

· 临床研究 ·

轻度认知功能障碍及老年性痴呆患者外周淋巴细胞糖原合成酶激酶-3 的变化

王兴彬 张柏源 张清德 曲忠森

【摘要】目的 探讨轻度认知功能障碍(MCI)及阿尔茨海默病(AD)患者外周淋巴细胞糖原合成酶激酶-3(GSK-3)的变化。**方法** 用放射性配体结合试验检测正常老年人(对照组)、MCI患者(MCI组)及AD患者(AD组)外周淋巴细胞GSK-3的活性,并用Western blot法检测GSK-3 β Ser9位点的磷酸化水平及总GSK-3 β 表达。**结果** AD组及MCI组GSK-3活性分别为 (1.32 ± 0.09) 和 (1.22 ± 0.10) ,明显高于对照组的 (1.00 ± 0.06) ,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$);AD组及MCI组GSK-3 β Ser9位点的磷酸化水平分别为 (0.82 ± 0.07) 和 (0.87 ± 0.08) ,明显低于对照组的 (1.01 ± 0.07) ,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01);AD组及MCI组总GSK-3 β 表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** MCI及AD患者外周淋巴细胞GSK-3的活性升高,可能对此类疾病的早期诊断有潜在的价值。

【关键词】 轻度认知障碍; 阿尔茨海默病; 淋巴细胞; 糖原合成酶激酶-3

Glycogen synthase kinase-3 in the lymphocytes of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease WANG Xing-bin*, ZHANG Bai-yuan, ZHANG Qing-de, QU Zhong-sen. *Department of Neurology, Feicheng People's Hospital Affiliated with Taishan Medical College, Feicheng 271600, China

Corresponding author: QU Zhong-sen, Email: quzs1968@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore changes in glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) levels in the lymphocytes of patients with mild cognition impairment (MCI) and Alzheimer's disease (AD). **Methods** GSK-3 activity was measured by ^{32}P liquid scintillography in a control group, an MCI group and an AD group. The expressions of GSK-3 β at Ser9 and total GSK-3 β were determined by western blotting. **Results** GSK-3 levels were significantly higher in the AD and MCI groups than in the control group. The phosphorylation of GSK-3 β at Ser9 was significantly lower in the AD and MCI groups compared with the control group, but there was no difference in the phosphorylation of total GSK-3 β among the three groups. **Conclusions** Higher GSK-3 activity in the lymphocytes might have value in the diagnosis of MCI and early AD.

【Key words】 Mild cognitive impairment; Alzheimer's disease; Lymphocytes; Glycogen synthase kinase-3

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)为老年人群中最常见及高发的痴呆疾病,而轻度认知功能障碍(mild cognition impairment, MCI)则被认为是一种介于老年记忆减退和痴呆(主要是AD)之间的过渡状态^[1]。也有观点认为, MCI代表AD的极早期阶段, MCI患者脑中也可能存在AD样的病理改变^[2-3]。

β 淀粉样蛋白(amyloid beta peptide, A β)产生过量与tau蛋白(microtubule associated protein tau, 微管相关蛋白 tau)的异常过度磷酸化是形成AD的两大病

理学特征的基础。糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)是参与AD发生的重要激酶,不仅与A β 的产生与聚集有关,而且与tau蛋白的过度磷酸化密切相关^[4]。有研究报道,在AD及MCI患者的外周血白细胞中, GSK-3的表达异常升高^[5]。但是用酶联免疫吸附检测(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测外周单核细胞中GSK-3 β 的含量时发现, MCI患者GSK-3 β 在外周单核细胞中的含量明显低于AD患者^[6]。淋巴细胞可以通过血脑屏障。早期AD患者外周淋巴细胞中GSK-3的变化如何目前尚不明确。因此,我们通过检测外周淋巴细胞的GSK-3水平,探讨其对AD的潜在诊断价值。

资料与方法

一、病例选择和分组

于2007年10月至2008年10月对门诊就诊患者

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.07.012

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(20060390635),上海市浦东新区社发局基金资助项目(PW2008A-8)

