

• 临床研究 •

液相色谱串联质谱技术在新生儿先天性肾上腺皮质增生症筛查的运用

福建医科大学附属医院 福建省妇幼保健院 (福州 350001) 苏跃青 朱文斌 周进福 陈涵强¹

【摘要】目的 采用液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 技术, 对传统新生儿先天性肾上腺皮质增生症 (CAH) 筛查方法进行改进。**方法** 对 73 例时间分辨荧光法 (TRFIA) 初筛异常的疑似 CAH 患儿, 先用基因分析技术为诊断标准分为 CYP21A2 基因突变患者、携带者和非 CAH21 新生儿, 再用 LC-MS/MS 测定 17-羟孕酮 (17-OHP) 和 21-脱氧皮质醇 (21-DF) 浓度, 最后比较 LC-MS/MS 技术与 TRFIA 法的差异。**结果** 73 例研究对象中, CAH21 患者 6 例, 携带者 9 例, 非 CAH21 新生儿 58 例。LC-MS/MS 法的 17-OHP 浓度 1.65~218.63 ng/mL, 21-DF 浓度 0.112~23.300 ng/mL; 其中, CAH21 患儿的 17-OHP 浓度显著高于携带者或非 CAH21 新生儿 (均 $P<0.001$); 21-DF 浓度: CAH21 患儿 > 携带者 > 非 CAH21 新生儿 (分别 $P<0.001$ 和 $P<0.05$)。Deming 回归和 Bland-Altman 偏差分析: LC-MS/MS 技术与 TRFIA 法检测结果的关联性良好, 但后者明显高于前者。根据 LC-MS/MS 技术检测正常人群上述两指标的参考范围, 前者假阳性 27 例, 为 TRFIA 法 40.30%; 后者假阳性 13 例, 为 TRFIA 法 19.40%。**结论** LC-MS/MS 技术应用对初筛阳性的疑似 CAH 患儿进行原干血片测定 17-OHP 和 21-DF 浓度, 可降低 TRFIA 过高的假阳性率。

【关键词】 LC-MS/MS 技术; 先天性肾上腺皮质增生症; 17-羟孕酮; 21-脱氧皮质醇

【中图分类号】 R722.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)01-0013-03

Application of liquid chromatography tandem mass spectrometry in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia

SU Yueqing, ZHU Wenbin, ZHOU Jinfu, CHEN Hanqiang. Fujian Maternity and Children Health Hospital, Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】Objective To improve newborn screening method for congenital adrenal hyperplasia (CAH21) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method. **Methods** In total, 73 CAH suspects using classical time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) were enrolled and collected their original dry blood samples. CYP21A2 mutations among all participants were assessed as confirmatory tests for CAH21 patients. LC-MS/MS method was used to further measure the 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) and 21-deoxycortisol (21-DF). **Results** Gene analysis confirmed that there were 6 CAH21 patients, 9 carriers and 58 newborns of none CYP21A2 mutation in 73 CAH suspects. The concentrations of 17-OHP and 21-DF in all participants using LC-MS/MS were range from 1.65 ng/mL to 218.63 ng/mL and 0.112 ng/mL to 23.300 ng/mL, respectively. Comparing with carriers or newborns of none CYP21A2 mutation, the 17-OHP in CAH patients increased significantly (both $P<0.001$). Whereas, concentration of 21-DF in CAH patients > mutation carriers > CAH21 negative newborns ($P<0.001$ and $P<0.05$, respectively). Deming regression analysis method and Bland-Altman plot showed that there was a good correlation in 17-OHP concentrations between using LC-MS/MS and using TRFIA. According the reference range of 17-OHP and 21-DF by LC-MS/MS in normal newborns, 40.30% and 19.40% of false-positive results were remained, compared with that by TRFIA, respectively. **Conclusion** Additional test of 17-OHP and 21-DF in original dried blood spots of newborns who have a positive initial screening using LC-MS/MS method are effective to reduce the ratio of false positive.

