临床研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0063-04

帕金森病患者脑脊液差异蛋白组学研究

徐芙蓉,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(Parkinson's disease,PD)与头痛(正常对照组)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),探寻帕金森病诊断的生物标志物。方法:以固相pH梯度等电聚焦(IPG-IEF)为第一向,垂直平板十二烷基磺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;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,分析其意义。结果:通过比较帕金森病与头痛(正常对照组)患者脑脊液蛋白质谱发现3个有意义的差异蛋白质点:蛋白(质)酪氨酸磷酸酶(Protein-tyrosine phosphatase 1B,PTP-1B),载脂蛋白E(Apolipoprotein E),泛素连接酶E3(E3 ubiquitin-protein ligase)。结论:帕金森病患者与头痛(正常对照组)患者脑脊液蛋白表达存在差异,这些差异蛋白有可能是帕金森病的DSPs,并有可能成为PD诊断的分子标志物。

【关键词】帕金森病;脑脊液;蛋白质组学;生物标志物

【中国图书分类法分类号】R741 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease

XU Fu-rong,et al

(*Department of Neurology,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To Compare the two-dimensional gel electrophoresis(2D-PAGE)with cerebrospinal fluid(CSF)of Parkinson's disease patients and control group(patients with headache),and to find out the disease-specific proteins(DSPs)which are closely correlated with Parkinson's Disease. *Methods*:proteins extracted from CSF were run in immobilized pH gradient isoelectic focusing(IPG-IEF)at the first dimension,and then run in vertical flat sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)at the second dimension. The protein spots in gels were visualized by silver staining protocol followed by gel scanning and analysised by Pdquest 8.0 software.Then differentially displayed protein spots were searched and identifiyed by MALDI-TOF-MS. *Results*:Three DSPs were found and they were Protein-tyrosine phosphatase 1B,Apolipoprotein E and E3 ubiquitin-protein ligase. *Conclusion*:There were different protein expressing in 2D-PAGE of Parkinson's disease and control group.These proteins may be the DSPs of Parkinson's disease and may be taked as biomarkers of Parkinson's disease.

【Key words】Parkinson's disease;Cerebrospinal fluid;Proteomics;Biomarker

PD是多发于中老年人的神经系统变性疾病,病因未明,氧化应激、线粒体机能障碍、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[1]。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缺失和Lewy小体的出现。目前尚无特异敏感的生化指标和影像学改变可作为临床确诊PD的依据,现诊断主要依赖病史、临床症状及体征、对相应药物治疗的反应等。因此,深入探讨其病因对早期诊断及其治疗具有重要的临床意义。本课题组前期已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[2,3]。因此,本实验拟采用蛋白质组学的方法,通过对比PD与头痛(正常)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DSPs,探讨它们在PD发病机制中的作用,寻找疾病早期诊断的生物标记物。

作者介绍:徐芙蓉(1980-),女,硕士,
研究方向:帕金森病。

通讯作者:彭国光,男,教授,E-mail:penwan233@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30370499)。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　试验器材与仪器　20例PD患者和10例头痛患者脑脊液均来自重庆医科大学附属第一医院神经内科。PD均经临床诊断(排除脑血管疾病、神经系统感染和肿瘤等器质病变);头痛组排除脑血管疾病、神经系统感染和肿瘤等器质病变,将其作为正常对照组。PD组患者平均年龄为59岁,其中男性12例,女性8例;头痛组患者平均年龄为53.2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4ml,分别取1ml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 000g离心10min, 去除细胞及其它不溶杂质后冻存于-70℃[4]。

1.1.2　主要试剂　固相pH梯度(IPG)胶条(pH4~7,17cm)、3-[(3-胆碱胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、三羟甲基氨基甲烷、碘乙酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺均购自Bio-Rad公司;三氟乙酸、尿素、硫脲、十二烷基磺酸钠(SDS)、甘油均购自Sigma公司;低熔点琼脂糖、胰蛋白酶、载体两性电解质、IEF覆盖液均购自Amersham Pharmacia公司;硝酸银、铁氰化钾购自上海生物工程公司;乙腈(JTbake)、碳酸氢铵(北京益利精细化学品有限公司)、牛血清白蛋白蛋白定量检测试剂盒(Bioteke Corporation)、过硫酸铵(北京红星化工厂)甘氨酸、(北京鼎国生物制品公司)丙酮(重庆北碚化学试剂厂)。

1.1.3　仪器和分析软件　第一向等电聚焦单元及组件、垂直电泳系统(PROTEAN 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均购自Bio-Rad公司;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)、真空冻干机(CHRIST ALPHA)、质谱分析仪(美国ABI公司Voyager DE-PROMALDI-TOF-MS)。

