

前血小板碱性蛋白对急性缺血性脑卒中的诊断意义

周罗绮^a,赵新玲^a,郭虹^b,潘邓记^a

摘要 目的:探索急性缺血性脑卒中患者血清中可能具有诊断意义的潜在生物标记物。**方法:**采集急性缺血性脑卒中患者血清73例及健康对照人群血清53例,从血清样本中提取蛋白后,应用相对和绝对定量同位素标记(iTRAQ)定量分析蛋白组学方法检测2组间的差异表达蛋白,采用生物信息学进行鉴定分析,并用western blot的方法进一步验证。绘制受试者工作特征曲线(ROC),计算曲线下面积(AUC),分析差异表达蛋白水平与急性缺血性脑卒中发病情况之间的关联。**结果:**急性缺血性脑卒中患者血清中前血小板碱性蛋白(PPBP)表达量较健康对照者升高1.47倍($P<0.01$);应用western blot验证发现PPBP在急性缺血性脑卒中患者血清中的表达量是健康人群的1.62倍($P<0.01$)。以通过PPBP表达含量为检验变量,患病与否为状态变量绘制ROC曲线, $AUC=0.7539$, $95\%CI=0.638\sim0.870$ ($P<0.01$)。**结论:**急性缺血性脑卒中患者血清中PPBP的表达量显著升高,可能是诊断急性缺血性脑卒中中潜在的生物标志物。

关键词 急性缺血性脑卒中;前血小板碱性蛋白;生物标记物

中图分类号 R741;R741.02;R743 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.08.001

Significance of Pro-Platelet Basic Protein in Diagnosis of Acute Ischemic Stroke ZHOU Luo-q^a, ZHAO Xin-ling^a, GUO Hong^b, PAN Deng-ji^a. a. Department of Neurology, b. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery; Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; Wuhan 430030; China

Abstract Objective: To investigate the serum biomarkers in acute ischemic stroke (AIS) patients that may be of potential diagnostic significance. **Methods:** Blood serum from 73 acute ischemic stroke patients and 53 health controls was collected. Proteins were isolated from serum samples then analyzed using the proteomics approach of isobaric tagging for relative and absolute quantitation (iTRAQ) to compare the differentially expressed proteins between the two groups. Bioinformatics was used for conformation and analysis, and the western blot was employed for further validation. The receiver operating characteristic (ROC) curve was created and the area under the curve (AUC) was calculated, and the relationship between differential protein expression and the occurrence of acute ischemic stroke was assessed. **Results:** Expression of pro-platelet basic protein (PPBP) showed a 1.47-fold increase in the AIS group ($P<0.01$) compared to that in the control group. Western blot revealed that PPBP expression in the AIS group was 1.62 times higher than that in the control group ($P<0.01$). With PPBP expression quantity as the test variable and patient or control as the status variable, we created the ROC curve which yielded $AUC=0.7539$, $95\%CI=0.638\sim0.870$ ($P<0.01$). **Conclusion:** The serum level of PPBP in AIS patients was significantly increased. PPBP may be a potential biomarker for the early diagnosis of AIS.

Keywords acute ischemic stroke; pro-platelet basic protein; biomarker

急性缺血性脑卒中是神经内科常见的重大疾病之一^[1],目前其临床诊断多通过临床表现、影像学检查等。如能找到特异性的生物标志物对卒中高危人群进行筛查、早期诊断高危个体、及时干预、评价干预效果甚至提供治疗靶点,对降低急性缺血性脑卒中的发病率及复发率有重要意义。

蛋白质是基因表达产物,其种类和数量在不同的生理、病理状态不同。每一种疾病人群的蛋白组的水平与机体所处的病理生理环境相关,所以蛋白组有助于了解疾病的发生机制。同位素相对标记与绝对定量技

术(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)结合液相串联质谱(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)的蛋白组学定量分析技术可检测出样本中蛋白组的水平,用于鉴定中枢神经系统疾病早期诊断的潜在生物标志物^[2-5]。

本研究运用蛋白组学结合LC-MS/MS技术及生物信息学,筛选急性缺血性卒中患者与健康人群血清中的差异蛋白,以寻找早期诊断急性缺血性脑卒中的潜在生物标记物。

作者单位

华中科技大学同济医学院附属同济医院 a. 神经内科, b. 耳鼻喉头颈外科
武汉 430030

基金项目

国家自然科学基金
(No. 81571206)

