

• 短篇论著 •

甘氨酸联合多种酰基肉碱在孤独症谱系障碍儿童中的识别价值*

涂相文¹, 张 峰², 陈俊坤¹

赣州市妇幼保健院:1. 优生遗传实验科;2. 儿童神经康复科, 江西赣州 341000

摘要:目的 分析孤独症谱系障碍儿童与健康儿童氨基酸和酰基肉碱水平差异,探讨甘氨酸(GLY)联合酰基肉碱在孤独症谱系障碍儿童早期识别的价值。方法 选取 2020 年 1 月至 2022 年 12 月在该院就诊的 2~4 岁孤独症谱系障碍(ASD)儿童为 ASD 组,ASD 患儿符合《精神障碍诊断与统计手册》(DSM-V)诊断标准。另选取同期该院年龄匹配的健康儿童为对照组。采用串联质谱(MSMS)技术检测两组儿童氨基酸和酰基肉碱水平,比较两组间氨基酸和肉碱水平差异;采用单因素和多因素 Logistic 回归分析早期识别 ASD 的独立影响因素,绘制受试者工作特征(ROC)曲线评估氨基酸和酰基肉碱在 ASD 儿童早期识别中的价值。结果 ASD 组氨基酸 ALA、GLY、ORN 低于对照组,ASD 组 VAL 高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);ASD 组酰基肉碱 C0、C5OH、C8、C10 水平高于对照组,ASD 组 C5、C5DC、C12、C14、C14:1、C16、C18 低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归显示,GLY、月桂酰肉碱(C12)、棕榈酰肉碱(C16)降低及 3-羟基-异戊酰肉碱(C5OH)升高是 ASD 的独立危险因素,ROC 曲线分析显示,GLY 联合多种酰基肉碱早期识别 ASD 的曲线下面积为 0.957,灵敏度为 0.959,特异度为 0.853。结论 GLY 联合多种酰基肉碱在 ASD 儿童早期识别中有较好的应用价值。

关键词:孤独症谱系障碍; 肉碱; 氨基酸; 早期识别; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.08.023

中图法分类号:R749.94

文章编号:1673-4130(2024)08-1011-04

文献标志码:A

孤独症谱系障碍(ASD)是一种高度异质性的神经发育障碍^[1],严重危害儿童身心健康,它的特点是沟通障碍和社交技能缺陷,主要表现为社会交互缺陷、交流障碍、兴趣狭隘、重复和刻板行为^[2]。ASD 的患病率最近几年逐步上升,已成为国际上范围内公共卫生难题^[3]。ASD 病因尚不明确,早期采取适当的干预措施,可改善沟通和社会行为,对 ASD 患者及其家人的健康有积极影响^[4]。因此,ASD 的早期识别尤为重要。然而,由于 ASD 发病较早,起病隐匿,诊断方法主要基于医生对患者的行为学观察及各项评价量表的临床行为评估^[5-6],且缺乏有效的辅助检查手段,这使得 ASD 的识别与诊断存在一定困难。部分学者探究生化指标如血清氧化甾醇水平、血液戊二酰肉碱和 C26 水平、维生素 D、叶酸等^[7-10]与 ASD 的相关性。虽然 ASD 的发病机制尚不明确,但多项研究提供了神经信号传导及线粒体功能异常与 ASD 相关的证据^[11]。甘氨酸(GLY)是一种除 γ 氨基丁酸外最重要的抑制性神经递质^[12],酰基肉碱则与线粒体功能及氧化应激相关^[13]。GLY 联合多种酰基肉碱在 2~4 岁 ASD 儿童识别的应用研究鲜见报道,本研究旨在探讨 GLY 联合多种酰基肉碱指标在 ASD 早期识别的应用价值,为临床对 ASD 儿童早期干预提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2020 年 1 月至 2022 年 12 月在本

