

• 论 著 •

脑脊液磷酸化 tau 蛋白在阿尔茨海默病诊断中的应用^{*}罗庆新¹, 罗星星², 陈家强¹, 蓝燕玲¹, 朱嫦琳², 李炜煌^{2△}

(1. 广东省佛山市第三人民医院检验科 528000; 2. 广东省佛山市第一人民医院检验科 528000)

摘要:目的 探讨脑脊液磷酸化 tau(p-tau)蛋白在阿尔茨海默病(AD)诊断中的水平变化及临床价值。方法 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)方法检测 51 例 AD 患者、52 例血管性痴呆(VD)患者及 50 例对照者脑脊液 p-tau 蛋白浓度,比较不同组别中 p-tau 水平的差异,同时运用受试者工作特性(ROC)曲线分析 p-tau 蛋白对 AD 的诊断价值,并确定其 p-tau 检测 AD 的最佳临界值及灵敏度、特异性。结果 AD 组、VD 组及对照组脑脊液 p-tau 蛋白浓度中位数及四分位数间距($P_{25} \sim P_{75}$)依次为 76.3 (59.1~89.8)ng/L, 36.4 (28.3~44.2)ng/L 和 34.9 (27.7~41.6)ng/L,其中 AD 患者脑脊液 p-tau 浓度高于 VD 组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),VD 组脑脊液 p-tau 蛋白水平稍高于对照组,但差异无统计学意义($P = 0.326$)。ROC 曲线分析结果显示,脑脊液 p-tau 蛋白诊断 AD 的曲线下面积(AUC)为 0.944(95% CI: 0.904~0.985)。选择 55.5 ng/L 作为脑脊液 p-tau 蛋白检测 AD 的最佳临界值(Cut-off),此时检测 AD 的灵敏度为 82.4%,特异度为 96.1%。结论 脑脊液 p-tau 蛋白在 AD 患者中特异性增高,可作为检测 AD 的生物标志物应用于临床,为 AD 的诊断提供重要实验室依据。

关键词:磷酸化 tau 蛋白; 阿尔茨海默病; 诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.13.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)13-1772-03

Study on the diagnostic value of phosphorylated tau protein in the patients with Alzheimer's disease^{*}LUO Qingxin¹, LUO Xingxing², CHEN Jiaqiang¹, LAN Yanling¹, ZHU Changlin², LI Weixuan^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third People's hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The first people's hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Objective To study the diagnostic value of phosphorylated tau (p-tau) protein in the patients with Alzheimer's disease (AD). **Methods** The level of p-tau protein was measured by ELISA in 51 patients with AD, 52 patients with vascular dementia (VD) and 50 controls, respectively. The levels of p-tau protein were compared among groups. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the diagnostic value of p-tau protein in patients with AD. And the cut-off value, sensitivity and specificity were calculated. **Results** The median and the quantile interval ($P_{25} - P_{75}$) level of p-tau protein in AD group, VD group and control group were 76.3 (59.1~89.8)ng/L, 36.4 (28.3~44.2)ng/L and 34.9 (27.7~41.6)ng/L, respectively. The level of p-tau protein of AD group was significantly higher than that of VD and control group ($P < 0.01$). The level of p-tau protein of VD group was higher than control group, but no significant difference was found ($P = 0.326$). The area under curve (AUC) was 0.944 (95% CI: 0.904~0.985). The cut-off value for detection of p-tau protein was 55.5 ng/L. The sensitivity and specificity were 82.4% and 96.1%, respectively. **Conclusion** The level of p-tau protein has increased specifically in patients with AD, and it can serve as a biomarker for diagnosis of AD.

Key words: phosphorylated tau protein; Alzheimer's disease; diagnosis

随着人口老龄化的迅速发展,老年期痴呆的发病率逐年上升^[1],临床上最常见类型为阿尔茨海默病(AD)和血管性痴呆(VD),其中 AD 患者约占 50%。由于 AD 患病率和致残率高,病程长且治疗费用高,早期诊断和早期干预治疗尤为重要,利于延缓病情发展,提高患者生活质量。目前 AD 诊断仍缺乏明确的实验室标准。脑脊液直接和中枢神经系统的细胞外空间联系,其生物学变化最能体现脑部的变化,是 AD 生物学诊断的一个常用介质。目前研究较多的脑脊液生物学指标包括总 tau(t-tau)蛋白、 β 淀粉样肽 42(A β 42)、抗糜蛋白酶(ACT)等^[2],但均存在一定的局限性,因此寻找早期诊断 AD 的灵敏度和特异度良好的脑脊液生物标志物,有助于 AD 的早发现及早治疗。研究报道,AD 患者脑脊液中 t-tau 蛋白及磷酸化 tau(p-tau)蛋白浓度显著上升^[3-4],但国内关于 p-tau 蛋白的研究报道较少。本研究旨在探讨脑脊液 p-tau 蛋白对 AD 的诊断