收稿日期

2018-06-26

通讯作者

潘邓记
279535082@qq.com
郭虹
guohongtjh@126.com

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2016年1月1日至2017年12月31日我科收治的急性脑梗死患者73例,男48例,女25例;均经头部MRI确诊。纳入同期本院健康体检者53例,男28例,女25例,排除既往脑卒中病史。所有受试患者被分为鉴定组及验证组。鉴定组包括急性脑梗死患者40例,男25例,女15例,平均年龄(54.4±11.76)岁;健康体检者20例,男10例,女10例,平均年龄(52.7±11.1)岁;取鉴定组患者血清用于蛋白组学检测,筛选差异表达蛋白质。验证组包括急性脑梗死患者33例,男23例,女10例,平均年龄(53.2±9.98)岁;健康体检者33例,男18例,女15例,平均年龄(54.0±11.8)岁;取验证组患者血清通过western blot验证差异蛋白表达量。所有受试者均知情同意,研究获医院伦理委员会审批。

1.2 方法

统计所有研究对象的年龄、性别、收缩压、舒张压、既往高血压、糖尿病、高血脂病史,及总胆固醇(totalcholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)、超敏C反应蛋白(hypertensive C-reactive protein, hs-CRP)检查结果。

抽取受试者空腹静脉血4 mL置于EDTA-真空管,4℃离心10 min(4 000 rpm),取上清液,以200 μL分装后-80℃储存。①蛋白组学实验方法:患者血清先用层析柱去除高峰蛋白,每组低丰度蛋白进行还原烷基化处理,用GE公司的2D-quant-kit法进行蛋白质浓度测定后,加入胰蛋白酶,37℃酶解过夜。iTRAQ标记试剂分别加入各管样品中,将标记好的各组样品混合。对混合后的肽段加入强阳离子交换buffer A,用phenomenex强阳离子交换色谱柱进行预分离,最后进行LC-MS/MS分析。原始质谱数据通过Proteome Discovery 1.2分析得到峰列表后,使用Mascot 2.3.02软件搜库进行蛋白质鉴定及定量分析以筛选出差异表达蛋白。②Western blot验证方法:将血清样本用PBS稀释5倍后通过BCA法测定浓度,每个样本取20 μg蛋白进行凝胶电泳,将蛋白转至PVDF膜,转膜条件为250 mA,45 min,4℃。经过5%脱脂牛奶室温封闭1 h后,TBST漂洗3遍,置于一抗前血小板碱性蛋白(preplatelet basic protein, PPBP)多克隆抗体(1:500, A1925, ABclonal公司)中4℃孵育过夜,次日TBST洗膜4遍,将膜置于二抗IPKine HRP,小鼠抗兔IgG LCS(1:10 000, A25022, Abbkine公司)中室温孵育1 h,洗

膜,显影。经凝胶分析软件统计其灰度值,同时用丽春红染色作为内参。计算PPBP在各组表达条带的灰度值。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料以率表示。组间比较采用独立样本均数t检验;以PPBP表达含量为检验变量,患病与否作为状态变量,绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析,并计算曲线下面积(area under curve, AUC), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征比较

鉴定组急性脑梗死患者收缩压及血HCY水平明显高于健康对照;年龄、性别、既往史及其他血液生化指标差异无统计学意义,见表1。验证组急性脑梗死患者的收缩压、高血压及糖尿病患病率、血HCY水平明显高于健康对照;年龄、性别等其他临床特征差异无统计学意义,见表2。

2.2 蛋白组学发现差异蛋白PPBP及western blot验证

蛋白组学筛选2组血清的差异表达蛋白,结果显示急性脑梗死患者血清中PPBP的表达量比健康对照者升高1.47倍($P<0.01$)。Western blot检测结果显示急性脑梗死患者血清中PPBP表达量比健康对照者升高1.62倍($P<0.01$),表达趋势与蛋白组学结果一致,见图1。

2.3 ROC曲线分析PPBP诊断急性缺血性脑卒中的效能

以通过western blot检测的PPBP表达含量为检验变量,患病与否为状态变量绘制ROC曲线,AUC=0.7539,95%CI=0.638~0.870($P<0.01$),提示PPBP可能可作为急性脑梗死患者潜在的早期诊断生物学标志物,见图2。

3 讨论

研究显示,在一定时间窗内静脉溶栓和动脉内机械取栓治疗急性脑梗死安全、有效^[6-9]。但目前临床上还没有可以应用于评价该病的生物标记物,寻找一种能够帮助风险评估、早期诊断、指导治疗、判断预后的分子生物学指标对降低卒中发病率及改善卒中患者预后均具有重要意义。适用于临床的生物标记物应当符合快速、经济、特异性及灵敏度高的条件。本研究着眼

表1 鉴定组临床特征比较

组别	例数	年龄/(岁, $\bar{x}\pm s$)	男/女	收缩压/(mmHg, $\bar{x}\pm s$)	舒张压/(mmHg, $\bar{x}\pm s$)
健康对照者	20	52.7±11.10	10/10	129.0±17.4	77.5±10.8
急性脑梗死患者	40	54.4±11.76	25/15	141.5±17.6	82.2±10.1
P值		0.602	0.260	0.015	0.115

