

研究报告

阿尔兹海默症血清多肽组生物标志物研究

孔祥怡¹ 杜建时² 马明³ 徐金玲⁴ 李水明⁴ 王勇⁴ 赵晴^{*3}¹(吉林大学白求恩医学部临床医学院, 长春 130021)²(吉林大学中日联谊医院血管外科, 长春 130033) ³(吉林大学中日联谊医院神经内科, 长春 130033)⁴(深圳大学生命与海洋科学学院, 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 深圳 518060)

摘 要 采用个体样品单独分析的方式分析, 比较 9 个健康对照者、10 个阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 患者和 12 个认知功能障碍 (Mild cognitive impairment, MCI) 患者的血清多肽组分析结果, 以寻找潜在的 AD 病生物标志物。结果表明, 高强度的 α -2-巨球蛋白肽段 VGFYESDVMGR 与 AD 病晚期阶段密切相关, 而载脂蛋白 C-III、组蛋白 H1.2 和组蛋白 H1.4 的大量降解, 则与中早期 AD 和认知功能障碍相关联; 载脂蛋白 C-III 和组蛋白 H1 的降解肽段具有明显的阶梯序列特征, 但在不同样本中的分布具有一定偶然性。AD 病发展的晚期与中早期的血清多肽组特征不同, 这 4 种蛋白质的降解有可能成为 AD 病潜在的生物标志物。研究结果也证明了, 归属于纤维蛋白原 α 链、胸腺素 β -4 和斑联蛋白等蛋白质的肽段是所有血清样本中的优势肽段。本研究提出了利用血清多肽组学方法辅助诊断 AD 病的方法, 为临床大规模验证提供了依据和参考。

关键词 多肽组; 生物标志物; 血清; 阿尔兹海默症; 认知功能障碍

1 引言

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与年龄相关的神经退行性疾病, AD 病目前尚无法治愈和逆转, 早期干预和诊断是延缓 AD 发生的重要途径^[1]。神经心理学量表测试、影像学检查和生物标志物检测是诊断 AD 病的 3 种主要方法^[2]。生物标志物是能够预测或反映特定生物过程变化的物质^[3], 目前公认的 AD 病生物标志物是脑脊液 (CSF) 中淀粉样蛋白 A β 42 水平的下降和磷酸化 tau 蛋白水平的升高^[4]。但是, 脑脊液检测是有损分析, 作为一种常规性检测很难普及, 而在血液、唾液和尿液等体液中寻找 AD 病的生物标志物, 具有取样方便和无创伤性的优点, 其中以血液在临床上最为常用。

Lista 等^[5]对基于质谱的 AD 病血液生物标志物进行了综述, 汇总了约 20 种蛋白质的含量改变和氧化应激可成为 AD 病的生物标志物, 并强调 AD 等神经退行性疾病的分子水平上的改变在出现临床症状的 20 年以前就可能发生。血液中 tau 蛋白和 A β 42 的含量很低, 不是理想的 AD 标志物, 但炎症和免疫相关蛋白质与 AD 病关系密切^[6]。在前期工作中, 本研究组利用 iTRAQ 定量标签技术对比 AD 病患者和年龄匹配对照组血清中的蛋白质, 发现了 S100A8 等 25 种差异表达蛋白, 有可能成为潜在的 AD 血液生物标志物^[7]。血液中磷脂类等小分子化合物也被用来预测 AD 病^[8]。O'Bryant 等^[9]指出, 基于血液的 AD 生物标志物在过去十余年取得了显著进展, 分析时间降低, 可接受性增强, 但重复性较差和缺少不同实验室之间的交叉验证制约了研究成果向医学临床的转化。尽管血液中多种蛋白质被认为有望成为 AD 病生物标志物, 但目前尚未见 AD 病多肽组生物标志物的相关报道。