院儿童神经康复科诊断为 ASD 的患儿为 ASD 组。纳入标准:按照《精神障碍诊断与统计手册》(DSM-V)诊断标准,并通过 CARS 孤独症诊断量表、Gesell 发育商评估、适应性行为评测等辅助检查^[5]后确诊的 2~4 岁 ASD 患儿。排除标准:(1)染色体异常等遗传性疾病、遗传代谢性疾病及其他代谢功能障碍性疾病;(2)其他非 ASD 神经发育障碍性疾病;(3)存在肢体发育异常、听力障碍;(4)病史不明及实验室数据不完整。按照上述标准,共 123 例 ASD 患儿纳入研究,其中男 111 例,女 12 例。以同期 56 例 2~4 岁健康儿童为对照组,其中男 45 例,女 11 例。对照组为排除代谢性、基础性疾病的儿童。本研究方案符合赫尔辛基宣言,所有入选儿童监护人均签署知情同意书,并获得了本院伦理审查委员会的批准。

1.2 方法 采集入选儿童手指或足底末梢血滴于滤纸片,每张滤纸片不少于 3 个血斑,血斑自然渗透无污染。血斑经过打孔仪(Panthera-Puncher TM9)打孔置于微孔板孔洞中,经非衍生法进行前处理后利用串联质谱仪(Waters TQD)检测血斑中指标。(1)氨基酸:丙氨酸(ALA)、GLY、鸟氨酸(ORN)、缬氨酸(VAL)、甲硫氨酸(MET)、亮氨酸(LEU);(2)肉碱及多种酰基肉碱:游离肉碱(C0)、乙酰肉碱(C2)、丙酰肉碱(C3)、丁酰肉碱(C4)、异戊酰肉碱(C5)、3-羟基-异戊酰肉碱(C5OH)、己酰肉碱(C6)、辛酰肉碱(C8)、癸

* 基金项目:江西省卫生健康委科技计划(202212353)。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20231211.1616.002.html\(2023-12-12\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20231211.1616.002.html(2023-12-12))

酰肉碱(C10)、戊二酰肉碱(C5DC)、十二碳酰肉碱(C12)、十四碳酰肉碱(C14)、十四碳烯酰肉碱(C14:1)、十六碳酰肉碱(C16)、十八碳酰肉碱(C18)。试剂盒采用 PerkinElmer 公司生产的 NeoBase™ Non-derivatized MSMS Kit。两组儿童临床及实验室资料来自医院病历管理系统及实验室信息系统。

1.3 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件进行数据统计分析,数据正态性采用 Shapiro-Wilk 检验,呈正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布的计量资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间比较采用 t 检验、Mann-Whitney U 检验;计数资料用例数或百分率表示,两组间比较采用 χ^2 检验。采用单因素和多因素 Logistic 回归分析 ASD 早期识别的独立影响因素,并使用受试者工作特征(ROC)曲线分析氨基酸及肉碱指标在 ASD 早期识别中的价值。以 $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结 果

2.1 ASD 患儿与健康儿童氨基酸及肉碱指标对比 ASD 组与对照组性别、月龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组氨基酸水平比较,ASD 组 ALA、GLY、ORN 低于对照组,ASD 组 VAL 高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组酰基肉碱水平比较:ASD 组 C0、C5OH、C8、C10 水平高于对照组,ASD 组 C5、C5DC、C12、C14、C14:1、C16、C18 低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 单因素和多因素 Logistic 回归分析 ASD 早期识别的独立影响因素 将单因素分析中 $P < 0.05$ 的指标纳入多因素分析,结果显示,C5OH、C12、C16、GLY 是 ASD 的独立影响因素($P < 0.05$)。见表 2、3。

表 1 两组氨基酸及肉碱指标对比[n/n 或 $\bar{x} \pm s$ 或 $M(P_{25}, P_{75})$]

