doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2020.09.003

·论著·

极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症16例临床及基因型分析

钱古柃,洪芳,童凡,吴鼎文,徐艳华,黄新文,杨茹莱(浙江大学医学院附属儿童医院,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,浙江杭州 310003)

[摘要]**目的**:探讨极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(VLCADD)的临床表现、实验室检查、诊治转归以及临床类型与基因型之间的关系。**方法**:选取2013年6月至2019年6月在我院通过新生儿筛查与临床确诊的VLCADD患儿共16例,回顾性分析患儿临床表现、实验室检查和基因型。**结果**:16例患儿中男5例,女11例,年龄7个月~10岁。临床类型:心肌型3例(18.75%),肝型5例(31.25%),肌型7例(43.75%),1例失访。心肌型患儿3例均死亡,肝型患儿2例死亡,肌型目前无死亡病例。16例患儿共检出28种不同的基因型,12种为未报道新的突变。28种基因型中点突变24种,小片段缺失3种,单碱基插入1种。**结论**:VLCADD重型患儿起病早而危重,即使新生儿筛查早期诊断也难以扭转结局。基因型中至少带1个无效等位基因或引起框移的的突变提示临床类型可能偏重。

[关键词]极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症;新生儿筛查;临床分型;基因型
[中图分类号]R725.8　　[文献标识码]A　　[文章编号]1672-108X(2020)09-0008-04

Clinical and Genotype Analysis of 16 Cases of Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency

Qian Guling, Hong Fang, Tong Fan, Wu Dingwen, Xu Yanhua, Huang Xinwen, Yang Rulai (*The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Center for Clinical Medicine of Children's Health and Disease, Zhejiang Hangzhou* 310003, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To probe into the clinical manifestation, laboratory examination, diagnosis and treatment outcome of very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (VLCADD), and the relationship between clinical phenotype and genotype. **Methods**: A total of 16 children with VLCADD after neonatal screening and clinical diagnosis in our hospital from Jun. 2013 to Jun. 2019 were extracted. Clinical manifestation, laboratory examination and genotype were retrospectively analyzed. **Results**: Among the 16 cases, there were 5 males and 11 females, aged from 7 months to 10 years. There were 3 cases (18.75%) of myocardial type, 5 cases (31.25%) of liver type, 7 cases (43.75%) of muscular type, and 1 case was lost to follow-up. There were 3 children with myocardial type died, 2 children with liver type died, and there was no death for muscular type. A total of 28 different genotypes were detected in 16 children, and 12 of them were unreported new mutations. Among the 28 genotypes, there are 24 point mutations, 3 small fragment deletions, and 1 single base insertion. **Conclusion**: VLCADD in severe children are start early and critical onset, and it is difficult to reverse the outcome even if the child was early diagnosed through neonatal screening. A variant with at least one null allele or a frame shift in the genotype may indicate a serious phenotype.

[**Keywords**] very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; neonatal screening; clinical phenotype; genotype

极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症(very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, VLCADD)是脂肪酸代谢性疾病的一种,国外报道其发病率为1/850 000~1/31 500[1-2]。VLCADD是线粒体内脂肪酸β氧化中的第一步关键酶——极长链酰基辅酶A脱氢酶(VLCAD)的基因先天缺陷所导致的常染色体隐性遗传病。根据临床表现分为3型:(1)早期发病型,又称心肌病型,常有心肌受累,在新生儿期即有心肌表现,往往在早期死亡;(2)肝型,表现为低酮性低血糖、瑞氏综合征等;(3)肌病型,多在青少年甚至成人被发现,表现为运动不耐受及感染诱发肌溶解。前两型临床表现重、预后差,肌型相对较轻。本研究收集近年来在我院经新生儿筛查及临床确诊的VLCADD患儿共16例,根据临床表现、基因变异类型及诊治体会作相关讨论。