【Key words】 LC-MS/MS method; congenital adrenal hyperplasia; 17-hydroxyprogesterone; 21-deoxycortisol

超过 90% 先天性肾上腺皮质增生症 (congenital adrenal hyperplasia, CAH) 是 CYP21A2 基因突变导致 21-羟化酶缺陷 (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD) 引起, 称为 CAH21^[1]。有效的实验室筛查是 CAH21 患儿及时诊治, 避免成年后生殖能力受损, 甚至新生儿期因低血压及失盐危象导致死亡的关键。目前, 国内外多数实验室采用免疫学方法检测 17-羟孕酮 (17-OHP) 单项指标进行 CAH 初筛; 但由于新生儿 17-OHP 易受诸如胎龄、性别、体质量等多种因素

影响^[2], 再加上其他结构类似的甾体激素交叉抗原干扰^[3], 假阳性率高达 99%^[4]。因此, 亟待改进当前新生儿 CAH 筛查方法。近年来, 由于液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 技术具有卓越的灵敏度、可靠性以及高通量特性, 已被广泛运用于新生儿多种代谢性疾病筛查; 但对 CAH 筛查的运用还处于探讨阶段^[5-6]。有研究认为, 21-脱氧皮质醇 (21-DF) 在 CAH 患儿, 特别是 21-羟化酶缺陷患儿具有较高特异性^[7]。本研究收集时间分辨荧光分析 (TRFIA) 17-OHP 初

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2016J01489)

1 通信作者

筛值异常的疑似 CAH 患儿,以 CYP21A2 基因突变分析作为参考方法,采用 LC-MS/MS 技术测定其 17-OHP 和 21-DF 值,并对 LC-MS/MS 和 TRFIA 两种方法的一致性及假阳性率进行比较。

1 对象与方法

1.1 对象:2016 年 4 月至 2018 年 3 月在福建省新生儿筛查中心采用 TRFIA 法初筛 17-OHP 值异常的疑似 CAH 患儿 73 例(正常参考值:早产儿 >60 nmol/L,足月儿 >30 nmol/L),男 32 例,女 41 例;早产儿 42 例,足月儿 31 例。17-OHP 初筛值范围 33.40 (10.12) ~ 1103.00 (334.24) nmol/L (ng/mL)。所有研究对象均按《新生儿遗传代谢病筛查血片采集技术规范》留取筛查干血片标本。本项目经我院伦理委员会批准且监督,研究对象知情同意。

1.2 方法:

1.2.1 CYP21A2 基因突变分析:按微量 DNA 提取试剂盒(Omega 生物,美国)说明书提取干血片基因组 DNA。采用巢式 PCR 扩增 CYP21A2 基因,PCR 引物序列、反应体系和反应条件见参考文献 [8],对 PCR 产物直接测序分析。对测序结果分析疑似大缺失者采用多重连接探针扩增 (ML-PA) 技术确证。

1.2.2 LC-MS/MS 技术检测 21-DF 和 17-OHP 浓度:1) 基质液:将健康成人静脉血生理盐水洗涤 3 次彻底清除残留血浆,按容积比 55:45 加入不含类固醇的血清稀释上述洗涤后的血细胞。2) 储备液:21-DF 和 17-OHP 分别先用乙腈:纯水 (7:3) 混合液稀释成 1 mg/mL,再用甲醇:纯水 (1:9) 混合液进一步稀释成 1 μ g/mL [色谱级的乙腈、甲醇和纯水来自格里斯(天津)医药化学技术有限公司]。-80 $^{\circ}$ C 保存。3) 校准品:分别将浓度 1 μ g/mL 的 21-DF 和 17-OHP 储备液用红细胞基质液稀释成 0.5、2.5、12.5、25.0、50.0 ng/mL 5 个浓度梯度。4) 质控品:将浓度为 1 μ g/mL 的 21-DF (TRC 公司,加拿大) 和 17-OHP (Chiron 公司,挪威) 储备液用红细胞基质液稀释成 1.25、5.00、37.50 ng/mL 3 个浓度梯度。干血片 -80 $^{\circ}$ C 保存。本研究校准品和质控品配制方法见参考文献 [9]。5) 标本处理:将 2 个 3.2 mm 大小的血片斑置于 200 μ L 萃取缓冲液(配比:50%甲醇+50%乙腈;氘化内标 21-DF 和 17-OHP 浓度 0.5 ng/mL,购自 (Pointe-Claire, QC, 加拿大), 37 $^{\circ}$ C 震荡 1 h,氮气干燥后加入 30 μ L 50%甲醇复溶,LC-MS/MS 上机检测 (UPLC-Xevo-TQ-S, 美国 Waters 公司)。6) 分析条件:采用 Waters ACQUITY UPLC HSST3 色谱柱 (2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μ m),流速为 0.45 mL/min。柱温为 40 $^{\circ}$ C,进样体积为 5 μ L;流动相 A 为超纯水,流动相 B 为甲醇梯度洗脱:0~1 min, 55% A; 1.0~3.5 min, 55%~35% A; 3.5 min, 2% A; 5.0 min, 55% A。

