

论著·临床研究

儿童传染性单核细胞增多症血浆蛋白质组学分析

冉志玲¹ 肖斌² 刘红瑞¹ 刘友平² 盛巧妮¹

(1. 泸州医学院附属中医院儿科, 四川 泸州 646000;
2. 泸州医学院生物化学与分子生物学教研室, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的** 通过对比分析传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)患儿与同龄健康儿童(对照组)的血浆蛋白质组图谱的差异表达,初步探索IM特异表达或异常表达的血浆“分子标志物”以协助临床诊断。**方法** 采用双向电泳技术(2-DE)结合质谱技术对IM患儿与对照组的血浆全蛋白进行比较蛋白质组学分析。**结果** 比较蛋白质组学分析发现IM患儿组与对照组比较具有明显差异表达蛋白质共有7个:血色素结合蛋白(Hpx)、VitD3结合蛋白(DBP)、胎球蛋白A(fetuin A)、C-反应蛋白(CRP)、载脂蛋白A(Apo A)、结合珠蛋白(HPT)、甲状腺运载蛋白(TTR),其中,HPT表达量较对照组明显升高,其余蛋白的表达量均较对照组明显降低。**结论** IM患儿与对照组比较存在明显差异表达的蛋白质,这些差异蛋白表达量的改变均与肝脏的急性损伤有关,提示儿童IM常伴有肝脏的急性损伤。若对这些差异表达的蛋白进一步分析,可望能够找到为IM临床诊断和治疗提供一定参考价值的血浆特异性标志物。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(3): 254-257]

[关键词] 传染性单核细胞增多症; 血浆蛋白; 蛋白质组学; 儿童

Plasma proteomic analysis in children with infectious mononucleosis

RAN Zhi-Ling, XIAO Bin, LIU Hong-Rui, LIU You-Ping, SHENG Qiao-Ni. Department of Pediatrics, Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China (Sheng Q-N, Email: 1925691596@qq.com)

Abstract: Objective To explore the abnormal expression of plasma proteins by analysis of proteomic expression profile in children with infectious mononucleosis (IM). **Methods** Two dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by the mass spectrometry was used to examine important protein spots with different expression levels between children with IM and normal controls. **Results** Seven differential proteins were obtained: hemopexin, vitamin D binding protein, fetuin A, C-reactive protein, apolipoprotein A, haptoglobin and transthyretin. Compared with the control group, haptoglobin showed a higher expression level in children with IM, and the expression levels of the other proteins were obviously down-regulated. **Conclusions** The expression changes of differential proteins identified in this study are all related with the liver acute injury, suggesting that children with IM are associated with acute liver injury. Further studies on the characteristics of above proteins will contribute to the diagnosis and treatment of pediatric IM.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(3): 254-257]

Key words: Infectious mononucleosis; Plasma protein; Proteomics; Child

传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)是儿童时期常见的感染性疾病之一,是由EB病毒感染所致的单核-巨嗜细胞系统传染性疾病。其临床表现复杂多样,且首发症

状不一,故临床易漏诊、误诊^[1],若治疗不及时可引起上呼吸道梗阻、脑炎、多发性神经炎、心律失常、心肌炎、肝功能衰竭及自身免疫性溶血等严重的并发症,危及患儿的生命。

[收稿日期] 2014-08-19; [接受日期] 2014-09-28

[基金项目] 泸州市科技计划项目(2012-S-38)。

[作者简介] 冉志玲,女,大学本科,副主任医师。

[通信作者] 盛巧妮,女,主任医师。

IM 的临床诊断主要依赖于病毒学检测, 然而 EB 病毒的培养周期长, 技术复杂, 费用昂贵, 且 EB 病毒 DNA 的检测, 只有在病毒血症时才能检出, 对于发病早期、轻症及幼儿易造成漏诊^[2]。如能在发病早期通过取材方便的外周血检测就能检测到出现早、特异性强、灵敏度高的分子标志物, 这对儿童 IM 的早期诊断和治疗具有重要的临床价值。

