临床研究 文章编号:0253-3626(2009)09-1246-04

血管性痴呆患者血清 Livin、VEGF 与 IL-18、IFN-γ 水平的临床研究

谭家泽,蔡志友

(重庆医科大学附属第一医院神经内科、重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过检测血管性痴呆患者抗凋亡因子(Livin)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)、白细胞介素-18(Interleukin-18,IL-18)和干扰素-γ(Interferon-γ,IFN-γ)的血清水平值,探讨 Livin、VEGF、IL-18、IFN-γ 在血管性痴呆中的发病机制和作用,研究 IL-18、IFN-γ 与血管性痴呆细胞凋亡和血管修复的关系。方法:实验分为 2 组:正常组(N 组)与血管性痴呆组。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血管性痴呆患者血清 VEGF、Livin、IL-18、IFN-γ 浓度值。结果:IL-18 与 IFN-γ 在血管性痴呆患者中明显高于对照组($P<0.05$),差异有统计学意义。且患者血浆 IL-18 与 IFN-γ 呈显著正相关($P<0.05$);对照组 IL-18 与 IFN-γ 无显著相关性($P>0.05$)。VEGF 与 Livin 在血管性痴呆患者中明显低于对照组($P<0.05$)。血管性痴呆组 IL-18、IFN-γ 与 VEGF、Livin 具有负相关性($P<0.05$)。结论:IL-18、IFN-γ 参与了血管性痴呆发生发展的炎性反应过程,炎症反应降低血管损伤修复作用可能是血管性痴呆发病机制之一。

【关键词】血管性痴呆;白细胞介素-18;干扰素-γ;Livin;血管内皮生长因子

【中国图书分类法分类号】R743.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-09

Serum level of Livin, VEGF and IL-18, IFN-γ in vascular dementia patients

TAN Jia-ze, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of Livin, VEGF, interleukin(IL)-18 and interferon(IFN)-γ in the plasma of patients with vascular dementia, and to observe role of Livin, VEGF, IL-18 and IFN-γ in the pathogenesis of vascular dementia. *Methods*: Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was used to detect the concentration of Livin, VEGF, IL-18 and IFN-γ in the serum of patients with vascular dementia. *Results*: Serum level of Livin and VEGF in the patients with vascular dementia were significantly lower than the control group ($P<0.001$). Serum level of IL-18 and IFN-γ in the patients with vascular dementia were significantly higher than the control group($P<0.001$). Serum level of IL-18 was significantly positively correlated with IFN-γ in the patients. Serum level of IL-18 and IFN-γ in the patients showed negative correlation with Livin and VEGF. Conclutions: The concentration of IL-18 and IFN-γ in patients with vascular dementia were significantly higher and associated with Livin and VEGF. This suggested that IL-18, IFN-γ may be both involved in the functional and structural integrity of vessel in the process of vascular dementia.

【Key words】Vascular dementia; Interleukin-18; Interferon-γ; Livin; Vascular endothelial growth factor

血管性痴呆(Vascular dementia,VD)作为脑血管疾病引起的后天性获得性智能障碍,脑血管疾病的危险因素也参与了其发病机制,脑血管疾病危险因素是 VD 的直接原因[1,2]。炎症反应、细胞凋亡和血管损伤参与了血管性痴呆的发病机制,所以我们检测血管性痴呆患者血清抗凋亡因子 Livin[3,4]和血管修复因子血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)[5,6]与前炎性因子 IL-18、IFN-γ 血清水平值,探讨血管性痴呆炎症反应发生后细胞凋亡和血管修复的关系,为干预治疗血管性痴呆提供依据。

