

# 浙江省新生儿多酰基辅酶A脱氢酶缺乏症筛查及随访分析

周 朵<sup>1</sup>, 叶梅玲<sup>2</sup>, 胡真真<sup>1</sup>, 张 玉<sup>3</sup>, 朱 琳<sup>3</sup>, 杨茹莱<sup>1</sup>, 黄新文<sup>1</sup>

1. 浙江大学医学院附属儿童医院遗传与代谢科 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心 国家儿童区域医疗中心, 浙江 杭州 310052
2. 浙江省台州医院 台州恩泽医疗中心(集团), 浙江 台州 317000
3. 浙江博圣生物技术股份有限公司, 浙江 杭州 310012

**[摘要]** **目的:**了解浙江省新生儿多酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(MADD)的发病率、临床特征及基因突变特点。**方法:**采用串联质谱法对2009年1月至2020年12月浙江省新生儿疾病筛查中心3 896 789名新生儿进行遗传代谢病筛查,结合尿有机酸分析及电子转移黄素蛋白(ETF)或电子转移黄素蛋白脱氢酶(ETFDH)基因检测确诊。确诊患儿进行饮食和生活管理,补充左卡尼汀、核黄素、辅酶Q10治疗,长期随访并评估患儿的生长和智力发育情况。**结果:**确诊MADD患儿13例,除1例为Ⅱ型,其余均为Ⅲ型(迟发型),发病率为1/299 753。13例患儿中,1例死亡,4例因感染诱发以低血糖为主要表现的急性代谢失调,1例出现肌张力降低,其余患儿随访发育良好(随访时间3~45个月)。患儿初筛血C4~C18:1不同程度升高。13例患儿进行基因检测,其中ETF基因复合杂合突变1例,ETF基因纯合突变1例,ETFB基因复合杂合突变1例,ETFDH基因复合杂合突变8例,ETFDH基因纯合突变1例,仅检测出一个ETFDH基因突变位点1例。c. 250G>A为热点突变。**结论:**MADD临床表现高度异质,新生儿期发病较为严重,迟发型常无明显临床症状,初筛血C4~C18:1不同程度升高,最常见基因突变为c. 250G>A。



**[关键词]** 新生儿筛查;多酰基辅酶A脱氢酶缺乏症;电子转移黄素蛋白;电子转移黄素蛋白脱氢酶;串联质谱法

**[中图分类号]** R722.11;R596 **[文献标志码]** A

## Screening of multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency in newborns and follow-up of patients

ZHOU Duo<sup>1</sup>, YE Meiling<sup>2</sup>, HU Zhenzhen<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>3</sup>, ZHU Lin<sup>3</sup>, YANG Rulai<sup>1</sup>,

收稿日期:2021-04-10 接受日期:2021-05-20

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1002204);国家自然科学基金(82073560);浙江省公益技术研究计划(LGC19B050013)

第一作者:周 朵,主治医师,主要从事儿童遗传代谢病筛查和诊治工作;E-mail:11318120@zju.edu.cn;https://orcid.org/0000-0002-6545-5351

通信作者:黄新文,主任医师,硕士生导师,主要从事儿童遗传代谢病筛查和诊治研究;E-mail:6305022@zju.edu.cn;https://orcid.org/0000-0002-2799-9155

HUANG Xinwen<sup>1</sup> (1. Department of Genetics and Metabolism, Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, National Children's Regional Medical Center, Hangzhou 310052, China; 2. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Taizhou Enze Medical Center (Group), Taizhou 317000, Zhejiang Province, China; 3. Zhejiang Biosan Biochemical Technology Co., Ltd., Hangzhou 310012, China)

Corresponding author: HUANG Xinwen, E-mail: 6305022@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-2799-9155>

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the incidence rate, clinical and gene mutation characteristics of multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) in newborns in Zhejiang province. **Methods:** A total of 3 896 789 newborns were screened for MADD using tandem mass spectrometry in Zhejiang Neonatal Screening Center during January 2009 and December 2020. Patients of MADD were confirmed by urine organic acid and electron transferring flavoprotein (ETF) or electron transferring flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene detection. MADD patients were given diet and life management, supplemented with L-carnitine, riboflavin and coenzyme Q 10 treatment, and their growth and intellectual development were evaluated during the followed up. **Results:** Thirteen patients with MADD were diagnosed, with an incidence of 1/299 753. One patient was type II, and the rest were type III. Patients were followed up for 3–45 months, 1 case died, 4 cases had acute metabolic disorders with hypoglycemia as the main manifestation due to infection, 1 case had hypotonia, and the rest 7 cases developed well. Patients had raised levels of C4–C18:1 acylcarnitines in the initial screening. Thirteen children were genetically tested, 1 case with compound heterozygous mutation in the *ETFA* gene, 1 case with homozygous mutation in the *ETFA* gene, 1 case with compound heterozygous mutation in the *ETFB* gene, 8 cases with compound heterozygous mutation and 1 case with homozygous mutation in the *ETFDH* gene, 1 case that only 1 locus of *ETFDH* gene was detected. The c.250G>A was the hotspot mutation in this study. **Conclusion:** The clinical manifestations of MADD are highly heterogeneous. The neonatal-onset form is serious, and late onset form usually has no obvious clinical symptoms. C4–C18:1 acylcarnitines usually increased in the initial screening, and the hotspot gene mutation is c.250G>A.

[ **Key words** ] Neonatal screening; Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency; Electron transferring flavoprotein; Electron transferring flavoprotein dehydrogenase; Tandem mass spectrometry

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(4): 454-462.]

