

# 帕金森病患者结肠黏膜磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白的检测及其临床意义

朱琳<sup>1</sup>, 张佳敏<sup>2</sup>, 张慧<sup>1</sup>, 李霄<sup>3</sup>, 汤琪云<sup>4</sup>, 张克忠<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院神经内科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京师范大学美术学院, 江苏 南京 210029; <sup>3</sup>南京医科大学第一附属医院病理科, <sup>4</sup>消化科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:探讨磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白(phosphorylated  $\alpha$ -synuclein, pSNCA)在帕金森病便秘(PD patients with constipation, PDC)患者结肠黏膜中的表达及其与非运动症状的关系。方法:将10例PDC患者及10例性别、年龄匹配的功能性便秘(functional constipation, FC)患者纳入研究,进行临床资料及非运动症状的评估。通过内镜活检获取每位受试者升、降结肠黏膜组织各2块,用免疫组织化学技术染色并评估pSNCA和神经元标志物-神经丝蛋白(NF)的表达,并进行共定位。最后进行pSNCA与非运动症状之间的相关性分析以探索非运动症状的发生机制。结果:所有PDC患者结肠黏膜均表达pSNCA(10/10),对照组阳性率90%(9/10),两组阳性率差异无统计学意义;但两组pSNCA的表达量差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且PDC组更为显著;PDC患者的pSNCA表达量与H-Y分期存在相关性( $r = -0.59, P < 0.05$ ),而与病程、UPDRS III评分、LEDD无关,便秘严重程度与UPDRS III评分存在相关性( $r = 0.67, P < 0.05$ )。此外,患者非运动症状(包括焦虑、抑郁、睡眠障碍、疲劳、便秘)的严重程度与肠道pSNCA的沉积无关。结论:pSNCA的沉积可能参与便秘以及帕金森病的发生发展,但与帕金森病的非运动症状无关。

**[关键词]** 帕金森病;便秘;磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白;神经丝蛋白;结肠黏膜

**[中图分类号]** R742.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)08-1095-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20180816

## Detection of colonic mucosal phosphorylated $\alpha$ -synuclein in patients with Parkinson's disease and its clinical significance

Zhu Lin<sup>1</sup>, Zhang Jiamin<sup>2</sup>, Zhang Hui<sup>1</sup>, Li Xiao<sup>3</sup>, Tang Qiyun<sup>4</sup>, Zhang Kezhong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>School of Fine Arts Nanjing Normal University, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Department of Pathology, <sup>4</sup>Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of phosphorylated  $\alpha$ -synuclein (pSNCA) in colonic mucosa of Parkinson's disease (PD) patients with constipation and its relationship with non-motor symptoms. **Methods:** Ten constipated patients with PD (PDC) and 10 gender- and age-matched patients with functional constipation (FC) were enrolled in this study, and the clinical data and non-motor symptoms were evaluated. Two specimens of ascending and descending colonic mucosa were obtained from each subject by endoscopic biopsy. pSNCA and neurofilament protein (NF) were stained by immunohistochemistry and colocalized. Finally, the correlation between pSNCA and non-motor symptoms was conducted to explore the mechanism of non-motor symptoms in PD. **Results:** All PDC patients displayed pSNCA (10/10) in the colonic mucosa and 90% (9/10) in the control group, with no significant difference between the two groups. However, there was a statistically significant difference between the two groups in the expression of pSNCA ( $P < 0.05$ ), and the PDC group was more significant. The level of pSNCA in PDC patients was related to H-Y stage ( $r = -0.59, P < 0.05$ ), but not with disease duration, UPDRS-III score and LEDD. The severity of constipation in PD was associated with UPDRS-III score ( $r = 0.67, P < 0.05$ ). In addition, the severity of non-motor symptoms (including anxiety, depression, sleep disturbances, fatigue, constipation) in patients was not related to the deposition of pSNCA in the intestine. **Conclusion:** The deposition of pSNCA may be involved in the development of constipation and Parkinson's disease, but not correlate with the non-motor symptoms of Parkinson's disease.

