

·论著·

血清神经来源外泌体 miR-221、miR-214 与帕金森病
认知障碍的相关性

于慧娟, 刘锡荣, 古力加乃提·麦麦吐逊

喀什地区第一人民医院神经内二科, 新疆 喀什 844000

摘要:目的 探讨血清神经来源外泌体 miR-221、miR-214 与帕金森病(PD)认知障碍的相关性。方法 纳入 150 例 PD 患者(PD 组)、100 例健康体检者(对照组), PD 组根据认知障碍程度分为正常组(PD-N 组)、轻度障碍组(PD-MCI 组)、痴呆组(PD-D 组)。采用实时荧光定量 PCR 检测外泌体 miR-221、miR-214 表达水平;分析两者表达与帕金森综合评分(UPDRS)、蒙特利尔认知评估(MoCA)的相关性;绘制 ROC 曲线分析两者表达对 PD 认知障碍的预测价值。结果 PD 组血清神经来源外泌体 miR-221、miR-214 表达水平均低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。PD-N 组外泌体 miR-221、miR-214 表达水平较 PD-MCI、PD-D 组高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。PD 患者外泌体 miR-221、miR-214 表达水平均与 UPDRS 评分呈负相关、与 MoCA 评分呈正相关($P < 0.05$)。外泌体 miR-221、miR-214 表达水平及两者联合预测 PD 认知障碍的 ROC 曲线下面积分别为 0.700、0.714、0.794($P < 0.05$)。结论 PD 患者血清神经来源外泌体 miR-221、miR-214 表达水平下调;与 PD 病情及认知障碍严重程度相关;两者联合检测对 PD 认知障碍具有一定预测价值。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(2): 110-114]

关键词: 帕金森病; 认知障碍; 外泌体 miR-221; 外泌体 miR-214; 相关性

中图分类号: 742.5

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.02.002

Correlation of serum nerve-derived exosomes miR-221 and miR-214 with cognitive impairment in Parkinson's disease

YU Hui-Juan, LIU Xi-Rong, Gulijianaiti·Maimaituxun

Second Department of Neurology, The First People's Hospital of Kashi Prefecture, Kashi Prefecture, Xinjiang 844000, China

Corresponding author: YU Hui-Juan, Email: m17114512924@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the correlation of serum nerve-derived exosomes miR-221 and miR-214 with cognitive impairment in Parkinson's disease (PD). **Methods** A total of 150 patients with PD were enrolled as PD group and 100 healthy individuals who underwent physical examination were enrolled as control group. According to the degree of cognitive impairment, the PD group was divided into normal group (PD-N group), mild cognitive impairment group (PD-MCI group), and dementia group (PD-D group). Quantitative real-time PCR was used to measure the expression levels of the exosomes miR-221 and miR-214; a Pearson correlation analysis was used to investigate the correlation of the expression of miR-221 and miR-214 with the scores of Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) and Montreal Cognitive Assessment (MoCA); the receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted to analyze the value of the expression of miR-221 and miR-214 in predicting cognitive impairment in PD. **Results** The PD group had significantly lower expression levels of the serum nerve-derived exosomes miR-221 and miR-214 than the control group ($P < 0.05$). The PD-N group had significantly higher expression levels of miR-221 and miR-214 than the PD-MCI group and the PD-D group ($P < 0.05$). The expression levels of miR-221 and miR-214 were negatively correlated with UPDRS score and were positively correlated with MoCA score in PD patients ($P < 0.05$). The expression level of miR-221 or miR-214 alone or in combination had an area un-

收稿日期: 2020-08-10; 修回日期: 2021-01-18

作者简介: 于慧娟(1983-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 神经内科临床。Email: m17114512924@163.com。

der the ROC curve of 0.700, 0.714, and 0.794, respectively, in predicting cognitive impairment in PD ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression levels of the serum nerve-derived exosomes miR-221 and miR-214 are downregulated in PD patients and are correlated with the condition of PD and the severity of cognitive impairment. Combined measurement of miR-221 and miR-214 has a certain value in predicting cognitive impairment in PD.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(2): 110-114]

Keywords: Parkinson's disease; cognitive impairment; exosome miR-221; exosome miR-214; correlation