[ **缩略语** ] 多酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency, MADD); 电子转移黄素蛋白(electron transferring flavoprotein, ETF); 电子转移黄素蛋白脱氢酶(electron transferring flavoprotein dehydrogenase, ETFDH); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR); 游离肉碱(free carnitine, C0); 丁酰基肉碱(butyrylcarnitine, C4); 戊酰基肉碱(isovalerylcarnitine, C5); 己酰基肉碱(hexanoylcarnitine, C6); 辛酰基肉碱(octanoylcarnitine, C8); 癸酰基肉碱(decanoylcarnitine, C10); 十二烷酰基肉碱(lauroylcarnitine, C12); 十二烯酰基肉碱(dodecenoylcarnitine, C12:1); 十四烷酰基肉碱(myristoylcarnitine, C14)

碱(myristoylcarnitine, C14); 十四烯酰基肉碱(tetradecenoylcarnitine, C14:1); 十四二烯酰基肉碱(tetradecadienoylcarnitine, C14:2); 十六烷酰基肉碱(palmitoylcarnitine, C16); 十六烯酰基肉碱(palmitoylcarnitine, C16:1); 十八烷酰基肉碱(octadecanoylcarnitine, C18); 十八烯酰基肉碱(oleoylcarnitine, C18:1); 信使RNA(messenger RNA, mRNA)

因线粒体*ETF*或*ETFDH*基因缺陷使线粒体氧化呼吸链脱氢酶脱氢产生的电子不能下传而导致脂肪酸、氨基酸及胆碱代谢障碍, 能量生成受阻, 临床可引起MADD<sup>[1-2]</sup>。MADD临床表现高度异质, 缺乏特异性症状和体征, 新生儿期至成年期均可发病。根据发病年龄, MADD可分为三型, I型和II型均于新生儿期发病, 其中I型伴多囊肾、面中部发育不全等先天畸形; III型亦称迟发型, 于婴儿期至成人期发病。MADD患者预后与疾病类型、合并症、诊断时间、治疗反应有关, 早期发现并及时干预效果良好, 预后较佳<sup>[3-10]</sup>。通过串联质谱法分析血酰基肉碱水平可以对MADD进行早期筛查<sup>[11]</sup>。本研究通过分析浙江省新生儿疾病筛查中心2009至2020年MADD新生儿筛查结果, 旨在了解浙江省新生儿MADD的发病率、临床特征、基因突变特点及预后。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

2009年1月至2020年12月浙江省新生儿疾病筛查中心对3 896 789名新生儿进行血酰基肉碱谱检测, 其中足月儿3 623 256名, 早产儿264 667名, 过期产儿8866名, 男女比例为1.1:1。本研究经浙江大学医学院附属儿童医院伦理委员会审查(2018-IRB-077), 筛查前家长签署知情同意书。

### 1.2 仪器与试剂

AQCUTY TQ-D串联质谱仪为美国Waters公司产品; GC-MS QP2010气相色谱-质谱联用仪为日本岛津公司产品; CT-100 PCR仪为美国Bio-Rad公司产品; 3500-DX测序仪为美国Life Tech公司产品; Miseq测序仪为美国Illumina公司产品; MassARRAY Analyzer 4飞行时间质谱仪、MassARRAY Nanodispenser RS-100芯片点样机均为美国Sequenom公司产品。Neogram新生儿衍生法筛查试剂盒、Neobase新生儿非衍生法筛查试剂盒均为芬兰PerkinElmer公司产品; 文库制备试剂盒为美国NEB公司产品; 外显子捕获试剂盒为美国Illumina公司产品; PCR试剂盒为日本TaKaRa

公司产品。

### 1.3 串联质谱法检测血酰基肉碱谱

按照《新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)》<sup>[12]</sup>, 新生儿出生满72 h且充分哺乳6次后, 由专业医护人员采集足跟血滴于专用采血滤纸片上, 制成干血斑标本送检。根据试剂盒操作说明对干血斑进行前处理, 再使用串联质谱仪检测。2009年1月至2013年11月3日采用衍生化方法, 2013年11月4日至2020年12月采用非衍生化法。C4、C5、C6、C8、C10、C12、C12:1、C14、C14:1、C16、C16:1、C18、C18:1升高的新生儿为筛查阳性。

### 1.4 根据血生化指标及尿有机酸浓度分析临床表现

召回筛查阳性新生儿, 复查后血酰基肉碱仍升高者进一步行血氨、血气分析、血生化等检测; 采集新鲜尿样, 先后经尿素酶、盐酸羟胺、氢氧化钠和盐酸处理, 加入内标17烷酸、24烷酸和托品酸, 使用乙酸乙酯萃取2次, 经甲基硅烷化衍生后上机检测尿有机酸。

### 1.5 高通量测序和MassARRAY技术检测基因突变及其致病性分析

采用高通量测序和MassARRAY技术对*ETF*及*ETFDH*基因的外显子及侧翼内含子进行检测, 检测结果与千人基因组(1000 Genomes)数据库、ESP6500数据库、ExAC数据库和基因组突变频率数据库(gnomAD)进行比对。使用SIFT、PROVEAN、PolyPhen-2、Mutation Taster、FATHMM和Human Splicing Finder等在线软件进行预测, 分析可疑突变位点对蛋白质结构和功能的影响以及是否会引起剪接改变。应用Mutation Taster在线软件评估突变位点在9种物种间(人、猕猴、家鼠、鸡、红鳍东方鲀、斑马鱼、果蝇、线虫和热带爪蟾)的保守性。根据美国医学遗传学与基因组学学会联合分子病理协会在2015年提出的“序列变异解读标准和指南”, 对突变位点的致病性进行分析。明确基因突变的患儿父母进一步进行桑格-库森法测序, 以确定突变来源。

## 1.6 MADD诊断

根据血酰基肉碱谱改变、尿有机酸改变和基因分析结果诊断:①典型患者酰基肉碱谱C4~C18均不同程度增高,也可表现为C6~C18或C12~C18增高,部分游离肉碱降低,酰基肉碱谱也可正常;②主要是戊二酸、乳酸增高,也可乙基丙二酸、2-羟基戊二酸、己二酸、辛二酸等多个二羧酸水平升高,尿有机酸也可正常;③基因检测为确诊的重要依据,主要为*ETFDH*基因突变。

