

· 老年人帕金森病专栏 ·

急性缺血性脑卒中患者外周血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度的研究

芦林龙^{1,2}, 李芳菲^{1,2}, 冯涛^{1,2*}, 陈慧敏^{1,2}, 郜丽妍^{1,2}

(¹首都医科大学附属北京天坛医院神经病学中心神经变性病科, ²国家神经系统疾病临床医学研究中心, 北京 100050)

【摘要】目的 α -突触核蛋白与帕金森病及其他神经退行性疾病相关。动物模型中, 细胞缺氧诱发氧化应激反应可导致 α -突触核蛋白聚集。急性缺血性脑卒中(AIS)患者外周血红细胞 α -突触核蛋白浓度变化未见相关报道。本研究旨在观察AIS患者外周血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度变化。**方法** 招募55名正常对照、55名帕金森病患者(PD)和55名AIS患者, 并采血留样本。采用纯化的重组 α -突触核蛋白双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(ELISA)作为进一步检测的测试标准。**结果** 外周血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体在正常对照组、PD组及AIS组中分别为(0.41 ± 0.14)、(0.82 ± 0.55)和(1.01 ± 0.56) mmol/L。AIS患者红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度显著高于正常对照组($P < 0.001$, 95%CI $0.426 \sim 0.773$)以及PD患者($P = 0.027$, 95%CI $0.022 \sim 0.369$)。**结论** AIS患者外周血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度显著升高。这种改变可能参与急性缺血事件的病理生理学改变, 但其临床意义有待进一步研究。

【关键词】 α -突触核蛋白; 血红细胞; 急性缺血性脑卒中; 帕金森病

【中图分类号】 R743.3

【文献标识码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2015.09.150

Oligomeric α -synuclein level in peripheral red blood cells of patients with acute ischemic stroke

LU Lin-Long^{1,2}, LI Fang-Fei^{1,2}, FENG Tao^{1,2*}, CHEN Hui-Min^{1,2}, GAO Li-Yan^{1,2}

(¹Department of Neurodegenerative Diseases, Center of Neurology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, ²National Clinical Research Center for Neurological Diseases, Beijing 100050, China)

【Abstract】Objective Alpha-synuclein has been suggested to be related with the etiology of Parkinson's disease (PD) and other neurodegenerative disorders. Hypoxia injury has been indicated to be associated with α -synuclein accumulation. But no report has linked the α -synuclein with the pathogenesis of stroke. This study aimed to investigate the level of oligomeric forms of α -synuclein in the patients with acute ischemic stroke (AIS). **Methods** Fifty-five patients with PD, 55 patients with AIS and 55 healthy individuals were recruited in this study. Their blood samples were characterized by a sandwich ELISA with purified recombinant α -synuclein as a test standard for further detection. **Results** The level of oligomeric α -synuclein in the red blood cells was (0.41 ± 0.14), (0.82 ± 0.55), and (1.01 ± 0.56) mmol/L respectively for the healthy control, PD and AIS groups. The AIS group had significantly higher α -synuclein level compared with either the healthy controls ($P < 0.001$, 95%CI = $0.426 \sim 0.773$) or the PD patients ($P = 0.027$, 95%CI $0.022 \sim 0.369$). **Conclusion** The level of oligomeric α -synuclein in red blood cells is significantly higher in patients with AIS, which may be involved in the pathophysiological changes in AIS, while its clinical significance requires further exploration.

【Key words】 α -synuclein; red blood cells; acute ischemic stroke; Parkinson's disease

This work was supported by the Natural Science Foundation of Beijing (KZ201210025028), the Project of Science and Technology Plan of Beijing (Z11110005880000), and the Training Program for High-level Talents From Beijing Health Industry (2011-3-022).

