

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00326

## 帕金森病患者脑脊液疾病特异蛋白的初步筛选及鉴定

### Screening for disease-specific proteins in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease

徐芙蓉, 涂文斌, 江思德, 彭国光\*

重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆市神经病学重点实验室, 重庆 400016

**[摘要]** **目的:**通过比较帕金森病与特发性震颤、头痛患者脑脊液蛋白质谱,筛选和鉴定与帕金森病密切相关的疾病特异性蛋白(disease-specific proteins, DSPs),寻找帕金森病的生物学标志物。**方法:**以固相 pH 梯度等电聚焦(IPG-IEF)为第一向,垂直平板十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)为第二向进行脑脊液蛋白质分离;用图像分析软件 PDQuest8.0 分析电泳图谱,寻找有意义的差异蛋白点;运用 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定,并对其中差异显著蛋白采用酶联免疫吸附实验(ELISA)进行鉴定。**结果:**帕金森病与特发性震颤患者及头痛对照组患者脑脊液蛋白质谱的比较,发现 3 个有意义的差异蛋白点,其中载脂蛋白 E (apolipoprotein E, Apo E)差异显著。ELISA 鉴定结果表明,与特发性震颤[(3.59±1.07) mg/L]、头痛患者[(3.67±0.71) mg/L]相比,PD 组患者脑脊液 Apo E 水平[(2.47±1.27) mg/L]明显下调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**帕金森病患者与特发性震颤患者、头痛对照组患者脑脊液蛋白表达存在差异,这些差异蛋白可能是帕金森病的 DSPs,并有可能成为帕金森病诊断的分子标志物。

**[关键词]** 帕金森病;特发性震颤;脑脊液;蛋白质组学;生物标志物

**[中图分类号]** R 742.5 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0326-03

帕金森病(Parkinson disease, PD)是多发于中老年人的神经系统变性疾病,病因迄今未明,目前认为是多种基因突变相互作用和(或)基因突变与环境毒素共同作用的结果。氧化应激、线粒体功能障碍、兴奋毒性、神经营养因子缺乏、免疫调节异常及细胞凋亡都是引起 PD 的可能原因<sup>[1]</sup>。其主要病理特征为黑质纹状体系统多巴胺能神经元进行性变性坏死缺失和脑内出现 Lewy 小体。特发性震颤(essential tremor, ET)亦为中枢神经系统较常见、病因未明的运动障碍性疾病,多见于 40 岁以上的中老年人,人群患病率约为 4.1%~39.2%<sup>[2]</sup>。主要表现为手或头部、甚至下肢和躯干的震颤或自主运动。PD 与 ET 均与遗传因素有关,且两者之间可能存在一定的相关性。PD 患者存在多巴胺能与胆碱能系统失衡,ET 患者有多巴胺能与去甲肾上腺素能系统的紊乱。临床上二者的震颤有类似之处,并均可通丘脑腹内侧核手术消除震颤,提示二者是相关联的疾病<sup>[3]</sup>。这些特点不利于二者的鉴别诊断。

本课题组前期对脑脊液蛋白质提取方法作了比较,并初步分析了 PD 患者脑脊液蛋白的双向凝胶电泳图谱,认为 2D-PAGE 技术可用于脑脊液蛋白质分离,能反映蛋白质表达的差异<sup>[4-5]</sup>。因此,本实验拟采用蛋白质组学的方法,通过对比 PD 患者组与 ET 患者组、头痛对照组患者脑脊液的蛋白质表达谱,运用图像分析软件 PDQuest8.0 分析电泳图谱,寻找与 PD 密切相关的疾病特异性蛋白(disease-specific proteins, DSPs),并运用 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定并验证,再