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是以肌肉僵直、静止震颤、步态改变为主要表现的常见神经变性病,随着病情进展可引起自主神经功能、睡眠、感觉、认知等多方面障碍^[1]。其中认知障碍在PD中十分常见,其发生不仅增加患者痛苦、影响生存质量,也给家庭乃至社会带来沉重压力,但当前临床缺乏对PD认知障碍的早期识别,使得患者治疗延误^[2]。外泌体作为一种重要的细胞间信号转导载体,具有蛋白、脂质、DNA、miRNA等多种检测靶点,其携带的miRNA可参与细胞增殖、分化、凋亡等多个病理、生理过程,因其具有分泌选择性、高稳定性及易检测性特征,被认为在神经变性病、心血管疾病等多种疾病诊断中具有潜在应用价值^[3-4]。本研究重点分析血清神经来源外泌体miR-221、miR-214在PD患者中表达及与患者认知障碍相关性,为临床PD认知障碍早期识别及干预提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

通过简单随机抽样法纳入2017年1月—2019年12月喀什地区第一人民医院门诊或住院的PD患者150例(PD组)。根据认知障碍程度^[6-7],分为正常组(PD-N组)、轻度障碍组(PD-MCI组)、痴呆组(PD-D组)。另选择同期100例健康体检者为对照组。

纳入标准:①符合中国帕金森病诊断标准(2016版)^[5]中PD诊断;②年龄55~85岁;③小学及以上受教育水平;④患者及家属签署知情同意。

排除标准:①合并其他中枢神经系统疾病;②存在严重心血管疾病、恶性肿瘤、重要脏器功能不全、血液系统疾病;③伴听力、视力或表达障碍;④既往神经病史;⑤酒精、药物滥用史;⑥无法获得配合。

本研究经喀什地区第一人民医院医学伦理委员会批准(批准文号:20170126)。

1.2 研究方法

1.2.1 血清神经来源外泌体提取 采取免疫沉淀法,主要步骤如下:①采集外周静脉血5 mL,室温静置10 min,于4℃下离心(2500 r/min)15 min,提取上清液0.5 mL分装到1.5 mL EP管,于-80℃保存。②取出样本快速解冻后,加入0.15 mL促凝血酶原激活酶-D于室温下溶解,室温下静置60 min。③加入含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂混合物的无钙、无镁DBS⁻²液0.35 mL。④4℃下离心(3000 r/min)

20 min,弃沉淀物。⑤取上清液加入ExoQuick试剂0.25 mL,4℃下培育1 h。⑥4℃下离心(1500 r/min)30 min后,保留沉淀(即外泌体),沉淀加入含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂DBS⁻²液0.35 mL。⑦加入L1细胞黏附分子(L1CAM)生物素化抗体2 μL,再加3%的牛血清蛋白(BSA)50 μL,于4℃条件下静置1 h后,加入链霉素和素琼脂糖25 μL,再加3%的BSA 50 μL,4℃条件下静置30 min。⑧4℃下离心(400 r/min)10 min,去上清液、留沉淀,沉淀加0.05 mmol/L的甘氨酸-盐酸(pH 3.0)50 μL,涡流10 s。⑨新悬浮的外泌体微粒于-80℃保存。

1.2.2 外泌体鉴定 采用透射电子显微镜观察外泌体形态,蛋白免疫印迹法(Western blotting)鉴定表面标志物。

1.2.3 外泌体miRNA提取 采用mirVana RNA Isolation Kit试剂(上海艾博思生物科技有限公司)从外泌体样本中提取RNA,严格按试剂盒操作,检测并分离miR-221、miR-214。

1.2.4 miRNA逆转录 建立15 μL逆转录体系(日本TAKARA公司)获得逆转录产物cDNA,包括1.5 μL 10×RT缓冲液、0.15 μL 100 mmol/L dNTP、1 μL 50 u/μL逆转录酶、4.16 μL焦炭酸二乙酯水、5 μL miRNA、3 μL 10 μmol/L miRNA-21反转录茎环引物(上海英骏公司)。RT体系冰上孵育5 min后,放入Gene Amp PCR System 9700(美国ABI公司),反应条件16℃、42℃、85℃分别30 min、30 min、5 min,逆转录产物于-20℃下保存。

1.2.5 PCR扩增与检测 采用TaqMan Pri-miRNA Assays(美国Invitrogen公司)建立20 μL反应体系,包括12.15 μL DEPC水、4 μL缓冲液、10 μmol/L miRNA-21正向、反向引物(上海英骏公司)各0.6 μL、0.4 μL 10 μmol/L TaqMan MGB探针、2 μL逆转录产物、0.25 μL 50×ROX。采用实时荧光定量PCR仪(美国ABI QuantStudio5型),扩增条件:95℃ 30 s,1个循环;95℃ 5 s、60℃ 34 s,40个循环;采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量分析miRNA-221、miR-214表达水平。

