

• 论 著 •

缺陷型/非缺陷型精神分裂症患者血清蛋白表达谱的比较研究*

董 慧¹, 朱克明², 唐小伟¹, 刘亚平¹, 张晓斌¹

(1. 江苏省扬州五台山医院检验科, 江苏扬州 225003; 2. 江苏大学生命科学研究院, 江苏镇江 212013)

摘要:目的 在蛋白质组水平上分析中国汉族缺陷型精神分裂症(DS)与非缺陷型精神分裂症(NDS)患者血清蛋白表达情况,从而寻找两种精神分裂症患者血清差异表达蛋白。方法 利用双向电泳技术分析缺陷型精神分裂症与非缺陷型精神分裂症患者血清蛋白质组,并对差异表达的蛋白点进行质谱仪鉴定。结果 两组血清蛋白二维蛋白图谱中存在 18 个显著差异表达的蛋白点,通过质谱鉴定出其中 15 个蛋白点。这 15 个蛋白中有 12 个蛋白在 DS 中下调,3 个蛋白在 DS 中上调。结论 首次利用蛋白质组学技术对中国汉族 DS 和 NDS 患者外周血蛋白表达谱进行比较研究,为开发 DS 特征性生物学标志及阐明缺陷型精神分裂症的病因学机制提供帮助。

关键词:缺陷型精神分裂症; 血清; 蛋白质组学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2131-02

The comparative study of deficit/non-deficit schizophrenia serum proteins*Dong Hui¹, Zhu Keming², Tang Xiaowei¹, Liu Yaping¹, Zhang Xiaobin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Yangzhou Wutaishan Hospital, Yangzhou, Jiangsu 225003, China;

2. Institute of Life Sciences of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: Objective To explore differently expressed proteins in serum samples obtained from Deficit Schizophrenia as well as Non-Deficit Schizophrenia patients with proteomic techniques. **Methods** Make the comparative study of serum proteins between DS and NDS patients with two-dimensional electrophoresis. The screened proteins were identified by mass spectrometer. **Results** During 18 differently expressed protein points screened in this study, 15 proteins were identified by mass spectrometer. Among of them, 12 proteins are up-regulated while 3 proteins are down-regulated in DS patients group. **Conclusion** It's the first time to make the comparative study of serum protein profiles between DS and NDS patients by proteomic analysis. We expect that this study will contribute to better understanding of the pathophysiology of DS and explore the potential disease-associated biomarker, improve the future study for clinical medication of schizophrenia.

Key words: deficit schizophrenia; serum; proteomics

精神分裂症(SCH)是以多种严重精神症状长期持续或不断加重为特点的大脑疾病,影响世界人口的 1%左右^[1]。1988 年 Carpenter 等^[2]提出缺陷型 SCH(DS)这一概念,研究者发现,较之非缺陷型 SCH(NDS)患者,DS 患者表现为临床疗效差、明显预后不良、衰退严重^[3-4];且两者间在神经生化、认知功能、神经影像学、激素水平和免疫学指标等方面也存在重要差异,因此 DS 被认为可能是一种高同质性的独立疾病亚型^[3-6]。本文首次利用蛋白质组学技术对中国汉族 DS 和 NDS 患者外周血蛋白表达谱进行比较研究,试图寻找 DS 血清中可能存在的特征蛋白,为寻找 DS 特征性生物学标志及阐明 SCH 的病因学机制提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为 2010~2012 年间在江苏省扬州五台山医院住院的患者,符合第 4 版美国精神障碍诊断与统计手册(DSM-IV)SCH 诊断标准;排除脑器质性疾病、感染性疾病或其他慢性躯体疾病、精神活性物质滥用史;年龄小于 60 岁,病情稳定大于 4 周;患者与其法定监护人签署知情同意书,并获得本院伦理委员会通过。符合上述标准的 SCH 患者由两名主治医师运用缺陷型 SCH 诊断量表评定 DS 或 NDS。最后

入组 DS 患者 30 例, NDS 患者 30 例,均为男性。

1.2 仪器与试剂 蛋白电泳系统、17 cm 线性化 IPG 干胶条、PDQuest 凝胶分析软件为 Bio-Rad 公司产品, Bruker 公司 MALDI-TOF 质谱仪, GE 公司 Image Scanner III 扫描仪。