作者单位:271600 肥城,泰山医学院附属肥城市人民医院神经内科(王兴彬、张柏源);菏泽医学专科学校临床系内科教研室(张清德);上海浦东新区人民医院神经内科(曲忠森)

通信作者:曲忠森, Email: quzs1968@yahoo.com.cn

进行筛查,并通过我院开展的全市心脑血管病普查收集 MCI 及 AD 患者,同时收集同期门诊健康志愿者 30 例,集中采血收集标本。

30 例门诊健康老年志愿者作为对照组,其中男 16 例,女 14 例;平均年龄(73.4 ± 6.7)岁;平均受教育年限(6.1 ± 2.9)年。入组标准:年龄 60 岁以上;无严重躯体疾病;认知功能、远近记忆力、生活及社交能力等无明显异常;简易精神状态检查表(Mini-Mental State Examination, MMSE)^[7]评分为(27.8 ± 1.9)分, Hachinski 缺血指数量表^[8]评分为(1.8 ± 0.5)分,临床痴呆评定量表(Clinical Dementia Rating Scale, CDR)^[9]评分为 0 分。

2007 年 10 月至 2008 年 10 月收集的有失忆性轻度认知功能损害的老年人 30 例作为 MCI 组,其中男 19 例,女 11 例;平均年龄(68.6 ± 6.9)岁;平均受教育年限(6.8 ± 3.7)年。入组标准:符合 Petersen 等^[10]提出的 MCI 诊断标准,有记忆力下降,持续在 3 个月以上;MMSE 评分(23.9 ± 1.8)分, Hachinski 缺血指数量表评分(1.7 ± 0.5)分,日常生活活动能力量表^[11]评分(22.0 ± 0.8)分,CDR 评分(0.5 ± 0.1)分,总体衰退量表(Global Deteriorate Scale, GDS)^[12]分级为 2~3 级。

2007 年 10 月至 2008 年 10 月收集的 30 例 AD 患者作为 AD 组,其中男 17 例,女 13 例;平均年龄(74.4 ± 7.8)岁;平均受教育年限(6.3 ± 4.1)年。入组标准:符合美国国立神经病学、言语功能障碍和脑卒中研究所(NIH/CDS-ADRDA)制定的“很可能 AD”诊断标准^[13],符合美国精神疾病专断和统计手册第 4 次修订版中的 AD 诊断标准^[14];MMSE 评分(16.0 ± 3.5)分, Hachinski 缺血指数量表评分(2.3 ± 0.4)分,日常生活活动能力量表评分(30.4 ± 2.8)分,CDR 评分(1.5 ± 0.6)分,GDS 分级为 3 级以上。

排除标准:以上入组者均排除心、肝、肾、肺疾病,无脑外伤、脑卒中、脑部感染及精神疾病史。

3 组性别、年龄和受教育程度比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

二、主要实验试剂

北京福瑞生物工程公司提供的 γ -³²P ATP;美国 Cell Signaling Technology 公司购买的识别总 GSK-3 β 和 Ser9 磷酸化的 GSK-3 β 抗体 p-GSK-3 β ;美国 Upstate 公司购买的酶活性测定底物(phospho-GS peptide);加拿大 Cedarlane labs 公司购买的淋巴细胞分离液。

三、样本采集

用肝素抗凝管采集各组静脉血 6~10 ml,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)等量稀释,将 6 ml 稀释的血细胞液加入 15 ml 离心管,再将 3 ml 淋巴细胞分离液(lympholyte-H)沿管壁加入离心管,室温

下离心 20 min($800 \times g$);用细吸管从界面上吸取淋巴细胞,并移到另一离心管,用 PBS 稀释细胞,离心 10 min($800 \times g$),弃上清;取沉淀,用 PBS 冲洗 3 次,再用 PBS 稀释成细胞数为($4 \sim 10$) $\times 10^6$ 的悬液;加入 100 μ l 细胞裂解液,经超声破碎(10 s, 3 次)后,离心 10 min($12\ 000 \times g$);取上清,采用二喹啉甲酸蛋白测定法测定蛋白质浓度, -70℃ 冰箱中保存。

