

叶酸及其相关代谢物在神经管畸形风险评估和预测中的作用比较研究

黄敏^{1,2} 梁晓萍^{1,2} 梁琼麟² 王义明² 罗国安^{* 1,2}

¹(华东理工大学药学院, 上海 200237) ²(清华大学化学系, 北京 100084)

摘要 以叶酸及其相关代谢物为研究对象, 结合定量分析方法以及多种统计学方法, 比较它们在神经管畸形发病风险评估和预测中的作用。采用前期建立的 HPLC-MS/MS 方法测定了 121 例病例和 118 例对照母体血清中的代谢物水平, 通过双样本成对 *t* 检验筛选差异代谢物 ($p < 0.05$), 然后利用 Logistic 回归和 ROC 分析计算这些代谢物的优势比以及预测灵敏度及特异性、阳性和阴性预测率。结果表明, 4 种差异代谢物中, 5-甲基四氢叶酸和同型半胱氨酸的优势比、阳性和阴性预测率均高于叶酸。本方法适用于疾病标志物的筛选和评价。

关键词 HPLC-MS/MS; Logistic 回归; ROC 分析; 叶酸; 5-甲基四氢叶酸; 同型半胱氨酸

1 引言

神经管畸形 (Neural tube defects, NTDs) 是一类神经管形成缺陷导致的严重先天畸形^[1], 补充叶酸是降低 NTD 发病率的主要干预措施^[2,3]。但是, 叶酸干预也存在一定的副作用^[4,5]: 一定剂量的叶酸可能会掩盖并加重维生素 B₁₂ 缺乏导致的症状; 高剂量的叶酸不但不能预防 NTD, 还可能会导致发育障碍及智力损伤等。另外, 并不是所有的 NTD 都可以通过补充叶酸进行预防^[6]。因此, 需要寻找新的能够指示 NTD 发病风险的标志物, 以便更好地进行药物干预。在标志物的筛选中, 目前常用的方法只是 *t* 检验、*F* 检验, 或者单因素方差分析, 而未进一步考虑标志物对疾病发生风险的评估和预测能力。本研究采用前期建立的 HPLC-MS/MS 定量方法^[7], 对病例和对照组血清样本中的叶酸及其相关代谢物 (5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、丝氨酸、组氨酸和同型半胱氨酸) 进行了准确的定量分析, 通过双样本成对 *t* 检验选择差异代谢物, 并利用 Logistic 回归和 ROC 分析考察它们在 NTD 风险评估和预测中的作用。这些代谢物的水平均在 NTD 的母体血清中发生紊乱, 并且与叶酸代谢密切相关^[8-11]。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 型液相色谱 (Agilent Technologies, USA) 串联 API3000 三级四极杆串联质谱 (Applied Biosystems, CA, USA); Excellence Plus XP 分析天平 (Mettler-Toledo, Switzerland); Micro 22R 冷冻高速离心机 (Hitachi, Japan); N-EVAP-24 温控样品氮吹仪 (Organomation, USA)。

叶酸 (Folic acid, FA), 5-甲基四氢叶酸 (5-Methyltetrahydrofolate, 5-MT), 5-甲酰基四氢叶酸 (5-Formyltetrahydrofolate, 5-FT), 四氢叶酸 (Tetrahydrofolate, THF), 丝氨酸 (Serine, Ser), 组氨酸 (Histidine, His)、同型半胱氨酸 (Homocysteine, Hcy) 和二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 均购自 Sigma-Aldrich 公司。乙腈 (质谱级, J. T. Baker 公司), 甲醇 (色谱级, Merck 公司), 甲酸 (色谱级, Sigma-Aldrich 公司)。抗坏血酸、柠檬酸、甲酸铵和甲酸 (分析纯, 北京化学试剂公司)。超纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

2.2 样品采集

研究对象主要来自山西省吕梁地区, 均未服用叶酸补充剂。其中 NTD-妊娠指的是: 通过 B 超诊断

2012-04-11 收稿; 2012-09-11 接受

本文系国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (No.2007CB511903) 资助

* E-mail: luoga@tsinghua.edu.cn

胎儿为无脑儿,脊柱裂或脑膨出等。收集了239例样本,包括怀有NTD胎儿的孕妇121例(病例组),正常孕妇118例(对照组),并记录其孕周和年龄。本研究由当地伦理委员会批准,并获得所有参与者的书面知情同意书。