1　治疗和方法

1.1　一般资料

选取2013年6月至2019年6月在我院通过新生儿筛查与临床确诊的VLCADD患儿共16例,其中新生儿筛查确诊病例15例,起病后临床确诊1例。所有检查均经过患儿家长的知情同意。

1.2　研究方法

1.2.1　临床资料及实验室检查　收集患儿临床资料,包括临床表现、随访经过及转归;常规实验室检查及辅助检查,如丙氨酸氨基转移酶(ALT)、肌酸激酶(CK)、心脏彩超、心电图。

基金项目:国家重点研发计划,编号2018YFC1002200;浙江省卫计委科研项目,编号2014KYA258。
作者简介:钱古柃(1981.11-),女,硕士,主要从事新生儿筛查及遗传代谢病研究,E-mail:qooling@zju.edu.cn。
通讯作者:杨茹莱(1963.03-),女,硕士,教授,主要从事新生儿筛查及遗传代谢病研究,E-mail:chsczx@zju.edu.cn。

1.2.2 串联质谱检查方法 末梢血或静脉血制作干血滤纸片后，经 PerKinElmer 串联质谱试剂盒处理后上串联质谱仪（Waters Quattro API）检测标本中的氨基酸及酰基肉碱。

1.2.3 基因突变分析 采集患儿及父母静脉血，二代高通量测序靶向测序并进行 Sanger 验证，采用 dbSNP、1000Genome、ESP6500、ClinVar 等数据库的生物信息进行分析。新的错义突变用 PolyPhen-2、SIFT、Mutation Taster、FATHMM、Provean 等进行功能预测。未能召回的病例，用新生儿筛查剩余的干血滤纸片血斑，做二代高通量测序。

2 结果

2.1 临床资料

确诊的 16 例患儿中，男 5 例，女 11 例，年龄 7 个月～10 岁。1 例是临床确诊病例，15 例是新生儿筛查确诊病例。2 例为姐妹关系。1 例有姐姐呕吐后“猝死”病史。所有家系均否认近亲婚配。心肌型 3 例（18.75%），起病早，病情重，均在出生后数月内死亡；肝型 5 例（31.25%），其中 2 例为缺乏直接证据的可疑肝型，发病以低血糖、抽搐、呕吐、拒奶等为主要表现，其中 2 例死亡；肌型 7 例（43.75%），平时无症状，伴或不伴血肌酸激酶的增高，但感染后会出现肌酸激酶增高，甚至横纹肌溶解肉眼肌红蛋白尿；1 例未配合复查，临床类型待定。未经治疗的初次血串联质谱结果均提示十四烯酰基肉碱（C14：1）及比值增高，C14：1 绝对值为 0.90～6.08 μmol/L（正常范围 0.03～0.26 μmol/L）。随访过程中，3 例伴有游离肉碱（C0）下降；7 例肌酸激酶增高，无症状时 CK 波动范围为 464～5 814 U/L（正常范围 39～308 U/L）；ALT 增高 5 例（正常值<50 U/L）。见表 1。