1.3 标本处理 无菌抽取 DS 与 NDS 组患者空腹静脉血 3~5 mL, 3 500 r/min 离心 5 min, 分离获得血清。每组 30 份血清等体积混合, 提取血清总蛋白, 用于双向电泳检测。血清总蛋白提取方法为等体积血清混匀, 加入预冷的 50% 三氯乙酸(TCA)到终浓度为 10%, 冰上放置 30 min。离心(15 000 r/min, 4 °C, 20 min), 弃上清液。沉淀用预冷的含 13 mM DTT 的丙酮洗 4 次。进一步离心(15 000 r/min, 4 °C, 20 min), 沉淀进行真空干燥。干燥的粉末溶解在样品缓冲液, 4 °C 过夜。最后一次离心(15 000 r/min, 4 °C, 20 min), 取上清液用于 2-DE。蛋白浓度的测定按照染料结合测定蛋白浓度的方法。

1.4 质谱分析 软件分析电泳图谱, 从凝胶内切取蛋白点, 进行胶内酶解后, 运用 MALDI-TOF 质谱仪分析, 将所得的肽质量指标图谱与蛋白质 Mascot 数据库(<http://www.matrix-science.com>)进行比对。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 组

* 基金项目:江苏省扬州市自然科学基金项目(YZ2014025)。 作者简介:董慧,女,助理研究员,主要从事病原微生物与免疫学研究。

间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NDS 和 DS 蛋白表达特征及差异分析结果 目前蛋白质组学已被广泛应用于鉴定差异蛋白,本研究通过双向电泳比较 NDS 和 DS 患者的血清蛋白表达情况。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),在二维图谱上共检测到 336 个蛋白点,这些蛋白点主要 pH 4~9,相对分子质量在 $(10 \sim 100) \times 10^3$ 之间。比较 NDS 和 DS 蛋白图谱,共发现 28 个差异蛋白,其中 18 个蛋白点通过 SPSS 软件分析表现差异有统计学意义($NDS/DS \geq 1.5$ 或 $NDS/DS \leq 0.67$, $P < 0.05$)。

2.2 质谱分析结果 在检测到的 18 个显著差异表达的蛋白中,有 15 个蛋白能够通过质谱鉴定出来,见表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),另外 3 个蛋白点则未能比到(表 1)。主要有两个原因:(1)这些蛋白丰度比较低;(2)数据库中无这些蛋白数据。在鉴定到的 15 个蛋白质中,发现较之与 NDS 组,CD5 分子样蛋白前体(图 1,蛋白点 7)、结合珠蛋白 Hp2(图 1,蛋白点 5)在 DS 患者血清中表达上调,而转甲状腺蛋白前体(图 1,蛋白点 1)、血纤维蛋白溶酶原(图 1,蛋白点 10-16)在 DS 患者中表达下调。在研究中发现某些蛋白点的理论分子量和等电点与双向电泳图不一致,包括蛋白点 3、5、7、11 和 14,这种情况在蛋白质组研究中经常出现,主要是由于翻译后修饰,蛋白剪切和降解等。其中蛋白点 3 未能在数据库中比到相应的结果,是一个新发现的功能未知蛋白。该蛋白在 DS 患者中表达量是 NDS 患者的 2.9 倍,推测其可能与 DS 疾病的发生发展过程相关。

3 讨 论

DS 以原发性、持久性阴性症状为基本特征。与 NDS 相比,DS 患者表现为临床疗效差、明显预后不良、衰退严重,可能是一种独立疾病亚型,对其研究有助于阐明 SCH 临床不同结局的特征性生物学机制。

利用蛋白质组学技术对 SCH 患者血液中的蛋白质进行分析比较,筛选出疾病相关蛋白,在此基础上对这些疾病相关蛋白表达水平、修饰情况、功能、作用通路等作进一步的研究,将可能发掘出 SCH 疾病相关生物标志以及药物作用靶点,并对 SCH 的发病机制、病理生理学基础的理解提供线索^[7-8]。目前 SCH 蛋白质组学研究发现,较之于健康人群,SCH 患者体内与能量代谢、神经传递、突触可塑性、钙稳态、免疫系统相关的一些蛋白质存在差异表达^[9-10]。

