帕金森病的蛋白质组学研究进展

陈曼,邢红霞
(新乡医学院第一附属医院神经内科,河南 新乡 453100)

摘要:帕金森病的发病病因及机制目前尚不明确,一般认为涉及线粒体功能障碍、氧化应激、免疫异常等诸多过程。寻找出能够提供诸多信息的生物学标志物将会给帕金森病的诊断及治疗带来显著意义。近年来,蛋白质组学的研究与发展的深入,为探究帕金森病的发病病因及其早期诊断提供了良好的技术支持,成为研究中的一个重要工具。因此该文着重论述帕金森病相关蛋白质组学的最新研究进展。

关键词:帕金森病;蛋白质组;蛋白质组学
doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.10.002

Progress in proteomics research of Parkinson's disease

CHEN Man, XING Hongxia
(*Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan* 453100, *China*)

Abstract: The pathogenesis of Parkinson's disease is still not clear. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, immune abnormalities are thought to be major reasons. It is necessary to find the biomarkers which can provide a lot of information about the diagnosis and treatment of Parkinson's disease. In recent years, with the research and development, proteomics has become an important tool and provides good technical support to explore the pathogenesis of PD and its early diagnosis. Here is to make a review intends to discuss the recent findings of the proteomics field, focusing on Parkinson's disease. In parallel, we has discussed how proteomics may provide potent tools that deserve further exploitation.

Key words: Parkinson's disease; Proteome; Proteomics

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是较常见的随年龄进展的神经退行性疾病,其主要的临床表现为运动迟缓、肌强直、静止性震颤等运动症状及睡眠障碍、嗅觉减退、便秘等非运动症状。PD 的发病病因及机制目前尚不明确,一般认为可能与遗传、环境和老化等因素有关。其诊断主要依赖于明显的临床症状、体征和多巴胺能反应性,因此亟需寻找简易有效的方法以便能够早期诊断。蛋白质组学是应用各种技术,研究在特定的时间和空间上,细胞内的基因所表达的全部蛋白质,并分析其表达水平及修饰状态、了解蛋白质间的相互作用与联系、阐明蛋白质功能及生物生命活动规律的一门学科。蛋白质组学的发展为探究 PD 的发病机制及早期诊断提供了一个良好的途径。笔者就 PD 的蛋白质组学的最新研究进展作一介绍。

1 PD 相关蛋白的蛋白质组学研究

1.1 α-突触核蛋白(SNCA)与 PD 的蛋白质组学研究 SNCA 是 PD 中路易小体的主要组成成分,SNCA 本身没有神经毒性[1],SNCA 的突变单体、低聚物、翻译后修饰物(如磷酸化、硝化等)可刺激神经细胞并具有毒性,在 PD 的发病中发挥重要作用。

有学者研究证明,相比多系统萎缩疾病患者,PD 患者皮肤的自主神经纤维中有磷酸化的 SNCA 沉积[2],可为 PD 的鉴别诊断提供一个可行方法。SNCA 突变体的聚集导致多巴胺神经元的死亡,是 PD 发病的关键因素。有人研究葡糖脑苷脂酶突变体与 PD 的关系,发现在突变体中,葡糖脑苷脂酶活性丧失 40%,干扰了溶酶体对 SNCA 的降解并引起蛋白质沉积,可能促进散发性 PD 的发病[3]。其作用机制可能因葡糖脑苷脂酶突变,蛋白质获得毒性或(和)突变导致其酶解效率降低[4]。对 SNCA 沉积机制将为探究 PD 的发生、发展提供重要依据。

现认为,多巴胺神经元中 SNCA 纤维聚集体、寡聚体、无定形性聚集体等形式对 PD 的发病有重要的作用。但这些是保护性反应物还是毒性产物,目前尚不清楚。Roberts 等[5]利用 SNCA 邻位连接技术,能够特异性识别 SNCA 寡聚体。已证实 SNCA 具有"朊病毒样"传递性,SNCA 寡聚体通过小胶质细胞胞吞作用在相邻细胞之间传递,诱导正常构象的 SNCA 蛋白错误折叠[6]。Braak 病理分期也认为