作者介绍:谭家泽(1972-),女,护师,
研究方向:脑血管疾病。

1 资料与方法

1.1 研究资料

(1)正常对照组:正常健康人 50 例,其中男 36 例,女 14 例,最大年龄 76 岁,最小年龄 21 岁,平均年龄(56±14)岁,为我院健康体检人员,简易智能状态量表(Mini-mental state

examination,MMSE)评分 27 分以上,年龄 55～80 岁,头部 CT 或 MRI 扫描正常,排除肝肾功能异常者;排除近期服用过降脂药及维生素类药物者。(2)血管性痴呆组(VD):2005 年 9 月至 2007 年 5 月共 120 例患者,男 62 例,女 58 例,最大年龄 88 岁,最小年龄 35 岁,平均年龄(66±11)岁。其中有高血压的血管性痴呆(HBPVD)及无高血压的血管性痴呆(非 HBPVD)分别为 76 例和 44 例;有糖尿病的血管性痴呆(DMVD)及无糖尿病的血管性痴呆(非 DMVD)分别为 32 例和 88 例;有高脂血症的血管性痴呆(HLVD)及无高脂血症的血管性痴呆(非 HLVD)分别为 46 例和 74 例。VD 患者入选标准[1,2]:诊断依据世界卫生组织国际疾病分类第 10 版(ICD-10)中血管性痴呆的诊断标准 DCR-10(1993 年),同时符合下列条件:(1)简易智能状态量表(MMSE)评分,文盲≤17 分,小学文化≤20 分,中学或以上文化≤24 分者。凡评分于界值以下者视为存在认知功能障碍,其中 13~23 分为轻度痴呆,5～12 分为中度痴呆,<5 分为重度痴呆。(2)改良 Hachinski 缺血量表评分为 5~9 分者。(3)排除改良 Hachinski 缺血量表评分≤4 分、考虑为 Alzheimer 病者;确诊为抑郁症、失语症、健忘症、去大脑皮质状态和脑卒中后额颞顶叶受损的精神症状者;单纯由于窒息、呼吸衰竭、一氧化碳中毒、氰化物中毒及颅脑创伤等引起的痴呆患者。(4)既往脑血管疾病病史和 CT 或 MRI 检查显示既往脑血管疾病证据。

1.2 方法

分别抽取肘静脉血,均于清晨采取空腹肘静脉血 2 ml 置于以 0.11 mol/L 枸橼酸三钠 1:9 抗凝的试管内,摇匀。常温离心 3 000 r/min,15 min,分离血清放置 -80℃保存。测定前室温下复苏。用同一批号试剂测定。双抗体夹心酶联免疫法(ELISA)测定血清 Livin(武汉博士德生物工程有限公司)、VEGF(福建迈新生物科技有限责任公司)、IL-18、IFN-γ 水平(IL-18 和 IFN-γ 试剂盒:上海西唐生物科技有限公司提供,美国 A&D 公司生产)。ELISA 操作步骤:设标准孔 8 孔,每孔中各加入 100 μl 标准品稀释液,第 1 孔中加入 1 000 pg/ml 的标准品 100 μl,混匀后从第 1 孔中用加样器吸出 100 μl 移至第 2 孔,混匀后用加样器再吸出 100 μl 移至第 3 孔,如此反复作对倍稀释至第 5 孔,最后,从第 7 孔中吸出 100 μl 弃去,使之体积均为 100 μl。第 8 孔为空白对照。从而分别得到 1000、500、250、125、62.5、31.2、15.6、0 pg/ml 的标准品;在反应板待测品孔中,每孔各加入待测样品 100 μl;将反应板充分混匀后置 37℃孵育 120 min;用稀释 20 倍后的洗涤液将反应板充分洗涤 5 次,放滤纸上印干;标准孔及待测品孔中各加入第一抗体工作液 50 μl;将反应板置 37℃孵育 60 min,洗板,每孔各加入酶标抗体工作液 100 μl;将反应板置 37℃ 60 min;洗板;每孔各加底物工作液 100 μl,并将反应板置 37℃暗处 5~10 min;每孔各加入 50 μl(1 滴)终止液混匀;在 492 nm 处测吸光值(OD_{450})。以标准品的浓度为横轴,OD 值为纵轴在半对数纸上作图,画出标准曲线;根据样品之 OD 值在该曲线上查出相应 Livin、VEGF、IL-18 和 IFN-γ 含量。

1.3 统计学处理

各项数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,同一组内不同时相点的比较采用 q 检验,两组之间同一时相点的比较采用 t 检验。$P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。用 SPSS11.0 统计软件包处理数据。

