

精神分裂症患者血清蛋白表达差异的研究^{*}

程 松,郭婧澜,丁银环,王开正(泸州医学院附属医院检验科,四川泸州 646000)

【摘要】 目的 采用蛋白质组学技术筛选精神分裂症患者血清蛋白标志物,为该疾病寻找客观的临床诊断依据。**方法** 利用 CM10 芯片和表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术检测健康对照组和精神疾病组血清蛋白质谱。将筛查出的特异蛋白质峰通过查询蛋白数据库查找出相对应的蛋白质。**结果** 在健康对照组和精神疾病组中,筛选出差异有统计学意义的蛋白质峰 15 个($P<0.01$),相对分子质量分别为 $2\ 058.06\pm 0.70$ 、 $2\ 159.68\pm 0.60$ 、 $2\ 651.54\pm 0.42$ 、 $2\ 774.36\pm 0.35$ 、 $2\ 912.61\pm 1.69$ 、 $3\ 116.9\pm 0.81$ 、 $3\ 168.95\pm 1.82$ 、 $3\ 407.71\pm 1.33$ 、 $4\ 050.38\pm 0.68$ 、 $4\ 100.61\pm 0.36$ 、 $5\ 642.83\pm 1.69$ 、 $5\ 913.05\pm 0.16$ 、 $9\ 186.42\pm 3.01$ 、 $2\ 093.81\pm 1.46$ 、 $2\ 221.92\pm 1.82$ 。**结论** 精神分裂症患者与健康人相比存在有特异性的血清蛋白,这些特异的血清蛋白对该病的诊断具有一定价值。

【关键词】 精神分裂症; 表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术; 蛋白标志物

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.02.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)02-0145-02

Study on serum protein expression differences in patients with schizophrenia^{*} CHENG Song, GUO Jing-lan, DING Yin-huan, WANG Kai-zheng (Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

【Abstract】 Objective To use the proteomics technique to screen the serum protein markers in the patients with schizophrenia for seeking the objective clinical diagnosis basis of this disease. **Methods** The SELDI-TOF-MS technique and CM10 chip were adopted to detect serum protein spectrum in the mental diseases group and the healthy control group. The corresponding proteins for screened specific protein peaks were found by querying the protein database. **Results** In the mental disease group and the healthy control group, 15 protein peaks with statistical difference were screened out ($P<0.01$). Their relative molecular weights were $2\ 058.06\pm 0.70$, $2\ 159.68\pm 0.60$, $2\ 651.54\pm 0.42$, $2\ 774.36\pm 0.35$, $2\ 912.61\pm 1.69$, $3\ 116.9\pm 0.81$, $3\ 168.95\pm 1.82$, $3\ 407.71\pm 1.33$, $4\ 050.38\pm 0.68$, $4\ 100.61\pm 0.36$, $5\ 642.83\pm 1.69$, $5\ 913.05\pm 0.16$, $9\ 186.42\pm 3.01$, $2\ 093.81\pm 1.46$ and $2\ 221.92\pm 1.82$ respectively. **Conclusion** Compared with normal subjects, schizophrenia patients have specific serum protein, which may have certain diagnostic value in the diagnosis of this disease.

【Key words】 schizophrenia; SELDI-TOF-MS; protein markers

精神分裂症(schizophrenia)是一种常见精神病,主要表现为环境和精神活动不协调^[1]。目前进行强制医疗措施或司法鉴定时,由于没有客观的检测方法,往往会存在主观判断性太强的局限性。而表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术具有高效、快速、灵敏地检测微量蛋白的特点。利用该技术,本课题组在筛选精神分裂症蛋白标志物上取得了一定成果^[2-3]。该实验对精神疾病进行分组比对研究,筛选出差异表达的血清标志蛋白,并探讨其临床价值。

1 资料与方法

1.1 标本来源 取自于泸州医学院附属医院 2009 年 3 月至 2010 年 3 月门诊健康查体者和精神疾病住院患者血清标本共 145 例。精神疾病组 124 例,其中器质性精神障碍 11 例,抑郁症 14 例,焦虑障碍 30 例,精神分裂症 33 例,精神分裂症直系亲属 36 例。健康体检对照组 21 例。

1.2 主要试剂与仪器 无水醋酸钠(sodium acetate)、磷酸盐缓冲液(PBS buffer)、尿素(urea)、3-环乙胺-1-丙磺酸(CHAPS)、芥子酸(sinapinic acid)、三氟乙酸(TFA)、二硫苏糖醇(DTT)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液(Tris-HCl)、1

mol/L 盐酸(HCl)、氢氧化钠(NaOH)均购自美国 Sigma 公司。乙腈(acetonitrile)购自 Fluka 公司。蛋白质指纹图谱分析仪(PBS II/C)、CM10 蛋白芯片由 Ciphergen 公司提供。