项目	ASD 组($n=123$)	对照组($n=56$)	$\chi^2/t/Z$	P
性别(男/女)	111/12	45/11	3.359	0.067
月龄(月)	34.69±7.21	32.06±11.10	1.623	0.109
C0(μmol/L)	27.61(23.06,31.56)	22.72(18.69,29.46)	3.181	0.001
C2(μmol/L)	14.24(11.89,16.57)	12.80(11.34,18.05)	0.650	0.516
C3(μmol/L)	1.21(1.02,1.66)	1.21(0.93,1.62)	0.549	0.583
C4(μmol/L)	0.19(0.16,0.24)	0.20(0.15,0.24)	0.230	0.981
C3DC+C4OH(μmol/L)	0.07(0.06,0.09)	0.08(0.06,0.11)	0.992	0.321
C5OH(μmol/L)	0.32(0.26,0.42)	0.19(0.16,0.24)	7.953	<0.001
C5(μmol/L)	0.08(0.06,0.10)	0.12(0.09,0.16)	6.249	<0.001
C5DC(μmol/L)	0.07(0.06,0.08)	0.08(0.08,0.09)	4.158	<0.001
C6(μmol/L)	0.04(0.03,0.05)	0.03(0.03,0.04)	1.491	0.136
C8(μmol/L)	0.07(0.05,0.09)	0.04(0.03,0.06)	4.906	<0.001
C10(μmol/L)	0.08(0.05,0.11)	0.06(0.05,0.09)	2.881	0.004
C12(μmol/L)	0.04(0.06,0.05)	0.05(0.04,0.07)	5.284	<0.001
C14(μmol/L)	0.06(0.05,0.08)	0.13(0.11,0.17)	7.560	<0.001
C14:1(μmol/L)	0.05(0.04,0.07)	0.06(0.04,0.08)	2.236	0.025
C16(μmol/L)	0.98(0.86,1.20)	1.97(1.26,2.81)	6.552	<0.001
C18(μmol/L)	0.49(0.42,0.60)	0.67(0.48,0.89)	4.329	<0.001
ALA(μmol/L)	216.26(171.87,263.10)	291.9(240.36,354.62)	5.615	<0.001
GLY(μmol/L)	269.17(227.82,301.28)	418.37(367.03,516.01)	8.708	<0.001
MET(μmol/L)	16.43(13.74,19.59)	17.56(14.43,20.43)	0.873	0.403
ORN(μmol/L)	79.45(67.30,94.46)	116.81(97.16,141.84)	7.269	<0.001
VAL(μmol/L)	160.73(137.90,183.92)	145.88(130.64,174.24)	1.952	0.051
LEU(μmol/L)	141.09(119.99,162.21)	176.66(153.66,193.37)	6.136	<0.001

表 2 单因素分析结果

指标	β	SE	$Wald$	P	OR	95%CI
C0	1.388	0.347	16.017	<0.001	4.007	2.031~7.908
C5OH	3.026	0.410	54.380	<0.001	20.624	9.227~46.102
C5	2.125	0.373	32.507	<0.001	8.370	4.032~17.374
C5DC	1.440	0.344	17.514	<0.001	4.222	2.151~8.289
C12	1.713	0.352	23.707	<0.001	5.544	2.782~11.047
C14	3.517	0.447	61.836	<0.001	33.678	14.017~80.916
C14:1	0.800	0.341	5.517	0.019	2.226	1.142~4.342
C16	3.151	0.419	56.461	<0.001	23.357	10.268~53.132

续表 2 单因素分析结果

指标	β	SE	$Wald$	P	OR	95%CI
C18	1.611	0.346	21.638	<0.001	5.009	2.541~9.877
C8	1.397	0.349	16.003	<0.001	4.043	2.039~8.015
C10	0.894	0.338	6.973	0.008	2.444	1.259~4.746
ALA	2.272	0.425	28.644	<0.001	9.702	4.221~22.298
GLY	3.751	0.463	65.711	<0.001	42.550	17.181~105.376
MET	0.669	0.332	4.057	0.044	1.953	1.018~3.744
ORN	2.616	0.393	44.196	<0.001	13.679	6.326~29.581
LEU	2.214	0.389	32.412	<0.001	9.151	4.271~19.609

2.3 GLY 联合多种酰基肉碱对 ASD 早期识别价值 ROC 曲线分析结果显示, GLY 联合多种酰基肉碱早期识别 ASD 的曲线下面积(AUC)为 0. 957, 灵敏度为 0. 959, 特异度为 0. 853。见图 1 和表 4。

表 3 多因素分析结果

指标	β	SE	Wald	P	OR	95%CI
C5OH	2. 039	0. 645	9. 979	0. 002	7. 676	2. 168~27. 206
C12	1. 615	0. 769	4. 412	0. 036	5. 031	1. 114~22. 707
C16	1. 444	0. 708	4. 161	0. 041	4. 239	1. 058~16. 984
GLY	2. 557	0. 719	12. 648	<0. 001	12. 903	3. 152~52. 819

