

# 脑脊液生物学标志物在朊蛋白疾病中的应用研究进展

阎海娟 综述 张本恕 审校

天津医科大学总医院神经内科,天津市 300052

**摘要:** 朊蛋白疾病是一组致死性的神经变性病,但目前在早期诊断、监测患者的病情变化等方面尚缺乏明确特异性的生物学标志物。发现可靠的生物学标志物对朊蛋白疾病的早期诊断和预防具有重要意义,与之相关的研究在国内外已取得了长足进步。本文综述了近年来 14-3-3 蛋白、 $\beta$  淀粉样蛋白、Tau 蛋白、S100 蛋白以及神经元特异性烯醇化酶(NSE)、脑型肌酸激酶和脂肪酸结合蛋白等生物学标志物在疾病诊断、临床表现及病情进展等相关方面的研究进展。

**关键词:** 脑脊液;生物学标志物;朊蛋白疾病

朊蛋白(prion protein, PrP)是一种糖蛋白,可存在于正常脑组织中,无致病性。但是变异后的朊蛋白具有传染性,可引起脑组织海绵状变性,并最终导致中枢神经系统疾病。克-雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)是朊蛋白疾病中的典型代表,可分为散发型 CJD(sCJD)、家族型 CJD(fCJD)、医源型 CJD(iCJD)和变异型 CJD(vCJD)四个类型。其中家族型占有所有临床表现的 5%~15%,属常染色体显性遗传,与 PrP 基因突变相关。医源型主要是由于使用污染的脑深部电极,使用垂体提取的人类生长因子和促性腺激素以及硬脑膜移植而引起。在临床诊断上可分为肯定 CJD、可能 CJD 和可疑 CJD。目前,确诊 CJD 的唯一金标准是脑组织或尸检证实 PrP<sup>sc</sup> 的存在,但是患者不易接受。因此,脑脊液中特异性蛋白的检测成为 CJD 的研究热点。

脑脊液(CSF)是存在于脑室及蛛网膜下腔内的一种无色透明液体,由侧脑室脉络丛分泌,能动态反映脑组织代谢及内环境变化的情况。中枢神经系统的病理变化,都有可能致其成分的改变。通过研究疾病状态下 CSF 中蛋白质的变化情况,可以对中枢神经系统疾病的病因、诊断、治疗以及预后判断提供重要的线索。一般来说,蛋白/基因作为有效的生物学标志物必须具备以下特性:敏感性(检测疾病早期的异常)、特异性(用于鉴别诊断)和可重复性<sup>[1]</sup>。近年来研究发现,一些特殊的脑蛋白与 CJD 关系密切,尤其是脑脊液中特殊蛋白的检测对 CJD 的诊断很有临床价值。蛋白组学方法研

究为探索 CJD 和其他痴呆病例中脑脊液新的生物标志物和蛋白分析提供了巨大的潜能。脑脊液蛋白的生化分析对 TSE 脑脊液生物标志物的检测成为 CJD 病临床诊断的一个常规辅助检查,并为其提供了一个行之有效的技术平台。本文对 CJD 病辅助临床诊断中常用的蛋白标志物 14-3-3、A $\beta$ 、总 tau 蛋白(T-tau)、磷酸化 tau 蛋白(P-tau)、S100 蛋白和 NSE 等的研究进展进行了系统综述。

## 1 蛋白标志物

### 1.1 朊蛋白(PrP<sup>c</sup>)

PrP<sup>c</sup> 是正常细胞所具有的糖蛋白,主要分布于神经细胞、胶质细胞、B 淋巴细胞和血小板表面的脂筏上,在多种动物中都有表达,而不同物种的 PrP<sup>c</sup> 间氨基酸序列具有高度同源性。朊蛋白在神经元中表达水平最高,且富集于突触处。PrP<sup>c</sup> 与作为递质的  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)系统作用调节突触功能、可参与睡眠深度和持续性的维持、神经组织的 Cu<sup>2+</sup> 代谢、蒲肯野细胞的活化、还参与细胞凋亡的调控<sup>[2]</sup>。