PD 病理改变是一个逐步累及整个大脑的过程。因此,抑制 SNCA 突变体的胞间传递可能是减少神经元损伤的重要途径。

1.2 DJ-1 与 PD 的蛋白质组学研究 DJ-1 蛋白广泛表达在神经元和神经胶质细胞中,是一种氧化应激保护蛋白,具有保护线粒体功能、维持线粒体内环境稳态等作用[7]。

Lev 等[8]利用来源于 DJ-1 蛋白的 13 个氨基酸片段和来源于 TAT 的 7 个氨基酸片段合成名为 ND-13,可穿透细胞的短肽。证实 ND-13 可保护神经细胞,并可恢复甲基苯基四氢吡啶(1-meth1-4-pheny1-,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)处理的小鼠模型脑中的多巴胺含量。Song 等[9]利用人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)转染方法发现 bcl-2 相关基因 2(BAG2)的过表达,可降低 MPTP 对线粒体膜电位的损毁,减少活性氧的生成和线粒体细胞色素 C 的释放,而 DJ-1 敲除后此作用消失,提示 BAG2 的神经保护作用可能是通过 DJ-1 介导。以上提示 DJ-1 蛋白功能丧失可引起细胞功能异常,最终促使 PD 的发生。

1.3 Parkin 与 PD 的蛋白质组学研究 Parkin 蛋白是一种 E3 连接酶,是细胞内代谢产物的清道夫。Parkin 基因突变所致的常染色体隐性遗传性 PD,是家族性 PD 最常见的形式。

Ozgul 等[10]利用二维液相色谱及质谱鉴定技术,测定在 SH-SY5Y 细胞内表达的野生型和突变型 Parkin 蛋白的差异,确认有 22 个蛋白质表达改变,其中 13 个是与调节蛋白折叠和能量代谢方面相关。有报道称 Parkin 蛋白突变相关的 PD 患者脑中路易小体缺失,因而 Parkin 蛋白被认为可促进路易小体的形成[11]。Parkin 蛋白翻译后修饰有多种形式。有学者提出 Parkin 蛋白丝氨酸残基可被不同的激酶磷酸化,磷酸化可影响其泛素化活动[12]。Im 等[13]发现双重特异性络氨酸磷酸化调节激酶 1A(DYRK1A)是 Parkin 蛋白新的结合物。DYRK1A 可直接磷酸化 Parkin 的 ser^{131} 残基,进而抑制 E3 泛素连接酶活性,进而导致 Parkin 与泛素结合酶 E2 及底物的亲和力降低。这些为探究 Parkin 介导的 PD 提供了依据。

1.4 富亮氨酸重复激酶(LRRK2)与 PD 的蛋白质组学的研究 LRRK2 位于细胞膜等膜结构,是一个具有 GTP 酶和激酶功能的蛋白质。其编码基因的突变是家族性 PD 常见的原因,其中突变体 G2019S 是最常见的致病形式,但 LRRK2 的更广泛的生理功能尚不明了。

LRRK2 突变导致的激酶活性增加是使其具有神经毒性的关键,已证实 LRRK2 突变可使蛋白质氧化和脂质过氧化物增加。因此减少或消除 LRRK2 突变体的表达可减弱对神经细胞的损伤。鉴于此,对于 LRRK2 抑制剂的研究将是治疗 PD 策略的新方向。Steger 等[14]利用 LC-MS/MS 蛋白质组学方法发现,突变的 LRRK2 可直接磷酸化 Rabs,从而降低与 Rab GDP 解离抑制剂在内的调节蛋白的亲和力。这在一定程度上揭示了 Rab GTP 酶为 LRRK2 的一个关键作用底物,促进激酶抑制剂的研究与发展。Li 等[15]确定了一个新型的 LRRK2 的 GTP 酶抑制剂,证实其可以抑制脂多糖诱导的小胶质细胞活化,且有较好的血脑屏障穿透性。Daher 等[16]提出另一个激酶抑制剂 PF-06447475,认为可缓解 G2019s-LRRK2 突变导致的相关神经炎症。探究 LRRK2 抑制剂相关作用将为 PD 的治疗提供新的思路。

2 蛋白质组学在 PD 患者中的研究

2.1 PD 患者脑组织中的蛋白质组学研究 Licker 等[17]利用双向凝胶电泳及质谱分析技术确定了 32 个差异性表达的蛋白点。免疫印迹技术进一步证明 PD 患者黑质中细胞非特异性肽酶 2(CNDP2)表达增加,免疫组化分析出多巴胺神经元胞质内有 CNDP2。有研究者提出 CNDP2 参与谷胱甘肽的生物合成。谷胱甘肽是重要的自由基清除剂,能对抗神经细胞的氧化损伤,提示 CNDP2 有一定的抗氧化作用。Liu 等[18]采用定量蛋白质组学方法确定 alphaB-晶状体蛋白(Cryab)表达上调显著。认为 Cryab 参与了 PD 中多巴胺神经元变性的病理过程,其表达上调可能是对炎症因子的保护性反应。Licker 等[19]利用蛋白质组学方法,筛选出 4 个可能与 PD 发病机制相关的蛋白质:ferritin-L、Seipin、γ-谷氨酰水解酶 GGH、nebulette。其中,ferritin-L 可能促进死亡的多巴胺神经元释放结合铁。这些研究为明确 PD 的病因学机制提供重要线索,也有助于发现有效的生物学诊断标志物和药物靶点。

