

重视孤独症谱系障碍早期筛查与诊断的代谢组学研究

武丽杰

哈尔滨医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学教研室,黑龙江 150081

【摘要】 孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是世界上患病人数增长最快的神经发育障碍性疾病,对该病的诊断目前仍缺乏客观的生物学标记。而代谢组学研究的进展似乎为找到 ASD 潜在标志物提供了新的方向。主要介绍了近年来 ASD 早期筛查与诊断相关的代谢组学研究进展,代谢标志物应用于 ASD 临床实践的可能性,并提出相关研究展望,供关注该领域的研究者参考借鉴。

【关键词】 孤独性障碍;早期诊断;生物学标记;儿童

【中图分类号】 R 749.94 R 179 R 44 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-9817(2019)04-0483-04

An overview on the importance of metabolomics study in early screening and diagnosis of autism spectrum disorders/WU Lijie. Department of Maternal & Child Health, School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin(150081), China

【Abstract】 Autism spectrum disorder (ASD) is the fast growing neurodevelopmental disorder worldwide. No biomarker tests for ASD currently exist. Research efforts in metabolomic may shed light on potential biomarkers for ASD. Here, we will review the current progress in metabolomics in early screening and diagnosis of ASD and focus on its effectiveness and caveats in clinical practices. This editorial also includes thoughtful discussion of future directions to provide better guidance for research in this area.

【Key words】 Autistic disorder; Early diagnosis; Biological markers; Child

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一类以社会交流障碍、刻板重复行为/狭隘的兴趣为主要特征的神经发育障碍性疾病^[1]。近年来的流行病学调查数据显示,ASD 在全球范围内患病率逐年升高,据美国疾病预防控制中心 2018 年发布结果显示,ASD 的患病率高达 1/59^[2]。我国最新的调查数据显示,中国 ASD 儿童的患病率已达 1%,和西方国家相近^[3]。ASD 是世界上患病人数增长最快的神经发育障碍性疾病,已经成为全球关注的重大公共健康问题^[4]。在儿童致残疾病中,ASD 的抢救价值最大,早期发现、早期干预可以有效改善不良预后、减轻家庭和社会的疾病负担,对患儿的一生都尤为重要。但目前对该病还没有特异性的实验室检测手段,也缺乏影像学诊断依据,各国对 ASD 的诊断主要依赖于患儿的特征性行为表现,辅以一些专业化的筛查和诊断性评估,缺乏客观的生物学指标和手段。因此,迫切需要寻找一些可靠的标志物能够用于 ASD 早期筛查及诊断,以及开展有靶向意义的治疗和干预。近年来,ASD 代谢组学研究进展似乎为找到 ASD 的潜在标志物提供了新的方向,无论是探索性还是验证性研究均获得

了一些有价值的成果,也越来越受到国内外学者的关注。

1 ASD 早期筛查与诊断标志物的代谢组学研究证据不断增多

代谢组学是继基因组学、转录组学、蛋白质组学之后,研究生物体系受外部刺激所产生的所有代谢产物的变化,是研究生命科学的又一个重要研究方法。由于其具有高分离度、高灵敏度、高重现性等优点,目前已经应用于医学的各个研究领域。近年来,国内外已有文献报道了代谢组学研究在探索 ASD 筛查与诊断的潜在标志物中的应用。经典代谢组学分析一般采用病例—对照研究设计,通过对血液、尿液、唾液等生物样本中的代谢物进行分析,在探索样本中初步筛查,找出在病例组和对照组间有显著差异的代谢产物,然后在验证样本中进一步确定这些差异代谢产物作为该病诊断标记的价值,从而建立该病早期筛查与诊断的特异性生物标志物的预测模型。此外,还有代谢物靶标分析,是研究特定代谢途径或同一种结构功能类型的代谢物群,如磷酸酯类、脂肪酸类或氨基酸类,有目的地研究特定的代谢循环或代谢产物,即对特定的目标化合物进行精确定性、定量分析。

近 10 年来,越来越多与 ASD 有关的代谢组学研究证据被发现。Ming 等^[5]使用液相色谱—气相色谱—质谱 (LC-GC/MS) 技术,进行了 ASD 与正常对照

