

·临床研究·

重复经颅磁刺激对阿尔茨海默病患者临床症状及血浆微小核糖核酸-125b、血浆磷酸化Tau-181蛋白的影响*

张凤霞^{1,2} 张 旻^{3,4} 朱珊珊¹

摘要

目的:观察重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者认知功能、神经精神行为症状及血浆微小核糖核酸-125b(miRNA-125b, miR-125b)、血浆磷酸化Tau-181蛋白(phosphorylated Tau181 protein, P-tau181)表达的影响。

方法:筛选轻中度AD患者34例,随机分为对照组(n=16)和试验组(n=18)。对照组采取认知训练及重复经颅磁伪刺激,试验组采取认知训练结合重复经颅磁真刺激。磁刺激强度为100%的静息运动阈值,频率为10Hz,每日治疗1次,每周治疗5天,持续4周,刺激脑区为左侧前额叶背外侧区和左侧颞叶区。在治疗前、后进行Addenbrooke-III认知检查(the Addenbrooke III cognitive examination, ACE-III)、简易精神状态量表(mini-mental state scale, MMSE)及神经精神症状问卷(neuropsychiatric inventory, NPI)评估,并采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术检测微小miR-125b表达量,酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)技术检测P-tau181的浓度。

结果:治疗结束后,试验组ACE-III、MMSE和NPI评分以及miR-125b、P-tau181均较组内治疗前显著改善,差异具有显著性意义($P<0.05$),且上述指标与对照组治疗后相比,差异具有显著性意义($P<0.05$);而对照组各项指标改善不具有显著性意义($P>0.05$)。

结论:rTMS能改善轻中度AD患者的认知功能及神经精神行为症状,这可能与rTMS促进血浆miR-125b的表达和抑制P-tau181蛋白产生相关。

关键词 重复经颅磁刺激;阿尔茨海默病;血浆微小核糖核酸-125b;血浆磷酸化Tau-181蛋白

中图分类号:R741.02,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2024)-02-0196-05

Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on clinical symptoms and plasma MiR-125b, phosphorylated Tau181 protein in patients with Alzheimer's disease/ZHANG Fengxia, ZHANG Min, ZHU Shanshan//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2024, 39(2): 196—200

Abstract

Objective: To observe the effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on cognitive function, neuropsychiatric behavioral symptoms, expression of plasma microRNA-125b (miR-125b) and phosphorylated Tau181 protein (P-Tau181) of patients with Alzheimer's disease (AD).

Method: Thirty-four patients with mild to moderate AD were screened and randomly divided into control group (n=16) and experimental group (n=18). The control group received cognitive training and repetitive transcranial magnetic pseudo-stimulation, and the experimental group received cognitive training and repetitive transcranial magnetic real stimulation. The magnetic stimulation intensity was 100% resting movement threshold (RMT), frequency was 10Hz. It's administered once a day, 5 days a week for 4 weeks. The stimulation site

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2024.02.008

*基金项目:中央高校基本科研业务费专项基金(2042021kf0140);国家自然科学基金面上项目(81271406)

1 武汉大学人民医院康复医学科,湖北省武汉市,430060; 2 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科; 3 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复神经内科; 4 通讯作者

第一作者简介:张凤霞,女,博士,主治医师; 收稿日期:2021-10-29

were the left dorsolateral prefrontal lobe and left temporal lobe. The Addenbrooke Ⅲ cognitive examination (ACE-Ⅲ), mini-mental state scale (MMSE) and neuropsychiatric inventory (NPI) were evaluated before and after treatment. The microRNA-125b expression was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and the concentration of P-Tau181 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Result: After treatment, the scores of ACE-Ⅲ, MMSE and NPI, miR-125b and P-Tau181 in the experimental group were significantly improved compared with those before treatment($P<0.05$). There was no improvement of all indexes in the control group($P>0.05$).

Conclusion: rTMS improve the cognitive function and neuropsychiatric symptoms of patients with mild to moderate AD, which may be related to the promotion of plasma miR-125b expression and inhibition of P-Tau181 protein production by rTMS. It is worthy for clinical application.

