Citrin蛋白缺乏所致新生儿肝内胆汁淤积症患儿临床特征及基因分析

刘浩^{1*}, 李春², 李晓文², 余朝文¹, 何晓燕¹, 苗静琨^{1*}

1. 重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014

2. 重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心, 重庆 400014

[摘要] 目的:分析citrin蛋白缺乏所致新生儿肝内胆汁淤积症(NICCD)患儿的临床特征及基因突变特点。方法:回顾性分析2012年9月至2017年12月于重庆医科大学附属儿童医院就诊的30例NICCD患儿和同期诊治的30例特发性新生儿胆汁淤积症(INC)患儿的临床表现、生化指标和目标基因捕获结合高通量测序和桑格-库森法验证结果。结果:NICCD与INC临床表现相似,但圆胖脸和陶土便在NICCD患儿中更为常见(均 $P<0.01$)。NICCD组血糖、前白蛋白、白蛋白、总蛋白、纤维蛋白原、转氨酶水平较INC组低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而间接胆红素、总胆汁酸、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶、血氨、甲胎蛋白、凝血功能标志物较INC组均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);INC组血氨基酸水平多在正常值范围内,而NICCD组血瓜氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、精氨酸及苏氨酸水平均升高(均 $P<0.01$);INC组尿有机酸轻度升高或正常,而NICCD组尿4-羟基苯乳酸、4-羟基苯丙酮酸及苯乳酸浓度显著升高(均 $P<0.01$)。NICCD组均存在SLC25A13突变,其中8例为纯合突变,9例为复合杂合突变,13例为单位点突变,以c. 851_854del(53.19%)最常见,同时发现2个新的致病性突变c. 1196T>A和c. 919G>T。结论:对于新生儿肝内胆汁淤积症并伴有圆胖脸、陶土便的患儿应警惕NICCD,血氨、甲胎蛋白、瓜氨酸以及尿4-羟基苯乳酸、4-羟基苯丙酮酸、苯乳酸水平升高可为临床诊断提供重要依据,目标基因捕获结合高通量测序对其诊断及鉴别诊断具有重要价值。

[关键词] 胆汁淤积, 肝内; 新生儿; Citrin蛋白缺乏; 血氨基酸; 尿有机酸; 高通量测序
[中图分类号] R722.11; R596 **[文献标志码]** A

Clinical characteristics and genetic analysis of neonatal

收稿日期:2021-05-11 接受日期:2021-08-01

基金项目:重庆医科大学附属儿童医院转化医学/疑难罕见病专项(20127000020);重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2019jacy-msxmX0249)

第一作者:刘浩,主管技师,主要从事遗传代谢病发病机制及诊断研究;E-mail:1320904@qq.com;https://orcid.org/0000-0003-4649-116X

通信作者:苗静琨,副主任医师,主要从事遗传代谢病发病机制及诊治研究;E-mail:jennamiao@aliyun.com;https://orcid.org/0000-0002-1063-7959

*现在重庆市妇幼保健院新生儿疾病筛查中心工作

intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency in comparison with idiopathic neonatal cholestasis

LIU Hao¹, LI Chun², LI Xiaowen², YU Chaowen¹, HE Xiaoyan¹, MIAO Jingkun¹

(1. Center for Clinical Molecular Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China; 2. Department of Neonatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Corresponding author: MIAO Jingkun, E-mail: jennamiao@aliyun.com, <https://orcid.org/0000-0002-1063-7959>