1.2　实验方法

1.2.1　脑脊液蛋白质定量及提取　各取每组病人脑脊液1ml,按组混和均匀,制作BSA蛋白质浓度标准曲线及测定混合后脑脊液蛋白质浓度(Bradford法),PD组为0.353g/L,正常对照组(头痛组)为0.428g/L。采用丙酮沉淀法[5]提取脑脊液中的蛋白质: 据所测的浓度每组取450μg蛋白质量(PD组1.27ml,正常对照组1.05ml),加入脑脊液4倍体积的-20℃丙酮混匀离心沉淀,-20℃丙酮洗涤两次,冷冻抽干。

1.2.2　双向电泳　按Bio-Rad公司双向电泳实验流程进行操作, 采用胶内上样法,450ug蛋白质样品溶于350μl水化上样缓冲液(尿素7mol/L,硫脲2mol/L, CHAPS 4%,DTT65mmol/L, Bio-Lyte0.2%(w/v),溴酚蓝0.001%),沿着聚焦盘中槽的边缘至左而右线性加入样品。IPG干胶条(pH4~7,17cm)胶面朝下置于聚焦盘中样品溶液上,再覆盖2~3ml矿物油。胶条被动水化13h及等电聚焦均在17℃自动进行,总电压时间积70 000Vh。聚焦完成后将胶条分别在胶条平衡缓冲液I和胶条平衡缓冲液II中平衡15min。将平衡后的IPG胶条浸没在1×电泳缓冲液中5s,转移至12%SDS-PAGE胶上端,0.5%低溶点琼脂糖封胶,电流5mA/gel持续30min,换用30mA/gel至溴酚蓝到达凝胶下缘约5mm时终止电泳。

1.2.3　凝胶染色(银染)与图像分析　参照Jun X.Yan[6]的银染方案进行染色。用Image Scanner扫描仪获取凝胶图像,再经Pdquest8.0图形分析软件对2-DE图谱进行背景消减、斑点检测、匹配、量化、获取差异蛋白斑点。

1.2.4　质谱分析　将差异点从胶上切下置于EP管中,进行脱色、干燥、酶解进行蛋白质胶内消化,再加入基质和质谱靶点样。制备好的样品用美国ABI公司的Voyager DE-PROMALDI-TOF质谱仪进行分析,得到的肽质量指纹谱数据在(http//www.prospector.ucsf.edu)进行数据库搜索[4]。

2　结　果

2.1　PD组与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所得相比,具有可重复性[2,3]。用PDQuest软件分析图谱,检测到PD组为(374±12)个蛋白质点,头痛组为(411±17)个蛋白质点。PD与头痛组比较共发现10个差异蛋白质点,PD组3个蛋白点量上调,7个蛋白点量下降(见图1~4)。

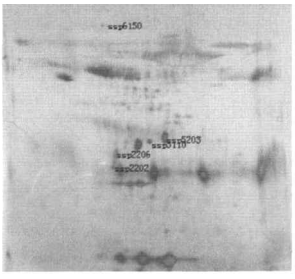


图1　PD患者脑脊液双向电泳图谱

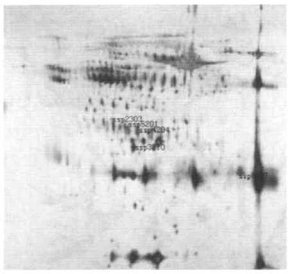
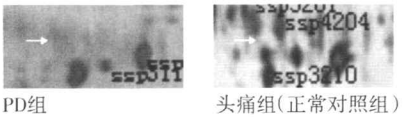


图2　头痛组(正常对照组)脑脊液双向电泳图谱



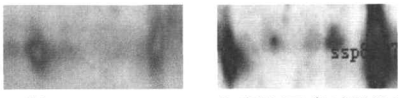
PD组　　头痛组(正常对照组)

图3　PD组与ET组及正常对照组比较,点ssp3110是下调的



PD组　　头痛组(正常对照组)

图4　PD组与ET组及正常对照组比较,点ssp4204是下调的



PD组　　头痛组(正常对照组)

图5　PD组与ET组及正常对照组比较,点ssp8107是下调的

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并对其进行数据库检索最终鉴别出3个蛋白,即点ssp3110、ssp4204、ssp8107,此3个点在PD组均是下调的。结果见表1。

3　讨　论

本试验通过对PD患者与头痛患者(正常对照组)的2-DE图谱进行比较,利用Pdquest8.0图像分析软件对2-DE图谱上的蛋白点群进行了图像分析,同时结合实际图谱及实验条件的变化,发现3个有意义的差异点。进一步对其进行胶内酶切和质谱分析,结果是蛋白(质)酪氨酸磷酸酶(Protein-tyrosine phosphatase 1B,PTP-1B)、载脂蛋白E(Apolipoprotein E)、泛素连接酶E3(E3 ubiquitin-protein ligase),这些蛋白主要涉及了氧化应激、神经营养和修复、蛋白降解等,与PD关系密切。

PTP-1B是蛋白酪氨酸磷酸酶家族中的一员,通过与其家族中其他成员及蛋白酪氨酸激酶联合作用,调节蛋白的酪氨酸磷酸化水平,进而调节细胞功能,如细胞分裂周期,细胞增殖,分化,新陈代谢,细胞骨架结构,神经发育和免疫应答[7]。PTP-1B的表达和活性在体内受多种因素调节。H_2O_2和谷胱甘肽

