

·基础研究·

国人外周血抗 β -淀粉样蛋白抗体水平的依龄性变化

杨志勇, 汪华侨, 张革, 林贤, 谢瑶, 袁群芳, 姚志彬
(中山大学基础医学院解剖学教研室脑研究室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】主动和被动免疫可以显著改善阿尔茨海默病(AD)的病理和临床过程,抗 $A\beta$ 抗体在AD预防和治疗中的作用已得到肯定,测定健康人群外周血中的抗 $A\beta$ 抗体的水平将有助于了解AD发病机制。【方法】收集1~89岁共210例健康人群的血清标本,以10岁为一个年龄组,共9组。采用间接ELISA法测定所收集人群的血清中抗 $A\beta$ 抗体的相对滴度,并用Western blot法检测其抗 $A\beta$ 抗体的特异性。【结果】健康人外周血中普遍存在抗 $A\beta$ 抗体,并且随年龄血清中抗 $A\beta$ 抗体水平逐渐增加,回归分析呈现线性关系;在60岁以上年龄组,抗体水平显著高于60岁以下的各年龄组($P < 0.01$)。Western blot的结果显示抗 $A\beta$ 抗体可以识别 β -淀粉样蛋白。【结论】健康人群血清中存在着特异性的抗 $A\beta$ 抗体,抗体的滴度呈依龄性增加。

关键词: β -淀粉样蛋白;自身抗体;阿尔茨海默病;中国人

中图分类号:R466.6

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)02-0125-04

Age-associated Changes of Antibodies against β -amyloid Protein in Plasma of Healthy Chinese Population

YANG Zhi-yong, WANG Hua-qiao, ZHANG Ge, LIN Xian, XIE Yao, YUAN Qun-fang, YAO Zhi-bin
(Department of Anatomy and Brain Research, Preclinical Medical School, SUN Yat-sen University,
Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】Active and passive immunization can improve the pathology and clinic processes in murine model and patients with Alzheimer's disease (AD). It has been confirmed that the antibodies against β -amyloid protein shows great significance in the prophylaxis and therapeutics of AD. To investigate the levels of naturally occurring anti- β -amyloid protein antibodies in healthy population may be helpful to explore the AD pathogenesis. 【Methods】A total of 210 plasma samples from healthy individuals (age from 1 to 89 years old) were collected. All cases were grouped by 10 years old. The presence and levels of antibodies against β -amyloid protein was determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the specificity of the antibodies was measured by Western blot analysis. 【Results】Naturally occurring anti- β -amyloid protein antibodies were found in the plasma of healthy groups. With the increasing of age, the levels of antibodies against β -amyloid protein were increased, which displayed the significant correlation. Regression analysis showed linear correlation and the levels of antibodies against β -amyloid protein in the groups above 60 years old were higher than that of below the 60 years old ($P < 0.01$). The specificity of the antibodies in plasma was confirmed by Western blot, which can recognize the $A\beta_{42}$ -GST fusion protein on the PVDF membrane. 【Conclusion】The age-associated increasement in the levels of antibodies against β -amyloid protein in the plasma of healthy groups may reflect a progressive increase in the number of cerebral plaques made up of amyloid protein aggregates and the increased immune responses to the β -amyloid protein in older persons.

Key words: amyloid β -protein; anti-amyloid IgG; Alzheimer's disease; Chinese

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005,26(2):125-128]

收稿日期:2004-11-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400512);广东省自然科学基金资助项目(20013137);广东省自然科学基金资助项目(04300218);广州市科技计划基金资助项目(2004Z3-E0151);中国博士后基金资助项目(2004035040);中山市科技局重点攻关基金资助项目(4209606)