[**Abstract**] **Objective:** To compare the clinical and genetic characteristics of patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD) and idiopathic neonatal cholestasis (INC). **Methods:** The clinical data of 30 patients with NICCD and 30 patients with INC admitted in Children's Hospital of Chongqing Medical University during September 2012 and December 2017 were retrospectively analyzed. The clinical manifestations, biochemical indicators and genetic characteristics were compared between two groups. **Results:** Patients in both groups presented similar clinical manifestations, however the chubby face and clay-colored stool were more common in NICCD patients (both $P < 0.01$). Comparing with INC group, NICCD group showed significantly decreased blood levels of glucose, prealbumin, albumin, total protein, fibrinogen, and aminotransferases ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while significantly increased blood levels of indirect bilirubin, total bile acid, alkaline phosphatase, lactic dehydrogenase, ammonium, alpha fetoprotein, and markers of coagulation function ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In addition, NICCD patients showed remarkably increased blood levels of citrulline, methionine, tyrosine, arginine, and threonine; as well as significantly increased urine levels of 4-hydroxyphenyllactic acid, 4-hydroxyphenylpyruvic acid and phenyllactic acid, while those indicators in INC patients were normal (all $P < 0.01$). All the patients with NICCD had *SLC25A13* mutation including 8 homozygotes, 9 compound heterozygotes, and 13 single heterozygotes. Among all mutations, c.851_854del was most common (53.19%), c.1196T>A and c.919G>T were two novel mutations. **Conclusions:** The manifestations of chubby face and clay-colored stool may provide clue for early diagnosis of NICCD along with the elevated biochemical parameters, such as ammonium, alpha-fetal protein, citrulline in blood and 4-hydroxyphenyllactic acid, 4-hydroxyphenylpyruvic acid, phenyllactic acid in urine. Target gene trapping and high-throughput sequencing have the key values in diagnosis and differential diagnosis of NICCD.

[**Key words**] Cholestasis, intrahepatic; Newborn; Citrin deficiency; Blood amino acid; Urine organic acid; High-throughput sequencing

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(4): 506-513.]

[**缩略语**] 特发性新生儿胆汁淤积症(idiopathic neonatal cholestasis, INC); citrin蛋白缺乏所致新生儿肝内胆汁淤积症(neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin

deficiency, NICCD); 美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)

新生儿胆汁淤积性黄疸是一种临床上十分常见的疾病,常见的病因有胆道闭锁、感染及遗传代谢病等^[1]。没有明确病因的新生儿胆汁淤积性黄疸即为INC^[2]。遗传代谢病引起新生儿胆汁淤积性黄疸最常见的原因因为NICCD。NICCD主要在新生儿期或婴儿期发病,以黄疸、肝大、肝功能异常和生长发育落后为主要表现^[3]。然而,这些临床表现并不具有特异性,NICCD的诊断和鉴别诊断仍需要生化检查和基因分析,否则容易误诊。本文以30例NICCD患儿为研究对象,分析其临床表现、生化指标和基因突变特点,并与INC患儿进行比较,以期为该病的精准诊疗提供思路。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2012年9月至2017年12月在重庆医科大学附属儿童医院经串联质谱法和/或分子诊断技术确诊的30例NICCD患儿的临床资料。诊断依据:①临床表现为黄疸迁延不愈;②串联质谱法检测结果显示血瓜氨酸超过40 $\mu\text{mol/L}$;③气相质谱法结果显示尿4-羟基苯乳酸、4-羟基苯丙酮酸显著升高;④基因检测发现*SLC25A13*致病性突变。至少符合①+②+④者考虑NICCD诊断^[4]。

收集同期诊治的INC患儿67例,采用简单随机抽样法,以随机号码表抽取其中30例作为对照组。INC的诊断依据美国儿科学会推荐的标准:①总胆红素低于85 $\mu\text{mol/L}$ 且直接胆红素超过17 $\mu\text{mol/L}$,或总胆红素超过85 $\mu\text{mol/L}$ 且直接胆红素所占比例超过20%,起病年龄小于1岁者;②超声、CT检查排除胆道闭锁等肝外胆管病变,免疫或分子病原体检测排除常见感染(巨细胞病毒、EB病毒、微小病毒B19、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、呼吸道常见病原体等感染),遗传代谢性肝病相关基因检测排除遗传性疾病者^[5]。

患儿监护人签署知情同意书,研究方案经重庆医科大学附属儿童医院学术伦理委员会批准(2021078)。

1.2 临床资料收集

收集的临床资料主要包括:性别、起病年龄、就诊年龄、粪便颜色、黄疸、肝大、脾大、生长发育

情况、出生史、静脉营养史、家族史及辅助检查结果(血糖、胆红素、胆汁酸、天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶、甲胎蛋白、碱性磷酸酶、血氨基酸和尿有机酸等)。

1.3 串联质谱法检测血氨基酸

于入院疾病发作期间,采集患儿末梢血或足跟血3滴,滴于Whatman 302滤纸片上,置于常温下自然干燥后送至实验室。干血斑标本经含有氨基酸同位素内标的有机溶剂萃取后,采用串联质谱仪API3200(美国AB SCIEX公司)进行氨基酸分析。

