

代谢生物标志物关联分析抑郁症与心理亚健康的差异性

孟彦^{1),2)}, 张波³⁾, 武嫣斐⁴⁾, 向欢³⁾, 秦雪梅^{1),2)}, 田俊生^{1),2)}*

(¹⁾ 山西大学 中医药现代研究中心, 太原 030006; (²⁾ 地中药功效与物质研究与利用山西省重点实验室, 太原 030006;

(³⁾ 山西大学 体育学院运动人体科学系, 太原 030006; (⁴⁾ 山西医科大学第一医院中医科, 太原 030001)

摘要 分析抑郁症和心理亚健康的关联代谢生物标志物, 为二者的临床诊断识别以及早期药物防治提供参考。筛选 18 例抑郁症患者和 23 例心理亚健康受试者, 空腹采集其静脉血。采用 ¹H-NMR 代谢组学技术并结合单变量、多元统计、相关性以及倍数变化 (Fold Change, *FC*) 等分析方法, 筛选二者内源性差异代谢物, 并作为候选的关联代谢生物标志物, 再以受试者工作曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 对其诊断识别能力进行评估。选择 $1r1 > 0.6$ 、 $FC > 1.5$ 为临界指标, 对候选的代谢生物标志物进行筛选, 候选的差异代谢物在两组受试者之间存在显著差异 ($P < 0.05, 0.01$)。主要有 3-OH-丁酸盐、醋酸盐、丙氨酸、甜菜碱和肉碱等。受试者工作曲线下面积 (*AUC*) 结果显示, 肉碱、胆碱、组氨酸和脂质 ($AUC > 0.85$) 对于关联抑郁症和心理亚健康, 具有较高的诊断价值以及预测能力, 为提高抑郁症临床诊断准确度和可信度开辟新途径, 并为心理亚健康受试者的早期识别和防治, 阻止其发展成为精神类疾病提供参考。

关键词 抑郁症; 心理亚健康; 相关分析; 代谢生物标志物; 受试者工作曲线

中图分类号 R446

Correlation Analysis on the Differences between Depression and Psychological Suboptimal Health by Metabolic Biomarkers

MENG Yan^{1),2)}, ZHANG Bo³⁾, WU Yan-Fei⁴⁾, XIANG Huan³⁾, QIN Xue-Mei^{1),2)}, TIAN Jun-Sheng^{1),2)}*

(¹⁾ Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006;

(²⁾ Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Taiyuan 030006;

(³⁾ Physical Education Departments, Shanxi University, Taiyuan 030006; (⁴⁾ Department of Chinese Medicine of First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi China)

Abstract Many people in the modern society are inflicted with depression and psychological suboptimal health. Here we analyzed the metabolic biomarkers associated with these two conditions, aiming to provide a reference for the clinical diagnosis and identification as well as the early therapeutic prevention and treatment. 18 patients with depression and 23 suboptimal health subjects were screened, and their venous blood was collected. We used the method of ¹H-NMR metabolomics, combined with the univariate analysis, multivariate statistics, correlation and Fold Change (*FC*), and screened the endogenous

收稿日期: 2017-11-22; 修回日期: 2018-01-07; 接受日期: 2018-01-14

国家自然科学基金项目 (No. 81441096); 山西省卫生和计划生育委员会项目 (No. 2014ZY01); 山西省科技研究计划 (No. 201603D321077, No. 201603D3113013, No. 201601D011122, No. 201701D22111344); 山西省科技创新重点团队 (No. 201605D131045-18) 和山西省重点实验室 (No. 201605D111004) 资助

* 通讯作者 Tel: (0351) 7019297; E-mail: jstian@sxu.edu.cn

Received: November 22, 2017; Revised: January 7, 2018; Accepted: January 14, 2018

Supported by The Project of National Natural Science Foundation of China (No. 81441096); Shanxi Province Health and Family Planning Commission Project (No. 2014ZY01) the Science Technology Department of Shanxi Province (No. 201603D321077, No. 201603D3113013, No. 201601D011122, No. 201701D22111344); the Science and Technology Innovation Team of Shanxi Province (No. 201605D131045-18) and the Key Laboratory of Shanxi Province (No. 201605D111004)

* Corresponding author Tel: (0351) 7019297; E-mail: jstian@sxu.edu.cn

differential metabolites as potential metabolic biomarkers by $1r1 > 0.6$ and $FC > 1.5$ as critical indicators. Metabolites including 3-OH-butyrate, acetate, alanine, betaine and carnitine and so on showed significant differences between the two groups ($P < 0.05, 0.01$). Then the receiver operating characteristic curve (ROC) was used to assess the ability of identification and diagnosis. The area under the receiver operating characteristic curve (AUC) showed that carnitine, choline, histidine, and lipid ($AUC > 0.85$) had a high diagnostic value and predictive ability for associating depression and psychological suboptimal health. In summary, the present research could set up new measures for improving the accuracy and reliability of clinical diagnosis of depression. It will play a critical role in the early identification of psychological suboptimal health and prevent it from turning into mental diseases.