表 1 16 例确诊 VLCADD 患儿基因型与临床诊治及转归

突变类型	临床分型	性别	确诊时间	家族史	临床表现、治疗及转归	C14：1/（μmol/L）	C14：1/c8/（μmol/L）	ALT/（U/L）	CK/（U/L）	心脏彩超、心电图
C.1349G>A C.388-390delGAG	肌病型	女	2013.07	姐妹同患	一直无症状，5 岁发热后首次出现横纹肌溶解，之后感染后常类似发作。目前低脂饮食，补充富含中链脂肪酸奶粉及 MCT	5.76	25.04	18	241～1 059	三尖瓣轻度返流
C.96-105del C.96-105del	心肌病型	女	2014.04-2014.07	无特殊	1 月龄开始富含中链脂肪酸奶粉喂养，感染后出现纳差、抽搐、低白蛋白血症，住院治疗无效死亡	6.08	101.33	65	83	心室壁增厚窦性心律
C.859A>G C.1238T>C	肌病型	女	2014.08	无特殊	无症状，平时未限制饮食，曾患流感后出现 CK 增高至 400 U/L	2.01	22.33	17	124～1 297	三尖瓣轻度返流
C.1357C>T C.1349G>A	疑似肝型	女	2016.06-2018.03	无特殊	感冒后猝死。平时无任何症状，未接受随访治疗	1.21	40.33	-	-	-
C.1153C>T C.541C>T	肌病型	男	2016.12	无特殊	目前无症状，富含中链奶粉与普通奶粉混合喂养	1.51	18.88	37	133	心超未见异常
C.733G>A C.1474C>T	肝型	女	2016.12-2019.03	无特殊	感冒后猝死，C0 偏低。补充左卡尼汀，限制脂肪饮食，MCT，家长配合度好	1.69	42.25	70	105～1 301	三尖瓣轻度返流，T 波轻度改变
C.878+1G>C C.863T>G	失访	男	2017.02	无特殊	电话随访目前无症状，未配合随访治疗	0.90	7.50	-	-	-
C.1280G>A C.1505T>A	心肌病型	男	2017.09-2017.10	无特殊	出生后立即发病，低血糖、抽搐，死亡	1.90	13.57	-	-	-
C.1276G>A C.1366C>T	肌病型	女	2017.11	无特殊	目前无症状，富含中链脂肪酸奶粉喂养，MCT	2.24	37.33	26	133	-
C.1057A>G C.1405C>T	可疑肝型	女	2018.04	姐姐 2 岁猝死	目前无症状，富含中链脂肪酸奶粉喂养	6.81	68.10	24	82	-
C.1349G>A C.388-390delGAG	肌病型	女	2018.05	姐妹同患	目前无症状，C0 偏低，口服左卡尼汀，富含中链脂肪酸喂养，MCT	7.76	59.69	44	685	三尖瓣轻度返流，正常心电图
C.562G>A C.1532G>A	心肌病型	男	2018.08-2019.01	无特殊	猝死，游离肉碱低，口服左卡尼汀，富含中链脂肪酸喂养	1.41	35.25	32	85	三尖瓣轻度返流，窦性心动过速
C.553G>A C.1273G>A	肝型	女	2018.10	无特殊	目前无症状，富含中链脂肪酸奶粉喂养	3.33	47.57	74	464	三尖瓣轻度返流，窦性心动过速
C.920_921del C.1054A>G	肝型	女	2018.12	无特殊	目前无症状，母乳与富含中链脂肪酸奶粉混合喂养	4.80	80.00	65	1 767	先天性心脏病，房间隔缺损
C.920C>T C.1505T>A	肌病型	女	2018.12	无特殊	目前无症状，母乳与富含中链脂肪酸奶粉混合喂养	1.03	20.6	32	51	-
C.1358G>A C.1699C>T	迟发型（临床诊断）	男	2008.8	无特殊	CK 偏高，感染后数次横纹肌溶解发作，剧烈运动后肌肉痛、肌溶解。高碳水低脂饮食，补充富含中链脂肪酸奶粉及 MCT	1.26	63.00	118	651～5 814	三尖瓣轻度返流，正常心电图

