

不同日龄新生儿血肉碱水平的变化及临床意义

李思平 李思涛 郑静屏 马飞 郝虎 肖昕

528100 佛山市三水区妇幼保健院儿科(李思平、郑静屏);510655 广州,中山大学附属第六医院儿科(李思涛、马飞、郝虎、肖昕)

通信作者:肖昕, Email:txiaoxin1049@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2016.21.010

【摘要】 目的 探讨性别、日龄、胎龄和出生体质量等因素与新生儿血肉碱水平之间的关系,以期为新生儿筛查提供一个参考指标。方法 选取2012年7月至2015年12月在佛山市三水区妇幼保健院和中山大学附属第六医院新生儿科出生的490例新生儿为研究对象,根据出生日龄分为3组,出生1d内为A组(207例),2~3d为B组(153例),4~14d为C组(130例),采集足跟末梢血,用串联质谱技术测定血中游离肉碱(FC)、总脂酰肉碱(AC)和总肉碱(TC)水平,分析性别、日龄、胎龄和出生体质量对上述指标的影响。结果 新生儿血肉中TC和AC水平在出生14d内呈现逐渐递减趋势。A组中性别、胎龄和出生体质量对TC、FC和AC各指标均有影响,男性、早产儿和低收入出生体质量儿高于女性、足月儿和正常出生体质量儿,差异均有统计学意义(P 均 <0.01);C组中胎龄和出生体质量对FC和TC的影响出现了与A组一致的趋势(P 均 <0.01);B组中各影响因素对上述指标的影响,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。结论 新生儿血肉中肉碱水平受日龄、胎龄和出生体质量影响,因此,新生儿筛查时要充分考虑上述因素对血肉中肉碱水平的影响。

【关键词】 总肉碱;游离肉碱;脂酰肉碱;婴儿,新生

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020212133)

Age in days – related variations in neonatal blood carnitine concentrations and its clinical significance Li Si-ping, Li Sitao, Zheng Jingping, Ma Fei, Hao Hu, Xiao Xin

Department of Pediatrics, Women and Children's Hospital of Sanshui District, Foshan 528100, Guangdong Province, China (Li SP, Zheng JP); Department of Pediatrics, the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat – Sen University, Guangzhou 510655, China (Li ST, Ma F, Hao H, Xiao X)

Corresponding author: Xiao Xin, Email:txiaoxin1049@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between neonatal blood carnitine levels and the factors of gender, days after birth gestational age (GA) and birth weight (BW), and to provide some data for routine neonatal metabolic screening. **Methods** A total of 490 neonates from Department of Neonatology, the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat – Sen University and Women and Children's Hospital of Sanshui District, Foshan during the period July 2012 to December 2015 were recruited in this study. They were divided into 3 groups according to days after birth, within 1 day after birth for group A (207 cases), 2 – 3 days for group B (153 cases), 4 to 14 days for group C (130 cases). Then heel peripheral blood were collected. Free carnitine (FC), total acylcarnitines (AC) and total carnitine (TC) concentrations were measured by using tandem mass spectrometry (MS – MS) and then tested for the association between the biomarkers and the factors of gender, days after birth, GA and BW. **Results** Concentrations of TC and AC tapered off from day 1 to day 14. Concentrations of TC, FC and AC were significantly higher in male – preterm – low birth weight infants compared with female – fullterm infants with normal birth weight infants in group A. The differences were statistically significant (all $P < 0.01$). Concentrations of TC and AC had the same trend in GA and BW in group C (all $P < 0.01$). There were no statistically significant difference in group B (all $P > 0.05$). **Conclusions** Neonatal blood carnitine concentrations have negative relationship with age, GA and BW. Therefore, during routine neonatal metabolic screening, full consideration should be given to the factors which may have an important influence on the carnitine levels.