组别	高血压/[例(%)]	糖尿病/[例(%)]	冠心病/[例(%)]	高血脂/[例(%)]	吸烟/[例(%)]	饮酒/[例(%)]
健康对照者	8(40.0)	2(10.0)	3(15.0)	3(15.0)	7(35.0)	2(10.0)
急性脑梗死患者	27(67.5)	10(25.0)	4(10.0)	5(12.5)	18(45.0)	10(25.0)
P值	0.065	0.203	0.529	0.735	0.561	0.203

组别	TC/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	TG/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	LDL/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	HCY/(μ mol/L, $\bar{x}\pm s$)	hs-CRP/(μ mol/L, $\bar{x}\pm s$)
健康对照者	3.9±0.7	1.6±0.9	2.3±0.6	11.0±4.3	7.1±11.3
急性脑梗死患者	3.6±0.9	1.4±0.7	2.1±0.8	16.1±8.9	2.1±0.8
P值	0.364	0.360	0.541	0.023	0.345

表2 验证组临床特征比较

组别	例数	年龄/(岁, $\bar{x}\pm s$)	男/女	收缩压/(mmHg, $\bar{x}\pm s$)	舒张压/(mmHg, $\bar{x}\pm s$)
健康对照者	33	54.0±11.8	18/15	129.9±16.3	79.6±10.2
急性脑梗死患者	33	53.2±9.98	23/10	142.7±20.0	84.2±10.1
P值		0.758	0.210	0.010	0.080

组别	高血压/[例(%)]	糖尿病/[例(%)]	冠心病/[例(%)]	高血脂/[例(%)]	吸烟/[例(%)]	饮酒/[例(%)]
健康对照者	11(33.3)	2(6.1)	5(15.2)	3(9.1)	9(27.3)	6(18.2)
急性脑梗死患者	22(66.7)	10(30.3)	3(9.1)	3(9.1)	16(48.5)	11(33.3)
P值	0.006	0.010	0.458	1.000	0.078	0.164

组别	TC/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	TG/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	LDL/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	HCY/(μ mol/L, $\bar{x}\pm s$)	hs-CRP/(mg/L, $\bar{x}\pm s$)
健康对照者	3.9±0.8	1.5±0.8	2.3±0.7	11.3±3.7	5.3±13.8
急性脑梗死患者	3.6±1.0	1.7±1.3	2.1±0.7	15.6±7.6	5.0±9.3
P值	0.339	0.460	0.167	0.005	0.917

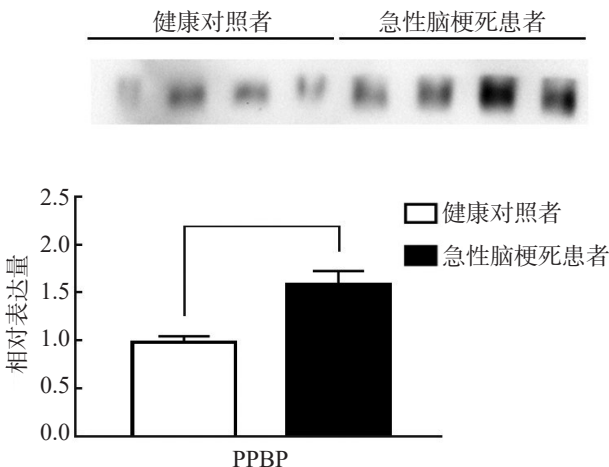


图1 western blot检测2组患者血清中PPBP蛋白表达量

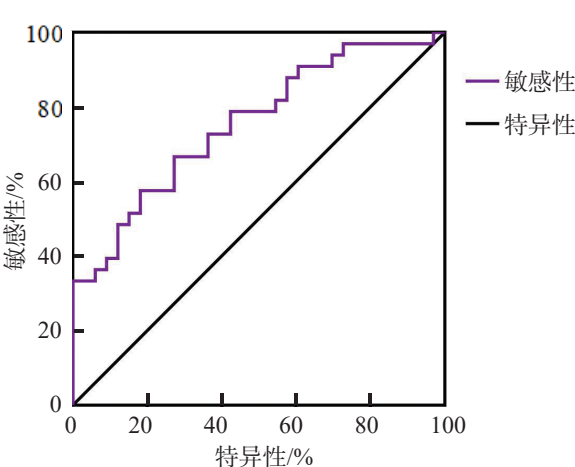


图2 PPBP诊断急性脑梗死的ROC曲线

于外周血液中蛋白组学的变化,寻找可应用于评价急性脑梗死的快速、便捷、低成本的生物标记物。

PPBP 又称为趋化因子7(C-X-C motif chemokine ligand 7, CXCL7)或中性粒细胞活化肽2(neutrophil-activating peptide-2, NAP-2),是属于CXC趋化因子家族的血小板衍生生长因子。PPBP可以通过调节N-甲