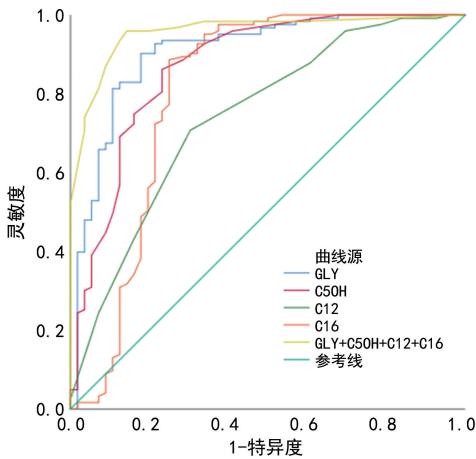


图 1 GLY 联合多种酰基肉碱对 ASD 早期识别的 ROC 曲线

表 4 各指标早期识别 ASD 的效能

项目	AUC	cut-off 值	P	95%CI	灵敏度	特异度
GLY	0. 906	343. 97	<0. 001	0. 854~0. 958	0. 902	0. 821
C5OH	0. 871	0. 245	<0. 001	0. 809~0. 933	0. 862	0. 766
C12	0. 743	0. 045	<0. 001	0. 663~0. 822	0. 707	0. 701
C16	0. 806	1. 375	<0. 001	0. 717~0. 895	0. 886	0. 749
4 项联合	0. 957	—	<0. 001	0. 928~0. 986	0. 959	0. 853

注: —表示此项无数据。

3 讨 论

ASD 是一种发育早期出现的神经发育障碍, 通常 3 岁以内起病, ASD 患者会出现不同程度的智力低下、社交能力缺陷、发育迟缓等, 给家庭及社会造成严重负担^[14]。有研究报道, ASD 患病率逐年递增, 2019—2020 年美国儿童和青少年 ASD 患病率 3. 14%, 男孩的患病率为 4. 64%, 女孩的患病率为 1. 56%^[15]; 一项多中心研究显示, 6~12 岁儿童 ASD 的患病率为 0. 7%, 男孩患病率约为女孩 3. 2 倍^[16]。目前 ASD 还没有确切的治愈办法, 并且自闭症的发病机制仍不明确, 但研究人员对 ASD 的环境与遗传风险因素进行研究^[17], 以期早期识别诊断, 采取适当的康复训练措施, 促使 ASD 儿童在成长过程中症状得到改善^[18]。

GLY 是一种广泛存在于中枢神经系统的抑制性神经递质, 在人体节律性运动、痛觉信息传导、大脑听觉信息处理等生理功能中具有极其重要的作用^[12]。同时, ASD 是一种神经发展性障碍, 存在一定的睡眠

问题, 常常现出异常的脑电波和异常的睡眠/清醒模式, 高水平的 GLY 作为抑制性神经递质具有改善睡眠、调节人体节律性的作用。此外, GLY 信号转导与社会和认知障碍存在相关联系^[19], 有研究报道, GLY 抑制性神经递质及其信号的传导在发育过程中起作用^[20], 且这种信号转导的改变与成年期的病理相关^[21], 由此推测, ASD 早期的神经发育障碍可能受到 GLY 信号转导的影响, 且这种信号转导某种程度上影响 ASD 远期预后。另外, 文献^[22-23]的研究也证实了这种假说, 兴奋性/抑制性神经递质比值失衡是 ASD 的异常神经发育的一种潜在病理机制。研究人员在 ASD 患者中发现 X 连锁甘氨酸受体 (GLYR) $\alpha 2$ 亚基基因突变^[21], 突变的受体功能障碍直接影响 GLY 信号转导。这些证据提示, GLY 参与的抑制性神经递质与 ASD 神经发育障碍有关, 低水平 GLY 是 ASD 的一个潜在风险因素。本研究多因素 Logistic 回归分析显示, GLY 水平是 ASD 的独立影响因素 ($P<0. 05$), ASD 组 GLY 水平显著低于对照组 ($P<0. 05$), 可能因为 GLY 水平降低会导致抑制性神经递质及多项生理功能的改变, 与 ASD 早期神经发育及预后有潜在的联系。