## 1.7 MADD患儿的治疗和随访

稳定期治疗:低脂、高碳水化合物、中等量蛋白质饮食,避免剧烈运动、长时间空腹及劳累;每天补充维生素B2 100~300 mg、左卡尼汀50~100 mg/kg、辅酶Q10 60~240 mg,改善线粒体能量代谢。

失代偿期治疗:抗感染、纠正低血糖及酸中毒、降血氨等对症处理;缩短喂养间隔,必要时可予鼻饲或静脉营养;维持足够热量及水、电解质平衡,确保每小时尿量3 mL/kg以上,以防出现急性肾功能衰竭;静脉注射左卡尼汀(每天50~100 mg/kg),分2~4次,避免肉碱耗竭,促进有机酸排泄。

病情稳定2~3个月后进行随访复查,监测项目包括体格检查、血常规、血氨、血气分析、血生化、血酰基肉碱谱、尿有机酸等,同时定期评估患儿体格及智力发育状况。随访时间根据个体差异而定。智力发育评估:0~30月龄采用贝利婴儿发展量表;30月龄以上至6岁采用格塞尔发育量表;6岁以上采用韦克斯勒儿童智力量表。

## 2 结 果

### 2.1 MADD筛查结果

3 896 789名新生儿中,血C4~C18升高63例,初筛阳性率为0.0016%,阳性预测值为20.6%,假阳性率为79.4%。MADD确诊患儿13例,男女比例为11:2,发病率为1/299 753。13例患儿分别来自13个无亲缘关系的家庭,父母非近亲结婚。除病例13为巨大儿(出生体重为4100 g)外,其余均为足月正常体重儿。

### 2.2 MADD患儿的临床表现和实验室及其他辅助检查结果

13例MADD患儿中Ⅱ型MADD 1例,Ⅲ型MADD 12例。急性代谢失调5例(例1、3、4、8、11),例1、例3伴有肝大,例8在3月龄时死亡;肌张力偏低1例;运动不耐受1例;其他6例随访至今无

临床表现。

13例MADD患儿实验室和影像学检查结果见表1。其中,高氨血症3例;高乳酸血症6例;丙氨酸转氨酶升高6例;肌酸激酶升高7例;肌酸激酶同工酶CK-MB升高6例;乳酸脱氢酶升高4例;高脂血症1例,高胆固醇血症1例;凝血功能异常1例;肝大2例;双肾超声异常2例(双肾小结晶、双肾回声增强);心电图异常1例(T波轻度改变);脑核磁共振异常2例(双侧侧脑室颞角丰满、脑发育落后)。

结果提示,MADD患儿临床表现高度异质,Ⅱ型患儿多于出生后出现低酮性低血糖、代谢性酸中毒、高氨血症和脑病等症状,Ⅲ型患儿症状相对较轻,主要表现为一过性高血氨、肌损害、肝功能损害、运动不耐受等症状,部分在应激时可急性发病。

### 2.3 MADD患儿血、尿代谢物检测结果

13例MADD患儿C8、C10、C12、C14、C14:1均升高,以C8、C10、C12升高程度明显,为正常上限6倍左右。C6、C14:2升高11例,C4、C12:1、C16、C16:1升高8例,C5升高6例,C18:1升高5例,C18升高4例,C0降低1例,见表2。

2例患儿(例2、5)进行了尿气相色谱-质谱分析,均有尿戊二酸、3-羟基戊二酸升高,1例合并3-羟基苯乙酸、2-羟基戊二酸、3-羟基异戊酸升高,1例合并乳清酸升高。

上述结果提示,MADD患儿血短、中、长链酰基肉碱(C4~C18:1)均不同程度升高。

### 2.4 MADD患儿基因突变检测结果

13例MADD确诊患儿均进行了基因检测。例2检出*ETFA*基因复合杂合突变(c. 520C>T、c. 218G>A);例5为*ETFA*基因纯合突变;例10为*ETFDH*基因纯合突变;例11为*ETFB*基因复合杂合突变(c. 574T>G、c. 614\_616del);例1只检测出一个*ETFDH*基因突变位点;其余8例患儿为*ETFDH*基因复合杂合突变,突变位点分别来自父母双方。*ETFDH*共检出突变11种(错义突变9种、缺失突变1种、剪切突变1种),检出c. 250G>A 5次,c. 1395T>G、c. 1450C>T各3次,其他突变位点各1次,见表3。结果提示,MADD患儿以*ETFDH*突变多见,最常见突变为c. 250G>A。

### 2.5 MADD患儿治疗及转归

例1于出生后数小时出现代谢失调,患儿存

**表 1** 13例多酰基辅酶A脱氢酶缺乏症确诊患儿实验室和影像学检查结果**Table 1** Results of laboratory and imaging examination of 13 patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency

