

文章编号: 1673-8640 (2018) 04-0290-05 中图分类号: R446.62 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2018.04.004

植物血凝素刺激外周血单个核细胞 Th1/Th2 细胞因子分泌对阿尔茨海默病的诊断价值

丁冰玉¹, 林 萍², 李擎天¹

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院检验系, 上海 200025;

2. 上海交通大学医学院附属精神卫生中心, 上海 200030)

摘要: **目的** 探讨阿尔茨海默病 (AD) 患者外周血单个核细胞 (PBMC) 在植物血凝素 (PHA) 刺激下分泌的细胞因子、血清细胞因子以及血脂水平对疾病的诊断价值。**方法** 收集 AD 患者血液样本 100 例以及健康对照者血液样本 100 例, 抽提 PBMC, 在 PHA 刺激下培养 48 h, 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定培养液上清中细胞因子白细胞介素 (IL)-1 α 、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 以及 γ 干扰素 (IFN- γ) 水平; 同时检测血清 IL-1 α (sIL-1 α)、血清 IL-6 (sIL-6)、血清 IL-10 (sIL-10)、血清 TNF- α (sTNF- α) 及血清 IFN- γ (sIFN- γ) 水平和血脂[总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 及低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)] 水平。6 周后 AD 患者重新采样检测。**结果** AD 组 PBMC 分泌的 IL-1 α 、IFN- γ 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 而 IL-10 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$); AD 组 sIL-6 及 sTNF- α 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$); AD 组血清 TC、TG 及 LDL-C 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$)。AD 组 6 周后重新采样的检测结果与第 1 次一致。**结论** 在 PHA 刺激下 PBMC 的 IFN- γ 等细胞因子分泌水平、血清细胞因子水平及血脂水平异常可能与 AD 发病相关, 其中 PHA 刺激的 IFN- γ 及 sIL-6、sTNF- α 、TC、TG、LDL-C 水平检测对 AD 有一定的诊断价值。

关键词: 细胞因子; 植物血凝素; 外周血单个核细胞; 阿尔茨海默症

Th1/Th2 cytokines secreted by phytohaemagglutinin-stimulated peripheral blood mononuclear cells for the diagnosis of Alzheimer's disease DING Bingyu¹, LIN Ping², LI Qingtian¹. (1. Faculty of Laboratory Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200030, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of cytokines, serum cytokines and blood lipid secreted by phytohaemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for the diagnosis of Alzheimer's disease (AD). **Methods** A total of 100 AD patients and 100 healthy subjects were enrolled, and their blood samples were collected. PBMC was extracted. The levels of culture solution cytokine interleukin (IL)-1 α , IL-6, IL-10, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ), serum cytokines (sIL-1 α), sIL-6, sIL-10, sTNF- α and sIFN- γ and blood lipid [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)] levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Samples were collected and determined again after 6 weeks. **Results** The levels of IL-1 α and IFN- γ in AD group were higher than those in control group ($P < 0.05$), while the level of IL-10 in AD group was lower than that in control group ($P < 0.05$). The levels of sIL-6 and sTNF- α were higher in AD group than those in control group ($P < 0.05$). The levels of TC, TG and LDL-C in AD group were higher than those in control group ($P < 0.05$). After 6 weeks, the results of re-sampling were similar those of the first determination. **Conclusions** Cytokines, serum cytokines and blood lipid secreted by PHA-stimulated PBMC, such as IFN- γ , may be associated with AD. Among them, IFN- γ , sIL-6, sTNF- α , TC, TG and LDL-C may be potential for the diagnosis of AD.

作者简介: 丁冰玉, 女, 1991年生, 硕士, 主要从事细胞因子对精神性疾病的诊断意义研究。

通信作者: 李擎天, 联系电话: 021-63846590-776561。

Key words: Cytokine; Phytohaemagglutinin; Peripheral blood mononuclear cell; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是中神经系统的退行性疾病, 通常表现为记忆功能和认知功能的进行性丧失, 伴随着人格和行为的改变。其特征性病理改变为淀粉样 β 蛋白 (amyloid- β protein, A β) 沉积形成的细胞外老年斑 (senile plaque, SP) 和tau蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结^[1]。目前, AD尚无明确的诊断试验, 只能在患者死亡后通过显微镜观察SP和神经原纤维缠结的存在来准确诊断。