Key words depression; psychological suboptimal health; correlation analysis; biomarkers; receiver operating characteristic curve

随着现代生活节奏加快,精神类疾病逐渐引起人们的关注。抑郁症是以显著持久的心境低落为主要临床特征的情感障碍类疾病^[1],具有高患病、高复发、高致残和高医疗成本等特点,严重者有自杀倾向^[2]。世界卫生组织最新估计,全球有逾 3 亿人罹患抑郁症,约占总人口的 4.3%,近十年来增速约 18%,其中中国约有 5 400 万患者。

有关抑郁症的病因和发病机制不甚明确,可能与神经递质分泌减少、神经细胞的凋亡、炎症反应、肠道菌群失调等多种因素有关^[3]。现阶段临床诊断仍需借助量表,药物干预是其主要的治疗手段,缺乏特异性的诊断识别方法和有效防控措施。

临床症状表现相对较轻、且不符合抑郁症的诊断标准,不能诊断为疾病的心理亚健康状态人群数量急剧增加。王崑^[4]指出处于亚健康状态者,不能达到健康标准,表现为一定时间内的行为活动减少,功能和适应能力减退,但不符合现代医学有关疾病的临床诊断标准。WHO 在调查中也指出,世界上处于亚健康状态的人群比例高达 75%,美国和日本约 60%,而中国则为 50% 左右^[5],其中处于心理亚健康状态的人群数量比例最大^[6],但同样缺乏特异性的识别方法和早期防控措施。

抑郁症属于已病范畴,而心理亚健康属于中医学理论中的“未病”范畴,与抑郁症存在“质”的区别。两者临床症状表现复杂多样,抑郁症会伴有兴趣缺失、无愉悦感、睡眠障碍、性欲减退、焦虑症状以及一些非特异性躯体不适^[7]。心理亚健康症状则表现出失眠多梦、大便异常、记忆力减退和注意力不集中等。虽然尚未达到精神类疾病的范畴,如长期得不到及时合理的干预,极易自发地转变为抑郁、焦虑、睡眠障碍、精神分裂等神经精神系统疾病,严重危害人类健康^[8]。

因此,本研究针对筛选符合纳入排除标准的抑

郁症患者和心理亚健康受试者的血浆样本,采用¹H-NMR 代谢组学技术进行代谢轮廓分析,并结合单变量、多元统计、以及相关性分析等手段,筛选造成二者差异的内源性差异代谢物,并作为关联的候选代谢生物标志物,再以受试者工作曲线(ROC)对其诊断识别能力进行评价,筛选出抑郁症与心理亚健康关联代谢生物标志物。

本研究结果对于提高抑郁症临床诊断的准确度和可信度,对于心理亚健康人群的早期识别、早期防治、防止其发展成为精神类疾病,对于改善居民生存状况,提高其生活质量具有重要的理论意义和实用价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Bruker 600-MHz 核磁分析仪(德国布鲁克公司),SC-3610 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),TGL-6 高速台式冷冻离心(上海力康科学仪器有限公司);重水(D₂O ALDRICH Chemistry, USA),磷酸二氢钠/磷酸氢二钠(天津市风船化学试剂科技有限公司),3-(三甲基硅基)丙酸钠盐(TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc, MA)。

1.2 研究对象诊断标准

抑郁症诊断标准:18 例抑郁症受试者(18 ~ 65 岁)来源为山西医科大学第一医院中医科就诊的抑郁症患者。入组病例须符合以下标准:(1)符合《中国精神疾病分类及诊断标准》(CCMD-3)诊断标准;(2)无抑郁病史^[9];(3)在汉密尔顿抑郁量表(HAMD)中,17 个项目的得分在 17 ~ 24 之间^[10]。心理亚健康识别标准^[6, 11]:23 例心理亚健康受试者(18 ~ 65 岁)来源于山西医科大学第一医院中医科。入组受试者须符合以下标准:症状自评量表(SCL-90)总分在 90 ~ 250 分之间,各项因子症状(忧郁、

人际关系敏感、强迫症状、偏执等)任何一个因子的均分在 1~4 分之间。

1.3 研究对象排除标准

抑郁症排除标准^[12]:有癫痫病史者;妊娠期和哺乳期妇女;筛选前 1 个月内参加过其他药物临床试验者;具有严重不稳定的躯体疾病者;1 年内有符合诊断标准的酒精和药物滥用或依赖者。心理亚健康受试者排除标准^[6];结合纳入者既往病史及辅助检查结果,经临床判断处于躯体或精神心理疾病;对酒精或精神活性物质滥用者;妊娠或者哺乳期妇女除外。

依据赫尔辛基宣言中的伦理原则,本研究方案通过山西医科大学第一医院伦理委员会审核批准,所有受试者符合上述纳入排除标准方可入组,并且签署知情同意书。

1.4 生物样本的采集

空腹采集全部受试者静脉血 5 mL 置于 10 mL 肝素钠真空采血管中,静置 0.5 h,室温下 3 000 r/min 离心 15 min 获得血浆,置于 1.5 mL EP 管中,-80 ℃ 冰箱保存。所有受试者在样本采集前 24 h 内禁止饮酒及食用海鲜等食品,晚上 10:00 后禁食禁水。

1.5 血浆样本的预处理

血浆样本置于冰水混合物中解冻,取 450 μL 至 EP 管中,加入 900 μL 甲醇,于 4℃ 13 000 r/min 离心 20 min 沉淀蛋白质,将 1 000 μL 上清液转移置 EP 管中。再次加入 900 μL 甲醇,涡旋混合,于 4 ℃ 13 000 r/min 离心 20 min。合并上清液 1 800 μL 氮气吹干,加入 600 μL PBS 磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L NaH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄ 溶于重水,调节 pH 为 7.4,含 0.01% TSP),在 4℃ 13 000 r/min 离心 10 min,移取上清液 550 μL 转移置内径 5 mm 的核磁管中待测。