2.2 PD 患者脑脊液中的蛋白质组学研究 Bäckström 等[20]采用 104 例早期 PD 患者、13 例进行核上性麻痹患者、30 例对照受试者,对脑脊液中的蛋白质成分进行比较,结合双盲蛋白定量测量法和回归分析,发现神经微丝轻链蛋白、心脏脂肪酸结合蛋白等表达增加,可能与帕金森病性痴呆(Parkinson's disease with dementia,PDD)相关。Lehnert 等[21]利用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术结合多反应性监测方法筛选出 14 种蛋白质,其

中非受体酪氨酸激酶 13 型在 PDD 中发现,认为可以作为 PDD 的诊断标记物。

Wang 等[22]利用双向电泳质谱技术结合基质辅助的激光解吸/电离技术(MALDI-TOF)联用电喷雾质谱分析脑深部电刺激之后,PD 患者脑脊液中共确定出 21 个蛋白质差异性表达。从而推测电刺激可以通过降低介导 PD 的相关蛋白质,减弱其诱导的毒性而发挥神经保护作用。为 PD 病因及治疗途径的探究带来新的依据。

2.3 PD 患者血清中的蛋白质组学研究 Zhang 等[23]把 iTRAQ 和二维液相色谱串联质谱分析等蛋白质组学技术相互结合,确定 PD 患者血清中共有 26 个差异性表达的蛋白质,其中 8 个蛋白质,包括血清转铁蛋白 Clusterin 表达增加;18 个蛋白质,包括补体 4b、载脂蛋白 A-I、凝血因子Ⅴ等表达下降。这些蛋白质与氧化应激、线粒体功能障碍、异常蛋白质聚集等病理过程有关。Alberio 等[24]采用 2-DE 等多种蛋白质组学相关技术筛选出 35 个 PD 相关蛋白。而结合珠蛋白(HP)和补体因子 H 起着调节和保护 CNS 自身免疫炎症反应及黑质多巴胺-纹状体系统完整性的作用,与 PD 的发病机制有着较为密切的联系,可以作为血清学的生物标记物。

3 蛋白质组学在 PD 模型中的研究

3.1 PD 动物模型的蛋白质组学研究 在 6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱导的小鼠模型中,Xiong 等[25]利用$^{18}O/^{16}O$ 标记、2D-LC 蛋白分离技术,在纹状体区域共辨认出 370 个非重复蛋白质。经 6-OHDA 的诱导,共有突触蛋白-1A,septin-5,动力蛋白 1 等 22 个蛋白表达变化。提示神经毒物刺激下,相关蛋白的变化可为阐明 PD 中纹状体的功能障碍机制提供线索。Garea-Rodríguez 等[26]在 6-OHDA 猕猴的 PD 模型中,对比对照组,发现脑多巴胺能神经营养因子可提高多巴胺转运蛋白结合活性,而胶质细胞源性神经营养因子增加酪胺酸反应阳性神经元数目较为明显。提示神经营养因子对于帕金森病的治疗可能有一定的作用。类似的,Padel 等[27]利用 6-OHDA 干预的 PD 小鼠模型,证实血小板衍生因子-BB 持续 2 周治疗会使 PD 模型病理行为部分恢复,提示这种生长因子可能影响黑质纹状体通路,具有神经修复效果。

Campello 等[28]利用双向电泳质谱分析技术,定量分析 MPTP 处理后 PD 猕猴模型视网膜中蛋白质丰度的变化。发现 13 个蛋白质表达下调,这些蛋白质都参与糖酵解,线粒体电子传递,光信号传导等途径。可认为经 MPTP 诱导之后视网膜神经元中出现能量代谢、视觉信号转导等相关功能的紊乱。Aimé 等[29]利用蛋白质组学技术,分析人类 PD 患者的大脑黑质致密带神经元,在经神经毒物诱导的 PD 大鼠动物模型的中脑腹侧神经元及细胞模型中,都证实 Tribbles 假性激酶 3(TRIB3)表达升高。进一步研究发现,TRIB3 过表达可加速神经细胞的死亡。TRIB3 及其调控途径可作为抑制 PD 中神经细胞死亡,减缓神经元退行性变性及丢失过程的重要控制因素。这些为 PD 发病机制及治疗方法的探究提供了思路。

