

• 论 著 •

血清炎性细胞因子与孤独症谱系障碍相关性的探讨

肖鸽飞, 周翔, 周玉球, 庄志成, 赵艳玲, 胡玲玲

(广东省珠海市妇幼保健院 519001)

摘要:目的 研究炎性细胞因子与孤独症谱系障碍(ASD)的相关性,寻找诊治该病的新的血清标志物。方法 采用蛋白质芯片技术对 20 例 ASD 病例及 20 例健康对照儿童血清标本的干扰素 γ 、白细胞介素、巨噬细胞炎性蛋白等 40 种炎性细胞因子进行测定分析。结果 ASD 病例组的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,多种白细胞介素如 IL-4、IL-5、IL-10、IL-11、IL-13、IL-17A,以及 CXC 类趋化因子 9 等细胞因子表达水平高于健康对照组($P < 0.05$);而巨噬细胞炎性蛋白 1 α 、巨噬细胞炎性蛋白 1 β 、血小板源生长因子 B 亚基、CC 类趋化因子 5、金属蛋白酶组织抑制剂 1、金属蛋白酶组织抑制剂 2、肿瘤坏死因子受体 II 等细胞因子表达水平低于健康对照组($P < 0.05$)。结论 ASD 儿童血清中巨噬细胞炎性蛋白等多种炎性细胞因子呈显著性升高或降低,提示 ASD 的发病机制与免疫系统受炎性刺激有关。

关键词:孤独症谱系障碍; 炎症; 细胞因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)15-2131-04

Study on correlation between serum inflammatory cytokine with autism spectrum disorder

XIAO Gefei, ZHOU Xiang, ZHOU Yuqiu, ZHUANG Zhicheng, ZHAO Yanling, HU Lingling
(Zhuhai Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Zhuhai, Guangdong 519001, China)

Abstract: Objective To study the correlation between the inflammatory cytokines and autism spectrum disorder(ASD), and to search new serum markers for diagnosis and treatment of this disease. **Methods** Forty inflammatory cytokines such as interferon- γ , interleukins (IL), macrophage inflammatory protein in 20 cases of ASD and 20 healthy children as the healthy control group were detected by adopting the protein chip technology. **Results** The granular-macrophage colony stimulating factor and expression levels of GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IL-13, IL-17A and MIG in the ASD group were significant higher than those in the normal control group($P < 0.05$). while MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TIMP-1, TIMP-2 and TNF RII in the ASD group were significantly lower than those in the normal control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Serum inflammatory cytokines such as macrophage inflammatory protein, IL-11, and INF- γ in the ASD children show significant increase or decrease, suggesting that the pathogenesis of ASD is associated with the immune system by inflammatory stimuli.

Key words: autism spectrum disorder; inflammation; cytokines

孤独症谱系障碍(ASD)又称自闭症或孤独症,是儿童最常见的神经发育障碍性疾病之一,且男性明显高于女性,在全球各地儿童中患病率约为 1%^[1],我国部分地区的 ASD 患病率为 2.55/1 000^[2],至今尚没有全国性的 ASD 流行病学调查数据^[3]。该病起病于婴幼儿期,主要表现为不同程度的语言沟通障碍、社会交往障碍、重复刻板行为及狭隘的兴趣等,多数患者伴有明显的精神发育迟滞。因其较高的发病率和对家庭、学校、社会造成的不良影响已成为备受关注的公共卫生问题。本研究拟从免疫学角度来研究炎性细胞因子与儿童 ASD 发病的相关性,筛选出有实践意义的生物标志物,为进一步研究其发病机制、早期诊断和及早干预提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 病例纳入标准 用 ASD 行为评定量表(ABC 量表)≥57 分、儿童孤独症评定量表(CARS)≥30 分作为筛选标准,诊断标准参照《美国精神障碍诊断与统计手册》第 5 版(DSM-V)。