1.3 方法

1.3.1 精神疾病诊断标准 抑郁症、焦虑障碍和精神分裂症患者诊断标准使用第 10 版的《国际精神疾病分类与诊断标准》(ICD-10),简明精神病评定量表(BPRS)评分大于或等于 30 分且无躯体疾病伴发。所有标本采用清晨空腹静脉血。

1.3.2 实验方法 按照 Ciphergen 公司提供的实验室操作规程完成,具体参照本课题已发表的报道^[2]。采集数据:为检测结合在 CM10 芯片表面的血清蛋白质,使用 PBS II/C 型蛋白质指纹图谱仪,调定最高检测相对分子质量为 100×10^3 ,优化范围为 $(2\sim 20)\times 10^3$,激光强度 220,检测敏感度为 9。然后再用 Biomarker Wizard 3.1 版本软件进行健康对照组和精神疾病组的蛋白质指纹图谱差异分析。

1.4 统计学处理 采用 Ciphergen Proteinehip 软件对采集到的血清图谱进行分析并计算出差异性,并以变异系数(CV)值表示,设定 $CV<15\%$ 时,不同芯片之间的实验误差为可接受范

^{*} 基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)重点项目(2006AA02090407)。 作者简介:程松,男,硕士,技师,研究方向为蛋白质组学与实验诊断。

围。使用 Biomarker Wizard 3.2 软件分析评估对照组和精神分裂症组的血清蛋白质指纹图谱,设置有意义的蛋白质峰出现频率阈值为 10%,分别设置 2 次信噪比过滤,第 1 次为 5,第 2 次为 2。确定这两组间蛋白质峰值比较时,对初筛的蛋白质峰进行 *t* 检验, $P<0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 差异蛋白质峰的检测 通过上述方法对各组间进行两两比较,筛选出差异有统计学意义的蛋白质峰 15 个($P<0.01$),见表 1。

表 1 精神疾病血清差异蛋白质的相对丰度

组别	<i>n</i>	2 058.06	2 159.68	2 651.54	2 774.36	2 912.61	3 116.9	3 168.35	3 407.71
精神分裂症组	33	11.28±3.83	14.00±4.68	12.90±7.18	32.00±17.03	7.31±8.71	12.80±4.62	16.10±5.74	12.80±5.41
焦虑障碍组	30	7.57±2.38	10.84±18.60	10.37±1.36	29.60±6.29	7.18±1.21	9.76±0.55	13.38±4.53	10.62±2.27
抑郁症组	14	6.68±1.97	7.69±4.89	6.87±0.77	21.01±4.28	4.64±0.76	7.99±0.26	8.51±1.89	8.02±0.19
器质性精神障碍组	11	7.63±0.33	9.27±6.41	7.34±4.56	22.31±1.55	6.91±2.26	7.09±3.37	13.80±16.28	7.07±1.34
精神分裂症直系亲属组	36	6.21±6.57	4.53±1.21	5.52±0.93	17.90±9.58	4.41±0.83	7.02±6.48	10.78±7.45	6.90±4.40
健康对照组	21	6.82±4.83	3.24±0.50	7.65±2.66	23.78±7.88	3.53±0.23	9.70±5.88	6.72±1.23	9.82±2.59
<i>P</i>		0.000 010	0.000 384	0.000 000	0.000 000	0.000 000	0.000 058	0.000 002	0.000 004

续表 1 精神疾病血清差异蛋白质的相对丰度

组别	<i>n</i>	4 050.38	4 100.61	5 642.83	5 913.05	9 186.42	2 093.81	2 221.92
精神分裂症组	33	7.72±2.33	36.90±12.50	15.70±9.48	28.00±23.49	24.00±23.43	9.20±12.26	11.80±8.30
焦虑障碍组	30	5.92±0.75	28.72±1.31	12.19±2.83	18.90±3.13	9.84±3.46	12.11±6.58	14.55±4.87
抑郁症组	14	5.87±0.16	25.78±4.01	9.05±3.49	21.20±15.09	17.81±3.18	12.68±7.33	17.50±5.61
器质性精神障碍组	11	6.64±1.16	26.77±2.98	10.43±1.53	20.43±9.34	18.50±12.78	19.03±20.60	19.45±21.10
精神分裂症直系亲属组	36	5.07±2.19	23.50±10.27	10.70±3.29	18.10±2.56	17.70±20.29	19.00±13.66	15.26±8.90
健康对照组	21	5.35±1.90	26.41±9.23	6.25±1.12	19.22±6.33	16.09±8.99	7.04±2.79	13.92±2.53
<i>P</i>		0.000 000	0.000 008	0.000 001	0.004 234	0.000 127	0.000 251	0.003 268