IM 系 EB 病毒感染所致, EB 病毒具有典型的嗜 B 淋巴细胞特性, 感染后主要侵犯血液系统及淋巴免疫系统^[3]。这提示如果对该病进行血浆比较蛋白质组学分析, 有望能找到针对 EB 病毒感染所致 IM 相关的出现早、特异性强、灵敏度高的分子标志物, 协助临床诊断。本研究采用蛋白质组学的研究方法, 通过双向凝胶电泳、质谱分析等生物信息学技术方法, 获得 IM 患儿及同龄正常儿童的血浆蛋白质图谱, 通过对这些图谱进行相互的差异分析并结合 INTERNET 数据库资料, 力图找到 IM 特异表达或异常表达的血浆分子标志物, 为儿童 IM 的早期诊断和治疗提供临床参考价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2013 年 10~12 月在泸州医学院附属中医院儿科住院的典型的 IM 患儿 10 例为研究对象, 发病年龄 2 岁 4 个月至 6 岁, 平均年龄 4.5 岁, 男女各 5 例。10 例患儿均符合 IM 诊断标准^[4]: (1) 临床表现有发热、咽峡炎、淋巴结及肝脾肿大; (2) 辅助检查: 血常规检查示变异淋巴细胞 >10%, 特异性血清学检查呈阳性, EBV-VCA-IgM 及 IgG 抗体效价增高, 血嗜异凝集反应阳性。6 例健康同龄儿童作为对照组。两组儿童家属对本研究均知情同意。

1.2 主要试剂和仪器设备

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等所有双向电泳试剂及固相 pH 梯度凝胶 (pH 4~7, 17 cm) 均购自 Bio-Rad 公司; 蛋白分子量 marker 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 购自碧云天生物技术研究; 其他常规试剂均购自 GE Healthcare 公司。ChemiDoc XRS 蛋白凝胶成像系统及双向电泳系统购自 Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机购自 Sigma 公司。分析软件及统计处理软件包括 ImageMaster 2D Platinum V5.0、SWISS-PROT 蛋白数据库、Mascot 肽指纹图

谱检索匹配软件及 SPSS 13.0 统计软件等。

1.3 血浆样品的收集

抽取 10 例 IM 患儿及 6 例同龄健康儿童清晨空腹静脉血 2 mL 于医用血常规管中 (EDTA 抗凝), 立即置 4℃ 冰箱静置 30 min 后普通离心机离心 (3000 g × 10 min), 吸取上清液 (血浆蛋白) 分装并冻存于超低温冰箱 -80℃ 备用。

1.4 血浆蛋白双向电泳 (2-DE) 分离

实验时取出以上所有冻存血浆, 置 4℃ 冰箱解冻 30 min 后离心 (15000 g, 4℃ 1 h), 以去除血浆中将干扰双向凝胶电泳的核酸、脂类、多糖及部分大分子蛋白质^[5]。各样本取离心后血浆上清液 3 μL 进行血浆蛋白双向电泳分离^[7]。最后用银染色法进行染色获得各样本的血浆 2-DE 图谱。各样本重复双向电泳 3 次, 每组至少获得 15 个重复性较好的双向凝胶电泳图谱以供下一步分析。

1.5 凝胶成像及 2-DE 图谱分析

将所有银染后的凝胶置 ChemiDoc XRS 蛋白凝胶成像仪中照相成像, 然后采用 Image Master 2D Platinum V5.0 双向电泳图谱软件 (Amersham Biosciences, Placataway, NJ, USA) 软件对所有双向电泳图谱进行组内、组间蛋白质表达的差异分析, 筛选出双向电泳图谱中标准化总灰度值 (%vol) 平均相差 2 倍及以上的蛋白点为差异表达蛋白。双向电泳图谱的斑点识别、半定量检测、配对分析及差异蛋白点的鉴别标准方法同文献^[6]。选取差异表达明显、分辨较清楚的蛋白点送北京肿瘤防治研究所质谱鉴定分析。最后将质谱分析结果结合 SWISS-PROT 数据库的搜索及 2-DE 图谱上相应点的表观分子量、等电点等进行综合分析来确定各差异表达蛋白点。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理与分析, 计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间均值的比较采用成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆蛋白 2-DE 凝胶图谱及质谱分析结果