正常的 PrP<sup>c</sup> 蛋白构象发生变化转变为变异型 PrP<sup>sc</sup>,便会引起朊病毒疾病。目前对正常朊蛋白和 CJD 的关联资料有限。CJD 的最佳诊断指标就是在 CSF 和其他液体中发现变异型朊蛋白,但是即使通过非常敏感的荧光对比光谱学技术也只有在少数的 CJD 病人的 CSF 中发现 PrP<sup>sc</sup><sup>[3]</sup>。也有学者观察到 PrP<sup>c</sup> 在 CJD 中浓度降低,而在其他一些神经系统变性疾病中也有类似现象。由于 CJD 有时很难与其它的神经系统变性疾病相鉴别,故还不能把正

收稿日期:2010-10-12;修回日期:2011-01-19

作者简介:阎海娟(1980-),女,博士在读,主要从事锥体外系疾病和痴呆的研究。

通讯作者:张本恕(1946-),女,教授,主任医师,博士生导师,主要从事锥体外系疾病和相关痴呆的临床与基础研究。

常朊蛋白作为一个有效标志物<sup>[4]</sup>。

## 1.2 14-3-3 蛋白

14-3-3 蛋白是一种分布于神经细胞中的酸性蛋白,约占脑组织可溶性蛋白的 1%。根据其在 DAEA 纤维色谱上的组分数和淀粉凝胶电泳的迁移位置而命名。14-3-3 蛋白家族对 CJD 的诊断的敏感性和特异性首先被发现是其中的 130 和 131 两个蛋白。通过对这两个蛋白质氨基酸序列的分析,并建立特异性的免疫测定法,其敏感性和特异性分别达到 96% 和 88%。发展到现在,该蛋白家族至少存在 7 个由不同基因编码的高度保守的亚型(分别为  $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\nu$ 、 $T$ 、 $\lambda$  和  $\sigma$  亚型)。研究表明各亚型均分别与人类常见疾病有密切关系,其中前 4 种可以在变异型 CJD 病人的脑脊液中检测到<sup>[5]</sup>。在 sCJD 和 vCJD 脑组织的异常朊蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)斑块沉积处已检测到 14-3-3 异构体;在 sCJD 病例脑组织胶质细胞中也发现了 14-3-3 蛋白的免疫反应;在 GSS(Gerstmann-Straussler-Scheinker)病例的朊蛋白淀粉样斑块处也发现其  $\epsilon$  亚型的存在<sup>[6]</sup>。14-3-3 的出现不仅和 CJD 的类别有关,而且和病程息息相关<sup>[7]</sup>,14-3-3 只在高于 90% 的高度可疑/确诊的 sCJD 或 gCJD 病例中升高,在大约 50% 的 GSS、vCJD、iCJD 中仅可微量检测,而在几乎所有的 FFI 病例中检测不到<sup>[8]</sup>。

基于确凿的临床依据,虽然 14-3-3 阳性对 sCJD 的诊断具有很高的敏感性和特异性,14-3-3 在脑脊液的检测已经成为拟诊 sCJD 的一项,但是其在 CJD 中的致病机理尚待明确。14-3-3 蛋白在脑脊液中的升高或许与参与 CJD 的分子致病过程有关。但是其在脑缺血、中枢神经系统炎症、以及血性脑脊液中都会升高,又表现出非特异性。更重要的是在与 CJD 更难鉴别的 AD 和桥本甲状腺脑炎等疾病中 14-3-3 是痕量的。所以为了减少假阳性结果,14-3-3 的检测只能在高度怀疑为 CJD 的病例中进行<sup>[9]</sup>。同时受不同 CJD 病例的病程长短的影响,14-3-3 的检测结果也不具有统一性。如在病程长的 CJD 病例(129 号密码子甲硫氨酸和缬氨酸杂合型或 PrP<sup>Sc</sup>2 型)中,其敏感性降低<sup>[10]</sup>。又如在神经系统症状早期 14-3-3 可检测到阳性,病程中后期有很高的敏感性,而在晚期,其值可能降低。而在对 iCJD 的序列研究中发现早期很难检测到 14-3-3,但 7 个月后当痴呆症状加剧时却显著增加<sup>[8]</sup>。正是由于 CJD 病例的种类和病程的长短对 14-3-3 的检测结果没有完整的统一性,故目前的这些现象

