

新生儿黄疸患儿与早产低体质量儿体内氨基酸水平变化原因分析^{*}

林 飞,徐钰琪,阙 婷,罗 超,李东明,陈少科[△](广西壮族自治区妇幼保健院儿童医院,南宁 530013)

【摘要】 目的 探讨新生儿黄疸患儿与早产低体质量儿体内氨基酸水平变化并分析其原因。**方法** 利用串联质谱技术(TMS)采用衍生法检测于血滤纸片中 18 种氨基酸水平。通过 t 检验统计比较原血片、召回血片两次氨基酸的水平,分析新生儿干血滤纸片中氨基酸水平变化的原因。**结果** (1)新生儿黄疸患儿共 38 例,除天冬氨酸(Asp)、瓜氨酸(Cit)两种氨基酸外,共有丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)、蛋氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、亮氨酸(Leu)、色氨酸(Trp)、缬氨酸(Val)、甘氨酸(Gly)、鸟氨酸(Orn)、组氨酸(His)、丝氨酸(Sern)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)14 种氨基酸检测结果,召回血片较原血片明显降低($P<0.05$);谷氨酰胺(Gln)、精氨酸(Arg)共 2 种氨基酸检测结果,召回血片较原血片明显升高($P<0.05$)。(2)早产低体质量儿共 46 例,除 Glu、Cit、Gln、His 4 种氨基酸外,Ala、Asp、Met、Phe、Tyr、Leu、Trp、Val、Arg、Gly、Orn、Sern、Thr、Pro 共 14 种氨基酸检测结果,召回血片较原血片明显降低($P<0.05$)。**结论** 新生儿黄疸及早产低体质量时期严重影响了干血滤纸片多种氨基酸水平的变化,故实验室对氨基酸遗传代谢病筛查结果的判断应结合新生儿病史,排除假阳性,从而减轻新生儿筛查工作者的压力及家长的精神负担。

【关键词】 新生儿黄疸; 早产低体质量儿; 串联质谱技术; 氨基酸

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.21.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)21-2947-03

Causes analysis of amino acid level change in jaundice neonates and premature low-birth-weight neonates^{*} LIN Fei, XU Yu-qi, QUE Ting, LUO Chao, LI Dong-ming, CHEN Shao-ke[△] (Children's Hospital, Guangxi Maternal and Child Health Care Hospital, Nanning, Guangxi 530013, China)

【Abstract】 Objective To discuss and analyze the change and causes of amino acid level in jaundice neonates and premature low-birth-weight neonates. **Methods** By utilizing the tandem mass spectrometry(TMS), the derivative method was adopted to measure 18 kinds of amino acid in dried blood spot(DBS). The amino acid levels were compared between the initial DBS and the recalled DBS by t-test. The causes of amino acid concentration variation in neonatal dried blood spot were analyzed. **Results** (1)In 38 jaundice neonates, except Asp and Cit, the concentrations of Ala, Glu, Met, Phe, Tyr, Leu, Trp, Val, Gly, Orn, His, Sern, Thr and Pro in the recalled DBS were significant decreased compared with the initial DBS($P<0.05$), while the concentrations of Gln and Arg in the recalled DBS were significant increased compared with the initial DBS($P<0.05$). (2)In 48 low-birth-weight neonates, except Glu, Cit, Gln and His, the concentrations of other amino acids in the recalled DBS were significant decreased compared with the initial DBS($P<0.05$). **Conclusion** Neonatal jaundice and premature low-birth-weight seriously affect the change of amino acid levels in DBS. So the laboratory judgement on the screening results of amino acid genetic metabolic diseases should combine with the neonatal history and exclude the false positive, thus alleviate the pressure of neonatal screening workers and mental burden of parents.

