

视锥蛋白样蛋白:一种新兴的脑损伤生物标志物

徐玉婷 综述 潘速跃 审校

南方医科大学南方医院神经内科 广东 广州 510515

摘要: 视锥蛋白样蛋白(VILIPs)是神经钙传感蛋白的一个亚家族,研究表明该蛋白家族具有较高的神经系统特异性,对缺血性卒中、阿尔茨海默病等中枢神经系统疾病的诊断有较高的特异度和敏感度,有望成为重要的脑损伤标志物。本文结合国内外最新研究,就 VILIPs 在不同中枢神经系统疾病所致脑损伤中的作用机制及临床意义予以阐述。

关键词: 神经钙传感蛋白;视锥蛋白样蛋白;脑损伤;生物标志物

现代影像学的发展为脑损伤的诊断、病情判断、预后评估等提供了很大的帮助,但仍存在一些不足,如:①影像学的滞后性;②对不宜搬动的重症病人有较大的限制;③对于缺血缺氧性脑病、心肺复苏等所致的继发性脑损伤,不能准确判断损伤程度等。近年来,脑损伤特异性生物标记物的研究越来越受到重视,这些指标的测定,对于探究脑损伤发病机制、早期诊断、判断病情、评价预后、指导治疗及减少脑损伤后遗症等方面具有重要临床意义。视锥蛋白样蛋白(visinin-like proteins, VILIPs),一种钙离子结合蛋白(Ca^{2+} -binding proteins, CaBPs),是其中新受关注的脑损伤特异性生物标记物之一。

1 概述

20 世纪 90 年代,人们新发现了一类在神经系统中高度表达的钙离子结合蛋白,并命名为神经钙传感蛋白(neuronal Ca^{2+} sensor proteins, NCS)。VILIPs 是该蛋白家族的一个亚家族,包括 VILIP-1(又称 VSNL1, NVP-1, neurocalcin α , VLP-1, 基因名 VSNL1)、VILIP-2(又称 NVP-2, neurocalcin β , 基因名 HPCAL4)、VILIP-3(又称 BDR-1, NVP-3, REM-1, 基因名 HPCAL1)、hippocalcin(又称 BDR-2, 基因名 HPCA)和 neurocalcin δ (又称 neurocalcin, 基因名 NCALD)^[1]。VILIPs 是最早被发现的钙传导蛋白之一,在前脑、海马回、尾状核、小脑等不同脑区中广泛表达,主要位于脑组织的神经元中。此外,VILIPs 在中枢神经系统(central nervous system, CNS)外如心、肺、肝、脾、肾、造血系统及结肠癌等组织中

也有表达。跟其它 NCS 蛋白相似,VILIPs 均含有 4 个 EF-臂保守结构域(EF-hands domain),其中 EF-1 是非功能性的。VILIPs 通过 Ca^{2+} -十四酰基开关(Ca^{2+} -myristoyl switch)机制易位到亚细胞结构的膜区室,该机制已经细胞实验证实。因各自钙离子结合力,膜结合动力学和细胞内受体的不同,VILIPs 可定位于同一神经元的不同细胞信号区室(cellular signaling compartment),在神经元功能的调节中发挥着各自的作用^[2]。目前已知的功能主要有:影响环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)和环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)等信号传导级联反应;调控 $\alpha 4\beta 2$ 烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)在细胞表面的表达及受体激动剂的敏感性;降低突触前 P/Q-型 Ca^{2+} 通道(CaV2.1)的失活速率;影响神经突触生长;上调失巢凋亡抑制因子原肌球蛋白受体激酶 B(tropomyosin receptor kinase B, trkB)的水平;促进 Tau 蛋白的高度磷酸化;与恶性肿瘤的转移有关;促进胰岛素分泌等^[1,3,4]。

