

阿尔茨海默病患者和健康老年人血清 A β 水平的变化及临床意义

郝建华 何亮 张庆侠 张然蓉 冯静霞 谢岭平

基金项目:广东省深圳市南山科技局项目(2012005)

作者单位:518052 深圳市,广东医学院附属南山人民医院检验科

通讯作者:郝建华, E-mail: haojmail@yahoo.com.cn

【摘要】 目的 探讨阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者和健康老年人血清中 β 淀粉样蛋白(β amyloid protein, A β)水平在正常衰老和 AD 进程中的变化规律及临床意义。方法 采用酶联免疫吸附法检测 63 例 AD 患者(AD 组)和 206 例健康老年人(健康对照组)血清中 A β 水平,并分析其与 AD 的关系。结果 AD 组和健康对照组不同性别组间血清 A β 水平差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);健康对照组不同年龄段组间 A β 水平差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);轻度 AD 组血清 A β 42 水平较中度及以上 AD 组和健康对照 A 组均显著升高,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01),中度及以上 AD 组 A β 42 血清水平随病情的加重而下降,与健康对照 A 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);AD 各组 A β 40 血清水平与健康对照 A 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 AD 患者血清中 A β 水平,尤其是 A β 42 水平的变化,可作为辅助诊断早期老年性 AD 的血清生物学标志物。

【关键词】 阿尔茨海默病;健康老年人;A β 淀粉样蛋白;酶联免疫吸附法

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2012.04.003

Alzheimer's disease and healthy elderly people serum β -amyloid protein variable and its clinical significance

HAO Jian-hua, HE Liang, ZHANG Qing-xia, et al. Department of Clinical Laboratory, Nanshan Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518052, China

【Abstract】 **Objective** To study the healthy elderly people and Alzheimer's disease (AD) patients serum β -amyloid protein levels during normal aging and the natural course of AD, and their clinical values for AD diagnosis. **Methods** Enzyme linked immunosorbent assay was employed to measure serum A β levels of 63 AD cases (AD group) and 206 healthy elderly people (healthy control group). The relation of AD and serum A β levels were analysed. **Results** All A β variables in age were unchanged in AD group and healthy control group (P all > 0.05), and also in sex were unchanged in healthy control group (P all > 0.05). Levels of A β 42 in the mild AD group were higher than in moderate or above AD group and healthy control A group, and the differences all had statistical significance (P all < 0.01). Level of A β 42 was similar between moderate or above AD group and healthy control A group ($P > 0.05$). AD patients had elevated serum A β 40, but there was no statistically significant difference as compared with healthy control A group ($P > 0.05$). **Conclusion** AD serum A β levels, especially A β 42, may be a useful biomarkers for AD diagnosis.

【Key words】 Alzheimer's disease; Healthy elderly people; β -amyloid protein; ELISA

老年性痴呆是目前医学界关注的焦点之一。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以进行性加重的智能衰退为特征的神经变性疾病,是老年性痴呆发生的最主要原因。AD 是一种神经系统变性疾病,临床表现为进行性加重的记忆减退和智力障碍。AD 致病的主要原因是由于大脑中 β 淀粉样蛋白(β amyloid protein, A β)大量沉积构成老年斑和神

经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),缠结脑部负责记忆的神经,导致严重失忆^[1-3]。A β 有两种形式,分别是由 40 个氨基酸和 42 个氨基酸组成的蛋白片段,前者称为 A β 40,存在于正常老年人和 AD 患者脑内;后者称为 A β 42,主要见于 AD 患者。A β 40 是正常代谢过程中产生的主要物质,AD 患者会产生大量的 A β 42,而 A β 42 完整的 C 端是诱发细

胞产生毒性的肽段。A β 能够激活免疫炎性及细胞毒性,并且能够破坏血脑屏障,使脑组织内的大分子物质进入血管,在对病因研究的分析中,A β 的神经毒性已得到公认^[4]。对 AD 病理的研究^[5]也表明,在 A β 斑块包绕及其附近的微血管有明显的血管淀粉样变现象,因此检测血清中的 A β 水平可用于轻度 AD 的辅助诊断。故血清中 A β 含量的测定对诊断该病具有较高的临床价值。本文研究采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对 63 例 AD 患者和 206 例健康老年人血清 A β 含量进行检测,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 AD 组 选自 2010 年 10 月-2011 年 12 月确诊于我院神经内科的 AD 患者 63 例(AD 组),平均年龄(73.2 \pm 16.9)岁;其中男性 30 例,平均年龄(72.5 \pm 14.2)岁,女性 33 例,平均年龄(73.5 \pm 16.2)岁。所有患者均符合国立神经病学、语言功能障碍和中风研究所的 AD 标准及《诊断与统计手册》的诊断标准^[6]。简易智力状态检查表(mini-mental state examination, MMSE)用于评判患者痴呆程度:轻度(MMSE $>$ 20 分),中度(10 分 \leq MMSE \leq 20 分),中度以上(MMSE $<$ 10 分)。根据 MMSE 评分标准,将 63 例 AD 患者分为:(1)轻度 AD 组 28 例,男 13 例,女 15 例,平均年龄(72.9 \pm 5.2)岁,MMSE 20~26 分;(2)中度及以上 AD 组 35 例,男 17 例,女 18 例,平均年龄(75.3 \pm 5.6)岁,MMSE 5~18 分。