1.4 气相质谱法检测尿有机酸

于入院疾病发作期间,采集患儿新鲜随机尿液,取适当尿液经尿素酶分解尿素与盐酸羟胺腈化后用乙酸乙酯进行萃取,离心后取上层有机相,氮气吹干,加入100 μL 双(三甲基硅基)三氟乙酰胺80 $^{\circ}\text{C}$ 衍生30 min后,采用气相质谱仪GCMS-QP2010(日本岛津公司)进行分析。

1.5 目标基因捕获结合高通量测序检测突变基因

于住院期间,用乙二胺四乙酸抗凝管采集患儿外周全血2 mL,用QIAamp DNA Mini试剂盒(德国Qiagen公司)提取患儿全基因组DNA,建立含有与遗传代谢病相关的249个基因(*SLC25A13*、*JAG1*、*NOTCH2*、*ABCB4*、*ABCB11*、*ATP8B1*、*TJP2*等)外显子组文库,采用Illumina HiSeq 2000(美国Illumina公司)测序仪由北京迈基诺基因科技股份有限公司进行测序。通过dbSNP数据库、千人基因组(1000 Genomes)数据库、基因组突变频率数据库(gnomAD)、人类基因突变数据库及国内外文献数据库中检索检出的基因突变,并根据ACMG联合分子病理协会提出的“序列变异解读标准和指南”判断突变的性质。

1.6 桑格-库森法验证突变基因

采用全血DNA小量试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司)提取患儿及其父母的全血DNA。根据靶向外显子测序结果,用长片段高保真PCR分别扩增患儿及其父母*SLC25A13*等突变基因序列。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳切胶纯化后使用终止子循环测序方法在ABI PRISM 3730遗传分析仪(美国Applied Biosystems公司)上纯化并测

序。通过将DNA序列与相应的基因库参考序列进行比较来鉴定突变位点。

1.7 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,正态分布的计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用*t*检验;偏态分布的计量资料用中位数(上下四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示,组间比较用秩和检验;计数资料用例数(百分率)[$n(\%)$]表示,组间比较用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NICCD组与INC组临床特征比较

NICCD组与INC组性别构成、分娩孕周、起病年龄、低出生体重儿比例差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。NICCD组超过一半患儿出现圆胖脸症状,三分之一患儿出现陶土便,而INC组没有出现圆胖脸症状,仅1例患儿出现陶土便,差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。两组黄疸、肝大、脾大、腹泻等发生率差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。见表1。结果提示,NICCD与INC临床表现相似,但圆胖脸和陶土便在NICCD患儿中更为常见。

2.2 NICCD组与INC组常规生化检查结果比较

NICCD组和INC组生化指标均有明显异常。NICCD组血糖、前白蛋白、白蛋白、总蛋白、纤维蛋白原、转氨酶水平较INC组低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而间接胆红素、总胆汁酸、碱性磷酸酶、血氨、甲胎蛋白、凝血功能标志物均较INC组升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见表2。结果提示,NICCD与INC生化指标谱的变化存在差异。

2.3 NICCD组与INC组血氨基酸和尿有机酸水平比较

INC组血氨基酸水平多在正常值范围内,而NICCD组血瓜氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、精氨酸及苏氨酸的水平升高(均 $P<0.01$);INC组尿有机酸轻度升高或完全正常,而NICCD组尿4-羟基苯丙酮酸、4-羟基苯乳酸及苯乳酸水平均升高(均 $P<0.01$),见表3。结果提示,与INC患儿相比,NICCD患儿血氨基酸和尿有机酸代谢明显异常。

2.4 NICCD组与INC组基因检测结果比较

30例NICCD患儿均检出SLC25A13基因突变,且经验证发现突变均来自患儿的父亲或母亲,包括8例纯合突变、9例复合杂合突变,其余13例为单位点突变;共检出12种突变类型,其中c.851_854del是最常见的突变类型,占53.19%,IVS16ins3kb次之,占10.64%;发现2个新的突变位点,分别为c.919G>T(p.E307X)和c.1196T>A(p.L399X)。见表4。根据ACMG联合分子病理协会提出的“序列变异解读标准和指南”,2个新无义突变均判断为可能致病。INC组患儿基因检测未发现与遗传代谢病相关的249个基因的致病性突变。