酰基肉碱是脂肪酸代谢中间物质, 它的主要功能是将长链脂肪酸运输到线粒体内, 从而参与 β 氧化能量代谢过程^[24]。目前普遍认为遗传因素是 ASD 重要因素之一, 有些研究阐明了 ASD 与线粒体基因改变, 如调节线粒体功能的线粒体 DNA 基因突变或核基因的缺失或突变^[25], 说明 ASD 与线粒体功能高度相关, 线粒体功能的缺陷是 ASD 因素之一。脂肪酸的 β 氧化发生在线粒体中, 当线粒体功能障碍导致多种酰基肉碱代谢异常, 目前对这种线粒体代谢异常机制并不明确, 但是多项研究提供了 ASD 脂肪酸代谢异常的证据。例如, ASD 患者 C5DC、C26 水平显著降低, 可作为 ASD 诊断的潜在标志物^[8]; 另一项研究发现, ASD 患者出现包括 C5OH 及长链酰基肉碱在内的多种酰基肉碱升高^[26]; 也有研究发现, C5OH 等多种酰基肉碱在 ASD 的代谢异常^[27]。酰基肉碱包括短链 (2~5 碳长)、中链 (6~12 碳长) 和长链 (>12 碳长), 本研究 ASD 组长链酰基肉碱 C14、C16、C18 低于对照组 ($P<0. 05$), 长链脂肪酸通过肉碱转运蛋白进入线粒体基质中, 长链酰基肉碱降低会导致人体供能障碍, 在儿童发育的关键阶段能量供应不足及细胞中脂质沉积是 ASD 的一个风险因素。此外, 本研究中链酰基肉碱 C8、C10 高于对照组, C12 则相反, 差异均有统计学意义 ($P<0. 05$); 两组短链酰基肉碱 C5 低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0. 05$), 这些中短链酰基肉碱代谢异常导致的有机酸异常蓄积对神经系统是有害的。多因素 Logistic 分析结果显示, C5OH、C12、C16 是 ASD 的独立影响因素, 这 3 项指标中 C12 及 C16 属于中长链脂肪酸, C5OH 增高可导致生物素

缺乏中间代谢产物存在异常有机酸蓄积,因此 3 项指标包含脂肪酸氧化功能及有机酸蓄积,与儿童早期神经发育密切相关,在一定程度上代表 ASD 的高风险因素。

综上所述,GLY 联合 C5OH、C12、C16 对 2~4 岁 ASD 儿童有较好的识别价值,虽然 ASD 发病机制仍不明确,但探讨 ASD 儿童氨基酸及肉碱代谢,以及分析 ASD 早期识别的风险因素,可为临床对 ASD 早期干预提供参考,对 ASD 及早康复治疗具有重要的意义。本研究,受检测限制部分氨基酸及肉碱未出现在本研究,同时样本量受限存在一定的局限性,今后将继续积累资料进行多中心研究。

参考文献

[1] INUI T,KUMAGAYA S,MYOWA-YAMAKOSHI M. Neurodevelopmental hypothesis about the etiology of autism spectrum disorders[J]. *Front Hum Neurosci*,2017, 11:354.

[2] LORD C,BRUGHA T S,CHARMAN T,et al. Autism spectrum disorder[J]. *Nat Rev Dis Primers*,2020,6(1):5.

[3] TALANTSEVA O I,ROMANOVA R S,SHURDOVA E M,et al. The global prevalence of autism spectrum disorder;a three-level meta-analysis[J]. *Front Psychiatry*, 2023,14:1071181.

[4] DANIOLOU S,PANDIS N,ZNOJ H. The efficacy of early interventions for children with autism spectrum disorders;a systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Med*,2022,11(17):5100.

[5] 中华医学会儿科学分会发育行为学组,中国医师协会儿 科分会儿童保健专业委员会,儿童孤独症诊断与防治技 术和标准研究项目专家组. 孤独症谱系障碍儿童早期识 别筛查和早期干预专家共识[J]. *中华儿科杂志*,2017,55 (12):890-897.

[6] 中华医学会儿科学分会发育行为学组,中国医师协会儿 科分会儿童保健学组. 中国低龄儿童孤独症谱系障碍早 期诊断专家共识[J]. *中华儿科杂志*,2022,60(7):640- 646.

