

【临床研究】

通信作者:邢红霞(1972-),女,河南郑州人,博士,主任医师,硕士生导师,主要从事帕金森病基础与临床方向的研究;E-mail: xhxwh02@163.com。

sion level in plasma among the control group, early-stage PD group and advanced-stage PD group ($P > 0.05$). The levels of APOE, PRDX-2 protein in early-stage PD group and advanced-stage PD group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The protein expression in the plasma of PD patients is changed, and the APOE and PRDX-2 may be the biomarkers for the early diagnosis of PD.

Key words: quantitative proteomics; Q-Exactive mass spectrometers; mass spectrometry; Parkinson's disease; biomarkers

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的运动障碍性疾病,病因尚未明确,目前对PD的临床诊断主要依赖于患者的运动症状和体征。但有研究报道,PD患者在确诊时的10 a前就已经开始出现缓慢进展性的神经退行性病变^[1],因此,筛选出灵敏度和特异度均较高的生物学标志物对于PD的临床早期诊断和干预具有重要意义。血液中含有多种可反映个体诊断信息的蛋白质,同时血液具有获取方便等特性,所以血液标志物是临床诊断PD的重要途径和方法。质谱(mass spectrometry, MS)技术是一种高通量大范围的研究蛋白质组学的方法,蛋白质组学及生物信息学方法联合应用有助于筛选并鉴定出患者血液中差异表达的蛋白质,进而寻找可辅助临床疾病诊断的可靠的生物学标志物。本研究利用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)联合Q-Exactive质谱仪,筛选出早期PD、晚期PD患者和健康人之间差异表达的蛋白质,以寻找出可能有助于诊断PD的生物学标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2016年7月至2017年3月于新乡医学院第一附属医院神经内科就诊的33例PD患者,均符合PD诊断标准^[2],所有患者行3.0T核磁共振成像检查,排除患有PD综合征、PD叠加综合征、智能障碍、既往有癫痫发作、重大颅脑外伤、脑血管病史等患者。依据修订的Hoehn-Yahr分级评定量表将疾病分为5级^[3],根据分级情况将33例患者分为早期PD组(1~2.5级)和晚期PD组(3~5级)。早期PD组19例,男10例,女9例,年龄(62.4 ± 6.5)岁,病程(2.6 ± 2.8)a;晚期PD组14例,男9例,女5例,年龄(66.0 ± 8.6)岁,病程(4.0 ± 4.5)a。另选择同期体检健康者36例作为对照组,其中男20例,女16例,年龄(64.4 ± 7.1)岁。3组研究对象的年龄、性别比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 主要试剂与仪器 二硫代苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)、三乙基碳酸氢铵(triethylammonium bicarbonate, TEAB)、乙腈(质谱级)、甲酸(质谱级)、羟胺均购自美国Sigma-Aldrich公司,质谱级胰蛋白酶购自美国

Promega公司,去高丰度蛋白试剂ProteoExtract Albumin/IgG Removal试剂盒购自德国Merck KGaA公司,C18萃取柱购自美国Thermo Fisher Scientific公司,2-D Quant试剂盒购自美国GE Healthcare公司,酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司。纯水仪购自美国Millipore公司,分析柱($3 \mu\text{m}$ Acclaim PepMap100 C18, $75 \mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$)、酶标仪、Nano-HPLC、Q-Exactive质谱仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样本采集及制备 采集每个患者空腹肘静脉血4 mL,置于含有乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的抗凝管中,在4℃、 $4\,000 \times g$ 条件下离心10 min,并重复1次,吸取上层液于新的离心管中。从早期PD组、晚期PD组、对照组中分别随机选取6例受试者的血样进行蛋白质组学分析。