【Key words】 neonatal jaundice; low-birth-weight neonate; tandem mass spectrometry; amino acid

人体内各种氨基酸是蛋白质、多肽的基本组成结构和新陈代谢中重要的小分子物质,参与氨基酸代谢的相关蛋白和酶发生缺陷,或者各种病理状态都会导致氨基酸代谢异常和血清氨基酸水平的改变^[1]。而串联质谱技术(TMS)应用于氨基酸、有机酸、脂肪酸和糖代谢异常及溶酶体贮积病等新生儿遗传代谢病筛查,实现了一种检测方法检测多种疾病的技术转变^[2]。利用 TMS 通过检测新生儿干血滤纸片筛查,是新生儿疾病筛查最大的发展之一。本研究主要探讨新生儿黄疸患儿与早产低体质量儿干血滤纸片中各种氨基酸变化,并分析了其影响因素。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 1 月至 2013 年 1 月新生儿黄疸患儿共 38 例:足月儿,出生 3 d 后采集干血滤纸片以进行新生儿疾病筛查,TMS 检测发现部分氨基酸升高,通过电话随访并召回,38 例黄疸患儿均经过蓝光治疗,召回采血时黄疸消失。选择同期早产低体质量儿 46 例:均小于 37 周出生,且体质量范围为 2 000~2 500 g,出生 3 d 后采集干血滤纸片以进行新生儿疾病筛查,TMS 检测发现部分氨基酸升高,通过电话随访并召回,召回采血时体质量均大于 2 500 g。标本采集于新生儿足跟血,滴于特制的滤纸片(Schleicher & Schuell 903 型)上,

^{*} 基金项目:十二五国家科技支撑计划项目(2012BAI09B04)。

作者简介:林飞,男,本科,技师,主要从事新生儿疾病筛查工作。 [△] 通讯作者,E-mail:chenshaoke123@163.com。

血液充分渗透滤纸片,无重叠,形成直径大于 8 mm 血斑,滤纸片分开放置,于清洁处自然晾干,并用密封袋存放于 2~8 ℃ 冰箱中。

1.2 仪器与试剂 Wallac Oy 公司提供的新生儿苯丙氨酸测定试剂盒,1420 VICTOR2D 型荧光读数仪,API3200 串联质谱仪,96 孔板加热吹干装置,96 孔过滤板(滤膜孔径 0.45 μm,美国 Millipore 公司),衍生剂(盐酸正丁醇与乙酰氯按体积比 9∶1 配制),其中,乙腈、甲醇、乙酰氯、正丁醇等均为高效液相色谱级试剂。同位素内标购于美国 Cambridge Isotope Labs。

1.3 方法 TMS:参考文献[3]报道的方法,(1)取直径 3.2 mm 圆形滤纸血盘(包括标准、质控和样品),置于 96 孔过滤板微孔内;(2)每孔加含有内标甲醇(1∶99)溶液 100 μL 进行萃取,室温静置 20 min;(3)离心(2 400 r/min,2 min)将过滤板中的萃取液移至另一个 96 孔聚丙烯板中;(4)将 96 孔聚丙烯板置于氮气吹干仪底座样品台上 50 ℃ 条件下加热吹干;(5)每孔加 70 μL 衍生剂,Teflon 膜封板;(6)置于 65 ℃ 恒温箱进行衍生化处理 15 min;(7)继续 50 ℃ 加热吹干,再往每孔内加 100 μL 80%乙腈溶液溶解,铝膜覆盖,即上机检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 新生黄疸患儿原血片、召回血片检测结果 除天冬氨酸(Asp)、瓜氨酸(Cit)两种氨基酸外,共有丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)、蛋氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、亮氨酸(Leu)、色氨酸(Trp)、缬氨酸(Val)、甘氨酸(Gly)、鸟氨酸(Orn)、组氨酸(His)、丝氨酸(Sern)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)14 种氨基酸检测结果,召回血片较原血片明显降低($P < 0.05$);谷氨酰胺(Gln)、精氨酸(Arg)共 2 种氨基酸检测结果,召回血片较原血片明显升高($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 新生黄疸患儿原血片、召回血片结果的比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