Corresponding author: FENG Tao, E-mail: happyft@163.com

α -突触核蛋白是一种相对分子质量为14.5ku的蛋白质, 在多种神经退行性疾病中含量增加^[1], 但确

切的神经机制尚不清楚。 α -突触核蛋白相关的病理改变可发生在帕金森病(Parkinson's disease, PD)

收稿日期: 2015-04-28; 修回日期: 2015-06-26

基金项目: 北京市自然科学基金项目(KZ201210025028); 北京市科技计划课题(Z11110005880000); 北京市卫生系统高层次人才培养计划(2011-3-022)

通信作者: 冯涛, E-mail: happyft@163.com

患者的神经系统、皮肤、唾液腺等全身多个系统,是该病经典的病理标志物^[2-5]。此外,PD患者及多系统萎缩患者外周血 α -突触核蛋白浓度均增加^[6],而阿尔茨海默症患者也存在 α -突触核蛋白相关的病理改变^[7]。这些研究说明, α -突触核蛋白病理改变存在于多种神经退行性疾病,且可能累及全身多个系统。然而,除了神经退行性疾病以外,目前 α -突触核蛋白病理改变与其他神经系统疾病[如急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke, AIS)]的关系研究较少。

神经细胞急性缺血损伤与 α -突触核蛋白有一定联系。动物研究发现,大脑中动脉急性闭塞可诱发急性氧化应激反应,并诱发 α -突触核蛋白聚集^[8]。早期研究也发现,在大脑中动脉闭塞小鼠模型中海马缺血5min后就开始出现 α -突触核蛋白的异常聚集^[9]。此外,陈予东等^[10]发现脑卒中患者血浆中 α -突触核蛋白寡聚体浓度增高。然而,其产生机制和病理意义尚有待进一步研究。此外,外周血红蛋白 α -突触核蛋白寡聚体浓度与AIS的关系尚无研究报道。

于是,我们招募正常对照、PD患者和AIS患者并留取血样标本,采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)定量观察红细胞 α -突触核蛋白浓度,并进行组间比较,同时观察年龄和性别对其含量的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象

招募55名正常对照组、55例PD患者和55例AIS患者。纳入标准:(1)PD组受试者符合英国帕金森病脑库的PD诊断标准;(2)卒中组为急性期缺血性脑卒中患者,其中,急性期定义为病程在2周内;(3)有抗凝血样;(4)签署知情同意书。正常对照组为与PD患者年龄和性别相匹配的健康老年人。排除标准:(1)继发性帕金森综合征患者;(2)符合痴呆诊断标准,临床痴呆评定量表(Clinical Dementia Rating, CDR) ≥ 1 ;(3)头部CT/MRI提示颅内器质性病变者;(4)严重焦虑、抑郁和精神分裂症患者;(5)合并心脏、肺、肝脏、肾脏、内分泌、血液系统严重疾病患者;(6)患有失语、严重构音障碍等影响临床测评的疾病;(7)预计依从性较差的患者。

1.2 红细胞的提取

EDTA-抗凝管采集样本血液10ml,低速短时离心(2000转/min, 4℃, 20min);吸取血浆:上层透明的黄色血浆(留取);洗涤:下层暗红色的红细胞加入1倍体积的1×PBS溶液,轻轻混匀;低速短时间

离心后弃上清,重复3次;最后一次离心弃上清后,加入1倍体积的1×PBS溶液,轻轻混匀后分装,于-80℃保存备用。

1.3 免疫组化分析

1.3.1 重组人 α -突触核蛋白的制备和纯化 将含有 α -突触核蛋白基因的pET重组质粒转化至大肠杆菌B121感受态细胞中,在含氨苄青霉素的2*YTA培养液中培养至适当浓度后加入IPTG诱导蛋白表达3h,超声破碎,进一步用离子交换分层、疏水层分析及反相层析纯化后获得 α -突触核蛋白,冷冻-80℃备用。

1.3.2 α -突触核蛋白寡聚体标准品的制备 将 α -突触核蛋白冻干粉末用PBS溶解使其终质量浓度为100 μ mol/L,经0.22 μ m滤膜过滤细菌,在37℃下650转/min恒温震荡72h。

1.3.3 双抗体夹心ELISA法测定红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度 用浓度1mg/L 3D5单抗包被96孔酶标板,2.5%明胶封闭2h。加用封闭液稀释生物素化的3D5抗体,向酶标板每孔加入100 μ l,孵育;用封闭液稀释亲和素标记的碱性磷酸酶(1:5000),向酶标板每孔加入100 μ l,孵育;向酶标板每孔加入100 μ l pNPP,显色;用酶标仪测定405nm处吸光度值(A_{405nm})。