作者简介: 杨志勇(1969-),男,安徽阜阳人,博士生;姚志彬,教授,课题负责人,通讯作者。E-mail:anatomy@gzsums.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)主要的病理特征是老年斑和神经纤维缠结,老年斑的核心是一种呈聚集状态的含 42 个氨基酸的多肽,称 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)。脑内淀粉样蛋白的过量聚集或过多的老年斑被认为是导致 AD 发病的关键因素,这就是所谓的“淀粉样蛋白学说”。目前研究 AD 预防和治疗的热点也集中在减少 A β 的产生、沉积和增加 A β 清除等方面。

1999 年 Schenk 等^[1]发现抗 A β 抗体可以清除老年斑并可预防老年斑的形成。我们也发现用 A β_{42} 及其片段 A β_{15} 诱导产生的抗 A β 抗体可以减轻淀粉样蛋白对 PC12 细胞的毒性,有效地减少 Tg2576 转基因鼠的 AD 样病理改变,并且使认知功能得到改善,表明抗 A β 抗体在 AD 的预防和治疗有重要的作用^[2,3]。Du 等^[4]研究发现正常人和 AD 病人组的血清中均有抗 A β 抗体,两组抗体都能与 A β 和老年斑结合但 AD 病人的抗体水平低于健康对照组。因此推测抗 A β 抗体可能在 AD 的发病中起一定作用。由于目前尚未有大量健康个体血清中抗 A β 抗体水平的报道,我们检测了广州地区不同年龄段的 210 名健康个体血清中抗 A β 抗体的相对滴度。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集广州地区 210 例健康人群的血清标本,从 1 岁到 89 岁,以 10 岁为一个年龄组,共 9 组。血清标本由中山大学附属第一医院、孙逸仙纪念医院和肿瘤医院的体检中心提供。其中男 124 例,女 86 例。各组内男女的年龄无差别。

1.2 检测方法

血清抗体的检测参照 Du 等^[4],采用间接 ELISA 法:① 96 孔聚苯乙烯反应板(JET 公司,Canada),A β_{42} (Genemed synthesis 公司,USA)1 μ g 溶于 100 μ L 包被稀释液,37 $^{\circ}$ C 孵育过夜;② PBST(0.5ml/L Tween20-PBS)200 μ L 洗涤 3 次,每次 3 min,去除贴壁气泡;③ 5 g/L 的明胶每孔 200 μ L 封闭,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。洗涤同上;④ 加入倍比稀释的血清标本。每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。洗涤同上;⑤ 过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (武汉博士德公司),1:2 000 稀释,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,洗涤同上;⑥ 加底物液(含邻苯二胺和过氧化氢)100 μ L 显

色后,2 mol/L 硫酸溶液 50 μ L 中止反应;⑦ 酶标仪测定每孔的 A 值(波长为 492 nm),以 P/N \geq 2.1 为阳性结果。取出现阳性结果的最高稀释倍数的倒数为该样品的滴度,20 min 内测定实验结果。阳性对照用单克隆抗体 Bam10(sigma 公司),稀释浓度为 1:2 000 和过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (武汉博士德公司),阴性对照组为不包被 A β_{42} 的倍比稀释的血清。

1.3 Western blot 法测定血清抗 A β_{42} 抗体的特异性

将 2 μ g A β_{42} 与谷胱甘肽 S 转移酶(GST)反应组成 GST-A β_{42} 融合蛋白(中山大学药学院合成),融合蛋白的相对分子质量为 31 \times 10³。取融合蛋白进行 Western blot 免疫印迹杂交。Western blot 的方法参考文献[5]。将所得的凝胶蛋白转至聚双氟乙烯(PVDF)膜后,加入正常人血清 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜,然后加入过氧化物酶标记的羊抗人 IgG(武汉博士德公司),稀释倍数为 1:1 000,孵育后 1 h 后以二氨基联苯胺(DAB)显色,0.01 mol/L PBS 中止。

1.4 统计学分析

各组抗体滴度数值用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,对各组进行方差检验,全部数据采用相关分析和回归分析。统计工具为 SPSS11.0 软件包。