1.2.6 量表评估 帕金森综合评分量表(Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS)^[8]内容包括精神、行为和情绪,日常生活能力,运动检查3个部分,共31项内容,均采用0~4分5级评分,总得分越高,病情越严重。蒙特利尔认知评估量表(Montreal Cognitive

Assessment, MoCA)^[9]包括8个认知领域共11项内容,总分30分,得分越低,意味着认知功能越差。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计学处理和分析。正态分布计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较行独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间进一步两两比较采取LSD- t 法。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。相关性分析采用Pearson相关分析法;绘制ROC曲线分析外泌体miRNA-221、miR-214表达水平对PD认知障碍预测价值。 $P < 0.05$ 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组与对照组性别、年龄、体重指数、文化程度、合并基础疾病比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 PD组与对照组一般资料比较

项目	PD组 (n=150)	对照组 (n=100)	χ^2/t 值	P值
性别(男/女)/例	85/65	57/43	0.003	0.958
年龄/岁	73.84±6.96	74.29±5.38	0.401	0.527
体重指数/(kg/m ²)	23.14±2.92	22.89±2.59	0.964	0.338
文化程度例(%)				
初中及以下	71(47.33)	46(46.00)	0.654	0.721
中学及中专	52(34.67)	39(39.00)	—	—
大专及以上	27(18.00)	15(15.00)	—	—
基础疾病例(%)				
合并糖尿病	29(19.33)	16(16.00)	0.452	0.502
合并高血压	35(23.33)	21(21.00)	0.188	0.665
UPDRS评分/分	36.42±4.46	—	—	—
MoCA评分/分	24.37±5.09	—	—	—

2.2 PD组与对照组外泌体miR-221、miR-214表达水平比较

PD组血清神经来源外泌体miR-221、miR-214表达水平平均低于对照组($P < 0.05$)。见表2。

表2 PD组与对照组外泌体miR-221、miR-214表达水平比较

组别	例数	miR-221	miR-214
PD组	150	21.15±7.48	23.23±7.26
对照组	100	35.95±5.62	32.36±5.34
t 值		15.337	10.827
P 值		<0.001	<0.001

2.3 不同认知障碍程度PD患者外泌体miR-221、miR-214表达水平比较

不同认知障碍程度PD患者外泌体miR-221、miR-214表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),表现为PD-

N组>PD-MCI组>PD-D组($P < 0.05$)。见表3。

表3 不同认知障碍程度PD患者外泌体miR-221、miR-214表达水平比较

组别	例数	miR-221	miR-214
PD-N组	77	24.26±8.09	25.88±6.84
PD-MCI组	43	20.20±7.34 ^①	22.74±6.42 ^①
PD-D组	30	14.49±4.52 ^{①②}	17.13±4.35 ^{①②}
F 值		20.223	21.406
P 值		<0.001	<0.001

注:①与PD-N组比较, $P < 0.05$;②与PD-MCI组比较, $P < 0.05$

2.4 PD患者外泌体miR-221、miR-214表达水平与临床评分相关性

Pearson相关性分析显示,PD患者外泌体miR-221、miR-214表达水平均与UPDRS评分呈负相关、与MoCA评分呈正相关($P < 0.05$)。见表4。

表4 PD患者外泌体miR-221、miR-214表达水平与UPDRS、MoCA评分相关性

项目	UPDRS评分		MoCA评分	
	r 值	P 值	r 值	P 值
miR-221	-0.514	0.007	0.628	<0.001
miR-214	-0.492	0.009	0.571	<0.001

2.5 外泌体miR-221、miR-214表达水平对PD认知障碍的预测价值

以外泌体miR-221、miR-214表达水平为检验变量,以是否合并认知障碍为状态变量,绘制ROC曲线,结果显示,外泌体miR-221、miR-214表达水平及两者联合预测PD患者合并认知障碍的ROC曲线下面积分别为0.700、0.714、0.794($P < 0.05$),其中miR-221最佳截断值为18.62,对应敏感度、特异度分别为0.558、0.795;miR-214最佳截断值为23.60,对应敏感度、特异度分别为0.701、0.644。见图1、表5。