3 讨 论

NICCD与INC的临床症状相似,往往需要鉴别诊断。本文对两组患儿的起病年龄和临床症状进行比较,发现圆胖脸和陶土便在NICCD患儿中更常见,而在INC患儿十分少见,具有一定的特征性。Chen等^[6]的研究同样发现通过NICCD患儿脸

表 1 NICCD组与INC组临床资料比较
Table 1 Clinical data of NICCD group and INC group

组 别	<i>n</i>	[<i>n</i> (%)或 $M(Q_1, Q_3)$]				
		男 性	分娩孕周	起病年龄(d)	低出生体重儿	黄 疸
NICCD组	30	22(73.3)	39 ⁺³ (37 ⁺³ ,41 ⁺¹)	23(16,32)	4(13.3)	30(100.0)
INC组	30	20(66.7)	39 ⁺⁴ (37 ⁺³ ,41 ⁺²)	25(16,35)	2(6.7)	30(100.0)
χ^2/U 值	—	0.317	0.328	0.319	0.741	0.000
<i>P</i> 值	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
组 别	<i>n</i>	腹 泻	肝 大	脾 大	圆胖脸	陶土便
NICCD组	30	6(20.0)	17(56.7)	16(53.3)	16(53.3)	10(33.3)
INC组	30	4(13.3)	9(30.0)	15(50.0)	0(0.0)	1(3.3)
χ^2/U 值	—	0.480	4.344	0.067	21.818	9.017
<i>P</i> 值	—	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01

“—”:无相关数据. NICCD:citrin蛋白缺乏所致新生儿肝内胆汁淤积症;INC:特发性新生儿胆汁淤积症.

表2 NICCD组与INC组生化检查结果比较

Table 2 Biochemical characteristics of NICCD group and INC group

(x̄ ± s)								
组别	n	血糖 (mmol/L)	总胆红素 (μmol/L)	直接胆红素 (μmol/L)	间接胆红素 (μmol/L)	总胆汁酸 (μmol/L)	前白蛋白 (g/L)	白蛋白 (g/L)
NICCD组	30	3.3 ± 1.8	168 ± 58	85 ± 44	77 ± 50	222 ± 89	66 ± 24	32 ± 7
INC组	30	4.7 ± 1.7	146 ± 52	94 ± 43	43 ± 29	151 ± 81	109 ± 35	40 ± 6
正常值	—	3.90~5.90	2.00~17.00	0.00~6.00	0.00~20.00	172.00~368.00	172.00~368.00	35.00~55.00
t值	—	2.661	1.725	0.724	3.238	3.685	3.685	3.653
P值	—	<0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
组别	n	总蛋白 (g/L)	球蛋白 (g/L)	丙氨酸转氨酶 (U/L)	天冬氨酸转氨酶 (U/L)	碱性磷酸酶 (g/L)	乳酸 (mmol/L)	血氨 (μmol/L)
NICCD组	30	47 ± 10	16 ± 4	62 ± 41	140 ± 72	969 ± 435	4.4 ± 2.2	64 ± 36
INC组	30	57 ± 8	17 ± 7	188 ± 155	280 ± 266	504 ± 235	4.3 ± 2.4	45 ± 19
正常值	—	65.00~85.00	20.00~40.00	<40.00	<40.00	45.00~500.00	0.70~2.10	9.00~33.00
t值	—	3.694	0.737	3.865	2.784	3.311	0.369	2.587
P值	—	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05
组别	n	甲胎蛋白 (ng/mL)	凝血酶原时间 (s)	活化部分凝血 酶原时间(s)	凝血酶时间 (s)	纤维蛋白原 (g/L)	D-二聚体 (μg/L)	
NICCD组	30	14 450 ± 1378	17.4 ± 4.7	67 ± 39	23.8 ± 4.0	0.9 ± 0.4	16.0 ± 3.4	
INC组	30	3085 ± 682	12.4 ± 2.0	40 ± 10	18.7 ± 2.8	1.9 ± 0.7	1.8 ± 1.3	
正常值	—	0.00~363.00	10.00~14.00	29.00~60.00	15.00~20.00	0.82~3.38	0.58~2.74	
t值	—	2.461	3.727	3.230	3.973	3.847	2.066	
P值	—	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	

“—”:无相关数据。NICCD:citrin蛋白缺乏所致新生儿肝内胆汁淤积症;INC:特发性新生儿胆汁淤积症。

表3 NICCD组与INC组血氨基酸和尿有机酸水平比较

Table 3 Blood amino acids and urinary organic acids levels in NICCD group and INC group