2 结果

2.1 抗体结果分析

210 例正常人的外周血中均测出抗 A β 抗体,抗体水平总体上呈年龄依赖性增加。以 10 岁为一个年龄组,各年龄组的抗 A β 抗体的水平随年龄的增加而逐渐增加。单因素方差分析显示 60 岁以上的 3 组间抗体滴度差异无显著性($P > 0.05$),但明显高于 60 岁以前的 6 组($P < 0.01$),60 岁以前的 6 组组间差异不明显($P > 0.05$)。男、女性人群之间抗体水平总体上男性高于女性($P < 0.05$)。在 30~39 岁、40~49 岁、50~59 岁和 70~79 岁组女性抗体的水平高于男性(表 1)。

2.2 Western blot 分析

Western blot 结果表明正常人外周血清中存在有抗 A β 抗体,此抗体可以与转至 PVDF 膜上的 A β_{42} -GST 融合蛋白特异性结合并显色(图 1)。图 1 为一 73 岁的正常男性血清与 PVDF 膜的共孵育后,用 DAB 显色,可见在约 31 ku 处出现特异性条

带, 此条带为 $A\beta_{42}$ -GST 融合蛋白与血清中抗 $A\beta$ 抗体结合的位点。

表1 国人各年龄组抗 $A\beta$ 抗体平均水平

Table1 The average titer of anti- β -amyloid antibodies in each group

Group(years old)	N(male/female)	Male	Female	Total
0-9	22(10/12)	1250±1142	808±922	1009±1027
10-19	24(12/12)	1300±996	1083±1106	1191±1035
20-29	22(11/11)	1727±1780	1600±1324	1664±1532
30-39	15(7/8)	1571±1235	2000±1814	1800±1533
40-49	32(21/11)	2800±1639	3091±2284	2900±1854
50-59	22(13/9)	2800±2263	2993±1428	2879±1927
60-69	37(29/8)	4883±2567	3500±2491	4584±2581
70-79	19(12/7)	5600±2771	6171±2682	5811±2678
80以上	17(9/8)	4493±3080	3771±3019	4196±3039
Total	210(124/86)	3256±232	2527±254	2961±2517

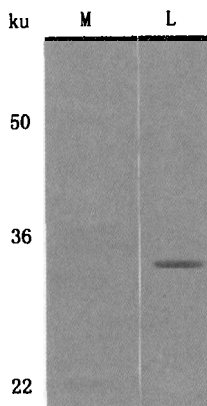


图1 73岁的正常男性血清与PVDF膜的共孵育后DAB显色

Fig.1 Normal plasma staining of PVDF membrane after Western blot

M: Protein marker; L: $A\beta_{42}$ -GST fusion protein

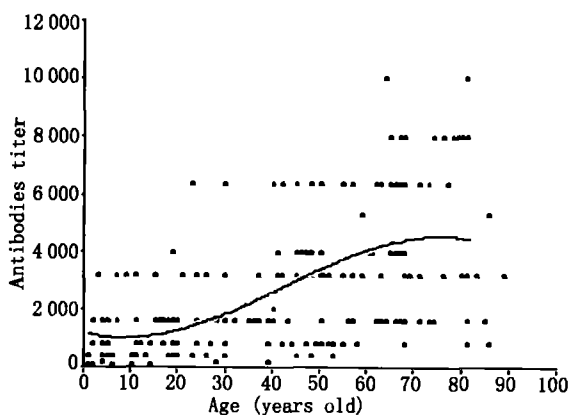


图2 血清中抗体水平的分布和回归曲线(Cubic模型)

Fig.2 The distribution of anti- β -amyloid antibodies and the regression curve estimation (cubic models)

