i>OTC</i>	ChrX	NM_000531	Exon9	c. 959G > C ^b	p. R320P	纯合

注：^a表示突变来自父源；^b表示突变来自母源；^c表示新发突变。

MMAB,例 4 和例 5 患儿的致病基因均为 *OTC*。此外,例 1、例 2 和例 3 的致病突变均为复合杂合突变,分别遗传自其父亲和母亲;例 4、例 5 均为纯合突变(半合子),其中例 4 的致病突变为新发突变,而例 5 的致病突变遗传自其母亲,见表 2。

3 讨论

遗传性代谢病多属于罕见病,目前已发现的病种达 500 多种,虽然单一疾病发病率很低,但总体发病率较高^[4]。Yoon 等^[5]对韩国 79 179 例新生儿进行遗传代谢病筛查,其阳性发病率为 1/2 800。Cleary^[6]对日本 14 200 例新生儿进行筛查,其阳性发病率为 1/1 100。王婵等^[7]对北京地区的 5 400 例新生儿科住院的新生儿进行筛查,其遗传代谢病的发病率为 1/466。宋元宗等^[8]对 327 例高危患儿进行遗产代谢病检测,确诊 27 例,其阳性发病率为 1/12。本研究运用 UP-GC-MS 技术对 970 例新生儿进行筛查,其中确诊 5 例患儿,阳性发病率为 1/194。综上,国内外新生儿遗传性代谢病的发病率均普遍较高,但因研究对象选取的不同,其发病率不同。此外,本研究对遗传代谢病在男女性别之间的发病率进行了比较,结果显示其差异无统计学意义,提示遗传代谢病的发病率与性别无关。

970 例新生儿中 5 例患儿通过 UP-GC-MS 技术被诊断患有遗传代谢病,疾病种类包括枫糖尿症、甲基丙二酸尿症和尿素循环障碍。枫糖尿症患儿的 UP-GC-MS 检测结果显示尿液中 2-羟基异戊酸、2-羟基异己酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、3-羟基异戊酸明显增高。2 例甲基丙二酸患儿的 UP-GC-MS 检测结果显示尿液中甲基丙二酸、甲基枸橼酸及 3-羟基丙酸均明显增高。2 例尿素循环障碍患儿的 UP-GC-MS 检测结果显示尿液中乳清酸、尿嘧啶、乳酸均明显增高。本研究所检测的 3 种遗传代谢病,其尿中特异性代谢物质与国内其他研究的检测结果相比,其结果基本一致^[9-11]。

2 例甲基丙二酸患儿的临床均有酮症酸中毒且伴随抽搐,其发病机制上可能是由于有机酸的异常堆积破坏身体酸碱平衡,从而导致代谢性酸中毒。氨基酸代谢类疾病通常表现为喂养困难,酸中毒,昏睡,激惹不安,惊厥等,有些会伴随某种特殊症状和体征,如尿液特殊气味及特殊色泽、头发色泽异常、肝脾肿大、骨骼异常等。本研究中 1 例枫糖尿症患儿临床表现为嗜睡、酸中毒及尿焦糖样气味,其中患儿尿液及汗液中散发出焦糖样的气味是该症的特异性表征。尿素循环障碍是先天性高氨血

症的主要发病原因,常常在新生儿哺乳数次后出现急性高氨血症^[12]。本研究中2例患儿均表现出高氨血症及高乳酸血症,且临床表现类似“败血症”,所以新生儿临床反复或持续表现高氨血症时应高度怀疑尿素循环障碍。