2 视锥蛋白样蛋白与脑损伤的关系

2.1 VILIP-1 与脑血管疾病的关系

缺血性卒中(ischemic stroke, IS)、脑出血等脑血管疾病可使神经细胞变性和坏死,破坏血脑屏障,导致脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)和血液中蛋白升高。既往对 S100 蛋白、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)、神经元特异性烯醇化酶(Neuron Specific Enolase, NSE)等生物标志物研究较多,而 VILIPs 作为新被发现的标志物,

收稿日期:2014-10-09;修回日期:2014-12-08

作者简介:徐玉婷(1989-),女,在读博士研究生,主要从事神经危重症研究。

通讯作者:潘速跃(1965-),男,教授,主任医师,博士后,博士生导师,主要从事神经危重症研究。

尚未得到足够的重视,但也有一些研究为 VILIP-1 在脑血管疾病尤其是缺血性卒中的临床应用奠定了重要的基础。2006 年,Laterza 等^[5]证实了 VILIP-1 在脑组织中高度表达并创建了大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MACO)模型大鼠,发现在术后 24 小时点 MACO 组大鼠 CSF 中的 VILIP-1 蛋白水平明显增高,而假手术组中未检测到 VILIP-1 蛋白,且永久性 MACO 组高于暂时性 MACO 组。他们还发现在正常对照组中 8% 被测者血清样本中可检测到少量 VILIP-1 蛋白,而在发病后 24 小时内 44% 的 IS 病人血清样本可检测到较高的 VILIP-1 蛋白水平。Stejskal 等^[6]用 Elisa 方法检测了 17 例正常个体和 16 例 IS 患者的血清及 CSF 中 VILIP-1 蛋白水平,IS 组于发病 3 小时内取样,结果显示:IS 组 VILIP-1 蛋白血清及脑脊液水平均较正常对照组显著增高($P < 0.01$),取血清 VILIP-1 蛋白浓度 0.093 mcg/L 为临界值,其诊断灵敏度和特异度均达 100%。从而进一步证实了 Laterza 等的研究结果,提示 VILIP-1 蛋白有可能成为 IS 甚至脑损伤的独立标志物,但他们的样本量较少,仍需要更大样本的研究来证实。An 等^[7]则将疑似 IS 病人分为 IS 组和类 IS 组,发现两组间血清 VILIP-1 蛋白的水平差异无统计意义,表明 VILIP-1 可能与脑损伤而非特定的 CNS 疾病相关。此外,Tarawneh 等^[8]还发现 IS 患者血清 VILIP-1 蛋白水平在发病 12 小时内增高,发病 72 小时达到顶峰,且与美国国立卫生院卒中量表(National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS)评分($r = 0.65$, $p = 0.0008$)和梗阻面积($r = 0.73$, $p = 0.024$)有关,对病情判断和预后评估有着潜在的临床意义。

2.2 VILIPs 与阿尔茨海默病的关系

VILIP-1 可能通过影响 Tau 蛋白的高磷酸化及参与 Ca^{2+} 介导的神经毒性过程,在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的病理过程中发挥重要作用^[9]。近年来,VILIPs 作为新的 AD 生物标志物受到重视。研究表明,AD 组中脑脊液 VILIP-1 水平与正常对照组($P < 0.0001$)和其它痴呆组($P < 0.0001$)相比显著增高^[10]。Mroczko 等发现 AD 组脑脊液 VILIP-1 水平(105 pg/ml)较轻度认知障碍组(69 pg/ml, $p = 0.028$)和正常老年组(42 pg/ml, $p < 0.001$)增高,且与 $A\beta$ (amyloid β -protein, $A\beta$) 42/40 和 pTau181 相关^[11]。Lee 等^[12]将 VILIP-1 与 Abeta(1-42)、tTau、pTau 比较,发现

