

• 临床研究 •

血浆外泌体中铁蛋白和转铁蛋白受体水平与帕金森病相关性研究

福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院神经内科 (福州 350001) 赵振华 潘楚锥 雷丽平 汪银洲¹

【摘要】 目的 探讨血浆外泌体中铁蛋白和转铁蛋白水平与帕金森病之间的关系。**方法** 收集 2019 年 10 月至 2021 年 10 月就诊于福建省立医院的 60 例 PD 患者,同时纳入 60 例健康对照组,抽取两组受试者血浆,提取血浆中的外泌体,采用 ELISA 方法对 PD 患者和对照组的血浆外泌体中的铁蛋白和转铁蛋白受体进行定量分析,分析以上指标与帕金森的病程及 Hoehn-Yahr (H-Y) 分级的相关性。**结果** PD 患者血浆外泌体中铁蛋白水平较对照组明显升高 [(246.87 ± 139.61) ng/ μ g vs. (447.97 ± 222.85) ng/ μ g, $P < 0.01$], 血浆外泌体中的转铁蛋白受体水平与对照组之间差异无统计学意义 [$(1\ 217.18 \pm 540.54)$ ng/ μ g vs. $(1\ 236.32 \pm 389.26)$ ng/ μ g, $P = 0.824$]。PD 患者血浆外泌体中铁蛋白及转铁蛋白受体水平与 PD 患者的 H-Y 分级无明显相关性 (P 分别为 0.966 和 0.453)。PD 患者的病程与血浆外泌体中的铁蛋白或 TfR 水平的相关性分析,差异均无统计学意义 (P 分别为 0.263 或 0.414)。**结论** 外周铁代谢紊乱可能参与了 PD 发生,但与疾病进展关系尚不明确,外泌体中铁蛋白可能成为帕金森病的外周血生物标志物。

【关键词】 帕金森病; 外泌体; 铁蛋白; 转铁蛋白受体

【中图分类号】 R713 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2023)03-0001-04

The relationship between ferritin and transferrin receptor levels in plasma exosomes and Parkinson's disease

ZHAO Zhenhua, PAN Chuzhui, LEI Liping, WANG Yinzhou. Department of Neurology, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the levels of ferritin and transferrin in plasma exosomes and Parkinson's disease. **Methods** A total of 60 patients with PD in Fujian Provincial Hospital from October 2019 to October 2021 were collected, and 60 healthy controls were enrolled at the same time. The plasma of the two groups was extracted and the exosomes were extracted. The ferritin and transferrin receptors in the plasma exosomes of PD patients and the control group were quantitatively analyzed by ELISA. The correlation between the above indexes, the course of Parkinson's disease and the H-Y stage was analyzed. **Results** Compared with the control group, the level of ferritin in the plasma exosomes of PD patients was significantly higher [(246.87 ± 139.61) ng/ μ g vs. (447.97 ± 222.85) ng/ μ g, $P < 0.01$], and there was no significant difference in the level of transferrin receptor between the two groups [$(1\ 217.18 \pm 540.54)$ ng/ μ g vs. $(1\ 236.32 \pm 389.26)$ ng/ μ g, $P = 0.824$]. There was no significant correlation between the level of ferritin and transferrin receptor in the plasma exosomes and the course of disease or H-Y stage of PD patients ($P = 0.966$ and 0.263 , respectively). There was no significant correlation between the duration of PD and the levels of ferritin or TfR in plasma exosomes ($P = 0.263$ and 0.414 , respectively). **Conclusion** The disorder of peripheral iron metabolism may be involved in the occurrence of PD, but the relationship between ferritin and disease progression is not clear. Ferritin in plasma exosomes may be a biomarker of Parkinson's disease.