1.1.2 病例排除标准 排除患有严重的心、肝、肾等躯体疾病,儿童精神分裂症,单纯精神发育障碍、单纯语言发育障碍,其他广泛性发育障碍,聋哑,以及诊断不明确、伴有其他神经系统器质性疾病的儿童。

1.1.3 分组 病例组(A 组)参照以上标准选取珠海市妇幼保健院 2015 年 6~9 月就诊的 ASD 患儿 20 例,其中男 15 例、女

5 例,平均年龄(3.2±0.9)岁;健康对照组(B 组)选取同期儿保科体检健康的同龄儿童 20 例,性别比例同 A 组,平均年龄(3.1±1.0)岁。两组性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。A 组及 B 组抽血前 3 个月均未患感冒、肺炎、哮喘等炎性疾病。A 组中再按病情轻重程度将病例分为轻-中度组(A1 组)和重度组(A2 组),其中 A1 组 ABC 量表评分≥57 分或 CARS 量表评分≥30 分, A2 组 ABC 量表评分≥67 分且 CARS 量表评分≥36 分。

1.2 方法

1.2.1 血清标本的留取 A 组和 B 组每人各抽取静脉血 2~3 mL,离心分离血清置-80℃保存。

1.2.2 检测方法 采用广州瑞博奥生物科技有限公司的蛋白芯片产品,应用蛋白抗体芯片定量技术检测血清标本中 B 淋巴细胞刺激趋化因子 1(BLC)、嗜酸细胞活化趋化因子(Eotaxin)-1、Eotaxin-2、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、C-C 类趋化因子 1(I-309)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-1 ra(IL-1 F3)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6R、IL-7、IL-8(CXCL8)、IL-10、IL-11、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17A、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、巨噬细胞集落刺激因子 1(M-CSF)、C-X-C 类趋化因子 9(MIG, CXCL9)、巨噬细胞炎性蛋白(MIP)- α 、MIP-1 β 、MIP-1 delta(CCL15)、血小板

源生长因子 B 亚基(PDGF-BB)、C-C 类趋化因子 5(RANTES, CCL5)、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)-1、TIMP-2、肿瘤坏死因子(TNF)-α、TNF-β、肿瘤坏死因子受体(TNF R) I、TNF R II 等 40 种炎性细胞因子的水平,各因子在芯片上的位置排列见图 1。

Each antibody is printed in quadruplicate horizontally															
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
A	POST				POST				BLC (CXCL13)						
B	Eotaxin-1 (CCL11)				Eotaxin-2 (MPIF-2)				G-CSF						
C	GM-CSF				I-309 (TCA-3/CCL1)				ICAM-1 (CD54)						
D	IFN-gamma				IL-1 alpha				IL-1 beta						
E	IL-1 ra (IL-1 F3)				IL-2				IL-4						
F	IL-5				IL-6				IL-6 R						
G	IL-7				IL-8 (CXCL8)				IL-10						
H	IL-11				IL-12 p40				IL-12 p70						
I	IL-13				IL-15				IL-16						
J	IL-17A				MCP-1 (CCL2)				M-CSF						
K	MIG (CXCL9)				MIP-1 alpha (CCL3)				MIP-1 beta (CCL4)						
L	MIP-1 delta (CCL15)				PDGF-BB				RANTES (CCL5)						
M	TIMP-1				TIMP-2										
N	TNF beta				TNF RI				TNF RII						

图 1 Human Inflammation Array C3 (QAH-INF-3) 检测靶因子位置排列

1.3 统计学处理 利用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,并将炎性因子的浓度水平与量表评分结果作 Pearson 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 量表评分结果 A 组中有 10 例伴有不同程度的精神发育迟缓,其中 3 例同时伴发注意力缺陷多动障碍(ADHD)。按 ABC 量表及 CARS 量表评估将 A 组病例分为 A1 组 13 例,ABC 量表评分为(49.8±11.7)分,CARS 量表评分为(29.2±2.3)分;A2 组 7 例,ABC 量表评分为(83.3±14.2)分,CARS 量表评分为(43.6±5.2)分。