表 2 差异蛋白数据库检索结果

差异蛋白名称	相对分子质量
神经肽-2	2 058.06±0.70
SS-18	2 159.68±0.60
内皮素-3	2 651.54±0.42
胰岛素样三 A 链/早期胎盘胰岛素样肽链	2 774.36±0.35
胰岛素样肽 A 链	2 912.61±1.69
信号转导 CD24	3 116.90±0.81
莱姆域的异构体 2 含蛋白 1	3 168.95±1.82
Glicentin 相关肽/亚型 14 CKLF 样跨膜	3 407.71±1.33
神经内分泌调节肽-2/肽素	4 050.38±0.68
凝血酶轻链/神经内分泌调节肽-2	4 100.61±0.36
异构体脑急性白血病 6 和细胞质蛋白/未知功能蛋白的 PNAS-138	5 642.83±1.69
异构体 4 白细胞蛋白特异性转录 1/异构体 2 活性氧调制器 1	5 913.05±0.16
亚型 2 Luc7 样蛋白/β-catenin 的相互作用蛋白 1/线粒体内膜移位进口亚基 T	9 186.42±3.01
Neuropeptide 2	2 093.81±1.46
胆囊收缩素-18	2 221.92±1.82

2.2 145 例样品的差异蛋白质峰统计 (1)2 221.92 为精神分裂症特征性表达降低的蛋白质。(2)9 186.42、3 116.9 和 2 058.06 为精神分裂症特征性表达增高的蛋白质组。(3)焦虑障碍组有 16 个差异蛋白质与精神分裂症平行表达。(4)抑郁症组有 2 个多肽(2 093.81 和 2 159.68)同精神分裂症一样表达增高。(5)器质性精神障碍组有 3 个多肽(3 168.95、2 093.81 和 2 159.68)也同精神分裂症一样表达增高。(6)精神分裂症直系亲属组中 2 093.81 同其他精神疾病组一样表达增高但健康对照组不增高。

2.3 查阅蛋白数据库鉴定结果 通过查询蛋白数据库(<http://us.expasy.org/tools/tagident.html>),相对分子质量项(Mw)输入筛选得到的 15 个相对分子质量数值,种类项输入“homo sapiens(人类)”,并以质量偏差为 0.1%(与试验仪器质量偏差一致)。具体检索结果见表 2。

3 讨 论

目前为止,引起精神分裂症的分子机制仍未阐明。研究人员认为,在诸多精神分裂症的致病因素中,遗传因素起主导作用,它对该病的影响占到 70%^[4]。而基因组研究揭示了不同的病理和生理情况下精神分裂症的基因表达状况,表明精神分裂症患者表现出异常的基因表达^[5]。蛋白质作为基因表达的最终产物也随之变化,并具有特异性^[6]。

本研究利用 CM10 芯片和 SELDI-TOF-MS 技术对精神分裂症患者和健康人血清蛋白进行比对筛查,发现差异有统计学意义的蛋白质峰 15 个($P<0.01$)。

然而,本研究的不足之处在于未对以上蛋白质水平进行盲法模型验证,此外研究标本量偏小、影响其检验效能,需要扩大标本量来检测并进行随访观察;患者的人口学特点、病程、治疗、疾病严重程度对蛋白质的影响不明。综合国内外文献,普遍认为精神分裂症是由遗传基因介导的神经系统发育异常而引起的疾病,寻找易感基因是研究该疾病的重要方法之一^[7]。现代芯片技术和蛋白质组学技术分别研究 cDNA 和蛋白质,它们都具有高通量、高分辨率等特点,是研究(下转第 149 页)