**[Key words]** Parkinson's disease; constipation; phosphorylated  $\alpha$ -synuclein; neurofilament; colonic mucosa

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08):1095-1101]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81671258);江苏省卫生计生委科技项目(H201602);江苏省自然科学基金(BK20141494)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: kezhong\_zhang1969@126.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是临床常见的神经变性病,至今病因不明。其诊断金标准是患者脑黑质神经元胞体内存在路易氏小体(Lewy bodies, LBs),LBs富含异常聚集的 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn)。磷酸化机制是调节 $\alpha$ -syn蛋白特性和生理功能的重要分子开关,且丝氨酸129(serine129, ser129)的磷酸化是 $\alpha$ -syn病理修饰的主要形式<sup>[1]</sup>。研究发现共核蛋白病患者脑中90%的 $\alpha$ -syn发生了ser129磷酸化,转变成了磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白(phosphorylated  $\alpha$ -synuclein, pSNCA)<sup>[2]</sup>,因此pSNCA可能会为研究PD的发病机制提供突破性契机。近年来虽然分子遗传学技术及影像技术的进展提高了PD的诊断水平,但早期诊断仍然面临很大挑战。

近来研究表明PD并不局限于大脑,还影响外周自主神经网络,尤其是肠道神经系统,甚至认为其起源于肠道。从活体患者获取肠道组织相对于脑组织容易得多;并且与皮肤和唾液腺相比,肠道组织含有更为密集的神经元网络以及节后神经节神经元突起。目前,大多数研究集中于肠道黏膜下层和肌层<sup>[3-4]</sup>,主要是因为这两处神经网络较黏膜更为密集;但在活体内,黏膜层因为损伤小、操作安全性高而更为实用。相关调查表明,PD患者便秘的患病率可高达70%,且其出现早于运动症状20余年<sup>[5]</sup>。但是,PD便秘的相关机制还不明确;许多神经病理学研究表明大多数PD患者肠内神经元存在LBs<sup>[4,6]</sup>,但其是否与便秘的存在相关还未知。目前,对PD胃肠道的研究仍很受关注<sup>[7-8]</sup>,这对阐明PD肠道损害的机制和开展PD的早期诊断具有重大意义。

迄今为止,在活体内研究PD肠黏膜相关病理的研究结果不太一致<sup>[7,9-10]</sup>。本研究通过免疫组织化学法评估PD患者及便秘对照患者肠道黏膜中pSNCA的表达,并分析其表达是否与便秘的存在有关,以探索pSNCA的表达对于PD早期诊断是否具有特异性。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选择2017年2—6月在南京医科大学第一附属医院神经内科门诊就诊明确诊断为帕金森病便秘(PD patients with constipation, PDC)的患者10例及我院消化内科门诊就诊的功能性便秘(functional constipation, FC)患者10例作为对照。

PDC组入组标准:①符合英国帕金森病协会脑库临床诊断标准<sup>[11]</sup>;②便秘症状满足罗马Ⅲ诊断标

准<sup>[12]</sup>;③无创伤性脑损伤史、脑肿瘤、其他神经系统疾病;④活检前1周末服用抗凝药物和抗血小板药物;⑤无肠道活检禁忌证;⑥排除其他肠道疾病;⑦认知功能得分(MMSE评分)>24分。对照组入组标准:①未被诊断过帕金森病、其他神经或精神疾病;②FC诊断符合罗马Ⅲ诊断标准;③~⑦同上述。本研究项目获南京医科大学第一附属医院伦理委员会审批(批号:2017-SR-093),且所有患者均签署了知情同意书。随访1年以上,以进一步明确诊断。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 临床资料

患者最初的临床诊断由1名运动障碍疾病专家评估。对所有纳入患者进行临床资料收集,同时对PDC患者进行统一帕金森病评定量表第3部分(the unified Parkinson's disease rating scale Ⅲ, UPDRS Ⅲ)、Hoehn-Yahr(H-Y)分期、左旋多巴每日等效剂量(levodopa-equivalent daily dose, LEDD)、汉密尔顿抑郁量表(the Hamilton depression scale, HAMD)、汉密尔顿焦虑量表(the Hamilton anxiety rating scale, HAMA)、简易智能精神状态检查量表(the mini mental state examination, MMSE)、帕金森病睡眠量表(Parkinson's disease sleepiness scale, PDSS)、疲劳严重程度量表(fatigue severity scale, FSS)、便秘严重程度自评量表(patient assessment of constipation symptoms, PAC-SYM)等资料评估。经检验,PAC-SYM具有良好的信效度<sup>[13]</sup>,此量表包含12项,每项0~5分(0分:不存在;5分:非常严重)。此量表基于3项症状:腹部症状、大便情况以及直肠症状,用以评估过去2周内便秘症状的严重程度。所有PD患者在来访期间均处于“关期”——停止服用抗帕金森病药物至少12h。

#### 1.2.2 结肠内镜活检

根据消化内科内镜处的标准程序进行结肠镜检查及活检。使用标准活检钳(MTN-BF-23/16-A;南京Micro-tech公司)进行活组织检查,每位受试者升结肠和降结肠分别取2块黏膜组织。其中1例PDC患者由于其降结肠水肿,为防止出血,仅取了升结肠组织。共分析了10例PDC患者的19个切片,10例对照者的20个切片。

