

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001893

Clus-human 蛋白在精神分裂症患者脑脊液中的差异表达

黄小宇, 黎雪梅

(重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:分析精神分裂症患者脑脊液中蛋白质的差异表达。**方法:**选取精神分裂症及非精神分裂症患者各 12 例,抽取脑脊液,用蛋白质分离技术——二维聚丙烯酰胺凝胶技术和蛋白质识别与鉴定技术——生物质谱技术筛选脑脊液中标志性蛋白质。**结果:**精神分裂症组 Clus-human 蛋白含量为 $(2.560 6 \pm 0.319 2) \mu\text{g/L}$,对照组 Clus-human 蛋白含量为 $(2.134 9 \pm 0.418 7) \mu\text{g/L}$,精神分裂症蛋白 Clus-human 含量与对照组 Clus-human 含量具有统计学差异($t=2.801, P=0.010$)。**结论:**精神分裂症患者脑脊液中发现 Clus-human 蛋白,对精神分裂症的诊断可能具有重要意义。

【关键词】精神分裂症; Clus-human 蛋白; 蛋白标志物; 质谱分析

【中图分类号】R749.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-02-15

Differential expression of Clus-human protein in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia

Huang Xiaoyu, Li Xuemei

(Department of Psychiatry, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the differential expression of proteins in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. **Methods:** A total of 12 patients with schizophrenia and 12 patients without schizophrenia were enrolled. Cerebrospinal fluid was collected, and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for protein separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for protein recognition and identification were used to screen out symbolic proteins in cerebrospinal fluid. **Results:** There was a significant difference in the content of Clus-human protein between the schizophrenia group and the non-schizophrenia group ($2.560 6 \pm 0.319 2 \mu\text{g/L}$ vs. $2.134 9 \pm 0.418 7 \mu\text{g/L}$, $t=2.801, P=0.010$). **Conclusion:** Clus-human protein is found in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia and may have important significance in the diagnosis of schizophrenia.

【Key words】schizophrenia; Clus-human; protein marker; mass spectrometry

精神分裂症是至今未明确病因的重型精神疾病,病情多反复发作甚至造成社会功能明显受损^[1]。据 WHO 推算,过去十年精神疾病负担上升至我国疾病总负担的四分之一,精神疾病在我国疾病总负担的排名中居首位^[2]。20 世纪 90 年代,精神分裂症在全球非致命疾病负担排名中位列第十,占失能寿命损失年(year of life with disability, YLD)的 2.6%。2000 年上升至 2.8%,位列第七^[3]。精神分裂症所致的社会及家庭负担不容忽视,针对开展精神分裂症

的病因研究不容耽搁。

精神分裂症的诊断及鉴别诊断主要根据患者的临床表现,缺乏客观的特异性实验室证据。国内外关于精神分裂症血清蛋白组学取得重大的发展, Zhou 等^[4]运用生物质谱技术(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)分析首发精神分裂症患者的血清蛋白谱,表明血纤维蛋白肽是有潜力的精神分裂症的生物标志物。四川省泸州医学院精神科利用 CM10 蛋白芯片对 84 份血清样品进行检测,通过精神分裂症患者与对照组血清蛋白质指纹图谱对照,筛选出其中 6 个有明显表达差异的标志蛋白,结果显示这些差异蛋白为精神分裂症的实验室诊断提

作者介绍:黄小宇, Email: 675336848@qq.com,

研究方向:精神分裂症。

通信作者:黎雪梅, Email: 981917802@qq.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181126.1659.002.html>

(2018-11-27)

供了潜在意义^[5]。浙江省湖州市第三人民医院应用表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术筛查出精神分裂症患者血清锰过氧化物歧化酶蛋白显著低表达^[6]。以上前期研究尚存在血液中对蛋白标志物的影响因素多,如地域、饮食、其他器质性疾病及患病病程等对血清蛋白影响不明确。麦克莱恩医院通过对 15 例精神分裂症患者脑组织进行解剖及免疫组学研究发现 Clus-human 蛋白是广泛分布在前额叶皮层的细胞类型,在精神分裂症患者中细胞外液的 Clus-human 蛋白明显增加^[7]。

1 对象与方法

1.1 对象

均符合世界卫生组织精神与行为障碍类别目录(ICD-10)的首发精神分裂症诊断标准的精神分裂症诊断。共 12 例,男性 7 例,女性 5 例。对照组为该院同期的住院病人 12 例,男性 7 例,女性 5 例。实验组与对照组一般情况比较,无统计学差异(表 1)。