四、GSK-3 的活性测定

按照 Pei 等^[15]介绍的方法测定 GSK-3 的活性:将 7.5 μ g 蛋白加入总量为 25 μ l、pH 值为 7.4 的缓冲液中,该缓冲液含 30 mmol Tris、10 mmol MgCl₂、10 mmol NaF、1 mmol Na₃VO₄、2 mmol 乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)、10 mmol 巯基乙醇(β -mercaptoethanol, β -ME)、200 μ mol [γ -³²P]ATP(放射比活度为 1500 cpm/pmol ATP)及 20 μ mol 磷酸化糖原合成酶底物,振荡混匀后,于 30℃ 下孵育 30 min,用 25 μ l 300 mmol 的 H₃PO₄ 反应液终止反应;各反应体系分别取 25 μ l 滴在磷酸纤维膜上,以 75 mmol H₃PO₄ 定时冲洗抽滤,滤膜晒干并置入液闪瓶中,加二甲苯闪烁液,隔夜以液体闪烁仪计数。用对照组所测数值的均值除以各样本数值,所得比值表示酶活性。

五、蛋白质印迹法检测 GSK-3 β Ser9 位点的磷酸化水平

按照 Ren 等^[16]介绍的方法检测 GSK-3 β Ser9 位点的磷酸化水平:取上清液,加入 1/3 体积 4 $\times$ 上样缓冲液,该缓冲液终浓度为 0.1 mol/L Tris, pH 值 6.8,含 4% 十二烷基磺酸钠(SDS)和 20% 甘油,于沸水中变性 10 min,冷却后备用;用 10% 聚丙烯酰胺分离胶将蛋白质提取物分离,再转印到硝酸纤维膜上,用 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h;用经过 5% 脱脂牛奶稀释的特异性识别 GSK-3 β Ser9 位点的抗体(1:1000 稀释)于 37℃ 下孵育 2 h,用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲盐溶液(pH 值 7.5)漂洗;再用经过 5% 脱脂牛奶稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:30 000)于 37℃ 下孵育 1 h,用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲盐溶液漂洗, ECL 显色 10 min。采用 Kodak 图像分析系统及 Image-Proplus 软件分析结果。

六、统计学处理

统计学处理采用 SPSS 11.0 版统计软件,所有数据均采用($\bar{x} \pm s$)表示,样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

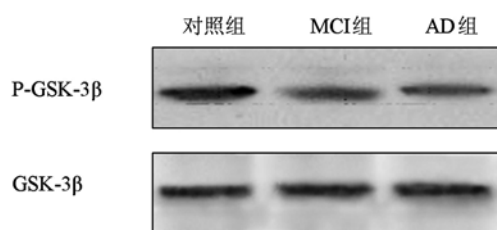
一、各组 GSK-3 活性的变化

MCI 组及 AD 组的外周淋巴细胞 GSK-3 活性明显升高,分别为(1.22 ± 0.10)和(1.32 ± 0.09),明显低

于对照组的(1.00 ± 0.06), 均 $P < 0.01$; MCI 组及 AD 组间 GSK-3 活性比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

二、各组 GSK-3 β Ser9 位点磷酸化水平比较

MCI 患者及 AD 患者 GSK-3 β Ser9 位点的表达明显降低, 分别为(0.87 ± 0.08)和(0.82 ± 0.07), 与对照组的(1.01 ± 0.07)比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01); 对照组、MCI 组和 AD 组总 GSK-3 β 表达水平分别为(0.98 ± 0.06), (0.96 ± 0.08)和(1.00 ± 0.06), 组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。