1.4 统计学处理

采用SPSS20.0统计软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量数据以均值 $\pm$ 标准差表示,3组组间比较采用方差分析(ANOVA)及验后检验;非正态分布的数据以中位数(百分位数间距)表示,组间比较采用非参数检验。计数资料和等级资料采用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 α -突触核蛋白寡聚体浓度组间差异性分析

正常对照组、PD组及AIS组各组红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度均符合正态分布。红细胞 α -突触核蛋白寡聚体在正常对照组、PD组及AIS组中分别为(0.41 $\pm$ 0.14)、(0.82 $\pm$ 0.55)及(1.01 $\pm$ 0.56)mmol/L。ANOVA示3组患者红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度差异具有统计学意义($F = 24.305$, $P < 0.001$)。验后检验示PD患者红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度显著高于正常对照组($P < 0.001$, 95%CI 0.230~0.577);AIS组患者红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度显著高于正常对照组($P < 0.001$, 95%CI 0.426~0.773)及PD组患者($P = 0.027$, 95%CI 0.022~0.369;图1)。

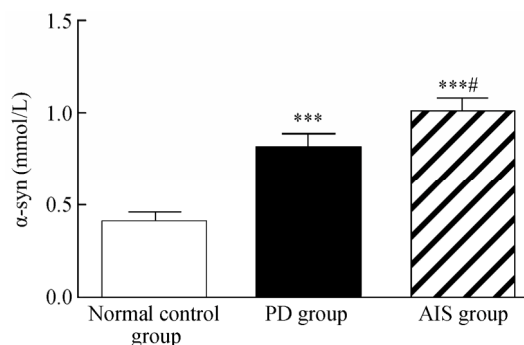


图1 3组患者血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度比较
Figure 1 Comparison of the oligomeric α -synuclein levels in the red blood cells among the three groups
 α -syn: α -synuclein; PD: Parkinson's disease; AIS: acute ischemic stroke. Compared with normal control group, *** $P < 0.001$; compared with PD group, # $P < 0.05$

2.2 性别对AIS患者血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度影响

55例AIS患者中男性43例,女性12例。血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度在男性患者中为 (1.01 ± 0.58) mmol/L,女性患者中为 (1.03 ± 0.51) mmol/L。男性AIS患者与女性患者相比,血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度差异无统计学意义($P > 0.05$;图2)。

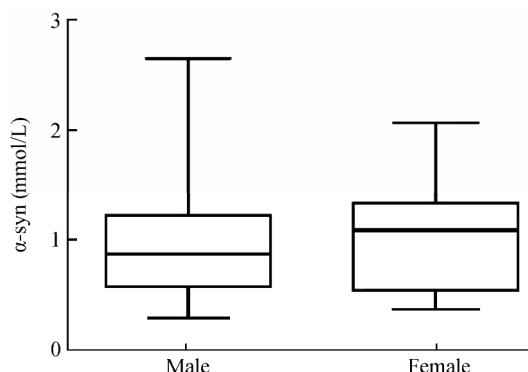


图2 不同性别AIS患者血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度比较
Figure 2 Comparison of oligomeric α -synuclein levels in the red blood cells between different genders in the patients with AIS
AIS: acute ischemic stroke; α -syn: α -synuclein

2.3 AIS患者及PD患者中 α -突触核蛋白寡聚体浓度与年龄相关性

AIS患者年龄为 (57.6 ± 12.1) 岁,PD患者年龄为 (54.4 ± 11.8) 岁。年龄与血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度在AIS患者($r = 0.036$, $P = 0.793$)及PD患者($r = -0.185$, $P = 0.190$)中均无显著相关性(图3,图4)。