只能为临床诊断提供一定的支持,其检测时机、朊蛋白疾病致病机理中的作用仍需广泛的探讨。

## 1.3 Tau 蛋白

Tau 蛋白是含量最高的微管相关蛋白,可参与多种细胞功能,如维持微管稳定性、细胞有丝分裂、细胞内物质转运及信息传递等。Tau 蛋白基因位于 17 号染色体长臂,为含磷酸基蛋白,正常成熟脑中 Tau 蛋白分子含 2-3 个磷酸基,是轴突生长发育和神经元极性形成中不可或缺的蛋白。

Tau 蛋白主要存在于神经元细胞中,也存在于一些少突胶质细胞和星形胶质细胞中,近年研究发现 tau 蛋白与一些中枢神经系统变性疾病有关,如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),匹克病(Picks disease)等<sup>[11]</sup>。Tau 蛋白也与一些朊病毒病相关,在一些 GSS 病例中的脑组织出现了典型的 tau 病理变化,病人脑组织中不仅存在淀粉样变,还出现了高度磷酸化的 tau 的沉积。但是 CJD 患者的总 tau 蛋白的水平要高于其他神经变性疾病。而且研究发现,在部分朊病毒病(Prion diseases)中,高度磷酸化的微管相关蛋白 tau 与朊蛋白(Prion protein, PrP)发生共定位<sup>[12]</sup>,因此 tau 蛋白与 PrP 的相互作用对 PrP 正常生理功能的研究提供了一个新思路。

## 1.4 $\beta$ 淀粉样蛋白

$\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )是一种含有 39~42 个氨基酸的多肽,广泛存在于各种体液中,包括血浆和脑脊液<sup>[13]</sup>。其由前体蛋白( $\beta$ -amyloid protein precursor, APP)的酶解分泌而成,并在细胞基质沉淀聚积导致神经元损伤和认知功能的衰退,是 AD 病人脑内老年斑周边神经元变性和死亡的主要原因。

A $\beta$ 1-42 是老年斑的主要成分,在 AD 患者脑内首先沉积并形成斑块;而 A $\beta$ 1-40 主要见于 AD 的血管性损害,是在疾病发展过程中逐渐形成的<sup>[14]</sup>。在 CJD 病人脑中有时可出现 AD 样 A $\beta$ 。与 14-3-3 检测呈假阳性的对照组相比,A $\beta$ 1-42 值在包括 CJD 的其它各类痴呆病例中降低<sup>[15]</sup>,所以同时检测 14-3-3 和 A $\beta$ 1-42 有助于 CJD 的诊断。

## 1.5 S100B

S100 蛋白是一组酸性钙结合蛋白,具有三个亚型:S100A0、S100A、S100B。其中 S100B 主要分布于中枢神经系统和周围神经系统的神经胶质细胞、施万细胞以及某些神经元细胞、黑色素细胞、软骨细胞和脂肪细胞中。由于 S100B 的分布

特性,CSF 中 S100B 水平与神经系统疾病具有明显相关性,CSF 中 S100B 的升高被认为是星形胶质细胞死亡的标志,可见于 CJD 的各个时期。CJD 患者血清及 CSF 中 S100 蛋白明显升高,其特异性为 81.1%,敏感性为 77.8%,甚至在一些脑脊液 14-3-3 蛋白检测为阴性的 CJD 患者,其 CSF 中 S100 蛋白含量也出现增高。目前 S100 蛋白升高已可作为 CJD 诊断的生物学标志。