【Key words】 Parkinson's disease; exosomes; ferritin; transferrin receptor

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种以锥体外系运动症状为主要表现的第二大神经退行性疾病。该病特异性病理表现在经典临床表现出现之前已经出现,PD 运动症状直到近 60% 的多巴胺神经元死亡才明显出现^[1]。由于早期缺乏合适的疾病生物标志物和明显的临床症状,早期 PD 容易被

误诊。因此,寻找适用于早期诊断的生物标记物仍然是研究的热点。研究认为脑脊液可作为获得 PD 生物标志物的准确可靠的来源^[2]。然而脑脊液样本的采集是一个繁琐的过程,血液是临床应用中更可行的生物标志物的来源^[3]。外泌体含有蛋白质和细胞来源的其他成分,中枢神经系统的外泌体可以通

基金项目:福建省自然科学基金项目 (2019J01502)

¹ 通信作者, Email: wphd@163.com

过血脑屏障进入外周,将蛋白质从神经元转移到脑脊液或进入外周血,这些蛋白质成分可能包含过量有毒或不溶性结构分子,如与 PD 发病相关的 α -突触核蛋白^[4]。但 PD 患者血浆外泌体中铁蛋白和转铁蛋白的水平尚不明确。在本研究中,我们从血浆中提取外泌体,检测了血浆外泌体中铁蛋白和转铁蛋白受体 (Transferrin Receptor, TfR) 水平,评估它们与 PD 潜在的关联,并评估它们作为该疾病的生物标志物的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料:选择 2019 年 10 月至 2021 年 10 月,我科招募的 60 例 PD 患者。所有 PD 患者均符合国际运动障碍学会的帕金森病临床诊断标准^[5]。健康对照组为患者的丈夫或妻子,或健康的社区志愿者。对照组的个体无神经系统疾病的迹象或症状。排除标准:1) 肿瘤;2) 特发性震颤、继发性帕金森病或帕金森叠加综合征;3) 严重颅脑创伤;4) 存在外周或者中枢神经系统炎症,传染性或自身免疫性疾病;5) 严重系统性疾病,如贫血、肝病、心力衰竭、肺部疾病和慢性肾功能衰竭;6) 其他神经退行性疾病。PD 组男 32 例,女 28 例,年龄 42~84 (64.5 ± 10.2) 岁;对照组男 33 例,女 27 例,年龄 40~80 (62.1 ± 9.7) 岁。两组性别、年龄差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。PD 组,病程 0.5~13 (4.3 ± 3.2) 年, Hoehn-Yahr (H-Y) 分级 1~5 (2.6 ± 1.2) 级。本研究经福建省立医院伦理委员会批准。实验室的工作人员和统计分析师都不知晓任何临床资料和分组信息。所有研究对象均签署知情同意书。所有 PD 组和对照组都接受了包括病史、体格检查、神经系统查体、实验室测试和神经心理评估在内的一系列评估。实验室评价包括血液常规参数、血清电解质、血尿素氮、肌酐、空腹血糖、维生素 B₁₂ 和促甲状腺激素,所有研究对象的上述实验室结果均为正常结果。所有 PD 患者均采用 H-Y 分级进行评估,并收集患者的病程。本研究纳入研究对象后,于上午空腹采集外周静脉血 5 mL,2 000 g 室温离心 20 min,上清即为血浆,分装保存于 -80 °C。

1.2 方法:

1.2.1 血浆外泌体的分离:根据说明书,采用血浆总外泌体分离试剂盒 (Invitrogen, 美国) 分离血浆外泌体。取冻存的样品,25~37 °C 水浴完全化冻后,室温,2 000 g,离心 20 min,吸取上清,

将上清室温,10 000 g,离心 20 min,取 300 μ L 上清加入 150 μ L PBS 缓冲液,涡旋混匀后,加入 90 μ L 的提取试剂涡旋,室温静置 10 min 后,室温,10 000g,离心 5 min,去除上清,加入 100 μ L PBS 溶解。加入 100 μ L 的含有蛋白酶抑制剂的 0.2% Triton X-100 的 PBS 缓冲液,室温静置 5 min。分装后保存于 -80 °C。