氧化石墨烯-磷酸镧纳米磁性复合材料 (LaGM) 由石墨烯、LaPO₄ 纳米棒和 Fe₃O₄ 纳米粒子构成, 可快速富集生物样品中的低丰度多肽^[10]。在前期研究中, 本研究组利用该材料分离多肽, 建立了纳升液相色谱-高分辨串联质谱分析的血清多肽组鉴定方法^[11]。本研究采用单个样本逐一分析的方式, 通过对比 AD 组、认知功能障碍组 (Mild cognitive impairment, MCI) 和健康对照组血清多肽组结果的差异, 从蛋白质异常降解的角度寻找潜在的 AD 病标志物, 为临床诊断和药效跟踪等提供参考。

2017-04-18 收稿; 2017-05-17 接受

本文系吉林省科技厅项目 (Nos. 20130727029YY, 20150204057SF) 和深圳市科技项目 (No. JSGG2014070316383793) 资助

* E-mail: 1292860277@qq.com

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Eksigent nanoLC-Ultra™ 2D 纳升液相色谱系统、Triple TOF 5600 plus 高分辨质谱仪、Protein Pilot 4.5 软件(美国 AB SCIEX 公司);真空冷冻干燥机(美国 Thermo Savant 公司)。

纳升液相色谱流动相 A 为 0.1% 甲酸-2% 乙腈,流动相 B 为 0.1% 甲酸-98% (V/V) 乙腈; C_{18} 反相色谱捕集柱(100 $\mu\text{m} \times 3 \text{ cm}$, 3 μm , 150 $\text{\AA}$)、 C_{18} 反相色谱分析柱(75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$, 3 μm , 120 $\text{\AA}$, ChromXP Eksigent, 美国 Sciex 公司)。所用试剂均为分析纯或质谱纯,购于美国 Thermo 公司。氧化石墨烯-磷酸镧纳米磁性复合材料(LaGM)根据文献[10]自行合成。所有临床样品来自吉林大学中日联谊医院,符合人体样品使用要求,患者知情同意。

2.2 多肽的分离和富集

血清样本共 31 例,每例取 80 μL 人血清样品,加入 500 μL 去离子水,与 20 μL 30 mg/mL LaGM 复合材料混合,1000 r/min 振荡 10 min,磁分离,在沉淀中加入 500 μL 水,涡旋 1 min,振荡 5 min,磁分离去掉上清液。在沉淀中加入 20 μL 80% 乙腈+1% TFA(V/V)的洗脱液,涡旋 1 min,振荡 5 min,磁分离,收集上清液,冷冻干燥。

2.3 反相色谱-Triple TOF 质谱分析

将分离冻干的多肽样品溶解于流动相 A 中,在 Eksigent nanoLC-Ultra™ 2D 系统上进行色谱分析。样品溶液以 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速上样到 C_{18} 预柱(100 $\mu\text{m} \times 3 \text{ cm}$, 3 μm , 150 $\text{\AA}$),然后保持流速冲洗脱盐 10 min。分析柱是 C_{18} 反相色谱柱(75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$, 3 μm , 120 $\text{\AA}$, ChromXP Eksigent),梯度洗脱:70 min 内流动相 B 由 5% 升高至 80% (V/V)。质谱分析采用 TripleTOF 5600 系统结合纳升喷雾 III 离子源(AB SCIEX, USA),喷雾电压为 2.4 kV,气帘气压为 0.2 Mpa,雾化气压为 34 kPa,加热温度为 150℃,质谱扫描方式为数据依赖采集模式。

2.4 数据分析条件

质谱采集到的原始 wiff 图谱文件,采用 Protein Pilot Software v. 4.5(AB SCIEX, USA)软件进行数据加工处理和检索分析,数据库为 Uniprot 库中的 Homo sapiens 人种专一数据库(包含 20210 条蛋白质序列,2015 年 1 月 2 日下载),检索参数设置为非酶切,检索方式为彻底分析,假阳性率控制为 1% FDR。

