

## 尿阿尔茨海默病相关神经丝蛋白联合血浆同型半胱氨酸测定在阿尔茨海默病诊断中的研究

徐晓娅<sup>1</sup>, 郭晓聪<sup>2</sup>, 邱涛<sup>1</sup>, 蒲荣梅<sup>1</sup>, 黄琳明<sup>1</sup>

1. 自贡市第一人民医院神经内科, 四川 自贡 643000

2. 自贡市第一人民医院检验科, 四川 自贡 643000

**摘要:**目的 探讨尿阿尔茨海默病(AD)相关神经丝蛋白(AD7c-NTP)含量测定联合血浆同型半胱氨酸(Hcy)在AD诊断中的价值。方法 纳入轻度阿尔茨海默病(CDR=1分)及中重度阿尔茨海默病患者(CDR≥2分)者各40例,并选择健康体检志愿者40例为对照组,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测尿液中AD7c-NTP含量,采用循环酶法测定血浆Hcy的含量,通过绘制ROC曲线,分析二者联合检测对AD的诊断准确性。结果 3组受试者尿AD7c-NTP含量比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );组间比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。根据ROC曲线,当尿AD7c-NTP为1.745 ng/mL时,对应的灵敏度和特异度之和最大。3组受试者血浆Hcy的含量比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );组间比较差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。根据ROC曲线,当血浆Hcy为15.05  $\mu\text{mol/L}$ 时,对应的灵敏度和特异度之和最大。当二者进行联合检测时,ROC曲线下面积为0.891,大于各项单独检测。结论 AD患者尿AD7c-NTP含量及血浆Hcy含量均增高;尿液AD7c-NTP含量及血浆Hcy含量可作为辅助AD诊断的生物标记物;二者联合检测可提高AD诊断的准确性。

**关键词:**阿尔茨海默病;阿尔茨海默病相关神经丝蛋白;血浆同型半胱氨酸

中图分类号:R742

DOI:10.16636/j.cnki.jimn.2020.05.008

## A study on measurement of Alzheimer-associated neuronal thread protein in urine combined with plasma homocysteine for diagnosing Alzheimer's disease

XU Xiao-Ya<sup>1</sup>, GUO Xiao-Cong<sup>2</sup>, QIU Tao<sup>1</sup>, PU Rong-Mei<sup>1</sup>, HUANG Lin-Ming<sup>1</sup>. 1. Department of Neurology, Zigong First People's Hospital, Zigong 643000, Sicuang, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Zigong First People's Hospital, Zigong, 643000, Sicuang, China

Corresponding author: HUANG Lin-Ming, Email: 502687651@qq.com

**Abstract: Objective** To explore the clinical significance of measuring the Alzheimer-associated neuronal thread protein (AD7c-NTP) in urine combined with plasma homocysteine (Hcy) for diagnosing Alzheimer's disease (AD). **Methods** A total of 40 cases of mild Alzheimer's disease (Clinical Dementia Rating [CDR]: 1), 40 cases of moderate to severe Alzheimer's disease (CDR:  $\geq 2$ ), and 40 healthy volunteers in physical examination (control group) were enrolled in this study. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the content of AD7c-NTP in urine. Enzymatic cycling assay was used to determine the content of plasma Hcy in the three groups. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the accuracy of the combined measurement of AD7c-NTP and Hcy for diagnosing AD. **Results** There was a significant difference in the content of AD7c-NTP in urine between the three groups ( $P<0.05$ ). According to the ROC curve, the sum of sensitivity and specificity reached its maximum when the content of AD7c-NTP in urine was 1.745 ng/mL. There was a significant difference in the content of plasma Hcy between the three groups ( $P<0.05$ ). According to the ROC curve, the sum of sensitivity and specificity reached its maximum when the content of plasma Hcy was 15.05  $\mu\text{mol/L}$ . When a combined measurement of AD7c-NTP and Hcy was performed, the area under the ROC curve was 0.891,

基金项目:四川省自贡市重点科技计划项目(2017SF05)

收稿日期:2020-02-27;修回日期:2020-09-21

作者简介:徐晓娅(1982-),女,副主任医师,硕士研究生,主要从事认知障碍研究。

通信作者:黄琳明(1963-),男,主任医师,学士,主要从事认知障碍及脑血管病研究。Email:502687651@qq.com。

which was larger than that when AD7c-NTP or Hcy was measured alone. **Conclusions** The content of both AD7c-NTP in urine and plasma Hcy increases in patients with AD, so they may be used as biomarkers for the diagnosis of AD. In addition, a combined measurement of the two biomarkers could improve the accuracy of diagnosis of AD.