Author's address Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei Province, 430060

Key word repetitive transcranial magnetic stimulation; Alzheimer's disease; microRNA-125b; phosphorylated Tau181 protein

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的痴呆,也是一种以进展性认知障碍为核心临床表现的神经系统变性病,为老年人致残的首位因素,给患者家庭及社会造成了巨大的负担^[1]。然而,目前临床上用于治疗AD的药物,并不能逆转疾病发展,只起到缓解症状的作用。因此,积极寻找安全有效的替代或辅助治疗措施,对AD患者具有极其重要的现实意义。重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)是一种安全、无创的脑刺激技术,通过磁场诱导的感应电流能有效改变大脑皮质兴奋性。研究表明,rTMS可改善AD患者的认知功能和精神行为症状等,为AD的康复治疗提供了新希望^[2];但其具体作用机制尚不完全清晰,缺乏深刻的理论支持。AD的特征性病理改变之一为tau蛋白过度磷酸化形成的神经细胞内神经原纤维缠结。微小RNA(microRNAs, miRNAs)在AD的病理生理机制中发挥重要作用,如miR-125b可影响Tau毒性^[3]。本实验室前期基础研究显示,rTMS能调控脑缺血大鼠神经元miRNA的表达^[4-5]。因此,本研究旨在探讨rTMS对AD患者miR-125b、P-tau181及临床症状的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究方案已获得华中科技大学同济医院伦理委员会批准(批号:TJ-IRB20160502),并在世界临床试验注册分中心——中国临床试验中心注册(ChiC-

TR-INR-16009227)。

纳入标准:①符合NINCDS-ADRDA^[6]很可能的AD痴呆诊断标准,年龄 ≥ 60 岁,病程 ≥ 6 个月者,起病隐袭,症状在数月至数年中逐渐出现,而短期内突然发生。具备脑退行性病变证据:病史、临床表现、MRI冠状位显示内侧颞叶(海马结构、内嗅皮质等)体积缩小,额叶、颞顶叶体积缩小,脑沟增宽、脑裂增大等;②MMSE分数15分—26分者(≥ 27 分,正常;21分—26分,轻度异常;10分—20分,中度异常; <10 分,重度异常);临床痴呆等级评定(Clinical Dementia Rating Scale, CDR)0.5—2分;③服用抗痴呆药物超过3个月者;④接受全面的神经心理评估者;⑤患者及/或家属在知情同意书上签字者。

排除标准:①排除其他疾病引起的痴呆者,如血管性痴呆、额颞叶痴呆、路易体痴呆等;②抑郁症(汉密尔顿抑郁量表 ≥ 17 分)所引起的假性痴呆者;③排除维生素B₁₂、叶酸和甲状腺激素、定量HIV抗体、梅毒血清学等实验室结果异常引起的痴呆;④排除既往有精神疾病史(如精神分裂症)者;⑤排除癫痫,有酗酒或精神类药物滥用史者;⑥心血管、肺、肝、肾等重大躯体疾病急性期者;⑦刺激局部有金属者;⑧听力及视力严重异常者;⑨颅骨损害或缺失者;⑩有磁共振检查禁忌证者。

选取从2015年9月到2018年11月,至同济医院神经内科门诊就诊,符合上述标准的轻中度AD患者34例,按随机数字表法分为试验组和对照组。2组患者的人口学资料差异均无显著性意义($P>0.05$),见表1。

表1 两组一般资料比较

项目	对照组	试验组	P值
患者例数	16	18	
性别(男/女)	4/12	4/14	0.720
年龄(岁)	69.38±7.87	68.50±7.98	0.750
教育年限(年)	11.69±2.68	12.33±1.97	0.435
病程(年)	3.31±1.96	3.50±1.72	0.770
利手(右/左)	15/1	16/2	0.614
促智药物(无/多奈哌齐/ 美金刚/多奈哌齐联合 美金刚)	3/6/1/6	3/7/2/6	0.960
APOEε4 基因 (阴性/杂合子/纯合子)	4/8/4	5/9/4	0.974
高血压(无/1级/2级)	10/3/3	9/5/4	0.747
糖尿病(无/有)	14/2	17/1	0.474

注:数据类型:性别、利手、促智药物使用人数、APOEε4分型、高血压及糖尿病患病是分类变量,组间比较采用 χ^2 检验分析,P值取 χ^2 检验中的似然比;年龄、教育年限、病程是数值型变量,组内数据采用均值±标准差表示,组间比较采用独立样本 t 检验。