2.2 炎性因子测定结果 A 组与 B 组标本血清用 QAH-INF-3 芯片测定的图谱分别如图 2 与图 3,检测结果及统计学分析结果见表 1。其中 A 组的 GM-CSF、IL-4、IL-5、IL-10、IL-11、IL-13、IL-17A、MIG 等细胞因子水平较 B 组呈升高趋势,MIP-1α、MIP-1β、PDGF-BB、RANTES、TIMP-1、TIMP-2、TNF R II 等细胞因子水平较 B 组有所下降,而 BLC、Eotaxin、G-CSF、I-309、ICAM-1、IFN-γ、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、MCP-1、MCSF、MIP-1d、TNF 等细胞因子水平 A、B 两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。病例组中 A1 组与 A2 组的各炎性因子水平之间经 t 检验分析差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 A、B 两组标本有统计学差异的炎性因子 浓度及统计学分析结果					
细胞因子	分组	浓度 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)	相差倍数	t	P
GM-CSF	A 组	82.60±37.50	1.39	2.28	0.029
	B 组	59.23±26.54			
IL-4	A 组	58.30±31.33	1.51	2.425	0.020
	B 组	38.59±18.44			
IL-5	A 组	345.23±124.12	1.31	2.416	0.021
	B 组	263.65±86.03			
IL-10	A 组	59.77±23.00	1.28	2.066	0.046
	B 组	46.61±16.82			
IL-11	A 组	1 382.44±651.19	1.50	2.627	0.012
	B 组	923.42±432.13			
IL-13	A 组	72.04±24.79	1.29	2.463	0.018
	B 组	55.90±15.63			
IL-17A	A 组	109.16±58.69	1.70	3.015	0.005
	B 组	64.28±31.41			
MIG	A 组	6 717.25±2 567.00	1.32	2.163	0.037
	B 组	5 097.55±2 151.58			

续表 1 A、B 两组标本有统计学差异的炎性因子 浓度及统计学分析结果					
细胞因子	分组	浓度 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)	相差倍数	t	P
MIP-1α	A 组	188.33±69.37	0.56	-4.094	0.000
	B 组	339.33±149.64			
MIP-1β	A 组	45.06±20.68	0.63	-3.037	0.004
	B 组	71.89±33.65			
PDGF-BB	A 组	1 365.05±118.01	0.84	-4.374	0.000
	B 组	1 629.02±242.74			
RANTES	A 组	3 572.88±331.45	0.93	-2.181	0.035
	B 组	3 826.99±401.93			
TIMP-1	A 组	8 317.65±942.91	0.90	-3.230	0.003
	B 组	9 287.14±955.34			
TIMP-2	A 组	51 944.44±10 668.53	0.81	-2.778	0.008
	B 组	64 220.19±16 635.81			
TNF RII	A 组	621.01±168.61	0.84	-2.548	0.015
	B 组	740.08±123.49			