【基金项目】 国家自然科学基金 (81673191)。

【作者简介】 武丽杰 (1964—),女,辽宁沈阳人,博士,教授,主要研究方向为儿童发育障碍及行为问题。

DOI: 10.16835/j.cnki.1000-9817.2019.04.002

儿童的尿液代谢组学分析,发现 ASD 儿童存在氨基酸代谢异常、氧化应激能力增强以及肠道菌群失调;Kuwabara 等^[6]利用电喷雾电离飞行时间质谱联用(CE-TOFMS)技术,采用二阶段(探索阶段和验证阶段)病例对照实验设计,分析 ASD 儿童的血浆代谢轮廓,发现了与氧化应激、线粒体功能障碍等相关的血浆代谢物异常。

Dieme 等^[7]对 ASD 儿童的尿液样本进行了代谢组学分析,通过对 22 例 ASD 儿童及 24 名正常对照的初步探索性分析,并另外选择 8 例 ASD 儿童与 8 名正常对照进行验证,经过核磁共振波谱(NMR)与超高效液相色谱—质谱(UPLC-MS)的检测和正交偏最小二乘法(OPLS-DA)分析,确定了有诊断价值的代谢物共计 46 个,涉及氨基酸代谢异常(包括酪氨酸、天门冬酰胺、苯丙氨酸、色氨酸和精氨酸)和肠道菌群失调,对其进行数据拟合分析,发现联合应用 46 个代谢物可以有效区分 ASD 儿童和正常对照,在 ROC 分析中,灵敏度可达 100%,特异度为 75%,曲线下面积(AUC)为 0.91。尽管该研究在用尿液样本的 ASD 代谢组学研究方面进行了较好的尝试,但由于模型的建立使用了 46 个代谢物进行预测,并不能用于临床的诊断实践,因为代谢组学研究所获得的模型是期望用最少的数据拟合来获得最大的预测收益,但可以说,该模型的建立为 ASD 的病因学研究提供了新的思考方向。此后,意大利 Gevi 等^[8]的研究应用高效液相色谱(HPLC)发现,ASD 患者体内维生素 B6、核黄素、泛酸和辅酶 A 以及苯丙氨酸—酪氨酸—色氨酸代谢与正常对照间的差异有统计学意义;而意大利 Lussu 等^[9]对 21 对 ASD 病例对照的尿液应用 NMR 方法检测,发现一系列与氧化应激与肠道菌群相关的代谢物水平异常。以上 2 项研究人群背景一致,共性的问题都是样本例数过少,可能由此所限或检测技术不同,而最终导致结果的不一致性。但不同团队的研究也可能产生某些一致性的结果,如 Bitar 等^[10]针对中东国家 40 例 ASD 儿童和 40 例正常对照,采用 NMR 和 LC-MS 技术进行的尿液分析再次证实了以往报道的酪氨酸、2-羟基丁酸、肌酸、谷氨酸代谢的异常,此外还新发现了一些干扰氨基酸代谢、肌酸代谢、肠道菌群、能量代谢以及氧化应激通路的代谢产物,其中色氨酸、肌酸、苏氨酸、羟苯酸盐、葡萄糖醛酸酯、羟脯氨酸和胍基琥珀酸 7 个代谢物被证实可作为潜在的诊断标志物,且联合诊断的灵敏度和特异度均较高,值得进行深入的研究探讨。以上研究均是通过分析尿液样本中的代谢物来筛选可能的标志物,尽管尿液取样方便无创,便于采集,然而发现的标志物复杂多样,尚缺乏一致性结果,且受饮食、采集时间的影响较大,致使不