3 结果与讨论

3.1 血清多肽组的个体差异及共同特征

相比于串联飞行时间质谱技术,高分辨的四极杆-飞行时间串联质谱的碰撞能更高,更易于鉴定非特异性酶切的肽段序列。例如,纤维蛋白原 α 链的肽段 FESKSYKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHA 由 29 个氨基酸构成,但在本实验中得到了几乎互补连续的 y、b 离子序列,还观察到了苯丙氨酸、组氨酸和谷氨酸的亚胺离子 m/z 120.08, m/z 110.07 和 m/z 102.08(图 1)。

本研究共对 9 例健康对照者、10 例 AD 病患者和 12 例认知功能障碍患者(MCI)的血清样品进行了多肽组成成分分析,结果如表 1 所示。对照组中肽段数目最少为 212 条,归属于 40 个蛋白质,最多则为归属于 130 个蛋白质的 1195 条肽段;在 AD 和 MCI 组中鉴定到的肽段数目最少分别为 261 和 406 条,蛋白质数目最少分别为 48 和 65 个蛋白质。而在 AD 组样品中,鉴定到的肽段数目最多为 956 条,蛋白质数目最多为 96 个,在 MCI 组中,肽段和蛋白质数目最多分别为 1095 和 123 个。总体上,AD 组和 MCI 组中的最高肽段数目约为最低数目的 2 倍,而在 9 例健康对照组样品中,鉴定到的肽段数目和蛋白质数目则分别相差 6 倍和 3 倍。这些结果说明,血清多肽组的个体差异很大,如果利用混合样品进行分析则不能发现这些差异。尽管如此,来自于纤维蛋白原 α 链、胸腺素 β -4 和斑联蛋白等蛋白质的肽段在所有个体血清样品中都为优势肽段,与前期研究结果一致^[10],例如,纤维蛋白原 α 链在全部 31 个血清样本的 28 样本个中鉴定分值排在第一位,在另外 3 个样本中排在第二位,其特异性肽段的

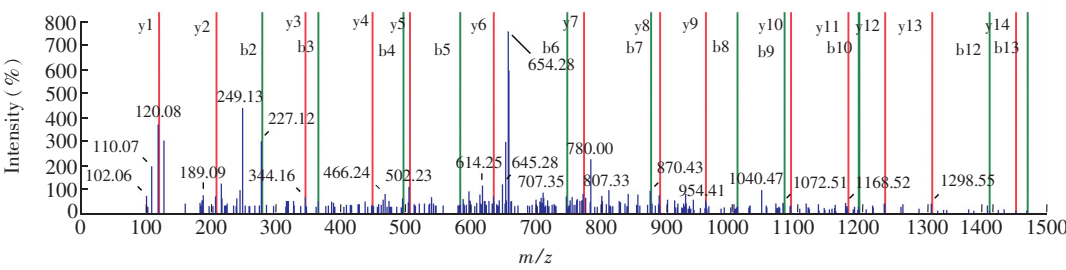


图 1 肽段 FESKSYKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHA 的串联质谱图

Fig.1 Tandem mass spectrum of peptide of FESKSYKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHA

表 1 31 个个体血清样本多肽组的肽段及其归属的蛋白质数目

Table 1 Number of peptides and proteins in proteome for 31 individual serum samples

对照组编号 Number of control	蛋白数目 #Proteins	肽段数目# Peptides	AD 组编号 Number of AD group	蛋白数目 #Proteins	肽段数目 #Peptides	MCI 组编号 Number of MCI group	蛋白数目 #Proteins	肽段数目 #Peptides
1	40	212	1	48	334	1	65	501
2	56	253	2	56	261	2	65	595
3	57	299	3	61	405	3	66	440
4	69	760	4	64	401	4	79	691
5	76	385	5	67	441	5	79	450
6	86	593	6	67	440	6	87	968
7	92	705	7	79	529	7	88	607
8	96	560	8	83	956	8	95	406
9	130	1195	9	92	641	9	96	777
			10	96	816	10	110	897
						11	112	1094
						12	97	769

AD, Alzheimer’s disease; MCI, cognitive dysfunction.