### 1.6 NSE

NSE 主要存在于脑神经细胞和神经内分泌细胞的胞浆内,体液中 NSE 含量很低。在神经细胞受损的情况下,NSE 从细胞内漏至细胞间隙,继而进入脑脊液和血循环,体液中 NSE 含量的增高,即提示神经细胞受损。S100B 在 80% 的 CJD 各型病例中增高,而 NSE 在 70% 的 sCJD、60% 的 g 的 CJD 和 50% 的 v 的 CJD 中增高<sup>[7,8]</sup>。另外,与对照组相比,NSE 在 CJD 血清中的浓度也显著异常。但是由于较低的敏感度和特异性,NSE 和 S100B 二者在支持 CJD 诊断方面受到了限制。需要注意的是,在 CJD 病早期,CSF 中 NSE 的变化更为敏感,而晚期随着神经细胞内 NSE 的耗竭,CSF 中 NSE 的浓度会降低。因此早期检测对病情判断更有助于 CJD 的诊断。

### 1.7 脑型肌酸激酶

肌酸激酶(CK)位于细胞浆和线粒体中,由 B 肽和 M 肽两种亚基组成。根据其组成亚基和分布位置的不同,肌酸激酶具有 4 种同工酶形式:肌型肌酸激酶(CK-MM)、心型肌酸激酶(CK-MB)、脑型肌酸激酶(CK-BB)和线粒体型(CK-MiMi)。肌酸激酶的同工酶在临床诊断中具有十分重要的意义,在各种病变发生时,人的血清中肌酸激酶水平迅速升高。目前认为在心肌梗塞的诊断中,测定肌酸激酶的活性比做心电图更可靠。CK-BB 主要分布在脑细胞中,在脑损伤时,脑脊液中 CK-BB 浓度升高。而且研究发现,CK-BB 浓度与 CJD 病程密切相关<sup>[16]</sup>。在疾病早期,相比于其他神经疾病 CJD 中 CK-BB 浓度增高;当疾病达到最高峰时 CK-BB 浓度也达到最高值,而在疾病终末期浓度恢复正常或仅轻微升高。因此,CK-BB 浓度的检测也是适合 CJD 的早期诊断方式。

### 1.8 脂肪酸结合蛋白(FABP)

FABP 是一组小分子胞浆蛋白,是心肌细胞胞浆中含量最丰富的蛋白质之一,广泛存在于哺乳动物的小肠、脂肪、心、脑、骨骼肌等多种细胞中<sup>[17]</sup>。国内外学者们用蛋白质组学的方法和 ELISA 免疫

测定等多种方法均证实了 H-FABP 在 CJD 患者脑脊液中明显增高,敏感性及特异性均为 100%<sup>[18,19]</sup>。说明 H-FABP 可以作为 CJD 患者的血清及脑脊液标志物,为今后开展 CJD 诊断提供了理论依据。

### 1.9 其它标志物

除了以上常见的 TSE 标志物,尚有其它的一些蛋白也可以作为诊断 TSE 的标志物。但是这些蛋白仅在一些亚型中检测过,作为标准诊断程序还为时尚早。例如 Cystatin C、LDH-1、GFAP 以及前列腺素 E2 在 CJD 病例的 CSF 中都有不同程度的增高<sup>[20]</sup>,促炎因子 TGF- $\beta$  显著降低,而抗炎因子 IL-4、IL-8 和 IL-10 升高<sup>[21]</sup>。

## 2 总结与展望

如上所述,由于病程、首发年龄和腰穿的时间会影响标志物的敏感性和特异性,这样会对 CJD 的诊断带来一些迷惑,对此有学者提出同时检测几种不同标志物,如 14-3-3 + Tau、14-3-3 + S100B 和 14-3-3 + NSE,可极大地提高 CJD 诊断的敏感性,分别达到 94%、96% 和 95%<sup>[22]</sup>。同时由于 CJD 的临床症状与其它痴呆性疾病相似且病程的快速进展,往往在中晚期才能做出诊断,而目前尚无有效地治疗方法,因此早期脑脊液中标志物的发现特别是症状前的初筛显得颇为重要,从而早期控制症状、延长生命。若能在症状前期发现一些标志物而做出诊断的话,能阻止医源性传播,这将是很有意义的。

## 参 考 文 献

- [1] Joanna G, Inga Z. Cerebrospinal fluid biomarkers in human prion diseases. *Future Neurol*, 2010, 5(2): 301-316.
- [2] Kim BH, Choi JK, Kim JI, et al. The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Mol Brain Res*, 2004, 124(1): 40-50.
- [3] Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(10): 5468-5473.
- [4] Meyne F, Ciesielczyk B, Heinemann U, et al. Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders. *J Alz Dis*, 2009, 17(4): 863-873.
- [5] Shiga Y, Wakabayashi H, Miyazawa K, et al. 14-3-3 protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in the progressive and terminal stages. *J Clin Neurosci*, 2006, 13(6): 661-665.