| 例序 | 性别 | 肌酸激酶<br>(U/L) | CK-MB<br>(U/L) | 乳酸脱氢酶<br>(U/L) | 血氨<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | 乳酸<br>(mmol/L) | ALT<br>(U/L) | 高脂血症 | 高胆固醇血症 | 凝血功能 | 肝脏超声          | 肾脏超声   | 心脏超声  | 心电图    | 脑核磁共振     |
|----|----|---------------|----------------|----------------|-----------------------------|----------------|--------------|------|--------|------|---------------|--------|-------|--------|-----------|
| 1  | 男  | 1235          | 175            | 1085           | 149                         | 5.1            | 79           | 有    | 有      | 异常   | 肝脐下<br>1.4 cm | 双肾回声增强 | 正常    | 正常     | 脑发育落后     |
| 2  | 男  | 58            | 27             | 473            | 正常                          | 正常             | 78           | 无    | 无      | 未查   | 正常            | 正常     | 正常    | 正常     | 双侧侧脑室颞角丰满 |
| 3  | 男  | 6755          | 185            | 1505           | 正常                          | 2.9            | 92           | 无    | 无      | 正常   | 肝肋下<br>3 cm   | 正常     | 正常    | 正常     | 未查        |
| 4  | 男  | 376           | 正常             | 正常             | 正常                          | 4.1            | 正常           | 无    | 无      | 未查   | 未查            | 未查     | 正常    | 正常     | 未查        |
| 5  | 男  | 正常            | 正常             | 正常             | 73                          | 正常             | 正常           | 无    | 无      | 未查   | 未查            | 未查     | 未查    | 未查     | 未查        |
| 6  | 男  | 正常            | 正常             | 正常             | 正常                          | 正常             | 正常           | 无    | 无      | 未查   | 未查            | 未查     | 正常    | 正常     | 未查        |
| 7  | 男  | 正常            | 正常             | 正常             | 正常                          | 正常             | 79           | 无    | 无      | 未查   | 未查            | 未查     | 正常    | 正常     | 未查        |
| 8  | 男  | 2653          | 54             | 762            | 正常                          | 4.7            | 正常           | 无    | 无      | 未查   | 正常            | 双肾小结晶  | 正常    | 正常     | 未查        |
| 9  | 女  | 正常            | 正常             | 正常             | 正常                          | 正常             | 正常           | 无    | 无      | 未查   | 未查            | 未查     | 正常    | 正常     | 未查        |
| 10 | 女  | 正常            | 正常             | 正常             | 正常                          | 正常             | 56           | 无    | 无      | 未查   | 未查            | 未查     | 正常    | 正常     | 未查        |
| 11 | 男  | 142           | 45             | 正常             | 正常                          | 3.2            | 正常           | 无    | 无      | 未查   | 未查            | 未查     | 正常    | 正常     | 未查        |
| 12 | 男  | 正常            | 正常             | 正常             | 正常                          | 正常             | 正常           | 无    | 无      | 正常   | 正常            | 正常     | 正常    | 正常     | 未查        |
| 13 | 男  | 253           | 42             | 正常             | 56                          | 3.5            | 78           | 无    | 无      | 未查   | 未查            | 未查     | 左室假腱索 | T波轻度改变 | 正常        |

CK-MB:一种肌酸激酶同工酶;ALT:丙氨酸转氨酶。

**表 2** 13例多酰基辅酶A脱氢酶缺乏症确诊患儿血酰基肉碱水平**Table 2** Carnitine concentrations in 13 patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency

| 例序 | C0   | C4   | C5   | C6   | C8   | C10  | C12  | C12:1 | C14  | C14:1 | C14:2 | C16   | C16:1 | C18  | C18:1 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 1  | 正常   | 1.13 | 0.49 | 1.22 | 1.58 | 1.72 | 2.56 | 0.48  | 2.54 | 1.83  | 0.14  | 6.42  | 1.61  | 正常   | 3.06  |
| 2  | 正常   | 1.61 | 2.00 | 0.42 | 0.59 | 0.64 | 1.03 | 0.38  | 2.45 | 0.81  | 0.08  | 11.71 | 1.63  | 3.80 | 5.11  |
| 3  | 正常   | 正常   | 正常   | 正常   | 0.30 | 0.48 | 0.81 | 正常    | 0.76 | 0.59  | 0.11  | 正常    | 正常    | 正常   | 正常    |
| 4  | 正常   | 0.91 | 0.57 | 1.46 | 2.34 | 2.06 | 1.89 | 0.32  | 1.99 | 1.06  | 0.10  | 6.24  | 1.13  | 正常   | 正常    |
| 5  | 正常   | 0.63 | 1.10 | 0.23 | 0.41 | 0.48 | 0.94 | 正常    | 1.96 | 0.65  | 0.07  | 6.37  | 1.37  | 2.46 | 3.61  |
| 6  | 正常   | 0.62 | 正常   | 0.78 | 1.61 | 2.46 | 3.04 | 0.66  | 1.76 | 1.57  | 0.15  | 6.21  | 0.85  | 正常   | 正常    |
| 7  | 正常   | 正常   | 正常   | 0.26 | 0.74 | 1.29 | 1.02 | 0.46  | 0.59 | 0.55  | 0.07  | 6.58  | 正常    | 正常   | 正常    |
| 8  | 4.74 | 1.93 | 0.89 | 0.20 | 0.42 | 0.40 | 0.75 | 正常    | 1.94 | 0.44  | 正常    | 9.68  | 1.06  | 3.93 | 4.61  |
| 9  | 正常   | 正常   | 正常   | 0.28 | 0.75 | 1.12 | 1.96 | 0.43  | 1.14 | 1.09  | 0.22  | 正常    | 正常    | 正常   | 正常    |
| 10 | 正常   | 正常   | 正常   | 正常   | 0.38 | 0.66 | 0.70 | 正常    | 0.49 | 0.37  | 正常    | 正常    | 正常    | 正常   | 正常    |
| 11 | 正常   | 2.75 | 0.63 | 0.68 | 0.81 | 0.88 | 1.01 | 正常    | 0.56 | 0.71  | 0.12  | 正常    | 正常    | 正常   | 正常    |
| 12 | 正常   | 正常   | 正常   | 0.38 | 0.77 | 1.40 | 2.35 | 0.34  | 1.43 | 1.21  | 0.11  | 正常    | 0.77  | 正常   | 正常    |
| 13 | 正常   | 0.75 | 正常   | 1.15 | 1.99 | 2.79 | 3.60 | 1.09  | 2.90 | 2.27  | 0.12  | 10.27 | 1.50  | 2.26 | 3.42  |

