



电子、语音版

·论著·

帕金森病患者血清中Toll样受体4及下游炎症因子的高表达与临床分期及分型的关系研究

郭清华¹, 郭彦杰², 宋净洋², 左书茜¹, 刘梦豪¹, 邢红霞², 李超堃³

1. 新乡医学院第一附属医院, 河南 卫辉 453100

2. 新乡医学院第三附属医院, 河南 新乡 453000

3. 新乡医学院, 河南 新乡 453000

摘要:目的 检测Toll样受体4(TLR4)及白介素6(IL-6)、白介素1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)在帕金森病(PD)患者血清中的表达,探讨TLR4及下游炎症因子与PD发生发展的关系。方法 选取2019年9月至2020年9月于新乡医学院第一附属医院神经内科门诊和病房就诊的原发性PD患者60例(PD组),以及同期在该院体检健康者60例(对照组)。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测其血清TLR4蛋白及IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平,并分析其与PD患者Hoehn-Yahr分期和临床分型的关系。结果 PD组外周血清TLR4水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);下游炎症因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平高于对照组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。PD分期越高,TLR4、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 的表达越高。震颤为主型、强直少动型和混合型PD患者TLR4、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 TLR4及其下游炎症因子的高表达与PD的发生发展和分期密切相关,对PD发病机制的研究具有重要意义。 [国际神经病学神经外科学杂志, 2022, 49(3): 41-45.]

关键词:帕金森病;Toll样受体4;白介素6;白介素1 β ;肿瘤坏死因子 α

中图分类号:R742.5

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2022.03.008

Association of the high expression of serum Toll-like receptor 4 and downstream inflammatory factors with clinical staging and typing in patients with Parkinson's disease

GUO Qing-Hua¹, GUO Yan-Jie², SONG Jing-Yang², ZUO Shu-Qian¹, LIU Meng-Hao¹, XING Hong-Xia², LI Chao-Kun³

1. The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical university, Weihui, Henan 453100, China

2. The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical university, Xinxiang, Henan 453000, China

3. Xinxiang Medical university, Xinxiang, Henan 453000, China

Corresponding author: XING Hong-Xia, Email: xhxwh02@163.com; LI Chao-Kun, Email: lichaokun@hotmail.com

Abstract: **Objective** To investigate the association of Toll-like receptor 4 (TLR4) and downstream inflammatory factors with the development and progression of Parkinson's disease (PD) by measuring the expression of TLR4, interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum of patients with PD. **Methods** A total of 60 patients with primary PD who were treated at the outpatient service and ward of Department of Neurology in The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College from September 2019 to September 2020 were enrolled as PD group, and 60

基金项目:河南省科技攻关项目基金(182102310156);河南省医学科技攻关计划省部共建项目基金(SBGJ202002095);河南省医学科技攻关计划联合共建项目基金(LHGJ20210548)。

收稿日期:2021-12-17;**修回日期:**2022-05-07

作者简介:郭清华(1994—),女,神经内科住院医师,硕士在读,主要从事脑血管病及神经变性疾病的研究。

通信作者:邢红霞(1972—),女,教授,主任医师,硕士生导师,主要从事脑血管病及神经变性疾病的研究。Email:xhxwh02@163.com。

李超堃(1978—),男,副教授,医学博士,硕士生导师,研究方向:线粒体功能与脑损伤机制。Email:lichaokun@hotmail.com。

individuals who underwent physical examination in this hospital during the same period of time were enrolled as control group. ELISA was used to measure the serum levels of TLR4, IL-6, IL-1 β , and TNF- α , and their association with the Hoehn-Yahr staging and clinical typing of PD patients was analyzed. **Results** Compared with the control group, the PD group had significantly higher serum levels of TLR4 and the downstream inflammatory factors IL-6, IL-1 β , and TNF- α in peripheral blood (all $P < 0.05$). The patients with higher PD stages tended to have higher expression levels of TLR4, IL-6, IL-1 β , and TNF- α . There were no significant differences in the expression of TLR4, IL-6, IL-1 β , and TNF- α between the patients with tremor-dominant, akinetic-rigid, and mixed subtypes of PD ($P > 0.05$). **Conclusions** The high expression of TLR4 and its downstream inflammatory factors is closely associated with the development, progression, and staging of PD, which is of great significance for the research on the pathogenesis of PD.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2022, 49(3): 41–45.]