【Key words】 Total carnitine; Free carnitine; Acylcarnitine; Infant, newborn

Fund program: Guangdong Province Science and Technology Plan Projects (2014A020212133)

脂肪酸氧化紊乱是最常见的先天代谢性隐性遗传病之一,主要表现为急性、致命性的昏迷发作和低血糖^[1]。通常情况下,症状是由中间代谢物蓄积引起,其中由脂酰 CoA 与左旋肉碱结合形成的脂酰肉碱具有典型的诊断价值^[2]。新生儿期采用串联质谱技术筛查,很容易做到症状前诊断^[1,3]。对新生儿血肉左旋肉碱和脂酰肉碱筛查的报道已有不少,但受到性别、年龄、胎龄和出生体质量等诸多因素影响,结果差异相当大^[4-7]。目前,

从多因素水平对血肉中左旋肉碱和脂酰肉碱进行研究的报道相对较少。因此,本研究从性别、日龄、胎龄和出生体质量等因素进行研究,以期为新生儿血肉左旋肉碱和脂酰肉碱筛查提供参考指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2012年7月至2015年12月在佛山市三水区妇幼保健院和中山大学附属第六医院新生

儿病房住院的新生儿为研究对象,同时记录其性别、日龄、胎龄和出生体质量。本研究入选标准:(1)早产儿(胎龄 28~36 周出生),无明显产前和产时窒息史,Apgar 评分 ≥ 8 分,血气分析 pH 和乳酸值未见明显异常;(2)足月新生儿(胎龄 37~41 周出生),Apgar 评分 ≥ 8 分,血气分析提示 pH 和乳酸值在正常范围内;(3)所有新生儿(包括早产儿和足月儿)母亲既往无高血压、糖尿病及肾脏疾病等慢性疾病史,无结核、梅毒等感染性疾病史,无营养不良病史,无吸烟、酗酒、吸毒及滥用药物史。剔除标准:(1)后期跟踪证实有先天遗传代谢性疾病或肝肾功能异常的病例;(2)死亡病例。首先根据日龄分组,出生 1 d 内为 A 组,2~3 d 为 B 组,4~14 d 为 C 组,然后根据性别、胎龄、出生体质量和出生体质量与胎龄关系等影响因素进行分析,新生儿基本临床资料和分组见表 1。期间共收集标本 506 例,其中日龄 >14 d 的 9 例,具有相同日龄的均不超过 2 例,不适于统计分析,以及日龄 ≤ 14 d 的 7 例数据存在明显异常,均予以剔除。本研究获得受试新生儿监护人的知情同意,并经佛山市三水区妇幼保健院及中山大学附属第六医院医学伦理委员会批准。

表 1 不同日龄新生儿临床基本资料和分组 (例)

组别	例数	性别		胎龄		出生体质量	
		男	女	早产儿	足月儿	LBW	NBW
A 组	207	127	80	123	84	131	76
B 组	153	93	60	87	66	93	60
C 组	130	69	61	73	57	86	44
χ^2 值		2.560		0.422		0.872	
P 值		0.278		0.810		0.647	

注:以出生后日龄进行分组,1 d 内为 A 组,2~3 d 为 B 组,4~14 d 为 C 组;LBW:低出生体质量;NBW:正常出生体质量 According to age in days after birth, within 1 day after birth for group A, 2-3 days for group B, 4-14 days for group C;LBW:low birth weight;NBW:normal birth weight

1.2 标本采集 空腹状态下,采集新生儿足跟末梢血于血斑采集卡(美国 Whatman 903 号滤纸)上,形成一个直径 1 cm、滤纸两面完全浸透的均匀血斑,室温条件下,平放自然晾干后,于 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 仪器和试剂 3200 QTRAP 高效液相色谱串联质谱

表 2 不同日龄组新生儿 FC、AC、TC 水平和 AC/FC 比值

Table 2 The levels of FC, AC, TC and AC/FC ratio in neonatal blood with different age groups