表 1　用 MS-FIT 软件在数据库中搜索的有意义的蛋白质

	代码	蛋白名称	MOWSE 分值	#/20(%) 匹配肽段	覆盖率(%)	蛋白分子量(u)/ 等电点
1	P18031	蛋白(质)酪氨酸酶	1732	10(52)	22.1	49967/5.9
2	P02649	载脂蛋白质	1.56e+6	13 (65)	38.8	36154/5.6
3	Q96EQ8	冷素连接酶 E3	9306	8(40)	35.8	26455/6.7

就是其中之一,可抑制PTP-1B的活性[8]。目前,还没有PTP-1B与PD的相关报道。我们知道氧化应激、线粒体机能障碍、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,而PTP-1B能调节神经发育和免疫应答,与多种生长因子有相互作用。所以我们推测PTP-1B可能与PD相关,但其生理作用复杂,不能单独作为PD的DSPs,结合其它DSPs可能有一定价值。

Apo-E是中枢神经系统最主要的载脂蛋白。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[9]。本实验结果显示PD组与对照组比较Apo-E下调,我们认为这可能提示PD患者神经细胞变性后的修复和再生因Apo-E下调而发生障碍。所以,Apo-E有可能是PD密切相关的DSPs。

泛素-蛋白酶体系统(Ubiquitin-proteasome systerm,UPS)是生物体内蛋白质选择性降解的重要途径之一,可清除细胞中突变、损伤和异常折叠的蛋白质,起到维持细胞内外环境稳定的作用[10]。泛素结合系统包括一系列酶,泛素结合酶E3就是其中之一。无论泛素蛋白酶体系统中哪一步出现功能异常均可导致UPS功能的异常,从而影响细胞生理特性,使蛋白异常聚集或异常降解,直至细胞死亡。本实验结果显示,与对照组比较,PD组脑脊液泛素连接酶E3下调。这可能提示PD患者UPS功能被抑制或受损,异常蛋白聚集并易于沉淀,致使多巴胺能神经元中形成Lewy小体或神经元变性缺失。所以我们认为泛素

结合酶E3参与了PD发病机制,有望成为PD诊断的生物标志物。

本试验采用双向凝胶电泳结合质谱分析对帕金森病组和正常对照组进行了蛋白组学研究。试验结果显示:两组中的个别蛋白质点表达有差异。这种差异可为探索PD病因和发病机制提供分子生物学依据,这些差异蛋白质亦有可能成为PD分子诊断标志物。

参 考 文 献

[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(8):505-507.

[2] 张玉平,彭国光.帕金森病患者脑脊液蛋白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(4):336-339.

[3] 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(3):172-176.

[4] Davidsson P,Westman-Brinkmalm A,Nilsson CL,et al. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients [J]. Neuroreport,2002;13(5):611-615.

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

[6] Yan JX,Wait R. 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(17):3666-3672.

[7] Ukkola O,Rankinen T,Lakka T,et al. Protein tyrosine phosphatase 1B variant associated with fat distribution and insulin metabolism[J]. Obes Res,2005;13(5):829-834.

[8] van Montfort RL,Congreve M,Tisi D,et al. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B[J]. Nature,2003;423(6941):773-777.

[9] Bedlack RS,Strittmatter WJ. Apolipoprotein E and Neuromuscular Disease[J]. Arch Neurol,2000;57(11):1561-1565.

[10] Sherman MY,Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins:a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases [J]. Neuron,2001;29(1):15-32.

(上接第 54 页)

定预防和治疗作用,其预置性保护作用,可能对老年痴呆高危人群有一级及二级预防作用。

参 考 文 献

[1] Kozlov AS,Angulo MC,Audinat E,et al. Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006;103(26):16058-16063.

[2] Jacobsen JS,Wu CC,Redwine JM,et al. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2006;103(13):5161-5166.

[3] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coodinate fourth edition[M]. Academic press,1998.80-89.

[4] Glickstein SB, Golanov EV,Reis DJ. Intrinsic neurons of fastigial nucleus mediate neurogenicneuroprotection against excitotoxic and ischemic neuronal injury in rat[J]. J Neurosci,1999;19(10):4142-4154.

[5] Wen HF. Effect of electrical stimulation of fastigial nucleus on cognitive Ability in rats with vascular dementia[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation,2004;8(34):7821-23.

[6] 谭兴林,董为伟,杨期东.电刺激小脑顶核防治血管性痴呆的实验研究[J]. 卒中与神经疾病杂志,2004;11(6):349-352.

[7] Takano T,Han X,Deane R,et al.Two-photon imaging of astrocytic Ca2+ signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease[J]. Ann N Y Acad Sci,2007;1097:40-50.

第九届全国神经生化会议将于
2009 年 5 月在湖南长沙举行,欢迎届时参加!