

帕金森病患者血浆中亲环素 A 的含量及其与炎症因子的相关性分析

敖文玲¹, 胡明¹, 胡叶丽¹, 李方明¹, 王卫东¹, 陈为安²

1. 南方医科大学深圳医院神经内科, 广东省深圳市 518000

2. 温州医科大学附属第一医院神经内科, 浙江省温州市 325035

摘要:目的 探讨帕金森病患者血浆中亲环素 A (CyPA) 的含量变化并分析其与炎症因子的相关性。方法 收集 2015 年 6 月至 2017 年 6 月我院神经内科收治的帕金森病患者 80 例 (帕金森组), 另选取同期健康体检者 80 例为对照 (对照组)。全自动生化分析仪检测 CyPA、超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 和白细胞介素 1 β (IL-1 β) 含量; 分析 CyPA 含量与 hs-CRP、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量的相关性; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和免疫印迹法 (Western Blot) 检测 LPS 处理后 CyPA mRNA 和蛋白表达变化; 小干扰 RNA (siRNA) 敲减 CyPA 的表达并验证后, 采用酶联免疫分析法 (ELISA) 检测 hs-CRP、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量。结果 帕金森组患者血浆 CyPA 含量及血清中炎症因子含量高于对照组 ($P < 0.05$); CyPA 含量与 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 呈正相关关系 ($P < 0.05$), 与 hs-CRP 无相关性 ($P > 0.05$)。LPS 处理 BV-2 小胶质细胞可使 CyPA mRNA 和蛋白质含量表达增加 ($P < 0.05$)。siRNA 敲减 CyPA 的表达可降低 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量 ($P < 0.05$), 对 hs-CRP 含量则无影响 ($P > 0.05$)。结论 帕金森病患者血浆 CyPA 含量升高可促进小胶质细胞炎症因子分泌, CyPA 可作为抑制或缓解小胶质细胞炎症状态的靶点。

关键词: 帕金森病; 亲环素 A; 小胶质细胞; 促炎细胞因子

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.04.002

Plasma level of cyclophilin A and its correlation with inflammatory factors in patients with Parkinson's disease

AO Wen-Ling, HU Ming, HU Ye-Li, LI Fang-Ming, WANG Wei-Dong, CHEN Wei-An. Department of Neurology, Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518000, China

Corresponding author: WANG Wei-Dong, E-mail: wj120019@msn.com; CHEN Wei-An, E-mail: wzanan@126.com

Abstract: Objective To investigate the changes in the plasma level of cyclophilin A (CyPA) in patients with Parkinson's disease (PD) and its correlation with inflammatory factors. **Methods** Eighty patients with PD who were admitted to our hospital from June 2015 to June 2017 were assigned to PD group. Eighty healthy volunteers within the same period were assigned to control group. An automatic biochemical analyzer was used to determine the levels of CyPA, hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), and interleukin 1 β (IL-1 β). The correlation of the CyPA level with the levels of hs-CRP, TNF- α , IL-6, and IL-1 β was analyzed. RT-PCR and Western blot were used to determine the changes in the mRNA and protein expression of CyPA after lipopolysaccharide (LPS) treatment. The levels of hs-CRP, TNF- α , IL-6, and IL-1 β were measured by enzyme-linked immunosorbent assay after knockdown of CyPA expression using small interfering RNA (siRNA). **Results** The plasma level of CyPA and serum levels of inflammatory factors were significantly higher in the PD group than in the control group ($P < 0.05$). The CyPA level was positively correlated with the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β ($P < 0.05$). There was no correlation between the CyPA level and the hs-CRP level ($P > 0.05$). LPS treatment of BV-2 microglial cells significantly increased the mRNA and protein expression of CyPA ($P < 0.05$). The knockdown of CyPA by siRNA significantly reduced the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β ($P < 0.05$).

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY15H090019)

收稿日期: 2018-03-15; **修回日期:** 2018-07-15

作者简介: 敖文玲 (1983-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事帕金森病、睡眠障碍和神经心理的研究。

通信作者: 王卫东 (1976-), 男, 博士, 主任医师, 主要从事脑血管疾病和帕金森病等的研究。E-mail: wj120019@msn.com。

陈为安 (1971-), 男, 博士, 主任医师, 主要从事神经内科学相关研究。E-mail: wzanan@126.com。

0.05) but had no effect on the hs-CRP level ($P > 0.05$). **Conclusions** An increased plasma level of CyPA promotes the secretion of inflammatory factors by microglial cells in patients with PD. CyPA can be used as a target to inhibit or alleviate the inflammatory state of microglial cells.