注：C14：1/C8 正常值范围为 0.41～2.75；MCT 为中链甘油三酯

2.2　基因分析

16 例患儿 *ACADVL* 基因的两个等位基因均检测到了突变，分别来自父母。16 例患儿 2 例是姐妹关系，故基因型相同（C. 1349G>A/C. 388-390delGAG）。16 例患儿中 1 例为纯合突变（C. 96-105delGCCCGGCCCT/C. 96-105delGCCCGGCCCT），其他 15 例均为复合杂合突变。16 例患儿共检出 28 种不同的基因型。基因突变以点突变为主，共 24 种（85. 71%），另检出小片段缺失 3 种（C. 96-105delGCCCGGCCCT、C. 388-390delGAG、C. 920-921del），单碱基插入 1 种（C. 878+1G>C）。16 种基因型为已知突变，12 种为新突变。12 种新突变中：C. 96-105delGCCCGGCCCT（P. Arg32Argfs * 26）导致 VLCAD 蛋白翻译提前终止；c. 878+1G>C 由于单碱基插入引起移码突变；另外 10 个突变（C. 859A>G、C. 1238T>C、C. 541C>T、C. 863T>G、C. 1276G>A、C. 1505T>A、C. 1057A>G、C. 562G>A、C. 1054A>G、C. 920C>T）均为错义突变。经 PolyPhen-2、SIFT、Mutation Taster、FATHMM、Provean 等 5 个软件进行功能预测，见表 2。

表 2　新错义突变功能预测

核苷及改变	氨基酸改变	PolyPhen-2	SIFT	Mutation Taster	FATHMM	Provean	突异意义
C. 541C>T	p. His181Tyr	D	D	D	D	D	可能致病
C. 863T>G	p. Phe288Cys	D	D	D	D	D	可能致病
C. 895A>G	p. Lys229Glu	D	D	D	D	D	尚未明确
C. 1238T>C	p. Ile413Thr	B	D	D	D	D	尚未明确
C. 1276G>A	p. Ala426Thr	P	D	D	D	D	可能致病
C. 1057A>G	p. Arg353Glu	D	D	D	D	D	可能致病
C. 562G>A	p. Glu188Ser	D	D	D	D	D	可能致病
C. 1054A>G	p. Met352Val	P	D	D	D	D	可能致病
C. 920C>T	p. Tyr307Ile	D	D	D	D	D	尚未明确
C. 1505T>A	p. Leu502Gln	P	D	P	D	D	尚未明确

注：D 为致病，B 为非致病，P 为可能致病

2.3　基因型与临床表型的关系

3 例心肌型患儿，1 例为 C. 96-105delGCCCGGCCT 的纯合子，1 例携带 C. 1280G>A（无义突变），另 1 例为错义突变。5 例肝型患儿中，1 例携带 C. 1357C>T（无义突变），1 例携带 C. 920-921del（引起框移），另 3 例均为错义突变。7 例肌型患儿中，1 例携带 C. 388-390delGAG（不影响阅读框），其余 6 例均是错义突变。

3　讨论

随着串联质谱技术的开展和基因检测广泛应用于临床，以及遗传代谢病新生儿筛查的开展，VLCADD 的确诊率明显增高。2013 年 6 月至 2019 年 6 月我院筛查中心通过串联质谱技术共筛查新生儿 2 551 824 例，确诊 15 例，浙江省新生儿的患病率约 1∶170 122。

VLCAD 作为线粒体脂肪酸 β 氧化过程中第一步的关键酶，缺陷将导致体内长链脂肪酸不能氧化供能，蓄积在细胞内。由于 VLCAD 在肝脏、心肌、骨骼肌、皮肤成纤维细胞等均有表达，因此缺陷会导致这些组织的细胞内蓄积长链脂肪酸产生毒性作用，引起相应的临床症状和体征。本研究中，心肌病型 3 例（18. 75%）：发病早，进展迅速，全部在出生数月内死亡（死亡年龄分别为 1、3、5 个月），其中 1 例患儿心脏彩超提示明显的心室壁增厚。肝型 3 例与疑似肝型 2 例，共 5 例（31. 25%），其中 2 例死亡，2 例疑似患儿 1 例目前（1 岁 6 个月）无症状，但其姐姐 2 岁时呕吐后猝死的家族史；另 1 例未配合复诊，平时无任何症状，但 1 岁 9 个月时感冒后猝死。肌型 7 例（43. 75%），目前均存活，其中 1 例是临床病例，9 岁起病，因感冒后肌肉痛、横纹肌溶解来我院确诊；另外 6 例均为新生儿筛查发现，有 1 例 5 岁开始发生多次感染后横纹肌溶解，其余均无明显症状，CK 正常或轻度增高，有患儿平时 CK 正常，感染后会轻度增高，无肌溶解症状。1 例因不配合复诊未能确定临床类型，电话随访患儿目前 2 岁 6 个月，无任何症状，心肌病型可能性不大。