[x̄ ± s或M(Q ₁ , Q ₃)]									
组别	n	瓜氨酸*	甲硫氨酸*	酪氨酸*	精氨酸*	苏氨酸*	4-羟基苯丙酮酸	4-羟基苯乳酸	苯乳酸
NICCD组	30	238 ± 180	141 ± 124	118 ± 84	63 ± 46	130 ± 57	69.53 (3.90, 207.61)	819.30 (296.20, 2340.10)	13.2 ± 7.7
INC组	30	23 ± 11	37 ± 14	68 ± 31	21 ± 14	61 ± 26	0.03 (0.00, 0.60)	1.95 (1.10, 8.70)	1.9 ± 1.5
正常值	—	7~40	8~35	20~100	1.5~25.0	20~100	0.0~0.9	0.0~7.0	0.0~4.9
t/U值	—	3.782	3.843	3.038	2.873	3.814	3.460	5.472	3.725
P值	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

“—”:无相关数据。*单位:μmol/L。NICCD:citrin蛋白缺乏所致新生儿肝内胆汁淤积症;INC:特发性新生儿胆汁淤积症。

部特征数据计算出的圆胖脸指数与健康新生儿有显著差异,而该症状的出现可能与脂肪合成及分解代谢异常有关。陶土便通常是由于胆道梗阻、胆汁排泄障碍引起,NICCD患儿肝脏摄取和排泄功能受损严重时,粪便可呈陶土色,而当肝脏摄取和排泄功能好转时,症状缓解^[7]。研究显示,citrin蛋白缺乏可影响肝细胞能量产生,造成肝细胞能量缺乏,而肝细胞能量缺乏将影响胆小管膜上腺

苷三磷酸依赖性载体蛋白的功能,致使胆汁酸、卵磷脂、胆固醇和胆红素等胆汁成分的跨膜转运不畅,最终形成胆汁淤积^[8]。NICCD患儿出现陶土便可能与此机制相关。因此,圆胖脸和陶土便可作为NICCD早期鉴别诊断的依据。

NICCD患儿和INC患儿的生化指标均有明显异常,但并不完全一致。Wang等^[9]对NICCD患儿与INC患儿的生化指标进行比较发现,两组患儿

表 4 30例NICCD患儿SLC25A13基因突变分析
Table 4 SLC25A13 gene mutations in 30 patients with NICCD

基因突变	氨基酸改变	突变类型	频 率	百分比(%)
c. 851_854del	p. M285Pfs*2	缺失	25	53. 19
IVS16ins3kb	p. A584fs585X	插入	5	10. 64
c. 1638_1660dup23	p. A554fsX570	重复	3	6. 38
c. 1660-1661insGAGATTACAGGTGGCTGCCCCGGG	P. A554fs	错义	3	6. 38
c. 615+5G>A	splicing	剪接	3	6. 38
c. 1177+1G>A	splicing	剪接	2	4. 26
c. 2T>C	p. M1T	错义	1	2. 13
c. 754G>A	p. E252K	错义	1	2. 13
c. 919G>T	p. E307X	无义	1	2. 13
c. 1095delT	p. F365fs	缺失	1	2. 13
c. 1051G>A	p. D351N	无义	1	2. 13
c. 1196T>A	p. L399X	无义	1	2. 13
合 计	—	—	47	100. 00

“—” :无相关数据. NICCD:citrin蛋白缺乏所致新生儿肝内胆汁淤积症.

的直接胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶均升高,其中INC组的直接胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶水平高于NICCD组;NICCD组的总蛋白、白蛋白、葡萄糖低于INC组,本文资料与其一致。此外,本文资料NICCD患儿的前白蛋白、碱性磷酸酶、纤维蛋白原水平低于INC患儿,而总胆红素、间接胆红素、总胆汁酸、血氨、甲胎蛋白及凝血功能水平升高。这些结果提示,NICCD患儿肝脏蛋白合成、糖代谢、胆红素代谢及凝血功能受损更明显,可能与citrin蛋白缺乏导致的细胞代谢障碍与氧化/还原稳态失调有关^[10-11]。在一系列生化指标中,两组患儿血氨和甲胎蛋白差异更明显,特别是甲胎蛋白,NICCD患儿的甲胎蛋白浓度均大于10 000 ng/mL,INC患儿的甲胎蛋白浓度虽也有升高,但升高不如NICCD患儿明显,仅3000 ng/mL左右,因此甲胎蛋白可作为鉴别NICCD与INC的重要指标之一。甲胎蛋白升高在婴幼儿肝病中较常见,但其具体原因并未明确,可能与肝细胞的毒性损伤有关^[12]。