VILIP-1 是唯一与简易精神状态量表(mini-mental state examination, MMSE)评分相关的生物标志物。并有研究显示 VILIP-1 诊断和预测效能与 Tau 蛋白等传统标志物相似,且与 Tau 蛋白等作为联合标志物时更佳^[13]。此外,高 VILIP-1 蛋白水平的正常认知者将来患 AD 的可能性更高,早期 VILIP-1 高的 AD 患者认知障碍进展更快^[11,13]。最新的研究还表明,在 AD 患者出现症状前 10~20 年间即可出现 VILIP-1 脑脊液水平增高,出现症状后水平下降,提示 AD 患者出现症状后病情进展减缓可能^[14]。

2.3 VILIPs 与精神疾病的关系

在精神分裂症发病机制中涉及到的复杂的细胞机制还不是很清楚, Ca^{2+} 假说认为 Ca^{2+} 稳态失调可能在精神分裂症的发病机制中起核心作用^[15]。VILIP-1 作为一种 Ca^{2+} 依赖性信号转导分子及 trkB mRNA 结合蛋白,可能通过影响信号通路、神经受体的功能、神经细胞过生长等方式参与精神分裂症的发病过程。在精神分裂症海马病理基础的背景下,免疫实验表明,VILIP-1 蛋白水平在精神分裂症患者的海马锥体细胞中降低,而在中间神经元中升高,基因芯片和蛋白质组学研究证实了上述免疫实验结果^[16]。基于韩国人口的全基因组连锁研究显示 VSNL1 基因所在的染色体 2p24.3 与精神分裂症相关联^[17]。发生在额叶的 VSNL1 基因变异已被发现与精神分裂症有关,并与威斯康辛卡片分类测验(Wisconsin cards sort test)结果相关^[18]。VILIP-1 在病理生理过程中的作用可能与 $\alpha 4\beta 2$ nAChR 受体相关联,VILIP-1 可增加 $\alpha 4\beta 2$ nAChR 表面表达和敏感性,而 $\alpha 4\beta 2$ nAChR 在突触敏感性和精神分裂症中均扮演了重要角色。在较早的免疫实验中,Bernstein 等^[19]发现在精神分裂症患者、抑郁症患者及正常个体间,齿状核神经元的 VILIP-1 水平及小脑神经元的 VILIP-3 水平均没有差异,提示这两种蛋白可能在精神分裂症的小脑病理过程中作用较小。总之,VILIP-1 蛋白可能参与了精神分裂症的病理过程,在精神分裂症患者的神经形态功能缺陷上发挥着重要作用,其具体作用机制仍有待进一步研究。

2.4 VILIPs 与颅内肿瘤的关系

运用表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)基因克隆技术已在癌组织中发现 VSNL 序列,如神经肿瘤,少突胶质细胞瘤,肺鳞状细胞癌,和头颈肿瘤等^[1]。目前有基因芯片等研究提示

VSNL1 可能对神经母细胞瘤、鳞状细胞癌的生长有抑制作用^[20,21]。然而,Xie 等^[22]发现: VSNL1 mRNA 在高侵袭性细胞中显著高于低侵袭性细胞,且与肿瘤的转移相关; VSNL1 可在体内体外调节神经母细胞瘤细胞的增殖表型和侵袭表型; VSNL1 表达上调的神经母细胞瘤细胞抗失巢凋亡能力增强,并伴随着失巢凋亡抑制因子 trkB 水平的增高。这些结果提示 VSNL1 在神经母细胞瘤的发生和转移中可能起着重要作用,但它们的不一致性尚不能得到解释,VSNL1 在肿瘤发生发展中的确切作用仍在探索中。最近的研究表明,某些 PHOX2B (paired-like homeobox 2b) 基因变异使它们与 VILIP-3 结合力减弱,从而阻碍了幼稚交感神经元的分化,增加了恶性肿瘤倾向^[23]。