1.2 治疗方法

对照组进行认知训练及重复经颅磁伪刺激,试验组进行认知训练及重复经颅磁真刺激,其中,认知训练内容具体可参照本课题组前期研究^[7]。rTMS采用丹麦 Magventure 公司生产的 MCF-B65 蝶形线圈,磁刺激强度为 100% 的静息运动阈值(resting motion threshold, RMT),频率为 10Hz,每序列 50 个脉冲,序列之间间隔 25s,共 1000 个脉冲。治疗时患者取坐位,保持头部不动,刺激线圈先后置于左侧前额叶背外侧皮层和左侧外侧颞叶。伪刺激组刺激脑区位置不变,线圈与脑切线成角 90°,线圈前部与脑接触,刺激参数与真刺激组一致。rTMS 治疗每日 1 次,每周治疗 5 天,连续治疗 4 周^[7]。

1.3 评价指标

于治疗前和治疗 4 周后采用 MMSE 及 Addenbrooke-III 认知检查(Addenbrooke's cognitive examination III, ACE-III)评估认知功能,神经精神症状问卷(neuropsychiatric inventory, NPI)评估神经精神行为症状。并同时采用酶联免疫吸附法检测 2 组患者血浆过度磷酸化 Tau181 蛋白(P-tau181),采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术检测血浆 miR-125b 含量。

1.3.1 MMSE:由 11 个认知相关的项目组成,需要 5min—10min 完成。最高可得 30 分,分数越高代表认知表现越好^[8]。

1.3.2 ACE-III:涉及 5 个认知领域,注意力(18 分)、记忆力(26 分)、词语流利性(14 分)、语言(26 分)和视空间(16 分)。最高分为 100 分,得分越高说明认知功能越好^[9]。

1.3.3 NPI:评估了 12 种痴呆常见的神经精神行为障碍,根据患者的照料者对 12 个项目的回答进行评分,分数越低表明情况越好^[10]。

1.3.4 P-tau181 及 MiR-125b:采集 2 组患者清晨空腹静脉血 5ml,对血液标本进行离心处理(2000r/min, 10min),后取上层血浆进行检查。通过酶联免疫吸附法检测血清标本中 P-tau181 的水平,通过 qRT-PCR 技术检测血浆 miR-125b 表达量,miR-125b 引物序列:上游 5'-CGGGCTCCCTGAGACCCTAA-3',下游 5'-CAGCCACAAAA GAG CACAAT-3',U6 作为内参。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 21.0 进行数据分析,人口学资料中连续变量采用独立样本 t 检验,分类变量采用 χ^2 检验。组内治疗前、后的数据采用配对样本 t 检验,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 具有显著性意义。

2 结果

2.1 两组患者治疗前与治疗后的 MMSE、ACE-III 和 NPI 评分比较

治疗前,两组患者的 ACE-III 评分、MMSE 评分和 NPI 评分组间比较,差异均无显著性意义($P>0.05$)。治疗后试验组患者的 ACE-III 评分和 MMSE 评分较组内治疗前均显著升高,而 NPI 评分显著下降,差异均有显著性意义($P<0.05$),且试验组患者治疗后的 ACE-III 评分、MMSE 评分和 NPI 评分与对照组比较,差异均有显著性意义($P<0.05$),见表 2。

2.2 两组患者治疗前、后血浆 miR-125b 和 P-tau181 水平比较

治疗前,两组患者血浆 miR-125b 和 P-tau181 水平组间比较,差异均无显著性意义($P>0.05$);治疗后,试验组 miR-125b 水平较组内治疗前显著升高,而 P-Tau181 水平显著下降,差异均有显著性意义($P<0.05$),且上述指标与对照组治疗后比较,差异均有显著性意义($P<0.05$),见表 3。

表2 两组患者治疗前、后的ACE-Ⅲ、MMSE和NPI评分比较

($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	例数	ACE-Ⅲ		MMSE		NPI	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	16	57.53±14.65	60.75±15.24	19.50±4.76	20.27±4.72	9.67±4.39	8.94±4.06
试验组	18	61.92±14.23	71.59±17.08 ^{①②}	20.56±4.56	23.39±4.02 ^{①②}	10.43±4.23	6.82±4.73 ^{①②}