串联质谱法检测血氨基酸结果显示,NICCD患儿血瓜氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、精氨酸水平增高,以瓜氨酸升高最明显,而INC患儿的氨基酸无明显变化,提示瓜氨酸可作为鉴别这两种疾病的重要指标。Saheki等^[13]也提出血氨、瓜氨酸、精氨酸等可作为诊断NICCD的重要生化指标。Citrin蛋白缺乏时细胞质中天冬氨酸不足,导致与瓜氨酸

合成精氨琥珀酸减少,引起瓜氨酸的蓄积。本文资料中,NICCD患儿的起病年龄大于或等于16 d,最迟为32 d,其中有3例患儿在出生3~7 d进行了串联质谱法筛查,而当时的血瓜氨酸浓度均在正常范围,提示串联质谱法筛查NICCD可能漏筛。Shigetomi等^[14]对60万名日本新生儿进行筛查后,采用瓜氨酸浓度40 μmol/L为切值,仅发现1例NICCD患儿,80%的患儿被漏筛;唐诚芳等^[15]对15万名中国新生儿进行筛查,采用瓜氨酸浓度30 μmol/L为切值,仅发现3例NICCD患儿。在东亚人群中,NICCD的携带率高达1/41,其发病率约为1/17 000,远高于筛查阳性率^[16],可能与瓜氨酸升高延迟导致漏检有关。

气相质谱法检测尿有机酸发现,NICCD患儿尿4-羟基苯乳酸、4-羟基苯丙酮酸及苯乳酸均增高,这可能与肝脏中苯丙氨酸与酪氨酸的分解代谢增强有关,而INC患儿的这些指标仅轻度升高或完全正常。这提示4-羟基苯乳酸、4-羟基苯丙酮酸及苯乳酸可能是鉴别NICCD与INC的重要指标。4-羟基苯乳酸和4-羟基苯丙酮酸水平升高除了可见于NICCD之外,也常见于半乳糖血症、酪氨酸血症或早产儿一过性的酪氨酸血症^[17]。此外,一些肝功能不全或肝功能损害的患儿尿4-羟基苯乳酸及4-羟基苯丙酮酸水平也可能升高。因此,尿有机酸分析并非十分特异,需要结合临床症状与其他实验结果才能做出准确诊断。

高通量测序通量大、特异性好,在分子生物学研究及疾病诊断方面发挥着重要作用。王美娟等^[18]采用高通量测序对临床NICCD疑似患儿进行基因分析,发挥重要诊断作用;Lin等^[19]采用串联质谱法联合基因分析对新生儿NICCD进行筛查,大大提高了诊断效能。NICCD呈常染色体隐性遗传,由*SLC25A13*突变所致。*SLC25A13*位于7号染色体7q21.3,由18个外显子组成,全长约200 kb,编码线粒体内钙结合天冬氨酸/谷氨酸载体蛋白,即citrin蛋白。不同种族之间*SLC25A13*突变存在明显的遗传异质性^[20-21]。迄今已报道106种突变,多为点突变、插入突变及缺失突变^[22]。本研究利用目标序列捕获结合高通量测序,分析了30例患儿的249个相关基因,发现均有*SLC25A13*突变,其中最常见类型为c. 851_854del,其次为IVS16ins3kb,结果与国内其他研究相似,提示c. 851_854del可能为中国人热点突变^[23]。本文资料中的患儿有13例为单个外显子突变,根据以往报道^[24],结合患儿典型的临床症状及生化异常,可诊断为NICCD;而INC患儿均未发现相关基因突变。本研究所采用的高通量测序主要针对靶基因的外显子序列,并未分析启动子或增强子区域。*SLC25A13*的启动子包含一个CCAAT盒与2个GC盒,启动子缺失分析发现ATG上游区域-221至-1对维持启动子活性具有关键性作用,CCAAT盒和GC盒的突变能显著影响细胞citrin蛋白的表达^[25]。肝细胞中,转录因子USF1与FOXA2能与近端启动子区(-442 bp至-19 bp)与增强子区(-968 bp至-768 bp)结合促进*SLC25A13*的表达^[26]。美国国家生物技术信息中心于2018年更新了8个启动子区域突变(-10至-160)。因此,推测单位点突变的患儿可能是由于*SLC25A13*启动子区域存在突变,下一步我们将深入研究这13例患儿的*SLC25A13*启动子或增强子区域。