#### 1.2.3 免疫组织化学染色

获取的黏膜组织立即用10%中性福尔马林溶液固定,随后分别进行升结肠和降结肠组织的石蜡包埋,所剩样本在-80℃的冰箱中保存。石蜡块用切片机进行连续切片,断面厚度为4  $\mu$ m。实验过

程:首先将样本石蜡块进行脱蜡并透化,随后置于柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中,使用高压抗原修复法进行抗原修复2 min。然后用血清封闭以降低背景染色。使用小鼠单克隆抗 ser129 磷酸化 $\alpha$ -syn 抗体(pSNCA)以及神经元标记物——神经丝 200 kDa 抗体(NF)对切片进行孵育,将切片置于4℃过夜。第2天进行常规免疫组化及免疫荧光共定位:①常规免疫组化程序:一抗 pSNCA(1:800, code pSyn#64, Wako 公司,日本),NF(1:500, MAB5256, CA52590, Millipore 公司,美国),第2天 PBS 冲洗3遍后,切片用生物素化的山羊抗小鼠 IgG(1:400, 北京 ZSGB-BIO 公司)孵育45 min;洗涤3次后,再用缀合辣根过氧化物酶的抗生物素蛋白-生物素复合物溶液孵育20 min;免疫反应物用3,3'-二氨基联苯胺(DAB, D5637, Sigma 公司,德国)显色,反应物为棕色;以 PBS 代替一抗作为阴性对照。切片用苏木精复染。②免疫荧光程序:一抗 pSNCA 抗体(1:800)、NF 抗体(1:800),第2天 PBS 洗片3 min×3次后,在暗处进行后续操作,滴加适宜浓度的荧光二抗,湿盒中孵育1 h;PBS 浸洗3次后,滴加 DAPI 避光孵育5 min,对标本进行染核,PBS 5 min×4次洗去多余的 DAPI;用吸水纸吸干片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

#### 1.2.4 图片处理

使用配有数码相机(Leica 公司,德国)的光学显微镜(DM4000B, Leica 公司,德国)观察切片。图像由2名专业研究人员进行双盲处理和分析。结果判定参考 Dieleman 等<sup>[14]</sup>的方法加以改进。每个切片中阳性产物所占面积百分比的评分如下:1分:1%~25%;2分:26%~50%;3分:51%~75%;4分:76%~100%。染色强度以多数阳性细胞呈现的染色特征为标准计分:0分:无着色;1分:淡黄色;2分:棕黄色;3分:棕褐色。染色强度分数与阳性产物所占面积百分比计分之和记为总分:≤1分:阴性;1~4分:弱阳性;≥4分:强阳性。

#### 1.3 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件进行分析。计量资料中正态分布数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用两样本 *t* 检验进行分析;非正态分布数据用中位数(四分位数)[ $M(Q_{25}, Q_{75})$ ]描述,采用独立样本 Mann-Whitney U 检验进行分析;计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用卡方检验。采用 Pearson、Spearman 相关分析 pSNCA 表达量、PDC 严重程度与 UPDRS III 等临床因素之间的相关性。 $P \leq 0.05$

为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床资料

PDC 组共 10 例,其中男 4 例,女 6 例,年龄 47~77 岁,平均(63.60 ± 8.33)岁;FC 组 10 例,其中男 3 例,女 7 例,年龄 54~83 岁,平均(62.10 ± 9.01)岁。两组年龄、性别差异均无统计学意义;PDC 组中 H-Y 分期平均为 1.6 期,其中 1 期 4 例,1.5 期 3 例,2 期 2 例,3 期 1 例,帕金森病病程、UPDRS III 评分、LEDD、HAMA 评分、HAMD 评分、PDSS 评分、FSS 评分、PAC-SYM 评分等见表 1。所有受试者在结肠镜检查期间或之后没有发生并发症。

### 2.2 肠黏膜 NF 的表达

通过神经元标志物 NF 评估黏膜中神经元的存在。NF 的免疫阳性产物在所有受试者的肠黏膜中均有发现(图 1 B, D)。

### 2.3 神经元细胞胞浆中 pSNCA 的表达

升结肠或降结肠任一黏膜样本显示 pSNCA 免疫染色阳性的即考虑该受试者为阳性。pSNCA 免疫阳性产物表达的形态多种多样,通常分散地分布在黏膜固有层内。颗粒状是最常见的,偶尔可见丝状染色物围绕在肠腺周围。此外,弥漫性细胞质染色的细胞,其分布常常靠近肠上皮层(图 2C),此类细胞由 Gray 等<sup>[15]</sup>证实为巨噬细胞。荧光共定位显示,pSNCA 表达于神经元细胞的胞浆中(图 3)。在结肠活检样本中,100%(10/10)PDC 患者和 90%(9/10)FC 患者发现 pSNCA 免疫染色阳性,两组阳性率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 2)。pSNCA 的表达量个体间差异较大(图 2)。