基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体的功能减轻猫大脑中动脉梗死(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后的脑损伤^[10]。PPBP还与多种疾病的病理生理机制相关,如PPBP促进淋巴细胞和内皮细胞激活,诱导炎症应答,促进动脉粥样斑块的形成和破裂^[11];PPBP可以通过抑制MCAO后大鼠脑内神

经型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)的活性,减少梗死后局部产生的一氧化氮,发挥神经保护作用^[12]。PPBP与炎症反应密切相关,在周围系统中可促进嗜中性粒细胞的粘附及迁移^[13],在中枢神经系统可以通过稳定线粒体膜及抑制小胶质细胞的激活发挥脑保护作用^[14]。PPBP已被确认为视网膜中央静脉缺血闭塞过程中增加的炎性生物标志物^[15],并为高脂血症患者冠心病发生的潜在危险因素^[16]。

本文用蛋白质组学定量分析的方法,对健康对照和急性缺血性脑卒中患者的血清进行分析,发现PPBP在急性脑梗死患者血液中显著升高,并通过western blot进一步验证了这个趋势。ROC曲线显示,PPBP诊断急性脑梗死的特异性和灵敏度均较好,有希望作为潜在的生物学诊断指标。但本研究为单中心小样本研究,得到确切的结论还需进一步的实验研究。

参考文献

[1] 吴亚哲, 陈伟伟. 中国脑卒中流行概况[J]. 心脑血管病防治, 2016, 16: 410-414.
[2] Zhan Y, Yang YT, You HM, et al. Plasma-based proteomics reveals lipid metabolic and immunoregulatory dysregulation in post-stroke depression[J]. Eur Psychiatry, 2014, 29: 307-115.
[3] Shen L, Liao L, Chen C, et al. Proteomics Analysis of Blood Serums from Alzheimer's Disease Patients Using iTRAQ Labeling Technology[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 56: 361-378.
[4] Mapstone M, Cheema AK, Fiandaca MS, et al. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults[J]. Nat Med, 2014, 20: 415-418.
[5] Sharma R, Gowda H, Chavan S, et al. Proteomic Signature of Endothelial Dysfunction Identified in the Serum of Acute Ischemic Stroke Patients by the iTRAQ-Based LC-MS Approach[J]. J Proteome Res, 2015, 14: 2466-2479.

[6] Goyal M, Menon BK, Van Zwam WH, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials[J]. Lancet, 2016, 387: 1723-1731.
[7] Emberson J, Lees KR, Lyden P, et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials[J]. Lancet, 2014, 384: 1929-1935.
[8] Hao Y, Yang D, Wang H, et al. Predictors for Symptomatic Intracranial Hemorrhage After Endovascular Treatment of Acute Ischemic Stroke[J]. Stroke, 2017, 48: 1203-1209.
[9] Whiteley WN, Emberson J, Lees KR, et al. Risk of intracerebral haemorrhage with alteplase after acute ischaemic stroke: a secondary analysis of an individual patient data meta-analysis[J]. Lancet Neurol, 2016, 15: 925-933.
[10] Takahashi H, Kirsch JR, Hashimoto K, et al. PPBP [4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine], a potent sigma-receptor ligand, decreases brain injury after transient focal ischemia in cats[J]. Stroke, 1995, 26: 1676-1682.
[11] Smith C, Damas JK, Otterdal K, et al. Increased levels of neutrophil-activating peptide-2 in acute coronary syndromes: possible role of platelet-mediated vascular inflammation[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48: 1591-1599.
[12] Goyagi T, Goto S, Bhardwaj A, et al. Neuroprotective effect of sigma(1)-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) is linked to reduced neuronal nitric oxide production[J]. Stroke, 2001, 32: 1613-1620.
[13] Schenk BI, Petersen F, Flad HD, et al. Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL)7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration[J]. J Immunol, 2002, 169: 2602-2610.
[14] Wegleiter K, Hermann M, Posod A, et al. The sigma-1 receptor agonist 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) protects against newborn excitotoxic brain injury by stabilizing the mitochondrial membrane potential in vitro and inhibiting microglial activation in vivo[J]. Exp Neurol, 2014, 261: 501-509.
[15] Ehlken C, Grundel B, Michels D, et al. Increased expression of angiogenic and inflammatory proteins in the vitreous of patients with ischemic central retinal vein occlusion[J]. PLoS One, 2015, 10: e0126859.
[16] Maneerat Y, Prasongsukarn K, Benjathummarak S, et al. PPBP and DEFA1/DEFA3 genes in hyperlipidaemia as feasible synergistic inflammatory biomarkers for coronary heart disease[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16: 80.

(本文编辑:唐颖馨)