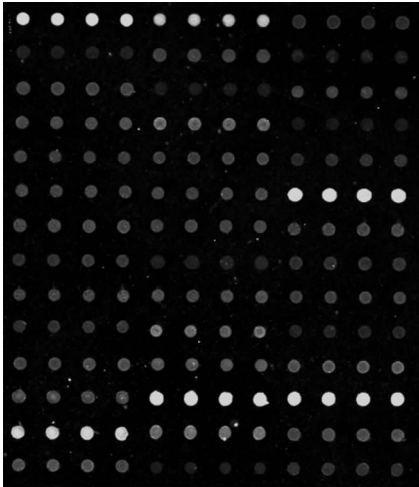


图 2 ASD 疾病 QAH-INF-3 芯片测定的图谱

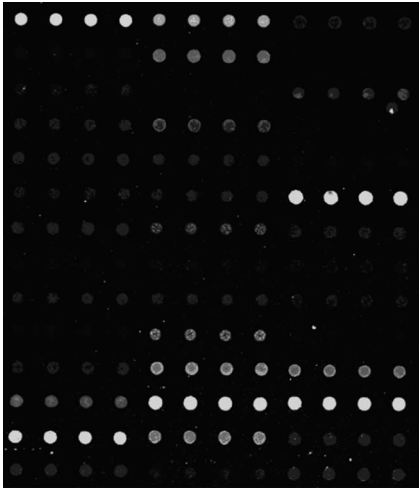


图 3 健康对照儿童 QAH-INF-3 芯片测定的图谱

2.3 炎性因子与量表评分的相关性 将 A 组中 40 种炎性因子的浓度分别与 ABC 量表、CARS 量表的评分作 Pearson 相关性分析,结果显示,仅 BLC、I-309、IL-12p40、RANTES 和 TIMP-2 与 ABC 量表的评分有相关性,Pearson 相关系数分别为-0.532、-0.558、-0.629、-0.625 和-0.558($P < 0.05$)。

3 讨 论

ASD 是一组广泛而严重的神经系统发育障碍性疾病,迄今为止病因学机制仍不明确,可能受环境、遗传等多重因素影响,目前从神经免疫学角度认识并探讨 ASD 是其研究的新切入点^[4]。细胞因子主要参与免疫活性的调解,也参与正常神经发育和功能,其异常活动可对多种神经产生影响。虽然 ASD 属神经系统发育障碍性疾病,所表现的内表型与脑组织的功能密切相关,但因伦理学问题取脑组织或脑脊液标本分析其病理变化比较困难。英国的 Taurines 等^[5]通过对伴/不伴 ADHD 的 ASD 患者血清中蛋白质的性能分析和蛋白质组学分析后认为,外周血中变化的蛋白质水平也可以为这类精神疾病寻找有用的生物标志物。

国外有许多关于 ASD 细胞因子失衡的报道,部分因子与该病的严重程度有关^[6]。本研究中 ASD 病情轻重程度与炎症因子水平之间差异无统计学意义,可能是由于样本量太少所致统计效力不足。目前,国内也有对脑源性神经营养因子(BDNF)^[7]、白细胞介素^[8]等与 ASD 关系的研究,但未见有干扰素、单核细胞趋化蛋白、抗体、肿瘤坏死因子等其他炎症细胞因子与 ASD 相关性研究的报道。

美国 Zerbo 等^[9]对 84 例 ASD 患儿、49 例发育迟缓(DD)的非 ASD 儿童、159 例健康儿的研究发现:在绝大多数新生儿标本中没有检测到细胞因子,但与健康儿相比,ASD 患儿 MCP-1 升高,而 RANTES 降低,并认为,在生命的最初几天测量免疫系统功能可能帮助早期识别神经发育异常,揭示正常的神经发育的生物机制。本研究中 A、B 两组 MCP-1 水平差异无统计学意义,但 RANTES 的检测结果与该研究是一致的($P<0.05$),且 A 组 MIP、TIMP 水平均低于 B 组($P<0.01$)。RANTES、MIP 具有趋化中性粒细胞到炎症组织的功能,是机体防御和清除入侵病原体等异物先天性免疫功能的一个重要方面,其低表达水平意味着机体对异物清除能力减弱,从而造成有关组织炎症损伤加重。尹苹等^[10]在其博士学位论文研究中也阐述,新生儿期炎症刺激可能通过长期启动小胶质细胞而将影响到其海马依赖性行为损伤。小胶质细胞是中枢神经的主要免疫细胞,而海马是学习、记忆等高级神经活动的重要部位,ASD 患儿体内多种炎症细胞因子异常表达,可能导致脑组织长期处在炎症刺激下,从而加重神经损伤,进而出现功能障碍。