1.3 统计学分析:TRFIA 法与 LC-MS/MS 法之间 17-OHP 浓度测定值的相关性和偏差度比较采用 MedCalc 软件进行 Deming 回归和 Bland-Altman 偏差分析 [10]。17-OHP 和 21-DF 测定值采用中位数和四分位区间 (interquartile range, IQR) 描述;K-S 检验进行正态分布检验;在非 CAH21 新生儿、携带者和 CAH21 患者之间,正态分布数据比较采用的采用单因素方差分析,非正态分布数据比较采用非参数

Mann-Whitney U 检验。根据对 17-OHP 和 21-DF 参考值判断所得的假阳性例数比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因分析:73 例疑似患儿中 6 例确诊为 CAH21 患者,全属于足月儿。67 例排除 CYP21A2 突变所致 21 羟化酶缺陷,包括 58 例两条等位基因均未发现 CYP21A2 突变,为非 CAH21 新生儿;9 例仅在其中一条等位基因发现致病性突变,为 CAH21 携带者。

2.2 LC-MS/MS 法 17-OHP 和 21-DF 测定值分析:73 例 17-OHP 浓度 1.65~18.63 ng/mL,21-DF 浓度 0.112~23.300 ng/mL。其中,58 例 CYP21A2 基因突变阴性新生儿中,17-OHP 测定值 8.5 (4.00~12.42) ng/mL,21-DF 测定值 0.14 (0.07~0.22) ng/mL;9 例突变携带者中,17-OHP 测定值 4.5 (3.40~6.96) ng/mL,21-DF 值 1.18 (1.01~2.70) ng/mL;6 例 CAH21 患儿中,17-OHP 测定值 114.87 (63.52~176.40) ng/mL,21-DF 值 13.55 (3.93~21.95) ng/mL。与携带者或 CAH21 阴性者比较,CAH21 患者的 17-OHP 浓度明显升高 (P 值均 < 0.001);但是携带者和 CAH21 阴性正常新生儿之间的 17-OHP 浓度没有改变 ($P = 0.817$)。而 CAH21 患者的 21-DF 浓度不仅明显高于携带者或 CAH21 阴性者 (P 值均 < 0.001),携带者的 21-DF 浓度也明显高于非 CAH21 新生儿 ($P = 0.031$)。

2.3 LC-MS/MS 法与 TRFIA 法比较:LC-MS/MS 法与 TRFIA 法测定的 17-OHP 浓度值 Deming 回归方程为 $Y_{LC-MS/MS} = -8.3352 - 0.6166X_{TRFIA}$,斜率和截距的 95% 置信区间分别为 0.6025~0.6307 和 -9.8600~-6.8104;Pearson 相关系数为 0.9878。进一步 Bland-Altman 图显示两种方法偏差值百分数为 145.9%,95% 置信区间为 -36.0%~327.8%。说明两种方法存在良好的关联性,但 TRFIA 法测定的 17-OHP 浓度显著高于 LC-MS/MS 法。