1.2.2 透射电子纤维镜:将提取的外泌体置于 2.5% 戊二醛中,在 4 °C 固定 2 h。样品在 0.1 M PBS 缓冲液中洗涤,并在 1% 的四氧化锇溶液中 4 °C 固定 2 h。将样品在梯度浓度的酒精 (50%、70%、90% 和 100%, 重复 3 次) 中脱水 10 min,然后分别用酒精:环氧丙烷 (1:1) 和环氧丙烷在室温下渗透 10 min。样品包埋在 Quetol-812 环氧树脂中,在 40 °C 聚合 2 h,60 °C 聚合 4 h,80 °C 聚合 10 h。用 UC6 超微切片机 (Leica, 德国) 切割超薄切片,然后在室温下用醋酸铀染色 15 min。结果在 120 kV 的 Tecnai Spirit 透射电子显微镜 (FEI, 美国) 中观察。

1.2.3 外泌体蛋白的铁蛋白和 TfR 的 ELISA 定量分析:采用二喹啉甲酸法进行的血浆外泌体的总蛋白定量结果作为内参。根据试剂盒说明书,应用人铁蛋白和 TfR 的 ELISA 试剂盒 (R&D 公司,美国) 对血浆外泌体中的铁蛋白和 TfR 水平进行定量检测,并重复检测 2 次,目标蛋白水平 = ELISA 检测结果的平均值/外泌体的总蛋白浓度。

1.3 统计学分析:在本研究中,使用 SPSS 26.0 进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用独立样本 t 检验;两组百分率的比较采用 χ^2 检验。采用 Pearson 相关性分析来评估病程和 H-Y 分级的相关性、铁蛋白及 TfR 水平与病程和 H-Y 分级的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血浆外泌体中的铁蛋白和 TfR 的比较:提取的外泌体经醋酸铀负染,透射电子显微镜下拍照,显示外泌体表现典型的双侧膜结构,茶托状,直径在 100 nm 左右 (图 1)。裂解外泌体后,ELISA 检测外泌体中的铁蛋白和 TfR 浓度,结果显示 PD 组血浆外泌体中的铁蛋白水平高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),PD 组血浆外泌体中的 TfR 水平和对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

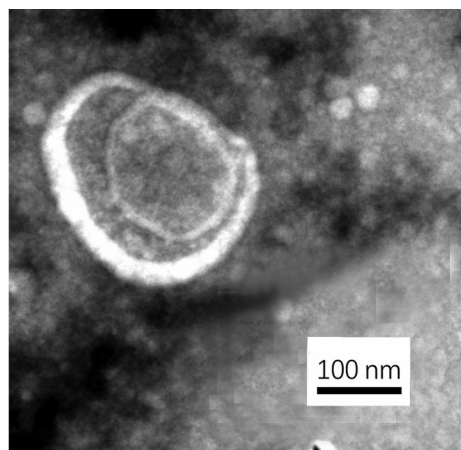


图 1 透射电子显微镜的外泌体典型图示

表 1 两组受试者血浆外泌体中的铁蛋白和 TfR 的比较 (ng/μg, $\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	PD 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
铁蛋白	246.87±139.61	447.97±222.85	5.924	<0.01
TfR	1 217.18±540.54	1 236.32±389.26	0.223	0.824

2.2 PD 组疾病严重程度与血浆外泌体中的铁蛋白和 TfR 水平的相关性分析: PD 组患者的 H-Y 分期与血浆外泌体中的铁蛋白和 TfR 水平无明显相关性 (*P* 分别为 0.966 和 0.453)。PD 组患者的病程与血浆外泌体中的铁蛋白或 TfR 水平的相关性分析, 差异均无统计学意义 (*P* 分别为 0.263 和 0.414)。

3 讨论

铁的异常代谢目前被认为是 PD 的发病机制之一。当体内铁浓度超过转铁蛋白的转运能力时, 过量的铁使新陈代谢中的氧化还原过程产生羟基自由基^[6], 这些自由基可能引起细胞损伤、脂质过氧化、线粒体功能障碍、慢性炎症、α 突触核蛋白的沉积等病理性改变^[7-8]。PD 患者的尸检发现了黑质铁沉积的增多^[9], 并且 PD 患者黑质中铁沉积的增多与其运动症状的严重程度具有相关性^[10]。同时铁沉积还参与了多系统萎缩等其他突触核蛋白病的发生发展^[11-12]。