大量研究证据支持, 伴随着神经退行性变化, 机体产生的免疫应答对AD发生、发展有重要作用^[2]。MÜLLER等^[3]推测Th1和Th2激活的不平衡可产生N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体激动剂——喹啉酸, 其对神经细胞有毒性作用。在此背景下, 研究免疫细胞Th1/Th2分泌的细胞因子对AD的诊断意义具有可行性。此外, 胆固醇代谢在AD的病理生理中也起到了一定的作用。有研究表明, 胆固醇高的受试者对AD的易感性增加, 降脂药物对AD的治疗可能有一定的作用^[4-7]。

本研究收集AD患者和健康对照者的血液样本, 抽提外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 在植物血凝素 (phytohaemagglutinin, PHA) 刺激下培养, 检测培养基上清液中的细胞因子水平, 同时检测血清细胞因子及血脂水平, 分析各指标对AD的诊断价值, 并在6周后重复采样, 以探究指标是否具有稳定性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集2015年9月—2016年10月上海交通大学医学院附属精神卫生中心的AD患者样本100例。AD患者简易精神状态检查 (Mini-Mental State Examination, MMSE) 评分 ≤ 24 , 入组的患者需排除以下情况: 有并发感染史; 伴随或过去有炎症和/或自身免疫性疾病史; 之前发生过短暂性大脑缺血性发作、脑卒中和/或其他脑血管病; 存在严重顽固性心力衰竭、严重肾脏疾病或晚期慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD); 有癌症或血液肿瘤史; 伴随的已知影响认知的医学、神经或精神疾病; 有重大头部创伤史; 近期做过重大手术; 在过去24 h内摄入过抗菌药物; 在过去2个月内摄入过降脂药物; 有酗酒和/或滥用药物史; 意识水平受到干扰^[8]。AD患者男42例、女58例, 年龄 (72 \pm 11) 岁。对照组100例样本

来自上海市闵行区中心医院的健康体检者, 其中男49名、女51名, 年龄 (70 \pm 9) 岁。对照组MMSE评分为30分, 排除标准同AD组。

1.2 方法

清晨空腹抽取抗凝全血4 mL, AD组于6周后同一时间点再次抽取血样。AD组根据不同采样时间, 按先后顺序分别记为AD1、AD2。采用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法分离PBMC, 利用台盼蓝试验确定活细胞的数量。PBMC以 10^6 /mL浓度重悬于RPMI-1640培养基中, 在PHA (10 μ g/mL) 刺激下, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养48 h。48 h后收集培养上清液, -80 $^{\circ}$ C冻存。采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司) 对PBMC在PHA刺激下分泌的白细胞介素 (interleukin, IL)-1 α 、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、 γ 干扰素 (interferon gamma, IFN- γ) 和血清IL-1 α (serum IL-1 α , sIL-1 α)、血清IL-6 (serum IL-6, sIL-6)、血清IL-10 (serum IL-10, sIL-10)、血清TNF- α (serum TNF- α , sTNF- α)、血清IFN- γ (serum IFN- γ , sIFN- γ) 进行测定。血脂[总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)]水平用UNCEL DXC800全自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特公司) 进行测定。

1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 各指标诊断效能的评估采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AD组和对照组PBMC在PHA刺激下分泌的细胞因子水平的比较

AD组PHA刺激下的IL-1 α 、IFN- γ 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 而IL-10水平明显低于对照组 ($P < 0.05$); IL-6、TNF- α 与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 6周后重新采样检测, 结果与第1次一致。见图1。

2.2 AD组和对照组血清细胞因子水平的比较

AD组sIL-6、sTNF- α 水平明显高于对照组 ($P<0.05$), sIL-1 α 、sIL-10及sIFN- γ 与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。6周后重新采样检测, 结果与第1次一致。见图2。

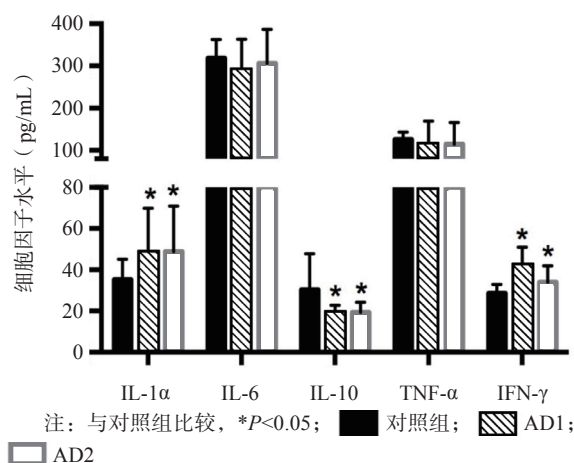


图1 AD组和对照组PBMC在PHA刺激下分泌的细胞因子水平的比较

2.3 AD组和对照组血脂水平的比较

AD组血清TC、TG及LDL-C明显高于对照组 ($P<0.05$), 而HDL-C在2个组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。6周后重新采样检测, 结果与第1次一致。见表1。