Keywords: Parkinson's disease; Toll-like receptor 4; interleukin-6; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中老年常见神经系统变性疾病之一,主要临床症状包括静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势平衡障碍等^[1],其最典型的病理特征是黑质致密部多巴胺能神经元进行性死亡和突触前蛋白的聚集及路易小体的形成^[2]。PD的发病机制目前尚不清楚,研究表明神经炎症参与了PD患者和动物模型的病理过程^[3],神经炎症被认为是PD发病的关键因素^[4]。Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)是一种模式识别受体,在检测到外源生物和内源性损伤相关分子上的特定分子模式后,介导炎症反应。这些受体在激活小胶质细胞(中枢神经系统的先天免疫细胞)中起主要作用,也在人外周组织中表达,包括血液和肠道^[5]。TLR4为TLR中的一种类型。有研究表明,TLR4在PD患者肠道中过表达,TLR4可能参与PD的发生及发展^[6]。本研究通过检测PD患者血清中TLR4及下游炎症因子的表达,来探究其与PD发生发展的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2019年9月至2020年9月于新乡医学院第一附属医院神经内科门诊和病房就诊的原发性PD患者60例(PD组)。PD的诊断标准采用英国脑库诊断标准^[7]。

采用1:1配对对照组,选择60例健康对照者,均来自健康体检中心,性别年龄与PD患者相匹配,且实验室检查结果均正常。

所有PD患者及健康对照者需严格排除感染、局部炎症反应等,入组时近期均无感染及自身免疫疾病病史。

PD组:男性32例,女性28例;年龄40~74岁,平均(62.5 \pm 8.6)岁。对照组:男性26例,女性34例;年龄45~83岁,平均(61.2 \pm 6.10)岁。PD组与对照组相比,性别、年龄方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。具有可比性。

本实验通过新乡医学院第一附属医院医学伦理委员会批准(伦理编号:2019027)。所有实验参与者均已签署知情同意书。

1.2 PD患者分型

根据PD患者运动症状和统一PD评估量表第三部分(Unified Parkinsons Disease Rating Scale-III, UPDRS-III)评分,依据Kang^[8]等提出的分型方法将PD患者分为震颤为主型(tremor dominant PD, TD-PD)、强直少动型(rigidity dominant PD, AR-PD)、混合型。

计算每位患者运动震颤评分:肢体的动作性或姿势性震颤评分;面部及四肢的静止性震颤评分。计算运动不能或强直评分:手掌运动实验评分;手指拍打实验评分;前臂回旋运动实验评分;站立平衡实验评分;身体动作迟缓评分;脚趾拍地运动实验评分;颈部和四肢的强直评分。

每个项目的评分为0~4,0表示无症状(或正常活动);4表示有明显症状或损伤。依据每位患者的UPDRS-III震颤评分(项目20、21的总分除以4)与运动不能或强直评分(项目22~27、31的总分除以15)的比值来定义运动亚型。比值 < 0.90 被分为AR-PD组,比值 > 1.5 则归入TD-PD组。

1.3 PD患者分期

采用Hoehn-Yahr分级量表进行PD分期:0期=无症状;1期=单侧疾病;2期=双侧疾病,无平衡障碍;3期=轻~中度双侧疾病,某种姿势不稳,独立生活;4期=严重残疾,仍可独自行走或站立;5期=无帮助时只能坐轮椅或卧床。

1.4 TLR4及下游炎症因子的检测

所有PD患者和健康对照者在禁食12 h后,采集外周静脉血2 mL。血液样本在室温下保存30 min,离心20 min,收集上清液。所有血清样本均保存在 -80°C 以备后续实验。采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清TLR4蛋白及白介素6(interleukin-6, IL-6)、白介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)因子的表达。