研究表明, 铁蛋白的细胞外分泌主要通过两条非经典蛋白分泌途径实现, 外泌体途径是铁蛋白细胞外分泌的方式之一^[13]。鉴于外泌体在细胞间信号传递和代谢交换的重要作用^[14], 外泌体中的铁蛋白可能不仅仅参与了细胞内铁贮存, 还可能参与了细胞间、组织甚至全身的铁分布有别于血浆中的可溶性铁蛋白, 外泌体中的铁蛋白受到外泌体脂质双层膜的屏蔽, 不容易受到外周环境的影响, 可能

可以更好地反映体内铁代谢的情况。

目前, 对于血清中铁蛋白与 PD 的关系研究仍不明确。一项纳入了 27 项研究的荟萃分析显示, PD 患者和对照组的血清/血浆铁蛋白水平相似, 其中涉及 2 006 例 PD 患者和 2 098 例对照组^[15]。然而, 另一项针对铁蛋白荟萃研究的结论则与之相悖, Wei 等^[16]纳入分析了 8 项研究, 共 635 名 PD 患者和 444 名对照, 结果显示 PD 组的血清/血浆铁蛋白水平显著升高。尽管 Wei 等的荟萃分析中纳入的研究数量和对照组数量与本研究存在较大差异, 但两项研究在 PD 患者和对照组中观察到的血清转铁蛋白水平相似。本研究从血浆中提取外泌体, 通过 ELISA 检测了血浆外泌体中铁蛋白水平, 与对照组相比, PD 患者血浆外泌体中铁蛋白水平明显升高, PD 患者血浆外泌体中铁蛋白水平与 PD 患者的病程及 H-Y 分期无明显相关性。

研究发现, 毒素诱导的神经变性与 DA 神经元内转铁蛋白 (Tf) 水平的进行性升高和氧化有关, 这种增加与铁沉积是平行的, 细胞内转铁蛋白的水平反映了其受体介导的转运水平^[17-18]。最新研究发现, 铁蛋白与 TfR 结合后, 会通过脑内皮细胞的转胞吞作用穿过血脑屏障, 而不会被阻断在溶酶体之中^[19]。研究认为铁蛋白和转铁蛋白能够降低细胞内铁水平, 而转铁蛋白是通过与位于细胞膜上的 TfR 结合, 将细胞外铁转运到细胞内, 提高细胞内铁水平, 对维持细胞铁稳态具有重要作用^[20]。有研究发现在小鼠的心肌细胞中高铁可以诱导 TfR 的高表达, 从而在铁死亡的多个通路中发挥作用^[21]。在正电子发射断层扫描研究中发现, 与健康对照组相比, PD 患者的脑铁摄取更高, TfR 形成增加^[22]。与铁摄取有关的 TfR 的丢失, 导致神经元缺铁、部分多巴胺能神经元的年龄进行性退化和运动障碍^[23]。健康动物的血液中含有大量的 TfR 阳性外泌体^[24]; 但缺乏人的脑脊液和血浆中 TfR 水平的研究, 尚未有研究表明人的血浆外泌体中是否存在转铁蛋白受体阳性。本研究从血浆中提取外泌体, 通过 ELISA 检测了血浆外泌体中 TfR 水平, 与对照组相比, PD 患者血浆外泌体中 TfR 水平与对照组之间差异无统计学意义。

