

# 浙江省新生儿异戊酸血症筛查及临床分析

胡真真<sup>1</sup>, 杨建滨<sup>1</sup>, 胡凌微<sup>1</sup>, 赵云飞<sup>2</sup>, 张超<sup>1</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. 台州市妇女儿童医院儿科, 浙江 台州 318000

**[摘要]** **目的:**了解浙江省新生儿异戊酸血症(IVA)的患病率、临床特征及基因突变特点。**方法:**采用串联质谱技术对2009年1月至2019年12月浙江省新生儿疾病筛查中心的3 510 004名新生儿进行遗传代谢病筛查,结合尿有机酸分析及IVD基因检测进行IVA诊断。IVA确诊患儿进行饮食和生活管理,补充左卡尼汀和甘氨酸治疗,长期随访观察并评估患儿的生长和智能发育情况。**结果:**共确诊IVA患儿15例,3例为急性新生儿型,其余无临床症状,患病率为1/234 000。所有患儿的血异戊酰基肉碱浓度均不同程度增加。12例患儿进行尿有机酸分析,其中11例异戊酰甘氨酸升高,4例伴3-羟基异戊酸升高。11例患儿进行基因检测,9例为IVD基因复合杂合突变,1例为IVD基因纯合突变,1例只检测出一个IVD基因位点。发现IVD基因突变19种(错义突变14种、内含子突变3种、移码突变1种、同义突变1种),其中11种突变未见报道。15例患儿中1例死亡,2例在当地随访,其余暂未发现明显临床症状(随访时间2~79个月),其中3例生长发育落后,其他患儿体格和智力发育均正常。**结论:**IVA临床表现无特异性,基因谱分散。使用串联质谱开展IVA新生儿筛查,实现早期诊断和治疗能纠正代谢缺陷及其引发的病理生理改变。



**[关键词]** 异戊酸血症; IVD基因; 新生儿筛查; 串联质谱法; 患病率; 基因型; 表型

**[中图分类号]** R722.11 **[文献标志码]** A

## Screening and clinical analysis of isovaleric acidemia newborn in Zhejiang province

HU Zhenzhen<sup>1</sup>, YANG Jianbin<sup>1</sup>, HU Lingwei<sup>1</sup>, ZHAO Yunfei<sup>2</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, YANG Rulai<sup>1</sup>, 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 Regional Medical Center for Children, Hangzhou 310052, China;

收稿日期:2020-05-12 接受日期:2020-08-13

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

第一作者:胡真真(1984—),女,博士,主管技师,主要从事儿童遗传代谢病筛查工作;E-mail: hzz22980825@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0003-3012-9414>

通信作者:黄新文(1968—),女,博士,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;E-mail: 6305022@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-2799-9155>

2. Department of Pediatrics, Taizhou Maternal and Child Health Hospital, Taizhou 318000, Zhejiang Province, China)

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

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the incidence, clinical, biochemical and genetic characteristics of isovaleric acidemia (IVA) in Zhejiang province. **Methods:** Between January 2009 and December 2019, a total of 3 510 004 newborns were screened for IVA using tandem mass spectrometry. Patients of IVA were confirmed by urine organic acid and *IVD* gene detection. IVA patients were given diet and life management, supplemented with L-carnitine and glycine treatment, long-term followed up to observe and evaluate the growth and intellectual development. **Results:** A total of 15 patients with IVA were diagnosed, with an incidence of 1/234 000. Three patients had acute neonatal IVA, and the rest were asymptomatic. The isovalerylcarnitine (C5) levels were increased in all patients. Twelve children underwent urinary organic acid analysis, of which 11 cases had elevated isovalerylglycine levels, 4 cases with 3-hydroxyisovalerate increased simultaneously. Eleven IVA patients underwent genetic testing, 9 patients were compound heterozygous variants in *IVD* gene, one with homozygous variants in *IVD* gene, and one harbored one *IVD* variant. Nineteen *IVD* variants (14 missense mutations, 3 intron mutations, 1 code shift mutation, and 1 synonymous mutation) were identified, 11 of which were not reported. Among the 15 IVA patients, one patient died and two patients were followed up locally. The remaining patients had no obvious clinical symptoms during the follow-up (2 - 79 months). Three patients presented with growth and development delay, the remaining had normal physical and mental development. **Conclusions:** The clinical manifestations of IVA are non-specific, and the gene spectrum is scattered. Newborn patients screened by tandem mass spectrometry can receive early diagnosis and treatment, so as to correct metabolic defects and pathophysiological changes.