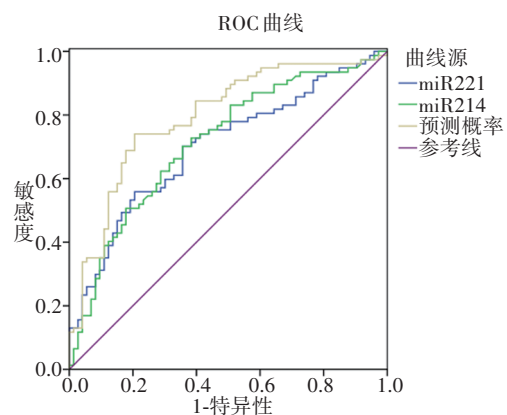


图1 外泌体miR-221、miR-214水平预测PD认知障碍的ROC曲线

表5 外泌体 miR-221、miR-214 水平预测 PD 认知障碍的 ROC 曲线下面积

指标	AUC	标准误	P 值	95%CI		Cut-off 值	敏感度	特异度
				下限	上限			
miR-221	0.700	0.043	<0.001	0.616	0.784	18.62	0.558	0.795
miR-214	0.714	0.042	<0.001	0.632	0.797	23.60	0.701	0.644
两者联合	0.794	0.037	<0.001	0.721	0.867	—	—	—

3 讨论

有数据显示,30%~60%的PD患者可合并有不同程度的认知功能障碍,其中30%以上PD患者最终可发展成帕金森痴呆^[10]。当前,PD认知障碍病因学机制并未完全阐明,一般认为和PD特征性神经病理学变化及多巴胺、5-羟色胺、乙酰胆碱等神经递质失衡有关^[11]。目前并无确切有效措施逆转PD认知功能障碍进展,早期干预是关键,但PD患者早期认知障碍表现并不明显,且临床缺乏早期识别意识,寻找有效的早期指征以指导干预是研究重点。

神经组织表达的miRNA种类丰富、组织特异性明显,当miRNA表达失衡时,可导致相应特异性蛋白表达失衡,进而参与神经系统疾病^[12]。外泌体因体积小可从中枢神经系统透过血脑屏障进入血液循环,其可携带致病状态下表达的失调或疾病特异性miRNA,而这类miRNA在外泌体保护下能免受细胞核糖核酸酶降解,故神经来源外泌体miRNA在神经系统疾病诊疗中良好应用前景^[13]。miRNA-221位于人染色体Xpl1.3区带,其表达与神经胶质瘤、多种恶性肿瘤及炎症性疾病有关,目前在PD中表达也受到重视^[14]。miRNA-214位于人1号染色体q24.3的DNM3基因中,其首次在宫颈癌HeLa细胞凋亡中发现,后来被证实可参与神经系统、骨骼、肌肉等细胞增长、分化及形态变化等过程,发挥多项生理功能^[15]。

本研究发现,PD患者血清神经来源外泌体miR-221、miR-214表达明显较健康人群下调,提示miR-221、miR-214表达可能参与PD发生。有研究指出^[16], α -突触核蛋白(α -synuclein, SNCA)作为路易小体主要成分,其异常聚集可引起氧化损伤、多巴胺神经元大量凋亡等病理变化,是PD病理核心所在,而miR-221、miR-214、miRNA-153、miRNA-141等多种miRNA可参与SNCA调控,这类miRNA表达下调可能是SNCA过量表达的重要原因。本研究进一步分析发现,miR-221、miR-214在合并PD-MCI或PD-D患者中表达水平较无认知障碍者更低,提示miR-221、miR-214下调可能参与PD认知障碍进程。有研究指出^[17],PD患者多存在皮质小脑微血管受损、脑白质结构改变,且认知功能损害严重者,这些变化更加明显。还有研究发现^[18],内皮细胞自噬失衡是引起血管微血管病变的重要过程,其调节受多个信号通路影响,而miR-221可通过调控PTEN/Akt信号通路来调节内皮细胞自噬,当神经组织miR-221表达下调后,PTEN表达可升高,抑制Akt

磷酸化,造成自噬作用增强,进而介导脑微血管损伤,而脑微血管受损与腔隙性脑梗死、神经胶质增生、脑白质病变等关联密切,最后可通过破坏长联络纤维、额叶-皮质下联络通路导致认知功能障碍发生。上述研究或许可解释PD认知功能障碍越严重者miR-221表达越低。研究表明^[19],海马神经元凋亡、兴奋性突触传递异常与认知障碍发生关联密切。而miR-214有抑制海马神经元自噬及凋亡、控制神经突向外生长、调控神经元分化等作用,其表达下调后,这些作用随之减弱^[20]。或可解释本文认知功能障碍严重者miR-221表达更低这一结果。冷利发^[21]的研究指出,过量的组织蛋白酶B(cathepsin B, CTSB)参与了神经系统炎症反应、SNCA寡聚物生成、多巴胺能神经元活力抑制等过程,在PD发生发展中占重要地位,而miR-214经酶切后形成的重要转录物miR-214-3p可通过与CTSB基因结合,下调CTSB蛋白表达,进而削弱其作用。当miR-214表达下调后,其重要转录物miR-214-3p也下调,对CTSB蛋白抑制作用减弱,可能也与PD认知障碍进程有关。