3 讨论

α -突触核蛋白寡聚体在PD和其他神经退行性疾病的发病机制中具有重要的作用,可以直接导致神经

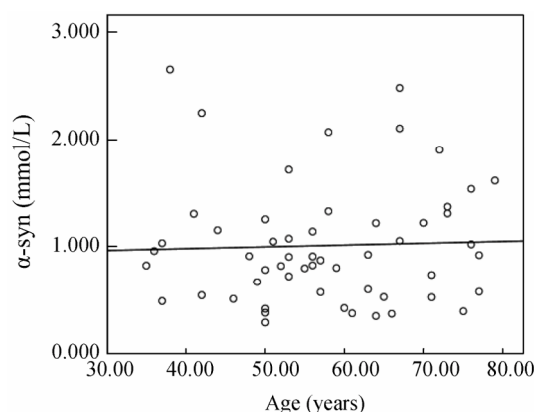


图3 AIS患者血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度与年龄的关系
Figure 3 Correlations between oligomeric α -synuclein levels in the red blood cell and age in patients with AIS
AIS: acute ischemic stroke; α -syn: α -synuclein

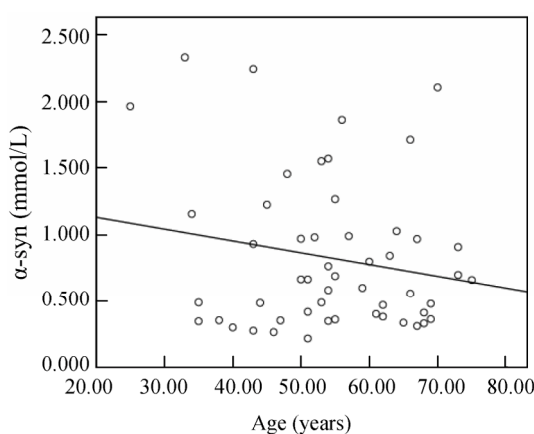


图4 PD患者血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度与年龄的关系
Figure 4 Correlations between oligomeric α -synuclein levels in the red blood cell and age in patients with PD
PD: Parkinson's disease; α -syn: α -synuclein

元的死亡^[6,11]。在本研究中,我们首次对AIS患者红细胞中的 α -突触核蛋白寡聚体进行了定量研究。结果表明,AIS患者红细胞 α -突触核蛋白寡聚体的含量明显高于对照组,甚至高于PD患者,但其浓度与性别、年龄无关。

AIS患者外周血红细胞 α -突触核蛋白含量升高,且升高程度较PD患者更为显著。这提示 α -突触核蛋白的功能异常可能不是PD患者的特异性改变。研究显示,在阿尔兹海默症患者^[12]及多系统萎缩患者^[6]中均存在 α -突触核蛋白的功能改变,与我们的研究结果一致。

α -突触核蛋白广泛存在于人体细胞中,其功能和致病机制尚不明确。研究指出 α -突触核蛋白可调节突触传递功能、突触囊泡密度和神经元可塑性^[13,14],其异常增高可以形成路易小体,从而导致细胞死亡。 α -突触核蛋白寡聚体具有细胞毒性,在神经退行性疾病中有重要作用^[15],但其在急性脑血管事件中所扮演角色尚缺乏解释。陈予东等人对脑卒中患者血浆进行分析,发现血浆 α -突触核蛋白寡聚体浓度增高。他们猜测:这可能是因为脑梗死部位缺血、缺氧,能

量代谢下降,导致缺血神经元胞膜破裂或分泌囊泡释放 α -突触核蛋白至细胞间质,进一步弥散至血浆中^[10]。本研究发现的AIS患者外周血红细胞中 α -突触核蛋白寡聚体浓度升高,进一步验证了急性缺血事件与 α -突触核蛋白病理改变的关系,但并不支持陈予东等人提出的假说。我们猜测: AIS患者外周血及血浆内 α -突触核蛋白寡聚体浓度增加是由氧化应激损伤诱发的。

早期研究发现,在大脑中动脉闭塞小鼠模型中海马缺血5min后就开始出现 α -突触核蛋白的异常聚集^[9]。具有细胞毒性的 α -突触核蛋白的异常聚集可能导致神经细胞的缺血损伤^[16]。这提示,神经细胞中 α -突触核蛋白的异常聚集可能是神经细胞缺血性损伤的机制之一。近期动物研究发现,大脑中动脉急性闭塞可诱发急性氧化应激反应,并诱发 α -突触核蛋白聚集^[8]。在PD和阿兹海默症患者中,氧化应激可能是导致 α -突触核蛋白异常聚集的原因之一^[12,17]。因此,我们认为氧化应激也可能导致急性缺血事件中 α -突触核蛋白细胞内异常聚集。我们猜测: AIS患者神经细胞急性缺血不仅引起神经细胞的氧化应激损伤,也可能引起外周细胞(如外周血红细胞)的氧化应激损伤,从而引起 α -突触核蛋白功能异常。