进一步以基因分析法作为参考,根据文献报道的 LC-MS/MS 法正常人群参考范围 [9]:17-OHP 早产儿和足月儿分别为 $< 0.50 \sim 8.25$ ng/mL 和 $< 0.50 \sim 1.49$ ng/mL;21-DF 早产儿和足月儿分别为 $< 0.50 \sim 1.29$ ng/mL 和 $< 0.50 \sim 1.58$ ng/mL。在早产儿中,17-OHP 的假阳性例数为 17 例,21-DF 的假阳性例数为 7 例,17-OHP 和 21-DF 均为假阳性的例数为 5 例;而在非早产儿中,17-OHP 的假阳性例数为 10 例,21-DF 的假阳性例数为 6 例,17-OHP 和 21-DF 均为假阳性的例数为 5 例;总 17-OHP 假阳性例数为 27 例,是 TRFIA 的 40.30% (27/67);总 21-DF 假阳性例数 13 例,是 TRFIA 法的 19.40% (13/67),总 17-OHP 和 21-DF 均为假阳性例数为 10 例,是 TRFIA 法的 14.9% (10/67)。17-OHP 假阳性例数明显高于 21-DF 的假阳性例数 ($P = 0.008$),但 21-DF 的假阳性例数与 17-OHP 和 21-DF 均为假阳性例数比较的差异无统计学意义 ($P = 0.472$)。

3 讨论

3.1 LC-MS/MS 技术 21-DF 测定值能有效区分携带者和阴性正常新生儿:近年来的研究证实,LC-MS/MS 技术的特异性、敏感性、标准曲线性能、准确度、精密度、基质效应、分析物在生物基质储存和处理全过程中的稳定性、提取

回收率等特征均符合干血片类固醇激素谱的测定^[1]。因此,各国学者试图探讨 LC-MS/MS 技术运用于 CAH 的筛查,以改进目前采用传统免疫学由于特异性、灵敏度较低和交叉抗原干扰导致的过高的假阳性困扰^[5-6]。

由于 21 羟化酶缺陷的 CAH 患儿无法进一步将 17-OHP 转化成皮质醇,过低皮质醇不仅导致肾上腺轴负反馈减弱和 ACTH 分泌增加,也使血液中堆积的 17-OHP 将羟基化为 21-DF。有研究表明,相对于 17-OHP,21-DF 血液中变化敏感度较高^[9]。甚至有人认为,在外界 ACTH 刺激的前后 60 min 测定血液 21-DF 能够有效区分 CAH21 携带者和正常人^[12]。本组 73 例采用传统的 RTFIA 法测定 17-OHP 单项指标进行 CAH 初筛实验发现异常的疑似 CAH 患儿中,基因分析确定为非 CAH 患者高达 67 例,其中仅有 9 例为 21 羟化酶基因携带者。在用 LC-MS/MS 法检测 17-OHP 和 21-DF 含量时,发现 CAH 患儿的 17-OHP 和 21-DF 浓度值均比携带者或未发现 21 羟化酶基因突变的新生儿高;但是,17-OHP 浓度在携带者和无 21 羟化酶突变新生儿之间没有显著变化,而携带者的 21-DF 浓度明显高于无 21 羟化酶基因突变的新生儿,这与以上文献报道一致。

3.2 RTFIA 法与 LC-MS/MS 法比较:进一步采用 Deming 回归分析法和 Bland-Altman 偏差图进行传统的 RTFIA 法与 LC-MS/MS 法之间 17-OHP 浓度测定值的相关性和偏差度比较显示,两种方法的相关度良好,但 RTFIA 法测定值明显高于 LC-MS/MS 法。可能原因正如 Jean 等^[13]的发现,新生儿期脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA), 和 17-羟孕烯醇酮 (17 OH pregnenolone, 17OHPreg) 含量明显高于青春期。由于上述两种甾体激素的结构与 17-OHP 存在高度的相似性,因此在采用 TRFIA 免疫学手段进行 17-OHP 测定时,可能成为免疫学反应的交叉抗原。

文献报道显示^[1],采用 LC-MS/MS 技术可以消除 84% 的初筛假阳性结果。由于目前尚无中国新生儿人群 LC-MS/MS 法的 17-OHP 和 21-DF 水平的正常参考值,我们以邻近的韩国 Borahm 等^[9]报道的 78 例足月儿和 76 例早产儿的 95% 区间范围数据为参考也发现,无论是 17-OHP 还是 21-DF,均可以明显比用 TRFIA 法这种传统初筛方法减少了假阳性例数。当然,与文献比较,我们初筛假阳性例数的消除比率略低,这可能与采用非本地区的正常参考水平及实验样本量较少有关。因此,今后有必要进一步扩大检测人群范围和样本量。有意思的是,我们同时发现早产儿采用 21-DF 作为参考,假阳性例数下降得更加明显,可能是与早产儿的 17-OHP 浓度容易受到胎龄、体质量、甚至较低活性的 11 β 羟化酶 (β -hydroxylase) 等因素影响有关^[14]。进一步,我们又比较了联合 17-OHP 和 21-DF 两项指标与单一采用 21-DF 单项指标在 CAH 假阳性率上的差别。遗憾的是尽管假阳性数少 2 例,但二者统计学上比较无意义,可能是因为 21-DF 即为 17-OHP 的羟基化产物,且在血液中的敏感性优于 17-OHP。这在我们今后的研究中将作进一步探讨。