100 条以上，约占总检出肽段数目的 15% ~40%。

总体而言，在血清样品中检测到的肽段数目与其所归属的蛋白质数目具有正相关性，但个体差异仍然较大。例如，在对照组样品 6 中鉴定到归属于 86 个蛋白质的 593 个肽段，而在样本 4 中，测到了 760 个肽段，但对应的蛋白质仅有 69 个；在 MCI 和 AD 组样品中也都存在蛋白质数目和肽段数目不是严格正相关的情况。健康对照组和 AD 组所检出的平均肽段数目约为 550 条，对应 75 种蛋白质，而在 MCI 组中，平均肽段和蛋白质数目则分别为 710 和 88。以上结果表明，无论是疾病组，还是健康对照组样品，血清多肽组的鉴定数目都存在一定差异，这是因为即使不考虑相同序列肽段的强度差异，在定性分析的结果上也必然存在差异。既然在两个对照组结果之间都存在差异，可以推测，不是一组对照组和疾病组样品之间所有的多肽组差异都可作为潜在的生物标志物。例如，存在大量阶梯序列是血清多肽组的一个显著特征，这些肽段的结构具有相似性，但它们在不同个体样本中的分布具有随机性。例如，在对照组样品 1 和 2 中，含有序列 KMADEAGSEADHEGTHSTKRGHA 的相同肽段有 43 条，而含有该序列的不同肽段在样品 1 中有 6 个，在样品 2 中有 7 个。同理，随机比较对照样本 1 和 AD 样本 6 的分析结果发现，两个样本中也有 10 条共同肽段含有序列 KMADEAGSEADHEGTHSTKRGHA。因此，比较两个不同样本的正常多肽组分析结果，通常能找到一些相同肽段和不同肽段，相同肽段在纤维蛋白原 α 链、胸腺素 β -4 和斑联蛋白等优势蛋白中出现几率更高。另一方面，此结果也提示在寻找多肽组生物标志物时，应尽量降低偶然因素的影响。在以上 31 个样本中，归属于纤维蛋白原 α 链的肽段在单个样本中可测定到 50 条以上，最多则接近 300 条。Noguchi 等^[12]从 30 例 AD 病患者和 30 例健康对照样本血清中检测到了 157 条总肽段，根据离子强度分析，发现其中 60 个肽段有强度差异，但只鉴定了包括 10 条归属于纤维蛋白原 α 链的肽段在内的 16 条肽段的序列，并据此认为一些定量强度在 1.3 倍以内的纤维蛋白原 α 链可以作为 AD 病生物标志物。但该研究未考虑其分析方法的局限性。

3.2 蛋白质水平上血清多肽组标志物

前期结果表明,如果不同样品中同一蛋白或肽段的离子强度相差超过 3 倍,则可认为其含量具有差异^[13],本研究综合考虑相对定量和定性分析结果的差异,利用离子强度和检出肽段数目两种指标衡量不同样本血清多肽组结果的差异,寻找潜在的 AD 病和认知功能障碍(MCI)生物标志物。结果表明,载脂蛋白 C-Ⅲ、α-2-巨球(A2M)蛋白、组蛋白 H1.2 和组蛋白 H1.4 在对照组和疾病组之间具有明显差异,它们的相对含量(离子强度)和肽段检出数目的增加有可能成为潜在的生物标志物,结果如表 2 所示。为了说明个体差异对结果的影响,表 2 还列出了各个体样本的血清多肽组的总离子强度和这 4 种蛋白质的肽段检出数目。健康对照组、AD 组和 MCI 组的总离子强度平均值分别为 1.4×10^6 、 2.4×10^6 和 2.4×10^6 。在 9 个对照组血清样本中,载脂蛋白 C-Ⅲ等四种蛋白质的总离子强度普遍偏低,总离子强度大多低于 1.0×10^4 ,例外的是对照 5 样本中组蛋白 H1.4 的总离子强度为 2.1×10^4 ,可能是因为个体差异所致。

表 2 4 种潜在生物标志物的总离子强度和检出肽段数目
Table 2 Total ionic strength and the number of peptides for the four potential biomarkers