在孕妇流产前采集静脉血至离心管内,置于冰上降温后,在4℃下,以2500 r/min离心10 min。上层的血清保存于-80℃。

2.3 样品制备方法

采用前期建立的样品制备方法^[7],准确吸取200 μL血清,加入100 μL DTT溶液(15 g/L),涡旋2 min;加入800 μL甲醇(含100 mg/L柠檬酸和抗坏血酸,防止叶酸降解),涡旋2 min;在4℃下,以10000 r/min离心15 min。取上清液,在室温下,以温和N₂流吹干,残渣用100 μL水溶液(含10 mg/L抗坏血酸,柠檬酸和DDT)复溶。涡旋2 min;在4℃下,以10000 r/min离心10 min,取上清液进样。

2.4 样品分析方法

HPLC-MS/MS分析方法如文献^[7]描述:色谱分离采用色谱柱Ultimate™ AQ-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Alltech预柱(20 mm×3.0 mm, 5 μm)。流动相A为5 mmol/L甲酸铵-0.15%(V/V)甲酸溶液(pH=3.2),流动相B为0.15%(V/V)甲酸-乙腈。洗脱梯度:0~25 min,100%~20% A;25~28 min,20%~5% A;28~30 min,5%~100% A,分析前平衡10 min,进样20 μL,柱温30℃。流速0.5 mL/min,质谱分析前通过三通进行分流,进入质谱的流速为0.2 mL/min。

质谱分析采用正离子模式下的多反应监测,电离电压5000 V、离子源温度400℃、碰撞气压力800 mPa,雾化气、气帘气和辅助干燥气的流速分别为8、9和1.2 L/min。

2.5 统计分析

统计分析均采用SPSS 14.0软件。进行Logistic回归和ROC分析时,所有数据先进行自然对数变换,然后通过Kolmogorov-Smirnov检验测试其正态性。 $P < 0.05$ 即认为具有统计显著性。

3 结果与讨论

3.1 HPLC-MS/MS定量分析结果

由前期研究^[7]可知,对NTD相关的7种代谢物(5-MT,5-FT,FA,Ser,His,Hcy和THF),所建立的HPLC-MS/MS方法的基质效应在88.6%~116.4%之间,回收率在76.5%~114.8%之间。基质效应(ME)和回收率(R)的计算公式如下:

$$ME = \frac{M_2 - M_1}{S} \times 100\% \quad (1)$$

$$R = \frac{M_3 - M_1}{S} \times 100\% \quad (2)$$

其中, M_1 , M_2 和 M_3 分别表示空白血清中的代谢物浓度,空白血清处理后加标的代谢物浓度和空白血清加标后处理的代谢物浓度, S 表示所加标准品的浓度。

此外,日内、日间精密度均小于10%,24 h内稳定性良好。线性系数均大于0.995。由于在样本血清中未测到THF,因此对其它6种代谢物进行定量分析,结果如表1所示。

表1 6种代谢物的定量分析结果

Table 1 Quantification results of the six metabolites

代谢物 Metabolite	病例组 Case	对照组 Control	p 值 p value*
叶酸 Folic acid (FA) (μg/L)	0.53±0.36	0.63±0.36	0.042
5-甲基四氢叶酸 5-Methyltetrahydro-folate (5-MT) (μg/L)	6.17±2.73	7.11±1.34	<0.001
5-甲酰基四氢叶酸 5-Formyltetrahydro-folate (5-FT) (μg/L)	6.43±1.69	6.84±2.85	0.038
同型半胱氨酸 Homocysteine (Hcy) (mg/L)	1.80±1.02	1.34±0.87	<0.001
丝氨酸 Serine (Ser) (μg/L)	149±48	161±58	0.172
组氨酸 Histidine (His) (mg/L)	3.10±0.76	3.26±1.09	0.553

* 由双样本成对 t 检验计算所得(自然对数转换后的数据)Two-sample t test with natural log-transformed data.