Key words: Parkinson's disease; cyclophilin A; microglial cell; pro-inflammatory cytokine

中枢神经系统退行性疾病如帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 等可诱导小胶质细胞 (microglia) 激活, 促进多种促炎细胞因子的释放^[1], 同时可诱导一氧化氮、前列腺素 E2 和活性氧等的释放促进神经元的病变和凋亡, 导致恶性循环, 对中枢和外周神经系统产生严重损伤^[2]。相关抗炎治疗也被证明可缓解神经退行性疾病患者神经元的炎症状态, 因此抑制或缓解小胶质细胞炎症是减缓神经退行性疾病中神经元死亡的重要策略之一^[3]。亲环素 A (cyclophilin A, CyPA) 是一种具有多种生物学功能的可释放型蛋白质, 多项研究显示 CyPA 是炎症和氧化应激的新型介导体, 是神经退行性疾病、心血管疾病、糖尿病、病毒感染和血栓形成等疾病的主要参与者^[4-5]。在帕金森病患者外周血中 CyPA 含量变化如何及其与促炎细胞因子关系如何尚不清楚, 因此本研究以帕金森患者及 BV-2 小胶质细胞为研究对象, 探讨 CyPA 在帕金森患者神经元炎症状态中的作用, 为帕金森病的抗炎治疗提供实验基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2015 年 6 月至 2017 年 6 月我院神经内科收治的帕金森病患者 80 例 (帕金森组), 男 48 例, 女 32 例, 年龄 59 ~ 92 岁, 平均年龄 (72.7 ± 9.5) 岁。病程 1 ~ 25 年, 其中 1 ~ 5 年 20 例, 5 ~ 10 年 31 例, 10 年以上 29 例。按照帕金森病 Honehn&Yahr 分级标准对所有患者进行分级, 其中早期 18 例, 中期 34 例, 晚期 28 例。帕金森病诊断标准参照 2016 版中国帕金森病诊断标准。排除标准: ①近期有全身性或系统性感染者; ②合并自身免疫性疾病或活动性自身免疫性疾病者; ③合并单一或多种恶性肿瘤者; ④严重肝肾功能障碍者等。另选取与帕金森组年龄和性别构成相匹配的同期健康体检者 80 例为对照 (对照组), 其中男 40 例, 女 40 例, 年龄 60 ~ 87 岁, 平均年龄 (70.6 ± 8.3) 岁。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 主要仪器 全自动生化分析仪 (Beckman

Coulter, 美国); 低温高速离心机 (Beckman Coulter, 美国); 超净工作台 (苏州安泰, 中国); 普通 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国); 电泳仪、电转仪及凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国); 恒温气浴摇床 (海门其林贝尔仪器制造有限公司, 中国)、多功能酶标仪 (Molecular Devices, 美国)。

1.2.2 主要试剂 LPS (Abcam, 美国); hs-CRP, TNF- α , IL-6 和 IL-1 β ELISA 试剂盒 (Biolegend, 美国); 总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司, 中国); 逆转录试剂盒 (宝生物工程 (大连) 有限公司, 日本); 荧光定量 PCR 试剂盒 (QIAGEN, 美国); PCR 引物 (华大基因, 中国); anti-CyPA (Abcam, 美国); anti-GAPDH 及 HRP 标记二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 中国)、ECL 发光液 (ThermoFisher, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 血浆 CyPA 及血清促炎细胞因子检测 所有受检者空腹采集外周静脉血, 1 h 内离心分离血浆或血清。离心速度为 3000 r/min, 离心 10 min。分离血浆或血清后, 全自动生化分析仪检测 CyPA 和超敏 C 反应蛋白 (hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 和白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 的含量。

1.3.2 BV-2 小胶质细胞培养 采用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM/F12 培养液培养 BV-2 小胶质细胞, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% CO_2 培养箱中静置培养。待细胞融合度达到 80% 时, 以 0.25% 胰酶-EDTA 消化细胞并进行传代培养。