[7] 邱继红,王敏建. 血清中氧化甾醇水平在孤独症谱系障碍 儿童早期识别中的价值[J]. *重庆医学*,2021,50(16): 2779-2782.

[8] LV Q Q,YOU C,ZOU X B,et al. Acyl-carnitine,C5DC, and C26 as potential biomarkers for diagnosis of autism spectrum disorder in children[J]. *Psychiatry Res*,2018, 267:277-280.

[9] SIRACUSANO M,RICCIONI A,ABATE R,et al. Vita- min D deficiency and autism spectrum disorder[J]. *Curr Pharm Des*,2020,26(21):2460-2474.

[10] 王峰,张瑜珏,赵婧怡,等. 孤独症谱系障碍儿童血浆叶酸 相关代谢物质水平及其与临床表征的关系[J]. *中国儿童 保健杂志*,2023,31(2):152-155.

[11] ROJAS-CHARRY L,NARDI L,METHNER A,et al. Abnormalities of synaptic mitochondria in autism spec- trum disorder and related neurodevelopmental disorders

[J]. *J Mol Med (Berl)*,2021,99(2):161-178.

[12] 周鸿铭,雷娜,鲁亚平. 甘氨酸神经递质研究进展[J]. *生 物学杂志*,2011,28(1):79-81.

[13] MCCANN M R,GEORGE D L R M,ROSANIA G R,et al. L-carnitine and acylcarnitines: mitochondrial biomarkers for precision medicine[J]. *Metabolites*,2021,11(1):51.

[14] RODDY A,O'NEILL C. The economic costs and its pre- dictors for childhood autism spectrum disorders in Ire- land;how is the burden distributed? [J]. *Autism*,2019, 23(5):1106-1118.

[15] LI Q,LI Y,LIU B,et al. Prevalence of autism spectrum disorder among children and adolescents in the United States from 2019 to 2020[J]. *JAMA Pediatr*,2022,176 (9):943-945.

[16] ZHOU H,XU X,YAN W,et al. Prevalence of autism spectrum disorder in china: a nationwide multi-center population-based study among children aged 6 to 12 years [J]. *Neurosci Bull*,2020,36(9):961-971.

[17] 夏宝妹,陈畅. 孤独症谱系障碍发病原因研究进展[J]. *精 神医学杂志*,2019,32(5):383-387.

[18] 柯晓燕. 孤独症谱系障碍早期识别与早期诊断的现状与 挑战[J]. *中国儿童保健杂志*,2023,31(3):238-240.

[19] PILOGE M,FASSIER C,LE CORRONC H,et al. Ge- netic and functional analyses demonstrate a role for ab- normal glycinergic signaling in autism[J]. *Mol Psychia- try*,2016,21(7):936-945.

[20] FOGARTY M J. Inhibitory synaptic influences on devel- opmental motor disorders[J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(8): 6962.

[21] CHEN X,WILSON K A,SCHAEFER N,et al. Loss, gain and altered function of GlyR $\alpha 2$ subunit mutations in neurodevelopmental disorders[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022,15:886729.

[22] PIETROPAOLO S,PROVENZANO G. Editorial: target- ing excitation-inhibition imbalance in neurodevelopmental and autism spectrum disorders[J]. *Front Neurosci*, 2022,16:968115.

[23] NELSON S B,VALAKH V. Excitatory/inhibitory bal- ance and circuit homeostasis in autism spectrum disor- ders[J]. *Neuron*,2015,87(4):684-698.

[24] RAMSAY R R,GANDOUR R D,van der LEIJ F R. Mo- lecular enzymology of carnitine transfer and transport [J]. *Biochim Biophys Acta*,2001,1546(1):21-43.

[25] YARDENI T,CRISTANCHO A G,MCCOY A J,et al. An mtDNA mutant mouse demonstrates that mitochon- drial deficiency can result in autism endophenotypes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2021,118(6):e2021429118.

[26] BARONE R,ALAIMO S,MESSINA M,et al. A subset of patients with autism spectrum disorders show a dis- tinctive metabolic profile by dried blood spot analyses [J]. *Front Psychiatry*,2018,9:636.

[27] 王若涵. 孤独症谱系障碍患儿血浆酰基肉碱水平及临床 意义[D]. 广州:广州医科大学,2021.