由表 1 可知,5-MT, 5-FT, FA 和 Hcy 在两组间有显著差异。病例组中 5-MT, 5-FT 和 FA 的含量显著低于对照组, Hcy 的含量显著高于对照组, 说明这 4 种代谢物的紊乱可能与神经管畸形的发生密切相关。

通常, 不同年龄段、孕周的孕妇体内化合物的浓度水平相差较大, 因此表 2 中比较了两组样本的年龄和孕周。由表 2 可知, 两组样本在年龄和孕周间并无显著差异, 说明所选取的对照样本与病例样本匹配较好。

3.2 Logistic 回归分析

优势比 (Odds ratio, OR) 是分析疾病与因素之间联系程度的指标, 采用 Logistic 回归计算 4 种差异代谢物 (5-MT, 5-FT, FA 和 Hcy) 的优势比, 以分析代谢物浓度对 NTD 发病风险的影响^[12], 结果见表 3。

由表 3 可知, 5-MT 的 OR 值显著小于 1, Hcy 的 OR 值显著大于 1, 说明孕妇体内 5-MT 浓度降低、Hcy 浓度增加, 会导致 NTD 的发病风险增加。而 FA 的优势比的 $p > 0.05$, 说明孕妇体内 FA 浓度的变化并不会显著影响 NTD 的发病风险。此外, 5-MT 的优势比小于 FA, 说明其浓度变化对 NTD 的发病风险影响更大。由于 FA、Hcy 和 5-MT 在两组间的变化趋势并不一致, 为了更好地比较这三者的优势比, 选取 FA、5-MT 和 Hcy 的浓度在对照组百分位数分布的不同浓度截点^[13]进行 Logistic 回归分析, 计算 OR 值, 结果见表 4。

表 4 FA, 5-MT 和 Hcy 的百分位数分布优势比

Table 4 Adjusted ORs and 95% CIs of FA, 5-MT and Hcy

浓度截点和百分位数 Concentration cutoffs and percentiles	病例数 Cases	对照数 Controls	优势比(95%置信区间) OR (95% CI)	校正的优势比(95%置信区间) Adjusted OR (95% CI) ^a
叶酸 FA (μg/L)				
<0.47 (30th)	53	31	1.53 (1.18, 1.98)	1.54 (1.19, 2.00)
<0.42 (20th)	44	21	1.88 (1.24, 2.84)	1.90 (1.25, 2.87)
<0.34 (10th)	17	10	1.86 (0.81, 4.28)	1.90 (0.82, 4.40)
5-甲基四氢叶酸 5-MT (μg/L)				
<6.42 (30th)	56	32	2.39 (1.63, 3.92)	2.43 (1.78, 4.35)
<5.96 (20th)	45	21	2.96 (1.80, 4.42)	3.14 (1.67, 4.69)
<5.59 (10th)	35	11	3.57 (2.13, 6.37)	4.32 (2.88, 7.17)
同型半胱氨酸 Hcy (mg/L)				
>1.85 (70th)	65	29	2.69 (1.92, 6.85)	2.81 (1.94, 7.44)
>2.32 (80th)	50	21	3.34 (1.87, 9.81)	3.53 (1.88, 10.1)
>2.66 (90th)	40	11	6.86 (2.10, 18.4)	7.55 (2.29, 21.0)

^a 使用年龄和孕周进行校正。Adjusted for age and gestational week.

由表 4 可知, 相比对照组, 病例组中 FA、5-MT 的浓度较低, Hcy 的浓度较高。由优势比的结果可知, 不同浓度范围内的优势比并不相同。随着 FA、5-MT 浓度的不断降低以及 Hcy 浓度的不断增加, 优

表 2 研究对象的基本信息

Table 2 Characteristics of participants in this study

基本信息 Characteristic	病例组 Case group		对照组 Control group		p 值 p value [*]
	人数 Number	比例 Percentage (%)	人数 Number	比例 Percentage (%)	
年龄 Age					
<20 岁 (Years old)	7	5.8	9	7.6	0.513
20 ~ 24 岁 (Years old)	51	42.1	41	34.7	
25 ~ 29 岁 (Years old)	31	25.6	39	33.1	
≥30 岁 (Years old)	32	26.5	29	24.6	
孕周 Gestational week					
<28 周 (Weeks)	100 (82.7%)		92	78.0	0.138
≥28 周 (Weeks)	16 (13.2%)		26	22.0	

^{*} p 值 (表示病例组和对照组之间的差异) 由卡方 (χ_2) 检验和 Fisher 精确检验计算所得。

p value for Chi-square (χ_2) test and Fisher's exact test (For categorical variables).