**Key words:** Alzheimer's disease; Alzheimer-associated neuronal thread protein; plasma homocysteine

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的认知障碍, 约占 70%<sup>[1]</sup>。其核心的病理特征为  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 的沉积和神经元纤维缠结。常见生物标记物为脑脊液中的  $A\beta$  和 tau 蛋白<sup>[2]</sup>, 但因其需要取脑脊液标本, 具有创伤性, 患者接受性较差, 限制了临床的应用。近年来有研究表明<sup>[3]</sup>, 阿尔茨海默病相关神经丝蛋白 (AD7c-NTP) 在阿尔茨海默病患者脑脊液及尿液中均呈高表达状态, 从尿液中检测 AD7c-NTP, 因其具有无创性, 故成为理想的生物标志物。同时也有研究表明, 血浆同型半胱氨酸 (homocysteine, HCY) 水平的增高是痴呆的危险因素<sup>[4]</sup>, 其可导致大鼠海马神经元的凋亡, 并显著提高体内海马神经元对兴奋毒性和氧化损伤的易感性<sup>[5]</sup>。那么, 尿 AD7c-NTP 和血浆 HCY 联合测定是否在 AD 的早期诊断中具有更高的价值呢? 目前这方面的研究甚少。

本研究通过对轻度 AD 及中重度 AD 组患者及正常对照组受试者进行尿 AD7c-NTP 测定及血浆 Hcy 水平测定, 以了解二者各自作为生物标志物在 AD 诊断中的价值, 并探讨二者联合检测对 AD 诊断的价值, 以期发现可应用于 AD 早期诊断的生物标志物, 为 AD 的早期诊断提供依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选取我院 2016 年 1 月至 2019 年 12 月记忆门诊及神经内科住院部患者中明确诊断为轻度 AD 和中重度 AD 的患者各 40 例, 同时选择社区及我院体检中心的 40 例正常人作为对照组。所有受试者符合相应的纳入标准及排除标准。本研究经自贡市第一人民医院伦理委员会批准 (伦理批准号: 2016-伦理审查-07); 所有受试者均签署知情同意书。

AD 组纳入标准: 符合美国精神病学会的精神障碍诊断和统计手册修订第 IV 版 (DSM-IV-R) 中的 AD 诊断标准及美国国立神经病学、语言障碍和卒中-老年性痴呆和相关疾病学会工作小组 (NINCDS-ADRDA) 中很可能 AD 的诊断标准<sup>[6]</sup>: ①临床检查存在痴呆, 并由神经心理检查确定; ②有两项或两项以上的认知功能缺损; ③进行性恶化;

④意识状态无改变; ⑤40~90 岁之间起病, 常在 60 岁以后; ⑥排除其他系统性疾病和其他器质性脑病所致的记忆或认知障碍。神经心理学量表测评: MMSE 量表: 文盲  $\leq 17$  分; 小学  $\leq 20$  分; 中学及其以上  $\leq 24$  分。临床痴呆评定量表 (Clinical Dementia Rating, CDR) 评分  $\geq 1$  分, 其中轻度 AD 组 CDR = 1 分, 中重度 AD 组 CDR  $\geq 2$  分。

对照组纳入标准: ①本人或陪护者确认无认知障碍症状及严重躯体疾病; ②年龄  $\geq 40$  岁; ③MMSE: 26~30 分; ④HIS  $\leq 4$  分; ⑤CDR: 0 分; ⑥ADL: 20 分。排除标准: ①其他能导致认知功能进行性减退的中枢神经系统疾病: 如心脑血管疾病、帕金森病、亨廷顿病、硬膜下血肿、正常颅压脑积水、脑瘤等; ②已知能导致痴呆的系统性疾病: 如甲状腺功能减退、维生素或叶酸缺乏、烟酸缺乏、低钙血症、神经梅毒、HIV 感染; ③外源性物质 (包括药物) 所致的痴呆; ④谵妄状态; ⑤其他精神障碍所致 (抑郁、精神分裂症)。