正常值范围:游离肉碱(C0)10.28~54.24  $\mu\text{mol/L}$ ;丁酰基肉碱(C4)0.03~0.48  $\mu\text{mol/L}$ ;戊酰基肉碱(C5)0.01~0.40  $\mu\text{mol/L}$ ;己酰基肉碱(C6)0.03~0.17  $\mu\text{mol/L}$ ;辛酰基肉碱(C8)0.02~0.17  $\mu\text{mol/L}$ ;癸酰基肉碱(C10)0.03~0.22  $\mu\text{mol/L}$ ;十二烷酰基肉碱(C12)0.03~0.28  $\mu\text{mol/L}$ ;十二烯酰基肉碱(C12:1)0.01~0.23  $\mu\text{mol/L}$ ;十四烷酰基肉碱(C14)0.07~0.40  $\mu\text{mol/L}$ ;十四烯酰基肉碱(C14:1)0.03~0.26  $\mu\text{mol/L}$ ;十四二烯酰基肉碱(C14:2)0.01~0.06  $\mu\text{mol/L}$ ;十六烷酰基肉碱(C16)0.49~6.00  $\mu\text{mol/L}$ ;十六烯酰基肉碱(C16:1)0.02~0.49  $\mu\text{mol/L}$ ;十八烷酰基肉碱(C18)0.24~1.90  $\mu\text{mol/L}$ ;十八烯酰基肉碱(C18:1)0.38~2.92  $\mu\text{mol/L}$ 。

表 3 13例多种酰基辅酶A脱氢酶缺乏症确诊患儿基因突变检测结果

Table 3 ETF/ETFDH mutations in 13 patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency

| 例 序 | 基因突变         | 突变1     |             |          | 突变2     |               |            |
|-----|--------------|---------|-------------|----------|---------|---------------|------------|
|     |              | 编码区     | 互补DNA改变     | 氨基酸改变    | 编码区     | 互补DNA改变       | 氨基酸改变      |
| 1   | <i>ETFDH</i> | 2(外显子)  | c. 242T>C   | p. L81P  | 未检出     | 未检出           | 未检出        |
| 2   | <i>ETFA</i>  | 5(外显子)  | c. 520C>T   | p. R174X | 2(外显子)  | c. 218G>A     | p. R73K    |
| 3   | <i>ETFDH</i> | 3(外显子)  | c. 250G>A   | p. A84T  | 11(外显子) | c. 1450C>T    | p. A84T    |
| 4   | <i>ETFDH</i> | 3(外显子)  | c. 229G>A   | p. G77S  | 5(外显子)  | c. 524G>A     | p. R175L   |
| 5   | <i>ETFA</i>  | 3(外显子)  | c. 365G>A   | p. A122L | 3(外显子)  | c. 365G>A     | p. A122L   |
| 6   | <i>ETFDH</i> | 11(外显子) | c. 1395T>G  | P. Y465X | 3(外显子)  | c. 250G>A     | p. A84T    |
| 7   | <i>ETFDH</i> | 7(外显子)  | c. 770A>G   | P. Y257C | 11(外显子) | c. 1450C>T    | p. A484R   |
| 8   | <i>ETFDH</i> | 11(外显子) | c. 1395T>G  | P. Y465X | 11(外显子) | c. 1450C>T    | p. A484R   |
| 9   | <i>ETFDH</i> | 3(外显子)  | c. 353G>T   | p. A117P | 3(外显子)  | c. 250G>A     | p. A84T    |
| 10  | <i>ETFDH</i> | 3(外显子)  | c. 250G>A   | p. A84T  | 3(外显子)  | c. 250G>A     | p. A84T    |
| 11  | <i>ETFB</i>  | 5(外显子)  | c. 574T>G   | p. Y192D | 6(外显子)  | c. 614_616del | p. K250del |
| 12  | <i>ETFDH</i> | 6(外显子)  | c. 643G>A   | p. A215T | 11(外显子) | c. 1395T>G    | P. Y465X   |
| 13  | <i>ETFDH</i> | 6(内含子)  | c. 684+1G>T | 非编码区     | 8(外显子)  | c. 982G>C     | p. D328H   |

ETF: 电子转移黄素蛋白; ETFDH: 电子转移黄素蛋白脱氢酶。

活但存在神经系统后遗症;例8三月龄时死于急性代谢失调;其余11例MADD患儿的随访时间为3~45个月。3例患儿因感染后出现急性代谢失调住院,1例肌张力偏低,1例运动不耐受,其余实验室指标稳定,体格和智力发育均正常。结果提示,MADD新生儿期发病迅猛,多于出生后数小时发病,迟发型病情相对较轻,预后较好。

### 3 讨论

MADD是一种常见的脂肪酸氧化代谢紊乱,不同国家和地区的新生儿MADD发病率差异较大,美国MADD发病率为1/378 272,新英格兰为1/214 285,澳洲为1/2 000 000~1/750 000,土耳其为1/15 000<sup>[13]</sup>。MADD在亚洲地区发病率较高,日本69例线粒体脂肪酸氧化代谢紊乱中有14例为MADD(占22.2%)<sup>[14]</sup>;中国上海地区检测了2万例临床高危儿童,确诊MADD 79例(占脂肪酸氧化代谢紊乱53.7%)<sup>[15]</sup>;中国台湾地区发现48例脂肪酸氧化代谢紊乱中有4例为MADD(占8.3%)<sup>[16]</sup>。本文资料显示,389万多名新生儿筛查确诊MADD患儿13例,发病率约为1/299 753,占脂肪酸氧化代谢紊乱3.3%<sup>[11]</sup>,且MADD实际发病率可能高于目前新生儿筛查所报道的数据。