序号 Number	蛋白质的离子强度 Intensity of the protein				总离子强度 Total intensities
	载脂蛋白 C-Ⅲ Apolipoprotein C-Ⅲ	α-2-巨球蛋白 α-2-macroglobulin	组蛋白 H1.2 Histone H1.2	组蛋白 H1.4 Histone H1.4	
CTRL 1	1962 (1)	1879 (1)	0 (0)	289 (1)	355401
CTRL 2	7211 (11)	3004 (3)	6293 (3)	4776 (8)	1491506
CTRL 3	2118 (5)	1374 (3)	5039 (1)	3874 (4)	886167
CTRL 4	7774 (16)	597 (1)	0 (0)	10310 (6)	2033557
CTRL 5	2546 (7)	1738 (1)	0 (0)	21300 (21)	992117
CTRL 6	1363 (4)	11316 (1)	0 (0)	0 (0)	3214275
CTRL 7	1666 (2)	7403 (3)	0 (0)	0 (0)	1313943
CTRL 8	5459 (6)	2084 (1)	0 (0)	0 (0)	1479511
CTRL 9	1799 (1)	0 (0)	0 (0)	587 (1)	481460
AD 1	366 (1)	30035 (5)	0 (0)	0 (0)	3504545
AD 2	794 (3)	56957 (5)	0 (0)	273 (1)	2133415
AD 3	0 (0)	67283 (4)	0 (0)	0 (0)	5242350
AD 4	0 (0)	18042 (2)	0 (0)	401 (1)	2235375
AD 5	237 (1)	38586 (4)	0 (0)	0 (0)	2898396
AD 6	306 (1)	11162 (2)	0 (0)	3339 (1)	1458445
AD 7	0 (0)	3988 (2)	17257 (5)	15284 (9)	1272211
AD 8	9645 (15)	1493 (1)	106426 (13)	55613 (30)	1695761
AD 9	16975 (16)	1230 (2)	1723 (1)	908 (1)	1863509
AD 10	51948 (36)	0 (0)	8886 (6)	4772 (1)	2432515
MCI 1	6153 (5)	11878 (1)	3320 (2)	14676 (4)	2278489
MCI 2	6566 (12)	932 (1)	67615 (9)	58496 (26)	1215455
MCI 3	2873 (8)	3189 (2)	72388 (12)	50278 (16)	964302
MCI 4	5427 (9)	1205 (1)	133397 (19)	66455 (30)	1563706
MCI 5	10522 (17)	2096 (1)	184104 (8)	87997 (28)	1898153
MCI 6	1609 (8)	997 (1)	75183 (9)	24988 (21)	1281774
MCI 7	6748 (9)	0 (0)	52977 (10)	51946 (18)	1516451
MCI 8	35789 (17)	6209 (1)	42414 (4)	14707 (6)	5037910
MCI 9	87201 (40)	0 (0)	16312 (5)	55028 (17)	2811498
MCI 10	30108 (28)	0 (0)	24021 (9)	16027 (12)	2880384
MCI 11	37463 (10)	275 7 (1)	165812 (24)	53881 (8)	5247731
MCI 12	461 (1)	474 (1)	34657 (7)	41539 (22)	1786992

Note: the numbers in brackets are the numbers of detected peptides.

α-2-巨球(A2M)蛋白在 AD 病理学中具有重要作用,与 AD 相关的 A2M 基因的 DNA 多态性导致 AD 脑中淀粉样斑块的积累显著增加^[14];也有研究表明,血液中的 A2M 浓度与脑脊液中神经元损伤标志物的浓度相关,较高的基线血清 A2M 浓度增加了男性患 AD 病的几率^[15]。在 10 例 AD 病人的血清样本中,有 6 例 α-2-巨球蛋白的离子强度显著增加,而其它 3 种蛋白质的强度无明显变化。值得注意