### 1.2 尿 AD7c-NTP 的测定

各组受试者均于清晨留取中段尿 10 mL, 采用深圳市安群生物工程有限公司提供的尿液 AD7c-NTP 检测试剂盒, 严格按照说明书操作。

### 1.3 血浆 Hcy 的测定

清晨空腹抽取受试者静脉血 5 mL, 使用威尚生物技术有限公司提供的 Hcy 检测试剂盒 (所用仪器为日立公司 008AS 全自动生化分析仪), 严格按照说明书操作。

### 1.4 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用方差分析分析组间差异。分别对各组患者尿液 AD7c-NTP 值及血浆 HCY 值绘制受试者特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线, 各参数的诊断效能用曲线下面积 (area under the curve, AUC) 来衡量, 并分析这两个参数诊断 AD 的敏感度及特异度, 通过约登指数确定最佳阈值。联合尿液 AD7c-NTP 值及血浆 HCY 值, 采用二分类 logistic 回归方法构建回归模型, 采用 AUC 评价这两个指

标的联合诊断效能。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 组一般资料的比较

3 组受试者在性别、年龄、受教育年限方面比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.2 3 组 MMSE 及 MoCA 评分的比较

3 组受试者 MMSE 及 MoCA 评分比较,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。与正常对照组比较,轻度与中重度 AD 组患者 MMSE 及 MoCA 评分降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与轻度 AD 组比较,中重度 AD 组患者 MMSE 及 MoCA 评分降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 各组受试者 MMSE、MoCA 分值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	MMSE/分	MoCA/分
对照组	40	27.68 ± 2.51	24.92 ± 4.76
轻度 AD 组	40	16.38 ± 3.41 <sup>a</sup>	11.90 ± 7.19 <sup>a</sup>
中重度 AD 组	40	8.45 ± 7.74 <sup>ab</sup>	4.19 ± 5.37 <sup>ab</sup>
F 值		931.15	866.91
P 值		0.00	0.00

注:a 为与正常对照组比较, $P < 0.01$ ;b 为与轻度 AD 组比较, $P < 0.01$

### 2.3 3 组尿 AD7c-NTP 含量的比较

3 组受试者尿 AD7c-NTP 含量比较,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。与正常对照组比较,轻度与中重度 AD 组患者尿 AD7c-NTP 含量增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与轻度 AD 组比较,中重度 AD 组患者尿 AD7c-NTP 含量增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组受试者尿 AD7c-NTP 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	尿 AD7c-NTP 含量/(ng/mL)
对照组	40	0.88 ± 0.69
轻度 AD 组	40	2.11 ± 1.98 <sup>a</sup>
中重度 AD 组	40	2.94 ± 1.54 <sup>ab</sup>
F 值		31.85
P 值		0.00

注:a 为与正常对照组比较, $P < 0.01$ ;b 与轻度 AD 组比较, $P < 0.05$

### 2.4 3 组受试者血浆 Hcy 含量比较

3 组受试者血浆 Hcy 含量比较,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。与正常对照组比较,轻度与中重度 AD 组患者血浆 Hcy 含量增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与轻度 AD 组比较,中重度 AD 组患者血浆 Hcy 含量增加,差异具有统计学意义

( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 各区间血浆 Hcy 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	Hcy 含量/( $\mu\text{mol/L}$ )
对照组	40	11.12 ± 8.65
轻度 AD 组	40	18.55 ± 8.78 <sup>a</sup>
中重度 AD 组	40	27.31 ± 8.75 <sup>ab</sup>
F 值	0.00	25.94
P 值		

注:a 为与正常对照组比较, $P < 0.01$ ;b 为与轻度 AD 组比较, $P < 0.01$

### 2.5 尿 AD7c-NTP 含量、血浆 HCY 含量诊断 AD 的 ROC 曲线分析及两种参数的联合诊断效能

将轻度及中重度 AD 患者归为 AD 组,对正常对照组及 AD 组行 ROC 曲线分析示,尿液 AD7c-NTP 含量及血浆 HCY 含量诊断 AD 的 AUC 分别为 0.830 (95% 可信区间为 0.756 ~ 0.905)、0.755 (95% 可信区间为 0.650 ~ 0.860)。尿液 AD7c-NTP 含量以 1.745 ng/mL 为最佳阈值,其诊断 AD 的敏感度为 70%,特异度为 87.5%。血浆 HCY 含量以 15.05  $\mu\text{mol/L}$  为最佳阈值,其诊断 AD 的敏感度为 72.5%,特异度为 70%。采用二分类 logistic 回归法,联合尿液 AD7c-NTP 含量及血液 HCY 含量构建回归模型,其诊断 AD 的 ROC 曲线下面积为 0.891 (95% 可信区间为 0.829 ~ 0.953),大于单一指标诊断 AD 的 AUC。见图 1。