1.2 方法

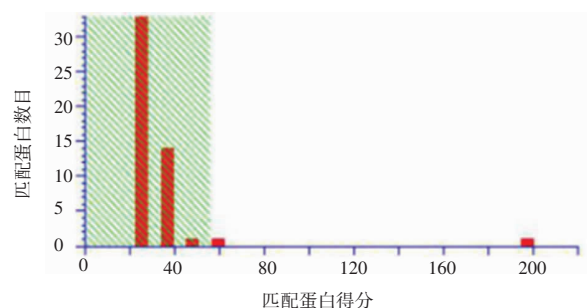
丙酮沉淀法提取脑脊液蛋白。固相 pH 梯度双向凝胶电泳:第一向等电聚焦;胶条平衡;第二向 SDS-PAGE 电泳。染色:使用考马斯亮蓝染色;再放入考马斯亮蓝 R250 染色液、乙醇、冰醋酸振荡;放入脱色液中脱色使蛋白点显示。凝胶通过 Image Scanner 扫描仪以及 Labscan 3.0 扫描软件获取图像。采用 SPSS19.0 软件采用独立样本 *t* 检验比较实验组与对照组蛋白含量升高值差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。用 MALDI-TOF MS 得到肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF)数据后,利用 MASCOT 软件分析处理。NCBI 数据库检索:选择互联网上 NCBI 数据库,限定物种。蛋白质功能分析和临床检测。

2 结果

2.1 质谱分析

应用 MALDI-TOF MS 筛查精神分裂症患者脑脊液中的蛋白标志物。通过 NCBI 数据库检测脑脊液蛋白质谱数据发现了精神分裂症组存在高表达(得分为 198)的某蛋白。通过

对这个蛋白进行氨基酸序列分析,发现该蛋白与 Clus-human 蛋白序列匹配,因此证明此蛋白为 Clus-human 蛋白,即丛生蛋白(图 1)。



蛋白质分值是由离子分值得出的蛋白评分大于 56,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);图中阴影线为可靠结果的区分

图 1 蛋白质谱分析图

2.2 对照组及实验组 Clus-human 蛋白含量

实验组 Clus-human 蛋白含量(2.5606 ± 0.3192)升高,较对照组该蛋白含量(2.1349 ± 0.4187)升高具有统计学差异($t=2.801, P=0.010$)。

3 讨论

精神分裂症是重型精神疾病,导致患者精神残疾,最终导致患者的社会功能损害,加重家庭和社会负担。目前缺乏关于协助诊断精神分裂症的特异性实验室检查。当前国内外均对精神分裂症的病因积极进行了许多相关研究。精神分裂症诊断及鉴别由于缺乏有效的客观的实验诊断依据,仅仅依靠临床症状诊断,因此容易造成对某些精神分裂症的评定产生分歧、鉴定困难及诊断主观性较强。精神分裂症的基因组学研究,揭示了病理生理相关基因的表达情况,表明精神分裂症患者存在基因表达的异常^[8],精神分裂症患者的蛋白质表达也随着基因表达改变而发生相应改变^[9]。因此,关于精神分裂症脑脊液差异蛋白进行的研究,能帮助发现精神分裂症特异性的蛋白标志物,进而为临床诊断提供可靠的实验室证据。

表 1 实验组与对照组一般资料比较

组别	年龄(岁)	身高(cm)	体质量(kg)	性别(n,%)		基础疾病(n,%)	
				男	女	有	无
实验组(n=12)	31.5 ± 2.3	164.7 ± 7.0	61.0 ± 11.5	7(58.3)	5(41.7)	0(0)	12(100)
对照组(n=12)	29.8 ± 1.9	165.9 ± 7.1	61.0 ± 13.5	7(58.3)	5(41.7)	2(16.7)	10(83.3)
χ^2 值	1.998	-0.405	-0.160	0.000		2.182	
P 值	0.058	0.689	0.987	1.000		0.140	

一直以来,有各种假说试图阐明精神分裂症的发病机制,包括神经发育学说^[10]、神经变性学说^[11]、神经递质异常^[12-13]、病毒感染学说^[14]、免疫功能障碍和自身免疫学说^[15-16]等。目前,倾向于认为该病是由先天遗传易感性和后天环境影响为主导的多因素疾病^[17]。脑脊液作为大脑组织的内循环,由于血脑屏障的作用,脑脊液的蛋白标志物影响因素较血液少,其特异性及敏感性更高。本研究主要检测精神分裂症患者脑脊液蛋白质的差异表达,并对其进行功能分析,希望在精神分裂症发病机制方面取得一些进展,同时发现一些有意义的差异表达的蛋白质,为临床实验室诊断和治疗药物的开发提供参考。

