

• 临床研究 •

液相串联质谱技术在高危婴幼儿遗传代谢病临床筛查诊断中的应用研究*

刘 丽¹,李 红^{1△},陆 彪²,张学红²,李少敏²,徐慧菊³,邹朝春⁴
(1. 宁夏医科大学临床学院,银川 750004;2. 宁夏医科大学总医院儿科,银川 750004;
3. 宁夏医科大学第二附属医院儿科,银川 750004;4. 浙江大学医学院附属儿童医院内分泌科,杭州 310003)

摘 要:**目的** 探讨液相串联质谱(LC-MS/MS)技术在遗传代谢病高危儿童筛查中的应用价值,并为科学防治提供参考。**方法** 采用血滤纸片对 246 例可疑遗传代谢病患儿采集血液样本,利用 LC-MS/MS 技术进行血液样本筛查,上述患儿均在宁夏医科大学总医院或银川地区其他综合性医院就诊。**结果** LC-MS/MS 筛查结果 30 例患儿阳性,阳性率为 12.2%,其中 9 例患儿为甲基丙二酸血症,4 例患儿为异戊酸血症,6 例患儿为苯丙酮尿症,2 例患儿为丙酸血症,1 例患儿瓜氨酸血症,1 例患儿为长链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症,1 例为线粒体三功能蛋白缺乏症,1 例患儿患糖尿病,3 例患儿同型胱氨酸尿症,2 例患儿精氨酸琥珀酸尿症。**结论** LC-MS/MS 技术在遗传代谢病的筛查诊断中高效、准确,是遗传代谢病筛查的有效工具。
关键词:串联质谱法;代谢缺陷,先天性;血液化学分析;诊断,鉴别
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.35.008 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2013)35-4252-03

Application of liquid chromatography tandem mass spectrometry method from dry blood spots for the screening of inherited metabolic disease*
Liu Li¹,Li Hong^{1△},Lu Biao²,Zhang Xuehong²,Li Shaoming²,Xu Huiju³,Zou Zhaochun⁴
(1. Department of Pediatrics,Ningxia Medical University,Yinchuan,Ningxia 750004,China;2. Department of Pediatric,General Hospital of Ningxia Medical University,Yinchuan,Ningxia 750004,China;3. Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Ningxia Medical University,Yinchuan,Ningxia 750004,China;4. Department of Endocrinology,Children's Hospital Affiliated to Medical College of Zhejiang University, Hangzhou,Zhejiang 310009,China)
Abstract: Objective To explore the application value of liquid chromatography tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) in screening of inherited metabolic disease risk children,and to provide a reference for the scientific prevention and control. **Methods** 246 cases of patients with inherited metabolic children blood samples were collected through the blood spots,LC-MS/MS was used to examine blood samples from high risk cases of inherited metabolic who came from general hospital of Ningxia medical university. **Results** 30 cases were confirmed with inherited metabolic disease by the LC-MS/MS,the positive rate was 12.2%,including 9 cases of methylmalonic academia,4 cases of isovaleric acidemia,6 cases of phenylketonuria,2 cases of propionic acidemia,2 cases of citrullinemia,1 cases of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase,1 cases of mitochondrial trifunctional protein deficiency,1 cases of maple syrup urine disease,3 cases of homocystinuria,2 cases of argininesuccinic aciduria. **Conclusion** Liquid chromatography tandem mass spectrometry(L-MS/MS) technology is highly efficient and high reliability method in screening inherited metabolic disease.
Key words: tandem mass spectrometry;metabolism,inborneirors;blood chemical analysis;diagnosis,differential