探讨它们在 PD 发病机制中的作用,寻找疾病早期诊断及鉴别诊断的生物标志物。

#### 1 材料和方法

1.1 标本来源及一般资料 20 例 PD 患者、作为对照的 8 例 ET 患者和 10 例头痛患者脑脊液标本均来自重庆医科大学附属第一医院神经内科。PD 及 ET 患者均经临床确诊,对照组头痛患者均为主诉头痛患者,均排除脑血管疾病、神经系统感染和肿瘤等器质性病变。PD 组患者平均年龄为(59±7)岁,其中男性 12 例,女性 8 例;ET 组患者平均年龄为(61±14)岁,其中男性 5 例,女性 3 例;头痛组患者平均年龄为(53.2±5)岁,其中男性 4 例,女性 6 例。所有患者行侧卧位腰椎穿刺,测颅内压无升高或降低,椎管无阻塞。取无色清亮脑脊液 4 ml,分别取 1 ml 送生化及常规检验,确定细胞数和蛋白量在正常范围内,剩余脑脊液样品在 4℃、2 000×g 离心 10 min,去除细胞及其他不溶杂质后冻存于 -70℃<sup>[6]</sup>。

1.2 主要试剂 牛血清白蛋白(BSA)蛋白定量检测试剂盒(BioTeke Corporation),固相 pH 梯度(IPG)胶条(pH 4~7, 17 cm, Bio-Rad),尿素、硫脲(Sigma),3-[(3-胆碱胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸、二硫苏糖醇(Bio-Rad),载体两性电解质、等电聚焦(IEF)覆盖液(Amersham Pharmacia),低相对分子质量蛋白质标准(上海生化所),十二烷基硫酸钠(SDS, Sigma 分装),三羟甲基氨基甲烷、碘乙酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰

**[收稿日期]** 2008-08-02 **[接受日期]** 2008-12-05

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30370499). Supported by National Natural Science Foundation of China(30370499).

**[作者简介]** 徐芙蓉,硕士生. 现在成都市第七人民医院工作. E-mail: bear1861@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-65659595, E-mail: penwan233@sina.com

胺、四甲基乙二胺(Bio-Rad),甘油(Sigma分装),过硫酸铵(北京红星化工厂),甘氨酸(北京鼎国生物制品公司),低熔点琼脂糖(Amersham Pharmacia),硝酸银、铁氰化钾(上海生物工程公司),乙腈(Bake公司),三氟乙酸(Sigma),碳酸氢铵(北京益利精细化学品有限公司),胰蛋白酶(Amersham Pharmacia)。

1.3 仪器和分析软件 超纯水 Milli-Q(美国密里博公司),分析天平 AUW120D(岛津制作所),酶标仪 Multiskan spectrum (Thermo)、Forma 控温摇床 420 型(Thermo),pH 计 PB-10(Sartorius),第一向等电聚焦单元及组件、垂直电泳系统(Protein II Cell)及组件、PDQuest 2D 图像分析软件、凝胶/发光图像分析系统 ChemiDoc XRS(Bio-Rad),真空干燥机(CHRIST ALPHA),质谱分析仪(美国 ABI 公司 Voyager DE-PROMALDI-TOF-MS)。

1.4 脑脊液蛋白质定量及提取 将每组患者脑脊液各取 1 ml,按组混合均匀,制作 BSA 蛋白质浓度标准曲线,测定混合后脑脊液蛋白质浓度(Bradford 法),PD 组为 0.353 g/L,ET 组为 0.372 g/L,正常对照组(头痛组)为 0.428 g/L。采用丙酮沉淀法<sup>[7]</sup>提取脑脊液中的蛋白质;据所测的浓度每组取 450  $\mu$ g 蛋白质(PD 组 1.27 ml、ET 组 1.21 ml、正常对照组 1.05 ml),加入脑脊液 4 倍体积的 -20 $^{\circ}$ C 丙酮混匀离心沉淀,-20 $^{\circ}$ C 丙酮洗涤两次,冷冻抽干。

1.5 筛选与帕金森病密切相关的疾病特异性蛋白(DSPs)