人TLR4 ELISA试剂盒(MSK, 中国武汉,批号:

kt99182);人IL-6 ELISA试剂盒(联科,批号:70-EK106)、人IL-1 β ELISA试剂盒(联科,批号:70-EK101B)、人TNF- α ELISA试剂盒(联科,批号:70-EK182)。

根据标准曲线用曲线拟合方程计算蛋白质含量,x轴为标准浓度,y轴为每个标准浓度对应的OD值。蛋白质含量在整篇论文中都以ng/L为单位。

1.5 统计学方法

使用SPSS 25.0软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位数 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示。符合正态分布的计量资料,两组间比较采用独立样本 t 检验;若其中一组或非符合正态分布的计量资料,两组间比较采用非参数检验或Mann-Whitney检验。多组间比较采用单因素方差分析或Kruskal-Wallis检验;多组间两两比较采用LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PD组的分型和分期

PD组患者的UPDRS-III评分为(31.66 \pm 14.88)分。I期17例(28.3%)、II期27例(45%)、III期8例(13.3%)、IV期3例(5%)、V期5例(8.3%)。

2.2 PD组和对照组血清TLR4及下游炎症因子水平比较

PD组外周血清TLR4水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);下游炎症因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 PD组与健康对照组血清TLR4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平比较 (ng/L)

组别	例数	TLR4($\bar{x}\pm s$)	IL-6 $[M(P_{25}, P_{75})]$	IL-1 β ($\bar{x}\pm s$)	TNF- α ($\bar{x}\pm s$)
PD组	60	2.53 \pm 0.78	4.51(3.37~9.85)	2.52 \pm 1.20	70.13 \pm 7.69
对照组	60	2.04 \pm 0.50	3.87(1.59~4.38)	1.84 \pm 1.66	57.90 \pm 5.58
t 值		2.191	2.174	2.132	4.089
P 值		<0.026	<0.023	<0.017	<0.001

2.3 不同分期PD患者血清TLR4及下游炎症因子水平比较

I、II、III、IV、V期PD患者之间血清TLR4水平比较,差异有统计学意义($P<0.001$)。I、II、III、IV、V期PD患者之间血清IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平比较,差异均有统计学意义($P<0.001$)。血清TLR4、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 表达随PD分期的增加而增加。见表2。

表2 不同分期PD患者血清TLR4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平比较 (ng/L, $\bar{x}\pm s$)

分期	例数	TLR4	IL-6	IL-1 β	TNF- α
I	17	2.00 \pm 0.13	1.20 \pm 0.29	1.18 \pm 0.32	62.28 \pm 2.04
II	27	2.20 \pm 0.04	1.74 \pm 0.16	1.71 \pm 0.18 ^①	66.20 \pm 1.17 ^①
III	8	2.26 \pm 0.01	2.76 \pm 0.76 ^{①②}	2.57 \pm 0.27 ^{①②}	69.24 \pm 1.19 ^{①②}
IV	3	2.56 \pm 0.24 ^{①②③⑤}	3.82 \pm 1.05 ^{①②③}	3.36 \pm 0.18 ^{①②③}	72.98 \pm 1.68 ^{①②③}
V	5	4.61 \pm 0.24 ^{①②③④}	7.34 \pm 0.36 ^{①②③④}	4.61 \pm 0.50 ^{①②③④}	77.03 \pm 0.77 ^{①②③④}
F 值		92.910	35.430	87.310	45.000
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①与I期比较, $P<0.05$;②与II期比较, $P<0.05$;③与III期比较, $P<0.05$;④与IV期比较, $P<0.05$ 。

2.4 PD患者血清TLR4及下游炎症因子水平与临床分型的关系

PD患者的临床分型为TD-PD型(30例)、AR-PD型

(22例)、混合型(8例)。PD患者血清TLR4、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平在3种分型间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表3 不同分型PD患者血清TLR4、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平比较 (ng/L)