[ **Key words** ] Isovaleric acidemia; *IVD* gene; Neonatal screening; Tandem mass spectrometry; Prevalence rate, Genotype; Phenotype

[ J Zhejiang Univ (Med Sci), 2020,49(5):556-564. ]

异戊酸血症 (isovaleric acidemia, IVA) 是由于异戊酰辅酶 A 脱氢酶 (isovaleryl-CoA dehydrogenase, *IVD*) 缺陷导致的常染色体隐性遗传病。IVA 新生儿期至成人期均可发病, 临床表现复杂多样, 缺乏特异性, 超过半数患者在新生儿期发生急性脑病, 婴儿期和儿童期可有反复呕吐、嗜睡、昏迷、汗脚样体臭、智力发育落后、代谢性酸中毒、血细胞减少及高血氨等症<sup>[1]</sup>, 须结合血液氨基酸及酰基肉碱谱、尿有机酸分析和基因检测等进行鉴别诊断。根据临床表型不同, IVA 可分为急性新生儿型和慢性间歇型, 近年来通过血液氨基酸及酰基肉碱谱新生儿筛查发现部分患者

没有明显临床症状<sup>[2]</sup>。IVA 是可治性疾病, 早期诊治患者预后良好<sup>[3]</sup>。目前, 很多国家和地区已将 IVA 列为新生儿筛查项目, 国外学者报道的发病率为 1/622 489 ~ 1/33 282<sup>[4-5]</sup>, 我国报道不多。本研究通过分析浙江省新生儿疾病筛查中心 2009 至 2019 年 IVA 新生儿筛查结果, 旨在了解新生儿 IVA 的患病率、临床特征、基因突变及预后。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

2009 年 1 月至 2019 年 12 月浙江省新生儿疾病筛查中心对 3 510 004 名新生儿进行血液氨基

酸及酰基肉碱谱筛查,其中足月儿 3 285 623 名,早产儿 215 597 名,过期产儿 8784 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),家长均签署知情同意书。

## 1.2 仪器与试剂

ACQUITY TQD 串联质谱仪为美国 Waters 公司产品;GCMS-QP2010 Plus 气相色谱质谱联用仪为日本岛津公司产品;CT-100 PCR 为美国 Bio-Rad 公司产品;3500Dx 测序仪为美国 Life Technologies 公司产品;Miseq 测序仪、外显子捕获试剂盒为美国 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 Agena Bioscience 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 Perkin Elmer 公司产品;文库制备试剂盒为美国 NEB 公司产品;PCR 试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品。

## 1.3 串联质谱法检测外周血氨基酸及酰基肉碱

按照《新生儿疾病筛查技术规范》(2010 年版)<sup>[6]</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,阴干后送检。根据试剂盒操作说明对干血斑标本进行前处理,再使用串联质谱仪检测氨基酸和肉碱浓度。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 2019 年 12 月采用非衍生化法。

干血斑标本中异戊酰基肉碱(C5)浓度超过截断值(0.40  $\mu\text{mol/L}$ ),且伴异戊酰基肉碱/乙酰基肉碱(C2)、异戊酰基肉碱/丙酰基肉碱(C3)比值升高的新生儿,为筛查阳性。

## 1.4 血生化检测及尿有机酸分析

召回异戊酸血症筛查阳性新生儿,复查后血异戊酰基肉碱仍增高者进一步检测血常规、血氨、血气分析、肝功能等;采集新鲜尿液样本,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,乙酸乙酯萃取两次,经甲基硅烷化衍生后上机检测尿有机酸。

## 1.5 高通量测序检测基因突变

采用高通量测序和 MassARRAY 技术对 *IVD* 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)、ESP6500 数据库、

ExAC 数据库和基因组突变频率数据库(gnomAD)进行比对。

## 1.6 生物信息学方法预测突变基因致病性

使用 SIFT、PROVEAN、PolyPhen-2、MutationTaster、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 MutationTaster 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(ACMG)指南对突变位点的致病性进行分析<sup>[7]</sup>。明确基因突变患儿的父母进一步进行 Sanger 测序,以确定致病突变位点。

## 1.7 诊断标准

以下三个条件中符合两条可诊断为 IVA:①血异戊酰基肉碱超过 0.40  $\mu\text{mol/L}$ 、异戊酰基肉碱/乙酰基肉碱(C2)、异戊酰基肉碱/丙酰基肉碱(C3)比值升高;②尿有机酸分析提示异戊酰甘氨酸超过 0.40 mmol/mol 肌酐,可伴有 3-羟基异戊酸增高;③ *IVD* 基因检测杂合突变或纯合突变。

## 1.8 治疗和随访

IVA 急性期严格限制患儿天然蛋白质的摄入,其中亮氨酸摄入减少至日常摄入量的 50%,同时保证能量摄入,纠正代谢紊乱,补充左卡尼汀(100 ~ 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )和甘氨酸(250 ~ 600  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。稳定期限限制患儿天然蛋白质的摄入,使用不含亮氨酸的特殊医用配方,长期服用左卡尼汀(50 ~ 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )和甘氨酸(150 ~ 250  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。

病情稳定 2 ~ 3 个月后随访复查,监测项目包括体格检查、血液氨基酸及酰基肉碱谱、尿有机酸、血常规、血氨、血气分析、肝功能等,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 ~ 6 岁,采用格塞尔发展测验;6 岁以上采用韦氏儿童力量表。

## 2 结果

### 2.1 IVA 筛查情况

共筛查新生儿 3 510 004 名,血异戊酰基肉碱增高 1131 例,初筛阳性率为 0.03%,阳性预测值为 1.33%,假阳性率为 0.03%。IVA 确诊患儿 15 例,男性 8 例,女性 7 例,患病率为 1/234 000

(表1)。15例患儿分别来自15个无亲缘关系的家庭,父母非近亲结婚。除例13为早产儿(孕35周)外,其余均为足月正常体重儿。3例为急性新生儿型(例7、8和14),分别于出生后第7、3和13天因少哭、少吃、少动入院治疗;3例(例6、7和14)尿液有异味;其余患儿暂无临床症状。