注:与组内治疗前比较,① $P < 0.01$;与对照组治疗后比较,② $P < 0.05$ 。

表3 两组患者治疗前、后血浆miR-125b和P-tau181水平比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR-125b ^(2-ΔΔCT)		P-tau181	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	16	0.13±0.04	0.19±0.05	22.61±2.79	21.50±2.83
试验组	18	0.14±0.03	0.48±0.42 ^{①②}	24.60±2.42	15.00±1.17 ^{①②}

注:与治疗前比较:① $P > 0.05$;与对照组治疗后比较:② $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究结果显示,试验组AD患者经过高频rTMS治疗4周后,ACE-Ⅲ与MMSE较治疗前显著上升,NPI评分较治疗前显著下降,且优于对照组,差异具有显著性意义。这说明高频rTMS能改善阿尔茨海默病患者的整体认知功能和神经精神行为症状,与本课题组前期研究结果相似^[7]。本研究还发现,rTMS能上调血浆中miR-125b浓度,下调P-tau181浓度。

miRNAs是一个短的非编码RNA家族,约有18—22个核苷酸,通过结合蛋白质mRNA的3'非翻译区(3' UTR)促进mRNA降解来抑制蛋白质表达。人脑富含miRNAs,其可能在人类的发展和认知能力中发挥重要作用。miRNAs在信号通路中起着关键的调节作用,失调的miRNAs影响基因转录和蛋白表达,导致神经退行性变的扩散。同时,miRNAs在血浆或血清中稳定存在,且在循环血液中的表达随着机体生理病理情况的改变而发生变化。在AD中,多篇研究显示miR-125b影响AD病理性tau磷酸化过程,参与AD的发生发展^[11-13]。既往有研究报道,AD患者相较于正常人群其循环中miR-125b下调^[14-15],并与认知功能相关^[16]。而在AD患者脑内,miR-125b的浓度是病理性上升的^[17]。miR-125b在AD患者脑内与循环中的差异性分布可能与外泌体的转运相关:大脑神经元发生病变、凋亡后,其产生的外泌体miRNAs可通过血脑屏障被释放到血液中^[18]。所以本研究推断,rTMS可能是通过抑制刺激脑区miR-125b的表达,并促进miR-125b

通过血脑屏障运输到血液,导致血液中浓度上调。重要的是,研究发现AD患者大脑内miR-125b与tau蛋白磷酸化相关,前者可通过促进后者磷酸化而参与AD的发病机制^[19]。在脑内,过表达miR-125b通过激活细胞周期蛋白依赖性激酶5(CDK5)、p35/25和p44/42-丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路,并下调磷酸酶DUSP6和PPP1CA以及抗凋亡因子Bcl-W,从而促进神经元细胞凋亡和Tau蛋白磷酸化水平增加^[19]。另外,miR-125b与神经可塑性相关^[20]。因此,miR-125b有望作为AD治疗的新靶点和一种新的调节因子^[21]。

异常过度磷酸化的Tau蛋白形成神经元纤维缠结并在神经元内聚积是AD的典型病理特征之一,大量研究提示,Tau蛋白异常在AD患者神经变性和学习记忆障碍的发生发展中起重要作用。2014年,国际工作组(IWG)-2诊断标准将脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中P-tau作为AD的诊断标志物之一^[22]。有研究认为,CSF中的Aβ和tau可高准确地预测AD病理,正电子发射计算机断层显像(position emission computed tomography, PET)也能高精度地探测Aβ和tau病理^[23]。Janelidze S等^[24]研究发现,血浆P-tau181与脑脊液P-tau181和PET检测Aβ、Tau病理相关,并能预测Tau PET和Aβ PET阳性;其次,血浆P-tau181在AD早期即升高,并随着疾病进展继续升高,特别是在疾病中后期。因而,在AD无创诊断和疾病进展中,血浆P-tau181是一种极具前景的生物标志物。本研究发现,P-tau181在AD患者经过rTMS治疗后其表达下降,说明rTMS可改善AD病理产物的表达。因为miR-125b影响P-tau的表达,因此,本研究猜测rTMS可能通过调控miR-125b的含量,进而下调P-tau181的表达。

rTMS的安全性问题方面:参加本试验部分患者,除在rTMS首次治疗中出现短暂的刺激部位头痛及部分患者在治疗过程中出现紧张,停止后患者

不适逐渐消失,未出现其他的不良反应,说明rTMS治疗AD是安全可靠的。然而,本研究样本量小,后续需要增加样本量进一步证实rTMS对AD血液标志物的影响。未来,还需进一步应用基础实验探索rTMS如何通过miR-125b调控信号通路来影响AD患者的Tau代谢。