价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集广东省佛山市第三人民医院 2013 年 12 月至 2015 年 12 月住院老年期痴呆患者共 103 例,其中包括 AD 患者 51 例,VD 患者 52 例,AD 患者诊断依据《阿尔茨海默病痴呆诊断标准》^[5],痴呆简易筛查量表(BSSD)评分均 ≤ 16 分,平均(14.18 $\pm$ 3.62)分,并排除其他神经系统病变,其中包括男 28 例,女 23 例,年龄 61~82 岁,平均(73.12 $\pm$ 8.17)岁。VD 患者诊断依据美国精神疾病诊断和统计手册中的标准^[6],并经 CT/MRI 检查提示存在脑血管病变,BSSD 评分 ≤ 18 分,平均(16.06 $\pm$ 3.52)分,包括男 27 例,女 25 例,年龄 61~82 岁,平均(73.47 $\pm$ 8.05)岁。对照组 50 例为同期住院非神经病变患者,BSSD 评分 ≥ 26 分,且排除神经系统病变,包括男 27 例,女 23 例,年龄 60~82 岁,平均(73.18 $\pm$ 8.00)岁。三组间

^{*} 基金项目:佛山市卫生和计生局医学科研课题项目(20160138)。作者简介:罗庆新,男,主管检验师,主要从事临床生化与分子诊断学的研究。 $\triangle$ 通讯作者, E-mail: lwx21cn@163.com。

年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院科学研究伦理委员会批准,所有患者或其监护人均签署知情同意书。

1.2 方法 患者入院完善相关辅助检查后,由神经内科专科医师进行腰椎穿刺术并采集脑脊液约 3 mL,置-20℃保存待测。脑脊液 p-tau 蛋白浓度检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA),试剂盒购自比利时 Innogenetics 公司,严格按照说明书操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,对脑脊液 p-tau 蛋白浓度进行 Kolmogorov-Smirnov 检验,不符合正态分布($P<0.05$),属于偏态分布。偏态分布的计量资料用中位数和四分位数间距($P_{25} \sim P_{75}$)表示,两组之间比较采用秩和检验(Mann-Whitney U 检验)。应用 ROC 曲线分析脑脊液 p-tau 蛋白诊断 AD 的最佳临界值及检测效能,绘图采用 GraphPad Prism5 软件。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同组患者脑脊液 p-tau 蛋白的浓度比较 AD 组、VD 组及对照组脑脊液 p-tau 蛋白浓度的中位数及四分位数间距($P_{25} \sim P_{75}$)依次为 76.3(59.1~89.8)ng/L、36.4(28.3~44.2)ng/L 和 34.9(27.7~41.6)ng/L。其中 AD 患者脑脊液 p-tau 蛋白浓度高于 VD 组和对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);VD 组脑脊液 p-tau 蛋白水平稍高于对照组,但差异无统计学意义($P=0.326$)。见图 1。

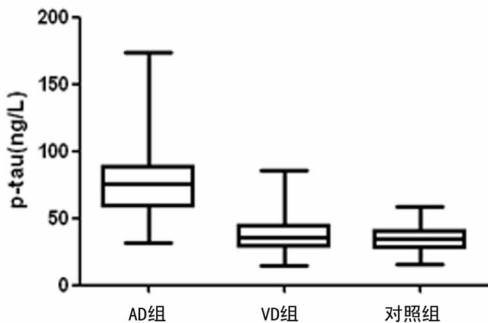


图 1 不同组患者脑脊液 p-tau 蛋白的浓度比较

2.2 脑脊液 p-tau 蛋白检测 AD 的 ROC 曲线分析 采用 AD 组作为病例组,VD 组及对照组作为对照组绘制 ROC 曲线脑脊液 p-tau 蛋白诊断 AD 的曲线下面积(AUC)为 0.944(95% CI:0.904~0.985)。选择 55.5 ng/L 作为脑脊液 p-tau 蛋白检测 AD 的最佳临界值(Cut-off),此时检测 AD 的灵敏度为 82.4%,特异度为 96.1%。