遗传代谢病是因维持机体正常代谢所必需的某些由多肽或蛋白组成的酶、受体、载体及膜泵生物合成发生遗传缺陷,即编码这类多肽的基因发生突变而导致的疾病。目前已发现的遗传代谢病超过 500 种^[1],其中有苯丙酮尿症、甲基丙二酸血症、丙二酸血症、戊二酸血症、戈谢病、法布里病等疾病。这类疾病通过适当的措施是可治疗和控制的,患儿在早期没有特别的临床表现,容易忽视、误诊、漏诊或难以确诊,一旦出现临床症状,对患儿的损害将不可逆转。为了达到早发现、早诊断、早治疗的目的,高危儿筛查被广泛应用于临床中,筛查是用快速、简便、灵敏检验方法,对一些危及儿童生命、危害儿童生长发育或导致儿童智力障碍的一些先天性、遗传性疾病进行群体检查,以便对疾病做出早期诊断^[2]。本文将血滤纸片法液相串联质谱技术应用于筛查诊断中,通过筛查了解宁夏地区遗传代谢病的阳性率和发病种类,为今后开展此类疾病的防控提供

参考。
1 资料与方法
1.1 一般资料 选取 2010 年 7 月至 2012 年 7 月由宁夏医科大学总医院及银川地区其他几家综合性医院收治遗传代谢病疑似高危婴幼儿 246 例,其中住院患儿 107 例,门诊患儿 139 例,男 147 例,女 99 例,年龄小于 1 岁患儿 87 例,1~3 岁患儿 159 例,患儿临床表现有不明原因的拒乳、喂养困难、厌食、营养不良;嗜睡、昏迷及意识障碍、肌张力异常;黄疸持续不退、肝脾肿大、慢性腹泻、反复呕吐、抽搐等;智力落后、生长发育迟缓、精神行为异常;部分实验室检查结果显示有难以纠正的酸中毒、电解质紊乱、多器官功能紊乱、低血糖、高血氨、高乳酸血症等,本实验患儿家长或监护人均自愿参加,并签署知情同意书。
1.2 材料与试剂 干滤纸片由美国 CDC 公司生产的型号为

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170787)。 作者简介:刘丽(1977~),本科,主治医师,主要从事临床儿科研究。 △ 通讯作者,Tel:18001211981;E-mail:115391597@qq.com。

S8-S903 滤纸片,抽静脉血滴于滤纸片上,直径约 10 mm,室温下凉干,-20 ℃冰箱保存待测。盐酸正丁醇、甲醇、乙酰氯、乙腈等均为高效液相色谱级,氮气纯度为 99.999%。同位素内标均购自美国 CIL 公司,酰基肉碱内标 8 种和氨基酸内标 12 种,分别为:2H3-棕榈酰肉碱、2H9-游离肉碱、2H3-丁酰肉碱、2H9-肉豆蔻酰肉碱、2H3-乙酰肉碱、2H9-异戊酰肉碱、2H3-辛酰肉碱、2H3-丙酰肉碱;2H2-鸟氨酸、2H2-瓜氨酸、2H3-谷氨酸、2H3-蛋氨酸、2H3-天冬氨酸、2H3-亮氨酸、2H4-丙氨酸、2H5-苯丙氨酸、2H8-缬氨酸、13C6-酪氨酸、15N,2-13C-甘氨酸、2H4,13C-精氨酸。所有同位素内标均用高效液相色谱级甲醇稀释,于 4 ℃冰箱中保存,所有工作液要求 1 月内用完。

1.3 方法 采用血滤纸片法采集血液标,采集点选择患儿的手指或足跟,将采集的标本滴于血滤纸片上形成均匀的血斑,置于空气中自然干燥 6 h 以上,干燥的标本滤纸片用塑料袋封存,-20 ℃保存待检^[3];标本检定时先用打孔器将血滤纸片打出 5 个直径为 3 mm 的圆形纸片,4 个作为质控,1 个作为空白,取制备好的干滤纸血片置于 96 孔过滤板中,将含有酰基肉碱和氨基酸同位素内标的甲醇液加入孔中,室温放置 10 min,密封震荡 20 min,萃取血滤纸片中的酰基肉碱和氨基酸内标物,萃取后离心至另一聚丙烯板中,50 ℃下加热吹干,加入盐酸正丁醇后用 Teflon 膜覆盖,将检测样品置于恒温箱中 15 min,温度控制在 65 ℃,又于 50 ℃加热吹干,加入乙腈使其溶解,铝膜覆盖,即可上样检测^[4]。仪器设置与资料分析:流动相:80%乙腈,流速:30 μL/min,检测时间:2.5 min,自动进样:

每次 10 μL,单次测定均采用 3 种扫描方式同时检测,3 种方式分别为:母离子扫描酰基肉碱 m/z:85 Da,扫描范围:210~505 m/z;中性丢失扫描中性氨基酸,m/z:102 Da,扫描范围:140~280 m/z;2H3-亮氨酸、2H2-鸟氨酸、2H3-天冬氨酸、2H4,13C-精氨酸采用多反应监测。以上内标同位素采用 CVTM 软件结合 SIL-HTc 自动取样器进行定量分析,根据同位素内标及氨基酸和酰基肉碱的离子峰强度,自动计算样品中氨基酸和酰基肉碱的浓度。

1.4 质量判断标准 参考王婵等^[5]的研究结合美国 Pediatrrix 公司的疾病筛查诊断标准,同时考虑 LC/MS/MS 检测到特异指标、临床表现、常规实验室检查,对检测对象进行综合筛查诊断。

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件对资料进行统计分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用两独立样本 *t* 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床资料分布及结果分析 筛查显示阳性患儿 30 例,阳性率为 12.2%,阳性患儿在年龄及性别方面基本无差异,但住院患儿筛查出遗传代谢病的概率相比门诊患儿大大增加,见表 1。

2.2 临床表现统计 由表 2 可见,厌食或营养不良、嗜睡或昏迷、生长发育迟缓是患儿最主要的临床表现,这些临床表现隐蔽、不易察觉,临床治疗时容易误诊。

表 1 阳性患儿基本资料分布统计结果(*n*)

筛查结果	阳性例数	年龄		就诊形式		性别	
		<1 岁	1~3 岁	住院	门诊	男	女
甲基丙二酸血症	9	5	4	6	3	4	5
异戊酸血症	4	2	2	3	1	3	1
苯丙酮尿症	6	4	2	4	2	2	4
丙酸血症	2	0	2	1	1	1	1
瓜氨酸血症	1	1	0	1	0	1	0
线粒体三功能蛋白缺乏症	1	1	0	1	0	0	1
长链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症	1	0	1	1	0	1	0
同型胱氨酸尿症	3	2	1	2	1	2	1
精氨酸琥珀酸尿症	2	1	1	1	1	2	0
枫糖尿症	1	0	1	1	0	1	0
合计	30	16	14	21	9	17	13

表 2 不同病征患儿临床表现统计结果(*n*)

筛查结果	总例数	肌张力异常	嗜睡或昏迷	精神异常	生长发育迟缓	厌食或营养不良	肝脾肿大
甲基丙二酸血症	9	1	1	0	2	4	1
异戊酸血症	4	0	1	0	1	2	0
苯丙酮尿症	6	1	2	1	1	1	0
丙酸血症	2	0	0	0	1	1	0
瓜氨酸血症	1	0	0	1	0	1	0
线粒体三功能蛋白缺乏症	1	1	1	0	1	0	0
长链酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症	1	1	1	0	0	0	0
同型胱氨酸尿症	3	0	1	0	1	1	1
精氨酸琥珀酸尿症	2	0	0	0	0	2	0
枫糖尿症	1	0	1	0	0	0	1
合计	30	3	7	1	6	12	1

3 讨 论

遗传代谢病是指维持机体正常代谢必需酶、蛋白等发生基因突变,使正常机体的某种功能发生改变所表现出的一系列病理性临床症状,该类疾病已位于中国疾病谱的前列,虽然单个病种的发病率相对较低,但由于种类繁多,总体发病率则较高,并且该类疾病呈进行性发展和加重,对于患儿的损伤也是不可逆的,因此早期诊断和治疗,成为防控该类疾病的关键^[6]。遗传代谢病的临床筛查诊断,单纯依靠实验室常规检查,一些异常变化无法解释和诊断,在此背景下遗传代谢病筛查方法,逐渐成为临床医生和疾病控制部门关注的焦点,早期的筛查方法操作繁琐,所能筛查的病种也极为有限^[7],在临床需求的推动下,气相色谱-质谱联用技术、串联质谱联用技术及基因分析技术等一系列高效、快速的筛查手段被应用于临床,这些筛查方法在临床快速诊断遗传代谢病发挥了重要作用,特别是 LC 技术是当前进行高危筛查最有效和简便的方法。