1.3.3 RT-qPCR 检测 CyPA mRNA 的表达变化 按 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒说明书提取总 RNA 并逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 反应。CyPA 和 GAPDH 引物序列见表 1。反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。根据目的基因的相对量 = 2 (CtGAPDH-CtCyPA) 计算 CyPA mRNA 的表达变化。

表1 CyPA 及 GAPDH 引物信息

基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
CyPA	上游 ACTCTCATTTAGATGGGCATCA	126
	下游 GAGTATCCGTACCTCCGCAA	
GAPDH	上游 GTCGCCAGCCGAGCCACATC	107
	下游 CCAGGCGCCCAATACGACCA	

1.3.4 Western Blot 检测 CyPA 蛋白的表达变化

以 RIPA Buffer 提取总蛋白,加入 5 × SDS Loading Buffer,99℃ 加热 5 min 使蛋白变性。取 20 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,切取凝胶进行电转,35 V 湿转过夜,5% BSA 室温封闭 2 h, PBST 洗 3 次,每次 5 min;室温孵育一抗 1 h, PBST 洗 3 次,每次 5 min;室温孵育二抗 30 min, PBST 洗三次,每次 5 min;室温孵育 ECL 发光液 1 min,进行凝胶成像并拍照,以灰度值 CyPA/灰度值 GAPDH 计算目的蛋白的表达变化。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 student's *t* 检验,多样本均数间比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 Student-Newman-Keuls

检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 帕金森组和对照组 CyPA 和促炎细胞因子含量比较

帕金森组血浆 CyPA,血清 hs-CRP、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表2 两组患者血浆 CyPA 和血清促炎细胞因子含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CyPA (ng/L)	hs-CRP (mg/L)	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)
对照组	80	2.35 ± 0.37	1.74 ± 0.86	165.76 ± 82.16	2.80 ± 1.41	22.22 ± 14.07
帕金森组	80	6.02 ± 0.57	4.93 ± 1.56	332.69 ± 87.53	20.2 ± 7.05	231.11 ± 72.58
<i>t</i>		55.36	16.00	12.44	21.41	25.27
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 帕金森病患者 CyPA 含量促炎细胞因子含量的相关性

相关性分析结果显示,帕金森病患者血浆 CyPA 含量与 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 呈正相关关系 ($P < 0.05$),与 hs-CRP 无明显相关性 ($P > 0.05$),见图 1。

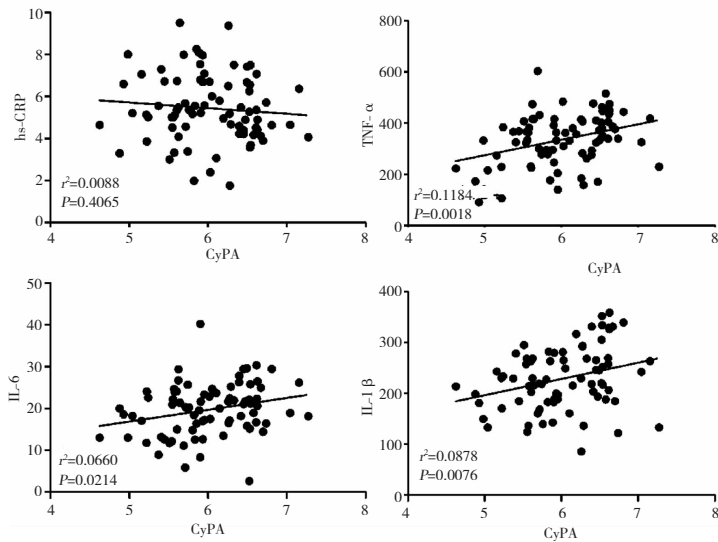


图1 帕金森病患者 CyPA 含量与促炎细胞因子含量的相关性。

2.3 帕金森病患者血浆 CyPA 含量与疾病病程及 H&Y 分级的关系

帕金森病患者血浆 CyPA 含量与疾病病程长短无关 ($P > 0.05$),而与疾病严重程度有关 ($P < 0.05$),随着疾病加重,CyPA 含量升高,见表 3。