此外,本文资料中*SLC25A13*有2个新突变:c. 919G>T和c. 1196T>A,其中c. 1196T>A未见报道,c. 919G>T仅报道于头颈部鳞癌中且人群分布频率低^[27]。两个新突变均为对蛋白质结构功能影响较大的无义突变,可导致信使RNA翻译时氨基酸编码提前终止。c. 919G>T突变使citrin蛋白在第307位氨基酸转录时终止,由正常的675个氨基酸缩短为306个氨基酸;c. 1196T>A突变使citrin蛋白在399位氨基酸在转录时终止,缩短为398个氨

基酸。正常citrin蛋白氨基端结合钙离子的4个EF手型结构域和羧基端6个线粒体跨膜域是其主要的功能域,在第307与399位氨基酸之后有对citrin蛋白结构至关重要的多个线粒体跨膜域,说明两种突变对蛋白质功能影响巨大。根据ACMG联合分子病理协会提出的“序列变异解读标准和指南”,这两个突变均为可能致病性突变。结合患儿的临床表现和生化指标异常,提示这两个突变已影响citrin蛋白的功能。

综上所述,对于临床不明原因胆汁淤积性黄疸,且延迟不退或退而复现的患儿,同时伴有圆脸和陶土便时,须高度警惕NICCD;甲胎蛋白、血氨、血氨基酸、尿有机酸等生化指标的升高可为NICCD的诊断和鉴别诊断提供参考;高通量测序对NICCD的确诊有重要价值。

志 谢 感谢刘晶莹同学和陈启雄医师在资料整理中提供帮助

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] ANANTH R. Neonatal cholestasis: a primer of selected etiologies[J/OL]. *Pediatr Ann*, 2018, 47(11): e433.
- [2] MCKIERNAN P J. Neonatal cholestasis[J]. *Semin Neonatol*, 2002, 7(2): 153-165.
- [3] NUMAKURA C, TAMIYA G, UEKI M, et al. Growth impairment in individuals with citrin deficiency[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2019, 42(3): 501-508.
- [4] SAHEKI T, SONG Y Z. Citrin deficiency-Gene reviews®[M/OL]. (2017-08-10)[2021-02-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1181/>.
- [5] MOYER V, FREESE D K, WHITTINGTON P F, et al. Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2004, 39(2): 115-128.
- [6] CHEN H W, CHEN H L, NI Y H, et al. Chubby face and the biochemical parameters for the early diagnosis of neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008, 47(2): 187-192.
- [7] YANG C H, CHEN C Y, CHOU Y Y, et al. Bile acid profiles in neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 475: 28-35.
- [8] 宋元宗. Citrin缺陷导致的新生儿肝内胆汁淤积症发病机制和治疗策略: 聚焦胆总管膜载体蛋白[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2018, 33(19): 1447-1450.