1.6 NMR 检测条件

采用 Bruker 600-MHz AVANCE III 核磁分析仪(德国布鲁克公司)采集一维¹H-NMR 图谱,使用 CPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill)脉冲序列以压制水峰信号,检测温度为 298 K,每个样品扫描次数 64 次,采样时间 2.7 min。其相关参数设置:光谱宽度 12 019.2 Hz,脉冲时间 14.0 μs,采样数据点 65 536, FID 分辨率 LB=0.3 Hz。

1.7 NMR 图谱处理

对所有血浆¹H-NMR 图谱使用核磁图谱处理软件 MestReNova 依次进行基线、相位调整,以内标 TSP 的化学位移(δ 0.0)对谱峰化学位移进行校准。

为消除水峰和甲醇峰对分析结果的影响,将 δ 3.31~3.38 和 δ 4.70~5.20 区间的谱峰进行手动切除,叠加所有核磁图谱并以 0.01 为积分基本单位,对图谱中 δ 0.5~9.0 的区域进行等宽度分割积分,得到的积分值进行归一化处理,数据以矩阵形式保存进行后续分析。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行单变量数据分析,同时积分数据矩阵导入代谢组学数据分析软件 SIMCA-P 14.1(Umetric, Sweden)进行多元统计分析,用代谢组学在线分析平台 MetaboAnalyst 3.0 ([http:// www. metaboanalyst. ca/](http://www.metaboanalyst.ca/))的 Statistical Analysis 模块进行关联分析、倍数变化分析。

2 结果

2.1 临床样本基本信息

本研究采用相应量表对门诊病人进行抑郁症患者与心理亚健康受试者识别,受试者部分信息如 Table 1:其中抑郁症患者:男性 8 例,女性 10 例,年龄为 46.6 ± 8.5;心理亚健康受试者:男性 5 例,女性 18 例,年龄为 44.4 ± 10.0。采用独立样本 *t* 检验和卡方检验(Chi-squar)分别对两组受试者年龄及性别做差异显著性分析,均未表现出显著性差异(*P*>0.05),说明两组样本在年龄及性别分布上具有一致性。

Table 1 Basic information and scale scores of subjects		
Projects	Depression	Suboptimal health
Sample size	18	23
Sex (M/ F)	8/10	5/18
Age (year)	46.6 ± 8.5	44.4 ± 10.0
HAMD ($\bar{x} \pm s$)	19.6 ± 2.2	—
SCL-90($\bar{x} \pm s$)	—	155 ± 34

2.2 血浆¹H-NMR 核磁图谱指认

Fig. 1 为血浆¹H-NMR 典型图谱,结合 Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc, Edmonton, AB, Canada) 软件、HMDB ([http://www. hmdb. ca/](http://www.hmdb.ca/)) 数据库,以及相关文献^[6,12,13]和 2D NMR 核磁图谱,对本研究所得¹H-NMR 图谱进行谱峰指认,共指认出 35 种化合物,其化学位移和谱峰归属信息见 Table 2。

2.3 多元统计分析

采用多元统计分析,可以在最大程度保留原始信息的基础上,将高维复杂的数据进行处理,建立相应的数学模型。本研究采用的多元统计分析,就是

Table 2 Peak attribution of the main marked metabolites in¹H-NMR spectra of plasma samples

Number	Metabolites	<i>P</i>	Group	δ <i>H</i> /ppm(Peak type, coupling constant /Hz)
1	2-OH-butyrate	0.73	γCH3	0.90 (t, 7.47)
2	3-OH-butyrate	0.04	γCH3	1.20 (d, 6.60)
3	Acetate	6.65E-12	βCH3	1.93 (s)
4	Acetoacetic acid	0.01	CH3 CH	2.28 (s) 3.48 (s)
5	Alanine	8.88E-10	βCH3 CH	1.48 (d, 7.3) 3.77 (m)
6	Betaine	0.02	N(CH3)3 CH2	3.27 (m) 3.89 (s)
7	Carnitine	5.49E-05	N(CH3)3	3.21 (s)
8	Choline	2.91E-05	N(CH3)3	3.20 (s)
9	Citric acid	0.09	Half CH2 Half CH2	2.54 (d, 16.1) 2.65 (d, 16.2)
10	Creatine	0.04	N-CH3 CH2	3.04 (s) 3.93(s)
11	Cysteine	0.55	CH CH2	3.97 (dd)3.06(m)
12	Glutamine	4.76E-05	αCH β CH2	2.16 (m) 2.45 (m)
13	Glutamic acid	2.30	βCH2 γ CH2	2.07 (m) 2.35 (m)
14	Glycine	0.88	αCH2	3.57 (s)
15	Glycerin	2.69E-11	CH2 CH	3.67 (m) 3.78 (m)
16	Histidine	2.74E-08	4-CH	7.10 (s)
17	Isoleucine	0.01	δCH3 γ CH3	0.94 (t, 7.4) 1.02 (d, 7.0)
18	Lactate	0.88	βCH3 α CH	1.33 (d, 6.9) 4.12 (q, 6.9)
19	Leucine	0.04	δCH3 α CH2	0.96 (d) 3.73 (m)
20	Lipid	0.0001	CH3	0.84 (q)
21	Methionine	0.05	γCH2 S-CH3	2.62 (t, 7.58) 2.14 (s)
22	Methylamine	0.99	CH3	2.61 (s)
23	Methanol	-	CH3	3.36 (s)
24	N-acetyl-glycoprotein	2.23E-12	CH3	2.04 (s)
25	Phosphatidylcholine	0.22	N(CH3)3	3.22 (s)
26	Phenylalanine	0.69	2 and 6-CH 3 and 5-CH	7.33 (m) 7.42 (m)
27	Proline	0.02	αCH2 β CH2	1.99 (m) 2.34 (m)
28	Alanine	0.55	CH3	2.38 (m)
29	Trimethylamine	8.9E-05	CH3	3.26 (m)
30	oxide Tyrosine	7.31E-07	3 and 5-CH 2 and 6-CH	6.90 (m) 7.19 (m)
31	Valine	0.45	γCH3 γ' CH3	0.99 (d, 7.1) 1.05 (d, 7.0)
32	Glucose	0.0002	C1H	5.24 (d, 3.7) 4.64 (d, 8.0)
33	Arginine	0.29	α CH2	1.92(m)
34	Glucosamine	0.39	βCH2γCH2	2.16 (m)2.54(m)
35	Lysine	0.27	CH2	3.02(m)1.73(m)