Tonhajzerova 等^[11]在对 ASD 与炎症细胞因子的研究中检测出患儿静脉血浆中的 IL-8 水平对照组显著增加,且 TNF- α 、IL-1 β 等其他炎症细胞因子也存在改变。本研究中 A 组的 IL-4、5、10、11、13、17A 等多项白细胞介素因子也均有升高,尤其 IL-17A 结果较 B 组高出近一倍,提示 ASD 患儿免疫系统处于应激状态。由于 IL-17A 可以诱导很多炎症因子的表达,过高的 IL-17A 水平对于疾病的病理发展起到恶化作用。Tostes 等^[12]的研究结果表明,ASD 患儿的血管活性肠肽(VIP)、IFN- γ 和一氧化氮(NO)水平显著升高,而神经营养因子-3(NT-3)水平明显低于对照组,在 ASD 患儿中 NO 与 IFN- γ 呈正相关。本研究中 A 组 IFN- γ 结果比 B 组有升高,但经

检验分析差异无统计学意义,可能与研究病例太少有关。

ASD 的行为、认知等内表型及其伴随症状与炎症因子是否具有相关性,年龄、性别与炎症因子的表达是否有关,都有待加大样本量做进一步的分析。总而言之,本研究中病例组的样本量虽少,但检测结果与其他学者的研究结果多能获得一致,这为 ASD 患儿的早期诊断、早期干预提供了一个新的思路,为进一步探索 ASD 的发病机制从神经免疫学角度打开了一条新的途径。

参考文献

[1] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders fifth edition; DSM-5TM [S]. Washington, DC: APA, 2013; 50-59.

[2] 俞蓉蓉, 林良华, 许丹, 等. 我国儿童孤独症患病情况分析[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(29): 4563-4565.

[3] 李洪华, 杜琳, 单玲, 等. 孤独症谱系障碍流行病学研究现状[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(24): 4471-4474.

[4] 周源源. 孤独症谱系障碍神经免疫机制的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2015, 42(2): 167-170.

[5] Taurines R, Dudley E, Conner AC, et al. Serum protein profiling and proteomics in autistic spectrum disorder using magnetic bead-assisted mass spectrometry[J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2010, 260(3): 249-255.

[6] Ross HE, Guo Y, Coleman K, et al. Association of IL-12p70 and IL-6:IL-10 ratio with autism-related behaviors in 22q11.2 deletion syndrome: a preliminary report[J]. Brain Behav Immun, 2013, 31: 76-81.

[7] 彭志晴, 赵栋, 孙彩虹, 等. 孤独症儿童血清中脑源性神经营养因子的水平[J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(1): 1-4.

[8] 戴炜, 韩钰, 邓艳梅, 等. 血清白细胞介素水平与儿童孤独症关系的研究[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(5): 715-718.

[9] Zerbo O, Yoshida C, Grether JK, et al. Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study; a case-control study[J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 113-116.

[10] 尹苹, 孙若鹏. 生命早期炎症对惊厥易感性及相关脑损伤的影响[D]. 济南: 山东大学, 2014: 95-118.

[11] Tonhajzerova I, Ondrejka I, Mestanik M, et al. Inflammatory activity in autism spectrum disorder[J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 861: 93-98.

[12] Tostes MH, Teixeira HC, Gattaz WF, et al. Altered neurotrophin, neuropeptide, cytokines and nitric oxide levels in autism[J]. Pharmacopsychiatry, 2012, 45(6): 241-243.

(收稿日期: 2016-03-29 修回日期: 2016-05-18)

(上接第 2130 页)

Immunol, 2014, 72(4): 413-421.

[13] 杨慧霞, 徐先明, 孙伟杰. 妊娠合并糖尿病: 临床实践指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 36-43.

[14] Lao TT, Ho LF, Chan BC, et al. Maternal age and prevalence of gestational diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2006, 29(4): 948-949.

[15] 杨慧霞. 重视妊娠期糖尿病国际新标准的临床应用[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(3): 172-173, 177.

[16] 周莉, 范玲. 妊娠期糖尿病诊断进展及面临的挑战[J]. 北京医学, 2014, 36(11): 895-898.

(收稿日期: 2016-03-07 修回日期: 2016-05-18)