同的研究结果难以相互验证,因此,并不是研究 ASD 代谢标志物的理想样本。

除尿液外,血液样本相对更加稳定,是代谢组学研究中常用的生物样本。West 等^[11]采集 52 例 ASD 儿童及 30 名正常对照的血浆,分成探索样本与验证样本,采用 LC-MS,GC-MS 检测方法,联合 5 种分析平台数据集,发现了影响能量代谢(包括三羧酸循环代谢物质、脂肪酸、氨基异丁酸、肌酸等)、线粒体功能(包括天冬氨酸、谷氨酸、脱氢表雄酮、支链氨基酸、戊二酸等)以及肠道菌群的许多代谢物,将筛出的 179 个代谢物分别引入分类模型进行统计分析,发现当应用支持向量机模型(SVM)分析时,包含 80 个代谢物所建立的预测模型效果最好,具有最优的灵敏度和特异度(分别为 85%,75%),AUC 为 0.84。随后该研究团队扩大样本量检测了 ASD 儿童的 31 种胺类代谢物水平,即在前期研究基础上开展了代谢物靶标分析,发现甘氨酸、鸟氨酸和谷氨酰胺与支链氨基酸的比值可以联合应用于区分 ASD 和正常发育儿童,特异度可达到 96.3%,阳性预测值达到 93.5%,但灵敏度仅为 16.7%^[12],说明以上指标还不能作为有临床应用价值的诊断标志物。但作者认为通过胺类代谢物的检测分析可以将 ASD 患者按照代谢物水平分层,或许对将来实现 ASD 的靶向干预及个别化治疗有一定指导意义。此外,也有研究者通过代谢组学方法发现了一些与 ASD 行为表型相关的标志物。如 Howsmon 等^[13]开展了基于叶酸代谢通路的生物标志物研究,通过高效液相色谱(HPLC)技术检测 83 例 ASD 儿童及未患病同胞、76 名正常儿童的氧化应激和 DNA 甲基化代谢途径,利用 Fisher 判别分析发现,7 个代谢物(DNA 甲基化百分比、胱氨酸/半胱氨酸、脱氧鸟嘌呤、氧化型谷胱甘肽、氧化应激比值、氯酪氨酸和谷氨酸—半胱氨酸)可以作为有效的 ASD 联合诊断标志物,不仅能够较好区分 ASD 儿童和正常发育儿童,还可以区分 ASD 儿童和未患病同胞,且灵敏度和特异度均超过 95%;而采用非线性 Kernel 偏最小二乘判别(KPLS-DA)分析发现,5 个代谢物联合指标(氧化型谷胱甘肽、氧化应激比值、硝基酪氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)与 ASD 的适应行为相关。

超高效液相色谱—四级杆飞行时间质谱联用(UPLC/Q-TOF MS/MS)技术,允许分析各种小分子量的极性化合物,能够获得化合物的准确分子量及丰富的结构信息,已发展成为代谢组学研究的主流技术方法。本课题组在国内首次应用此技术开展了 ASD 血清标志物研究,通过探索与验证研究发现了 11 个代谢物,主要包括不饱和脂肪酸类、肉毒碱类及鞘脂类等^[14],由此建立 Logistic 回归模型发现了 2 个有意义

的代谢物:二十二碳六烯酸(DHA)和 S1P;对联合诊断价值进行 ROC 分析发现,AUC 为 0.90,灵敏度和特异度分别为 90%和 74%;此外,研究还发现 DHA,S1P 相对含量与孤独症行为检核表(Autism Behavior Checklist, ABC)总分相关。由此认为,DHA 和 S1P 可能作为 ASD 潜在的、有诊断价值的生物标志物,对于将来 ASD 的筛查、诊断和靶向营养干预有非常重要的意义。

综合 ASD 的代谢组学研究发现,ASD 患者异常的代谢指标涵盖了氨基酸代谢、核苷酸代谢、能量代谢、氧化应激、肠道菌群等较多通路,但能否通过代谢组学来预测 ASD 风险因素、筛查出与 ASD 临床表型特征相关的特异性指标,尚需进一步开展多中心、大样本的人群研究。

2 ASD 代谢组学研究结果的影响因素

代谢组学研究已成为 ASD 生物标志物筛选和鉴定的一种关键手段,但无论是经典代谢组学还是代谢物靶标分析均仍然存在不可避免的劣势,前者的劣势是目前仍存在较多无法解释的代谢物,后者的劣势则是在全局特征的描述上还存在不足,并且代谢组学研究还受某些因素的影响,主要包括:(1)ASD 可能是由遗传因素和环境因素相互作用导致的复杂神经发育障碍性疾病,具有高度的遗传异质性和临床异质性,造成 ASD 个体间的表型差异很大;同时还经常与癫痫、注意缺陷多动障碍、胃肠道症状、睡眠障碍等合并出现,伴随症状也会对体内代谢物质产生影响。(2)样品的采集与前处理,体内代谢物质会随时间变化,不同的样本采集条件和时间会影响分析结果;不同代谢物质的理化特性不同,在样本前处理阶段也极易产生误差;在检测分析前,临床生物样本均需经过一定的前处理,包括蛋白沉淀、液液萃取、净化、衍生化或浓缩等,例如氨基酸、有机酸等代谢物质一般极性较强,难以挥发,应用 GC-MS 时就需要经过衍生化处理来增加挥发性。(3)检测手段与分析方法,在代谢组学研究中,应用的检测技术不同,即使是同样遗传背景的人群,不同研究间代谢产物的结果就可能产生很大差异,这也是代谢组学研究所面临的瓶颈和问题;且代谢组学检测会产生多维大数据信息,需要运用生物信息学手段进行深度挖掘,常用于代谢组学分析的方法包括主成分分析(PCA)、层次聚类分析(HCA)、SVM、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)、OPLS-DA、KPLS-DA 等,而不同的分析方法有各自的优势,但每一种方法均不可避免的会对原始数据产生不同损耗,目前还不能很好处理代谢组学研究数据的标准化问题。