综上,笔者初步认为,对于传统免疫学方法 17-OHP 浓度初筛异常的新生儿,采用 LC-MS/MS 技术对这些疑似 CAH 患儿的原干血片进行 17-OHP 和 21-DF 浓度再次测定,不仅能够消除由于免疫学交叉抗原导致的 17-OHP 测定值过

高,还可以有效区分其他诸如早产或者低体质量等因素导致的假阳性,从而不仅可以使临床医生更加快速准确地诊断病情,而且也有利于减轻新生儿家属医疗费用和精神压力。

参考文献

- [1] E-Maouche D, Arlt W, Merke D P. Congenital adrenal hyperplasia [J]. Lancet, 2017, 390 (10108): 2194-2210.
- [2] 苏跃青, 朱文斌, 王旌, 等. 新生儿血 17-羟孕酮的正常水平及其影响因素 [J]. 中华围产医学杂志, 2015, 18 (9): 687-691.
- [3] Wong T, Shackleton C H, Covey T R, et al. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 alpha hydroxyprogesterone radioimmunoassays [J]. Clin Chem, 1992, 38 (9): 1830-1837.
- [4] Pearce M., DeMartino L, McMahon R, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New York State [J]. Mol Genet Metab Rep, 2016, 7: 1-7.
- [5] 占霞, 韩连书, 叶军, 等. 干血滤纸片类固醇激素质控品制备及评价 [J]. 临床儿科杂志, 2017, 35 (12): 941-945.
- [6] Seo J Y, Park H D, Kim J W, et al. Steroid profiling for congenital adrenal hyperplasia by tandem mass spectrometry as a second-tier test reduces follow-up burdens in a tertiary care hospital: a retrospective and prospective evaluation [J]. J Perinat Med, 2014, 42 (1): 121-127.
- [7] Turcu A F, Rege J, Chomic R, et al. Profiles of 21-carbon steroids in 21-hydroxylase deficiency [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100 (6): 2283-2290.
- [8] 苏跃青, 陈涵强, 朱文斌, 等. 经典型 21-羟化酶缺乏症的 CYP21A2 基因突变分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33 (6): 786-790.
- [9] Borahm K, Mi-Na L, Hyung-Doo P, et al. Dried blood spot testing for seven steroids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with reference interval determination in the Korean population [J]. Ann Lab Med, 2015, 35 (6): 578-585.
- [10] Altman D G, Bland J M. Assessing Agreement between Methods of Measurement [J]. Clin Chem, 2017, 63 (10): 1653-1654.
- [11] Kuldeep D, Thomson H, Patti R, et al. An automated method on analysis of blood steroids using liquid chromatography tandem mass spectrometry: Application to population screening for congenital adrenal hyperplasia in newborns [J]. Clinica Chimica Acta, 2011, 412: 2076-2084.
- [12] Costa-Barbosa F A, Tonetto-Fernandes V F, Carvalho V M, et al. Superior discriminating value of ACTH-stimulated serum 21-deoxycortisol in identifying heterozygote carriers for 21-hydroxylase deficiency [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2010, 73 (6): 700-706.
- [13] Jean F, Yves L B, J'érôme Gu'échot, et al. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry profile of 16 serum steroids, including 21-deoxycortisol and 21-deoxycorticosterone, for management of congenital adrenal hyperplasia [J]. Journal of the Endocrine Society, 2017, 1 (3): 186-201.
- [14] Kamrath C, Hartmann M F, Boettcher C, et al. Reduced activity of 11 β -hydroxylase accounts for elevated 17 α -hydroxyprogesterone in preterms [J]. J Pediatr, 2014, 165 (2): 280-284.