组别	例数	FC($\mu\text{mol/L}$)	AC($\mu\text{mol/L}$)	TC($\mu\text{mol/L}$)	AC/FC
A 组	207	27.50 \pm 9.54	26.40 \pm 7.42	53.91 \pm 14.63	1.03 \pm 0.31
		25.31(13.44~45.71)	26.55(12.84~38.10)	52.90(30.13~77.19)	1.00(0.57~1.59)
B 组	153	26.01 \pm 9.61	24.18 \pm 7.77	50.19 \pm 14.80	1.01 \pm 0.42
		24.75(12.68~43.20)	23.36(12.43~37.30)	51.01(28.82~70.94)	0.96(0.51~2.01)
C 组	130	21.49 \pm 8.43	21.27 \pm 11.13	42.76 \pm 16.19	1.05 \pm 0.46
		19.54(10.03~40.11)	19.45(10.08~41.96)	40.76(22.43~74.22)	0.93(0.54~1.90)
χ^2 值		35.775	49.993	49.885	2.162
P 值		0.000	0.000	0.000	0.339

注:以出生日龄进行分组,1 d 内为 A 组,2~3 d 为 B 组,4~14 d 为 C 组;FC:游离肉碱;AC:总脂酰肉碱;TC:总肉碱;AC/FC:总脂酰肉碱与游离肉碱比值;每一个代谢产物值第 1 行为 $\bar{x}\pm s$ 、第 2 行为中位数(第 5~95 百分位数) According to age in days after birth, within 1 day after birth for group A, 2-3 days for group B, 4-14 days for group C;FC:free carnitine; AC:total acylcarnitines; TC:total carnitine; AC/FC:AC/FC ratios; for each metabolite values were $\bar{x}\pm s$ in the first line, and median (5th-95th percentiles) in the second line

谱联用仪(Applied Biosystems, 美国),配套设备和分析软件分别为电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)和 ChemoView 1.4.2;美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪。所选试剂纯度均为高效液相色谱级别,包括甲醇、正丁醇、乙酰氯、乙腈和保护氮气。

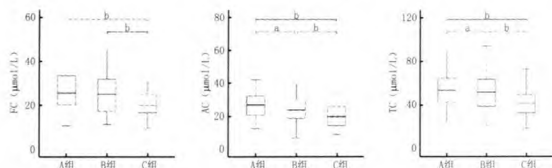
1.4 串联质谱条件 选用色谱柱为瑞典 Kromasil C18 (50.0 mm \times 4.6 mm \times 5.0 μm),采用乙腈水溶液(15.4 mol/L)为流动相,四元泵流速为 1 mL/min,进样量 20 μL /次。采用母离子扫描方式,子离子 m/z 85 Da 片断,母离子扫描范围 m/z 210~m/z 502。

1.5 统计学处理 ABI 数据分析软件 ChemoView 1.4.2 对质谱数据处理,根据各丁酯化脂酰肉碱及其放射性核素内标的离子峰强度,由内标水平,自动计算所测样品脂酰肉碱水平。应用 SPSS 19.0 对数据进行统计分析,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 和中位数(第 5~95 百分位数)表示,运用 Shapiro-Wilk 进行正态性检验,然后采用 Kruskal-Wallis 检验或 Mann-Whitney U 检验进行多样本和两独立样本分析,不同时间组两两比较采用扩展 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血 FC、AC、TC 水平与日龄关系 数据经 Shapiro-Wilk 检验显示非正态分布,然后进行 Kruskal-Wallis 检验,结果见表 2。FC、AC 和 TC 水平在不同日龄组中均数不全相等;AC 和 TC 随日龄增加逐渐降低,差异有统计学意义(P<0.05);FC 虽然在 A 组和 B 组间差异无统计学意义(P>0.05),但二者与 C 组相比,差异均有统计学意义(P 均<0.01),见图 1。