1.1.2 健康对照组 选自来我院体检科进行体检的 206 例健康老年人,平均年龄(74.3 \pm 18.9)岁;无心脑血管疾病,且心电图、血压正常,血糖、血脂及血常规在正常范围内。无神经系统体征及明显的肝肾和内分泌疾病。根据头部 CT 或 MRI,排除颅内占位性病变和感染。按年龄段的不同分为四组,其中 50~60 岁组 52 例、61~70 岁组 52 例、71~80 岁组 52 例、80 岁以上组 50 例;按性别分为两组,其中男性 102 例,平均年龄(72.3 \pm 16.8)岁;女性 104 例,平均年龄(75.3 \pm 17.1)岁。

1.1.3 健康对照 A 组 选择健康对照组中 63 例与 AD 组性别及年龄相匹配的对照者,经平衡检验差异均无统计学意义(P 均 $>$ 0.05)。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 采用德国 Analytik Jena AG 公司生产的耶拿(JENA)FlashScan 酶标仪检测 A β 水平;A β 40、A β 42 检测试剂盒均由深圳市安群生物工

程有限公司提供。

1.2.2 标本采集 采用无抗凝剂真空采血管采集受检者静脉血 3 ml,以离心半径 13.5 cm,2500 r/min 离心 10 min,取血清分装于 EP 管,-60 $^{\circ}$ C 冰箱内保存待测。

1.2.3 检测方法 血清中 A β 40 和 A β 42 水平的测定采用 ELISA 法。操作严格按试剂盒说明书进行,于波长 450 nm 处分别读取 A β 40 和 A β 42 的吸光度值(A 值),并经 Soft MaxPro 软件拟合浓度-吸光度值二次标准曲线,计算出待测血清中 A β 40、A β 42 的浓度。各组标本均分别重复测定两次,取平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示;多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间均数的比较采用 t 检验;以 $P<$ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年龄组健康老年人 A β 40 和 A β 42 测定的结果比较 健康老年人各年龄组血清中 A β 40、A β 42 水平的测定结果见表 1。A β 40 水平在 50~80 岁之间随着年龄的增长逐步上升,80 岁以后开始有所下降;A β 42 水平随着年龄增长呈轻微下降趋势。各组年龄段之间 A β 40 和 A β 42 水平相互比较,差异均无统计学意义(P 均 $>$ 0.05)。

表 1 206 例健康老年人血清 A β 40 和 A β 42 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	A β 40(pg/mL)	A β 42(pg/mL)
50~60 岁	52	124.0 \pm 6.8	93.0 \pm 5.1
61~70 岁	52	123.3 \pm 7.4	92.6 \pm 6.1
71~80 岁	52	125.9 \pm 6.9	91.4 \pm 4.4
>80 岁	50	123.1 \pm 8.3	90.8 \pm 5.4

注:A β 40 水平各组间比较, $F=1.527$, $P>$ 0.05;A β 42 水平各组间比较, $F=2.029$, $P>$ 0.05

2.2 不同性别健康老年人之间血清中的 A β 水平比较 由表 2 可见,健康老年人中女性 A β 40、A β 42 水平平均高于男性,但差异均无统计学意义(P 均 $>$ 0.05)。

2.3 AD 各组与健康对照 A 组血清中 A β 水平的比较 A β 40 水平随 AD 病程发展呈轻微的上升趋势,AD 各组与健康对照 A 组比较,差异无统计学意义($P>$ 0.05)。轻度 AD 组血清中 A β 42 水平平均高于中度及以上 AD 组和健康对照 A 组,差异均有统计学意义(P 均 $<$ 0.01);随着病情的加重,AD 患者血清中 A β 42 水平明显下降,中度及以上 AD 组与健康对照 A 组比较,差异无统计学意义($P>$ 0.05)。见表 3。

2.4 不同性别的 AD 组患者之间血清中 A β 水平比

较 由表 4 可见,AD 组中女性 A β 40、A β 42 水平平均高于男性,但差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