的是, 以上 6 例 AD 病人的发病时间均超过 4 年, 智力减退症状和情感障碍已很明显, 临床上已不难诊断。因此, 寻找早期的认知功能障碍(MCI)阶段的生物标志物更有意义。在其余的 4 例 AD 病和 13 例 MCI 血清样本中, 有 10 例样本的载脂蛋白 C-Ⅲ的总离子强度和肽段检出数目显著增加, 有 14 例伴随着组蛋白 H1.2 和组蛋白 H1.4 的肽段检出数目和离子强度的显著增加。有研究指出, 血浆中低水平的载脂蛋白 C-Ⅲ会增加 AD 病风险, 是 AD 病的早期标志物, 认为该蛋白因结合 β 淀粉样蛋白 A β 结合蛋白而含量降低^[16]。但本研究结果表明, 载脂蛋白 C-Ⅲ蛋白质水平上含量的降低也可能由于其降解所致。组蛋白的去乙酰化与 AD 病发病机理密切相关, 但组蛋白的降解与 AD 通过何种方式联系目前尚不知晓。尽管如此, 本研究结果表明, 组蛋白 H1.2 和 H1.4 的降解是伴随 MCI 和发病时间较短的 AD 病的大概率事件, 可能与 AD 病的发生发展过程相联系, 但是在晚期 AD 病血清中很少能检测到, 推测该蛋白的降解是人体的应激反应, 发病时间过长, 组蛋白降解的应激反应减弱, 但与 α -2-巨球蛋白降解相关的应激反应加强增加。

3.3 肽段水平上血清多肽组标志物的多样性

通常, 根据不同样品中相同肽段的强度差异或者有和无的区别可以确定潜在的肽段标志物, 但是在实际样品中情况较为复杂。分别以载脂蛋白 C-Ⅲ和 α -2-巨球蛋白为例进行说明。在多肽组分析结果中, 蛋白质总离子强度增加常伴随检出肽段数目的显著增加。例如, 在第 10 例 AD 病血清样本中, 检测到了 36 条归属于载脂蛋白 C-Ⅲ的肽段, 其中 17 条肽段列于表 3, 这 17 条肽段可视为以肽段 PEVRPTSAVAA 和 SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTA为基础延伸出的两类阶梯序列。在一些对照组样品中, 能检测到肽段 PEVRPTSAVAA 或 SEAEDASLLSFMQGYMKHA 的类似阶梯肽段, 但肽段数目通常较少, 而强度差别有时并不明显, 即疾病组中载脂蛋白 C-Ⅲ强度的增加部分来自于检出肽段的增加。实际上, 肽段的出现具有偶然性, 例如在有些 AD 样本中检测到的该系列的最短肽段为 SEAE-DASLLSF, 而最长肽段为 SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQESQVAQQA, 因此, 由于个体差异和肽段的多样性, 以载脂蛋白 C-Ⅲ的降解增加做为生物标志物, 比某一特定肽段为潜在生物标志物更为稳健。

表 3 血清中载脂蛋白 C-Ⅲ的部分肽段

Table 3 Identified endogenous peptides in human serum coming from Apolipoprotein C-Ⅲ

序号 Number	肽段序列 Peptide sequence
1	PEVRPTSAVAA
2	DPEVRPTSAVAA
3	LDPEVRPTSAVAA
4	DLDPEVRPTSAVAA
5	WDLDPPEVRPTSAVAA
6	STVKDKFSEFWDLDPPEVRPTSAVAA
7	SSLKDYWSTVKDKFSEFWDLDPPEVRPTSAVAA
8	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTA
9	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAK
10	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKD
11	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDA
12	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDAL
13	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSV
14	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQE
15	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQES
16	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQESQVAQQARGWVTDGF
17	SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQESQVAQQARGWVTDGFFSSLKDYW

相比之下, α -2-巨球蛋白的肽段分布情况简单得多。尽管其是血浆中分子量最大的蛋白质, 但检出的肽段数目最多 5 条, 很多情况下为 1 条(结果见表 2), 并且均为 VGFYESDVMGR, 而其它肽段均与该肽段大部分序列相同, 包括 VGFYESDVM (oxidation) GR、FYESDVMGR、GPEGLRVGFYESDVMG、