P: psychological suboptimal health *vs* depression. s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet, dd: doublet of doublet

将高维复杂的数据进行“简化和降维”,由于临床样本受到年龄、性别、饮食和环境等因素的影响,所得到的数据更为复杂。为了更好的发现二者之间差异,采用有监督的 PLS-DA 进行¹H-NMR 代谢轮廓分析,结果如 Fig. 2 A 所示(模型参数 $R^2X = 0.52$, $R^2Y = 0.998$, $Q^2Y = 0.973$)。进一步对 PLS-DA 分析结果进行置换数为 200 次的模型验证,结果如 Fig. 2B 所示(原始数据与排列数据之间的参数值为 $R^2 = 0.9982$, $Q^2 = 0.9733$), R^2 与 Q^2 的截距分别

为 0.93, -0.083,综合模型参数以及模型验证结果显示没有过度拟合。由 Fig. 2 A 可知,心理亚健康受试者与抑郁症患者各自聚集成两组,并且沿 t[1] 轴明显分开,表明心理亚健康受试者与抑郁症患者存在明显的差异。

2.4 候选代谢生物标志物的发现与识别

为了发现心理亚健康受试者与抑郁症患者血浆中存在的候选差异生物标志物,使用有监督的正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),将二者之间存

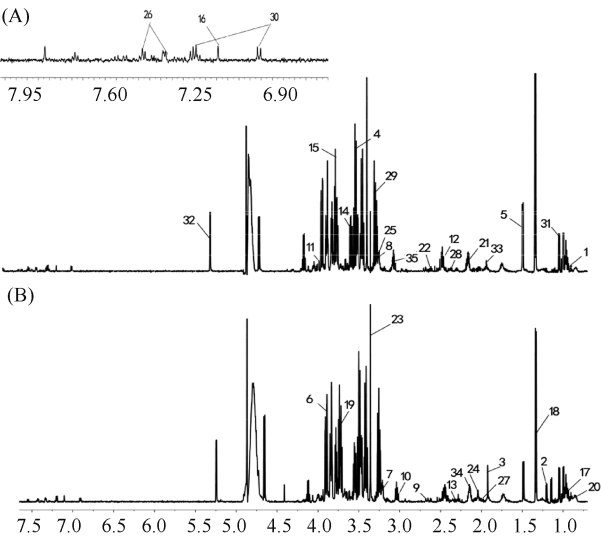


Fig. 1 Representative 600 MHz ¹H-NMR spectra of plasma samples (A: depression, B: suboptimal health) Plasma samples were collected from the subjects of the study. The chemical shifts of metabolites were represented by the abscissa and the numbers corresponding to different metabolites were as follow: 1) 2-OH-butyrate, 2) 3-OH-butyrate, 3) Acetate, 4) Acetoacetic acid, 5) Alanine, 6) Betaine, 7) Carnitine, 8) Choline, 9) Citric acid, 10) Creatine, 11) Cysteine, 12) Glutamine, 13) Glutamic acid, 14) Glycine, 15) Glycerin, 16) Histidine, 17) Isoleucine, 18) Lactate, 19) Leucine, 20) Lipid, 21) Methionine, 22) Methylamine, 23) Methanol, 24) N-acetyl-glycoprotein, 25) Phosphatidylcholine, 26) Phenylalanine, 27) Proline, 28) Alanine, 29) Trimethylamine oxide, 30) Tyrosine, 31) Valine, 32) Glucose, 33) Arginine, 34) Glucosamine, 35) Lysine

在的细微差异放大,此法在 PLS 的基础上增加了对正交信号的校正,即衍生算法。它能预先设定 Y 值来进行目标分类和判别。使得模型能够过滤掉那些与结果预测没有显著性关系的变化,这样的结果更清晰并适合于临床应用。在 OPLS-DA 得分图 (Fig. 2C) 以及在排列测试的 CV-ANOVA ($P < 0.05$) 中 (方差分析),显示心理亚健康组与抑郁症组能够较好地分离,两组之间存在显著差异,(模型参数值 $R^2X = 0.374$, $R^2Y = 0.993$, $Q^2Y = 0.962$)。

Fig. 2D 为 OPLS-DA 分析 S-plot 图,展示结果为对两组分离具有显著贡献的代谢物,其中“S”曲线上离原点越远的点,VIP 值越大,对分组贡献也越大。在本文中筛选出 $VIP > 1$ 的内源性代谢物后,对其所属的相对峰面积进行独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。采用单维分析作为辅助手段,验证和筛选得到的差异性变量,从而获得具有显著性差异的内源性候选代谢生物标志物,其分别是 3-OH 丁酸盐、醋酸盐、乙酰乙酸、丙氨酸、甜菜