## 2.2 患儿实验室检查结果

15例IVA确诊患儿中,血常规结果异常8例,其中红细胞、白细胞和血小板减少3例,血红蛋白和白细胞减少4例,单纯血红蛋白减少1例;高氨血症10例(39~197  $\mu\text{mol/L}$ ,参考值 $<30 \mu\text{mol/L}$ );代谢性酸中毒4例(酸碱度值7.325~7.346,参考值 $>7.350$ );丙氨酸转氨酶升高1例(154 U/L);肌酸激酶增高2例;乳酸脱氢酶升高1例。见表2。

15例IVA确诊患儿的血液氨基酸及酰基肉碱谱检测初筛结果中,异戊酰基肉碱为0.66~14.50  $\mu\text{mol/L}$ (参考值 $<0.40 \mu\text{mol/L}$ ),仅例15伴游离肉碱(CO)降低(7.17  $\mu\text{mol/L}$ ,参考值 $>10.28 \mu\text{mol/L}$ );随访期间异戊酰基肉碱的波动范围为0.40~18.35  $\mu\text{mol/L}$ 。15例IVA确诊患儿中,除例8、10和15因死亡或在当地随访等原因未采集尿样,其余12例进行了尿有机酸分析,其中例5结果正常,其余11例异戊酰甘氨酸均升高(4.40~1136.00 mmol/mol 肌酐,参考值 $<0.40 \text{ mmol/mol}$  肌酐),4例伴3-羟基异戊酸

升高(4.87~2141.00 mmol/mol 肌酐,参考值 $<2.30 \text{ mmol/mol}$  肌酐)。见表2。

15例患儿中4例(例1、3、5、9)血异戊酰基肉碱浓度低于6  $\mu\text{mol/L}$ ,尿异戊酰甘氨酸浓度低于195 mmol/mol 肌酐,为代谢轻型;其余11例血异戊酰基肉碱浓度均高于6  $\mu\text{mol/L}$ ,为代谢严重型。

## 2.3 患儿及其父母基因检测结果

15例IVA确诊患儿中,11例进行了基因检测,例9只检测出一个IVD基因位点,例11为IVD基因纯合突变,其余9例患儿为IVD基因复合杂合突变,突变位点分别来自父母双方。共检出突变19种(错义突变14种、内含子突变3种、移码突变1种、同义突变1种),检出c.640A>G、c.359G>A、c.476G>C和c.1015T>C各2次,其余突变各1次。预测分析结果显示,7个新错义突变为潜在的致病突变,c.123A>C和2个内含子突变(c.1147+5G>A和c.296-10C>G)可能会影响剪切改变(表3)。

## 2.4 遗传代谢病家族史分析结果

例7母亲孕8产3,第一胎出生后第7天不明原因死亡。例14姐姐(6岁2个月)血异戊酰基肉碱及尿异戊酰甘氨酸升高,分别为6.09  $\mu\text{mol/L}$ 和92.48 mmol/mol 肌酐,基因测序基因型同先证者,智力及体格发育正常,5岁左右曾有无明显原因酸中毒住院病史。其余13例患儿无遗传病家族史。

表1 15例异戊酸血症确诊患儿的临床资料

Table 1 Clinical data of 15 patients with isovaleric acidemia

例序	性别	确诊时间	随访时间	临床症状	疾病分型	随访和预后情况
1	女	2月龄	45个月	无	代谢轻型	生长发育落后
2	女	1月龄	79个月	无	代谢严重型	正常
3	男	13月龄	38个月	无	代谢轻型	正常
4	女	17日龄	2个月	无	代谢严重型	正常
5	男	59月龄	59个月	无	代谢轻型	正常
6	男	17日龄	46个月	尿液异味	代谢严重型	生长发育落后
7	男	13日龄	46个月	少哭、少吃、少动,尿液异味	急性新生儿型、代谢严重型	正常
8	男	15日龄	—	少哭、少吃、少动	急性新生儿型、代谢严重型	出生后第7天死亡
9	男	2月龄	11个月	无	代谢轻型	正常
10	男	10日龄	—	无	代谢严重型	当地确诊随访
11	男	21日龄	25个月	无	代谢严重型	生长发育落后
12	女	25日龄	18个月	无	代谢严重型	正常
13	女	28日龄	12个月	无	代谢严重型	正常
14	女	28日龄	14个月	少哭、少吃、少动,尿液异味	急性新生儿型、代谢严重型	正常
15	女	24日龄	7d	无	代谢严重型	当地确诊随访