采用去高丰度蛋白试剂去除血浆中的高丰度蛋白质,并使用3K超滤管浓缩样品。按照2-D Quant试剂盒说明,对18例样本进行蛋白定量,计算样本总蛋白含量,剩余的滤液用于蛋白还原、烷基化、酶解、筛选及鉴定。简要过程为:每例样本提取100 μg 蛋白质,加入到500 μL 含10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT、100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEAB的溶液中,在4℃、 $14\,000 \times g$ 条件下离心15 min后丢弃滤液,重复3次,室温孵育1 h;再加入到500 μL 含20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA、100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEAB的溶液中再次超滤,离心15 min后丢弃滤液,重复3次,将样品室温避光孵育45 min;最后把样本蛋白加入到含100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的TEAB溶液中,在4℃、 $14\,000 \times g$ 条件下再离心3次,每次15 min,离心后丢弃滤液,将滤液收集到新的离心管中。将样本中加入TEAB,调整滤液的pH至8~9,每个样品加入1.5 μg 胰蛋白酶,37℃恒温箱孵育过夜,在真空浓缩仪中干燥,于-80℃保存。分别将体积分数为30%、50%、70%的乙腈溶液加入至C18填充的固相萃取柱中,并加入样品进行洗脱, $14\,000 \times g$ 室温下离心1 min,为了提高洗脱效率,重复2次;用体积分数为5%乙腈和体积分数0.1%的甲酸溶液对样品进行重溶,室温条件下, $1\,500 \times g$ 离心1 min,并重复3次

进行脱盐处理。然后在真空浓缩仪中干燥除去乙腈, -80 ℃ 保存待用。

1.3.2 液相分离及质谱检测 质谱分析过程在深圳市疾病预防控制中心现代毒理学重点实验室完成。应用 ChromXP C18 (3 μm, 120 Å) Nano-LC 富集柱对多肽样品进行富集, 以含体积分数 0.1% 甲酸的超纯水作为流动相, 通过分析柱洗脱, 让样品充分富集在脱盐柱上。经过高温电离及电压雾化后进入 QE 质谱机器中进行检测, 收集离子信号。离子信号经过 ProteinPilot 软件处理并进行搜库。筛选出早期 PD 组、晚期 PD 组、对照组均重复出现的多肽, 选取差异表达倍数在 2.0 以上的结果进行分析。

1.3.3 生物信息学分析 利用 R 语言中的 Cluster-Profiler 工具包^[4]对差异蛋白进行功能富集, 并分别对差异蛋白进行 KEGG 通路富集及 GO 功能富集(包括生物学过程、分子功能、细胞组分分析)。

1.3.4 蛋白质验证 结合文献及生物信息学功能分析结果, 作者发现氧化应激蛋白载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE)、过氧化物酶蛋白-2 (peroxiredoxin-2, PRDX-2)、炎性反应相关蛋白补体成分 7 (complement component 7, C7) 在 PD 的发病机制中可能具有重要作用和一定的临床意义, 故对这 3 个蛋白质进行 ELISA 定量验证。实验操作的详细过程参照说明书。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著差异法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异蛋白质分析及鉴定结果 3 组受试者共筛选出差异表达倍数在 2.0 以上的蛋白质 372 个。对差异蛋白进行分析发现, 早期 PD 组患者与对照组比较, 血浆中有 97 个差异表达的蛋白质, 其中表达上调 13 个; 晚期 PD 组与对照组比较, 血浆中有 68 个差异表达的蛋白质, 其中表达上调 5 个。

2.2 差异蛋白功能的生物信息学分析 早期 PD 组与对照组差异表达的蛋白质在 KEGG 通路中富集到 14 条相关通路, 其中包括补体和凝血级联反应、低氧诱导因子-1 信号通路、肌动蛋白细胞骨架调节等通路。晚期 PD 组与对照组差异表达的蛋白质在 KEGG 通路中富集到 16 条相关通路, 其中包括 Rap1 信号通路、血小板活化信号通路和黏着斑信号通路等相关通路。GO 生物学过程分析结果显示, 早期 PD 组与对照组差异表达的蛋白质富集了 98 个不同的生物学进程, 晚期 PD 组与对照组差异表达的蛋白质富集了 52 个不同的生物学进程, 主要与

炎症、应激反应过程调控有关; GO 分子功能富集分析结果显示, 早期 PD 组与对照组差异表达的蛋白质富集了 28 种不同的分子功能, 晚期 PD 组与对照组差异表达的蛋白质富集了 23 种不同的分子功能, 均与核酸或者蛋白质结合有关; GO 细胞组分功能富集分析发现, 早期 PD 组、晚期 PD 组与对照组差异表达的蛋白主要位于细胞囊泡和细胞膜上。