ETF和ETFDH是脂肪酸 $\beta$ 氧化电子传递体,接受来自脂肪酸 $\beta$ 氧化中多种脱氢酶产生电子进

行氧化磷酸化供能,其功能缺陷致多种脱氢酶功能受阻,血短、中、长链酰基肉碱(C4~C18)均不同程度升高<sup>[2,17]</sup>。文献报道新生儿期发病的MADD患儿C4~C16均升高,迟发型患儿多出现C8~C14升高<sup>[1,18-20]</sup>。本文资料中新生儿发病的2例患儿C4~C18:1均升高,迟发型患儿C8~C14:1均升高,以C8、C10、C12升高程度明显,为正常上限6倍左右。新生儿发病及死亡患儿C4明显升高<sup>[19,21-22]</sup>,本文资料中新生儿发病患儿及迟发型出现代谢失调患儿C4水平相对较高。Van Rijt等<sup>[23]</sup>研究发现成纤维细胞中的脂肪酸氧化能力、酰基肉碱谱与临床表型相关,新生儿发病患者脂肪酸氧化能力降低伴C16明显升高、短中链酰基肉碱轻度降低;而迟发型患儿脂肪酸氧化能力正常或轻度降低伴酰基肉碱正常或轻度升高,其中C2、C5、C16是区分新生儿型与迟发型的关键指标。本研究通过干血斑检测肉碱谱未发现这一关联,推测可能由于标本来源不同之故。新生儿筛查C0降低者预后较差<sup>[19]</sup>。本文资料中1例死亡患儿存在C0降低,可能与大量的线粒体内蓄积的多酰基辅酶A与肉碱结合,导致继发性肉碱消耗有关。

MADD临床表现高度异质,新生儿期发病迅猛,多于出生后数日因低酮性低血糖、代谢性酸中毒、高氨血症和脑病等死亡。迟发型患儿症状相对较轻,主要表现为间歇性肌无力、心肌病、肝功

能损害等,部分在发热、饥饿、疲劳、药物等应激下急性发病<sup>[3-10]</sup>。Ding等<sup>[21]</sup>报道1例患儿新生儿期严重低血糖,四月龄时死于肌无力及呼吸衰竭。胡晓明等<sup>[18]</sup>总结21例MADD新生儿期发病患儿,其中Ⅱ型13例,Ⅰ型8例;死亡16例(76.2%),其中出生后1周内死亡9例(42.9%),5例存活患儿(23.8%)均出现不同程度智力运动发育落后,提示新生儿期发病者病死率高,存活者多伴神经系统后遗症。对迟发型MADD临床病例研究发现,98.65%的患儿出现肌无力,少数伴呕吐、脂肪肝、食欲不振和感觉性共济失调等,多数维生素B2治疗后症状好转<sup>[24]</sup>。本文资料中1例患儿为Ⅱ型,于出生后数小时出现代谢失调,以呼吸困难、反应低下、低血糖、肝功能损害、心肌损害、凝血功能异常为主要症状,患儿存活但存在脑发育落后。12例迟发型患儿中,4例感染诱发急性代谢失调,除1例死亡,其余3例代谢失调纠正后发育良好;其他患儿体格、智力随访发育正常,但存在一过性的高氨血症(1例)、丙氨酸转氨酶升高(3例)、心肌损害(1例)、肌张力偏低(1例)及运动不耐受(1例),57%的患儿肌酸激酶升高。由于随访时间有限,这些患儿是否会出现代谢失调、发育落后以及其他临床表现尚不能确定。

MADD为常染色体隐性遗传,*ETFA*、*ETFB*或*ETFDH*基因突变几乎涵盖了所有类型,以*ETFDH*突变多见,*ETFA*或*ETFB*突变仅占7%<sup>[25]</sup>。本文资料中*ETFDH*检出率为76.9%。目前已报道380余种*ETFDH*基因突变,大部分为错义突变<sup>[1-2]</sup>。不同国家和地区*ETFDH*基因谱存在差异,土耳其和库尔德人种的热点突变为c.1130T>C,中国南方热点突变为c.250G>A<sup>[24,26-28]</sup>。MADD患者的基因型与临床分型有关,无义突变、框移突变会造成mRNA表达及酶活性完全缺失,从而导致最严重的Ⅰ型;剪切突变造成残留酶活性非常低,导致Ⅱ型;错义突变对mRNA表达或mRNA稳定性影响较小,残留酶活性较高,导致发病晚和病情较轻的Ⅲ型<sup>[29-30]</sup>。本文资料中,10例患儿检查出*ETFDH*突变,除1种缺失突变及1种剪切位点突变,其余均为错义突变,最常见突变为c.250G>A。研究显示,c.250G>A突变常在核黄素反应性轻型患者中出现,表现为肌无力、胃肠道症状及运动不耐受等症状<sup>[28,31]</sup>。本文资料中携带该突变的4例患儿除1例运动不耐受,其余均无症

状。本文资料显示,c.1450C>T和c.1395T>G是仅次于c.250G>A的常见突变位点。本文资料中携带c.1450C>T突变的患儿存在死亡和无症状两种结局,与Fan等<sup>[19]</sup>报道一致;Zhu等<sup>[24]</sup>报道2例MADD患者携带c.1395T>G突变,1例无症状,1例感觉障碍,而本文资料中携带该突变的患儿死亡,因此*ETFDH*基因突变具有临床异质性,基因型与表型的关系须进一步论证。