目前国内外尚未见 DS 患者外周蛋白表达情况的相关报道,本研究中首次利用蛋白质组学技术对中国汉族 DS 和 NDS 患者外周血清蛋白表达谱进行比较研究,并筛选出 18 个显著差异表达的蛋白点,其中有 15 个蛋白能够通过质谱鉴定出来。其中结合珠蛋白 Hp2 等在 DS 患者血清中表达上调。结合珠蛋白是肝脏合成的一种酸性糖蛋白,能与游离血红蛋白结合成稳定的复合物。同时结合珠蛋白也是一种急性期时相反应蛋白,当机体处在应激状态时,血液中的 Hp 明显增多。既往研究显示,SCH 患者体内结合珠蛋白水平较之健康人群显著升高^[11],且在利培酮治疗后患者血清中结合珠蛋白水平下降。而转甲状腺蛋白前体、血纤维蛋白溶酶原在 DS 患者中表达下调。转甲状腺蛋白基因位于 SCH 易感区域,转甲状腺蛋白在 SCH 患者中表达水平呈下降趋势^[12]。这些差异表达蛋白的

发现将为更好地研究 DS 这一疾病亚型、制定有效治疗策略提供帮助。

另外本研究中筛选到一个未见报道、功能未知的兴趣蛋白,该蛋白在 DS 患者中表达量显著高于 NDS 患者。推测该蛋白可能与疾病的发生发展过程相关。接下来将围绕该蛋白的功能开展相关工作,为明确该蛋白在 DS 发病机制、病理生理学中的作用提供必要线索。

本研究首次通过蛋白质组学技术揭示 DS 和 NDS 患者外周蛋白表达差异,这一研究结果将对更好地理解 DS 与 NDS 病因学差异、不同的病理生理过程提供线索,对于有效治疗提供帮助。

参考文献

- [1] Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, “just the facts” what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology[J]. Schizophr Res, 2008, 102(1/3): 1-18.
- [2] Carpenter WT and Strauss JS. The prediction of outcome in schizophrenia. IV: Eleven-year follow-up of the Washington IPSS cohort[J]. J Nerv Ment Dis, 1991, 179(9): 517-525.
- [3] Galderisi S, Maj M. Deficit schizophrenia: an overview of clinical, biological and treatment aspects[J]. Eur Psychiatry, 2009, 24(8): 493-500.
- [4] Kirkpatrick B, Galderisi S. Deficit schizophrenia: an update[J]. World Psychiatry, 2008, 7(3): 143-147.
- [5] Dickerson F, Kirkpatrick B, Boronow J, et al. Deficit schizophrenia: association with serum antibodies to cytomegalovirus [J]. Schizophr Bull, 2006, 32(2): 396-400.
- [6] 唐小伟, 耿德勤, 沙维伟, 等. 缺陷型与非缺陷型患者淋巴细胞数的比较研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2012, 38(11): 676-691.
- [7] Martins-De-Souza D, Dias-Neto E, Schmitt A, et al. Proteome analysis of schizophrenia brain tissue[J]. World J Biol Psychiatry, 2010, 11(2): 110-120.
- [8] Rachel MC, Jeffrey TH, Edmund Jackson, et al. Increased alpha-defensins as a blood marker for schizophrenia susceptibility[J]. Mol Cell Proteomics, 2008, 7(7): 1204-1213.
- [9] Tucholski J, Simmons MS, Pinner AL, et al. Abnormal N-linked glycosylation of cortical AMPA receptor subunits in schizophrenia [J]. Schizophr Res, 2013, 146(1/3): 177-183.
- [10] Daniel MS, Wagner FG, Andrea S. Proteome analysis of schizophrenia patients Wernicke's area reveals an energy metabolism dysregulation[J]. BMC Psychiatry, 2009, 20(9): 17-25.
- [11] Wan C, La Y, Zhu H, et al. Abnormal changes of plasma acute phase proteins in schizophrenia and the relation between schizophrenia and haptoglobin (Hp) gene[J]. Amino Acids, 2007, 32(1): 101-108.
- [12] Nakagawa N, Yao H, Nakahara T, et al. Serum of transthyretin as a treatment-responsive biomarker for schizophrenia [J]. Brain Nerve, 2013, 65(9): 1093-1099.

(收稿日期: 2015-05-01)