“—”:无相关资料。

表2 15例异戊酸血症确诊患儿的实验室检查结果

Table 2 Laboratory data of 15 patients with isovaleric acidemia

例序	血异戊酰基肉碱( $\mu\text{mol/L}$ )		血游离肉碱( $\mu\text{mol/L}$ )		异戊酰甘氨酸 ( $\text{mmol/mol}$ 肌酐)	3-羟基异戊酸 ( $\text{mmol/mol}$ 肌酐)
	初筛	随访	初筛	随访		
1	0.86	0.99~2.97	50.71	23.97~70.25	4.40	0.00
2	2.12	1.47~8.26	15.49	13.66~53.39	30.29~234.70	0.00~4.87
3	2.09	0.95~2.38	57.35	28.59~40.71	7.78	0.00
4	8.46	8.39~8.71	24.85	9.35~33.74	316.20~1136.00	5.59~2141.00
5	1.74	0.40~1.28	47.13	22.74~42.39	0.00	0.00
6	6.13	4.65~12.05	11.31	9.64~41.46	76.52~799.10	0.00~1.18
7	11.12	2.93~18.35	17.30	10.58~87.87	14.07~41.69	0.00
8	9.85	—	22.17	—	—	—
9	0.66	0.49~2.50	15.69	21.65~60.08	8.74	1.30
10	9.13	—	18.19	—	—	—
11	7.43	1.52~7.43	16.43	13.13~52.98	18.75~80.45	0.42~2.01
12	11.34	6.78~16.20	16.40	3.52~21.11	109.65~285.41	1.16~91.11
13	9.36	3.93~17.13	30.97	28.26~85.83	52.55	2.22
14	11.17	5.31~17.16	15.52	31.57~62.40	276.00	54.00
15	14.50	6.78	7.17	2.96	—	—

例序	白细胞计数( $\times 10^9/\text{L}$ )	红细胞计数( $\times 10^{12}/\text{L}$ )	血红蛋白量( $\text{g/L}$ )	血小板计数( $\times 10^9/\text{L}$ )	高血氨	酸中毒	肝损害
1	8.60	3.93	123	506	阳性	阳性	阳性
2	8.59	3.74	103*	591	阳性	阴性	阴性
3	7.61*	3.69*	126*	290	阳性	阴性	阴性
4	7.74	3.75	133	276	阳性	阳性	—
5	9.22	3.62	116	301	阴性	阳性	阴性
6	6.92*	4.25*	130*	255	阴性	阴性	阴性
7	2.83*	3.66*	129*	26*	阳性	阳性	阴性
8	—	—	—	—	阳性	—	—
9	4.83*	3.05*	105*	214	阳性	阴性	阴性
10	—	—	—	—	—	—	—
11	9.79	4.23	132	234	阳性	阴性	阴性
12	5.25*	3.65*	119*	51*	—	阴性	阴性
13	10.49*	3.06*	109*	363	阳性	阴性	阴性
14	5.70*	4.64*	144*	35*	阳性	阴性	阴性
15	—	—	—	—	—	—	—

“—”:无相关资料。\*低于正常值下限。

## 2.5 患儿临床随访和治疗情况

例8于出生第7天死于高氨血症,例10和例15在当地随访,其余12例IVA患儿的随访时间为2~79个月。例3和例5仅适当限制蛋白质摄入,未进行其他治疗,体格及智力发育均正常。其余10例患儿通过饮食及药物治疗,3例生长发育落后(例1、6和11,身高和体质量均为正常儿童的3%~10%),其他患儿体格和智力发育均正常。

## 3 讨论

不同国家和地区的IVA发病率差异较大,美国为1/250 000<sup>[8]</sup>,欧洲为1/622 489~1/45 466<sup>[4,9]</sup>,中东地区较高,为1/56 416~

1/33 282<sup>[5,10]</sup>,中国台湾地区为1/365 000<sup>[11]</sup>。本研究筛查了超过350万名新生儿,共确诊IVA患儿15例,IVA患病率约为1/234 000。

IVD功能缺陷导致亮氨酸分解代谢过程中异戊酰辅酶A无法生成3-甲基巴豆酰辅酶A,造成异戊酰辅酶A蓄积,引起异戊酰基肉碱、异戊酰甘氨酸和3-羟基异戊酸增多。由于异戊酰基肉碱与2-甲基丁酰肉碱及特戊酰肉碱为同分异构体,采用目前的串联质谱法筛查试剂不能区分出来,须结合尿有机酸分析进行鉴别诊断。尿异戊酰甘氨酸增多是诊断IVA的特征性指标,患儿急性期可伴3-羟基异戊酸增多。2-甲基丁酰肉碱见于2-甲基丁酰辅酶A脱氢酶缺乏症,尿有机酸分

表3 11例异戊酸血症确诊患儿的IVD基因突变特征

Table 3 Variants detected in the IVD gene among 11 patients with isovaleric acidemia