3 讨 论

AD 是引起老年痴呆的最主要原因之一。随着人口老龄化,65 岁以上老年期痴呆的发病率和患病率随年龄增加几乎呈指数增长,其发病与教育程度、居住条件及生活习性等相关^[7]。在我国,每年有近百万的 AD 新发病例^[1,8],给社会和家庭带来沉重的负担,也给社会经济发展和老年卫生保健带来巨大的挑战。由于 AD 发病机制尚未明确,缺乏早期诊断的方法和标准,符合临床诊断标准的 AD 病例已处于疾病晚期,神经元已呈不可逆损伤^[9],失去了治疗和干预的最好时机。

tau 蛋白是位于神经轴索的一种结构蛋白,正常脑中,tau 蛋白的功能是与微管蛋白结合以促进微管的形成并维持微管稳定性,诱导微管形成束状。tau 蛋白过度磷酸化可使其失去正常功能,并导致神经纤维缠结^[10],是 AD 的主要病理特点之一。研究指出,检测脑脊液中的总 t-tau 蛋白可有效鉴别 AD

和正常老化,但灵敏度特异度均不高^[11-12]。然而,由于 VD 及其他神经变性疾病如额颞叶痴呆(FTD)、Lewy 体痴呆(LBD)等病患中脑脊液 t-tau 水平也增加,因此 t-tau 在鉴别 AD 及其他类型痴呆的特异性较低,不能作为鉴别 AD 的良好标志物^[13]。其他脑脊液生物学指标包括 Aβ42、ACT 等,仍存在着一定的局限性^[2]。

随着免疫分析技术的发展,脑脊液 p-tau 蛋白可被特异性检出。研究指出,p-tau 蛋白对鉴别 AD 与非 AD 神经变性疾病灵敏度和特异性均远远高于 t-tau 蛋白。本研究对 AD 患者、VD 患者及健康对照者脑脊液 p-tau 蛋白的浓度进行比较,结果显示 AD 组患者 p-tau 蛋白水平高于其他两组,而 VD 组与健康对照组 p-tau 蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$),证实 p-tau 蛋白仅在 AD 中特异性升高,可作为鉴别 AD 与健康人,AD 与 VD 的良好指标,与文献报道一致^[10]。有研究认为采用联合 Aβ42、t-tau 蛋白及 p-tau 蛋白的方法检测 AD,其灵敏度和特异性可相应提高^[14]。然而,本研究采用 ROC 曲线分析脑脊液 p-tau 蛋白对 AD 的检测性能,结果显示单独采用脑脊液 p-tau 蛋白诊断 AD 的 AUC 达到 0.944,最佳临界值为 55.5 ng/L,此时检测 AD 的灵敏度为 82.4%,特异度为 96.1%,表明 p-tau 蛋白对 AD 具有良好的诊断价值,可独立作为 AD 诊断的重要参考指标。

综上所述,脑脊液 p-tau 蛋白在 AD 患者中特异性增高,可作为检测 AD 的生物标志物应用于临床,为 AD 的诊断提供重要实验室依据。然而,本研究存在着一定的局限性,由于其他神经变性疾病样本量较少,因此在本研究中并未纳入,仅探讨 p-tau 蛋白对 AD 与 VD 及健康对照者的鉴别诊断价值,应在后续研究中补充该部分研究,进一步明确 p-tau 蛋白对 AD 的特异性鉴别诊断价值。

参考文献

- [1] Chan KY, Wang W, Wu JJ, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis[J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2016-2023.
- [2] Vos SJ, Visser PJ, Verhey F, et al. Variability of CSF Alzheimer's disease biomarkers; implications for clinical practice[J]. PloS One, 2014, 9(6): e100784.
- [3] Broncel M, Krause E, Schwarzer D, et al. The Alzheimer's disease related tau protein as a new target for chemical protein engineering[J]. Chemistry, 2012, 18(9): 2488-2492.
- [4] 张玉芳,陈颖,王晓冬,等.阿尔茨海默病发病中淀粉样蛋白与 tau 蛋白的产生及其相互关系[J].中华老年医学杂志, 2013, 32(1): 104-106.
- [5] 美国国立老化研究所与阿尔茨海默病协会诊断指南协作组.阿尔茨海默病痴呆诊断标准的推荐[J].中华神经科杂志, 2012, 45(5): 352-355.
- [6] Jeste DV, Meeks TW, Kim DS, et al. Research agenda for DSM-V: diagnostic categories and criteria for neuropsychiatric syndromes in dementia[J]. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2006, 19(3): 160-171.
- [7] 韩若欣,左秀美.生活高危因素对阿尔茨海默病的影响分析[J].检验医学与临床, 2014, 11(2): 150-154.
- [8] 丁玎,洪震.老年性痴呆和轻度认知功(下转第 1777 页)

general concepts and associated terms[S]. Geneva; ISO, 2007.