- SONG Yuanzong. Pathophysiologic and therapeutic insights into neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: focusing on the canalicular transporters[J]. **Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics**, 2018, 33(19): 1447-1450. (in Chinese)
- [9] WANG J S, WANG X H, ZHENG Y J, et al. Biochemical characteristics of neonatal cholestasis induced by citrin deficiency[J]. **World J Gastroenterol**, 2012, 18(39): 5601-5607.
- [10] HAYASAKA K. Metabolic basis and treatment of citrin deficiency[J]. **Jrnl Inher Metab Disca**, 2021, 44(1): 110-117.
- [11] SAHEKI T, KOBAYASHI K, IJIMA M, et al. Pathogenesis and pathophysiology of citrin (a mitochondrial aspartate glutamate carrier) deficiency [J]. **Metab Brain Dis**, 2002, 17(4): 335-346.
- [12] WU J T, BOOK L, SUDAR K. Serum alpha fetoprotein (AFP) levels in normal infants[J]. **Pediatr Res**, 1981, 15(1): 50-52.
- [13] SAHEKI T, KOBAYASHI K. Mitochondrial aspartate glutamate carrier (citrin) deficiency as the cause of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and idiopathic neonatal hepatitis (NICCD)[J]. **J Hum Genet**, 2002, 47(7): 333-341.
- [14] SHIGETOMI H, TANAKA T, NAGAO M, et al. Early detection and diagnosis of neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency missed by newborn screening using tandem mass spectrometry[J]. **Int J Neonatal Screen**, 2018, 4(1): 5.
- [15] 唐诚芳, 刘思迟, 冯 毅, 等. 希特林蛋白缺乏症新生儿早期血氨基酸谱特征及新生儿筛查评估[J]. **中华儿科杂志**, 2019, 57(10): 797-801.
- TANG Chengfang, LIU Sichi, FENG Yi, et al. Newborn screening program and blood amino acid profiling in early neonates with citrin deficiency[J]. **Chinese Journal of Pediatrics**, 2019, 57(10): 797-801. (in Chinese)
- [16] BYLSTRA Y, KUAN J L, LIM W K, et al. Population genomics in South East Asia captures unexpectedly high carrier frequency for treatable inherited disorders[J]. **Genet Med**, 2019, 21(1): 207-212.
- [17] FERNBACH S A, SUMMONS R E, PEREIRA W E, et al. Metabolic studies of transient tyrosinemia in premature infants[J]. **Pediatr Res**, 1975, 9(4): 172-176.
- [18] 王美娟, 钟雪梅, 马 昕, 等. 婴儿肝内胆汁淤积症患儿的临床特征及基因分析[J]. **中国当代儿科杂志**, 2021, 23(1): 91-97.
- WANG Meijuan, ZHONG Xuemei, MA Xin, et al. Clinical characteristic and gene variants of patients with infantile intrahepatic cholestasis [J]. **Chinese Journal of Contemporary Pediatrics**, 2021, 23(1): 91-97. (in Chinese)
- [19] LIN Y, LIU Y, ZHU L, et al. Combining newborn metabolic and genetic screening for neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency[J]. **Jrnl Inher Metab Disca**, 2020, 43(3): 467-477.
- [20] WOO H I, PARK H D, LEE Y W. Molecular genetics of citrullinemia types I and II [J]. **Clin Chim Acta**, 2014, 431: 1-8.
- [21] LIN W X, ZENG H S, ZHANG Z H, et al. Molecular diagnosis of pediatric patients with citrin deficiency in China: *SLC25A13* mutation spectrum and the geographic distribution[J]. **Sci Rep**, 2016, 6(1): 29732.
- [22] OH S H, LEE B H, KIM G H, et al. Biochemical and molecular characteristics of citrin deficiency in Korean children[J]. **J Hum Genet**, 2017, 62(2): 305-307.
- [23] SONG Y Z, ZHANG Z H, LIN W X, et al. SLC25A13 gene analysis in citrin deficiency: sixteen novel mutations in East Asian patients, and the mutation distribution in a large pediatric cohort in China[J/OL]. **PLoS One**, 2013, 8(9): e74544.
- [24] 乐 鑫, 熊小丽, 赵培伟, 等. Citrin缺陷所致新生儿肝内胆汁淤积症*SLC25A13*基因突变的分子诊断[J]. **临床儿科杂志**, 2014, 32(4): 312-315.
- YUE Xin, XIONG Xiaoli, ZHAO Peiwei, et al. Molecular diagnosis of *SLC25A13* gene mutation in neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency [J]. **Journal of Clinical Pediatrics**, 2014, 32(4): 312-315. (in Chinese)
- [25] CHEN J L, ZHANG Z H, LI B X, et al. Bioinformatic and functional analysis of promoter region of human *SLC25A13* gene[J]. **Gene**, 2019, 693: 69-75.
- [26] CONVERTINI P, TODISCO S, DE SANTIS F, et al. Transcriptional regulation factors of the human mitochondrial aspartate/glutamate carrier gene, isoform 2 (*SLC25A13*): USF1 as basal factor and FOXA2 as activator in liver cells[J]. **Int J Mol Sci**, 2019, 20(8): 1888.
- [27] DENG J, WENG X, YE J, et al. Identification of the germline mutation profile in esophageal squamous cell carcinoma by whole exome sequencing[J]. **Front Genet**, 2019, 10: 47.

[本文编辑 余 方 刘丽娜]