分型	例数	TLR4($\bar{x}\pm s$)	IL-6 $[M(P_{25}, P_{75})]$	IL-1 β ($\bar{x}\pm s$)	TNF- α ($\bar{x}\pm s$)
混合型	8	2.32 \pm 0.20	2.03(1.59, 2.92)	2.57 \pm 0.87	70.53 \pm 7.32
TD-PD型	30	2.87 \pm 1.03	2.35(1.54, 6.27)	2.22 \pm 1.12	72.60 \pm 9.61
AR-PD型	22	2.13 \pm 0.19	2.93(2.19, 3.71)	2.59 \pm 1.30	66.44 \pm 3.48
F 值		1.842	0.293	0.252	1.317
P 值		0.193	0.749	0.780	0.294

3 讨论

PD是仅次于阿尔兹海默病的第二大神经系统退行性疾病,以中脑黑质多巴胺能神经元的选择性变性、多巴胺耗竭、黑质纹状体通路受损为特征^[1]。PD的症状,除了静止性震颤、肌强直、运动迟缓等,还包括了嗅觉下降、睡眠障碍、认知功能障碍等非运动症状,其致残率及致死率均较高,严重影响患者的生活^[9]。

目前认为,神经退行性疾病的发病机制主要有中枢神经系统内的氧化应激、细胞毒性、炎症反应、蛋白异常累积、铁死亡等^[10-11]。目前的研究已经证实,神经炎症在PD的发生发展中产生了重要的影响,如PD的多巴胺能神经元的进行性退化最近被认为与炎症反应有关;从神经细胞或少突胶质细胞释放的错误折叠的 α -核突触蛋白(alpha-nuclear synapsin, α -syn)可以被小胶质细胞TLR4识别^[12],激活下游炎症因子,从而促进炎症和氧化应激,导致神经退行性变。另有研究在PD患者的脑实质和脑脊液中也发现了TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、转化生长因子 α 等炎症因子的显著升高^[13]。

引起神经炎症的方式有很多,其中TLR主要参与非特异性免疫,是非特异性免疫与特异性免疫之间的重要桥梁,并能够识别来自微生物的带有高度保守结构的小分子。当细菌攻破人类机体的自然物理保护屏障,如肌肤、黏膜等时,TLR能够认识,并刺激人类机体产生形成免疫应答^[14]。TLR4表达于肠道和免疫相关细胞,以及小胶质细胞、星形胶质细胞和神经元上,主要与细菌脂多糖以及其他微生物和宿主分子结合。结合后,TLR4激活NF- κ B信号传导以触发下游促炎细胞因子释放,在先天免疫防御、小胶质细胞激活和神经退行性变中发挥重要作用。有文献指出在动物实验中,TLR4敲除小鼠中的鱼藤酮治疗显示较少的肠道炎症,相对于野生型小鼠而言,肠道运动功能障碍、脑神经炎症和神经变性均较轻微^[15]。有研究表明 α -syn寡聚体使TLR4受体敏感,而TLR4拮抗剂可减轻 α -syn诱导的炎症^[16]。人体和动物肠道均存在大量的革兰阴性菌,革兰阴性菌的产物(细菌内毒素)可以激活TLR4启动下游炎症反应过程,促进PD患者肠道和脑部的炎症和氧化应激^[17]。这表明TLR4可能在PD的发生、发展中发挥着重要的作用。

本研究检测了TLR4及其下游炎症因子在60例PD患者和60例健康对照组中的表达,并探讨了其与PD分期、PD临床分型的关系。实验结果表明,PD患者血清TLR4、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 的表达高于健康志愿者,提示TLR4及下游炎症因子在PD发病中起重要作用,这与Yang等^[18]的研究相一致。为探究其与临床分型的关系,本实验将TLR4、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 的表达与PD分期进行分析,实验结果表明,随PD分期的增加,TLR4、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 的表达增加。PD分期越高,病情越严重,提示