表 3 差异代谢物的优势比

Table 3 Adjusted odds ratios (ORs) of differential metabolites

代谢物 Metabolite	校正的优势比 Adjusted odd ratio (OR ^a)	95% 置信区间 95% Confidence interval CI	p 值 p value ^b
叶酸 FA	0.464	0.035 ~ 1.289	0.053
5-甲基四氢叶酸 5-MT	0.138	0.047 ~ 0.407	<0.001
5-甲基四氢叶酸 5-FT	0.363	0.149 ~ 0.982	0.052
同型半胱氨酸 Hcy	18.4	4.151 ~ 81.374	<0.001

^a 使用年龄和孕周进行校正; ^b 假定 OR 值等于 1 的假设检验计算所得。

^a Adjusted for age and gestational week; ^b p value tests the hypothesis that the OR is equal to one.

势比不断增加,即NTD的发病风险不断增加。更重要的是,Hcy和5-MT在不同浓度范围内的优势比均高于FA,这与表3的结果一致。由此可知,相比FA,Hcy和5-MT更能指示NTD的发病风险。

3.3 ROC 曲线分析

本研究采用受试者工作特征(Receiver operating characteristic, ROC)分析比较FA,Hcy和5-MT在NTD发病风险预测中的作用。ROC分析以每一个检测结果(代谢物浓度)作为可能的诊断阈值,以计算得到的灵敏度(真阳性率)为纵坐标,1-特异性(假阳性率)为横坐标绘制曲线,其中AUC(曲线下面积)的大小表明了诊断准确度的大小^[4]。图1比较了FA,Hcy和5-MT的ROC曲线。其中由于Hcy水平在两组间的趋势与其它2个代谢物不同,需先进行倒数变换。

ROC曲线越接近图的左侧和上侧说明该代谢物或生物标志物在NTD发病风险预测中的准确性越高;ROC曲线下面积大于0.7即认为有一定的临床意义。由图1可知,5-MT和Hcy的AUC均大于FA,其中5-MT的AUC最大。在表5中列出了它们的AUC、*p*值以及灵敏度、特异性,阳性预测率(Positive predictive value, PV^+)和阴性预测率(Negative predictive value, PV^-)。后两者分别指的是“判为阳性时患病的概率”以及“判为阴性时不患病的概率”,计算公式如下:

$$PV^+ = \frac{TP}{TP+FP} = \frac{S_1}{S_1+(1-S_2)} \quad (3)$$

$$PV^- = \frac{TN}{FN+TN} = \frac{S_2}{(1-S_1)+S_2} \quad (4)$$

其中, PV^+ 、 PV^- 分别表示阳性预测率和阴性预测率,TP,FP,TN和FN分别表示真阳性率,假阳性率,真阴性率和假阴性率, S_1 和 S_2 分别表示灵敏度和特异性。

表5 3种代谢物的重要ROC参数

Table 5 Important ROC parameters for the three metabolites

代谢物 Metabolite	曲线下面积 Area under curve AUC	<i>p</i> 值 <i>p</i> value*	灵敏度 Sensitivity	特异性 Specificity	阳性预测率 Positive predictive rate PV^+	阴性预测率 Negative predictive rate PV^-
叶酸 FA	0.654	<0.001	0.845	0.413	0.590	0.727
5-甲基四氢叶酸 5-MT	0.888	<0.001	0.770	1.000	1.000	0.813
同型半胱氨酸 Hcy	0.672	<0.001	0.942	0.365	0.597	0.869

* 无效假设:真实面积=0.5。Null hypothesis: true area=0.5.

由表5可知,5-MT的“灵敏度+特异性”值最大,其中特异性达到了100%,超过了FA和Hcy。与此相比,临床上阳性和阴性预测率更有意义。因为临床研究中常遇到的情况是事先不知道对象是否患病,需要通过标志物判断阳性或阴性。所以,有效的标志物需有良好的阳性和阴性预测率。由表5可知,5-MT的阳性预测率达到了100%,阴性预测率超过了80%,均高于FA;Hcy的阴性预测率超过了85%,高于FA,阳性预测率也稍高于FA。相比于叶酸,这两种代谢物更能预测NTD的发病风险。

3.4 小结

本研究采用HPLC-MS/MS进行代谢物定量分析,通过双样本*t*检验筛选差异代谢物,并结合Logistic回归和ROC分析比较了叶酸和其相关代谢物在NTD风险评估和预测中的作用。通过对病例组和对照组血清样本中代谢物的精确测定,发现5-MT,5-FTHF,FA和Hcy在两组间有显著差异;Logistic回归结果显示,5-MT,Hcy的优势比均大于叶酸;ROC分析结果显示,5-MT和Hcy的AUC均大于叶酸,且阳性、阴性预测率均高于叶酸。综上可知,5-MT和Hcy在NTD的发病风险评估和预测中的表现均优于叶酸,可能成为NTD干预研究中的新的重要标志物。这种结合定量分析和多种统计学方法的研究手