碱、肉碱、胆碱、谷氨酰胺、甘油、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脂质、N-乙酰基-糖蛋白、酪氨酸和葡萄糖。进一步将上述结果采用热图分析,能更加直观地展示变化趋势 (Fig. 3),颜色加深表明在血浆中表达水平升高,相反,则表达水平降低。

2.5 候选代谢生物标志物筛选分析

为了从海量数据中筛选出差异性的变量,挖掘和提取更有意义的信息,对初步筛选的差异代谢物进行相关性以及倍数变化 (FC) 统计分析,使得多标准筛选的差异性变量能更好反应多种因素造成的体内代谢紊乱。采用 Metaboanalyst 3.0 在线数据分析系统,进行相关性分析和倍数变化分析,进一步筛选候选代谢生物标志物。结果如 Fig. 4 A 所示,粉色代表生物标志物之间呈现正相关,表示代谢物相关联的代谢途径可能存在一定的相同或相似。与此相反,蓝色代表负相关,表明与代谢物相关的代谢途径有差异。

以相关系数 $1r1 > 0.6$ 为临界指标筛选出 8 种代谢物,其中 5 中呈现正相关 (其中甘油、组氨酸、胆碱、肉碱和脂质),3 种呈现负相关 (醋酸盐、N-乙酰基-糖蛋白和酪氨酸),相关系数值如 Table 3 所示。以 $FC > 1.5$ 为临界值,筛选得到 3-OH 丁酸盐、醋酸盐、肉碱、胆碱、组氨酸、异亮氨酸、脂质、N-乙酰基-糖蛋白和酪氨酸 9 种代谢物如 Fig. 4B 所示。同时采用两种分析方法可以相互补充,使筛选结果更加可靠,综合以上结果,得出存在显著差异的差异代谢物有醋酸盐、肉碱、胆碱、组氨酸、脂质、N-乙酰基-糖蛋白和酪氨酸。

Table 3 The r value (Pearson correlation coefficients) of differential metabolites

Number	Metabolites	r (Pearson correlation coefficients)
1	Glycerin	0.89609
2	Acetate	-0.86540
3	N-acetyl-glycoprotein	-0.84661
4	Histidine	0.77779
5	Tyrosine	-0.68758
6	Choline	0.67172
7	Carnitine	0.62872
8	Lipid	0.60575
9	Glucose	0.59665
10	Glutamine	-0.57000
11	Isoleucine	0.45249
12	Acetoacetic acid	-0.41434
13	Betaine	0.36260
14	3-OH-butyrate	0.35880
15	Leucine	0.34496
16	Alanine	0.33144

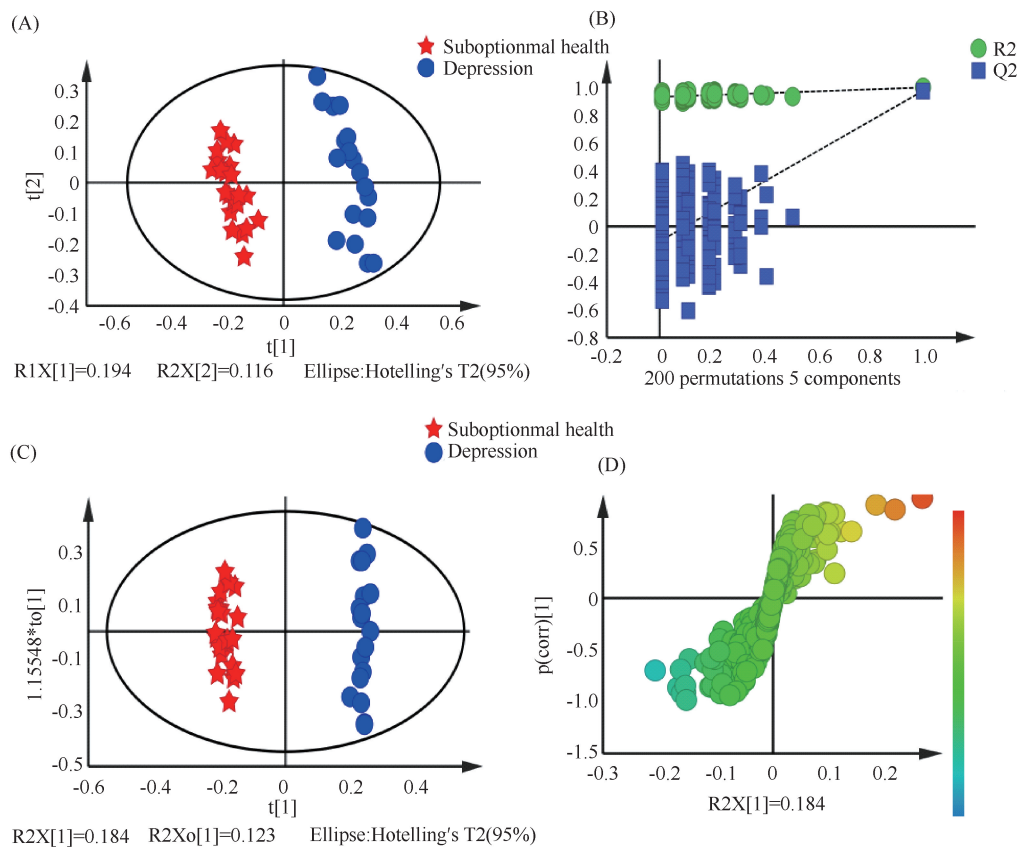


Fig. 2 Discovery of the differential biomarkers from ¹H-NMR spectra of plasma (A) The PLS-DA and (C) OPLS-DA score plots derived from ¹H NMR spectra of plasma were used for observing the sample distribution. The first and second component (t1 and t2) were represented by the abscissa and the ordinate in the PLS-DA score plots, respectively. Besides, the first component t1 and orthogonal component (t1 and t01) were represented by the abscissa and the ordinate in the OPLS-DA score plots, respectively. (B) The corresponding 200 permutation test of PLS-DA was used to confirm the model. The predicted values and the observed values were represented by the abscissa and the ordinate, respectively. (D) The corresponding S-plot of OPLS-DA. The covariance and correlation were represented by the abscissa and the ordinate, respectively