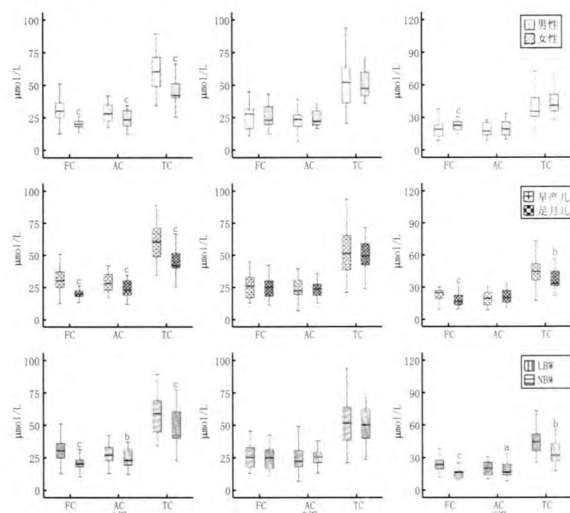
2.2 血 FC、AC、TC 水平与性别、胎龄、出生体质量关系 A 组中性别、胎龄和出生体质量对 FC、AC 和 TC 各指标均有影响,男性、早产儿和低体质量儿高于女性、足月儿和正常体质量儿(P 均<0.01);C 组中胎龄和出生体质量对 FC 和 TC 的影响,出现了与 A 组一致的趋势(P 均<0.01);B 组中,各影响因素对上述指标的影响,差异均无统计学意义(P 均>0.05),见图 2。



注:以出生后日龄进行分组,1 d 内为 A 组,2~3 d 为 B 组,4~14 d 为 C 组;FC:游离肉碱;AC:总脂酰肉碱;TC:总肉碱;^a*P*<0.05, ^b*P*<0.001
According to age in days after birth, within 1 day after birth for group A, 2-3 days for group B, 4-14 days for group C; FC: free carnitine; AC: total acylcarnitines; TC: total carnitine; ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.001

图 1 不同日龄新生儿血 FC、AC、TC 水平随日龄变化特征

Figure 1 The characteristics of alteration in concentrations of neonatal blood TC, AC and FC with different age



注:以出生后日龄进行分组,1 d 内为 A 组,2~3 d 为 B 组,4~14 d 为 C 组;FC:游离肉碱;AC:总脂酰肉碱;TC:总肉碱;LBW:低出生体质量;NBW:正常出生体质量;^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01, ^c*P*<0.001
According to age in days after birth, within 1 day after birth for group A, 2-3 days for group B, 4-14 days for group C; FC: free carnitine; AC: total acylcarnitines; TC: total carnitine; LBW: low birth weight; NBW: normal birth weight; ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01, ^c*P*<0.001 with different age

图 2 不同影响因素对不同日龄新生儿血 TC、AC、FC 水平和 AC/FC 比值影响

Figure 2 The analysis of different factors affected the levels in neonatal blood TC, AC, FC and AC/FC ratio with different age

3 讨论

脂肪酸氧化紊乱是一类超过 20 种以上的先天性常染色体隐性遗传代谢病的总称^[8],世界范围内发病率约为 1/9 000^[9-10]。随着串联质谱技术的发展,国内外大型实验室利用串联质谱技术检测血中肉碱水平,使该类疾病的确诊率有了明显提高^[1,3]。本研究利用串联质谱技术研究性别、日龄、胎龄和出生体质量等影响因素对血中 TC、FC 和 AC 水平的影响,结果发现 TC 和 AC 在出生 14 d 内呈逐渐降低趋势,而且早产儿和低出生体质量儿的 TC 和 FC 水平高于较足月儿和正常出生体质量儿。

以日龄分组研究显示,出生前 14 d,血中 TC 和 AC 水平逐渐减少。有研究显示,适于龄儿出生后 5 d TC 和 AC 水平较脐带血高^[11],但该组随后的研究及最近国内的研究均与本研究相符^[5,12]。较早的研究显示胃肠

外喂养的早产儿需外源肉碱补充^[13-14];进一步研究显示,胎盘能主动代谢血中肉碱和脂酰肉碱并将其转移到胎儿^[15]。因此,结合本研究 and 以往的研究推测,新生儿出生后肉碱水平有一个逐渐降低的过程,伴随自身合成能力逐步增强以及饮食补充的逐步稳定,又呈现一个逐步升高并渐趋稳定的趋势^[5,12]。