遗传性代谢病虽多为单基因疾病,但其发病的分子机制复杂不一,不同的基因突变可能导致相同的疾病,而不同的疾病也可能由同一基因决定,致病分子机制的研究可为精准的临床治疗和遗传咨询提供依据。为探讨5例阳性患儿发病的分子机制,本研究采用Sanger测序技术分别对其发病相关已知致病基因的外显子进行测序,均发现致病突变。例1患儿的UP-GC-MS检测结果为枫糖尿症,基因检测结果明确了其致病基因*BCKDHB*,该基因与枫糖尿症Ib型的发病相关,提示患儿为枫糖尿症Ib型。例2和例3患儿UP-GC-MS检测结果均为甲基丙二酸尿症,基因检测结果显示其致病基因分别为*MUT*和*MMAB*,*MUT*基因编码甲基丙二酰辅酶A变位酶,突变可导致无活性的mut⁰型,*MMAB*基因编码腺苷三磷酸钴胺素腺苷转移酶,突变可导致cblB型。临床治疗甲基丙二酸尿症常常使用维生素B₁₂,但维生素B₁₂却对mut⁰型的甲基丙二酸尿症患儿治疗无效,而对cblB型的甲基丙二酸尿症患儿治疗部分有效,所以遗传代谢病的分子诊断结果可为临床的精准治疗提供可靠的依据。

例4和例5患儿尿检测结果均诊断为尿素循环障碍,基因检测结果显示致病基因均为*OTC*,提示这2例患儿为鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症(OTCD),该症是尿素循环障碍中最常见的一种疾病。*OTC*基因为X连锁隐性遗传,例4和例5患儿均为男性,即一个致病突变就可导致OTCD的发生。研究发现例4的突变位点c.148 G>T为新发突变,其母亲在该位点未见突变,而例5的突变位点c.959G>C遗传自其母亲。此外,结合例5的家族史,推测其母亲之前生育的不明原因死亡的男性患儿可能携带同一致病位点,其外婆曾生育的2个不明原因死亡的男性患儿也可能携带同一致病位点,而突变位点c.959G>C位点是由外婆遗传给患儿的母亲。我们将进一步对该家系进行基因分析,以

明确该家系致病突变的遗传模式。

综上所述,遗传代谢病在新生儿中的发病率应引起临床医生的高度重视,本研究采用的UP-GC-MS技术灵敏度高、特异性强,可为遗传代谢病的早期诊断提供强有力的依据。基因检测技术在遗传代谢病诊断中的应用,可以为临床医生在疾病分型、精准治疗及后续的遗传咨询、产前诊断等方面提供有效的依据。

参考文献

- [1] CAMPISTOL J, PLECKO B. Treatable newborn and infant seizures due to inborn errors of metabolism[J]. *Epileptic Disord*, 2015, 17(3):229-242.
- [2] VERNON HJ. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy[J]. *JAMA Pediatr*, 2015, 169(8):778-782.
- [3] TAL G, PITT J, MORRISY S, et al. An audit of newborn screening procedure: impact on infants presenting clinically before results are available[J]. *Mol Genet Metab*, 2015, 114(3):403-408.
- [4] BARI ĆI, FUMI ĆK, HOFFMANN GF. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium[J]. *Croat Med J*, 2001, 42(4):379-383.
- [5] YOON HR, LEE KR, KANG S, et al. Screening of newborns and high-risk group of children for inborn metabolic disorders using tandem mass spectrometry in South Korea: a three-year report[J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 354(1/2):167-180.
- [6] CLEARY MA. Developmental delay: when to suspect and how to investigate for an inborn error of metabolism[J]. *Archives of Disease in Childhood*, 2005, 90(11):1128-1132.
- [7] 王婵, 何玺玉, 封志纯, 等. 5400例新生儿期遗传代谢性疾病筛查结果分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(9):753-755.
- [8] 宋元宗, 张霆, 张春花, 等. 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] 周兆群, 江涛, 王晓榕, 等. 气相色谱-质谱技术在遗传代谢病患儿中的应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009, 29(9):1282-1284.
- [10] 杨艳玲, 宋金青, 秦炯. 气相色谱-质谱联用分析在遗传代谢病筛查和诊断中的应用[J]. *中国医刊*, 2006, 41(2):34-35.
- [11] 韩连书. 遗传代谢病检测技术的应用及其结果的临床判读[J]. *中国实用儿科杂志*, 2014, 29(8):569-574.
- [12] 杨艳玲, 孙芳, 钱宁, 等. 尿素循环障碍的临床和实验室筛查研究[J]. *中华儿科杂志*, 2005, 43(5):331-334.

(收稿日期:2017-02-14,修回日期:2017-02-22)