免疫组化半定量分析显示 PDC 组 pSNCA 表达量显著高于 FC 组,差异具有统计学意义( $P=0.043$ ,表 2,图 1)。随后,两组之间又分别进行了升、降结肠 pSNCA 表达量的比较,结果显示差异无统计学意义(表 2)。

### 2.4 PDC 组 pSNCA 的表达与患者非运动症状之间的相关性

采用线性相关分析显示,PDC 患者 pSNCA 的表达量仅与 H-Y 分期存在显著相关性( $r=-0.59, P=0.042$ ),而与帕金森病的病程、UPDRS III 评分、LEDD 无明显相关性。此外,患者非运动症状(包括焦虑、抑郁、睡眠、疲劳、便秘严重程度)的表达与肠道 pSNCA 的沉积无关。

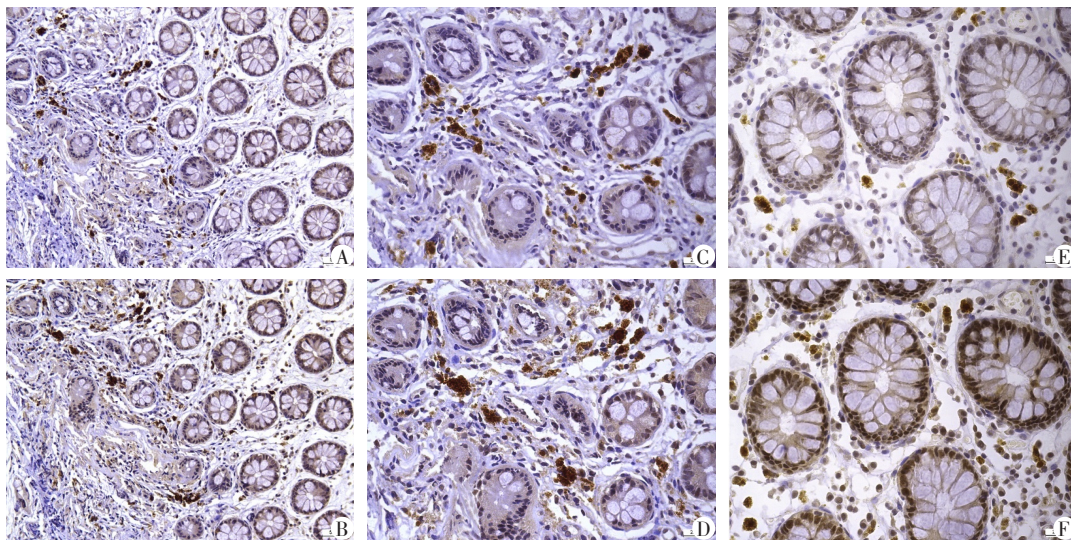
研究发现大部分来自便秘患者的结肠标本存



表1 PDC组与FC组临床资料的比较

Table 1 Comparison of clinical characteristics between PDC patients and FC patients ( $\bar{x} \pm s$ )

临床资料	PDC组	FC组	统计量	P值
性别(男/女)	4/6	3/7	—	1.000
年龄(岁)	63.6 ± 8.3	62.1 ± 9.0	0.387	0.704
PD病程[年, $M(Q_{25}, Q_{75})$ ]	4.2(0.5, 8.5)	—	—	—
Hoehn-Yahr分期[期, $M(Q_{25}, Q_{75})$ ]	1.6(1.0, 2.0)	—	—	—
UPDRS-III评分(分)	22.0 ± 11.7	—	—	—
LEDD(mg/d)	596 ± 335	—	—	—
PAC-SYM评分[分, $M(Q_{25}, Q_{75})$ ]	13.0(9.3, 15.3)	6.0(3.8, 9.3)	2.700	0.015
HAMA评分(分)	10.3 ± 6.9	—	—	—
HAMD评分(分)	4.9 ± 3.6	—	—	—
PDSS评分[分, $M(Q_{25}, Q_{75})$ ]	11.5(6.8, 30.5)	—	—	—
FSS评分(分)	26.0 ± 14.5	—	—	—