男性新生儿 TC、FC 和 AC 水平略高于女性,但差异无统计学意义,这与已有的研究报道一致^[4,7]。目前已发表的研究中有关胎龄对 TC、FC 和 AC 的影响结果尚不一致^[4,7,11-12,16],有研究显示血浆 TC 水平和胎龄无明显关系^[4,7,11],但 Tokuriki 等^[16]的研究结果显示早产儿 FC 水平较足月儿低,而 Meyburg 等^[12]的研究结果显示早产儿 FC 水平较足月儿高,后者与本研究结果一致。出生体质量对各检测指标的影响结果也不一致,有研究显示上述指标与出生体质量呈正相关^[6,11],也有研究显示与出生体质量呈负相关^[7]。研究证实怀孕 3 个月后胎盘才具有转移肉碱进入胎儿血液循环的能力,因此,早产儿有面临肉碱缺失的风险^[14]。同时有研究显示,胎龄相同的低体质量儿骨骼肌摄取肉碱的能力较正常出生体质量儿低^[13]。结合本研究选取的早产儿胎龄均大于 28 周,此时胎盘已经有足够的转运肉碱至胎儿,而无论是在早产儿还是低出生体质量儿,均有存在骨骼肌摄取能力不足的可能,因此,TC 和 FC 会出现较高的水平。

本研究的局限性在于标本主要集中在出生前 14 d,在此年龄段 TC 和 AC 水平显示了很好的逐步递减趋势,那么整个新生儿期趋势是怎样呢?因此,在以后的研究中,需要进一步扩大标本收集的范围,从而保证标本的均衡性。本研究结果也证实新生儿血肉碱水平会受到日龄、胎龄和出生体质量等客观因素影响。此外,不同实验室硬件设备以及操作人员的技能可能也会对检测结果产生影响。因此,对新生儿血肉碱水平筛查分析时,首先应建立本实验室的检测标准;然后,结合临床表现及其他检验指标,有针对性地进行下一步基因或酶学检测,从而区别不同类型的肉碱缺乏,为进行合理有效地早期治疗提供辅助,从而达到早期诊断、早期治疗、减少后遗症的目的。

参考文献

- Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects [J]. Clin Pharmacokinet, 2012, 51 (9): 553-572. DOI: 10.2165/11633940-000000000-00000.
- McCoin CS, Knotts TA, Adams SH. Acylcarnitines-old actors auditioning for new roles in metabolic physiology [J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11 (10): 617-625. DOI: 10.1038/nrendo.2015.129.
- El-Hattab AW. Inborn errors of metabolism [J]. Clin Perinatol, 2015, 42 (2): 413-439. DOI: 10.1016/j.clp.2015.02.010.
- Gucciardi A, Zaramella P, Costa I, et al. Analysis and interpretation of acylcarnitine profiles in dried blood spot and plasma of preterm and full-term newborns [J]. Pediatr Res, 2015, 77 (1/1): 36-47. DOI: 10.1038/pr.2014.142.

- [5] 傅慧青, 高平明, 陆镇奇, 等. 早产小于胎龄儿生后早期血浆游离肉碱变化特点[J]. 中国实用医药, 2015, 10(29): 38-39. DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2015.29.023.
Fu HQ, Gao PM, Lu ZJ, et al. Characteristic of plasma free carnitine changes in small for gestational age preterm in early postnatal period [J]. Chin Pract Med, 2015, 10(29): 38-39. DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2015.29.023.
- [6] 陈大字, 谢莉, 黄丽华, 等. 低出生体重儿游离肉碱的研究及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(19): 3261-3263. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2015.19.53.
Chen DY, Xie L, Huang LH, et al. Effect of free carnitine on low birth weight infant and its clinical significance [J]. Chin J Matern Child Health Care, 2015, 30(19): 3261-3263. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2015.19.53.
- [7] Chace DH, Pons R, Chiriboga CA, et al. Neonatal blood carnitine concentrations: normative data by electrospray tandem mass spectrometry [J]. Pediatr Res, 2003, 53(5): 823-829.
- [8] Vishwanath VA. Fatty acid beta-oxidation disorders: a brief review [J]. Ann Neurosci, 2016, 23(1): 51-55. DOI: 10.1159/000443556.
- [9] Rocha H, Castineiras D, Delgado C, et al. Birth prevalence of fatty acid beta-oxidation disorders in Iberia [J]. JIMD Rep, 2014, 16: 89-94. DOI: 10.1007/8904_2014_324.
- [10] Hassan FA, El-Mougy F, Sharaf SA, et al. Inborn errors of metabolism detectable by tandem mass spectrometry in Egypt: the first newborn screening pilot study [J]. J Med Screen, 2016, 23(3): 124-129. DOI: 10.1177/0969141315618229.
- [11] Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, et al. Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile [J]. Pediatr Res, 2001, 49(1): 125-129. DOI: 10.1203/00006450-200101000-00024.
- [12] Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, et al. Acylcarnitine profiles of preterm infants over the first four weeks of life [J]. Pediatr Res, 2002, 52(5): 720-723. DOI: 10.1203/00006450-200211000-00018.
- [13] Penn D, Ludwigs B, Schmidt-Sommerfeld E, et al. Effect of nutrition on tissue carnitine concentrations in infants of different gestational ages [J]. Biol Neonate, 1985, 47(3): 130-135.
- [14] Shenai JP, Borum PR. Tissue carnitine reserves of newborn infants [J]. Pediatr Res, 1984, 18(7): 679-682.
- [15] Myllynen P, Vähäkangas K. Placental transfer and metabolism: an overview of the experimental models utilizing human placental tissue [J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(1): 507-512. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.08.027.
- [16] Tokuriki S, Hayashi H, Okuno T, et al. Biotin and carnitine profiles in preterm infants in Japan [J]. Pediatr Int, 2013, 55(3): 342-345. DOI: 10.1111/ped.12053.