2 结 果

2.1 血清 Livin、VEGF、IL-18 和 IFN-γ 检测结果

ELISA 法测定血清 Livin、VEGF 水平显示血管性痴呆患者血清 Livin、VEGF 水平均低于对照组(P=0.002 8)。特别是糖尿病组最明显(P=0.000 6),LivinLivin、VEGF 血清水平值也最低,这与应激性高血糖以及糖尿病糖代谢紊乱可能有关。t 检验提示:糖尿病血管性痴呆组与非糖尿病血管性痴呆组组间 Livin、VEGF 含量差异有统计学意义(t=5.26,P=0.002 8;t=6.52,P=0.003 5),高血压血管性痴呆组和高脂血症血管性痴呆组组间 Livin、VEGF 含量差异无统计学意义(t=5.37,P=0.072;t=5.87,P=0.085)(表 1)。

ELISA 法测定血清 IL-18 和 IFN-γ 水平显示血管性痴呆患者血清 IL-18 和 IFN-γ 水平均高于对照组(P=0.002 8)。特别是糖尿病组最明显(P=0.000 6),IL-18 和 IFN-γ 血清水平值也最高,这也

表 1 Livin、VEGF、IL-18 和 IFN-γ 检测结果与比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Livin (nmol/ml)	VEGF(nmol/ml)	IL-18(pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)
N	50	12.87±0.32	14.17±0.21	43.85±6.11	129.92±7.41
HBPVD	76	7.21±0.40[a]	9.29±0.42[a]	62.05±7.17[a]	190.91±8.19[a]
非 HBPVD	44	6.98±0.26[a]	9.21±0.24[a]	60.05±7.43[a]	188.42±8.65[a]
DMVD	32	5.91±0.19[ab]	7.95±0.12[ab]	71.81±8.21[ab]	201.21±8.11[ab]
非 DMVD	88	7.20±0.30[a]	9.21±0.52[a]	61.11±7.44[a]	189.23±8.10[a]
HLVD	46	7.19±0.42[a]	9.17±0.32[a]	62.45±7.67[a]	191.65±8.13[a]
非 HLVD	74	7.16±0.36[a]	8.89±0.29[a]	62.05±7.52[a]	188.91±8.43[a]

注:与正常组比较,[a] P<0.01;与其他血管性痴呆患者组比较,[b] P<0.05

与应激性高血糖以及糖尿病糖代谢紊乱可能有关。t 检验提示：糖尿病血管性痴呆组与非糖尿病血管性痴呆组组间 IL-18 和 IFN-γ 含量差异有统计学意义（t=6.26，P=0.001 8；t=5.31，P=0.002 4），高血压血管性痴呆组和高脂血症血管性痴呆组组间 IL-18 和 IFN-γ 含量差异无统计学意义（t=5.67，P=0.092；t=5.76，P=0.082）（表 1）。

2.2 Livin、VEGF、IL-18 和 IFN-γ 相关性分析

直线相关性分析显示 Livin 与 IL-18 和 IFN-γ呈负相关性（r=-0.848，P=0.000 8；r=-0.861，P=0.003 1），VEGF 与 IL-18 和 IFN-γ 也呈负相关性（r=-0.718，P=0.001 8；r=-0.830，P=0.002 6），Livin 与 VEGF 呈正相关性（r=0.813，P=0.005 8），IL-18 与 IFN-γ 也呈正相关性（r=0.872，P=0.002 4）。

3 讨 论

Livin 是一种新近发现的细胞凋亡因子，以其为靶点的抑制物及反义 Livin 能够保护细胞不进行凋亡，具有广谱和低毒的副作用。Livin 的作用途径有二：（1）在 Fas/caspase-8 诱导的死亡受体途径中，Livin 不直接结合抑制 caspase-8，而是直接抑制核心蛋白酶 caspase-3 的活性，从而抑制整条途径发挥抗凋亡作用。（2）在细胞色素 C/Apof-1 作用的线粒体途径，则可以直接与 caspase-9 前体蛋白（pro-caspase-9）和其激活形式结合从而抑制其活性，还可以直接结合并抑制 caspa-3 的活性，阻断他们依次切割激活。同时阻断了 caspase-3 对 pro-caspase-9 的反馈激活，抑制了细胞的调亡[7]。我们也通过对 Livin 检测显示血管性痴呆患者 Livin 含量降低，Livin 表达水平与 IL-18 和 IFN-γ 呈负相关，提示 Livin 低表达参与了血管性痴呆的细胞凋亡进程，炎症反应可能是其促发因素。