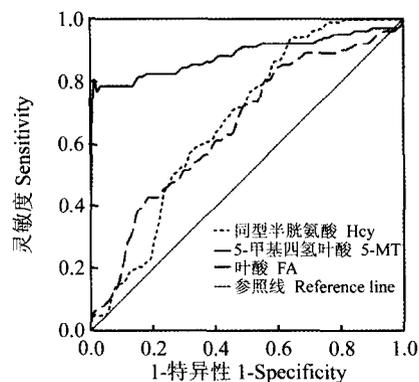


图1 3种代谢物的ROC曲线

Fig. 1 Receiver operating characteristic (ROC) curves of the three metabolites

段适用于疾病标志物的筛选和评价。

References

- 1 Lemire R J. *JAMA*, **1988**, 259(4): 558-562
- 2 Berry R J, Li Z, Erickson J D, Li S, Moore C A, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong L Y, Gindler J, Hong S X, Correa A. *N. Engl. J. Med.*, **1999**, 341(20): 1485-1490
- 3 Pitkin R M. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2007**, 85(1): 285S-288S
- 4 Reynolds E H. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, **2002**, 72(5): 567-571
- 5 Smith A D. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2007**, 85(1): 3-5
- 6 Hesecker H B, Mason J B, Selhub J, Rosenberg I H, Jacques P F. *Br. J. Nutr.*, **2009**, 102(2): 173-180
- 7 Liang X P, Liang Q L, Xia J F, Wang Y, Hu P, Wang Y M, Zheng X Y, Zhang T, Luo G A. *Talanta*, **2009**, 78(4-5): 1246-1252
- 8 Zhang H Y, Luo G A, Liang Q L, Wang Y, Yang H H, Wang Y M, Zheng X Y, Song X M, Chen G, Zhang T, Wu J X. *Exp. Neurol.*, **2008**, 212(2): 515-521
- 9 Mills J L, McPartlin J M, Kirke P N, Lee Y J, Conley M R, Weir D G, Scott J M. *Lancet*, **1995**, 345(8943): 149-151
- 10 Mills J L, Scott J M, Kirke P N, McPartlin J M, Conley M R, Weir D G, Molly A M, Lee Y J. *J. Nutr.*, **1996**, 126(3): 756S-760S
- 11 XIA Jian-Fei, LIANG Qiong-Lin, HU Ping, WANG Yi-Ming, LUO Guo-An. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(1): 136-143
夏建飞, 梁琼麟, 胡坪, 王义明, 罗国安. *分析化学*, **2009**, 37(1): 136-143
- 12 Bland J M, Altman D G. *BMJ*, **2000**, 320(7247): 1468
- 13 Hobbs C A, Cleves M A, Melnyk S, Zhao W, James S J. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81(1): 147-153
- 14 Cook N R. *Circulation*, **2007**, 115(7): 928-935

A Comparative Study Among Folic Acid and Its Related Metabolites on Risk Assessment and Prediction of Neural Tube Defects

HUANG Min^{1,2}, LIANG Xiao-Ping^{1,2}, LIANG Qiong-Lin², WANG Yi-Ming², LUO Guo-An^{*1,2}

¹ (School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

² (Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Quantitative method and multiple statistical methods were used to compare the effect of folic acid and its related metabolites on risk assessment and prediction of neural tube defects. First, a previously established HPLC-MS/MS method was employed to determine the levels of these metabolites in maternal serum samples of 121 cases and 118 controls. Then two-sample t test ($p < 0.05$) was used to obtain differential metabolites between these two groups. At last, Logistic regression and receiver operating characteristic (ROC) analysis were employed to calculate the odds ratio, sensitivity and specificity, positive and negative predictive rate of these metabolites. Results showed that among the 4 differential metabolites, 5-methyltetrahydrofolate and homocysteine both got higher odds ratio, positive and negative predictive rate than folic acid. The method was suitable for screening and assessment of disease biomarkers.

Keywords High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; Logistic regression; Receiver operating characteristic analysis; Folic acid; 5-Methyltetrahydrofolate; Homocysteine

(Received 11 April 2012; accepted 11 September 2012)