3 讨论

目前,临床诊断 AD 的准确率仅有 70%左右,如果能将血清中的一些分子标记物与临床诊断标准结合起来,将能明显提高 AD 疾病诊断的准确率。为了能够早期准确诊断 AD,同时又可作为病情疗效的判断指标,需要找到一种可靠和有效的血清学标记物^[7]。自上世纪 90 年代以来有大量的研究集中在对淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)及其代谢产物生成异常与 AD 的关系研究上^[8]。APP 是在 β -分泌酶和 γ -分泌酶的作用下裂解产生 1~40 或 1~42 个氨基酸的 A β 肽 (即 A β 40 和 A β 42)。A β 42 增加与 AD 发病有非常密切的相关性,其主要作用是引起大脑组织形成不溶性的淀粉样沉积物,即 AD 特有的病理结构改变,而 A β 42 也是 AD 淀粉样斑块中的主要成分。有研究^[9]报道,AD 患者的 APP 浓度明显高于对照组和其他类型的痴呆患者,且随着年龄的增长,浓度会随之增加。

本文研究结果显示,血清 A β 含量在自然衰老过程中呈现出一个年龄相关性的变化。A β 40 水平在 50~80 岁之间随着年龄的增长呈现总体上升趋势,80 岁以后开始有所下降;A β 42 水平随着年龄增长呈轻微下降趋势,各组年龄段之间 A β 40 和 A β 42 水平相互比较,差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。Selkoe 等^[10]研究表明,健康人脑内 A β 水平随年龄

的增长而升高,这与本文研究结果不完全一致,具体原因还有待进一步研究。

本文研究显示,在 AD 疾病变化过程中,轻度 AD 患者血清 A β 42 浓度较健康对照 A 组显著升高 ($P < 0.01$),与相关报道^[11]在 AD 早期即可检测到血清中 A β 42 的升高相符。轻度 AD 组血清 A β 42 浓度的升高可能是因为 AD 患者脑血管内淀粉样改变与脑组织中形成的老年斑几乎同时发生,甚至还要早,并且 A β 42 是 AD 患者脑血管淀粉样变和老年斑的主要成分,AD 患者脑血管淀粉样改变的产生主要由血管壁肌细胞产生的大量 A β 42 的沉淀所致,因此在 AD 早期即可检测到血清中 A β 42 的升高。其次,在 AD 患者中,不管是中枢神经细胞还是外周的血管壁肌细胞所产生的 A β 42 均有一定的增加,AD 患者血脑屏障的通透性也会增加,同时脑组织老年斑内的 A β 42 可穿透血脑屏障而进入血循环,使得血清中的 A β 42 含量增加。因此,AD 患者血清 A β 42 浓度升高主要是由于血管壁肌细胞产生大量的 A β 42 所致。

另外,在本文研究中发现中度及以上 AD 患者血清中 A β 42 的浓度明显下降的原因可能是,随着病情的进一步加重,A β 42 在患者体内的产生增加,同时沉淀也在增加,A β 42 沉淀的程度与患者老年斑的病理演变过程相关,虽然 A β 42 在晚期患者脑组织和血管内的产生会增加,但患者发生沉淀的 A β 42 的数量也相应增加,随着病情的加重,AD 患者脑组

表 2 206 例男、女健康老年人血清 A β 40 和 A β 42 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	A β 40(pg/mL)	A β 42(pg/mL)
男性组	102	72.3 \pm 16.8	118.9 \pm 9.1	90.1 \pm 3.4
女性组	104	75.3 \pm 17.1	122.1 \pm 8.4	92.1 \pm 5.3

注:A β 40 水平男性组与女性组比较, $t=1.436, P> 0.05$;A β 42 水平男性组与女性组比较, $t=1.752, P> 0.05$

表 3 AD 组和健康对照 A 组血清中 A β 40、A β 42 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	A β 40(pg/mL)	A β 42(pg/mL)
轻度 AD 组	28	76.4 \pm 12.6	127.6 \pm 5.6	147.2 \pm 7.8
中度及以上 AD 组	35	77.9 \pm 13.4	129.3 \pm 6.9	86.4 \pm 6.4
健康对照 A 组	63	72.7 \pm 19.4	125.8 \pm 6.5	92.3 \pm 5.3

注:三组间 A β 40 水平比较, $F=2.876, P> 0.05$;三组间 A β 42 水平比较, $F=882.1, P< 0.05$;A β 42 水平组间两两比较,轻度 AD 组与中度及以上 AD 组比较, $q=50.107, P< 0.01$,轻度 AD 组与健康对照 A 组比较, $q=54.815, P< 0.01$,中度及以上 AD 组与健康对照 A 组比较, $q=5.658, P> 0.05$

表 4 63 例男、女 AD 患者血清中 A β 40 和 A β 42 水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	年龄(岁)	A β 40(pg/mL)	A β 42(pg/mL)
男性	30	72.5 \pm 4.2	128.9 \pm 8.7	107.4 \pm 6.9
女性	33	73.5 \pm 6.2	130.1 \pm 9.4	103.1 \pm 5.3