3 ASD 早期筛查与诊断代谢组学研究展望

从目前发表的文献看,在 ASD 代谢组学研究中,仍缺少大样本研究和纵向追踪证据,也缺少高论证强度的 RCT 系统综述证据。因此,近年来,尽管代谢组学研究发现了较多与 ASD 有关联的代谢物,但迄今为止还没有一种代谢物可以单独作为 ASD 的可靠标志物用于临床实验,也尚未找出能够明确应用于临床筛查和诊断的、简便易行的联合指标。因此,将目前代谢组学研究发现的 ASD 早期筛查标志物进行临床推广与实践仍为时过早。但代谢组学方法拓宽了 ASD 的研究思路,为未来 ASD 精准和客观诊断指明了方向,为更全面了解 ASD 病理生理机制提供了机会和可能。基于以往研究和发现,在接下来的工作中,围绕 ASD 的代谢组学研究,可以继续寻找具有 ASD 特异性的新的代谢通路,也可以针对已知代谢通路中的代表性组分进行深入分析,期望找到客观有效的 ASD 早期筛查与诊断的特异性标记,实现 ASD 的早发现、早诊断、早治疗,改善患者的预后。此外,还可以通过代谢组学研究找到精准指导 ASD 的靶向干预或个性化治疗的方向,实现循证证据指导下的 ASD 综合干预,促进其良好转归。

4 参考文献

- [1] American Psychiatric Association.Diagnostic and statistical manual of mental disorders[M].5th ed.Washington,DC: American Psychiatric Association,2013:58-62.
- [2] BAIO J,WIGGINS L,CHRISTENSEN D L,et al.Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2014[J].MMWR,2018,67(6):1-23.
- [3] SUN X,ALLISON C,WEI L,et al.Autism prevalence in China is comparable to Western prevalence[J].Mol Autism,2019,10:7.
- [4] BUESCHER A V,CIDAV Z,KNAPP M,et al.Costs of autism spectrum disorders in the United Kingdom and the United States[J].JAMA Pediatrics,2014,168(8):721-728.
- [5] MING X,STEIN T P,BARNES V,et al.Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: a metabolomics study[J].J Proteom Res,2012,11(12):5856-5862.
- [6] KUWABARA H,YAMASUE H,KOIKE S,et al.Altered metabolites in the plasma of autism spectrum disorder: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectroscopy study[J].PLoS One,2013,8(9):e73814.
- [7] DIEME B,MAVEL S,BLASCO H,et al.Metabolomics study of urine in autism spectrum disorders using a multiplatform analytical methodology[J].J Proteom Res,2015,14(12):5273-5282.
- [8] GEVI F,ZOLLA L,GABRIELE S,et al.Urinary metabolomics of young Italian autistic children supports abnormal tryptophan and purine metabolism[J].Mol Autism,2016,7:47.

(下转第 489 页)

诊疗服务是家长或监护人的责任,院系相关人员在过程中主要提供支持协助。其次,为更好地对大学生心理危机进行预防和应对,学校要加强与精神专科医院的合作,通过医院和学校的有效联动建立“医教结合”模式,形成一支由精神科医生、护士、心理咨询教师等专业技术人员组成的复合型心理危机干预队伍,学校加强大学生的心理危机预防机制,医院设立接收有心理疾病学生的专业窗口,建设门诊药物治疗或住院治疗的绿色通道,加强学校和医院之间的沟通和联动,促进大学生心理危机预防工作不断向纵深推进,将预防干预机制植入到每个学生的心里,做到有效预防,避免意外事件发生,切实保障大学生身心安全^[8]。