例序	核苷酸改变	基因位置	人群频率			氨基酸 改变	有害性预测							保守 指数 (%)
			1000 Genomes	ExAC	gnomAD		SIFT	PROVEAN	PolyPhen-2 HDIV	PolyPhen-2 HVAR	fathmm	Mutation- Taster	Human Splicing Finder	
2	c.340G > C	外显子4	—	—	—	V114L	D	N	B	B	D	D	—	67
	c.1208A > G	外显子12	—	$1.60 \times 10^{-5}$	$1.62 \times 10^{-5}$	Y403C	D	D	D	P	D	D	—	100
3	c.134T > G	外显子1	—	—	—	L45R	D	D	D	D	D	D	—	100
	c.640A > G	外显子6	—	$8.00 \times 10^{-6}$	$1.62 \times 10^{-5}$	T214A	D	D	D	D	D	D	—	100
5	<b>c.302A &gt; G</b>	外显子4	—	—	—	Y101C	D	D	P	B	D	D	—	67
	<b>c.1147 + 5G &gt; A</b>	内含子1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Y	—
6	<b>c.1184G &gt; T</b>	外显子12	—	—	—	R395L	D	D	D	D	D	D	—	100
	<b>c.1232A &gt; C</b>	外显子12	—	—	—	E411A	D	D	D	D	D	D	—	100
7	c.466-2A > G	内含子4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Y	—
	c.877G > T	外显子8	—	—	—	G293W	D	D	D	D	D	D	—	100
8	c.359G > A	外显子4	—	$8.00 \times 10^{-6}$	$4.06 \times 10^{-6}$	R120Q	D	D	D	D	D	D	—	100
	c.476G > C	外显子5	—	—	—	G159A	D	D	D	D	D	D	—	100
9	<b>c.487G &gt; A</b>	外显子5	—	—	$4.06 \times 10^{-6}$	G163R	D	D	D	D	D	D	—	100
11	<b>c.1015T &gt; C</b>	外显子10	—	—	—	C339R	D	D	D	D	D	D	—	77
12	<b>c.1189_1190delCT</b>	外显子12	—	—	—	L397Sfs * 7	—	—	—	—	—	—	—	—
	<b>c.1019G &gt; A</b>	外显子10	$3.99 \times 10^{-4}$	$4.10 \times 10^{-5}$	$2.03 \times 10^{-5}$	R340Q	D	D	D	D	D	D	—	100
13	c.640A > G	外显子6	—	$8.00 \times 10^{-6}$	$1.62 \times 10^{-5}$	T214A	D	D	D	D	D	D	—	100
	<b>c.667C &gt; T</b>	外显子6	—	$4.06 \times 10^{-6}$	$5.80 \times 10^{-5}$	R223W	D	D	D	P	D	D	—	100
	<b>c.296-10C &gt; G</b>	内含子3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Y	—
	<b>c.123A &gt; C</b>	外显子1	—	—	—	A41A	T	N	—	—	—	D	Y	—
14	c.359G > A	外显子4	—	—	—	R120Q	D	D	D	D	D	D	—	100
	c.476G > C	外显子5	—	—	—	G159A	D	D	D	D	D	D	—	—

“—”:无相关资料.IVD参考序列:NM\_002225.3.D;潜在有害、有害或致病;P;可能有害;N;中性;B;良性;T;可容忍;Y;剪切改变;保守指数;将人类IVD氨基酸序列与其他8个物种进行比较,该位点同为人类IVD野生型氨基酸的比例;加粗字体为新突变。

析结果2-甲基丁酰甘氨酸增多<sup>[12]</sup>;匹氨西林和头孢菌素类抗菌药物及特戊酸酯软膏含特戊酰肉碱,使用这些药物会引起异戊酰基肉碱暂时增多,通过同位素稀释串联质谱法和超高效液相色谱串联质谱法检测干血斑标本中的异戊酰甘氨酸和异戊酰基肉碱可以进行鉴别<sup>[13-14]</sup>。根据血异戊酰基肉碱和尿异戊酰甘氨酸浓度是否分别超过 $6 \mu\text{mol/L}$ 和 $195 \text{mmol/mol}$ 肌酐,可将IVA分为代谢轻型和代谢严重型<sup>[15]</sup>。对于代谢严重型患儿,监测尿异戊酰甘氨酸水平比血异戊酰基肉碱水平更能有效反映疾病状况和评估预后<sup>[16]</sup>。本研究确诊15例患儿,初筛时血异戊酰基肉碱水平均有不同程度的增高;11例患儿尿异戊酰甘氨酸水平增多,4例患儿伴3-羟基异戊酸增高;4例为代

谢轻型,其中2例未特殊治疗,随访发育良好;其余均为代谢严重型,尿异戊酰甘氨酸水平较血异戊酰基肉碱水平升高程度更为明显,及早治疗可明显改善代谢紊乱;例7新生儿期发病,经过治疗后恢复良好,其同胞新生儿早期死亡。

IVA的致病基因IVD位于染色体15q14-15,长约15 kb,含12个外显子,编码394个氨基酸。目前已报道超过92种的IVD基因突变(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>),包括错义突变、剪切突变和移码突变等<sup>[17]</sup>。不同国家和地区的IVD基因谱存在差异,热点突变在德国和美国均为c.932C > T(p. A282V)<sup>[2]</sup>,南非高加索人群均为c.367 G > A(p. G123R)<sup>[18]</sup>,韩国为c.457-3\_2CA > GG<sup>[19]</sup>,泰国为c.457-3\_2CA > GG<sup>[20]</sup>,中国

