

· 论著 ·

帕金森病患者血清可溶性 Fas 和可溶性 Fas 配体水平观察

时鹏¹, 年娣², 屈洪党¹, 李强¹, 钱卫东¹, 谢静¹, 许力¹, 王春¹, 马博¹

1. 蚌埠医学院第一附属医院神经内科, 安徽省蚌埠市 233000

2. 蚌埠医学院检验系核医学, 安徽省蚌埠市 233000

摘要:目的 观察血清中细胞凋亡蛋白可溶性 Fas (sFas) 与可溶性 Fas 配体 (sFasL) 的水平及其动态变化是否参与帕金森病 (PD) 的发生, 探索 PD 可能的发病机制。方法 60 例帕金森病患者 (男性 34 例, 女性 26 例) 为研究组, 30 例健康体检者 (男性 16 例, 女性 14 例) 为对照组。用酶联免疫分析法检测两组血清 sFas/sFasL 水平, 比较两组之间 sFas/sFasL 浓度的差异。结果 PD 组 Hoehn-Yahr 分级 1-5 级血清 sFas/sFasL 水平均显著高于对照组 (P 值均 <0.05)。PD 组 UPDRS 评分轻度、中度和重度血清 sFas/sFasL 水平均显著高于对照组 (P 值均 <0.05)。PD 患者血清 sFas/sFasL 水平呈正相关性 ($r=0.801$; $P=0.01$)。结论 血清 sFas/sFasL 的水平与 PD 病情严重程度有关, 血清 sFas/sFasL 水平与 PD 的发病有一定的关系。

关键词: 帕金森; 抗原; CD95; 细胞凋亡

Study on serum levels of soluble Fas and soluble Fas ligand in patients with Parkinson's disease

SHI Peng, Nian Di, QU Hong-Dang, LI Qiang, Qian Wei-Dong, XIE Jing, Xu Li, WANG Chun, Ma Bo. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Bengbu Medical University, Bengbu, Anhui 233000, China

Corresponding author: Nian Di, Email: Niandi07@sohu.com

Abstract: Objective To investigate the roles of serum soluble Fas (sFas) and soluble Fas ligand (sFasL) in the development and progression of Parkinson's disease (PD). **Methods** Sixty patients with PD (26 females and 34 males) were selected as study group, and 30 healthy subjects (14 females and 16 males) were selected as control group. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure serum levels of sFas and sFasL in both groups, and the differences in sFas and sFasL concentrations between the two groups were evaluated. **Results** All patients with Hoehn-Yahr stage 1-5 PD had significantly higher serum levels of sFas and sFasL than the control group ($P<0.05$ for all). Patients with mild, moderate, and severe PD, as evaluated according to the UPDRS scoring system, had significantly higher serum levels of sFas and sFasL than the control group ($P<0.05$ for all). In PD patients, serum levels of sFas and sFasL were positively correlated with each other ($r=0.801$, $P=0.01$). **Conclusions** Serum levels of sFas and sFasL are positively correlated with the severity of PD. sFas and sFasL might play an important role in the pathogenesis of PD.

Key words: Parkinson's disease; antigen; CD95; apoptosis

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是中老年人常见的神经系统退行性疾病, 病因为神经元变性或丢失、纹状体 DA 含量降低, 导致胆碱系统功能相对亢进, 临床表现多有运动迟缓、肌强直、静止性震颤等, 其致残率、病死率均较高。Fas 系统是细胞凋亡调控信号途径的重要部分, 是机体维持自

身稳定的一条重要调控途径, 可溶性 Fas (soluble Fas, sFas) 和可溶性 Fas 配体 (soluble Fas ligand, sFasL) 分别是 Fas 和 Fas 配体 (FasL) 的可溶形式, 研究表明, sFas/sFasL 与心血管疾病、自身免疫系统疾病的发病及预后均有密切联系^[1], 而与帕金森病相关报道甚少。

基金项目: 安徽省卫生厅课题 (KJ20132210)