A、C、E: pSNCA的表达; B、D、F: NF的表达; A、B、C、D的低倍镜视野( $\times 200$ , 来源于同1例77岁女性PDC患者); C、D: 分散分布于黏膜固有层内的pSNCA和NF免疫阳性产物( $\times 400$ ); E、F: 来源于同1例73岁女性FC组患者( $\times 400$ )。

图1 PDC组及FC组结肠黏膜组织pSNCA及NF表达(免疫组化染色)

Figure 1 Expression of pSNCA and NF in colonic mucosa in PDC patients and FC patients (IHC)

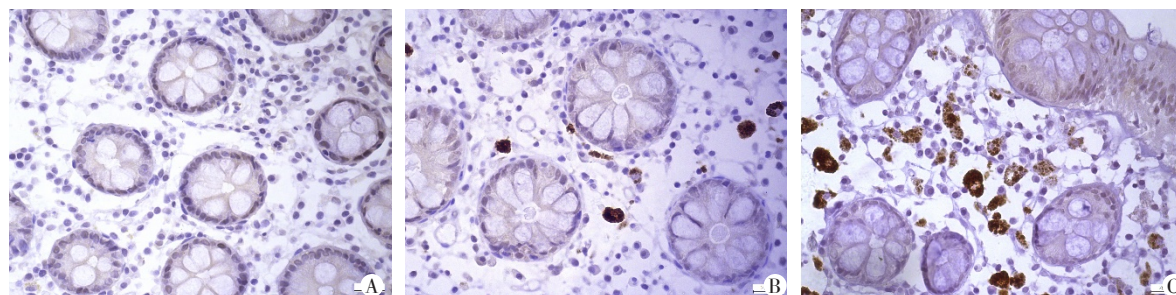
在pSNCA的阳性表达,但无论是PDC组还是对照组,其便秘严重程度均与蛋白沉积无明显相关性;然而PDC组便秘严重程度与UPDRS III评分存在显著相关性( $r=0.67, P=0.036$ ,表3)。

### 3 讨论

既往对尸体解剖标本或手术标本进行的研究表明,在PD进展过程中,肠道神经系统是受损的<sup>[7]</sup>,这可能是导致PD胃肠道症状的原因<sup>[16]</sup>;而本研究结果显示有便秘症状的患者结肠黏膜神经纤维中均有pSNCA的表达。本研究早期PD患者的肠道神经系统表达pSNCA支持Braak的假说<sup>[17]</sup>:肠道可能是PD的发病起源或肠道病变促进病程进展。

本研究中,早期阶段的PD患者肠黏膜pSNCA阳性。Forsyth等<sup>[16]</sup>证实早期PD患者肠黏膜渗透性增加,认为 $\alpha$ -syn的沉积与肠黏膜屏障的损伤有关;Zhou等<sup>[18]</sup>发现pSNCA通常存在于易受损脑区;胃肠道含有最大且最丰富的微生物群,具有诱导炎症和氧化应激的能力,因此推测PD患者胃肠道是易损的,易诱发pSNCA聚集。此外,有研究发现 $\alpha$ -syn的磷酸化受生理刺激的严格调控,增强的氧化应激可以增加pSNCA的表达<sup>[19]</sup>。因此,本研究中pSNCA的沉积可能反映出肠道神经系统的受损,最终导致相关胃肠道症状。这与Jost等<sup>[20]</sup>的发现一致:肠道神经系统损伤所致的慢性结肠运动是PD患者便秘的主要原因。