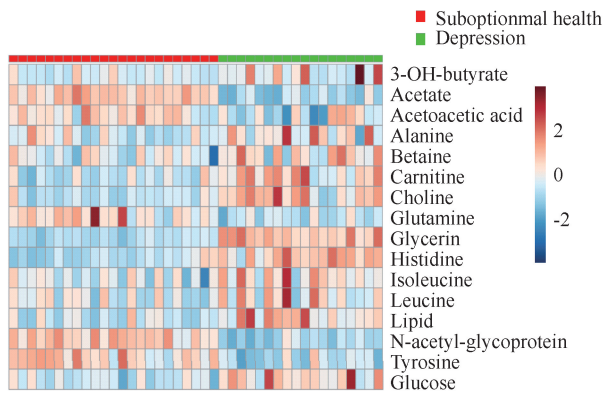


Fig. 3 The heatmap of candidate biomarkers screened by multivariate statistics combined with univariate analysis The redder the colour, the higher the expression level in plasma. And vice versa. The candidate biomarkers include 3-OH butyrate, acetate, acetoacetic acid, alanine, betaine, carnitine, choline, glutamine, glycerine, histidine, isoleucine, leucine, lipid, n-acetyl-glycoprotein, tyrosine and glucose

2.6 代谢生物标志物诊断能力评价

受试者工作曲线(ROC)用于识别某种疾病的生物标志物,以及诊断生物标志物并能够加以预测。ROC 曲线下面积(AUC)能够权衡灵敏度与专属性,用来描述生物标志物方面的性能。为比较不同生物标志物的性能,采用受试者工作曲线(ROC)和 ROC 曲线下面积(AUC)对筛选的候选代谢生物标志物进行诊断能力评估。ROC 曲线下面积(AUC)取值范围一般在 0.5 ~ 1 之间。如 AUC < 0.5 表明所筛选出的生物标志物没有诊断价值,0.5 < AUC < 0.7 表明生物标志物诊断能力较差,且准确性较低,这可能与样本量太少有关,0.7 < AUC < 0.9 表明生物标志物有较高的诊断能力,而 AUC > 0.9 则表明生物标志物具有很高的诊断价值以及诊断能力^[14]。本研究结果如 Fig. 5 和 Table 4 所示,由图表信息可知,肉碱、胆碱、组氨酸和脂质(AUC > 0.85)具有较高的诊断价值以及预测能力,其可能是关联抑郁症患者和心理亚健康受试者二者差异的代谢生物标志物。

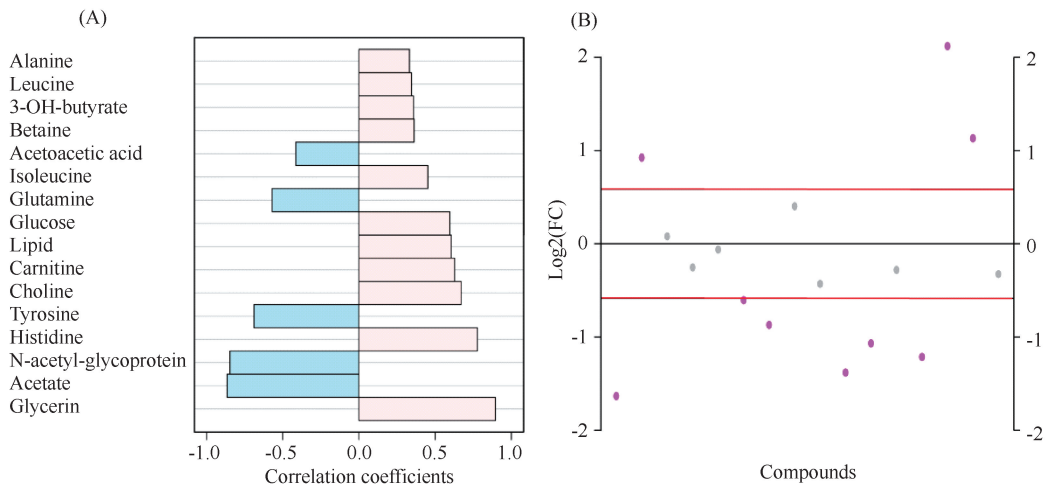


Fig. 4 Screening of the candidate biomarkers from ¹H-NMR spectra of plasma The potential metabolic biomarkers were screened by $|r| > 0.6$ and $FC > 1.5$ as critical indicators. (A) the results of the correlation analysis of candidate biomarkers show that acetoacetic acid, glutamine, tyrosine, N-acetyl-glycoprotein, and acetate were negatively correlated; 3-OH-butyrate, alanine, betaine, carnitine, choline, glycerin, histidine, isoleucine, leucine, lipid and glucose were positively correlated (B) Candidate biomarkers were screened by the fold change analysis including 3-OH butyrate, acetate, carnitine, choline, histidine, isoleucine, lipid, N-acetyl-glycoprotein, tyrosine