氨基酸种类	原血片	召回血片	<i>P</i>
Ala	366.68±113.02	141.61±37.80	0.000
Asp	38.70±24.75	27.70±8.52	0.086
Glu	263.37±70.95	174.67±70.87	0.001
Met	42.02±13.82	22.78±5.76	0.000
Phe	179.69±100.89	44.44±13.84	0.000
Tyr	126.92±52.39	67.85±19.70	0.000
Leu	293.58±60.73	168.30±37.81	0.000
Trp	59.88±31.74	33.68±9.84	0.002
Val	238.77±43.65	124.39±28.03	0.000
Arg	3.37±2.44	7.23±3.13	0.001
Cit	14.78±3.95	13.82±5.38	0.549
Gly	499.24±111.64	171.96±61.62	0.000
Orn	52.70±25.83	30.44±18.61	0.005
Gln	12.69±10.00	20.07±9.99	0.034
His	294.44±156.09	103.66±32.02	0.000
Sern	145.25±55.90	65.53±42.48	0.000
Thr	145.62±54.92	72.25±25.55	0.000
Pro	1373.39±1099.43	740.87±303.13	0.025

2.2 早产低体质量儿原血片、召回血片结果 除 Glu、Cit、Gln、His 4 种氨基酸外,Ala、Asp、Met、Phe、Tyr、Leu、Trp、Val、Arg、Gly、Orn、Sern、Thr、Pro 共 14 种氨基酸检测结果,召回血片较原血片明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 早产低体质量儿原血片、召回血片结果的比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

氨基酸种类	原血片	召回血片	<i>P</i>
Ala	250.39±156.45	141.52±48.62	0.001
Asp	38.80±22.34	29.39±7.70	0.042
Glu	206.71±68.94	190.47±52.80	0.345
Met	52.75±21.70	23.24±7.09	0.000
Phe	191.49±88.12	45.69±12.76	0.000
Tyr	117.71±56.28	65.80±24.17	0.000
Leu	246.13±94.49	166.44±30.43	0.000
Trp	45.18±20.24	30.68±6.66	0.001
Val	193.33±66.06	109.41±21.76	0.000
Arg	8.61±7.64	5.95±4.52	0.007
Cit	15.35±6.98	14.46±5.37	0.599
Gly	421.03±123.93	222.10±71.24	0.000
Orn	45.70±29.55	28.59±17.13	0.011
Gln	14.85±8.94	21.14±15.72	0.080
His	162.26±87.11	132.96±106.99	0.290
Sern	114.37±66.24	73.20±33.27	0.005
Thr	136.66±36.37	83.41±29.41	0.000
Pro	1014.92±555.17	610.87±251.93	0.001

2.3 新生黄疸患儿和早产低体质量儿原血片 and 召回血片结果比较 新生黄疸患儿和早产低体质量儿原血片有 12 种相同氨基酸水平(Ala、Met、Phe、Tyr、Leu、Trp、Val、Gly、Orn、Sern、Thr、Pro)较召回血片升高($P < 0.05$);新生黄疸患儿原血片中 Gln 及 Arg 水平较早产低质量儿的偏低($P < 0.05$)。见表 1、2。

3 讨 论

人体内氨基酸的病理性代谢异常,会引起相应的氨基酸遗传代谢病,如 Phe、Met、Leu 与 Val、Tyr 等氨基酸病理性异常代谢时,将导致高苯丙氨酸血症、高胱氨酸血症等。