本研究还发现,PD患者外泌体miR-221、miR-214表达水平均与UPDRS评分呈负相关、与MoCA评分呈正相关,进一步提示miR-221、miR-214表达与PD病情严重程度、认知障碍程度有相关性。此外,外泌体miR-221、miR-214水平及两者联合预测PD患者合并认知障碍的ROC曲线下面积分别为0.700、0.714、0.794,提示联合miR-221、miR-214检测对PD患者认知障碍有一定预测价值,这一研究结果或可为PD患者外泌体miRNA靶向治疗及PD早期认知障碍识别带来契机。

综上所述,血清神经来源外泌体miR-221、miR-214在PD患者表达水平下调,且随着认知障碍越严重,其表达水平越低,联合两者检测对PD认知障碍识别有一定预测价值,值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] 王库良,禹红梅,罗晓光,等. 帕金森患者的血压特点及其机制的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2020, 47(1): 103-106.
- [2] 吕晓,卢晓东. 高同型半胱氨酸血症与帕金森病患者认知功能的相关性分析[J]. 中华全科医学, 2019, 17(1): 83-86.
- [3] 吴月容,谷有全. 帕金森病的诊断新进展[J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26(3): 374-376, 380.
- [4] 马文彬. 帕金森病血清miRNA生物标记物的研究[D]. 济

- 南:山东大学, 2017.
- [5] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组, 中国医师协会神经内科医师分会帕金森病及运动障碍专业. 中国帕金森病的诊断标准(2016版)[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(4): 268-271.
 - [6] 邹海强, 马敬红. 帕金森病轻度认知功能障碍的诊断标准: 运动障碍协会工作组指南[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(19): 6013-6017.
 - [7] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组, 中华医学会神经病学分会神经心理学与行为神经病学组. 帕金森病痴呆的诊断与治疗指南[J]. 中华神经科杂志, 2011, 44(9): 635-637.
 - [8] 蔡雪峰, 欧小凡, 黄宗文, 等. 参芪胶囊联合多奈哌齐治疗帕金森的疗效及对脑神经递质和神经营养因子含量水平的影响[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(1): 170-174.
 - [9] 李晓鹏, 赵鹏, 钱进. 尿酸水平与初诊帕金森病轻度认知功能障碍相关性研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13(11): 544-547.
 - [10] 官俏兵, 沈和平, 俞晓翔, 等. 血清中神经来源外泌体 Mi-croRNA-211-5p 与帕金森病认知障碍的相关性及诊断意义[J]. 中华老年医学杂志, 2020, 39(4): 413-417.
 - [11] 马春潮, 朱晓冬. 帕金森病认知障碍[J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(9): 769-774.
 - [12] 陈欣雅, 季秋虹. 外泌体在神经退行性病变中的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2017, 34(2): 191-192.
 - [13] 徐子茜, 焦玲. 帕金森病认知障碍相关生物学指标的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(4): 374-376.
 - [14] 白家赫, 郑亚利, 于永鹏. 外泌体及其 microRNA 与帕金森病相关研究进展[J]. 临床医学进展, 2019, 9(5): 650-656.
 - [15] Ma WB, Li YY, Wang C, et al. Serum miR-221 serves as a biomarker for Parkinson's disease[J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(7): 511-515.
 - [16] 王艳, 赵然尊, 陈攀科, 等. 微小 RNA-214 改善高糖诱导的 H9c2 细胞焦亡的机制探讨[J]. 中华心血管病杂志, 2019, 47(10): 820-828.
 - [17] Koros C, Stamelou M, Simitsi A, et al. Selective cognitive impairment and hyposmia in p.A53T SNCA PD vs typical PD[J]. Neurology, 2018, 90(10): e864-e869.
 - [18] 梁海云, 王良, 杜秀兰, 等. 帕金森病患者血清外泌体与脑白质结构改变和认知功能损害的关联性研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(4): 312-316.
 - [19] 李罗成. 外泌体 miR-221/222 对内皮细胞自噬和凋亡的调控作用及机制研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2016.
 - [20] 琚静美. 海马神经元兴奋性突触传递异常在慢性间歇低氧诱导小鼠认知障碍中的作用探讨[D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
 - [21] 冷利发. MiR-214-3p 调控胶质细胞 CTSS 蛋白影响多巴胺能神经元活力的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.

责任编辑: 龚学民