注: MCI 组与对照组比较, $P < 0.05$; AD 组与对照组比较, $P < 0.01$; P-GSK-3 β 表示磷酸化的 GSK-3 β

图 1 各组 GSK-3 β Ser9 位点的磷酸化水平

讨 论

AD 是一种中枢神经元退行性改变疾病, 主要表现为进行性记忆减退和认知功能障碍, 并逐渐成为老龄化社会的主要疾病之一。AD 有两大主要病理学特征: 神经元外老年斑 (senile plaques) 沉积及神经元内神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles)。老年斑主要由 A β 构成, A β 可能通过诱导神经细胞凋亡、过氧化损伤、炎症反应等产生神经毒性作用^[17]。神经原纤维缠结主要是由异常磷酸化的 tau 蛋白构成, 异常过度磷酸化 tau 蛋白失去组装微管及维持微管稳定性的功能, 故可影响微管的动力学功能^[18]。GSK-3 不仅与 A β 的产生与聚集有关, 而且与 tau 蛋白的过度磷酸化密切相关^[4]。GSK-3 有两个同功异构体, 分别是 GSK-3 α (51 kD) 和 GSK-3 β (47 kD), 磷酸化 GSK-3 α 的第 21 位丝氨酸和 GSK-3 β 的第 9 位丝氨酸可以抑制 GSK-3 的活性^[11]。因此, 对 GSK-3 的研究将对 AD 的诊断及治疗产生积极意义。

Hye 等^[5]报道, 在 AD 及 MCI 患者的外周白细胞中 GSK-3 的表达异常升高, GSK-3 β 的活性及表达也增强, 提示检测外周白细胞 GSK-3 表达情况对此类疾病的诊断可能有潜在价值。Marksteiner 和 Humpel^[6]用 ELISA 方法分别检测了 MCI 及 AD 患者外周单核细胞中 GSK-3 β 的含量, 结果发现 GSK-3 β 在 MCI 及 AD 患者外周单核细胞中含量降低, 且 MCI 患者的 GSK-3 β 水平比 AD 患者更低。国内研究提示, MCI 及 AD 患者

外周淋巴细胞胞蛋白磷酸酯酶-2A (protein phosphatase-2A, PP-2A) 的活性及表达降低^[19], 本研究选择外周淋巴细胞进行研究是因为外周淋巴细胞存在 GSK-3^[20], 且淋巴细胞可以通过血脑屏障^[21]。我们首先应用放射性配体结合试验检测外周淋巴细胞 GSK-3 的活性, 结果发现 MCI 患者的 GSK-3 活性明显高于正常老年人; AD 患者的 GSK-3 的活性也明显高于正常老年人, 与 MCI 患者比较也稍高, 但差异无统计学意义。此结果提示: 在 AD 患者早期或在 MCI 时期即可出现外周淋巴细胞 GSK-3 活性的异常升高。

为进一步阐明 GSK-3 活性升高的原因, 我们还检测了外周淋巴细胞 GSK-3 β Ser9 位点的磷酸化水平。结果证实, 无论在 MCI 患者还是 AD 患者, GSK-3 β Ser9 位点的磷酸化水平均降低, MCI 及 AD 患者淋巴细胞中 GSK-3 的表达无明显增加, 提示 GSK-3 活性升高可能是 GSK-3 β Ser9 磷酸化程度降低所致。

总之, 本研究证实了 MCI 及 AD 患者外周淋巴细胞的 GSK-3 活性升高, 且这种变化可能与 GSK-3 β Ser9 位点的磷酸化水平降低有关, 提示 GSK-3 在此类疾病中可能有诊断价值。

参 考 文 献

- [1] Petersen RC, Smith GE, Waring SC, et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. Arch Neurol, 1999, 56: 303-308.
- [2] Kidd PM. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. Altern Med Rev, 2008, 13: 85-115.
- [3] Morris JC, Storandt M, Miller JP, et al. Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. Arch Neurol, 2001, 58: 397-405.
- [4] Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. Eur J Neurosci, 2007, 25: 59-68.
- [5] Hye A, Kerr F, Archer N, et al. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. Neurosci Lett, 2005, 373: 1-4.
- [6] Marksteiner J, Humpel C. Glycogen-synthase kinase-3beta is decreased in peripheral blood mononuclear cells of patients with mild cognitive impairment. Exp Gerontol, 2009, 44: 370-371.
- [7] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res, 1975, 12: 189-198.
- [8] Rosen WG, Terry RD, Fuld PA, et al. Pathological verification of ischemic score in differentiation of dementias. Ann Neurol, 1980, 7: 486-488.
- [9] Hughes CP, Berg L, Danziger WL, et al. A new clinical scale for the staging of dementia. Br J Psychiatry, 1982, 140: 566-572.
- [10] Petersen RC, Doody R, Kurz A, et al. Current concepts in mild cognitive impairment. Arch Neurol, 2001, 58: 1985-1992.