本研究中利用 TMS 分别检测新生黄疸患儿与早产低体质量儿原血片、召回血片中的 18 种氨基酸,通过 *t* 检验分别进行了统计分析。新生黄疸患儿共 38 例,除 Asp、Cit 两种氨基酸两次检测结果差异无统计学意义($P > 0.05$),召回血片中 Ala、Glu、Met、Phe、Tyr、Leu、Trp、Val、Gly、Orn、His、Sern、Thr、Pro 共 14 种氨基酸检测的结果明显降低($P < 0.05$),Arg、Gln 两种氨基酸检测的结果明显升高($P < 0.05$);早产低体质量儿共 46 例,除 Glu、Cit、Gln、His 4 种氨基酸两次检测的结果差异无统计学意义($P > 0.05$)外,召回血片中 Ala、Asp、Met、Phe、Tyr、Leu、Trp、Val、Arg、Gly、Orn、Sern、Thr、Pro 共 14 种氨基酸检测的结果均明显降低($P < 0.05$)。结果表明新生儿黄疸及早产低体质量时期干血滤纸片中多种氨基酸水平升高,利用 TMS 技术筛查氨基酸遗传代谢病时,应结合新生儿病史判断结果。

本研究发现,38 例新生黄疸患儿和 46 例早产低体质量儿原血片中 12 种相同氨基酸水平(Ala、Met、Phe、Tyr、Leu、Trp、Val、Gly、Orn、Sern、Thr、Pro)较召回血片升高($P<0.05$);新生黄疸患儿原血片中 Gln 及 Arg 水平偏低($P<0.05$)。本文对以上氨基酸水平变化的影响因素进行分析,新生儿黄疸能导致不同程度的神经系统损害,同时能引起心、肝、肾等器官的脂质过氧化损伤^[4];早产低体质量儿因机体各器官发育不成熟,机体的正常代谢机制亦尚未完善。原血片中 Ala、Thr、Leu、Val、Tyr、Pro 均明显升高,主要是由于这些氨基酸均与肝脏的受损和修复相关^[5]。肝脏蛋白质分解产生的支链氨基酸如 Val、Leu,经血液运往肌肉,与肌肉的支链氨基酸一起进行分解代谢,脱氨基以合成 Ala。新生黄疸患儿及早产低体质量儿原血片中 Val、Leu 水平明显升高,提示机体可能存在有助于 Ala 生成的机制,而 Ala 对肝脏损伤有很强的修复作用^[6]。因此,新生黄疸患儿及早产低体质量儿血液中 Ala、Thr、Leu、Val、Tyr、Pro 氨基酸水平的升高反映机体处于自我调节从而达到自我修复的状态,待召回复查时,机体处于稳定状态,各种氨基酸的水平相对下降。

Phe、Met、Gly、Orn、Sern、Trp 水平升高考虑是由于新生黄疸患儿及早产低体质量儿肝脏功能发育不完全或肝损伤,其相对应的代谢酶活性低或合成酶不足,正常代谢模式尚未完全建立引起的一过性升高,如 Phe 羟化酶活性轻度延迟,会引起一过性的 Phe 升高^[7]。

此外,研究中发现新生黄疸患儿原干血滤纸片中 Gln 及 Arg 水平明显偏低,主要原因是血清胆红素水平对新生儿免疫功能产生不同程度影响^[8]。胆红素具有细胞毒作用,可导致患儿免疫性淋巴细胞凋亡增加^[9]。新生黄疸患儿肝脏功能不全,Gln 合成酶活性低,Gln 合成不足,且小肠上皮细胞内 Gln 池贮量小,进行蓝光治疗时,机体处于抗氧化的应激状态,谷胱甘肽(GSH)又作为人体内最强的抗氧化剂,肠黏膜细胞将大量摄取 Gln 以合成 GSH,以维持机体的抗氧化作用;新生黄疸患儿肠肝循环的增加时,Gln 能刺激肠道黏膜改善血流状态,肠上皮细胞中 Gln 酶活性升高,增加对 Gln 的利用,以减少肠道的损伤并进行修复。Gln 作为肠道黏膜细胞及各种快速生长细胞的代谢氧化燃料,同时调控许多有关代谢、细胞防卫和细胞修复的基因表达^[10-11],而 Arg 同样具有扩张组织血管,维持血流通畅并调节机体免疫反应的作用^[12]。Gln 及 Arg 作为免疫营养氨基酸,在提供能量的同时增强机体免疫功能、减轻有害或过度的炎性反应、保护肠黏膜屏障功能完整性、促进修复,使机体恢复稳定状态^[13-14]。患儿处于黄疸时期,机体对 Gln 及 Arg 的需求量超过其产出量,从而导致了体内 Gln 及 Arg 水平均处于低水平状态,待召回复查时,黄疸时期已过且机体处于稳定状态,故体内 Gln 及 Arg 含量升高。