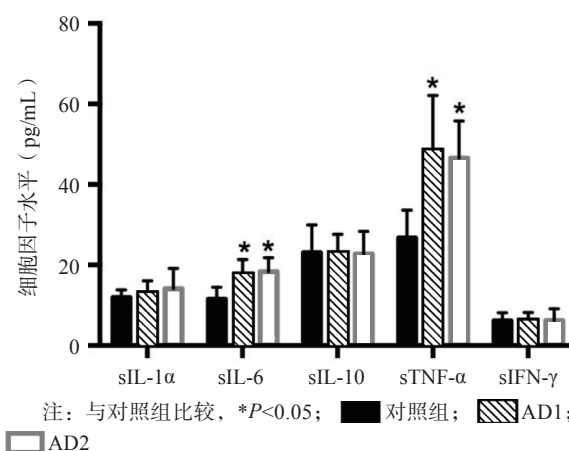


图2 AD组和对照组血清细胞因子水平的比较

表1 AD组和对照组血脂水平的比较

(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TC	TG	LDL-C	HDL-C
AD组					
AD1	100	6.25±0.77*	2.20±0.63*	4.18±0.78*	1.42±0.41
AD2	100	6.33±1.03*	2.27±0.41*	4.32±0.94*	1.42±0.57
对照组	100	5.27±0.63	1.46±0.69	3.36±0.62	1.47±0.79

注: 与对照组比较, * $P<0.05$

2.4 ROC曲线分析

分析IFN- γ 、IL-1 α 、sIL-6、sTNF- α 、TC、TG、LDL-C对AD的诊断价值, 同时以IFN- γ 代表Th1介导的免疫应答, IL-6和IL-10代表Th2介导的免

疫应答, 利用细胞因子的比值分析Th1/Th2改变在AD诊断中的敏感性和特异性, 评价这种改变作为生物标志物指导AD诊断的意义, 结果见图3, 其分析结果及特征性参数见表2。

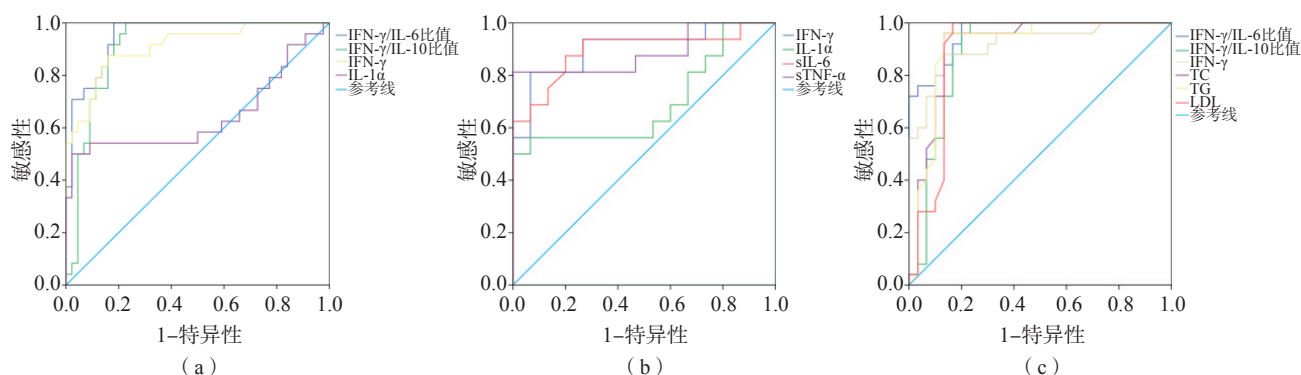


图3 评价Th1/Th2、IFN- γ 、IL-1 α 、sIL-6、sTNF- α 及血清TC、TG、LDL-C对AD诊断价值的ROC曲线

表2 ROC曲线评价Th1/Th2、IFN- γ 、IL-1 α 、sIL-6、sTNF- α 及血清TC、TG、LDL-C对AD诊断价值的特征性参数

指标	AUC	标准差	P值	95%可信区间
IFN- γ /IL-6比值	0.951	0.023	<0.001	0.905 ~ 0.996
IFN- γ /IL-10比值	0.912	0.036	<0.001	0.842 ~ 0.982
IFN- γ	0.911	0.037	<0.001	0.838 ~ 0.984
IL-1 α	0.644	0.082	0.051	0.483 ~ 0.805
sIL-6	0.894	0.061	<0.001	0.774 ~ 1.000
sTNF- α	0.888	0.064	<0.001	0.761 ~ 1.000
TC	0.912	0.042	<0.001	0.829 ~ 0.995
TG	0.911	0.044	<0.001	0.825 ~ 0.996
LDL-C	0.897	0.049	<0.001	0.801 ~ 0.993