- [6] Di Fede G, Giaccone G, Limido L, et al. The epsilon isoform of 14-3-3 protein is a component of the prion protein amyloid deposits of Gerstmann-Strassler-Scheinker disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2007, 66(2): 124-130.
- [7] Shiga Y, Wakabayashi H, Miyazawa K, et al. 14-3-3 protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in the progressive and terminal stages. *J Clin Neurosci*, 2006, 13(6): 661-665.
- [8] Sanchez-Juan P, Green A, Ladogana A, et al. Cerebrospinal fluid tests in the differential diagnosis of CJD. *Neurology*, 2006, 67(4): 637-643.
- [9] Castellani RJ, Colucci M, Xie Z, et al. Sensitivity of 14-3-3 protein test varies in subtypes of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, 2004, 63(3): 436-442.
- [10] Gmitterová K, Heinemann U, Bodemer M, et al. 14-3-3 CSF levels in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease differ across molecular subtypes. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(11): 1842-1850.
- [11] 牛丰南, 孙宗正, 徐运. 阿尔茨海默病早期诊断的分子靶标研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009, 36(1): 86-90.
- [12] Han J, Zhang J, Yao H, et al. Study on interaction between microtubule associated protein tau and prion protein. *Sci China C Life Sci*, 2006, 49(5): 473-479.
- [13] Mollenhauer B, Cullen V, Kahn I, et al. Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Exp Neurol*, 2008, 213(2): 315-325.
- [14] Holmes G, Boche D, Wilkinson D, et al. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomized, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*, 2008, 372(9634): 216-223.
- [15] Skinningsrud A, Stnset V, Gundersen AS, et al. Cerebrospinal fluid markers in Creutzfeldt-Jakob disease. *Cerebrospinal Fluid Res*, 2008, 5(14): 1-8.
- [16] Jimi T, Wakayama Y, Shibuya S, et al. High levels of nervous system-specific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Chim Acta*, 1992, 211(1-2): 37-46.
- [17] Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport functions of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1486(1): 28-44.
- [18] 左秀美, 王东升, 赵节绪, 等. 散发性 CJD 患者新的潜在标志物 H-FABP 的检测. *中风与神经疾病杂志*, 2006, 23(2): 181-182.
- [19] Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard PR, et al. A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics*, 2003, 3(8): 1495-1499.
- [20] Jesse SP, Ceppek L, Arnim CV, et al. Glialfibrillary acidic protein and protein s-100b: different concentration pattern of glial proteins in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *J Alz Dis*, 2009, 17(3): 541-543.
- [21] Stoeck K, Bodemer M, Ciesielczyk B, et al. Interleukin 4 and interleukin 10 levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol*, 2005, 62(10): 1591-1594.
- [22] Sanchez-Juan P, Green A, Ladogana A, et al. CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, 2006, 67(4): 637-643.

## 还原体肌病研究进展

林鹿杰 综述 肖兴军 审校

哈尔滨医科大学附属第二医院神经内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

**摘要:** 还原体肌病(RBM)是一种少见肌病, 目前其病因尚未清楚, 发病机制多倾向于 FHL1 基因突变。人们对其缺少深刻认识, 国内文献对其介绍的报道也较少。本文参考国外最新文献就其临床表现及发病机制综述如下:

**关键词:** 还原体肌病; FHL1

**基金项目:** 黑龙江省自然科学基金(D2007-24)

**收稿日期:** 2010-12-11; **修回日期:** 2011-03-09

**作者简介:** 林鹿杰(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事神经肌肉病及脑血管病的研究。

**通讯作者:** 肖兴军(1969-), 男, 副主任医师, 博士, 主要从事神经肌肉疾病的研究。E-mail: xiaoxingjun@medmail.com.cn。