VEGF 又叫血管调理素是新近发现的一种生长因子，具有促内皮细胞分裂的作用，VEGF 可以促进血管的生长和侧支循环的建立。最近 VEGF 基因已克隆出来，有人应用重组 VEGF 给冠状动脉和下肢动脉闭塞的动物血管内持续灌注 14 d，证明可以促进血管的新生和侧支循环的建立，有效地防治心肌梗塞和闭塞性血管病。VEGF 为动脉缺血性疾病的治疗提供了及其诱人的前景，因此把 VEGF 基因治疗称为“分子搭桥术”。局灶脑缺血的动物实验证实梗塞后 3 d 是最活跃的血管增生期，并可见明显的 VEGF 表达[8]，VEGF 作为脑缺血性损伤血管修复因子在脑缺血性疾病中的脑保护作用已被证实[9]。本实验通过对血管性痴呆患者 VEGF 检测显示 VEGF 含量下降，且 VEGF 表达水平与 IL-18 和 IFN-γ 呈负相关，与 Livin 呈正相关，提示 VEGF 低表达参与了血管性痴呆的细胞凋亡和血管损伤进程，炎症反应可能也是其促发因素。

IL-18 是近年新发现的一种分子量为 18 000~19 000 的多肽类物质，主要由单核-巨噬细胞产生，在体内与细胞膜上的 IL-18 受体（IL-18R）相结合而发挥作用。作为前炎性细胞因子，IL-18 有促进 T 细胞增及增强 CD^{8+}T 细胞[10,11]和 NK 细胞的细胞毒性作用[12,13]。研究发现与 IL-12 的协同作用[14]，IL-18 可通过上调 IFN-γ 基因表达、NK 细胞毒性和抗肿瘤活性[15]。本研究显示，在血管性痴呆患者急性期血清中 IL-18 的浓度显著增高。血清 IL-18 的水平与 Livin 和 VEGF 呈负相关。这就提示 IL-18 通过参与了血管性痴呆炎症过程，与血管性痴呆的发生发展有密切关系，这与国外文献报道相一致[16]。

IFN-γ 是一种调节细胞功能的小分子多肽，它主要产生于活化的自然杀伤（NK）细胞、T 辅助淋巴细胞 Th1 亚群以及 CD8 细胞毒细胞活化的 Tcl 亚型[17]。IFN-γ 是单核/巨噬细胞主要而强有力的激活因子，可介导 T 细胞对巨噬细胞的激活，激活的巨噬细胞分泌细胞因子，包括 IL-12[18]，而后者反馈促进 T 细胞系统，促进 T 细胞分化为 CD4+Th1、CD^{8+}Tc1 亚群，促进细胞毒性 T 细胞的分化并抑制 Th2 细胞的增殖[19-21]。本研究结果示血管性痴呆患者血清中 IFN-γ 浓度显著增高，血清 IFN-γ 的水平与 Livin 和 VEGF 呈负相关。这提示 IFN-γ 与急性血管性痴呆病情变化有密切关系，参与了血管性痴呆的急性炎症反应过程。本研究还发现，在血管性痴呆血清中 IL-18 和 IFN-γ 呈显著正相关，由此推断 IL-18 和 IFN-γ 共同参与了血管性痴呆发生发展过程，其可能的机制是血管性痴呆后应激反应促进炎症细胞产生 IL-18、IFN-γ 细胞因子等的产生，IL-18 又反作用于炎症细胞高表达 IFN-γ，引起强烈持久的炎症反应从而导致脑损伤的进一步发生。

综上所述，血管性痴呆患者抗细胞凋亡与血管修复功能的能力下降及持续的慢性炎症参与了血

管性痴呆的病理机制。Livin、VEGF、IL-18 与 IFN-γ 参与了血管性痴呆中的具体作用机制如何，尚待进一研究。随着对 Livin、VEGF、IL-18、IFN-γ 等细胞因子在脑血管事件中作用机制的深入研究，针对细胞因子治疗可能为临床治疗脑血管事件后的血管性痴呆提供新思路。

参 考 文 献

[1] 血管性认知功能损害专家共识组. 血管性认知功能损害的专家共识[J].中华内科杂志，2007，46(12)：1052-1055.

