

## 脂肪酸代谢酶的表达异常对孤独症的诊断意义

陈建玲<sup>1,3</sup>, 傅迎美<sup>2</sup>, 禹顺英<sup>2</sup>, 陈静<sup>1</sup>, 杜亚松<sup>1\*</sup>

(上海交通大学医学院附属精神卫生中心 1. 儿少科; 2. 上海市重性精神病重点实验室, 上海 200030 ;  
3. 纽约州立基础研究院 神经生化研究室, 美国 纽约 10314)

**摘要:**目的 探讨脂肪酸代谢酶的表达水平对孤独症的诊断意义。方法 用蛋白质印迹法测定国外孤独症儿童的新鲜冰冻小脑组织中脂肪酸合酶(FASN)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、乙酰辅酶A合成酶1(AceCS1)和长链脂酰辅酶A合成酶1(ACSL1)蛋白质含量;用酶联免疫吸附实验检测国内孤独症儿童外周血中FASN、ACC、AceCS1和ACSL1的含量。结果 孤独症小脑组织及外周血中ACC和FASN的水平均高于对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。孤独症小脑组织及外周血中FASN、ACC、ACSL1及AceCS1的表达均与孤独症严重程度呈显著正相关( $P < 0.01$ )。结论 儿童孤独症症状的严重程度与脂肪酸代谢酶系的表达变化相关,脂肪酸代谢酶的表达异常可能是诊断儿童孤独症的生物标志物之一。

**关键词:** 孤独症;脂肪酸;小脑;脂肪酸合酶;乙酰辅酶A羧化酶

中图分类号:R749.94 文献标志码:A

## Significance of abnormal expression of fatty acid metabolic enzymes in the diagnosis of autism

CHEN Jian-ling<sup>1,3</sup>, FU Ying-mei<sup>2</sup>, YU Shun-ying<sup>2</sup>, CHEN Jing<sup>1</sup>, DU Ya-song<sup>1\*</sup>

(1. Department of Child & Adolescent Psychiatry; 2. Department of Shanghai Key Laboratory of Psychotic Disorders, Shanghai Mental Health Center, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; 3. Department of Neurochemistry, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, New York 10314, the United States)

**Abstract: Objective** To investigate the significance of expression level of fatty acid metabolic enzymes in the diagnosis of autism. **Methods** The protein content of fatty acid synthase (FASN), acetyl-CoA carboxylase (ACC), acetyl-CoA synthase 1 (AceCS1) and long chain acyl-CoA synthase 1 (ACSL1) in freshly frozen cerebellum tissues of autistic children were determined by Western blot. The levels of FASN, ACC, AceCS1 and ACSL1 in the peripheral blood of autistic children in China were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The levels of ACC and FASN in cerebellum and peripheral blood of autistic patients were higher than that of control groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The expressions of FASN, ACC, ACSL1 and AceCS1 in cerebellum tissue and peripheral blood of patients with autism were positively correlated with the severity of autism (all  $P < 0.01$ ). **Conclusions** The severity of autistic symptoms in children is related to the expression changes of fatty acid metabolic enzymes, and the abnormal expression of fatty acid metabolic enzymes may be a group of biomarkers for the diagnosis of autism in children.

**Key words:** autism; fatty acid; cerebellum; fatty acid synthase; acetyl coenzyme A carboxylase

收稿日期:2019-10-09 修回日期:2020-01-03

基金项目:国家重点研发计划(2017YFC1309903);上海市卫生计生委智慧医疗专项研究项目(2018ZHYL0210)