2.3 蛋白质验证 结果见表 1。3 组受试者血浆中 C7 蛋白水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。早期 PD 组、晚期 PD 组患者血浆中 APOE、PRDX-2 蛋白水平均低于对照组 ($P < 0.05$)。将 ELISA 结果与质谱分析结果对比分析, APOE、PRDX-2 的验证结果与质谱分析结果基本一致。

表 1 3 组受试者血浆中 C7、APOE 及 PRDX-2 蛋白水平比较
Tab.1 Comparison of C7, APOE and PRDX-2 protein level in blood plasma among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	C7/(mg · L ⁻¹)	APOE/(mg · L ⁻¹)	PRDX-2/(μg · L ⁻¹)
对照组	36	187.8 ± 43.2	425.1 ± 3.0	38.7 ± 1.2
早期 PD 组	19	150.7 ± 48.1	322.5 ± 31.3 ^a	29.7 ± 1.2 ^b
晚期 PD 组	14	106.4 ± 30.5	269.8 ± 22.5 ^a	25.8 ± 3.2 ^b

注: 与对照组比较^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

3 讨论

PD 是一种常见的神经退行性疾病, 其病因及发病机制尚不明确, 目前多认为是遗传因素与环境因素共同作用的结果。PD 的发病涉及线粒体功能障碍、氧化应激、免疫异常、细胞自噬、异常蛋白的跨突触传递和神经炎性反应等诸多过程。目前, PD 的临床诊断主要依靠患者明显的运动障碍症状和体征, 确诊时往往已达到疾病晚期阶段。因此, 寻找早期诊断和预防疾病的方法具有重要意义。本研究利用 HPLC 联合 Q Exactive 技术筛选并鉴定出 PD 患者和健康人群血浆中差异表达的蛋白质, 利用生物信息学分析发现, 这些蛋白质主要包括氧化应激相关蛋白、补体系统激活相关蛋白、炎症反应相关蛋白、蛋白水解相关蛋白、神经元突触再生相关蛋白、β 淀粉酶形成调节相关蛋白。根据质谱分析及生物信息学分析结果发现, 氧化应激蛋白 APOE、PRDX-2 及炎症反应相关蛋白 C7 在 PD 的发病机制中可能具有重要作用, 因此, 本研究采用 ELISA 进一步验证早期 PD 组、晚期 PD 组和对照组受试者血浆中 APOE、PRDX-2、C7 蛋白的表达水平, 结果显示, 早期 PD 组、晚期 PD 组受试者血浆中 APOE 和 PRDX-2 蛋白表达水平低于对照组, 而 3 组 C7 蛋白表达水平差异无统计学意义, 提示氧化应激在 PD 的发病机制中可能具有重要的作用。

APOE 是含有 299 个氨基酸残基的分泌性糖蛋白^[5], 具有在全身组织间转运脂质的功能, 参与胆

固醇的合成和再分布^[6]。在中枢神经系统中,APOE主要由星形胶质细胞合成和分泌,并参与神经元的生长、修复和再生过程。APOE基因和蛋白均呈多态性,其具有3个等位基因($\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$),编码异构体APOE2、APOE3、APOE4蛋白^[7]。神经退行性疾病中蛋白质错误折叠和异常聚集,导致大量相关神经元细胞在大脑中进行性功能丧失并死亡,有研究显示,携带 $\epsilon 4$ 基因者比不携带 $\epsilon 4$ 基因者脑中的 β 淀粉样蛋白沉积更为显著,并与神经纤维缠结的形成有着密切联系^[8],说明APOE4在PD患者脑中的阿尔茨海默病样病变中发挥作用。LASKOWITZ等^[6]研究表明,中枢神经系统损伤的模型动物脑组织中APOE表达水平下调,间接刺激星形胶质细胞活化,从而发挥保护次级神经元的作用。