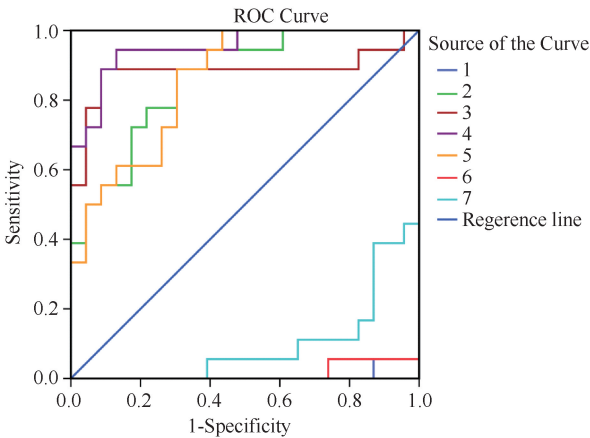


Fig. 5 ROC curves used for evaluating diagnostic capabilities of biomarkers (1) Acetate; (2) Carnitine; (3) Choline; (4) Histidine; (5) Lipid; (6) N-acetyl-glycoprotein; (7) Tyrosine

Table 4 Information of the ROC curve under the area (AUC)

Number	Test result variable(s)	Area	Std. error	Asymptotic sig.	Asymptotic 95% confidence interval
1	Acetate	0.007	0.009	<0.001	−0.010 −0.250
2	Carnitine	0.860	0.056	<0.001	0.749 −0.970
3	Choline	0.882	0.067	<0.001	0.749 −1.014
4	Histidine	0.949	0.033	<0.001	0.885 −1.014
5	Lipid	0.855	0.057	<0.001	0.744 −0.967
6	N-acetyl-glycoprotein	0.014	0.016	<0.001	−0.061 −0.045
7	Tyrosine	0.094	0.047	<0.001	0.003 −0.186

本研究首先对受试者临床样本信息如年龄及性别做差异显著性分析,结果显示两组样本在年龄及性别分布上具有一致性($P > 0.05$)。之后采用多元统计分析结合单维分析验证和筛选得到的差异性变

3 讨论

抑郁症作为一种精神类疾病,在国内外普遍存在。近年来其患病率呈现逐年上升趋势,部分患者未能及时诊断,甚至导致自杀。心理亚健康则是一种持续消极的心理状态,但尚未到达疾病的范畴。这种持续消极状态严重影响主体的生活质量,若没有及时有效调整,存在进一步发展成为多种精神系统疾病的隐患。目前,二者在临床诊治方面仍需借助量表诊断,但量表本身有其自身的局限性和特异性,诊断过程中易受主观意识干扰。因此,发现关联抑郁症和心理亚健康的代谢生物标志物,有望为二者的临床诊断识别和有效干预提供依据。

量。后续采用多标准筛选差异性变量。用于临床的诊断生物标志物必须具有高灵敏度和专属性。对于比较不同生物标志物的性能,ROC 曲线下面积值(AUC)可以作为一种强有力的测量手段。最终确定

肉碱、胆碱、组氨酸、脂质具有较高的诊断价值以及预测能力,其有可能是关联抑郁症患者和心理亚健康受试者二者差异的代谢生物标志物。

胆碱由磷酸酰胆碱转化而成,并通过肠道菌群代谢转化为氧化三甲胺^[15,16]。有研究表明,抑郁症患者肠道菌群代谢紊乱导致血浆中氧化三甲胺、氧化二甲胺的变化。组氨酸是人体非必须氨基酸之一,经脱羧反应后可形成组胺,组胺是一种神经递质,可以刺激胃蛋白以及胃酸分泌增加食欲。组氨酸与人体食欲存在密切的关系^[17]。食欲减退是抑郁症与心理亚健康重要的临床症状之一。肉碱作为一种氨基酸衍生物,可以作为长链脂酰 CoA 的载体,把长链脂肪酸从其线粒体外的活化位点转运到线粒体基质内的氧化位点。肉碱提高骨骼肌呼吸链功能和能量合成,抗氧化能力和脂质过氧化能力,且与人体的免疫功能有密切的关系,而脂质代谢异常与抑郁症有密切的联系^[18,19]。

在生物体内代谢物能够反应机体系统的生理病理状态,而代谢组学技术能够捕获这一变化。NMR 分析以其具有对样品无创性,无偏向性检测等优点,成为代谢组学研究中重要的技术之一。除 NMR 代谢组学技术,还有气相色谱-质谱(GC-MS)、液相色谱-质谱(LC-MS)等技术手段。Robert^[21]等人对慢性疲劳综合症^[20]做了相关的靶标代谢组学分析,采用液相色谱,电喷雾离子化和串联质谱法相结合的技术,在血浆中从生化途径定位不同的代谢物。Tian^[6]等人采用核磁代谢组学技术,发现并筛选得到心理亚健康受试者的血浆生物标志物组,但并未与抑郁症进行关联性研究。Liu^[11]等人在研究中药复方逍遥散对抑郁症病人血浆生物标志物的影响中发现,与健康人相比,抑郁症患者血浆中的三氯乙酰胺、苯丙氨酸、亮氨酸、胆碱、脂质等物质显著变化。上述结果中的胆碱和脂质与本研究获得的关联代谢生物标志物相吻合。

现阶段国外对心理亚健康的研究较少,且部分研究主要集中在心理亚健康或抑郁症的单一领域。本研究应用¹H-NMR 代谢组学技术对二者进行相互关联,后续研究考虑多种手段相结合,建立更加全面的分析方法,对采集到的图谱信息进行综合分析。