LC/MS/MS 技术能在几分钟内对标本进行几十种代谢产物分析,目前可用于 30 多种遗传代谢病的筛查,因其比传统的筛查手段更具特异性、灵敏性及高效率^[8-11],能在无临床症状或处于症状前期时发现疾病,为遗传代谢病的及时治疗赢得时间。本文此次筛查结果显示阳性率为 12.2%(30/246),遗传代谢病中甲基丙二酸血症高达 3.7%(9/246),阳性样本中有厌食或营养不良表现的患儿高达 40.0%(12/30),其中住院患儿筛查出遗传代谢病的概率大大高于门诊患儿,这是由于住院患儿细微的异常,容被更具专业知识的医护人员观察到,而患儿父母或家属对患儿细微的异常行为容易忽视,早期筛查有利于早期介入干预,有利于提高临床医疗工作者对先天性遗传代谢性疾病的重视^[12-15]。另外,本文还将干血滤纸片应用筛查中,这有利于样本的采集、传递和保存,对于遗传代谢病的大规模筛查诊断提供了便利。

参考文献:

- [1] 郭红梅,林谦,李玫.气相色谱-质谱法对南京地区 288 例高危婴幼儿遗传代谢疾病筛查的研究[J].南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(7):1056-1058.
- [2] 朱继田.糖代谢异常对冠脉病变程度的影响[J].中华全科医学,2012,10(8):1249-1250.
- [3] Nogueira C, Aiello C, Cerone R, et al. Spectrum of MMACHC mutation in Italian and Portuguese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cb1C type [J]. Mol Genet Metab, 2008, 93(4): 475-480.
- [4] 庄太凤,马建荣,温春玲,等.高危新生儿遗传代谢病临床病因学分析[J].中华临床医师杂志,2011,5(1):22-26.
- [5] 王婵,何玺玉,封志纯,等.5 400 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.
- [6] 何大可,张建明,邵新华,等.81 例遗传代谢病患儿神经系统损害和症状分析[J].上海交通大学学报:医学版,

2011,31(10):1444-1447.

- [7] Spada M, Riva S, Maggiore G, et al. Pediatric liver transplantation[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(6): 648-674.
- [8] 谢玉珏,杨育菲,周安连,等.B 超测 NT 联合母体血清 AFP、F-β-HCG 筛查胎儿唐氏综合征的临床价值分析[J].中华全科医学,2011,9(8):1298-1299.
- [9] Hidalgo FJ, Navarro JL, Delgado RM, et al. Determination of alpha-keto acids in pork meat and Iberian ham via tandem mass spectrometry[J]. Food Chem, 2013, 140(1-2):183-188.
- [10] Patil D, Gautam M, Mishra S, et al. Determination of withaferin A and withanolide A in mice plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetics after oral administration of Withania somnifera aqueous extract[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013(80):203-212.
- [11] Xu Y, Ding J, Chen H, et al. Fast determination of sulfonamides from egg samples using magnetic multiwalled carbon nanotubes as adsorbents followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chem, 2013, 140(1-2):83-90.
- [12] Ding Y, Hou JW, Zhang Y, et al. Metabolism of genipin in rat and identification of metabolites by using ultraperformance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013(2013):957030.
- [13] Gilart N, Miralles N, Marcé RM, et al. Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2013(774):51-60.
- [14] Walorczyk S, Drozdzyński D, Kowalska J, et al. Pesticide residues determination in Polish organic crops in 2007-2010 applying gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry[J]. Food Chem, 2013, 139(1/4):482-487.
- [15] Tszysznice W, Borowiec A, Pawlowska E, et al. Two rapid ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants compared to immunoassay [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013(928):9-15.

(收稿日期:2013-09-24 修回日期:2013-10-16)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。