- [4] 赵杰. 2 型糖尿病抵抗素基因单核苷酸多态性 (SNPs) 及胰岛素抵抗相关因素研究[J]. 内蒙古医学杂志, 2007, 39 (4): 416-419.
- [5] Collins FS, Guyer MS, Chakracarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation [J]. Science, 1997, 278(5343): 1580-1581.
- [6] Collins FS, Patrinos A, Jordan E, et al. New goal for the U. S. human genome project: 1998 — 2003 [J]. Science, 1998, 282(5389): 682-689.
- [7] Haffner SM, Kennedy E, Gonzalez C, et al. A prospective analysis of the HOMA mode [J]. Diabetes Care, 1996, 19 (10): 1138-1141.
- [8] 张芹, 骆天红, 张宏利, 等. Cnbl 基因多态性与 2 型糖尿病相关性研究[J]. 诊断学理论与实践, 2007, 6(2): 115-118.
- [9] Kim KH, Lee K, Moon YS, et al. A cysteine-rich adipose-tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(14): 1125-1126.
- [10] 李芳萍, 傅祖值. 抵抗素的研究[J]. 国外医学: 内科学分册, 2003, 30(3): 99-101.
- [11] 周强, 杨静, 罗森珊, 等. 肥胖人群脂联素、抵抗素和胰岛素抵抗水平的研究[J]. 检验医学, 2011, 26(1): 23-26.
- [12] 杨春香, 顾国浩, 卢大儒, 等. RBP4 多态性与 2 型糖尿病患者的相关性研究[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(3): 200-203.
- [13] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. Nature, 2001, 409(6818): 307-312.
- [14] RaJala MW, Obici S, Scherer PE, et al. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively insulin action on glucose production[J]. Clin Invest, 2003, 111(2): 173-174.
- [15] Sagawa N, Yura S, Itoh H, et al. Role of leptin in pregnancy: a review[J]. Placenta, 2002, 23 (Supply A): S80-S86.
- [16] Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, et al. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists [J]. Biol Chem, 2001, 276(28): 25651-25653.
- [17] Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285(2): 561-564.
- [18] 周强, 罗森珊, 林桢, 等. 2 型糖尿病患者 SNP+45 基因型与 SNP 和抵抗素的水平[J]. 中国热带医学, 2011, 11(3): 276-278.
- [19] 董艳, 李果, 骆天红, 等. 抵抗素基因多态性与华东地区 2 型糖尿病的相关性[J]. 上海第二医科大学学报, 2003, 23 (2): 97-99.
- [20] Sentinelli F, Romco S, Area M, et al. Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes: mutation analysis and population study[J]. Diabetes, 2002, 51(3): 860-862.

(收稿日期: 2013-06-22 修回日期: 2013-09-25)

(上接第 146 页)

基因与蛋白质之间相互作用的潜在技术^[8]。最近的实验证实了编码 N-乙酰马来酰亚胺敏感因子和突触蛋白 synapsin II、synaptotagmin5 的基因在一组精神分裂症患者的背侧前额皮质中表达水平偏低^[9]。另外, 芯片研究实验得到的最一致的结果是 RGS4 在精神分裂症患者的背侧前额皮质中表达水平下调^[10-11]。故寻找差异性表达的基因和蛋白之间的关联将可以进一步验证筛选出的 15 个蛋白质在精神分裂症中差异表达的真实性, 对研究精神分裂症的分子发病机制和诊断具有一定参考价值。

参考文献

- [1] 韩柏. 精神分裂症的现代研究[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2003: 2-12.
- [2] 姜伟, 王开正, 蔡美珠, 等. 精神分裂症血清蛋白指纹图人工神经网络诊断模型研究[J]. 中国神经精神病学杂志, 2008, 34(1): 27-30.
- [3] 丁银环, 胡琼英, 梁双花, 等. 运用内标校准法提高表面增强激光解吸电离飞行时间质谱检测中的重复性[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(3): 337-339.
- [4] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
- [5] 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): 205-209.
- [6] Steiner J, Biela H, Bernstein 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 neuron-specific enolase from glia or neurones[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006, 77(11): 1284-1287.
- [7] Rowland L, Bustillo JR, Lauriello J. Proton magnetic resonance spectroscopy (H-MRS) studies of schizophrenia [J]. Semin Clin Neuropsychiatry, 2001, 6(2): 121-130.
- [8] Vawter MP, Crook JM, Hyde TM, et al. Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: a preliminary study[J]. Schizophr Res, 2002, 58 (1): 11-20.
- [9] Gogos JA, Morgan M, Luine V, et al. Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 95(17): 9991-9996.
- [10] Marcotte ER, Srivastava LK, Quirion R. DNA microarrays in neuropsychopharmacology[J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 22(8): 426-436.
- [11] Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond[J]. Nature Genetics, 2003, 33 (Suppl): 311-323.

(收稿日期: 2013-07-22 修回日期: 2013-09-12)