C14∶1 与辛酰基肉碱（C8）比值是串联质谱检查诊断本病的关键指标。本组患儿的 C14∶1 范围为 0. 90 ~ 6. 08 μmol/L（正常值范围 0. 03 ~ 0. 26 μmol/L），均明显高于正常。

VLCADD 的基因 *ACADVL* 位于染色体 17p13. 1，包含 20 个外显子，编码 655 个氨基酸，目前已有 284 个突变被报道（HGMD，http://www. hgmd. cf. ac. uk/ac/index. php，2019 年 3 月）。本研究 16 例患儿检测到了 28 种不同的基因型，呈现高度异质性，以点突变为主（24/28），其中 2 个无义突变（C. 1357C>T，C. 1280G>A），22 个错义突变，错义突变占比 78. 6%，与既往报道相符合[3-4]。本研究的基因型与临床分型可以发现，在 5 例死亡患儿中，1 例为 C. 96-105delGCCCGGCCT 的纯合子患儿，基因型会导致蛋白质翻译终止；2 例等位基因中的其中一个分别带有 C. 1357C>T、C. 1280G>A，也会导致蛋白质提前翻译终止；2 例 4 个等位基因均为错义突变。7 例肌型患儿仅一种突变类型是小片段缺失 C. 388-390delGAG，且刚好缺失 3 个碱基不影响阅读框，其他均是错义突变。5 例肝型患儿中 1 例携带 C. 1357C>T（无义突变），1 例携带 C. 920-921del（引起框移）。3 例心肌型患儿中，1 例为 C. 96-105delGCCCGGCCT 的纯合子（导致蛋白质翻译提前终止），1 例携带 C. 1280G>A（无义突变）。分析本组基因型和表型的关系，发现 VLCADD 患

儿基因型中,至少带有 1 个无效等位基因,或者引起框移等突变的时候,与临床表型关系密切,也与既往研究[5-6]相符。但即使突变的两个位点均为错义突变,也不能提示预后良好,本组患儿中 2 例死亡患儿,4 个等位基因均为错义突变,仅凭基因型判断预后需商榷[7]。

心肌型患儿难救治,起病早且迅速,新生儿期即起病,我院抢救过其中 1 例,未成功,另 2 例在当地死亡,死亡年龄分别为 3 个月、1 个月、5 个月。肝型患儿即使是在饮食管理很严格的情况下,仍有猝死的风险,2 例死亡患儿中,其中 1 例一直在我院门诊高糖低脂饮食(脂肪占比 25%~30%)治疗,摄入富含中链脂肪酸的奶粉和 MCT,避免饥饿与剧烈运动,家长依从性较好,患儿 2.3 岁猝死。肌型患儿目前均存活,已经发病的患儿,严格饮食管理,避免饥饿;对于未出现症状和 CK 增高的患儿,饮食上未予特殊控制,仅医嘱避免饥饿,配合定期复查随访。所有存活患儿生长发育水平,经身高体质量评估,发育商筛查,均提示基本正常。近年研究较多的患儿皮肤成纤维细胞中 β 脂肪酸氧化速率与正常细胞百分比被建议用于判断疗效和预后[8-10],正常细胞百分比越高残存的酶活性越高。研究发现,新生儿筛查几乎不能改变重型患儿的预后,饮食治疗对重型患儿几乎无效,而对正常细胞百分比>10%且出现症状的患儿,可以通过积极干预有效地减少低血糖的发生[11-12],但远期影响尚需进一步观察。

综上所述,VLCADD 重型患儿(心肌型和部分肝型)起病早且危重,病死率高,即使新生儿筛查早期诊断也难以扭转结局。基因型与表型的关系有较明显的不确定性,突变中至少带 1 个无效等位基因或引起框移的突变提示临床类型可能偏重。

参考文献:

[1] ARNOLD G L, VAN HOVE J, FREEDENBERG D, et al. A delphi clinical practice protocol for the management of very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency [J]. Mol Genet Metab, 2009, 96(3): 85-90.