由此可见,新生儿黄疸及早产低体质量严重地影响了新生儿多种氨基酸水平变化,实验室对在氨基酸遗传代谢病检测结

果进行判断时,应结合新生儿病史,排除假阳性,从而减轻新生儿筛查工作者的压力及家长的精神负担。

参考文献

- [1] Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport; characteristics, regulation, and metabolic significance[J]. Nutrition, 2002, 18(9): 761-766.
- [2] 王洪允, 江骥, 胡蓓. 串联质谱在新生儿遗传代谢性疾病筛查中的应用[J]. 质谱学报, 2011, 32(1): 24-30.
- [3] 顾学范, 韩连书, 高晓岚, 等. 串联质谱技术在遗传性代谢病高危儿童筛查中的初步应用[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(6): 401-404.
- [4] 黄健瑜, 肖昕. 高胆红素血症新生儿血浆 8-异-前列腺素 F(2 α)水平与心肌酶谱和肝肾功能的相关性[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(2): 121-123.
- [5] Rasul CH, Hasan MA, Yasmin F. Outcome of neonatal hyperbilirubinemia in a tertiary care hospital in Bangladesh[J]. Malays J Med Sci, 2010, 17(2): 40-44.
- [6] Chadalavada R, Biyyani RS, Maxwell J, et al. Nutrition in hepatic encephalopathy[J]. Nutr Clin Pract, 2010, 25(3): 257-264.
- [7] Arnopp JJ, Lorey FW, Currier RJ, et al. Results of screening for phenylketonuria using a lower cutoff value in early collected specimens[J]. Screening, 1995, 3(4): 193-199.
- [8] 纪凤英, 兰鹏华. 光疗对高胆红素血症新生儿细胞免疫状态的影响[J]. 护理实践与研究, 2009, 6(24): 8-10.
- [9] 叶中绿, 沈丹, 柯宇华, 等. 思连康对高胆红素血症新生儿免疫功能和细胞因子水平的影响[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(2): 179-181.
- [10] Chwals WJ. Regulation of the cellular and physiological effects of glutamine[J]. Mini Rev Med Chem, 2004, 4(8): 833-838.
- [11] Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, et al. Molecular mechanisms of glutamine action[J]. J Cell Physiol, 2005, 204(2): 392-401.
- [12] Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010, 13(1): 97-104.
- [13] Calder PC. Immunonutrition in surgical and critically ill patients[J]. Br J Nutr, 2007, 98(Suppl 1): 133-139.
- [14] Santora R, Kozar RA. Molecular mechanisms of pharmacutrients[J]. J Surg Res, 2010, 161(2): 288-294.

(收稿日期: 2014-03-02 修回日期: 2014-05-08)

(上接第 2946 页)

- 遗传资源学报, 2012, 13(5): 830-837.
- [11] 吕建新, 尹一兵. 分子诊断学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 62-63.
 - [12] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18): 9821-9826.

- [13] 朱燕, 武淑兰, 屈晨雪, 等. 限制性内切酶结合竞争聚合酶链反应定量检测在多药耐药基因甲基化状态中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4): 409-411.
- [14] 宋美华, 唐金海, 吴建中, 等. 乳腺癌组织 CCNA1 启动子区甲基化与肿瘤转移的相关性[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1321-1323.

(收稿日期: 2014-02-24 修回日期: 2014-04-12)