[2] Westgard JO. Managing quality vs. measuring uncertainty in the medical laboratory[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(1):31-40.

[3] Ellison SR, Rosslein M, William A, et al. EURACHEM/CITAC Guide CG4. Quantifying uncertainty in analytical measurement [S]. 2000. <http://faculty.fiu.edu/~almirall/uncertainty-eurachemcitac.pdf>

[4] White GH, Farrance I. Uncertainty of measurement in quantitative medical testing: a laboratory implementation guide[J]. 2003, 25(25):1-24.

[5] CAC. Proposed draft revised guidelines on measurement uncertainty[M/OL]. Codex committee on methods of analysis and sampling (CC-MAS), 2010.

[6] CLSI C51-P. Expression of measurement uncertainty in laboratory medicine; proposed guideline [S]. CLSI, 2011.

[7] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-TRL-001. 医学实验室-测量不确定度的评定与表达, 2012.

[8] 刘子勇. 容量计量[M]. 北京: 中国计量出版社, 2009:7-8.

[9] Nordic Innovation Center. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories [S]. Nordtest, 2011.

[10] ISO, IEC. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S]. Geneva; ISO, 2005, 17025.

[11] ISO. Medical laboratories - Particular requirements for quality and competence. ISO 15189. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2007.

[12] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL01. 检测和校准实验室能力认可准则, 2006.

[13] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02. 医学实验室质量和能力认可准则, 2006.

[14] ISO. In vitro diagnostic medical devices-Measurement of quantities in biological samples-Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials [S]. Geneva, Switzerland; ISO, 2003.

[15] ISO. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method[S]. Geneva, Switzerland; ISO, 1994.

[16] ISO. In vitro diagnostic medical devices-Measurement of quantities in samples of biological origin-Requirements for content and presentation of reference measurement procedures[S]. Geneva, Switzerland; ISO, 2009, 15193.

[17] ISO. In vitro diagnostic medical devices -Measurement of quantities in samples of biological origin-Requirements for certified reference materials and the content of supporting documentation [S]. Geneva, Switzerland: ISO, 2009, 15194.

[18] 杨振华. 关注测量不确定度在临床检验中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(9):965-966.

[19] 梁淑新, 施俊英. 生物化学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2007:225.

[20] 马智. 临床疾病检验[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2008:116.

[21] 杨桦. 阴离子间隙在新生儿窒息中的临床应用[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(16):2302.

[22] 关仲. 阴离子间隙的临床应用分析[J]. 中国当代医药, 2010, 17(12):151.

[23] 李伟锋, 张天增. 阴离子间隙在急性肾功能衰竭患者中的临床应用价值分析[J]. 中国社区医师(医学专业), 2012, 4(17):81.

[24] 杨敏京, 冯立群, 张苗. 脑出血患者阴离子间隙变化的临床意义分析[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14(1):20-21.

[25] 芦志英. 阴离子间隙在诊断混合型酸碱平衡紊乱中的作用[J]. 临床急诊杂志, 2013, 14(6):266-268.

(收稿日期:2016-02-06 修回日期:2016-04-10)

(上接第 1774 页)

能障碍的流行病学研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2013, 21(1):101-108.

[9] Samtani MN, Raghavan N, and Shi Y, et al. Disease progression model in subjects with mild cognitive impairment from the Alzheimer's disease neuroimaging initiative: CSF biomarkers predict population subtypes [J]. Br J Clin Pharmacol, 2013, 75(1):146-161.

[10] Mondragon-Rodriguez S, Perry G, Zhu X, et al. Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: implications for Alzheimer's disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013(1):940603.

[11] Young AL, Oxtoby NP, Daga P, et al. A data-driven model of biomarker changes in sporadic Alzheimer's disease [J]. Brain, 2014, 139 (9):2564-2577.

[12] 鲍琳琳, 赵红, 张仁泽, 等. 阿尔茨海默病患者脑脊液核心生物标记与认知功能的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(1):39-41.

[13] Fabre F, Forsell C, Viitanen M, et al. Clinic-based cases with frontotemporal dementia show increased cerebrospinal fluid tau and high apolipoprotein E epsilon4 frequency but no tau gene mutations [J]. Exp Neurol, 2001, 168 (2):413-418.

[14] 方宇, 张璐, 朱红灿, 等. 脑脊液磷酸化 tau 蛋白及 β 淀粉样蛋白检测在老年期痴呆患者早期鉴别诊断中的价值[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(13):2561-2562.

(收稿日期:2016-01-28 修回日期:2016-03-31)