注：AUC为曲线下面积（area under curve）

3 讨论

AD是最常见的神经退行性痴呆，其发生、发展涉及遗传、环境和生理因素^[9]。随着年龄的增长，老年人体内的血流量及灌注减少，导致活性氧产生和氧化应激失衡，炎症细胞因子生成增加。细胞因子可影响淀粉样前体蛋白（amyloid precursor protein, APP）的表达和促淀粉样变性过程和/或 β -淀粉样蛋白聚集^[10]，导致AD患者大脑的认知区域 $A\beta$ 异常聚集、增加，刺激免疫系统，诱发炎症反应的正反馈过程，造成细胞的不可逆损伤^[11]。细胞因子还可影响激酶活性，进而导致tau蛋白磷酸化异常^[10]。有学者提出，AD患者出现的认知障碍可能是由细胞因子介导的神经元与胶质细胞之间的相互作用造成的^[12]。

本研究关注AD患者PBMC在PHA刺激下的Th1/Th2细胞因子水平，PBMC可通过血脑屏障到达中枢神经系统，发挥免疫功能^[13]。本研究结果也显示AD组PHA刺激下的IFN- γ 水平明显高于对照组（ $P<0.05$ ）。有研究表明，在促炎性细胞因子IFN- γ 的刺激下，被淀粉样斑块包绕的小胶质细胞吲哚胺-2, 3-二氧化酶（indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO）过表达^[14]。IDO是犬尿氨酸途径（kynurenine pathway, KP）的限速酶，影响着色氨酸（tryptophan, TRP）的代谢。IDO的过度表达可引起KP调节异常，TRP向犬尿素（kynurenine, KYN）合成增加，TRP及其代谢产物具有神经毒性，与神经退行性疾病的发病机制有关^[4, 14]。本研究结果显示AD患者PBMC分泌的IFN- γ 增加，推测其增加引起了IDO过表达，神经毒性喹啉酸产生增加，引起神经元变性，造成了疾病的发生、发展。

本研究结果还显示IL-6和IL-10趋向下降，而IFN- γ 趋向上升，由此推测PHA刺激下细胞因子的产生模式更倾向于Th1介导的免疫应答。6周后重复收集样本检测，结果显示2个时间点PHA刺激的PBMC细胞因子分泌情况一致，提示这种Th1/Th2改变在AD患者中处于稳定状态，表明可以将这种改变作为AD的生物标志物。PHA刺激下PBMC分泌的IFN- γ 、IL-1 α 水平诊断AD的AUC为0.911、0.644，说明IFN- γ 水平对AD有一定的诊断价值；Th1/Th2（IFN- γ /IL-6比值、IFN- γ /IL-10比值）诊断AD的AUC分别为0.951、0.912，说明Th1/Th2改变对AD有诊断价值，IFN- γ /IL-6比值对AD的诊断价值比IFN- γ /IL-10比值更高，且Th1/Th2改变的诊断价值比单个细胞因子水平的诊断价值更高。

本研究还对AD患者血清细胞因子进行了测定，发现sIL-6、sTNF- α 水平明显高于对照组（ $P<0.05$ ），这与文献报道^[15-18]一致，且sIL-6、sTNF- α 诊断AD的AUC为0.894、0.888。由此可见，sIL-6、sTNF- α 水平均对AD有一定的诊断价值，但诊断价值低于PHA刺激下PBMC分泌的IFN- γ 水平。

正常机体内的APP由 α -内分泌酶催化裂解生成可溶性蛋白片段，而由 β -内分泌酶催化生成 $A\beta$ 。在高胆固醇水平下， α -内分泌酶活性受到一定抑制，APP经由 β -内分泌酶催化增多， $A\beta$ 生成增加^[6]。有研究表明，血脂代谢异常还显著影响tau蛋白过度磷酸化，从而导致AD的发生^[5]。本研究中AD患者TC、TG以及LDL-C水平明显高于对照组，且指标的升高在6周后仍能被检测到。TC、TG、LDL-C诊断AD的AUC分别为0.912、0.911、0.897，结合老年人因代谢水平降低引起的血脂生理性升高，提示这3项指标可作为AD的风险评估指标。