1.5.1 双向电泳 (1)第一向 IPG-IEF:按 Bio-Rad 公司双向电泳实验流程进行操作,采用胶内上样法。胶条采用 IPG 干胶条(pH 4~7,17 cm),分清正负极。胶条于 17 $^{\circ}$ C 被动水化 13 h,经过 150 V 1 h,250 V 1 h,500 V 1 h,1 000 V 1 h,最后在 8 000 V 下等电聚焦。(2)平衡:聚焦好的胶条分别在平衡缓冲液 I (6 mol/L 尿素、2% SDS、0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8、20% 甘油、2% DTT)和平衡缓冲液 II (6 mol/L 尿素、2% SDS、0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8、20% 甘油、2.5% 碘乙酰胺)中震荡平衡 15 min。(3)第二向垂直平板 SDS-PAGE:将平衡后 IPG 胶条从样品水化盘中移出后浸没在 1 $\times$ 电泳缓冲液中数秒,转移至预先灌制好的 1 mm 厚、20 cm $\times$ 20 cm,12% SDS-PAGE 胶上端,用 0.5% 低熔点琼脂糖封胶,然后在 Bio-Rad Protein II Cell 电泳仪上进行第二向电泳。参数设置:5 mA/gel,30 min;30 mA/gel,5 h 至溴酚蓝到达凝胶下缘约 5 mm 时终止电泳。

1.5.2 凝胶染色 参照 Yan 等<sup>[8]</sup>的银染方案进行染色。将染色后的凝胶利用 Image Scanner 光学扫描仪,扫描并备份凝胶图像,再经 PDQuest 8.0 图形分析软件对 2-DE 图谱进行背景消减、斑点检测、匹配、亮化、获取斑点位置坐标。进行第一向等电点校正和第二向相对分子质量校正;选取 ET 组凝胶图作为参考凝胶,PD 组图谱与之进行配比,以蛋白质表达水平上调或下调 200% 为目标点,寻找差异表达蛋白质。根据线性关系估计等电点(pI)值;根据标准蛋白相对分子质量进行差异斑点的相对分子质量自动分析。

1.5.3 质谱分析 制备好的样品用美国 ABI 公司的 Voyager DE-PROMALDI-TOF 质谱仪进行分析。参数设置:线性模式,正离子谱测定, $N_2$  激光源波长 337 nm,真空度  $8 \times$

$10^{-8}$  Torr(1 Torr=133.3 Pa),离子源加速电压为 20 kV,脉冲宽度为 3 ns,离子延迟时间 100 ns,Gird 75%,Guide Wire 0.003%,基质为 CHCA,激光强度为 850~1 200 内部单位,质谱信号单次扫描累加,100 次。外标采用混合的 Mixture 2 标准液进行相邻校正。

1.5.4 数据库检索 得到的肽质量指纹谱数据在(<http://prospector.ucsf.edu>)进检索。查询条件:MS-Fit 检索,PMF 中的肽段相对分子质量为 800~3 000,酶解片段不完全选择为 1 个,肽段相对分子质量最大容许误差为  $\pm 1$ 。半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸(carbamidomethyl-Cys),被选择的片段峰信号均应较强,为基线宽度的 1 倍以上。

1.6 ELISA 法鉴定差异表达蛋白 ELISA 试剂盒购自美国 Usen life Science & Technology 公司,检测范围为 1.56~100 mg/L。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学处理 用 SPSS 15.0 统计软件包进行统计分析。多组间比较采用方差分析,进一步作两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 PD 组与 ET 组、头痛组患者脑脊液蛋白质电泳图比较 本实验所得电泳图谱与本课题组之前研究<sup>[4-5]</sup>所得相比,具有可重复性,脑脊液蛋白质点主要集中在 pH 4~7 区域,从左到右 pI 增加,纵向自上而下相对分子质量减少。对得到的电泳图运用 PDQuest 8.0 软件分析,检测到的蛋白质斑点数,PD 组为 374 个蛋白质点,ET 组为 411 个蛋白质点,头痛组为 398 个蛋白质点。由软件自动选取差异大于 2 倍的斑点。PD 与 ET 组比较共发现 14 个差异蛋白质点,PD 组 3 个蛋白点量上调,11 个蛋白点量下降。PD 与头痛组比较共发现 12 个差异蛋白质点,PD 组 3 个蛋白点量上调,9 个蛋白点量下降(图 1)。PD 组与 ET 组及头痛对照组比较点 ssp8107、ssp4204、ssp8102 表达下调。