2.4 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症模型 CyPA mRNA 和蛋白的表达变化

与未处理 LPS 组比较,LPS 处理 BV-2 小胶质细胞后,CyPA mRNA 和蛋白的表达增加,两组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。

表 3 帕金森病患者血浆 CyPA 含量与疾病病程及 H&Y 分级的关系 ($\bar{x} \pm s$)

指标	疾病病程(年)			H&Y 分级		
	>10	1~5	5~10	晚期	早期	中期
CyPA (ng/L)	5.98±0.55	5.99±0.58	6.02±0.46	5.51±0.51	6.00±0.43	6.34±0.36
F		0.041			20.630	
P		0.959			0.000	

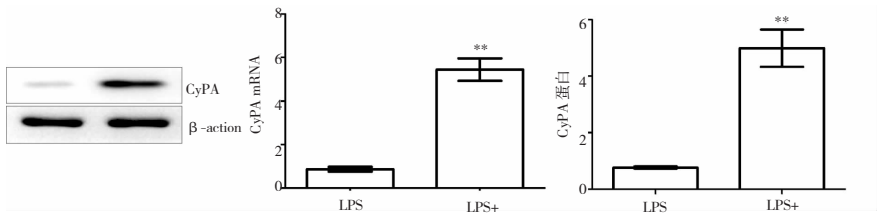


图 2 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症模型 CyPA mRNA 和蛋白的表达变化
注: ** 为与 LPS-组比较, $P < 0.01$

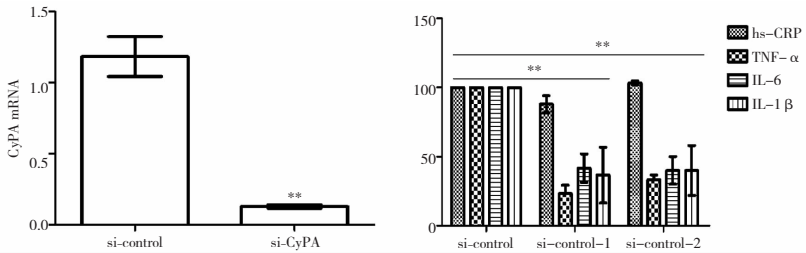


图 3 CyPA 对细胞促炎因子表达的影响
注: ** 为与 LPS-组比较, $P < 0.01$

3 讨论

帕金森病最主要的病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元的变性死亡,并由此引起纹状体多巴胺含量显著性减少而致病。但目前具体的病因仍不清楚,遗传因素、环境因素、年龄老化和氧化应激等均可能参与帕金森病多巴胺能神经元的变性死亡过程^[6]。有研究发现^[7],神经炎症是帕金森等神经退行性疾病的一种主要病理过程,在帕金森病患者的黑质纹状体中存在大量小胶质细胞激活,激活后产生的多种细胞因子(如 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 等)可以引起炎症反应,促进神经元的病变和凋亡,导致恶性循环,对中枢和外周神经系统产生严重损伤。因此,控制小胶质细胞炎症是帕金森的治疗策略之一^[8]。本研究以帕金森患者和 BV-2 小胶质细胞为研究对象,寻找控制小胶质细胞炎症反应的可能靶点,为帕金森病的治疗提供实验基

2.5 CyPA 对细胞促炎因子表达的影响

采用 siRNA 敲减 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞中 CyPA 的含量,结果显示,敲减 CyPA 可减少 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的含量,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而对 hs-CRP 含量无明显影响($P > 0.05$),见图 3。

础。帕金森病患者外周血促炎细胞因子含量检测结果显示,hs-CRP、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量高于对照组,提示帕金森患者确实处于炎症状态,与文献报道一致。

亲环素 A (CyPA) 是最早发现的亲环素家族蛋白,由 165 个氨基酸组成,存在于哺乳动物所有类型细胞中。CyPA 具有肽脯氨酰顺反异构酶活性,作为分子伴侣参与体内多种蛋白的成熟、折叠、活化、稳定及定位^[9]。近年来的研究发现,CyPA 与炎症的发生密切相关,是氧化应激和炎症的新型介导物^[10,11]。CyPA 是一种胞内蛋白,但多种因素可导致其释放,如炎症、缺氧、氧化应激及其他刺激。Heinzmann 等^[12]研究发现,新型细胞外 CyPA 抑制剂 MM284 可减少肌钙蛋白 I 诱导的心肌炎小鼠模型的心肌炎症。Li 等^[13]研究发现,在 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤模型中,CyPA 抗体处理可减轻肺组织炎