2.3 相关性和回归分析

相关性分析表明年龄与抗 $A\beta$ 抗体水平有明显的相关性, 相关系数为 0.567。随着年龄的增加, 抗体水平也逐渐增加, 呈正相关(图2)。

3 讨论

正常情况下, 淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的代谢以 α 裂解酶的裂解为主, 其裂解产物不包含完整的 $A\beta_{42}$ 片段, 同 AD 病人比较, 健康人体内只有较少的 $A\beta_{42}$ 产生, 且在脑内有少量淀粉样斑块的形成和聚集。由于遗传或其他因素, APP 转以 β 和 γ 裂解酶的裂解为主, 产生了较多的病理性 $A\beta_{42}$ 。现有研究表明无论是可溶性的 $A\beta_{42}$ 还是聚集性的 $A\beta_{42}$, 在中枢神经系统和外周血液循环中均表现出多种神经毒性, 因此清除体内过多的 $A\beta_{42}$ 是 AD 发病和治疗研究的重点。

研究表明即使在健康人, 脑内 $A\beta_{42}$ 的水平和老年斑的数量是随年龄的增加而逐渐增加, 但血清中的 $A\beta_{42}$ 水平不能完全准确地反映这种变化^[6]。Johnson 等^[7]发现年龄是脑内 $A\beta$ 聚集最主要的危险因素, 此外, 带有载脂蛋白(APO) ϵ 4 等位基因的个体及绝经后女性也是危险因素, 后者可能与雌激素水平的下降有关。在正常小鼠, 大鼠, 狗, SAM 鼠、PDAPP 转基因鼠, APO ϵ 4 基因敲除鼠等均发现有类似的情况。因此, 我们发现随年龄增加, 血清中针对 $A\beta$ 的抗体逐渐增加的现象, 可能是由于正常人体内、特别是脑内淀粉样蛋白或老年斑逐渐增加、聚集, 这些聚集的淀粉样蛋白暴露出相应的抗原表位, 诱导机体产生针对 $A\beta_{42}$ 的自身抗体。抗 $A\beta$ 抗体的依龄性增加反映出体内 $A\beta_{42}$ 逐渐聚集的趋势^[8]。实验证实只有呈聚集的 $A\beta_{42}$ 而不是可溶性的 $A\beta$ 能介导抗体产生。

人体的免疫系统具有保护作用, 我们推测抗 $A\beta$ 抗体的增加可能是人体一种正常的减轻 $A\beta$ 毒性、防止认知功能衰退的代偿机制。虽然脑内 $A\beta_{42}$ 聚集和老年斑形成也逐渐增加, 但正常人体内抗 $A\beta$ 抗体的依龄性增加表明免疫反应可持续增强。因为机体正常下也可以产生少量 $A\beta_{42}$, 机体的这种免疫反应是如何逃避中枢和外周免疫耐受或进行阳性选择的尚待进一步研究。

Monsonogo 等^[9]的研究表明 $A\beta$ 反应性 T 细胞在人体是能终生存在, 并且在老年人, 针对 $A\beta$ 的免疫反应得到加强, 这可以解释在老年组, 血清中

抗 A β 抗体明显高于年轻各组。因此健康人随年龄的增加,针对 A β 免疫反应增加,抗体的产生逐渐增多,到老年阶段,这种免疫应答进一步得到加强,以延缓认知功能衰退。而在年轻时期,脑内淀粉样斑的形成不明显,因此,难以诱导产生高水平的抗 A β 抗体。

AD 免疫治疗的实验表明抗 A β_{42} 抗体具有以下 3 种可能的作用:① 降解斑块作用:抗体通过 Fc 介导小胶质细胞吞噬老年斑;② 周围沉积作用:通过在外周血循环中与 A β 结合形成抗原-抗体复合物,加速 A β 从脑内流出;③ 抑制聚集作用:与 A β 结合后,阻断了 A β 的纤维性聚集^[10]。目前抗 A β 抗体在外周的作用逐渐引起重视,抗 A β 抗体可以清除血液中可溶性 A β ,使脑内的淀粉样蛋白加速向外周移动,降低脑内 A β 聚集^[11]。人体试验表明抗 A β 抗体可以识别老年斑,预防 A β_{42} 纤维聚集,防止 A β_{42} 对 PC12 细胞的毒性;接受免疫治疗的 AD 病人 1 年内认知水平得到保持稳定,部分病人的 MMSE 分数还有所增加^[12]。