大陆及台湾地区以 c. 1208A > G (p. Y403C) 较为常见<sup>[11,17]</sup>。本文资料中, *IVD* 基因突变多为错义突变(占比 73.7%), 突变位点分散, 没有热点突变。研究显示, *IVA* 基因型与生化表型存在一定相关性, c. 158G > C (p. R53P) 和 c. 1184G > A (p. R395H) 突变与代谢严重型相关<sup>[21-22]</sup>; c. 941C > T (p. A314V)、c. 941C > G (p. A314G)、c. 500T > C (p. M167T)、c. 158G > A (p. R53H) 和 c. 706G > A (p. G236S) 与代谢轻型相关<sup>[2,16,23-24]</sup>; c. 932C > T (p. A282V) 突变在新生儿筛查患儿中最为常见, 多为无症状型<sup>[25]</sup>。Dercksen 等<sup>[18]</sup>报道的 10 例 *IVA* 患儿均为 c. 367G > A (p. G123R) 纯合突变, 临床表型从无症状型到严重的智力障碍和多发性代谢紊乱。Vatanavicham 等<sup>[20]</sup>报道的 5 例患儿均携带 c. 457-3\_2CA > GG 突变, 4 例急性新生儿型, 1 例慢性间歇型。Hertecant 等<sup>[22]</sup>报道三个同胞姐妹均为 c. 1175G > A (p. R392H) 纯合突变, 分别为急性新生儿型、慢性间歇性及无症状型。Wiley 等<sup>[26]</sup>报道的 2 例 *IVA* 患儿携带 c. 640A > G (p. T214A) 突变, 为无症状型, 携带这一突变的例 3 为代谢轻型, 例 13 却为代谢严重型。Li 等<sup>[17]</sup>报道的一例急性新生儿型携带 c. 359G > A (p. R120Q) 突变。本文资料中 2 例急性新生儿型(例 8 和例 14) 也携带该突变, 但携带该突变的例 14 姐姐却为慢性间歇型, 提示 *IVD* 基因突变具有临床表现异质性, 基因型与临床表型的关系须进一步论证。

*IVA* 患者临床表现多样, 通常伴有反复呕吐、嗜睡、昏迷、汗脚样体臭、智力发育落后、代谢性酸中毒、血细胞减少及高血氨等, 其不良预后主要表现为死亡和神经系统损伤。急性新生儿型常于患儿出生后 7 d 发病, 病死率高达 30% 以上, 而慢性间歇型和无症状型患儿的病死率仅为 3%<sup>[27]</sup>。异戊酸等代谢产物在大脑皮层诱导氧化应激及在突触膜中通过脂质过氧化机制抑制钠钾 ATP 酶活性等可引起神经系统损伤<sup>[28-29]</sup>, 受损程度与诊治时机有关, 与急性发作的程度和次数无关。出生后 5 周内诊治的 *IVA* 患儿仅有 15% 出现神经系统损伤, 而后期诊断的患者半数以上会出现神经系统损伤<sup>[27]</sup>, 患儿智商新生儿筛查诊断者较临床病例高 5 个百分点<sup>[16]</sup>。本文资料中, 8 例患儿出现血细胞减少, 10 例患儿出现高血氨, 4 例患儿出现代谢性酸中毒, 治疗后均恢复正常; 3 例急性新生儿型, 1 例出生后第 7 天明确诊断前死亡, 其余

2 例发育良好。随访的 12 例患儿智力发育均正常, 治疗后没有现代代谢失调。因此, 开展 *IVA* 新生儿筛查, 患儿进行早期治疗能改善患儿代谢紊乱, 极大降低病死率和避免神经系统损伤, 进一步优化新生儿筛查流程缩短诊断时间可避免早期新生儿死亡。

慢性间歇型 *IVA* 患儿急性发作的次数随年龄增加而减少, 可能与感染减少有关。青春期甚至成年后, 麻醉、过度运动、体力活动、疲劳、低热量饮食和禁食、怀孕、酒精等因素可能加速内源蛋白质分解诱发急性发作, 无症状患者及病情稳定超过一年的患者十年内仍可能发生代谢失偿, 因此 *IVA* 一旦确诊须终身管理和治疗<sup>[27]</sup>。进一步对确诊患儿的同胞进行血液氨基酸及酰基肉碱谱或尿有机酸分析, 可以发现慢性间歇型甚至无症状型患儿<sup>[18]</sup>。本文资料中, 一例患儿的姐姐为代谢严重型, 有代谢性酸中毒发作病史, 针对性的治疗可避免代谢失调的再次发作。

综上所述, *IVA* 是一种罕见的有机酸血症, 临床表现无特异性, 基因谱分散, 急性新生儿型患儿病情危重且病死率高, 须结合血液氨基酸及酰基肉碱谱、尿有机酸和基因检测等进行诊断和鉴别诊断。使用串联质谱法开展 *IVA* 新生儿筛查, 实现早期诊断和治疗能纠正代谢缺陷及其引发的病理生理改变。*IVA* 患者确诊后经终身管理和治疗, 一般预后良好。

## 参考文献

- [1] 李溪远, 华 瑛, 丁 圆, 等. 新生儿期发病的经典型异戊酸血症四例分析 [J]. 中华围产医学杂志, 2015, 18 (3): 188-194. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1007-9408. 2015. 03. 005. LI Xiyuan, HUA Ying, DING Yuan, et al. Analysis of four Chinese patients with neonatal-onset isovaleric acidemia [J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2015, 18 (3): 188-194. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1007-9408. 2015. 03. 005. (in Chinese)
- [2] ENSENAUER R, VOCKLEY J, WILLARD J M, et al. A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening [J]. Am J Hum Genet, 2004, 75 (6): 1136-1142. DOI: 10. 1086/426318.
- [3] 洪 芳, 黄新文, 张 玉, 等. 浙江省新生儿有机酸尿症筛查及随访分析 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2017, 46 (3): 240-247. DOI: 10. 3785/j. issn. 1008-