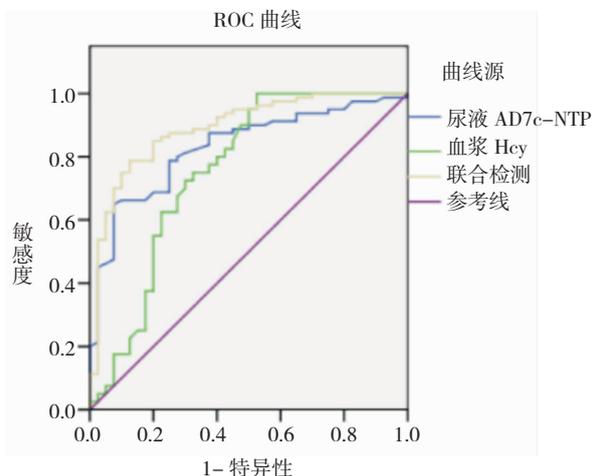


图 1 尿液 AD7c-NTP 含量、血浆 HCY 含量单独检测及联合检测诊断 AD 的 ROC 曲线分析

## 3 讨论

新的 AD 诊断标准中,生物标记物的检测具有重要的意义<sup>[7]</sup>。目前公认的 AD 的生物标记物为脑脊液中的 A $\beta$  和 tau 蛋白<sup>[2]</sup>,但因其需要取脑脊

液标本,具有创伤性,患者接受性较差,很大程度的限制了临床的应用。

AD7c-NTP是一种分子量为41 kD的跨膜磷蛋白,主要在神经元中表达,定位于神经细胞的轴突,并且在AD患者脑内选择性增高<sup>[8]</sup>。Goodman等<sup>[9]</sup>通过对AD患者和非AD患者尿样中AD7c-NTP的含量进行对比研究发现,AD组患者尿AD7c-NTP的含量显著高于非AD痴呆组及正常对照组。国内也有相关研究发现<sup>[3]</sup>,AD患者的脑组织、脑脊液和尿液中AD7c-NTP含量均有增加,其对AD早期诊断具有较高的敏感性和特异性;且含量与AD的严重程度相关<sup>[10]</sup>。有研究通过ELISA方法发现<sup>[11]</sup>,当取1.5 ng/mL作为cut-off值时,其敏感性和特异性分别为89.3%、84.7%。有学者通过对22例轻中度AD和8例MCI患者进行MMSE、NPI测评,并进行Pib-PET检查及尿AD7c-NTP测定后研究认为,尿AD7c-NTP在预测阿尔茨海默病患者脑内Pib沉积方面具有高的特异性和中等的敏感性,且尿AD7c-NTP的含量和患者的激越具有较强的相关性<sup>[2]</sup>。AD7c-NTP在AD中的具体作用机制尚需不明确。有研究表明,AD患者AD7c-NTP表达水平的增加可能与其介导AD神经退行性变化中细胞凋亡级联反应有关,脑组织中AD7c-NTP的免疫反应主要发生在退行性神经元、营养不良的轴突和神经纤维网等磷酸tau蛋白呈阳性的区域,其可能参与了tau蛋白的累积过程,进而产生神经元纤维缠结<sup>[12]</sup>,而与A $\beta$ 的沉积无关。本研究通过对正常对照组、轻度AD及中重度AD组受试者进行尿AD7c-NTP含量检测,结果各组间差异有统计学意义。对正常对照组及AD组进行ROC曲线分析示,尿液AD7c-NTP值诊断AD的AUC为0.830(95%可信区间为0.756~0.905)。提示尿液中AD7c-NTP可作为AD辅助诊断的一个有价值的生物标志物。