GFYESDVMGR 和 GPEGLRVGFYE 等,但它们的检出数目较少,并且离子强度低于该肽段一个数量级以上。因此,可以认为 α -2-巨球蛋白的最主要肽段是 VGFYESDVMGR,6 名晚期 AD 患者 α -2-巨球蛋白的总离子强度较高,均是因为该肽段强度高所致。组蛋白 H1.2 和 H1.4 的肽段分布情况也较为复杂,不像 α -2-巨球蛋白一样具有很强的规律性。组蛋白 H1.2 和 H1.4 在健康对照组血清样本中的强度普遍较低,而在所有 MCI 样本和 2 例 AD 病血清中离子强度很高,这可能与组蛋白 H1 的功能相关。文献[17]表明,成年人大脑损伤后,会向细胞外释放组蛋白 H1,而组蛋白 H1 可通过线粒体损伤和凋亡来杀死神经元,进而造成进一步的脑损伤和智力行为变化,释放出的组蛋白在体内降解后释放入血液从而被检测。由于组蛋白的释放属于脑损伤的应激反应,因此,在正常人血液中组蛋白肽段含量较低。AD 病的一个明显特征是脑内能量代谢的障碍,在晚期 AD 病人体内与组蛋白释放相关的应激反应减弱,几乎检测不到组蛋白 H1 的降解肽段。因此,组蛋白 H1.2 和 H1.4 有可能将 MCI 和晚期 AD 相区别,并结合其它指标用于 AD 病的临床前诊断。

4 结论

本研究发现 α -2-巨球蛋白肽段 VGFYESDVMGR 与 AD 病的晚期阶段密切相关,而载脂蛋白 C-III、组蛋白 H1.2 和组蛋白 H1.4 的大量降解与早期 AD 和认知功能障碍存在关联。个体样品的分析结果表明,生物标志物的多肽组特征与临床诊断结果之间可能并不完全一致,例如,部分 AD 病人的血浆多肽组学特征更接近 MCI,这可能是由于病人的智力表现与病理生理变化不完全同步所致。本研究进一步验证了个体血清多肽组结果的差异性和共性,证明纤维蛋白原 α 链、斑联蛋白和胸腺素等蛋白质的肽段为血清中的优势肽段。

References

- 1 Selkoe D J. *Science*, **2012**, 337: 1488–1491
- 2 Perrin R J, Fagan A M, Holtzman D M. *Nature*, **2009**, 461: 916–922
- 3 Fagan A M, Xiong C J, Jasielec M S, Bateman R J, Goate A M, Benzinger T L S. *Sci. Transl. Med.*, **2014**, 226: 226–230
- 4 Duits F H, Prins N D, Lemstra A W, Pijnenburga Y A L, Bouwman F H, Teunissenb C E. *Alzheimers Dement.*, **2015**, 11: 523–532
- 5 Lista S, Faltraco F, Prvulovic D, Hampel H. *Prog. Neurobiol.*, **2013**, 101–102: 1–17
- 6 BIE Li-Zhan, NI Xiu-Shi. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, **2014**, 23(34): 3867–3871
别立展,倪秀石. 现代中西医结合杂志, **2014**, 23(34): 3867–3871
- 7 Shen L, Liao L L, Chen C, Guo Y, Song D L, Wang Y, Chen Y, Zhang K, Ying M, Li S M, Liu Q, Ni J. *J. Alzheimers Dis.*, **2017**, 56(1): 361–378
- 8 Mapstone M, Cheema A K, Fiandaca M S, Zhong X, Mhyre T R, MacArthur L H, Hall W J, Fisher S G. *Nat. Med.*, **2014**, 20(4): 415–418
- 9 O'Bryant S E, Mielke M M, Rissman R A, Lista S, Vanderstichele H, Zetterberg H, Lewczuk P, Posner H. *Alzheimers Dement.*, **2017**, 13(1): 45–58
- 10 Cheng G, Wang Z G, Liu Y L, Zhang J L, Sun D H, Ni J Z. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(82): 10240–10242
- 11 KONG Xiang-Yi, SHI Kai, CONG Le-Le, WANG Jing, JIANG Li-Jun, HONG Xiao-Yu, LI Shui-Ming, WANG Yong, ZHAO Qing. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2017**, 45(1): 133–138
孔祥怡,石 锴,丛乐乐,王 静,蒋立军,洪晓愉,李水明,王 勇,赵 晴. 分析化学, **2017**, 45(1): 133–138
- 12 Noguchi M, Sato T, Nagai K, Utagawa I, Suzuki I, Arito M, Iizuka N, Suematsu N, Okamoto K, Kato T, Yamaguchi N, Kurokawa M S. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.*, **2014**, 29(8): 808–818
- 13 HONG Xiao-Yu, WANG Hao, XU Jin-Ling, LI Shui-Ming, WANG Yong. *Chinese. J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(3): 403–408
洪晓愉,王 浩,徐金玲,李水明,王 勇. 分析化学, **2016**, 44(3): 403–408