TLR4及下游炎症因子的持续高表达可能与PD的进展相关。产生这样结果的原因可能是TLR4的激活促进相应的炎症因子释放,引起神经炎症,从而加速神经退行性变。此外,有研究表明TLR4可与 α -syn相互作用,触发小胶质细胞反应,包括 α -syn摄取、促炎性细胞因子释放和氧化应激促进^[19],这些研究的结果在MPTP诱导的PD鼠模型中得到了证实^[20]。根据PD患者主要临床表现,将其分为AR-PD、TD-PD及混合型。本实验将TLR4、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 的表达与临床分型进行分析,结果表明,TLR4及下游炎症因子与PD临床分型无显著性差异。这可能与本研究样本量较小有关,未来应进一步扩大样本量进行分析。

在本研究中,我们发现TLR4及其下游炎症因子在PD患者中高表达,其与PD的分期密切相关。TLR4及其下游信号炎症因子的高表达促进了神经炎症的发生发展,这可能是PD进展的重要因素之一。TLR4有望为PD的临床治疗提供新的靶点,具有重要的科学意义和临床应用前景。

参 考 文 献

- [1] RABIEI Z, SOLATI K, AMINI-KHOEI H. Phytotherapy in treatment of Parkinson's disease: a review[J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 355-362.
- [2] ZENG XS, GENG WS, JIA JJ, et al. Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 109.
- [3] DAUER W, PRZEDBORSKI S. Parkinson's disease: mechanisms and models[J]. *Neuron*, 2003, 39(6): 889-909.
- [4] GELDERS G, BAEKELANDT V, PERREN AVAN DER. Linking neuroinflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 4784268.
- [5] KOULI A, HORNE CB, WILLIAMS-GRAY CH. Toll-like receptors and their therapeutic potential in Parkinson's disease and α -synucleinopathies[J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 81: 41-51.
- [6] LAWRIMORE CJ, CREWS FT. Ethanol, TLR3, and TLR4 agonists have unique innate immune responses in neuron-like SH-SY5Y and microglia-like BV2[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2017, 41(5): 939-954.
- [7] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1992, 55(3): 181-184.
- [8] KANG GA, BRONSTEIN JM, MASTERMAN DL, et al. Clinical characteristics in early Parkinson's disease in a central California population-based study[J]. *Mov Disord*, 2005, 20(9): 1133-1142.
- [9] TITOVA N, QAMAR MA, CHAUDHURI KR. The nonmotor features of Parkinson's disease[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2017, 132: 33-54.

- [10] HO MS. Microglia in Parkinson's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1175: 335-353.
- [11] 王梦笛,王洪财. 铁死亡—多巴胺—神经黑色素调控轴在帕金森病中的作用[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2021, 48(6): 564-566.
- [12] NALBANDIAN A, KHAN AA, SRIVASTAVA R, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome is associated with valosin-containing protein myopathy[J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 21-41.
- [13] NAGATSU T, MOGI M, ICHINOSE H, et al. Cytokines in Parkinson's disease[J]. *J Neural Transm Suppl*, 2000(58): 143-151.
- [14] CAPUTI V, GIRON MC. Microbiome-gut-brain axis and toll-like receptors in Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1689.
- [15] PEREZ-PARDO P, DODIYA HB, ENGEN PA, et al. Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice[J]. *Gut*, 2019, 68(5): 829-843.
- [16] HUGHES CD, CHOI ML, RYTEN M, et al. Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson's disease pathogenesis[J]. *Acta Neuropathol*, 2019, 137(1): 103-120.
- [17] MANCUSO C, SANTANGELO R. Alzheimer's disease and gut microbiota modifications: the long way between preclinical studies and clinical evidence[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 129: 329-336.
- [18] YANG Y, HAN CY, GUO L, et al. High expression of the HMGB1-TLR4 axis and its downstream signaling factors in patients with Parkinson's disease and the relationship of pathological staging[J]. *Brain Behav*, 2018, 8(4): e00948.
- [19] KALIA LV, LANG AE. Parkinson's disease[J]. *Lancet*, 2015, 386(9996): 896-912.
- [20] RIETDIJK CD, WEZEL RJAVAN, GARSSSEN J, et al. Neuronal toll-like receptors and neuro-immunity in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and stroke[J]. *Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2016, 3: 27-37.

责任编辑:龚学民