综上所述, 笔者认为 PD 患者血浆外泌体中铁蛋白水平明显升高, 可能成为潜在的 PD 生物标志物。本研究也存在一些局限性, 将来还需要扩大样本量进一步研究。

参考文献

- [1] Berardelli A, Wenning G K, Antonini A, et al. EFNS/MDS-ES/ENS [corrected] recommendations for the diagnosis of Parkinson's disease [J]. *Eur J Neurol*, 2013, 20 (1): 16-34.
- [2] Farotti L, Paciotti S, Tasegian A, et al. Discovery, validation and optimization of cerebrospinal fluid biomarkers for use in Parkinson's disease [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017, 17 (8): 771-780.
- [3] Mehta S H, Adler C H. Advances in biomarker research in Parkinson's disease [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2016, 16 (1): 7.
- [4] Zhao Z H, Chen Z T, Zhou R L, et al. Increased DJ-1 and α -synuclein in plasma neural-derived exosomes as potential markers for Parkinson's Disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 10: 438.
- [5] Postuma Ronald B, Berg D, Stern M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease [J]. *Movement Disorders*, 2015, 30 (12): 1591-1599.
- [6] Youdim M B, Riederer P. The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease [J]. *J Neural Transm suppl*, 1993, 40: 57-67.
- [7] Gutteridge J M. Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration [J]. *Ann N Y Acad sci*, 1994, 738: 201-213.
- [8] Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim-Moussa B H, et al. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2011, 118 (6): 939-957.
- [9] Griffiths P D, Dobson B R, Jones G R, et al. Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease. An in vitro study using extended x. ray absorption fine structure and cryo. electron microscopy [J]. *Brain*, 1999, 122 (Pt 4): 667-673.
- [10] An H, Zeng X, Niu T, et al. Quantifying iron deposition within the substantia nigra of Parkinson's disease by quantitative susceptibility mapping [J]. *J Neurol sci*, 2018, 386: 46, 52.
- [11] Dicson D W, Lin W, Liu W K. Multiple system atrophy: a sporadic synucleinopathy [J]. *Brain Pathol*, 1999, 9 (4): 721-732.
- [12] Galvin J E, Giasson B, Hurtig H I, et al. Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha-, beta-, and gamma-synuclein neuropathology [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157 (2): 361-368.
- [13] Truman-Rosentsvit M, Berenbaum D, Spektor L, et al. Ferritin is secreted via 2 distinct nonclassical vesicular pathways [J]. *Blood*, 2018, 131 (3): 342-352.
- [14] Goetzl E J, Boxer A, Schwartz J B, et al. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2015, 85 (1): 40-47.
- [15] Jiménez-Jiménez F J, Alonso-Navarro H, García-Martín E, et al. Biological fluid levels of iron and iron-related proteins in Parkinson's disease: Review and meta-analysis [J]. *Eur J Neurol*, 2021, 28 (3): 1041-1055.
- [16] Wei Z, Li X, Li X, et al. Oxidative stress in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 236.
- [17] Wallace D F, Summerville L, Crampton E M, et al. Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload [J]. *Hepatology*, 2009, 50 (6): 1992-2000.
- [18] Wallace D F, Summerville L, Subramaniam V N. Targeted disruption of the hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132 (1): 301-310.
- [19] Fan K, Jia X, Zhou M, et al. Ferritin Nanocarrier Traverses the Blood Brain Barrier and Kills Glioma [J]. *Acs Nano*, 2018, 12 (5): 4105-4115.
- [20] Jiang L, Wang J, Wang K, et al. RNF217 regulates iron homeostasis through its E3 ubiquitin ligase activity by modulating ferroportin degradation [J]. *Blood*, 2021, 138 (8): 689-705.
- [21] 杨岚婷, 徐涛, 杨福情, 等. 转铁蛋白受体对铁过载所致大鼠心肌细胞铁死亡的作用及其机制 [J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47 (8): 781-788.
- [22] Cabrera-Valdivia F, Jiménez-Jiménez F J, Molina J A, et al. Peripheral iron metabolism in patients with Parkinson's disease [J]. *J Neurol Sci*, 1994, 125 (1): 82-86.
- [23] Matak P, Matak A, Moustafa S, et al. Disrupted iron homeostasis causes dopaminergic neurodegeneration in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (13): 3428-3435.
- [24] Usman W M, Pham T C, Kwok Y Y, et al. Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 2359.