- 14 Kovacs D M. *Exp. Gerontol.* , **2000**, 35(4): 473–479
- 15 Varma V R, Varma S, An Y, Hohman T J, Seddighi S, Casanova R, Beri A, Dammer E B, Seyfried N T, Pletnikova O, Moghekar A, Wilson M R, Lah J J, O'Brien R J, Levey A I, Troncoso J C, Albert M S, Thambisetty M. *Mol. Psychiatry*, **2017**, 22(1): 13–23
- 16 Shih Y H, Tsai K J, Lee C W, Shiesh S C, Chen W T, Pai M C, Kuo Y M. *J. Alzheimers Dis.* , **2014**, 41(3): 855–865
- 17 Gilthorpe J D, Oozeer F, Nash J, Calvo M, Bennett D L, Lumsden A, Pini A. *F1000Res.* , **2013**, 8(2): 148

Study of Alzheimer's Disease Biomarkers Based on Serum Peptidomics

KONG Xiang-Yi¹, DU Jian-Shi², MA Ming³, XU Jin-Ling⁴, LI Shui-Ming⁴, WANG Yong⁴, ZHAO Qing^{*3}

¹(Norman Bethune Health Science Center of Jilin University, Changchun 130021, China)

²(Department of Vascular surgery, China-Japan Union Hospital, Changchun 130033, China)

³(Department of Neurology, China-Japan Union Hospital, Changchun 130033, China)

⁴(College of Life Science and Oceanography, Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract Early diagnosis and intervention is an important way to delay the progress of Alzheimer's disease (AD). Compared with cerebrospinal fluid, blood sampling is not invasive and easy to be obtained in clinic practice. In this study, the serum samples of 9 controls, 10 AD and 12 mild cognitive dysfunction (MCI) patients were analyzed and compared through one by one analysis to screen potential markers for AD diagnosis. The experimental results showed that VGFYESDVMGR of α -2-macroglobulin peptide was closely related to the late stage of AD disease, and the large amount degradation of apolipoprotein C-III, histone H1.2 and histone H1.4 was significantly related to early stages of AD progression. The characteristics of serum peptidome were different for the early and late AD, and these four proteins may be used as potential biomarkers of AD disease. In addition, the obvious ladder sequence characteristic was observed for apolipoprotein C-III and histone H1, which could partly explain why the peptides distribution in different samples was somewhat contingent. On the contrary, the distribution at protein level was more stable. Finally, it was confirmed that the peptides of proteins such as fibrinogen α -chain, thymosin β -4 and patchy proteins were the dominant peptides in all serum samples. Overall, this study showed that the method of using serum peptidomics to diagnose AD was possible. The results may provide evidence and references for the large-scale clinical validation of AD.

Keywords Peptidomics; Biomarker; Serum; Alzheimer's disease; Mild cognitive impairment

(Received 18 April 2017; accepted 17 May 2017)