综上所述，PHA刺激下PBMC的IFN- γ 等细胞因子分泌水平、血清细胞因子水平及血脂水平异常可能与AD发病相关，其中PHA刺激的IFN- γ 及sIL-6、sTNF- α 、TC、TG、LDL-C水平对AD有一定的诊断价值。

参考文献

- [1] NORDBERG A. Dementia in 2014. Towards early diagnosis in Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11 (2): 69-70.
- [2] RICHARTZ E, STRANSKY E, BATRA A, et al.

- Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease?[J]. J Psychiatr Res, 2005, 39 (5) : 535-543.
- [3] MÜLLER N, SCHWARZ M J. Neuroimmune-endocrine crosstalk in schizophrenia and mood disorders[J]. Expert Rev Neurother, 2006, 6 (7) : 1017-1038.
- [4] SHAHBAZI S, KAUR J, KUANAR A, et al. Risk of late-onset Alzheimer's disease by plasma cholesterol: rational in silico drug investigation of pyrrole-based HMG-CoA reductase inhibitors[J]. Assay Drug Dev Technol, 2017, 15 (7) : 342-351.
- [5] BORRONI B, COLCIAGHI F, LENZI G L, et al. High cholesterol affects platelet APP processing in controls and in AD patients[J]. Neurobiol Aging, 2003, 24 (5) : 631-636.
- [6] SOLOMON A, KIVIPILTO M, WOLOZIN B, et al. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later[J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2009, 28 (1) : 75-80.
- [7] PAPPOLLA M A, BRYANT-THOMAS T K, HERBERT D, et al. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology[J]. Neurology, 2003, 61 (2) : 199-205.
- [8] D'ANNA L, ABU-RUMEILEH S, FABRIS M, et al. Serum interleukin-10 levels correlate with cerebrospinal fluid amyloid beta deposition in Alzheimer disease patients[J]. Neurodegener Dis, 2017, 17 (4-5) : 227-234.
- [9] BAGYINSZKY E, GIAU V V, SHIM K, et al. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis[J]. J Neurol Sci, 2017, 376: 242-254.
- [10] DOMINGUES C, DA CRUZ E SILVA OAB, HENRIQUES A G. Impact of cytokines and chemokines on Alzheimer's disease neuropathological hallmarks[J]. Curr Alzheimer Res, 2017, 14 (8) : 870-882.
- [11] MCNAULL B B, TODD S, MCGUINNESS B, et al. Inflammation and anti-inflammatory strategies for Alzheimer's disease-a mini-review[J]. Gerontology, 2010, 56 (1) : 3-14.
- [12] JULIAN A, DUGAST E, RAGOT S, et al. There is no correlation between peripheral inflammation and cognitive status at diagnosis in Alzheimer's disease[J]. Aging Clin Exp Res, 2015, 27 (5) : 589-594.
- [13] SARESELLA M, MARVENTANO I, CALABRESE E, et al. A complex proinflammatory role for peripheral monocytes in Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 38 (2) : 403-413.
- [14] YAMADA A, AKIMOTO H, KAGAWA S, et al. Proinflammatory cytokine interferon-gamma increases induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase in monocytic cells primed with amyloid beta peptide 1-42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 2009, 110 (3) : 791-800.
- [15] DURSUN E, GEZEN-AK D, HANAĞASI H, et al. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease[J]. J Neuroimmunol, 2015, 283: 50-57.
- [16] HELMY A A, NASEER M M, SHAFIE S E, et al. Role of interleukin 6 and alpha-globulins in differentiating Alzheimer and vascular dementias[J]. Neurodegener Dis, 2012, 9 (2) : 81-86.
- [17] COJOCARU I M, COJOCARU M, MIU G, et al. Study of interleukin-6 production in Alzheimer's disease[J]. Rom J Intern Med, 2011, 49 (1) : 55-58.
- [18] GEZEN-AK D, DURSUN E, HANAĞASI H, et al. BDNF, TNF α , HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment[J]. J Alzheimers Dis, 2013, 37 (1) : 185-195.
- (收稿日期: 2017-12-16)
(本文编辑: 姜 敏)