综上所述,高频rTMS可有效改善AD患者的认知功能和精神行为症状,并抑制病理性产物miR-125b及P-tau181的产生,安全可行,具有临床应用价值。

参考文献

- [1] 杨青,贾杰. 阿尔茨海默病相关指南及专家共识解读: 全周期康复新视角[J]. 中国医刊,2021,56(1):22—27.
- [2] Chou YH, Ton That V, Sundman M. A systematic review and meta-analysis of rTMS effects on cognitive enhancement in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging,2020(86):1—10.
- [3] Schonrock N, Götz J. Decoding the non-coding RNAs in Alzheimer's disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(21): 3543—3559.
- [4] Liu H, Han XH, Chen H, et al. Repetitive magnetic stimulation promotes neural stem cells proliferation by upregulating MiR-106b in vitro[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,2015,35(5):766—772.
- [5] Guo F, Han X, Zhang J, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation via the regulation of MiR-25 in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. PLoS One,2014,9(10):e109267.
- [6] 彭丹涛,李鹤,张占军.2010年欧洲神经病学联盟阿尔茨海默病诊疗指南[J]. 中华老年医学杂志,2011,30(2):89—95.
- [7] Zhang F, Qin Y, Xie L, et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation combined with cognitive training improves cognitive function and cortical metabolic ratios in Alzheimer's disease[J]. J Neural Transm (Vienna), 2019, 126(8):1081—1094.
- [8] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini- mental state". a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician[J]. J Psychiatr Res, 1975, 12(3): 189—198.
- [9] Wang BR, Ou Z, Gu XH, et al. Validation of the Chinese version of Addenbrooke's cognitive examination III for diagnosing dementia[J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2017, 32(12): e173—e179.
- [10] Cummings JL, Mega M, Gray K, et al. The neuropsychiatric inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia[J]. Neurology,1994,44(12):2308—2314.
- [11] Zhao Y, Zhang Y, Zhang L, et al. The potential markers of circulating microRNAs and long non-coding RNAs in Alzheimer's disease[J]. Aging Dis,2019,10(6):1293—1301.
- [12] Banzhaf-Strathmann J, Benito E, May S, et al. MicroRNA-125b induces tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in Alzheimer's disease[J]. EMBO J, 2014, 33(15): 1667—1680.
- [13] Swarbrick S, Wragg N, Ghosh S, et al. Systematic review of miRNA as biomarkers in Alzheimer's disease[J]. Mol Neurobiol,2019,56(9):6156—6167.
- [14] Kumar S, Reddy PH. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease?[J]. Biochim Biophys Acta,2016,1862(9):1617—1627.
- [15] Zhao Y, Zhang Y, Zhang L, et al. The potential markers of circulating microRNAs and long non-coding RNAs in Alzheimer's disease[J]. Aging Dis,2019,10(6):1293—1301.
- [16] Tan L, Yu JT, Liu QY, et al. Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease[J]. J Neurol Sci,2014,336(1—2):52—56.
- [17] Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways[J]. J Alzheimers Dis,2008,14(1):27—41.
- [18] 刁华琼,李小黎,林亮吟,等. 外泌体microRNAs与阿尔茨海默病关系的研究进展[J]. 基础医学与临床,2020,40(11):1542—1545.
- [19] Banzhaf-Strathmann J, Benito E, May S, et al. MicroRNA-125b induces tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in Alzheimer's disease[J]. EMBO J, 2014, 33(15): 1667—1680.
- [20] Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, et al. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132[J]. Neuron,2010,65(3):373—384.
- [21] Ma X, Liu L, Meng J. MicroRNA-125b promotes neurons cell apoptosis and tau phosphorylation in Alzheimer's disease[J]. Neurosci Lett,2017(661):57—62.
- [22] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria[J]. Lancet Neurol,2014,13(6):614—629.
- [23] Lleó A, Cavedo E, Parnetti L, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in trials for Alzheimer and Parkinson diseases[J]. Nat Rev Neurol,2015,11(1):41—55.
- [24] Janelidze S, Mattsson N, Palmqvist S, et al. Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia[J]. Nat Med, 2020,26(3):379—386.