9292. 2017. 06. 03.  
HONG Fang, HUANG Xinwen, ZHANG Yu, et al. Screening for newborn organic aciduria in Zhejiang province: prevalence, outcome and follow-up [J]. **Journal of Zhejiang University (Medical Science)**, 2017, 46 (3): 240-247. DOI: 10. 3785/j. issn. 1008-9292. 2017. 06. 03. (in Chinese)
- [4] KASPER D C, RATSCHMANN R, METZ T F, et al. The National Austrian Newborn Screening Program - eight years experience with mass spectrometry. Past, present, and future goals [J]. **Wien Klin Wochenschr**, 2010, 122 (21-22): 607-613. DOI: 10. 1007/s00508-010-1457-3.
- [5] GOLBAHAR J, AL-JISHI E A, ALTAYAB D D, et al. Selective newborn screening of inborn errors of amino acids, organic acids and fatty acids metabolism in the Kingdom of Bahrain [J]. **Mol Genet Metab**, 2013, 110 (1-2): 98-101. DOI: 10. 1016/j. ymgme. 2013. 07. 006.
- [6] 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) [2020-06-11]. <http://www.nhc.gov.cn/cmsresources/mohfybjysqwss/cmsrsdocument/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) [2020-06-11]. <http://www.nhc.gov.cn/cmsresources/mohfybjysqwss/cmsrsdocument/doc10798.doc>. (in Chinese)
- [7] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology [J]. **Genet Med**, 2015, 17 (5): 405-424. DOI: 10. 1038/gim. 2015. 30.
- [8] CHACE D H, KALAS T A, NAYLOR E W. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns [J]. **Clin Chem**, 2003, 49 (11): 1797-1817. DOI: 10. 1373/clinchem. 2003. 022178.
- [9] SCOLAMIERO E, COZZOLINO C, ALBANO L, et al. Targeted metabolomics in the expanded newborn screening for inborn errors of metabolism [J]. **Mol Biosyst**, 2015, 11 (6): 1525-1535. DOI: 10. 1039/c4mb00729h.
- [10] AL HOSANI H, SALAH M, OSMAN H M, et al. Expanding the comprehensive national neonatal screening programme in the United Arab Emirates from 1995 to 2011 [J]. **East Mediterr Health J**, 2014, 20(1): 17-23.
- [11] LIN W D, WANG C H, LEE C C, et al. Genetic mutation profile of isovaleric acidemia patients in Taiwan [J]. **Mol Genet Metab**, 2007, 90 (2): 134-139. DOI: 10. 1016/j. ymgme. 2006. 08. 011.
- [12] SCHLUNE A, RIEDERER A, MAYATEPEK E, et al. Aspects of newborn screening in isovaleric acidemia [J]. **Int J Neonatal Screen**, 2018, 4(1): 7. DOI: 10. 3390/ijns4010007.
- [13] CLOPPENBORG T, JANZEN N, WAGNER H, et al. Application of a second-tier newborn screening assay for C5 isoforms [J]. **JIMD Rep**, 2014, 13: 23-26. DOI: 10. 1007/8904\_2013\_275.
- [14] MINKLER P E, STOLL M, INGALLS S T, et al. Selective and accurate C5 acylcarnitine quantitation by UHPLC-MS/MS: Distinguishing true isovaleric acidemia from pivalate derived interference [J]. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 2017, 1061-1062: 128-133. DOI: 10. 1016/j. jchromb. 2017. 07. 018.
- [15] VOCKLEY J, ENSENAUER R. Isovaleric acidemia: new aspects of genetic and phenotypic heterogeneity [J]. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, 2006, 142C (2): 95-103. DOI: 10. 1002/ajmg. c. 30089.
- [16] COUCE M L, ALDAMIZ-ECHEVARRÍA L, BUENO M A, et al. Genotype and phenotype characterization in a Spanish cohort with isovaleric acidemia [J]. **J Hum Genet**, 2017, 62(3): 355-360. DOI: 10. 1038/jhg. 2016. 144.
- [17] LI Y, SHEN M, JIN Y, et al. Eight novel mutations detected from eight Chinese patients with isovaleric acidemia [J]. **Clin Chim Acta**, 2019, 498: 116-121. DOI: 10. 1016/j. cca. 2019. 08. 019.
- [18] DERCKSEN M, DURAN M, IJLST L, et al. Clinical variability of isovaleric acidemia in a genetically homogeneous population [J]. **J Inherit Metab Dis**, 2012, 35 (6): 1021-1029. DOI: 10. 1007/s10545-012-9457-2.
- [19] LEE Y W, LEE D H, VOCKLEY J, et al. Different spectrum of mutations of isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD) gene in Korean patients with isovaleric acidemia [J]. **Mol Genet Metab**, 2007, 92 (1-2): 71-77. DOI: 10. 1016/j. ymgme. 2007. 05. 003.
- [20] VATANAVICHARN N, LIAMMONGKOLKUL S, SAKAMOTO O, et al. Phenotypic and mutation spectrums of Thai patients with isovaleric acidemia [J]. **Pediatr Int**, 2011, 53(6): 990-994. DOI: 10. 1111/j. 1442-200X. 2011. 03488. x.
- [21] MOHSEN A W, ANDERSON B D, VOLCHENBOUM S L, et al. Characterization of molecular defects in isovaleryl-CoA dehydrogenase in patients with isovaleric acidemia [J]. **Biochemistry**, 1998, 37 (28): 10325-10335. DOI: 10. 1021/bi973096r.