Clus-human 蛋白有 2 种亚型,2 种蛋白亚型有着相反的生物学作用。在精神分裂症中 Clus-human 蛋白的基因表达似乎显著调节抑制性神经元^[18]。所以在精神分裂症中 Clus-human 蛋白起着抑制大脑皮层活动,可能在防止大脑病变过程中起着重要作用。在我们的实验中,发现 Clus-human 蛋白在精神分裂症组中有表达。Clus-human 蛋白在机体中防止大脑病变可能起着重要作用,故其在精神分裂症患者脑脊液中含量可能反应性升高。目前最新研究发现在精神分裂症患者脑组织细胞外液的 Clus-human 蛋白显著高表达,同时此蛋白由脑脊液样本通过蛋白组学技术获得,脑脊液作为大脑组织的内循环,所以 Clus-human 蛋白在精神分裂症诊断中可能具有特异性。但本研究尚存在以下不足:①样本量小,需要扩大病例检测并进行随访观察,以确立蛋白标志物的重复性和实验诊断模型的可靠性;②脑脊液取样本困难。

参 考 文 献

- [1] Ricolleau G, Charbonnel C, Lodé L, et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors[J]. *Proteomics*, 2006, 6 (6): 1963-1975.
- [2] 管丽丽, 杜立哲, 马 弘. 精神分裂症的疾病负担(综述)[J]. *中国心理卫生杂志*, 2012, 26(12): 913-919.
- [3] World Health Organization. The global burden of disease; 2004 update[R/OL]. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/.
- [4] Zhou N, Wang J, Yu Y, et al. Mass spectrum analysis of serum biomarker proteins from patients with schizophrenia[J]. *Biomedical Chromatography*, 2014, 28(5): 654-659.
- [5] 刘建君, 白克镇. 精神分裂症的蛋白组学研究新进展[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2008, 8(2): 153-155.
- [6] 刘建君, 白克镇. 应用 SELDI-TOF-MS 技术筛查精神分裂症血清蛋白标志物[J]. *上海精神医学*, 2010, 22(3): 136-139.
- [7] Athanas KM, Mauney SL, Woo TW. Increased extracellular clusterin in the prefrontal cortex in schizophrenia[J]. *Schizophr Res*, 2015, 169(1-3): 381-385.
- [8] Yu JT, Tan L. The role of clusterin in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis, and therapy[J]. *Mol Neurobiol*, 2012, 45 (2): 314-326.
- [9] Li H, Zhang X, Guo Y, et al. A case-control study of genetic association of the PLA2G4A gene with schizophrenia in a Chinese population[J]. *Psychiatr Genet*, 2007, 17(3): 205.
- [10] Steiner J, Bielau H, Bismstein HG, et al. Increased cerebrospinal fluid and serum levels of S100B in first-onset schizophrenia are not related to a degenerative release of glial fibrillar acidic protein, myelin basic protein and neurone-specific enolase from glia or neurones[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006, 77(11): 1284-1287.
- [11] Franck N, Georgieff N. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia[J]. *Rev Prat*, 2002, 52(11): 1202-1207.
- [12] Archer T. Neurodegeneration in schizophrenia[J]. *Expert Rev Neurother*, 2010, 10(7): 1131-1141.
- [13] Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia-emerging role of glutamate mechanisms[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, 31(2/3): 302-312.
- [14] Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies [J]. *Am J Psychiatry*, 2010, 167(3): 261-280.
- [15] 刘 辉, 邵岩华, 王家学. 精神分裂症血清中自身抗体与 Fas 诱导因子活性关联[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(2): 136-139.
- [16] Strous RD, Shoenfeld Y. Schizophrenia, autoimmunity and immune system dysregulation: a comprehensive model up-dated and revisited[J]. *J Autoimmun*, 2006, 27(2): 71-80.
- [17] Roth TL, Lubin FD, Sodhi M, et al. Epigenetic mechanisms in schizophrenia[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(9): 869-877.
- [18] Jones SE, Jomary C. Clusterin[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(5): 427-431.

(责任编辑: 冉明会)