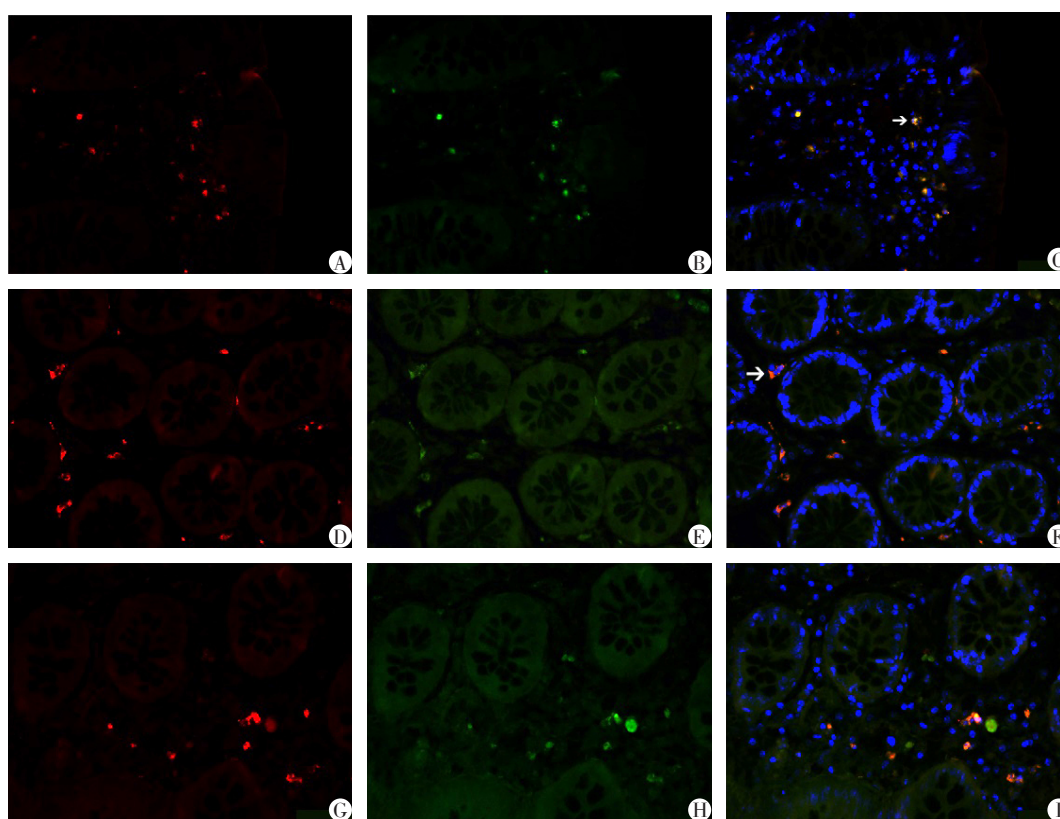




A:pSNCA 阴性表达(来源于1例73岁女性FC患者,);B:pSNCA 弱阳性表达(来源于1例58岁男性PDC患者);C:pSNCA 强阳性表达(来源于1例58岁女性FC患者),靠近肠上皮下层分布可见弥漫性细胞质染色的细胞;以上图片说明,pSNCA 的表达量个体间差异较大。

图2 结肠黏膜活检组织 pSNCA 表达的差异性(免疫组化染色,×400)

Figure 2 Differential expression of pSNCA in colonic mucosa biopsies (IHC, ×400)



结肠黏膜固有层中 pSNCA(A、D、G)与 NF(B、E、H)的共定位;C、F、I:共定位图像;A~C、D~F:来源于1例77岁女性帕金森病便秘患者的升结肠、降结肠;G~I:来源于1例59岁女性便秘患者;pSNCA 表达于神经元细胞的胞浆中(箭头)。

图3 结肠黏膜层中 pSNCA 与 NF 的免疫荧光双标记共定位(免疫荧光染色,×200)

Figure 3 Immunofluorescence double-label colocalization of pSNCA and NF in the colonic mucosa (IHC, ×200)

便秘人群存在结肠菌群的变化,这可能会影响肠道上皮和黏膜功能<sup>[21]</sup>。本研究发现对照组大部分患者亦表达 pSNCA,这说明便秘患者的肠道神经系统亦是受损的,同时也提示便秘患者存在肠道屏障功能的损害。然而,到目前为止,关于单纯便秘患者的肠道功能,特别是肠屏障功能相关的研究很少。因此,便秘患者的肠道屏障功能是否受损还需在今后工作中进一步研究。有证据表明健康人的肠

道屏障功能正常,且健康人的肠道不表达 $\alpha$ -syn<sup>[16]</sup>。一些研究者认为肠道 $\alpha$ -syn 阳性的健康人可能是 PD 前驱期患者<sup>[22]</sup>。但这仅仅是推测,其是否正确有待于后续随访观察。总之,本研究表明 pSNCA 的沉积可能参与了便秘的发生发展,但无论是 PDC 组还是对照组,其便秘严重程度均与蛋白沉积无明显相关性,说明结肠中 pSNCA 的高发生率可能与便秘存在一定相关性,但便秘的发生发展可能还存在其他机

表2 PDC组和FC组pSNCA表达阳性率和免疫组化评分比较

Table 2 Comparison of pSNCA expression positive rate and immunohistochemistry score in PDC group and FC group

指标	PDC组	FC组	P值
阳性率[% (n/N)]			
升结肠	100(10/10)	70(7/10)	0.211
降结肠	89(8/9)	90(9/10)	1.000
合计	100(10/10)	90(9/10)	1.000
免疫组化评分[分, ( $\bar{x} \pm s$ )]			
升结肠	3.20 $\pm$ 0.89	2.35 $\pm$ 2.20	0.280
降结肠	3.78 $\pm$ 1.68	2.45 $\pm$ 1.74	0.079
合计	3.50 $\pm$ 1.12	2.40 $\pm$ 1.74	0.043