收稿日期: 2014-03-04; 修回日期: 2014-05-28

作者简介: 时鹏 (1981-), 男, 医师, 医学硕士, 主要从事神经系统遗传变性疾病基础与临床研究。

通讯作者: 年娣, 讲师, 医学硕士, 主要从事神经系统遗传变性疾病的基础研究。Email: niandi07@sohu.com。

本研究拟观察帕金森患者血清 sFas/sFasL 水平,探讨 sFas/sFasL 介导的细胞凋亡在 PD 病情变化中的作用及与病情严重程度的关系,可能为 PD 判断病情和评估预后提供一个新途径。

1 材料和方法

1.1 对象

1.1.1 PD 组 入选标准:2012 年 06 月 ~ 2013 年 06 月在蚌埠医学院第一附属医院神经内科住院的 PD 患者 60 例,其中男性 34 例,女性 26 例,年龄 38 ~ 78 岁,平均(58.92 ± 6.57)岁。均符合英国帕金森病协会脑库临床诊断标准且均征得病人及其家属同意,符合医学伦理学道德规范。

排除标准:①严重肝肾功能不全者及心肺疾病;②血管炎、风湿性心脏病患者及有感染并发症者;③有血液系统疾病;④肿瘤患者;⑤近 6 个月内急性创伤出血、感染及心脑血管疾病。

1.1.2 对照组 30 例健康体检合格者;男性 16 例,女性 14 例,年龄 38 ~ 79 岁,平均(60.73 ± 7.15)岁。

1.2 Hoehn-Yahr 分级评定

参照 Hoehn-Yahr 分级表标准,对 60 例 PD 患者进行评分。

0 期:无症状;0 例。

1 期:单侧/侧身体受影响,但没有影响平衡;11 例。

2 期:身体双边/侧受影响,但没有影响平衡;12 例。

3 期:平衡受影响,轻度到中度疾病,但患者可以独立生活;10 例。

4 期:严重影响活动能力,但患者可以自行走动和站立;14 例。

5 期:在没有他人帮助的情况下,只能卧床或坐轮椅;13 例。

以上评分均由经专业培训的神内科医师完全按照测评标准完成。

1.3 帕金森 UPDRS 评分

参考 Langston 等从精神、行为和情感,日常生活,运动检查和药物治疗的并发症四大项进行评分,总分为 199 分,分轻、中、重 3 组。轻度 0 ~ 50 分,13 例;中度 51 ~ 100 分,24 例;重度 101 ~ 199 分,23 例。

1.4 样本采集及测定

患病组及正常对照组采集空腹静脉血 4 ml,室

温下以 4000 r/min 离心 10 min(白洋 B 600-A 低速离心机),收集血清,放置 - 80℃ 冰箱内贮存。采用 sFas 及 sFasL 试剂盒(美国 R&D 有限公司),应用酶联免疫吸附法(ELISA),操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本的 t 检验;多组间均数的比较采用 one-way ANOVA 法;多组间资料两两比较采用 LSD 法;两因素间相关性应用 Spearman 相关分析; $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD 组与对照组一般资料比较

PD 组与对照组之间一般情况年龄、性别、饮酒、血糖、血压、血脂、既往史差别均无统计学意义($P > 0.05$),两组之间有良好的均衡性,见表 1。

表 1 PD 组与对照组一般情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	PD 组(n=60)	对照组(n=30)	t	P
年龄(岁)	58.92 ± 6.57	60.73 ± 7.15	4.94	0.57
性别				
男性	34(56.7)	16(53.3)	0.38	0.48
女性	26(43.3)	14(46.7)		
吸烟	17(28.3)	10(33.3)	0.34	0.46
饮酒	15(25.0)	9(30.0)	0.18	0.62
高血压	42(70.0)	18(60.0)	0.79	0.23
糖尿病	36(60.0)	19(63.3)	1.45	0.14
高血脂	18(30.0)	11(36.7)	0.76	0.25
TIA 史	5(8.3)	3(10.0)	0.18	0.19
心脏病史	8(13.3)	4(10.0)	1.03	0.31
心脑血管病家族史	3(5.0)	1(3.3)	0.07	0.55