[2] Hachinski V，ladecola C，Petersen R C，et al. National institute of neurological disorders and stroke-canadian stroke network vascular cognitive impairment harmonization standards[J].Stroke，2006，37(9)：2220-2241.

[3] Chang H，Schimmer A D. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy[J]. Mol Cancer，2007，6(1)：24-30.

[4] Ma L，Huang Y，Song Z，et al. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway[J].Cell Death Differ，2006，13(12)：2079-2088.

[5] Taoufik E，Petit E，Divoux D，et al. TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin-and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2008，105(16)：6185-6190.

[6] Yang J P，Liu X F，Liu H J，et al.Extracellular signal-regulated kinase involved in NGF/VEGF-induced neuroprotective effect[J]. Neurosci Lett，2008，434(2)：212-217.

[7] Nachmias B，Ashhab Y，Bucholtz V，et al.Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor：implications for drug-resistant melanoma[J]. Cancer Res，2003，63(19)：6340-6349.

[8] Rafael H. Chronic brain ischemia and revascularization [J]. J Neurosurg，2006，105(2)：339-340.

[9] Wang Y Q，Guo X，Qiu M H，et al. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion[J]. J Neurosci Res，2007，85(1)：73-82.

[10] Ushio S，Namba M，Okura T，et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor，expression in Escherichia coli，and studies on the biologic activities of the protein[J]. J Immunol，1996，156：4274-4279.

[11] Okamoto I，Kohno K，Tanimoto T，et al.Development of CD8+ effector T cells is differentially regulated by IL-18 and IL-12[J]. J Immunol，1999，162：3202-3211.

[12] Rodriguez-Galan M C，Bream J H，Farr A，et al. Synergistic effect of IL-2，IL-12，and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression[J]. J Immunol，2005，174：2796-2804.

[13] Lauwerys B R，Renauld J C，Houssiau F A. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18[J]. Cytokine，1999，11：822-830.

[14] Okamoto M，Kato S，Oizumi K，et al. Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice：a potential role for cytokines，chemokines，and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia[J]. Blood，2002，99：1289-1298.

[15] Schmitz T，Heep A，Groenendaal F，et al. Interleukin-1beta，interleukin-18，and interferon-gamma expression in the cerebrospinal fluid of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus--markers of white matter damage [J]. Pediatr Res，2007，61：722-726.

[16] Fang H Y，Ko W J，Lin C Y. Inducible heat shock protein 70，interleukin-18，and tumor necrosis factor alpha correlate with outcomes in spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. J Clin Neurosci，2007，14：435-441.

[17] Holland N，Dong J，Garnett E，et al. Reduced intracellular T-helper 1 interferon-gamma in blood of newly diagnosed children with Crohn's disease and age-related changes in Th1/Th2 cytokine profiles[J]. Pediatr Res，2008，63：257-262.

[18] Soares H，Waechter H，Glaichenhaus N，et al. A subset of dendritic cells induces $CD4^+$ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independentbutCD70-dependentmechanisminvivo[J]. J Exp Med，2007，204：1095-1106.

[19] Li H，Jiang H J，Ma M Q，et al. Vaccination with allogeneic GM-CSF gene-modified lung cancer cells：antitumor activity comparing with that induced by autologous vaccine [J]. Cancer Biother Radiopharm，2007，22：790-798.

[20] Bilgic S，Aktas E，Salman F，et al. Intracytoplasmic cytokine levels and neutrophil functions in early clinical stage of type I diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract，2008，79：31-36.

[21] 杨 健，蔡志友，晏 勇，等.血管性痴呆患者血清 Livin、VEGF 与 MMP-9 水平的临床意义[J].重庆医学，2009，38(11)：1314-1315，1318.

(责任编辑：冉明会)

欢迎阅读，欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132