MADD患者治疗主要是在低脂、高碳水化合物、中等量蛋白质饮食基础上给予维生素B2、左卡尼汀、辅酶Q10治疗,大部分迟发型患儿的治疗效果明显,及早治疗可避免、减轻及逆转临床症状<sup>[32]</sup>。苯扎贝特是一种过氧化物酶活性受体激动剂,通过诱导多种参与线粒体脂肪酸氧化酶的转录,降低血清脂质水平,对于核黄素无反应性患儿有效<sup>[5]</sup>。外源性酮体3-羟基丁酸是脑、骨骼肌和心脏的重要替代能量,参与胆固醇合成,促进髓鞘化,具有信号传导功能,激活羧基羧酸受体2,减少脂肪分解及神经保护作用。3-羟基丁酸治疗后70%MADD患儿的心肌病、脑白质营养不良、肝大、运动不耐受和呼吸衰竭等症状明显改善<sup>[33]</sup>。

综上所述,MADD是一种罕见的遗传代谢病,MADD患儿的新生儿筛查C4~C18:1有不同程度的升高;基因型与临床分型存在一定相关性;新生儿期发病者病死率高,存活者常遗留严重后遗症,而迟发型患儿多数预后良好。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] OLSEN R K J, OLPIN S E, ANDRESEN B S, et al. *ETFDH* mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency[J]. *Brain*, 2007, 130(8): 2045-2054.
- [2] CHEN W, ZHANG Y, NI Y, et al. Late-onset riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD): case reports and epidemiology of *ETFDH* gene mutations[J]. *BMC Neurol*, 2019, 19(1): 330.
- [3] HU X M, LI L. Multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in an infant[J]. *Ind J Pediatr*, 2019, 86(2): 194-195.
- [4] MACCHIONE F, SALVIATI L, BORDUGO A, et al. Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency in elderly carriers[J]. *J Neurol*, 2020, 267(5): 1414-1419.
- [5] YAMADA K, KOBAYASHI H, BO R, et al. Efficacy of bezafibrate on fibroblasts of glutaric acidemia type II

- patients evaluated using an in vitro probe acylcarnitine assay[J]. **Brain Dev**, 2017, 39(1): 48-57.
- [6] YAMADA K, KOBAYASHI H, BO R, et al. Clinical, biochemical and molecular investigation of adult-onset glutaric acidemia type II: Characteristics in comparison with pediatric cases[J]. **Brain Dev**, 2016, 38(3): 293-301.
- [7] HONG D J, ZHU M, ZHU Z J, et al. Clinical and muscle magnetic resonance image findings in patients with late-onset multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. **Chin Med J**, 2019, 132(3): 275-284.
- [8] PAN X Q, CHANG X L, ZHANG W, et al. Late-onset multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency with cardiac syncope: a case report[J]. **World J Clin Cases**, 2020, 8(5): 995-1001.
- [9] 丰利芳,陈晓红,李东晓,等. 上呼吸道感染患儿口服尼美舒利后发生瑞氏综合征及猝死样症状[J]. **中国当代儿科杂志**, 2018, 20(11): 944-949.  
FENG Lifang, CHEN Xiaohong, LI Dongxiao, et al. Reye syndrome and sudden death symptoms after oral administration of nimesulide due to upper respiratory tract infection in a boy[J]. **Chinese Journal of Contemporary Pediatrics**, 2018, 20(11): 944-949. (in Chinese)
- [10] 陆 妹,杨艳玲. 线粒体脂肪酸氧化代谢病与猝死[J]. **中国实用儿科杂志**, 2019, 34(7): 551-555.  
LU Mei, YANG Yanling. Mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation disorders and sudden death[J]. **Chinese Journal of Practical Pediatrics**, 2019, 34(7): 551-555. (in Chinese)
- [11] 郑 静,赵正言,黄新文,等. 浙江省新生儿脂肪酸氧化代谢筛查及随访分析[J]. **浙江大学学报(医学版)**, 2017, 46(3): 248-255.  
ZHENG Jing, ZHAO Zhengyan, HUANG Xinwen, et al. Screening for fatty acid oxidation disorders of newborns in Zhejiang province: prevalence, outcome and follow-up[J]. **Journal of Zhejiang University (Medical Science)**, 2017, 46(3): 248-255. (in Chinese)
- [12] 中华人民共和国卫生部. 新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)[A/OL]. (2010-11-10)[2021-06-11]. <http://www.nhc.gov.cn/cmsresources/mohfybjysqwss/cmsersdocument/doc10798.doc>.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical guide of newborn screening in China (2010) [A/OL]. (2010-11-10)[2021-06-11]. <http://www.nhc.gov.cn/cmsresources/mohfybjysqwss/cmsersdocument/doc10798.doc>. (in Chinese)
- [13] LINDNER M, HOFFMANN G F, MATERN D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting[J]. **J Inherit Metab Dis**, 2010, 33(5): 521-526.
- [14] TAMAOKI Y, KIMURA M, HASEGAWA Y, et al. A survey of Japanese patients with mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation and related disorders as detected from 1985 to 2000[J]. **Brain Dev**, 2002, 24(7): 675-680.
- [15] HAN L, HAN F, YE J, et al. Spectrum analysis of common inherited metabolic diseases in Chinese patients screened and diagnosed by tandem mass spectrometry[J]. **J Clin Lab Anal**, 2015, 29(2): 162-168.
- [16] CHIEN Y H, LEE N C, CHAO M C, et al. Fatty acid oxidation disorders in a Chinese population in Taiwan[J]. **JIMD Rep**, 2013, 11: 165-172.
- [17] WANG C, CUI Y, QU X. Optimization of electro-transformation (ETF) conditions in lactic acid bacteria (LAB)[J]. **J MicroBiol Methods**, 2020, 174: 105944.
- [18] 胡晓明,李 莉,米 荣,等. *ETFDH*基因复合杂合突变致新生儿多种酰基辅酶A脱氢酶缺乏症家系一例并文献复习[J]. **中华新生儿科杂志**, 2018, 33(3): 205-209.  
HU Xiaoming, LI Li, MI Rong, et al. A family affected by multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency due to compound heterozygous mutations on *ETFDH* and literature review[J]. **Chinese Journal of Neonatology**, 2018, 33(3): 205-209. (in Chinese)
- [19] FAN X, XIE B, ZOU J, et al. Novel *ETFDH* mutations in four cases of riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. **Mol Genet Metab Rep**, 2018, 16: 15-19.
- [20] 王伟青,宋东坡,于春冬,等. 多种酰基辅酶A脱氢酶缺乏症1例病例报告[J]. **中国循证儿科杂志**, 2019, 14(4): 313-316.  
WANG Weiqing, SONG Dongpo, YU Chundong, et al. A case report of multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. **Chinese Journal of Evidence Based Pediatrics**, 2019, 14(4): 313-316. (in Chinese)
- [21] DING M, LIU R, QIUBO L, et al. Neonatal-onset multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) in the *ETFDH* gene: a case report and a literature review[J/OL]. **Medicine**, 2020, 99(37): e21944.
- [22] VAN DER WESTHUIZEN F H, SMUTS I, HONEY E, et al. A novel mutation in *ETFDH* manifesting as severe neonatal-onset multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. **J Neurol Sci**, 2018, 384: 121-125.
- [23] VAN RIJT W J, FERDINANDUSSE S, GIANNOPOULOS P, et al. Prediction of disease severity in multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a retrospective and laboratory cohort study[J]. **J Inherit Metab Dis**, 2019, 42(5): 878-889.
- [24] ZHU M, ZHU X, QI X, et al. Riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency in 13