综上所述,本研究发现, AIS患者外周血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度显著升高。外周血红细胞 α -突触核蛋白寡聚体浓度改变可能参与急性缺血事件的病理生理改变,但其是否能够作为疾病早期诊断、反映预后的生物学标记物或能否作为AIS的独立危险因素,有待进一步研究。在未来的研究中,我们需要对AIS患者外周血 α -突触核蛋白寡聚体浓度及其他危险因素进行流行病学研究;同时对缺血性脑卒中患者外周血 α -突触核蛋白寡聚体浓度与疾病的严重程度之间的关系及其神经损伤机制进一步进行研究。

【参考文献】

- [1] Kim WS, Kagedal K, Halliday GM. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases[J]. *Alzheimers Res Ther*, 2014, 6(5): 73.
- [2] Donadio V, Incensi A, Leta V, *et al.* Skin nerve alpha-synuclein deposits: a biomarker for idiopathic Parkinson's disease[J]. *Neurology*, 2014, 82(15): 1362-1369.
- [3] Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, *et al.* Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(6): 703-713.
- [4] Gao L, Chen H, Li X, *et al.* The diagnostic value of minor salivary gland biopsy in clinically diagnosed patients with Parkinson's disease: comparison with DAT PET scans[J]. *Neurol Sci*, 2015 Mar 28. [Epub ahead of print]
- [5] Malek N, Swallow D, Grosset KA, *et al.* Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease—a systematic review[J]. *Acta Neurol Scand*, 2014, 130(2): 59-72.
- [6] Li FF, Gao LY, Li X, *et al.* Alpha-synuclein oligomer in red blood cells as a biomarker for Parkinson's disease[J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2015, 17(2): 161-163. [李芳菲, 邵丽妍, 李鑫, 等. 红细胞 α -突触核蛋白寡聚体作为帕金森病生物学标记物研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2015, 17(2): 161-163.]
- [7] Toledo JB, Cairns NJ, Da X, *et al.* Clinical and multimodal biomarker correlates of ADNI neuropathological findings[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2013, 1(1): 65.
- [8] Sato K, Yamashita T, Kurata T, *et al.* Telmisartan reduces progressive oxidative stress and phosphorylated alpha-synuclein accumulation in stroke-resistant spontaneously hypertensive rats after transient middle cerebral artery occlusion[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014, 23(6): 1554-1563.
- [9] Ishimaru H, Ueda K, Takahashi A, *et al.* Changes in presynaptic protein NACP/alpha-synuclein in an ischemic gerbil hippocampus[J]. *Brain Res*, 1998, 788(1-2): 311-314.
- [10] Chen YD, Yin N, Li X, *et al.* Changes of α -synuclein and its oligomeric formation in plasmas of patients with stroke[J]. *J Cap Med Univ*, 2013, 34(6): 826-829. [陈予东, 尹娜, 李昕, 等. 脑卒中患者血浆中 α -突触核蛋白及其寡聚体形成量变化的研究[J]. *首都医科大学学报*, 2013, 34(6): 826-829.]
- [11] Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease[J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 29-52.
- [12] Eggers AE. Why do Alzheimer's disease and Parkinson's disease target the same neurons[J]? *Med Hypotheses*, 2009, 72(6): 698-700.
- [13] Withers GS, George JM, Banker GA, *et al.* Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 1997, 99(1): 87-94.
- [14] Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, *et al.* Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(9): 3214-3220.
- [15] Waxman EA, Giasson BI. Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(7): 616-624.
- [16] Kitamura Y, Ishida Y, Takata K, *et al.* Alpha-synuclein protein is not scavenged in neuronal loss induced by kainic acid or focal ischemia[J]. *Brain Res*, 2001, 898(1): 181-185.
- [17] Rivas-Arancibia S, Zimbron LF, Rodriguez-Martinez E, *et al.* Oxidative stress-dependent changes in immune responses and cell death in the substantia nigra after ozone exposure in rat[J]. 2015, 7: 65.

(编辑: 周宇红)