3 问题和展望

视锥蛋白样蛋白作为 Ca^{2+} 信号级联反应的主要参与者,在 CNS 疾病的病理生理过程中扮演了重要角色。VILIPs 具有较高的 CNS 特异性,在脑血管疾病、阿尔茨海默病、脑肿瘤、精神分裂症等神经精神疾病的脑组织中均有异常表达; IS 和 AD 早期即可在患者血清和脑脊液中检测到 VILIPs 水平增高,且有较高的敏感性和特异性,相对于传统的生物标志物而言,VILIPs 有望成为脑损伤的独立标志物;另有研究证实 VILIP-1 无性别差异性^[6]。这些特征表明 VILIPs 是较为理想的脑损伤生物标志物,但目前尚缺乏大样本多中心的系统性临床研究,欠缺与现阶段临床常用的脑损伤生物标志物,如 NSE 和 S100 蛋白等的对照研究。国内的动物实验表明,VILIP-1 (敏感度为 75.9%,特异度为 99.9%) 对诊断新生大鼠缺血缺氧性脑病的敏感度和特异度高于 NSE (敏感度为 72.4%,特异度为 63.7%),两者结合诊断价值更高,提示 VILIP-1 有可能成为更重要的脑损伤标志物^[24]。另外,VILIPs 在其它 CNS 疾病如颅内感染、脑外伤、颅内肿瘤、癫痫等及 CNS 外疾病导致的脑损伤中的临床应用尚未受到关注,与脑损伤严重程度的关系、其最佳诊断临界值及实用性也有待进一步研究。值得注意的是,CNS 之外来源的 VILIPs 可增加假阳性,CNS 外和脊髓损伤来源的 VILIPs 能否被排除需在将来的研究中得到关注。

总之,VILIPs 的研究不仅对揭示各种 CNS 疾病的发病机制有重要意义,作为脑损伤生物标志物也极具应用前景,有望成为脑损伤早期诊断,病情和

预后判断的有效工具,但仍需要大样本多中心的系统性临床研究来验证。此外,VILIPs 还有可能成为治疗的新靶点,促使新的治疗药物产生。

参 考 文 献

- [1] Braunewell KH, Klein-Szanto AJ. Visinin-like proteins (VSNLs): interaction partners and emerging functions in signal transduction of a subfamily of neuronal Ca^{2+} -sensor proteins. *Cell and tissue research*, 2009, 335(2): 301-316.
- [2] Spilker C, Braunewell KH. Calcium-myristoyl switch, sub-cellular localization, and calcium-dependent translocation of the neuronal calcium sensor protein VILIP-3, and comparison with VILIP-1 in hippocampal neurons. *Molecular and cellular neurosciences*, 2003, 24(3): 766-778.
- [3] Zhao CJ, Noack C, Brackmann M, et al. Heinemann U, et al. Neuronal Ca^{2+} sensor VILIP-1 leads to the upregulation of functional $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal neurons. *Molecular and cellular neurosciences*, 2009, 40(2): 280-292.
- [4] Akagi T, Hijiya N, Inomata M, et al. Visinin-like protein-1 overexpression is an indicator of lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 2012, 131(6): 1307-1317.
- [5] Laterza OF. Identification of Novel Brain Biomarkers. *Clinical chemistry*, 2006, 52(9): 1713-1721.
- [6] Stejskal D, Sporova L, Svestak M, et al. Determination of serum visinin like protein-1 and its potential for the diagnosis of brain injury due to the stroke: a pilot study. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 2011, 155(3): 263-268.
- [7] An SA, Kim J, Kim OJ, et al. Limited clinical value of multiple blood markers in the diagnosis of ischemic stroke. *Clinical biochemistry*, 2013, 46(9): 710-715.
- [8] Tarawneh R, Ford AL, Ohlendorf M, et al. Visinin-like Protein-1 (VILIP-1): A Novel Plasma Biomarker For The Detection Of Acute Cortical Ischemic Stroke. In: *STROKE. PHILADELPHIA, PA 19106-3621 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS*, 2011, 42(3): E203.
- [9] Schnurra I, Bernstein HG, Riederer P, et al. The neuronal calcium sensor protein VILIP-1 is associated with amyloid plaques and extracellular tangles in Alzheimer's disease and promotes cell death and tau phosphorylation in vitro: a link between calcium sensors and Alzheimer's disease? *Neurobiology of disease*, 2001, 8(5): 900-909.
- [10] Tarawneh R, D'Angelo G, Macy E, et al. Visinin-like protein-1: diagnostic and prognostic biomarker in Alzheimer