- cases, and a literature review in mainland Chinese patients[J]. *J Hum Genet*, 2014, 59(5): 256-261.
- [25] OLSEN R K J, ANDRESEN B S, CHRISTENSEN E, et al. Clear relationship between *ETF/ETFDH* genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency[J]. *Hum Mutat*, 2003, 22(1): 12-23.
- [26] XI J, WEN B, LIN J, et al. Clinical features and *ETFDH* mutation spectrum in a cohort of 90 Chinese patients with late-onset multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2014, 37(3): 399-404.
- [27] WANG Z Q, CHEN X J, MURONG S X, et al. Molecular analysis of 51 unrelated pedigrees with late-onset multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency (MADD) in southern China confirmed the most common *ETFDH* mutation and high carrier frequency of c.250G>A[J]. *J Mol Med*, 2011, 89(6): 569-576.
- [28] LAN M Y, FU M H, LIU Y F, et al. High frequency of *ETFDH* c.250G>A mutation in Taiwanese patients with late-onset lipid storage myopathy[J]. *Clin Genet*, 2010, 78(6): 565-569.
- [29] GRÜNERT S C. Clinical and genetical heterogeneity of late-onset multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2014, 9(1): 117.
- [30] ERSOY E O, RAMA D, ÜNAL Ö, et al. Glutaric aciduria type 2 presenting with acute respiratory failure in an adult[J]. *Respir Med Case Rep*, 2015, 15: 92-94.
- [31] FU H X, LIU X Y, WANG Z Q, et al. Significant clinical heterogeneity with similar *ETFDH* genotype in three Chinese patients with late-onset multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. *Neurol Sci*, 2016, 37(7): 1099-1105.
- [32] VASILJEVSKI E R, SUMMERS M A, LITTLE D G, et al. Lipid storage myopathies: current treatments and future directions[J]. *Prog Lipid Res*, 2018, 72: 1-17.
- [33] VAN RIJT W J, JAGER E A, ALLERSMA D P, et al. Efficacy and safety of D, L-3-hydroxybutyrate (D, L-3-HB) treatment in multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. *Genet Med*, 2020, 22(5): 908-916.

[本文编辑 余方 刘丽娜]

## · 学术动态 ·

### 张岩研究员团队与王明伟研究员团队合作成果揭示黑皮质素4受体激活机制

浙江大学医学院张岩研究员团队与中国科学院上海药物研究所王明伟研究员团队合作围绕黑皮质素(MC)4受体进行了深入研究,结合多种药理学实验手段系统地阐明了MC4的底物选择性机制,同时开展了结构导向合理化药物设计分析。相关研究成果“Structural insights into ligand recognition and activation of the melanocortin-4 receptor”(https://www.nature.com/articles/s41422-021-00552-3)于2021年8月25日在线发表在《细胞研究》(*Cell Research*)。

研究人员采用单颗粒冷冻电镜技术,解析了MC4受体与Gs蛋白复合物分别结合内源配体促黑素、两种上市多肽药物阿法诺肽(afamelanotide)和布拉鲁肽(bremelanotide)以及MC4受体选择性小分子激动剂THIQ的高分辨率三维空间结构(3.0~3.1埃分辨率)。该研究不仅详细描述了MC4受体被内源性多肽激活的分子机制,而且系统分析了多肽药物及小分子配体对受体激活的差异,有望为相关药物发现和结构优化提供精准信息。

MC受体家族配体结合口袋的氨基酸序列高度保守,除了MC2受体,内源性配体和改造的多肽配体对其他4个MC受体几乎没有选择性。针对2005年由美国默克公司开发的对MC4受体具有较高选择性的小分子配体THIQ,研究人员结合功能验证详细分析了这种选择性的结构基础。通过与MC1受体同源建模结构叠合对比发现,在两个受体中有3个氨基酸与THIQ的相互作用存在差异。随后,单突、组合双突和三突实验发现这3个氨基酸的整体组合对THIQ的选择性发挥了重要作用。此外,研究人员还发现了更多更集中的不保守氨基酸聚集区域。对MC受体结构的解析将为开发更为安全有效的减肥药物打下基础。

张会冰博士研究生、陈礼楠博士研究生和杨德华研究员为论文第一作者。研究得到国家自然科学基金、浙江省自然科学基金、教育部脑与脑机融合前沿科学中心等资助。