- [11] Cummings JL, Mega M, Gray K, et al. The Neuropsychiatric inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology*, 1994, 44:2308-2314.
- [12] Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, et al. The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry*, 1982, 139:1136-1139.
- [13] McKhann D, Drachman M, Folstein R, 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.
- [14] American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th ed. Washington: Azeri-Press Agency, 1994:706-708.
- [15] Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, et al. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *Neuropathol Exp Neurol*, 1997, 56:70-78.
- [16] Ren QG, Liao XM, Wang ZF, et al. The involvement of glycogen synthase kinase-3 and PP-2A in lactacystin-induced tau accumulation. *FEBS Lett*, 2006, 580:2503-2511.
- [17] Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, et al. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1-42) and A beta(25-35). *J Am Chem Soc*, 2001, 123:5623-5631.
- [18] Iqbal K, Iqbal T, Bancher C, et al. Alzheimer paired helical filament: restoration of the biological activity by dephosphorylation. *FEBS Lett*, 1994, 349:104-108.
- [19] 曲忠森. 轻度认知障碍及老年性痴呆患者外周淋巴细胞 PP-2A 的变化. *中华神经科杂志*, 2007, 40:652-654.
- [20] Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, et al. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet*, 2004, 36:131-137.
- [21] Giunti D, Borsellino G, Benelli R, et al. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J Leukoc Biol*, 2003, 3:584-590.

(修回日期:2010-04-21)

(本文编辑:吴倩)

· 消息 ·

中华医学会与北京万方数据股份有限公司续签 “中华医学会系列杂志数据库”独家合作协议

中华医学会与北京万方数据股份有限公司(以下简称万方数据)达成的“中华医学会系列杂志数据库”独家战略合作已成功运行3年,新一轮的独家合作协议已于2010年6月底续签。中华医学会旗下遍布全国24个省、直辖市、自治区的123种医学期刊的数字化信息网络传播权继续独家授予万方数据,双方将继续践行“传承百年经典,铸就精品中华期刊群;再现世纪华章,打造医学信息新航母”的战略目标。

传媒产业数字化、信息化已经成为期刊业必须面对的重要问题。国家新闻出版总署对数字化出版的发展趋势高度关注,出台了一系列政策引导传统出版行业积极利用新兴技术、有效融入数字化出版潮流,推动产业转型及升级。2008年中华医学会与万方数据建立了“中华医学会系列杂志数据库”独家战略合作伙伴关系。作为国内信息资源提供方与信息服务商的首次独家合作,不仅在传统出版领域解决了数字信息版权保护问题,而且避免了在迅速发展的信息内容服务业中由于版权保护制度滞后产生的负面效应,给当时信息内容服务业者对数字信息版权保护的迷茫指明了发展方向。

在双方合作的3年中,万方数据开发完成了覆盖中西医医学全领域的信息内容产品体系,搭建了开放、和谐、创新的医学知识链接全开放平台——万方医学网。万方数据通过多渠道资源合作、互链等形式,整合文献数据、知识库资源和各类多媒体资源打造了包括在线产品、镜像产品、移动产品、分析报告和光盘等其他产品的综合产品线,促进了以万方医学网为媒介的传统媒体和新媒体的全媒体联动,从而为医护人员、医学科研人员、企事业用户以及普通大众提供了具有个性化的专业信息服务,同时开拓性地致力于公众的健康信息素养培育。

中华医学会与万方数据战略合作协议的续签,顺应了国家新闻出版总署倡导和引导的数字传播发展方向和趋势,推动了中华医学会系列杂志品牌化、集群化、数字化、国际化的发展进程。在未来的3年合作期中,我们不仅要巩固和发展已有的良好合作局面,而且将更加坚定地同心携手,共同探求医学出版的未来之道。将会按照国家有关期刊改革的要求,建立逐步开放和共享的医学专业信息平台,力争使我们的专业信息服务于更多的读者和作者,最终将实现为医学科技创新体系建设、医学科研信息评价等方面提供全方位、多层次、个性化的服务。