(收稿日期: 2016-09-19)

(本文编辑: 范艳芬)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

2016 年本刊可直接用缩写的常用词汇

C 反应蛋白 (CRP)	肌酸激酶同工酶 (CK-MB)	室间隔缺损 (VSD)
白细胞 (WBC)	计算机 X 线断层照像术 (CT)	胎牛血清 (FBS)
白细胞介素 (IL)	甲型肝炎病毒 (HAV)	体质量指数 (BMI)
磁共振成像 (MRI)	碱性磷酸酶 (ALP)	脱氧核糖核酸 (DNA)
蛋白质印迹 (Western blot)	静脉用免疫球蛋白 (IVIG)	系统性红斑狼疮 (SLE)
电化学发光 (ECL)	巨细胞病毒 (CMV)	心电图 (ECG)
动脉导管未闭 (PDA)	聚合酶链反应 (PCR)	新生儿重症监护病房 (NICU)
动脉血二氧化碳分压 [$p_a(\text{CO}_2)$]	聚偏二氟乙烯 (PVDF)	血红蛋白 (Hb)
动脉血氧分压 [$p_a(\text{O}_2)$]	磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)	氧气 (O_2)
杜尔伯科极限必需培养基 (DMEM)	磷酸盐缓冲液 (PBS)	一氧化氮 (NO)
儿科重症监护病房 (PICU)	酶联免疫吸附测定 (ELISA)	一氧化碳 (CO)
二氨基联苯胺 (DAB)	脑电图 (EEG)	乙型肝炎病毒 (HBV)
二氧化碳 (CO_2)	尿素氮 (BUN)	乙型肝炎病毒 e 抗体 (抗-HBe)
房间隔缺损 (ASD)	缺氧缺血性脑病 (HIE)	乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg)
辅助性 T 淋巴细胞 (Th)	缺氧缺血性脑损伤 (HIBD)	乙型肝炎病毒表面抗体 (抗-HBs)
干扰素 (INF)	人类白细胞抗原 (HLA)	乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)
核糖核酸 (RNA)	人类免疫缺陷病毒 (HIV)	乙型肝炎病毒核心抗体 (抗-HBc)
红细胞 (RBC)	乳酸脱氢酶 (LDH)	中心静脉压 (CVP)
红细胞沉降率 (ESR)	三酰甘油 (TG)	肿瘤坏死因子 (TNF)
获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)	肾小球滤过率 (GFR)	重症监护病房 (ICU)
肌钙蛋白 I (cTnI)	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	自然杀伤细胞 (NK 细胞)
肌酐 (Cr)	食品与药品管理局 (FDA)	总胆固醇 (TC)
肌酸激酶 (CK)	世界卫生组织 (WHO)	