虽然探寻到的关联性代谢生物标志物能够为抑郁症与心理亚健康的临床诊断开辟新途径。但是由于临床样本的个体差异较大,筛选出关联性代谢生物标志物仍然需要大量的临床样本进行验证。后续的研究有望扩大样本量,并结合临床表型症状对其

进一步佐证,为深入研究抑郁症与心理亚健康的关系以及临床诊断提供参考。

参考文献(References)

- [1] Bai S, Zhang X, Chen Z, *et al.* Insight into the metabolic mechanism of Diterpene Ginkgolides on antidepressant effects for attenuating behavioral deficits compared with venlafaxine [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**: 9591-9605
- [2] Paykel ES, Brugha T, Fryers T. Size and burden of depressive disorders in Europe [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2005, **15** (4): 411-423
- [3] Czarny P, Wigner P, Galecki P, *et al.* The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, **80** (Part C): 309-321
- [4] Yan YX, Liu YQ, Li M, *et al.* Development and evaluation of a questionnaire for measuring suboptimal health status in urban Chinese [J]. *J Epidemiol*, 2009, **19** (6): 333-341
- [5] Wang Y, Ge S, Yan Y, *et al.* China suboptimal health cohort study: rationale, design and baseline characteristics [J]. *J Transl Med*, 2016, **14** (1): 291-303.
- [6] Tian JS, Xia XT, Wu YF, *et al.* Discovery, screening and evaluation of a plasma biomarker panel for subjects with psychological suboptimal health state using ¹H-NMR-based metabolomics profiles [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 33820-33832
- [7] 胡随瑜,王素娥,张春虎. 抑郁症临床症状分层与中医辨证分型的关系[J]. *中西医结合学报* (Hu SY, Wang SE, Zhang CH. Relationship between symptom stratification and syndrome differentiation of traditional Chinese medicine for depressive episode [J]. *J Chin Integrative Med*), 2011, **9** (9): 933-936
- [8] 张潇,武嫣斐,高耀,等. 心理亚健康大鼠模型的建立及评价[J]. *中草药* (Zhang X, Wu YF, Tian JS, *et al.* Establishment and evaluation of rat model with psychological sub-health [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*), 2016, **47** (4): 610-616
- [9] Chen YF. Chinese classification of mental disorders (CCMD-3): towards integration in international classification [J]. *Psychopathology*, 2002, **35** (2-3): 171-175
- [10] Hamilton M. A rating scale for depression [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1960, **23** (1): 56-62
- [11] 王分,武嫣斐. 百合地黄汤治疗阴虚型心理亚健康 50 例[J]. *光明中医* (Wang X, Wu YF. The Treatment of 50 cases yin-deficiency type of psychological health groups with Baihe Dihuang Decoction [J]. *Guang Ming Zhong Yi*), 2014, **29** (12): 2558-2559
- [12] Liu CC, Wu YF, Feng GM, *et al.* Plasma-metabolite-biomarkers for the therapeutic response in depressed patients by the traditional Chinese medicine formula Xiaoyaosan: A ¹H-NMR-based metabolomics approach [J]. *J Affect Disord*, 2015, **185**: 156-163
- [13] Wu Q, Zhang Q, Sun B, *et al.* ¹H NMR-based metabonomic study on the metabolic changes in the plasma of patients with functional dyspepsia and the effect of acupuncture [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, **51** (3): 698-704
- [14] 夏小涛,孙宁,刘彩春,等. 基于¹H-NMR 代谢组学的抑郁症生物标志物发现及帕罗西汀干预作用[J]. *药学报* (Xia XT, Sun N, Liu CC, *et al.* Study on discovering potential biomarkers of depression and drug intervention of paroxetine based on ¹H-NMR metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin*), 2016, **54** (4): 595-599
- [15] Noh HS, Hah YS, Nilufar R, *et al.* Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity [J]. *J Neurosci Res*, 2006, **83** (4): 702-709
- [16] Dumas ME, Barton RH, Toye A, *et al.* Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103** (33): 12511-12516

- [17] 刘雅荣, 李晶洁, 吕书勤. 基于核磁共振的脾虚湿盛证肝癌患者血浆代谢组学研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化 (Liu YR, LI JJ, Lu SQ. Plasma Metabonomics analysis of Liver cancer patients of damp abundance due to spleen asthenia syndrome based on nuclear magnetic resonance [J]. Modern Trad Chin Med Mater Med—World Sci Technol), 2016, **18**(2): 296-301
- [18] 李洁, 彭丽娜. 肉碱对运动训练大鼠骨骼肌线粒体呼吸链功能及氧自由基代谢的影响[J]. 生理学报 (Li J, Peng LN. Effects of carnitine on respiratory chain and metabolism of oxygen radical in mitochondria of skeletal muscle after exhaustive running in training rat [J]. Acta Physiol Sin), 2013, **65**(6): 631-636
- [19] Wang J, Jiang C, Chen L, *et al.* A cross-sectional study to investigate the correlation between depression comorbid with anxiety and serum lipid levels [J]. Compr Psychiatry, 2016, **69**: 163-168
- [20] Fukuda K, Straus SE, Hickie I, *et al.* The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group [J]. Ann Intern Med, 1994, **121**(12): 953-959
- [21] Naviaux RK, Naviaux JC, Li K, *et al.* Metabolic features of chronic fatigue syndrome [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, **113**(37): E5472-5480