4.4 完善高校心理健康教育工作的规章制度 《精神卫生法》要求各个学校在制定有关心理咨询与心理危机干预的规章制度时,不仅要考虑学校的自身特点,还要遵循相关的法律法规。目前各学校都依据各自的实际工作情况制定相应的心理咨询辅导制度,在《精神卫生法》实施后,要对各学校现有的规章制度进行全面审核,特别是针对心理健康教育和心理危机干预的规章制度。首先,加强知情同意环节,规范心理咨询记录,加强问题学生个案咨询管理工作。学校心理咨询中心对心理咨询教师保留在机构中的咨询记录要有明确规范,记录要保存客观的信息和内容,如问题学生的说话、表情和行为等^[9]。心理咨询教师要形成良好的撰写咨询记录的习惯,每一个咨询电话、每次会谈,都要做好文字或语音的记录并保存。在日常心理危机干预工作中要建立严谨的、完整的、系统的、长期的咨询台账记录,这既是对工作的负责,便于查阅,也是对自己的法律保护措施^[10]。其次,《精神卫生法》将意愿诊疗及住院的权力赋予当事人的监护人,一旦发现心理危机个案学生,要及时与监护人进行沟通协商,同时与医疗卫生部门及时协调沟通。再次,在心理咨询个案材料的保存和呈报等环节上,要

强化保密观念和措施。对于严重心理障碍学生的处理,明确学校心理咨询中心的职能是告知监护人并建议转介,不能直接进行心理干预和诊断治疗。

总之,在进行大学生心理危机干预实践活动中,学校心理咨询师要明确了解《精神卫生法》对心理咨询与心理危机干预的法律要求,清晰界定心理诊治和心理咨询的界限,明确学校心理咨询师的职能和责任;学校需要建立行之有效的心理危机干预体系,建立与专业诊疗机构相结合的“医教结合”新模式,完善心理健康教育工作的规章制度,从而提升心理危机应对能力。

5 参考文献

- [1] 吴兴昉.学校社会工作对高校心理咨询工作的启示:以贵州省 8 所高校为例[D].武汉:华中师范大学,2012.
- [2] 陶钧,郑亚楠,唐宏.大学生精神卫生知识知晓、对精神障碍患者歧视状况对专业性心理求助态度影响的调查分析[J].现代预防医学,2017,44(3):474-477.
- [3] 全国人大常委会法制工作委员会行政法室.《中华人民共和国精神卫生法》释义及实用指南[M].北京:中国民主法制出版社,2012:31-45.
- [4] 姚玉红,毕晨虹,赵旭东.《精神卫生法》实施对高校心理咨询工作的影响初探[J].思想理论教育,2014(5):85-88.
- [5] 张演善,肖蓉,赵静波.《精神卫生法》背景下心理咨询师法律认知的现状分析[J].中国健康心理学杂志,2015,23(6):837-841.
- [6] 刘小林,赵旭东.中国心理卫生协会心理治疗与心理咨询专业委员会第九届年会“精神卫生法观点交锋”纪要[J].中国心理卫生杂志,2013,27(11):857.
- [7] 马喜亭,刘立新.《精神卫生法》规制下的高校心理健康教育工作格局[J].思想理论教育,2017(12):107-110.
- [8] 张海燕.高校医教结合心理健康服务工作的探索:以上海高校为例[J].思想理论教育,2016(1):90-93.
- [9] 何元庆.高校心理咨询中保密的伦理困境与解决出路[J].中国临床心理学杂志,2015,23(2):378-380.
- [10] 姚斌.高校心理咨询的界限:法律与伦理的维度[J].思想理论教育,2018(5):89-94.

收稿日期:2019-01-24;修回日期:2019-03-07

(上接第 485 页)

- [9] LUSSU M, NOTO A, MASILI A, et al. The urinary (1) H-NMR metabolomics profile of an Italian autistic children population and their unaffected siblings[J]. Autism Res, 2017, 10(6):1058-1066.
- [10] BITAR T, MAVEL S, EMOND P, et al. Identification of metabolic pathway disturbances using multimodal metabolomics in autistic disorders in a Middle Eastern population[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 152:57-65.
- [11] WEST P R, AMARAL D G, BAIS P, et al. Metabolomics as a tool for discovery of biomarkers of autism spectrum disorder in the blood plasma of children[J]. PLoS One, 2014, 9(11):e112445.
- [12] SMITH A M, KING J J, WEST P R, et al. Amino acid dysregulation metabolotypes: potential biomarkers for diagnosis and individualized

treatment for subtypes of autism spectrum disorder[J]. Biol Psychiatry, 2019, 85(4):345-354.

- [13] HOWSMON D P, KRUGER U, MELNYK S, et al. Classification and adaptive behavior prediction of children with autism spectrum disorder based upon multivariate data analysis of markers of oxidative stress and DNA methylation[J]. PLoS Comput Biol, 2017, 13(3):e1005385.
- [14] WANG H, LIANG S, WANG M, et al. Potential serum biomarkers from a metabolomics study of autism[J]. J Psych Neuroscience, 2016, 41(1):27-37.

收稿日期:2019-04-03