PRDX-2是一种广泛表达的2-半胱氨酸过氧化物酶,为细胞内保护系统的一部分。PRDX-2主要通过严密控制细胞内相关的应激性活性氧水平达到维持细胞正常功能的作用^[9]。细胞中过量的过氧化氢可使神经元受到氧化应激损伤而死亡。因此,PRDX-2的主要作用为清除细胞内低浓度的过氧化氢,保护细胞中的相关酶不受氧化作用而失活^[10]。许多年龄相关的退行性疾病的发病与氧化应激导致的神经元细胞持续性损伤有关。已有研究证实,PD患者脑组织中的线粒体复合体I因受到氧化损伤而导致能量代谢障碍^[11-12]。即使在PD疾病早期,在PD患者血小板和血浆中也能找到线粒体氧化性损伤导致功能障碍的证据^[13]。在蛋白质质谱分析以及ELISA实验结果中,早期PD组和晚期PD组受试者血浆中APOE和PRDX-2蛋白表达水平均低于对照组,因此,APOE和PRDX-2可能作为诊断PD的生物学标志物。

补体C7作为细胞膜上的锚,插入脂质双分子层形成靶细胞膜上的孔,在固有免疫中起关键作用^[14]。补体系统是固有免疫系统的基本组成部分之一,与许多蛋白质有级联反应。LI等^[15]人在小鼠脑脊液中发现C7可能参与神经再生。本研究通过蛋白质谱筛选出补体C7在早期PD患者与对照组血浆中表达具有差异性。但是利用ELISA方法验证时发现,对照组和PD患者血浆中的表达水平比较差异无统计学意义。补体C7相关的调控通路及其生物学功能仍需进一步深入研究。

综上所述,PD患者血浆中有广泛的蛋白质组学改变。这些差异表达的蛋白质具有丰富的功能,如氧化应激、炎症反应、补体激活、神经元突起再生等。

氧化应激反应可能参与PD的发生、发展过程,APOE、PRDX-2有望成为诊断PD的生物学标志物。

参考文献:

- [1] KALIA L V, LANG A E. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2015, 386(9996):896-912.
- [2] BERG D, POSTUMA R B, ADLER C H, et al. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2015, 30(12):1600-1611.
- [3] MONTICONE M, AMBROSINI E, LAURINI A, et al. In-patient multidisciplinary rehabilitation for Parkinson's disease: a randomized controlled trial [J]. *Mov Disord*, 2015, 30(8):1050-1058.
- [4] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16(5):284-287.
- [5] 王毅, 李翔翔, 李娟, 等. ApoE基因缺失小鼠视网膜及Bruch膜组织形态观察[J]. *眼科新进展*, 2013, 336(1):13-16.
- [6] LASKOWITZ D T, LEI B, DAWSON H N, et al. The apoE-mimetic peptide, COG1410, improves functional recovery in a murine model of intracerebral hemorrhage [J]. *Neurocrit Care*, 2012, 16(2):316-326.
- [7] HUANG Y, MAHLEY R W. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 72:3-12.
- [8] NABERS A, OLLESCH J, SCHATNER J, et al. Amyloid- β -secondary structure distribution in cerebrospinal fluid and blood measured by an immuno-infrared-sensor: a biomarker candidate for Alzheimer's disease [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(5):2755-2762.
- [9] De FRANCESCO L, BERTOLDI M, MATTE A, et al. Oxidative stress and beta-thalassemic erythroid cells behind the molecular defect [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013:985210.
- [10] BERTOLDI M. Human peroxiredoxins 1 and 2 and their interacting protein partners; through structure toward functions of biological complexes [J]. *Protein Pept Lett*, 2016, 23(1):69-77.
- [11] SOBOTTA M C, LIOU W, STOCKER S, et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(1):64-70.
- [12] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLITT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. *Physiological Reviews*, 2014, 94(3):909-950.
- [13] SEET R C, LEE C Y, LIM E C, et al. Oxidative damage in Parkinson disease: measurement using accurate biomarkers [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(4):560-566.
- [14] SERNA M, GILES J L, MORGAN B P, et al. Structural basis of complement membrane attack complex formation [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:10587.
- [15] LI G S, LI Q F, DONG M M, et al. Complement components of nerve regeneration conditioned fluid influence the microenvironment of nerve regeneration [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(4):682-686.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)