症反应,并可显著减少血清中 IL-1 β 的含量。本研究结果显示,CyPA 含量与 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 呈正相关关系,与 hs-CRP 无明显相关性,且帕金森病患者血浆 CyPA 含量与疾病病程长短无关,而与疾病严重程度有关,提示 CyPA 可能与疾病进展有关。在 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症模型结果显示,敲减 CyPA 的表达可减少 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量,而对 hs-CRP 无明显影响,说明 CyPA 可通过促进促炎细胞因子的分泌导致炎症反应。Sun 等^[14] 研究发现 CypA 可与 NF- κ B 亚基 p65/RelA 相互作用并促进 NF- κ B 激活信号传导,而 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 均为 NF- κ B 信号通路的炎症因子,因此本研究结果与 Sun 等^[14] 文献报道一致。

综上所述,CyPA 可能通过 NF- κ B 信号通路促进促炎细胞因子的分泌进而导致炎症反应,而炎症反应又可进一步促进小胶质细胞释放 CyPA,导致恶性循环,加重神经系统的炎症反应。本研究为以神经炎症为病理过程的神经退行性疾病的抗炎治疗提供了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Szejder-Pacholek A, Joniec-Maciejak I, Wawer A, et al. The effect of α -synuclein on gliosis and IL-1 α , TNF α , IFN γ , TGF β expression in murine brain [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(2): 242-251.
- [2] Lee DS, Lee M, Sung SH, et al. Involvement of heme oxygenase-1 induction in the cytoprotective and neuroinflammatory activities of *Siegesbeckia Pubescens* isolated from 5,3'-dihydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone in HT22 cells and BV2 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 65-72.
- [3] Weng L, Zhang H, Li X, et al. Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathways in microglia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 44: 1-8.
- [4] 汤镇,曾丹. 亲环素 A 的相关研究进展 [J]. *检验医学与临床*, 2016,13(4): 556-559.
- [5] Pasetto L, Pozzi S, Castelnovo M, et al. Targeting Extracellular Cyclophilin A Reduces Neuroinflammation and Extends Survival in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(6): 1413-1427.
- [6] Bjørklund G, Stejskal V, Urbina MA, et al. Metals and Parkinson's disease: Mechanisms and biochemical processes [J]. *Curr Med Chem*, 2017. [Epub ahead of print]
- [7] 王莹雪,卞育婕,周玉奇,等. 帕金森病动物模型神经炎症反应与损伤的研究进展 [J]. *神经解剖学杂志*, 2017, 33(1): 90-94.
- [8] Lee DS, Kwon KH, Cheong SH. Taurine Chloramine Suppresses LPS-Induced Neuroinflammatory Responses through Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 Expression in Mouse BV2 Microglial Cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 975: 131-143.
- [9] Tsai SF, Hsieh CC, Wu MJ, et al. Novel findings of secreted cyclophilin A in diabetic nephropathy and its association with renal protection of dipeptidyl peptidase 4 inhibitor [J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 463: 181-192.
- [10] Xue C, Sowden M, Berk BC. Extracellular Cyclophilin A, Especially Acetylated, Causes Pulmonary Hypertension by Stimulating Endothelial Apoptosis, Redox Stress, and Inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(6): 1138-1146.
- [11] Zhang M, Tang J, Yin J, et al. The clinical implication of serum cyclophilin A in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018, 13: 357-363.
- [12] Heinzmann D, Bangert A, Müller AM, et al. The Novel Extracellular Cyclophilin A (CyPA) - Inhibitor MM284 Reduces Myocardial Inflammation and Remodeling in a Mouse Model of Troponin I - Induced Myocarditis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124606.
- [13] Li W, Liu W, Chen C, et al. Effect of extracellular cyclophilin A on inflammatory response and anti-inflammatory activity of antibody against cyclophilin A [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2018, 34(1): 90-101.
- [14] Sun S, Guo M, Zhang JB, et al. Cyclophilin A (CypA) interacts with NF- κ B subunit, p65/RelA, and contributes to NF- κ B activation signaling [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e96211.