\*通信作者(corresponding author): yasongdu@yahoo.com.cn

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 主要表现为社会沟通和社会交往缺陷, 以及局限、重复的行为、兴趣或活动<sup>[1]</sup>。ASD 的病因及发病机制未明。有研究报道突触修剪障碍可能参与 ASD 的发病<sup>[2]</sup>。而脂肪酸 (fatty acid, FA) 在突触发育和形成中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。有研究表明, 必需脂肪酸摄入不足可能会增加 ASD 的发病风险, 母孕期补充  $\omega$ -3 不饱和脂肪酸能降低 ASD 的发病风险<sup>[4]</sup>。但  $\omega$ -3 不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 的补充却不能改善 ASD 患儿的临床症状<sup>[5]</sup>。提示必需脂肪酸在 ASD 发病中的作用尚存在学术争议<sup>[6]</sup>。动物模型研究发现, 脂肪酸合成代谢可能参与 ASD 的发病<sup>[7]</sup>。由于中国尚缺乏人脑组织库, 本研究以国外尸体 ASD 儿童的小脑组织及国内 ASD 儿童为研究对象, 探讨脂肪酸代谢在 ASD 中的作用及其与 ASD 症状严重程度相关性, 为寻找 ASD 的生物标志物提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 研究对象: 孤独症组儿童的小脑组织 [美国发育障碍患者脑和组织库 (Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders, BTBDD)] 8 例, 男 5 例, 女 3 例, 年龄 4~14 岁, 平均年龄 (9.1±3.4) 岁; 死后间隔时间 9~24 h, 平均 (15.1±4.8) h; 儿童孤独症评定量表 (Childhood Autism Rating Scale, CARS) 得分 32~58 分, 平均 (41.4±8.4) 分。对照组儿童的小脑组织 [美国国家儿童保健和人类发育研究所 (National Institute of Child Health and Human Development, NICHD)] 共入组 8 例, 男 5 例, 女 3 例, 年龄 4~14 岁, 平均年龄 (8.4±3.7) 岁; 死后间隔时间 10~21 h, 平均 (16.8±3.4) h; CARS 得分 15~21 分, 平均 (16.5±1.8) 分。CARS 量表的评分标准: <30 分, 无孤独症; 30~36 分, 轻、中度孤独症; 37~60 分, 重度孤独症。两组研究对象均需排除脆性 X 综合征或其他广泛发育障碍, 强迫症、情感障碍或其他神经精神疾病, 神经系统变性疾病、脑外伤或脑血管病。两组的年龄、性别及死后间隔时间无显著差异。两组儿童的小脑组织标本用于 Western blot 检测。该组研究经纽约州立基础研究院审核通过, 所有上述研究对象均已签署知情同意书。

2018 年 9 月至 2019 年 8 月在本院确诊为孤独症的患儿 60 例为研究组, 以同期来本院常规咨询但未诊断为任何精神疾病的健康儿童 36 名为对照组。所有孤独症患儿均符合美国精神障碍诊断与统计手册第五版 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, DSM-V) 孤独症谱系障碍的诊断标准。本研究共纳入孤独症患儿 60 例, 男 39 例, 女 21 例, 年龄 3~14 岁, 平均年龄 (7.3±3.2) 岁; 纳入对照组 36 名, 男 24 例, 女 12 例, 年龄 3~15 岁, 平均年龄 (7.3±3.1) 岁。两组儿童年龄和性别无显著差异。两组儿童的外周血标本用于 ELISA 检测。本研究通过上海市精神卫生中心伦理委员会批准 (文号: 2018-43), 所有研究对象均已签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂: 脂肪酸代谢酶抗体试剂盒 (Cell Signaling Technology 公司): 包含兔单克隆抗体脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FASN)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-coA-carboxylase, ACC)、乙酰辅酶 A 合成酶 1 (acetyl coenzyme A synthetase 1, AceCS1)、长链脂酰辅酶 A 合成酶 1 (long-chain acyl-coenzyme A synthetase 1, ACSL1) 和  $\beta$ -actin, 抗兔 IgG (anti-rabbit IgG, HRP linked antibody) 等; BCA 法蛋白浓度测定试剂盒 (Thermo Fisher 公司); SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (BioRad 公司); ELISA 试剂盒: FASN、ACSL1 和 AceCS1 (Biocompare 公司)、ACC (Cell Signaling Technology 公司) 等。

### 1.2 方法

1.2.1 蛋白质印迹 (Western blot) 检测小脑组织中脂肪酸代谢酶蛋白含量: 首先配置匀浆缓冲液; 其次把新鲜冰冻小脑组织制备成脑组织匀浆; 再进行 BCA 蛋白浓度测定, 制胶、上样、电泳、转膜、封闭和抗体孵育, 最后在暗室中显影鉴定。

1.2.2 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测外周血中脂肪酸代谢酶含量: 研究对象于就诊当日静脉采血 4 mL, 室温静置 2 h, 1 000×g 离心 20 min, 分离血清。根据 ELISA 试剂盒说明书分别进行检测。大致步骤为: 先将标准或样品加入 96 孔板中, 孵化并移除; 再加入特异性的检测抗体, 孵育和洗涤; 然后加入酶结合物, 孵育和洗涤; 最后加入终止液, 立即在酶标仪的 450 nm 处测量 A 值, 根据标准曲线计算结果。

### 1.3 统计学分析

所得图像用 Image J 软件进行吸光度值比较分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,计数资料以例数或百分率表示。用 IBM SPSS Statistics 20.0 进行统计分析,两组间脂肪酸代谢酶的表达水平的比较采用独立样本 *t* 检验。两组间年龄、死后间隔时间的比较采用独立样本 *t* 检验。两组间性别比较采用 $\chi^2$  检验。相关分析采用 Spearman 非参数相关分析法。