- [22] HERTECANT J L, BEN-REBEH I, MARAH M A, et al. Clinical and molecular analysis of isovaleric acidemia patients in the United Arab Emirates reveals remarkable phenotypes and four novel mutations in the IVD gene [J]. **Eur J Med Genet**, 2012, 55 (12):671-676. DOI:10.1016/j.ejmg.2012.08.001.
- [23] TANAKA K, BUDD M A, EFRON M L, et al. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1966, 56(1):236-242. DOI:10.1073/pnas.56.1.236.
- [24] SAKAMOTO O, ARAI-ICHINOI N, MITSUBUCHI H, et al. Phenotypic variability and newly identified mutations of the *ivd* gene in Japanese patients with isovaleric acidemia[J]. **Tohoku J Exp Med**, 2015, 236(2):103-106. DOI:10.1620/tjem.236.103.
- [25] ENSENAUER R, FINGERHUT R, MAIER E M, et al. Newborn screening for isovaleric acidemia using tandem mass spectrometry: data from 1.6 million newborns[J]. **Clin Chem**, 2011, 57(4):623-626. DOI:10.1373/clinchem.2010.151134.
- [26] WILEY V, WEBSTER D, LOEBER G. Screening pathways through China, the Asia Pacific region, the world[J]. **Int J Neonatal Screen**, 2019, 5(3):26. DOI:10.3390/ijns5030026.
- [27] GRÜNERT S C, WENDEL U, LINDNER M, et al. Clinical and neurocognitive outcome in symptomatic isovaleric acidemia [J]. **Orphanet J Rare Dis**, 2012, 7:9. DOI:10.1186/1750-1172-7-9.
- [28] SOLANO A F, LEIPNITZ G, DE BORTOLI G M, et al. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in isovaleric acidemia in brain cortex of young rats[J]. **Free Radic Res**, 2008, 42(8):707-715. DOI:10.1080/10715760802311179.
- [29] RIBEIRO C A, BALESTRO F, GRANDO V, et al. Isovaleric acid reduces  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats [J]. **Cell Mol Neurobiol**, 2007, 27(4):529-540. DOI:10.1007/s10571-007-9143-3.

[本文编辑 沈敏余方]

## · 学术动态 ·

# 康利军教授和段树民教授团队揭示神经胶质细胞感受环境刺激和调节嗅觉适应性的新机制

2020年9月23日,康利军教授团队和段树民院士团队合作在《神经元》(*Neuron*)发表了题为“Sensory glia detect repulsive odorants and drive olfactory adaptation”的研究论文(<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.026>)。该研究首次发现外周神经胶质细胞可以直接感受环境气味刺激,并通过 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)神经递质,实时抑制嗅觉神经元的活性,从而引起嗅觉适应性。

研究人员首先在模式生物秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)的化学感受器鞘状胶质细胞(amphid sheath glia, AMsh 胶质细胞)中特异性表达钙敏感的荧光蛋白GCaMP5,发现无论在体还是离体分离培养的AMsh胶质细胞都能够被机械刺激和厌恶性气味分子所激活。通过一系列分子遗传学筛选,研究人员发现两种G蛋白偶联受体SRH-79和STR-61分别表达于AMsh胶质细胞和ASH感觉神经元,作为受体蛋白感受气味分子异戊醇,并通过瞬时受体电位(TRP)通道和三磷酸肌醇受体(IP<sub>3</sub>R)引起细胞内的钙升高响应。然后通过AMsh胶质细胞中表达光敏感通道蛋白(CoChR),采用光遗传学方法特异性操控AMsh胶质细胞活性,研究人员发现激活的AMsh胶质细胞能通过释放抑制性神经递质GABA,作用于ASH感觉神经元上的离子型GABA受体LGC-38,抑制ASH神经元对气味分子的响应,进而调节动物的嗅觉行为学模式。有意思的是,如果基因敲除AMsh胶质细胞上的异戊醇受体SRH-79,AMsh胶质细胞就失去了对异戊醇气味适应性的调控能力,但仍然保持对辛醇(1-octanol)气味适应性的实时调节作用,充分说明了AMsh胶质细胞能够直接感受气味刺激,并实时调控嗅觉行为响应。

研究揭示了神经胶质细胞在感觉生成调控中的主动、实时的作用,并从分子和环路水平揭示了嗅觉适应性的产生机制,为充分阐明神经胶质细胞的生理功能和感觉适应性的生成机制奠定了科学基础,并提示神经胶质细胞及其相关分子在神经精神疾病发生与相关药物开发中潜在的意义。

段夺、张虎、岳晓敏和范月丹博士研究生是论文共同第一作者。研究主要受国家自然科学基金、国家重点研发项目等资助。