2.2 Hoehn-Yahr 分级组间及与对照组 sFas/sFasL 水平比较

Hoehn-Yahr 分级组间与对照组 sFas/sFasL 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$);sFas/sFasL 水平与 Hoehn-Yahr 分级呈正相关,见表 2。

表 2 Hoehn-Yahr 分级组间及与对照组 sFas/sFasL 水平比较 ($\bar{x} \pm s$; ng/L)

组别	例数	sFas	sFasL
1 级	11	3.45 ± 0.27*	1.55 ± 0.17 [▲]
2 级	12	3.53 ± 0.34*	1.76 ± 0.38 [▲]
3 级	10	4.26 ± 0.53*	2.23 ± 0.42 [▲]
4 级	14	5.97 ± 1.00*	2.95 ± 0.39 [▲]
5 级	13	6.36 ± 1.02*	3.90 ± 0.47 [▲]
对照组	30	2.97 ± 0.36*	1.13 ± 0.11 [▲]

注:★为 sFas 水平各组间两两比较($F=5.36, P<0.05$),均 $P<0.01$;▲为 sFasL 水平各组间两两比较($F=4.54, P<0.05$),均 $P<0.01$ 。

2.3 UPDRS 评分组间及与对照组 sFas/sFasL 水平比较

UPDRS 评分分组与对照组 sFas/sFasL 水平比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 且病情越严重, sFas/sFasL 水平越高, 见表 3。

表 3 UPDRS 评分组间及与对照组 sFas/sFasL 水平比较 ($\bar{x} \pm s$; ng/L)

组别	例数	sFas	sFasL
轻度	10	$3.96 \pm 0.59^*$	$1.83 \pm 0.32^{\nabla}$
中度	24	$4.79 \pm 1.02^*$	$2.82 \pm 0.55^{\nabla}$
重度	26	$5.96 \pm 1.33^*$	$3.80 \pm 0.49^{\nabla}$
对照组	30	$2.97 \pm 0.36^*$	$1.13 \pm 0.11^{\nabla}$

注: ★为 sFas 水平各组间两两比较 ($F = 6.17, P < 0.05$), 均 $P < 0.01$; ▽为 sFasL 水平各组间两两比较 ($F = 4.37, P < 0.05$), 均 $P < 0.01$ 。

2.4 sFas 和 sFasL 表达的相关性分析

60 例患病组 sFas 和 sFasL 表达的相关性分析呈正线性相关关系 ($r = 0.801, P = 0.01$), 见表 4、图 1。

表 4 sFas 和 sFasL 表达的相关性分析

	例数	r	P
sFas	60	0.801	0.01
sFasL	60		

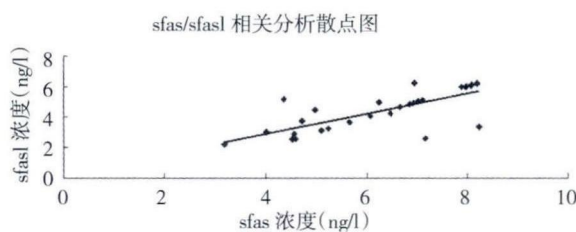


图 1 sFas/sFasL 相关分析散点图

3 讨论

帕金森病是目前全球中老年人常见的一种神经系统变性疾病。在我国 65 岁人群中患病率已高达 1.7%, 且老龄化现象的加剧, 患病总数正持续增长^[2-4]。迄今其发病机制仍不清楚, 多数学者认为其发病原因如下: ①泛素-蛋白酶系统 (UPS) 降解障碍: PD 是一种蛋白降解障碍性疾病, α -synuclein (AS) 的降解障碍和异常聚集与 PD 的发生密切相关。突变 AS 过度积聚可导致 UPS 降解障碍, 对细胞产生毒性, 同时 UPS 功能障碍可引起细胞内蛋白降解障碍、聚集, 导致胞浆内路易小体形成及多