## 2 结果

### 2.1 孤独症尸体小脑中脂肪酸代谢酶系的蛋白表达水平与孤独症严重程度的相关性分析

孤独症组小脑组织中 ACC 和 FASN 的蛋白表达显著升高( $P<0.05$ ),而 AceCS1 和 ACSL1 无显著变化(图 1)。孤独症组小脑组织中 FASN、ACC、

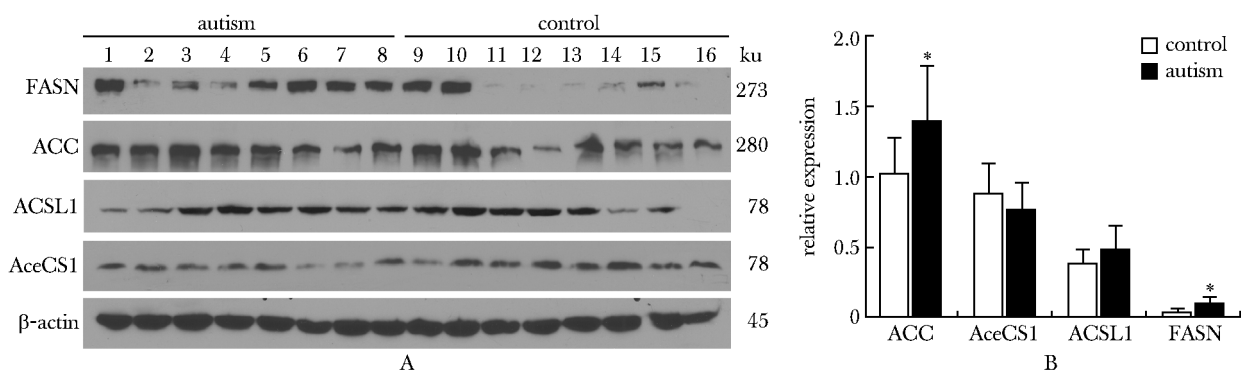
ACSL1 及 AceCS1 的蛋白表达均与 CARS 量表评分呈显著正相关( $P<0.01$ )(表 1)。

### 2.2 孤独症患者外周血中脂肪酸代谢酶的含量及与孤独症严重程度的相关性分析

孤独症患者外周血中 ACC 和 FASN 的含量明显高于对照组( $P<0.01$ ),而 AceCS1 和 ACSL1 无显著变化(表 2)。孤独症组儿童外周血中 FASN、ACC、ACSL1 及 AceCS1 的含量均与 CARS 量表评分呈显著正相关( $P<0.01$ )(表 3)。

## 3 讨论

本研究发现,孤独症小脑及血清中均存在脂肪酸代谢酶 ACC 和 FASN 的表达增加,其中 ACC 是脂肪酸合成的关键酶,且这一步骤的反应制约着脂肪酸合成过程中第一阶段的速度,ACC 的活性在一定程度上决定了脂肪酸的合成速度和含油量的高低<sup>[8]</sup>。



A. Western blot analysis of five markers, FASN, ACC, ACSL1, AceCS1 and  $\beta$ -actin, in the cerebellum specimen from non-autism controls and autism patients; B. relative expression of FASN, ACC, ACSL1 and AceCS1 levels between the autism and control groups; \* $P<0.05$  compared with the control group

图 1 脂肪酸代谢酶系在孤独症组和对照组小脑组织中的表达情况

Fig 1 Expression of fatty acid metabolic enzymes in the cerebellum specimen of autism group and control group

表 1 孤独症组小脑组织中脂肪酸代谢酶系蛋白表达水平与孤独症严重程度的相关性

Table 1 Correlation between the protein expression level of fatty acid metabolic enzymes in cerebellum and the severity of autism ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

group	CARS	fatty acid metabolism enzymes (r value)			
		FASN	ACC	ACSL1	AceCS1
control	16.5 $\pm$ 1.8	-0.09	-0.36	0.02	0.05
autism	41.4 $\pm$ 8.4	0.22*	0.81*	0.53*	0.41*

\* $P<0.01$  compared with control.

表 2 孤独症患者外周血中脂肪酸代谢酶含量

Table 2 Content of fatty acid metabolic enzymes in peripheral blood of children with autism ( $\bar{x}\pm s$ )

group	FASN/ (ng/mL)	ACC/ (ng/mL)	ACSL1/ (pg/mL)	AceCS1/ (ng/mL)	<i>n</i>
control	2.8 $\pm$ 0.2	5.7 $\pm$ 0.3	300.7 $\pm$ 31.8	3.7 $\pm$ 0.2	36
autism	4.5 $\pm$ 0.4*	7.8 $\pm$ 0.5*	325.0 $\pm$ 20.9	4.2 $\pm$ 0.3	60

\* $P<0.01$  compared with control group.