表3 PDC患者pSNCA表达、PAC-SYM评分与临床指标的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of pSNCA expression, PAC-SYM score and clinical characteristics in PDC patients

指标	pSNCA表达评分		PAC-SYM评分	
	r值	P值	r值	P值
年龄	-0.13	0.733	-0.03	0.940
PD病程	-0.50	0.175	0.15	0.681
Hoehn-Yahr分期	-0.59	0.042	0.20	0.589
UPDRS-III	-0.14	0.723	0.67	0.036
LEDD	-0.32	0.395	-0.23	0.531
PAC-SYM评分	0.22	0.538	—	—
HAMA评分	0.20	0.615	0.15	0.685
HAMD评分	0.04	0.925	0.23	0.523
PDSS评分	-0.34	0.336	0.05	0.900
FSS评分	0.04	0.910	0.05	0.887

制。此观点与Lebouvier等<sup>[23]</sup>的研究结果一致:  $\alpha$ -syn的沉积与慢性便秘的存在有关,但具体机制还有待探索。

Ser129在 $\alpha$ -syn神经毒性的形成中起关键作用。 $\alpha$ -syn在病理和遗传方面都与PD的发病机制密切相关,磷酸化又是其主要修饰形式,这提示 $\alpha$ -syn磷酸化可能是共核蛋白病的重要调控机制。本文两组便秘的受试者结肠黏膜几乎均有pSNCA的表达,这与Pouclet等<sup>[9]</sup>研究结果相悖,其对照组和PD患者均未表达pSNCA。但是,其他研究结果与本文一致<sup>[7-8,10]</sup>。pSNCA阳性率的差异可能源于所应用的抗体灵敏度及分析方法不同,其中Stokholm<sup>[8]</sup>、Antunes等<sup>[10]</sup>与本研究应用的是免疫组化法,Visanji

等<sup>[7]</sup>应用的是免疫组化及PET印迹法。值得注意的是,上述研究中,仅Pouclet等<sup>[9]</sup>的研究中没有应用抗原修复技术进行抗原修复,且其对照组平均年龄(<60岁)显著较低。另外,标本差异也是造成结果差异的主要因素。目前研究使用的均是手术标本或活检组织<sup>[24]</sup>,Shin等<sup>[25]</sup>证实活检样本及手术样本可造成结果的不一致。Corbillé等<sup>[26]</sup>用了一种不同方法(一维和二维电泳分离蛋白)来检测结肠中的pSNCA,结果显示患者与对照组表达的pSNCA水平没有差异,再次支持了本研究结果。尽管本研究没有招募完全健康的人群作为对照组,但PDC与便秘对照组匹配较好,并且会随访本研究中的所有个体,以进一步明确诊断。因此,本文仍然推测pSNCA可能参与便秘的发生发展。

值得注意的是,PDC患者便秘评分的确如预期所想,比对照组更高,这表明PDC患者便秘较单纯便秘的人更严重,这与前人研究结果相吻合<sup>[26]</sup>。PD患者便秘发生率比健康人更高<sup>[27]</sup>。本研究PDC组pSNCA的表达量与对照相比具有显著差异,且与H-Y分期显著相关,这表明PD疾病本身可能也与pSNCA的沉积有关,且在便秘形成或加剧中起作用,换句话说,pSNCA升高可能加剧了便秘。然而本研究却并未显示便秘严重程度与pSNCA的表达显著相关,其原因可能是存在其他导致患者胃肠道神经系统变性的潜在因素。国外研究表明帕金森病患者便秘发生与疾病本身程度、年龄及其他生活因素有关<sup>[28]</sup>。本研究发现UPDRS评分在便秘严重程度中起作用,与国外报道大致相同。

本研究中仍存在一些局限性:①对便秘的评估采用临床量表,主观性比较大;在未来工作中,采用客观指标,如结肠运输时间、基于计算机断层扫描的体积估算和胃排空来评估便秘严重程度,数据会更准确。②本研究样本量相对较小,且没有设健康组,但PDC组和便秘对照组在年龄和性别上匹配良好。本研究相关分析得到一些阴性结果,可能与样本量小、标本取材部位、主观评判的误差等因素有关,其确切的内在关系还有待今后进一步证实。

[参考文献]

- [1] Oueslati A. Implication of alpha-synuclein phosphorylation at S129 in synucleinopathies: What have we learned in the last decade? [J]. J Parkinsons Dis, 2016, 6(1): 39-51
- [2] Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al. Alpha-synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions [J].