3.2 PD 细胞模型的蛋白质组学研究 Shao 等[30]利用 MN9D 细胞系,分别用 1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 和 2.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$的甲基汞(MeHg)以及 MPTP 处理细胞,用高效液相色谱/电喷雾电离质谱光谱(HPLC-ESI-MS/MS)分析鉴定出三个实验组表达改变的蛋白质。发现其中相同的蛋白质参与丙酮酸盐代谢、脂肪酸代谢、过氧化物磷酸化等。提示 MeHg 和 MPTP 可能有共同作用途径导致 PD 发病。

Alberio 等[31]在 MPTP 诱导的 SH-SY5Y 的 PD 细胞模型中,比较多巴胺诱导后线粒体中蛋白质的改变。用鸟枪法定量化测定,发现线粒体蛋白酶碎片的累积,证明多巴胺可诱导激活线粒体中的蛋白水解酶,为帕金森综合征的治疗提供了依据。微小 RNA-7 表达在人和小鼠络氨酸羟化酶阳性的黑质神经元中,对神经细胞起保护作用。Choi 等[32]在 MPTP 诱导细胞 PD 模型中,利用液相色谱法结合串联质谱法分析:microRNA-7 介导使相关 mRNA 表达下调。研究者进一步也验证了 microRNA-7 具有保护 MPTP 诱导的细胞死亡作用。因此认为 microRNA-7 不仅参与 PD 发病,也可以作为 PD 的治疗靶点。

4 蛋白质组学在 PD 药物中的应用

Zhang 等[33]利用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)的方法深入研究分析认为,原儿茶酸和白杨黄素联合处理细胞后,通过上调抗氧化酶表达来调节细胞的氧化还原状态,也降低脂质过氧化物产物丙二醛的水平,从而保护神经细胞。这提示多种药物联合使用可能增强神经保护作用。Liang 等[34]在 PD 大鼠模型中,证实毛蕊花苷可以抑制 6-OHDA 引起的对神经元的损伤。Alberio 等[35]提取左旋多巴干预后患者的淋巴细胞,利用 2-DE 结合免疫化学证实:在 T 淋巴细胞中,ATP 合酶 β 亚基和蛋白酶体 β 亚基 2 型与左旋多巴的日剂量呈线性相关。经 H_2O_2 刺激后,又观察到过氧化物酶 6 表达下调。可判断 L-DOPA 不仅对多巴胺系统有影响还可能对免疫系统有一定作用。这些为指导新型药物开发

和临床用药有一定的作用。

5 结论

当前已经有很多研究正在逐渐阐明促使 PD 发病的因素。蛋白质组学以一种高通量大范围的蛋白质相关技术方法应用于 PD 的研究,包括 HPLC-ESI-MS/MS、iTRAQ、MALDI-TOF/TOF 等多种技术,为 PD 的病因学探究带来了很大便利。PD 的最新研究正是借助于蛋白质组学多种技术,揭示了 SNCA、DJ-1、LRRK2 等重要蛋白质与 PD 潜在关系。对于 PD 患者脑组织、脑脊液、血清的蛋白质组学研究,更加有助于发现特异性和灵敏度高的生物学标记物,对 PD 的早期诊断、治疗及预防具有重要的临床价值。而利用 MPTP、6-OHDA 等神经毒物构建的 PD 动物及细胞模型与蛋白质组学方法的结合则使人们能直观地阐明 PD 发生、发展,也发现具有药物研究价值的作用靶点和药物新作用。同时也应该认识到这项技术是对大量蛋白质的分析,因此,对于少量蛋白质更加准确的鉴定将会对 PD 的研究具有更大的促进作用。相信随着研究的深入和技术发展,将会有精准有效的方法诊断及治疗 PD。

参考文献

[1] SIDHU A,WERSINGER C,VERNIER P. Alpha-synuclein regulation of the dopaminergic transporter:a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. FEBS Letters,2004,565(1/3):1-5.

[2] ZANGE L,NOACK C,HAHN K,et al. Phosphorylated a-synuclein in skin nerve fibres differentiates Parkinson's disease from multiple system atrophy[J]. Brain,2015,138(Pt8):2310-2321.