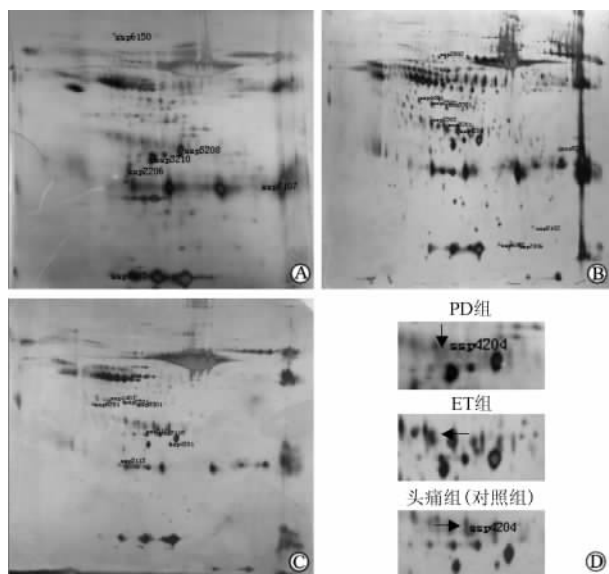


图 1 各组患者脑脊液蛋白质电泳图

A:PD;B:ET;C:头痛组;D:ssp4204 点在 PD 组、ET 组、头痛组的表达

2.2 差异表达蛋白质的肽质量指纹分析 经过对上述差异点行质谱分析,得到比较满意的肽质量指纹图。对其进行数据库检索,最终鉴别出3个蛋白(表1)。ssp8107:遍在蛋白

质连接酶 E3; ssp4204:载脂蛋白 E; ssp8102: NADH-泛醌氧化还原酶 ASH1 亚单位。

表 1 用 MS-Fit 软件在数据库中搜索的有意义的蛋白质

序号	代码	蛋白名称	MOWSE 分值	#/20(%) 匹配肽段	覆盖率 (%)	蛋白相对分子质量/pI
1	Q96EQ8	遍在蛋白质连接酶 E3	9 306	8 (40)	35.8	26 455/6.7
2	P02649	载脂蛋白 E	1.56×10 <sup>6</sup>	13 (65)	38.8	36 154/5.6
3	O95169	NADH-泛醌氧化还原酶	4 978	9 (45)	45.7	21 766/6.3

2.3 差异表达蛋白 Apo E 的 ELISA 鉴定结果 在所有差异表达蛋白质点中,点 ssp4204(Apo E)差异显著,重复性高,表达清晰。Apo E 在中枢神经系统损伤的修复过程中有重要作用,可能是 PD 的 DSPs,因此对其进行 ELISA 法鉴定。结果证实,PD 组脑脊液 Apo E 水平[(2.47±1.27) mg/L]较 ET 组[(3.59±1.07) mg/L]及头痛对照组[(3.67±0.71) mg/L]低,差异有统计学意义(P<0.05)。

目前未知。目前有研究<sup>[11]</sup>报道 Apo E ε2 等位基因与散发 PD 有关,可能是 PD 的易感基因,是否 Apo E ε2 等位基因导致 Apo E 水平降低,使携带 Apo E ε2 等位基因者易患帕金森病,尚须进一步探讨。

3 讨论

[参考文献]