Hcy是一种含硫氨基酸,参与体内多种能量代谢及甲基化反应<sup>[13]</sup>。近年来有研究表明,高Hcy血症是AD的一个重要的独立危险因素,并且血浆Hcy水平与疾病严重程度呈正相关<sup>[14]</sup>。一项荟萃分析显示<sup>[15]</sup>,血液中Hcy浓度越高,患AD的风险越高;血液中Hcy每增加5  $\mu$ mol/L,患AD相对风险增加15%,呈线性关系。本研究通过对上述3组受试者进行血浆Hcy含量检测,结果提示各组差异均具有统计学意义。血浆Hcy值诊断AD的

AUC为0.755(95%可信区间为0.650~0.860),提示血浆Hcy可作为AD辅助诊断的生物标志物。

本研究进一步对受试者进行尿AD7c-NTP及血浆Hcy的联合检测,研究显示:采用二分类logistic回归法,联合尿液AD7c-NTP值及血液Hcy值构建回归模型,其诊断AD的ROC曲线下面积为0.891(95%可信区间为0.829~0.953),大于单一指标诊断AD的AUC。故二者联合作为诊断AD的生物标志物,具有更为重要的价值。

本研究选择的两个标志物均较为被患者接受,利于临床开展;但因本研究纳入的样本量偏小,且没有进一步深入研究两个指标在AD的发生发展中的具体机制,故尚需我们进一步进行大样本、更为深入的研究以进一步明确其在AD诊断中的价值。

#### 参 考 文 献

- [1] Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, et al. World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future [EB/OL]. [访问日期]. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf>.
- [2] 刘东明,易芳,许宏伟,等.低密度脂蛋白受体相关蛋白1基因多态性与中国人阿尔茨海默病发病风险的meta分析[J].国际神经病学神经外科学杂志,2019,46(5):509-514.
- [3] Ma L, Wang R, Han Y, et al. Development of a novel urine Alzheimer-associated neuronal thread protein ELISA kit and its potential use in the diagnosis of Alzheimer's disease [J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(4):308-314.
- [4] Lin L, Du H. An anthraquinone compound and its protective effects against homocysteine-induced cytotoxicity and oxidative stress [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2018, 202:314-318.
- [5] Negahdar H, Hosseini SR, Parsian H, et al. Homocysteine, trace elements and oxidant/antioxidant status in mildly cognitively impaired elderly persons: a cross-sectional study [J]. Rom J Intern Med, 2015, 53(4):336-342.
- [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 [J]. Neurology, 1984, 34(7):939-944.
- [7] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria [J]. Lancet Neurol, 2014, 13(6):614-629.
- [8] Munzar M, Levy S, Rush R, et al. Clinical study of a uri-

- nary competitive ELISA for neural thread protein in Alzheimer disease [J]. *Neurol Clin Neurophysiol*, 2002, 2002(1): 2-8.
- [9] Goodman I, Golden G, Flitman S, et al. A multi-center blinded prospective study of urine neural thread protein measurements in patients with suspected Alzheimer's disease [J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2007, 8(1): 21-30.
- [10] 王蓉, 姬志娟, 盛树力, 等. 阿尔茨海默病尿神经丝蛋白检测方法的建立及其临床意义 [J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(1): 46-50.
- [11] Ma L, Wang R, Han Y, et al. Development of a novel urine Alzheimer-Associated neuronal thread protein ELISA kit and its potential use in the diagnosis of Alzheimer's disease [J]. *J Clin Lab Anal*, 2016, 30(4): 308-314.
- [12] 方堃, 张玉蓉, 王芳, 等. 尿 AD7c-NTP 联合尿甲醛、血清 S100B 在 AD 早期诊断中的价值及与认知水平的相关性 [J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(1): 113-116, 121.
- [13] Tian S, Han J, Huang R, et al. Increased plasma homocysteine level is associated with executive dysfunction in type 2 diabetic patients with mild cognitive impairment [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 58(4): 1163-1173.
- [14] Li JG, Barrero C, Gupta S, et al. Homocysteine modulates 5-lipoxygenase expression level via DNA methylation [J]. *Ageing Cell*, 2017, 16(2): 273-280.
- [15] Zhou F, Chen S. Hyperhomocysteinemia and risk of incident cognitive outcomes: an updated dose-response meta-analysis of prospective cohort studies [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 51: 55-66.