- disease. *Annals of neurology* , 2011 , 70(2) : 274–285.
- [11] Mroczko B , Groblewska M , Zboch M , et al. Evaluation of visinin-like protein 1 concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with mild cognitive impairment as a dynamic biomarker of Alzheimer ' s disease. *J Alzheimer ' s Disease* , 2014. [Epub ahead of print].
- [12] Lee JM , Blennow K , Andreasen N , et al. The brain injury biomarker VLP-1 is increased in the cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients , *Clin chem.* 2008 , 54 (10) : 1617–1623.
- [13] Tarawneh R , Lee JM , Ladenson JH , et al. CSF VILIP-1 predicts rates of cognitive decline in early Alzheimer disease. *Neurology* , 2012 , 78(10) : 709–719.
- [14] Fagan AM , Xiong C , Jasielec MS , et al. Longitudinal change in CSF biomarkers in autosomal -dominant Alzheimer ' s disease. *Sci Transl Med* , 2014 , 6(226) : 226ra30.
- [15] Lewis DA , Moghaddam B. Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of { gamma } -aminobutyric acid and glutamate alterations. *Arch Neurol* , 2006 , 63 (10) : 1372.
- [16] Vercauteren FG , Flores G , Ma W , et al. An organelle proteomic method to study neurotransmission-related proteins , applied to a neurodevelopmental model of schizophrenia. *Proteomics* , 2007 , 7(19) : 3569–3579.
- [17] Hong KS , Won HH , Cho EY , et al. Genome-wide significant evidence of linkage of schizophrenia to chromosomes 2p24. 3 and 6q27 in an SNP-Based analysis of Korean families. *Am J Med Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* , 2009 , 150(5) : 647–652.
- [18] Braunevel KH , Dwary AD , Richter F , et al. Association of VSNI1 with schizophrenia , frontal cortical function , and biological significance for its gene product as a modulator of cAMP levels and neuronal morphology. *Translational psychiatry* , 2011 , 1: e22.
- [19] Bernstein HG , Krell D , Braunevel KH , et al. Increased number of nitric oxide synthase immunoreactive Purkinje cells and dentate nucleus neurons in schizophrenia. *Journal of neurocytology* , 2001 , 30(8) : 661–670.
- [20] Fan J , Chen Y , Chan HM , et al. Removing intensity effects and identifying significant genes for Affymetrix arrays in macrophage migration inhibitory factor-suppressed neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2005 102 (49) : 17751–17756.
- [21] Schonrath K , Klein -Szanto AJ , Braunevel KH. The putative tumor suppressor VILIP-1 counteracts epidermal growth factor-induced epidermal-mesenchymal transition in squamous carcinoma cells. *PloS one* , 2012 , 7(3) : e33116.
- [22] Xie Y , Chan H , Fan J , et al. Involvement of visinin-like protein-1 (VSNI-1) in regulating proliferative and invasive properties of neuroblastoma. *Carcinogenesis* , 2007 , 28 (10) : 2122–2130.
- [23] Wang W , Zhong Q , Teng L , et al. Mutations that disrupt PHOXB interaction with the neuronal calcium sensor HPCAL1 impede cellular differentiation in neuroblastoma. *Oncogene*. 2014 , 33(25) : 3316–3324.
- [24] Yan R , Chu GL. The diagnostic value of serum neuron specific enolase and visinin-like protein in HIE rat models. *Chinese Journal of Evidence-Based Pediatric* , 2013 , 8 (4) : 304–307.