本研究采用蛋白质组学的方法,通过对比 PD 组与 ET 组、头痛对照组的蛋白质图谱,寻找差异表达蛋白,探寻 PD 的 DSPs。结果表明,PD 组脑脊液蛋白质图谱与 ET 组、头痛对照组脑脊液蛋白质图谱之间存在差异。我们鉴定出 3 个差异蛋白,分别为遍在蛋白质连接酶 E3(E3 ubiquitin-protein ligase)、载脂蛋白 E (apolipoprotein E, Apo E)和 NADH-泛醌氧化还原酶 ASH1 亚单位(NADH-ubiquinone oxidoreductase ASH1 subunit),三者均在 PD 组均下调。这些蛋白主要涉及蛋白降解、神经营养和修复、氧化应激等,与 PD 关系密切,有可能是 PD 的 DSPs,并有可能成为 PD 诊断的分子标志物。在所鉴定出的 3 个蛋白中 Apo E 差异显著,重复性高,表达清晰。采用 ELISA 法对 PD 组、ET 组、头痛对照组脑脊液中 Apo E 进行定性和半定量,结果证实,PD 组脑脊液 Apo E 水平较 ET 组及头痛对照组低,差异有统计学意义(P<0.05)。

[1] 彭国光,董为伟. 帕金森病神经保护性治疗研究进展[J]. 中华老年医学杂志,2003,22:505-507.

[2] Louis E D, Ottman R, Hauser W A. How common is the most common adult movement disorder? Estimates of the prevalence of essential tremor throughout the world[J]. Mov Disord,1998, 13:5-10.

[3] Bain P, Brin M, Deuschl G, Elble R, Jankovic J, Findley L, et al. Criteria for the diagnosis of essential tremor[J]. Neurology,2000,54(11 Suppl 4):S7.

[4] 张玉平,彭国光. 帕金森病患者脑脊液蛋白质的双向凝胶电泳图谱初步分析[J]. 中国神经精神疾病杂志,2006,32:336-339.

[5] 孙太欣,彭国光. 双向凝胶电泳脑脊液蛋白质提取方法的比较[J]. 中国医药生物技术,2007,2:172-176.

[6] Davidsson P, Westman-Brinkmalm A, Nilsson C L, Lindbjör M, Paulson L, Andreassen N, et al. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients[J]. Neuroreport,2002, 13:611-615.

[7] Yuan X, Russell T, Wood G, Desiderio D M. Analysis of the human lumbar cerebrospinal fluid proteome[J]. Electrophoresis,2002,23(7-8):1185-1196.

[8] Yan J X, Wait R, Berkelman T, Harry R A, Westbrook J A, Wheeler C H, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Electrophoresis,2000,21:3666-3672.

[9] Bedlack R S, Strittmatter W J, Morgenlander J C. Apolipoprotein E and neuromuscular disease: a critical review of the literature[J]. Arch Neurol,2000,57:1561-1565.

[10] Zhang J, Sokal I, Peskind E R, Quinn J F, Jankovic J, Kenney C, et al. CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases[J]. Am J Clin Pathol,2008,129:526-529.

[11] Huang X, Chen H, Miller W C, Mailman R B, Woodard J L, Chen P C, et al. Lower low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with Parkinson's disease[J]. Mov Disord, 2007,22:377-381.

Apo E 是脂蛋白的一种,在人体内主要在肝脏和大脑中合成。Apo E 是中枢神经系统最主要的载脂蛋白,由神经胶质细胞、小吞噬细胞和神经元合成;在周围神经系统由施旺细胞、神经节卫星细胞和巨噬细胞合成。正常大鼠和人脑内,Apo E 除作为配体与 LDL 受体结合,还有其他重要的生理功能,如调节细胞生长和分化、组织修复和免疫调节。中枢神经系统损伤之后,Apo E 作为脂质载体参与脂质代谢,调控胆固醇的动员和再分配,参与神经细胞膜的修复、再生和维持<sup>[9]</sup>。本研究发现 PD 组患者中枢神经系统 Apo E 与 ET 组、头痛对照组比较减少,这与 Zhang 等<sup>[10]</sup>的结果一致。结果提示,Apo E 与 PD 关系密切,可能参与了 PD 的发病机制。我们认为 Apo E 的减少将使不明原因所致的黑质多巴胺神经元变性后的修复和再生发生障碍,当多巴胺神经元变性缺失达一定量时,即出现 PD 的临床症状,因 Apo E 水平降低的情况未逆转,多巴胺神经元渐进性变性缺失致 PD 病情渐进性发展。当然,导致 PD 脑脊液 Apo E 水平降低的原因,