Du 等^[13]发现,从人血清中分离纯化的抗 A β 抗体可以与可溶性的 A β 和纤维性 A β 结合,不仅防止 A β 纤维聚集,还使纤维聚集的 A β 结构降解;体外实验显示抗 A β 抗体对培养的海马神经元具有保护作用,减轻 A β_{25-35} 和 A β_{40} 的毒性损害。

临床上散发性 AD 的多数在 60 岁以后,AD 病人的外周血和脑脊液中,抗 A β 抗体水平比健康对照组减少^[4,14],虽然这些 AD 病人针对其他抗原的免疫功能没有受到损害,但针对 A β 可能出现了免疫耐受。由于相当多的 AD 病人和健康人外周血和脑脊液中抗体水平很相似,因此,抗 A β 抗体在 AD 发病中的作用目前仍未明确,研究 AD 病人和健康人、年轻人和老年人之间抗 A β 抗体性质上的异同将对了解 AD 发病和治疗仍有重要的意义。

抗 A β 抗体的保护作用已得到肯定,是否低滴度抗 A β 抗体的人群发生 AD 的几率会增加?无论是健康人还是 AD 病人,长期追踪抗 A β 抗体水平是否对 AD 的诊断和预后判断有价值?结论尚难肯定,但本研究结果反映了体内,主要是脑内 A β_{42} 进行性沉积的趋势。

(感谢中山大学孙逸仙纪念医院段朝晖医生、第一附属医院刘美娜医生提供血清标本)

参考文献:

[1] Schenk D, Barbour R, Dunn W, *et al.* Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like

pathology in the PDAPP mouse [J]. *Nature*, 1999, 400 (8):173-7.

- [2] 李国营,胡金家,林 贤,等.A β 不同片段疫苗免疫鼠后血清对 A β_{42} 诱导细胞毒性作用的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(2):102-4.
- [3] 胡金家,汪华侨,姚志彬,等.A β_{42} 及其亚单位疫苗诱导 BALB/c 小鼠抗体的产生及其抗的毒性作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(2):178-80.
- [4] Du Y, Dodel R, Hampel H, *et al.* Reduced levels of amyloid β -peptide antibody in Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2001, 57(5):801-5.
- [5] Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1995.880-96.
- [6] Selkoe D J. Clearing the brain's amyloid cobwebs [J]. *Neuron*, 2001, 32(2):177-80.
- [7] Johnson JK, McCleary R, Oshita M H, *et al.* Initiation and propagation stages of β -amyloid are associated with distinctive apolipoprotein E, age, and gender profiles [J]. *Brain Res*, 1998, 798(1,2): 18-24.
- [8] Nobrega A, Haury M, Gueret R, *et al.* The age-associated increase in autoreactivity immunoglobulins reflects a quantitative increase in specificities detectable at lower concentrations in young mice [J]. *Scand J Immunol*, 1996, 44(5):437-43.
- [9] Monsonogo A, Zota V, Karni A, *et al.* Increased T cell reactivity to amyloid β protein in old human and patients with Alzheimer disease [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(3):415-22.
- [10] Schenk D. Amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, 3(10):824-8.
- [11] Lemere CA, Spooner ET, LaFrancois J, *et al.* Evidence for peripheral clearance of cerebral A β protein following chronic, active A β immunization in PSAPP mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2003, 14(1):10-8.
- [12] Hock C, Konietzko U, Streffer JR, *et al.* Antibodies against β -amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 2003, 38(4): 547-54.
- [13] Du Y, Wei X, Dodel R, *et al.* Human anti- β -amyloid antibodies block β -amyloid fibril formation and prevent β -amyloid-induced neurotoxicity [J]. *Brain*, 2003, 126 (9):1935-9.
- [14] Weklser ME, Relkin N, Turkenich R, *et al.* Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals [J]. *Exper Gerontol*, 2002, 37(7):943-8.

(编辑 张思健)