注:A β 40 水平男性组与女性组比较, $t=0.582, P> 0.05$;A β 42 水平男性组与女性组比较, $t=1.269, P> 0.05$

织内的病理改变也越来越明显,患者脑和血管内产生 A β 42 的沉淀增多,以至脑和血清中 A β 42 的含量出现下降。而在早期 AD 患者血管壁肌细胞产生大量 A β 42 在血清中,并且早期发生病理改变时淀粉样沉淀较少,随着病情的进展,AD 中期病理改变淀粉样沉淀较多,A β 42 沉淀增加,从而在 AD 中期以后血清 A β 42 浓度下降。

当前,对于 AD 患者的治疗只能延缓早期的病情,对已发展到中晚期的患者缺乏有效的治疗方法。这就要求对 AD 患者能有一种有效的、早期的检测手段。在 AD 患者疾病发展过程中,AD 早期血清 A β 42 浓度升高,AD 中期以后 A β 42 浓度下降,这与彭丹涛等^[12]研究结果相一致。这也为 AD 患者的早期诊断提供帮助。

本文研究的 206 例健康老年人中,女性的 A β 40、A β 42 水平均高于男性,但差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。据文献^[13]调查统计发现,AD 患者的男女比例为男:女=1:1.5~3 倍,绝经后的女性患病率比男性明显增加。采用雌激素补充治疗对女性可起到预防或者延缓病情的发生,故可推测 AD 的发生与雌激素的缺乏有一定关系。在体外实验^[14]把雌激素加入神经干细胞培养液后分化形成的细胞突起增加和分支增多,这也说明雌激素对神经组织细胞的形态与功能具有一定的调节作用。女性 AD 患者体内雌二醇水平明显低于正常人,并且患者体内雌二醇的水平与痴呆病情的程度呈正相关。因此临床上可以把雌二醇含量降低、且 A β 含量增加用于筛查绝经期女性 AD 高危人群的指标之一。然而本文研究显示,在 AD 患者组中,男女患者之间的 A β 水平比较,差异无统计学意义,说明除 A β 外还有多种因素与痴呆的发生有关,值得进一步的研究。

本文研究主要对不同年龄段和性别的健康老年人和 AD 患者进行分层研究。对于不同年龄和性别的健康对照组之间,其血清中 A β 40、A β 42 水平差异均无统计学意义(P 均 >0.05),提示在临床应用中可以建立共同的正常参考值。对于轻度 AD 患者,A β 42 血清中水平较健康老年人显著增高,可作为对早期 AD 临床诊断的外周血清标志物。总之,对于确

定 AD 患者 A β 水平正常参考值范围和外周血清标志物,还需要大样本的研究。

4 参考文献

- 1 高中宝,吴卫平.阿尔茨海默病早期诊断生物标志物的研究现状.中华保健医学杂志,2012,14:70-73.
- 2 Wang X, Su B, Perry G, et al. Insights into amyloid 2 β 2in2 duced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. Free Radic Biol Med, 2007,43:1569-1573.
- 3 Li L, Darden TA, Bartolotti L, et al. Biophys J,1999,76:2871-2878.
- 4 Marx J. Boring on β 2 amyloid role in Alzheimer's disease. Science, 1992,255:688-689.
- 5 Greenfield JP, Tsai J, Gouras G, et al. Pro Natl Acad Sci,USA, 1999,96:742-747.
- 6 McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease; Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. Neurology,1984,34:939-944.
- 7 Diaz R. New biochemical markers in Alzheimer disease. Arch Neurol, 2001,58:354-356.
- 8 黄春霞,张志敏. β 淀粉样多肽细胞毒性作用的研究进展.中国老年学杂志,2009,29:2414-2417.
- 9 马三元,李振甲. β -类淀粉样蛋白放射分析法及其在老年痴呆症中的初步应用.标记免疫分析与临床,2001,8:29.
- 10 Selkoe DJ. Clearing the brain S amyloid cobwebs. Neuron,2001,32:177-180.
- 11 Mayeux R, Tang NX, Jacobs DM, et al. Plasma amyloid beta1-42 and incipient AD. J. Ann Neurol,1999,46:412-419.
- 12 彭丹涛,许贤豪,褚德发.老年性痴呆患者血清中淀粉样蛋白 A β 1-42 和 A β 1-40 水平与对照组的对比研究.中华老年脑血管病杂志,2004,6:371-373.
- 13 Assini A, Cammarata S, Vitali A, et al. Plasma levels of amyloid β -protein42 are increased in women with mild cognitive impairment. Neurology,2004,63:828-831.
- 14 马路,张吉强,姚清.雌激素合成酶与雌激素受体在神经干细胞及其分化后细胞内的表达.重庆医学,2005,34:560-561.

(收稿日期:2012-09-11)

(本文编辑:李霏)