[2] LINDNER M, HOFFMANN G F, MATERN D, et al. 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.

[3] PENA L D, VAN CALCAR S C, HANSEN J, et al. Outcomes and genotype-phenotype correlations in 52 individuals with VLCAD deficiency diagnosed by NBS and enrolled in the IBEM-IS database [J]. Mol Genet Metab, 2016, 118(4): 272-281.

[4] OBAID A, NASHABAT M, ALFADHEL M, et al. Clinical, biochemical, and molecular features in 37 Saudi patients with very long chain acyl CoA dehydrogenase deficiency [J]. JIMD Rep, 2018, 40: 47-53. doi: 10.1007/8904_2017_58.

[5] ANDRESEN B S, OLPIN S, POORTHUIS B J, et al. Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency [J]. Am J Hum Genet, 1999 (64): 479-494.

[6] GOETZMAN E S, WANG Y, HE M, et al. Expression and characterization of mutations in human very long-chain acyl-CoA dehydrogenase using a prokaryotic system [J]. Mol Genet Metab, 2007, 91(2): 138-147.

[7] HOFFMANN L, HAUSSMANN U, MUELLER M, et al. VLCAD enzyme activity determinations in newborns identified by screening: a valuable tool for risk assessment [J]. J Inherit Metab Dis, 2012, 35(2): 269-277.

[8] DIEKMAN E F, FERDINANDUSSE S, VAN DER POL L, et al. Fatty acid oxidation flux predicts the clinical severity of VLCAD deficiency [J]. Genet Med, 2015, 17(12): 989-994.

[9] OLPIN S E, MANNING N J, POLLITT R J, et al. Improved detection of long-chain fatty acid oxidation defects in intact cells using [9,10-3H] oleic acid [J]. J Inherit Metab Dis, 1997 (20): 415-419. https://doi.org/10.1023/A:1005358802096.

[10] OLPIN S E, MANNING N J, POLLITT R J, et al. The use of [9,10-3H] myristate, [9,10-3H] palmitate and [9,10-3H] oleate for the detection and diagnosis of medium and long-chain fatty acid oxidation disorders in intact cultured fibroblasts [J]. Adv Exp Med Biol, 1999, 466: 321-325. doi.org/10.1007/0-306-46818-2_37.

[11] BLEEKER J C, KOK I L, FERDINANDUSSE S, et al. Impact of newborn screening for very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency on genetic, enzymatic, and clinical outcomes [J]. J Inherit Metab Dis, 2019, 42(3): 414-423.

[12] BLEEKER J C, KOK I L, FERDINANDUSSE S, et al. Proposal for an individualized dietary strategy in patients with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency [J]. J Inherit Metab Dis, 2019, 42(1): 159-168.

(编辑:杨丹)

(收稿日期:2019-12-06 修回日期:2020-02-20)

· 编者 · 作者 · 读者 ·

本刊特别欢迎各类基金课题论文

为了鼓励作者将基金课题(包括国家自然科学基金、国家各部委及各省、市、自治区级的各种基金)产生的论文投到《儿科药学杂志》发表,以进一步提高本刊的学术水平,由上述基金课题产生的论文将在本刊优先发表,同时对该基金课题产生的研究性论文给予优厚稿酬。基金项目稿件需附基金课题文件复印件并在文中注明基金名称及编号,否则无效。热忱欢迎广大作者投稿。投稿网址:http://www.ekyxzz.com.cn。