巴胺能神经元变性坏死及凋亡^[5-8]。②蛋白质错误折叠和聚集: PD 等神经变性疾病病变共同特征是蛋白在脑组织中不同部位的异常沉积。集聚的错误折叠蛋白本质上对神经元都是有毒性的。如蛋白的聚集可以使细胞变形或者干扰转运过程中 ATP 酶的分解活性而导致神经元损伤凋亡或坏死^[9]。③炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍: 线粒体在神经递质合成贮存、细胞能量代谢、氧化磷酸化、传递电子、细胞死亡调控等过程中发挥重要作用。炎症反应、氧化应激可促使线粒体膜的极性破坏, 通透性增加, 释放细胞色素 C 和凋亡诱导因子, 产生细胞凋亡。近年来的研究表明, PD 黑质多巴胺能神经元缺失与细胞凋亡有关, 利血平 PD 大鼠模型中发现选择性纹状体神经元缺失, 处于死亡过程中的纹状体神经元在形态学和生化特征上均具有凋亡特征。Lee 等^[10]应用细胞凋亡靶向探针 ApoPep-1 对 MPTP 处理的 PD 小鼠进行光学显像等研究, 结果表明帕金森病与细胞凋亡密切相关。王东玉等^[11]的研究显示应用 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 制备的 PD 小鼠模型中存在黑质 DA 能神经元的凋亡和凋亡诱导因子 (AIF) 的核移位。

Fas 是肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 家族成员, 属膜表面受体, 由胞内区 (内含死亡结构域)、胞外区和跨膜区 3 部分组成, 与配体 FasL 结合后使胞内凋亡结构域上 FADD/MORT1 和 CAP4/MACH1 解离, CAP4/MACH1 进一步将信号转导至白介素-1 β 转换酶途径, 激活特异性内源性核酸酶, 将染色质 DNA 分解成小片段, 致细胞凋亡。如果 Fas 基因转录过程中, mRNA 剪切方式发生改变, 则编码合成跨膜区不完整或缺失的可溶性 Fas (sFas), sFas 因缺乏跨膜区蛋白, 与 FasL 结合不能诱导细胞凋亡, 但可通过与 Fas 竞争结合 FasL, 而阻断 Fas/FasL 介导的细胞凋亡, 且随着 sFas 浓度增加, 其抑制作用增强。sFasL 是 FasL 经金属酶水解而产生的, 可与 Fas 结合, 诱导细胞凋亡。现认为外周血 sFas 表达增强则提示机体由于某种损害产生了细胞凋亡, 而其可能通过抑制细胞凋亡过程而使细胞避免被损害。Bertarbet 等^[12]的研究结果显示 PD 患者额叶皮质 Fas 结合蛋白 (FAF1) 表达显著增加, 体外实验发现 PD 相关发病因素氧化应激、线粒体功能障碍等能显著促进 FAF1 的表达, 推测 FAF1 在 PD 发病中有重要意义。Calopa 等^[13]对淋巴细胞亚群进行自发凋亡和诱

导凋亡的研究,结果显示 PD 患者 CD4(+)T 细胞表面 Fas 表达增加,可能和外周血中的 CD4(+)T 细胞减少相关,Fas 可能增加了 PD 患者外周血 CD4(+)T 细胞的凋亡易感性。Usenko 等^[14] 实验发现 LRRK-2 基因突变的 PD 患者外周血淋巴细胞 Fas mRNA 水平较正常对照组显著升高。