表3 孤独症组外周血中脂肪酸代谢酶含量与孤独症严重程度的相关性

Table 3 Correlation between the content of fatty acid metabolic enzymes in peripheral blood and the severity of autism ( $\bar{x}\pm s$ )

group	CARS	n	fatty acid metabolism enzymes (r value)			
			FASN	ACC	ACSL1	AceCS1
control	15.6±0.1	36	0.14	0.18	0.05	-0.11
autism	32.8±5.4	60	0.29*	0.43*	0.83*	0.97*

\* $P < 0.01$  compared with control group.

FASN 是脂肪酸从头合成的关键酶,是一个具有多种功能的酶系统,相比脂肪酸从头合成过程中的其他酶,FASN 是唯一一只作用于脂肪酸合成路径而不会影响到其他代谢过程的酶<sup>[9]</sup>。因此,ACC 和 FASN 的表达增加提示孤独症可能存在脂肪酸合成的增加。本研究还发现,ASD 中 ACC、FASN、ACSL1 和 AceCS1 的表达水平与 CARS 量表评分呈显著正相关,CARS 得分高者 ACC、FASN、ACSL1 和 AceCS1 的水平也高,这也提示未来可能通过检测脂肪酸代谢酶的含量高低来预测孤独症症状的严重程度。

## 参考文献:

- [1] Doernberg E, Hollander E. Neurodevelopmental disorders (ASD and ADHD): DSM-5, ICD-10, and ICD-11 [J]. *CNS Spectr*, 2016, 21: 295-299.
- [2] Cao X, Tabuchi K. Functions of synapse adhesion molecules neurexin/neuroigins and neurodevelopmental disorders [J]. *Neurosci Res*, 2017, 116:3-9.
- [3] van Deijk AF, Camargo N, Timmerman J, et al. Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function *in vivo* [J]. *Glia*, 2017, 65:670-682.
- [4] Mazahery H, Conlon C, Beck K, et al. A randomised-controlled trial of vitamin D and omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in the treatment of core symptoms of autism spectrum disorder in children [J]. *J Autism Dev Disord*, 2019, 49:1778-1794.
- [5] Li YJ, Li YM, Xiang DX. Supplement intervention associated with nutritional deficiencies in autism spectrum disorders: a systematic review [J]. *Eur J Nutr*, 2018, 57: 2571-2582.
- [6] Montani L, Suter U. Building lipids for myelin [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10: 861-862.
- [7] Chen J, Wu W, Fu Y, et al. Increased expression of fatty

与本研究不同的是,有学者认为 ASD 患者血液中的长链多不饱和脂肪酸水平显著降低,给 ASD 患者补充  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸可能有助于改善 ASD 的核心症状,且孕妇摄入  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸的量与后代 ASD 的发病风险呈显著负相关,摄入量越高,后代患孤独症的风险越低<sup>[10-11]</sup>。相反,也有研究认为, $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸的补充并不能改善 ASD 的临床症状<sup>[12]</sup>。这些研究结果不同的原因可能在于饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸在孤独症发病中的作用不同。

综上所述,ASD 中 ACC 和 FASN 的表达水平高于正常对照,而且,ASD 症状越重,ACC、FASN、ACSL1 和 AceCS1 的表达水平越高。脂肪酸合成代谢异常可能是 ASD 的发病机制之一,将来可能在此基础上探索出具有诊断和监测价值的生物标志物,用于指导 ASD 的临床诊断和治疗。然而,由于本研究中的脑组织样本来源于国外组织库,且样本量小,没有进行种族划分,暂时无法对不同种族 ASD 患者的小脑组织样本进行分析,将来会扩大样本量及细分种族等指标进行下一步的研究。

- acid synthase and acetyl-CoA carboxylase in the prefrontal cortex and cerebellum in the valproic acid model of autism [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12: 1293-1298.
- [8] Svensson R, Parker S, Eichner L, et al. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models [J]. *Nat Med*, 2016, 22:1108-1119.
- [9] Jones SF, Infante JR. Molecular pathways: fatty acid synthase [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21:5434-5438.
- [10] Bozzatello P, Rocca P, Mantelli E, et al. Polyunsaturated fatty acids: what is their role in treatment of psychiatric disorders? [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20. doi: 10.3390/ijms20215257.
- [11] Keim SA, Gracious B, Boone KM, et al.  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acid supplementation may reduce autism symptoms based on parent report in preterm toddlers [J]. *J Nutr*, 2018, 148:227-235.
- [12] Horvath A, Łukasik J, Szajewska H.  $\omega$ -3 fatty acid supplementation does not affect autism spectrum disorder in children: a systematic review and meta-Analysis [J]. *J Nutr*, 2017, 147:367-376.