- Nat Cell Biol, 2002, 4(2):160-164
- [3] Barrenschee M, Zorenkov D, Böttner M, et al. Distinct pattern of enteric phospho- $\alpha$ -synuclein aggregates and gene expression profiles in patients with Parkinson's disease[J]. Acta Neuropathol Commun, 2017, 5(1):1-14
- [4] Aldecoa I, Navarro-Otano J, Stefanova N, et al. Alpha-synuclein immunoreactivity patterns in the enteric nervous system[J]. Neurosci Lett, 2015, 602(31):145-149
- [5] Savica R, Bradley BF, Mielke MM. When do  $\alpha$ -Synucleinopathies start? An epidemiological timeline: A review[J]. JAMA Neurol, 2018, (2):E1-7
- [6] Hilton D, Stephens M, Kirk L, et al. Accumulation of  $\alpha$ -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease[J]. Acta Neuropathol, 2014, 127(2):235-241
- [7] Visanji NP, Marras C, Kern DS, et al. Colonic mucosal  $\alpha$ -synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease[J]. Neurology, 2015, 84(6):609-616
- [8] Stokholm MG, Danielsen EH, Hamilton-Dutoit SJ, et al. Pathological  $\alpha$ -synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients[J]. Ann Neurol, 2016, 79(6):940-949
- [9] Pouclet H, Leboviev T, Coron E, et al. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease[J]. Neurogastroenterol Motil, 2012, 24(4):e202-e205
- [10] Antunes L, Frasilho S, Ostaszewski M, et al. Similar  $\alpha$ -synuclein staining in the colon mucosa in patients with Parkinson's disease and controls[J]. Mov Disord, 2016, 31(10):1567-1570
- [11] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinicopathological study of 100 cases[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1992, 55(3):181-184
- [12] Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process[J]. Gastroenterology, 2006, 130(5):1377-1390
- [13] Frank L, Kleinman L, Farup C, et al. Psychometric validation of a constipation symptom assessment questionnaire[J]. Scand J Gastroenterol, 1999, 34(9):870-877
- [14] Dieleman, Palmen, Akol, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium(DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 114(3):385-391
- [15] Gray MT, Munoz DG, Gray DA, et al. Alpha-synuclein in the appendiceal mucosa of neurologically intact subjects[J]. Mov Disord, 2014, 29(8):991-998
- [16] Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa  $\alpha$ -synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease[J]. PLoS One, 2011, 6(12):e28032
- [17] Braak H, Del Tredici K. Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease[J]. Neurology, 2008, 70(20):1916-1925
- [18] Zhou J, Broe M, Huang Y, et al. Changes in the solubility and phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein over the course of Parkinson's disease[J]. Acta Neuropathol, 2011, 121(6):695-704
- [19] Xu Y, Deng Y, Qing H. The phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein: development and implication for the mechanism and therapy of the Parkinson's disease[J]. J Neurochem, 2015, 135(1):4-18
- [20] Jost WH. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's Disease[J]. J Neurol Sci, 2010, 289(1-2):69-73
- [21] Parthasarathy G, Chen J, Chen X, et al. Relationship between microbiota of the colonic mucosa vs. feces and symptoms, colonic transit, and methane production in female patients with chronic constipation[J]. Gastroenterology, 2016, 150(2):367-379
- [22] Chung SJ, Kim J, Lee HJ, et al. Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker[J]. Mov Disord, 2016, 31(2):241-249
- [23] Leboviev T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms[J]. PLoS One, 2010, 5(9):e12728
- [24] Kim JS, Park IS, Park HE, et al.  $\alpha$ -Synuclein in the colon and premotor markers of Parkinson disease in neurologically normal subjects[J]. Neurol Sci, 2017, 38(1):171-179
- [25] Shin C, Park SH, Yun JY, et al. Fundamental limit of  $\alpha$ -synuclein pathology in gastrointestinal biopsy as a pathologic biomarker of Parkinson's disease: Comparison with surgical specimens[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2017, 44(11):73-78
- [26] Corbillé AG, Preterre C, Rolli-Derkinderen M, et al. Biochemical analysis of  $\alpha$ -synuclein extracted from control and Parkinson's disease colonic biopsies[J]. Neurosci Lett, 2017, 641(2):81-86
- [27] Knudsen K, Fedorova TD, Bekker AC, et al. Objective Colonic dysfunction is far more prevalent than subjective constipation in parkinson's disease: A colon transit and volume study[J]. J Parkinsons Dis, 2017, 7(2):359-367
- [28] Gage H, Kaye J, Kimber A, et al. Correlates of constipation people with Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2011, 17(2):106-111