[3] FISHBEIN I,KUO YM,GIASSON BI,et al. Augmentation of phenotype in a transgenic Parkinson mouse heterozygous for a Gaucher mutation[J]. Brain,2014,137(Pt12):3235-3247.

[4] MACHIYA Y,HARA S,ARAWAKA S,et al. Phosphorylated alpha-synuclein at Ser-129 is targeted to the proteasome pathway in a ubiquitin-independent manner[J]. J Biol Chem,2010,285(52):40732-40744.

[5] ROBERTS RF,WADE-MARTINS R,ALEGRE-ABARRATEGUI J. Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain[J]. Brain,2015,138(Pt6):1642-1657.

[6] OLANOW CW,BRUNDIN P. Parkinson's disease and alpha synuclein:is Parkinson's Disease a prion-like disorder[J]. Movement Disorders,2013,28(1):31-40.

[7] HAO LY,GIASSON BI,BONINI NM. DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function[J]. Proc Natl Acad Sci,2010,107(21):9747-9752.

[8] LEV N,BARHUM Y,BEN-ZUR T,et al. A DJ-1 based peptide attenuates dopaminergic degeneration in mice models of Parkinson's disease via enhancing Nrf2[J]. PLoS ONE,2015,10(5):e0127549.

[9] SONG Z,XU S,SONG B,et al. Bcl-2-associated athanogene 2 prevents the neurotoxicity of MPP via interaction with DJ-1[J]. J Mol Neurosci,2015,55(3):798-802.

[10] OZGUL S,KASAP M,AKPINAR G,et al. Linking a compound-heterozygous Parkin mutant (Q311R and A371T) to Parkinson's disease by using proteomic and molecular approaches[J]. Neurochem Int,2015,85-86:1-13.

[11] DAWSON TM,DAWSON VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. Science,2003,302(5646):819-822.

[12] YAMAMOTO A,FRIEDLEIN A,IMAI Y,et al. Parkinphosphorylation and modulation of its E3 ubiquitin ligase activity[J]. J Biol Chem,2005,280(5):3390-3399.

[13] IM E,CHUNG KC. A phosphorylates parkin at Ser-131 and negatively regulates its ubiquitin E3 ligase activity[J]. J Neurochem,2015,134(4):756-768.

[14] STEGER M,TONELLI F,ITO G,et al. Phosphoproteomics reveals that Parkinson\'s disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases[J]. Elife,2016,5:e12813.

[15] LI T,HE X,THOMAS JMA,et al. A novel GTP-binding inhibitor,FX2149,Attenuates LRRK2 Toxicity in Parkinson's disease models[J]. PLoS ONE,2015,10(3):e0122461.

[16] DAHER JP,ABDELMOTILIB HA,HU X,et al. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) pharmacological inhibition abates α-synuclein gene-induced neurodegeneration[J].J Biol Chem,2015,290(32):19433-19444.

[17] LICKER V,CÔTE M,LOBRINUS JA,et al. Proteomic profiling of the substantia nigra demonstrates CNDP2 overexpression in Parkinson's disease[J]. J Proteomics,2012,75(15):4656-4667.

[18] LIU Y,ZHOU Q,TANG M,et al. Upregulation of alphaB-crystallin expression in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease[J]. Neurobiol Aging,2015,36(4):1686-1691.

[19] LICKER V,TURCK N,KÖVARI E,et al. Proteomic analysis of human substantia nigra identifies novel candidates involved in Parkinson's disease pathogenesis[J]. Proteomics,2014,14(6):784-794.

[20] BÄCKSTRÖM DC,ERIKSSON DOMELLÖF M,LINDER J,et al. Cerebrospinal fluid patterns and the risk of future dementia in early,incident Parkinson disease[J]. JAMA Neurol,2015,72(10):1175-1182.

[21] LEHNERT S,JESSE S,RIST W,et al. iTRAQ and multiple reaction monitoring as proteomic tools for biomarker search in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia[J]. Exp Neurol,2012,234(2):499-505.

[22] WANG ES,YAO HB,CHEN YH,et al. Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients preand postdeep brain stimulation[J]. Cell Physiol Biochem,2013,31(4/5):625-637.

[23] ZHANG X,YIN X,YU H,et al. Quantitative proteomic analysis of serum proteins in patients with Parkinson's disease using an isobaric tag for relative and absolute quantification labeling,two-dimensional liquid chromatography,and tandem mass spectrometry[J]. Analyst,2012,137(2):490-495.