本研究结果显示 PD 患者组与正常对照组比较,血清 sFas/sFasL 浓度差异均有统计学意义,PD 患者组明显高于正常对照组。这一结果提示血清 sFas/sFasL 介导的细胞凋亡可能是 PD 发病的机制之一。本实验还对 PD 患者分别进行了 Hoehn-Yahr 评分和 UPDRS 评分,发现 sFas/sFasL 水平与 PD 患者病情严重程度有一定的关系;Hoehn-Yahr 评分越高,病情越严重,血清 sFas/sFasL 水平越高,各组间两两相比差异均具有统计学意义;UPDRS 评分与 sFas/sFasL 水平之间亦为相同的结果,提示 PD 的病情发展与 sFas、sFasL 表达上调有关,其机制可能是:某些异常情况诱发氧化应激,产生大量的活性氧(ROS),ROS 的产生激活 Fas/FasL 系统,进一步导致 Fas 致死区(FADD)结构蛋白招募 Caspase-8 原形成死亡诱导复合体,形成蛋白酶促级联反应,致神经细胞凋亡。在 PD 病情发展过程中,病变越严重可能相应的炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍越严重,神经元退行性变、坏死越多,细胞凋亡越多,因而介导细胞凋亡的促凋亡因子 sFasL 表达上调,与此同时机体也反应性地通过产生更多的凋亡抑制因子 sFas 来拮抗细胞凋亡,抑制神经细胞的过度脱落,促进细胞修复,以利于神经缺损功能恢复。

综上所述,PD 发病是多种因素共同作用的结果,各种诱因共同启动线粒体功能障碍、氧化应激、蛋白降解障碍等最终导致黑质致密部多巴胺能神经元缺失、细胞凋亡,从而导致 PD 的发生。在 PD 发病过程中,细胞凋亡可能是一个伴随各种诱因出现的中间反应阶段。PD 患者血清 sFas/sFasL 的浓度变化可能与病情轻重有关。研究 sFas/sFasL 系统介导 PD 细胞凋亡机制对研究 PD 的发病机制有重要意义,如可采取阻断 Fas 系统凋亡信息通路等途径来预防和治疗 PD。不过,本研究的样本量较小,研究结果仍需进一步大样本的研究加以证实。

参 考 文 献

[1] 许静,蒲传强. Fas/FasL 在神经系统疾病作用的研究进

展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2013, 40(3): 297-300.

- [2] Zhang ZX, Roman GC, Hong Z, et al. Parkinson's disease in China: prevalence in Beijing, Xian, and Shanghai. *Lancet*, 2005, 365(9459): 595-597.
- [3] Chen W, Xu ZM, Wang G, et al. Non-motor symptoms of Parkinson's disease in China: a review of the literature. *Parkinsonism Relat Disord*, 2012, 18(5): 446-452.
- [4] Gui YX, Wan Y, Xiao Q, et al. Verification of expressions of Kir2 as potential peripheral biomarkers in lymphocytes from patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2011, 505(2): 104-108.
- [5] Li C, Ting Z, Qin X, et al. The prevalence of LRRK2 Gly2385 Arg variant in Chinese Han population with Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2007, 22(16): 2439-2443.
- [6] Yang H, Zhou HY, Li B, et al. Neuroprotection of Parkinson's disease against apoptosis is independent of inclusion body formation. *Neuroreport*, 2005, 16(10): 1117-1121.
- [7] Tan YY, Zhou HY, Wang ZQ, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to the death induced by UCH-L1 inhibitor. *Mol Cell Biochem*, 2008, 318(1-2): 109-115.
- [8] Duyckaerts C, Sazdovitch V, Seilhean D. Update on the pathophysiology of Parkinson's disease. *Bull Acad Natl Med*, 2010, 194(7): 1287-1303.
- [9] Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, et al. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, 2003, 115(6): 727-738.
- [10] Lee MJ, Wang K, Kim IS, et al. Molecular imaging of cell death in an experimental model of Parkinson's disease with a novel apoptosis-targeting peptide. *Mol Imaging Biol*, 2012, 14(2): 147-155.
- [11] 王东玉,张朝东. 帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元凋亡诱导因子核移位的研究. *解剖学进展*, 2009, 15(1): 56-59.
- [12] Betarbet R, Anderson LR, Gearing M, et al. Fas-associated factor 1 and Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 2008, 31(3): 309-315.
- [13] Calopa M, Bas J, Mestre M, et al. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients. *Neurobiol Dis*, 2010, 38(1): 1-7.
- [14] Usenko TS, Vavilova TV, Shvartsman AL, et al. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with LRRK2-associated Parkinson's disease. *Tsitologia*, 2012, 54(1): 44-48.