血浆样本总蛋白 2-DE 图谱可见大多数蛋白点分布在分子量 M_w 30~70 kD 和等电点 pI 5~6.5 范围

内,同一样本的2-DE图谱蛋白点在对应位置上有一定的重复性,不同图谱间蛋白点在Mw和pI方向上有一定偏差,但并不影响结果的分析。

2.2 蛋白质表达的差异分析

经Image Master 2D Platinum V5.0软件进行比对分析,发现8个蛋白质点存在明显差异变化,其中蛋白点1、2、3、4、5、8均较对照组降低,而蛋白点6、7较对照组升高(图1~2)。

2.3 差异表达蛋白点质谱结合SWISS-PROT数据库分析结果

选取以上差异表达明显且分辨较清楚的8个蛋白点作进一步基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析,结合SWISS-PROT数据库的搜索及2-DE图谱上相应点的表观分子量、等电点等进行综合分析,最终共获得7个蛋白质(蛋白点6、7鉴定为同一蛋白质): 血色素结合蛋白(hemopexin, Hpx)、VitD3结合蛋白(vitamin D binding protein, DBP)、胎球蛋白A(fetuin A)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、载脂蛋白A(apolipoprotein A, ApoA)、结合珠蛋白(haptoglobin, HPT)、甲状腺运载蛋白(transthyretin, TTR),它们的功能大多与机体的炎症反应或肝脏的分泌功能相关(表1)。其中,除HPT(蛋白点6、7)表达量较对照组明显升高外,其余蛋白(蛋白点1、2、3、4、5、8)的表达量均较对照组明显降低(图2)。

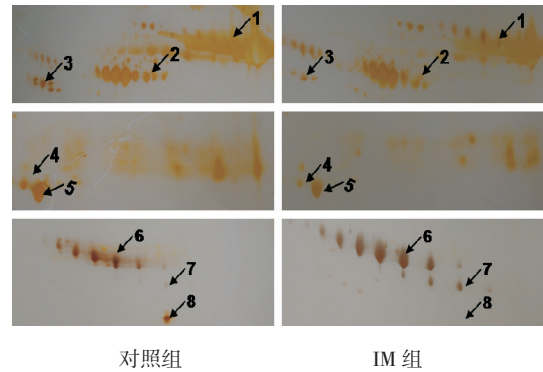


图1 IM组与对照组对应蛋白点的2-DE图谱的比较
蛋白点1、2、3、4、5、8表达均较对照组降低,蛋白点6、7表达均较对照组升高。

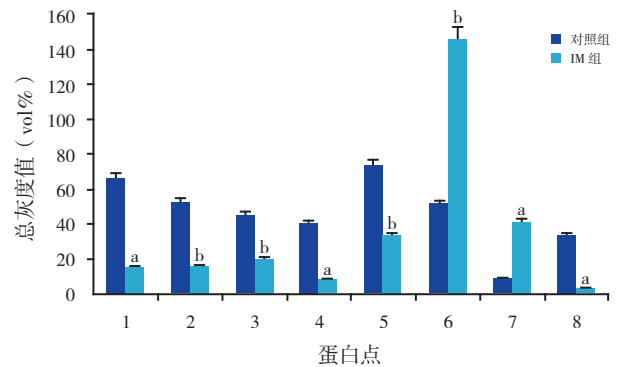


图2 两组各差异蛋白点2-DE图谱灰度值比较
与对照组比较, a示 $P<0.01$, b示 $P<0.05$ 。

表1 差异蛋白点质谱分析信息

蛋白点 编号	蛋白名称	SWISS-PROT 注册号	蛋白四 肽分值	肽段四 配数	理论分子量 / 等电点	实验分子量 / 等电点	功能
1	血色素结合蛋白 (hemopexin, Hpx)	P02790	116	8	72036/5.59	71300/5.40	负急性反应蛋白
2	VitD3 结合蛋白 (vitamin D binding protein, DBP)	P02774	132	5	53918/5.24	53800/5.30	肝脏分泌功能
3	胎球蛋白 A (fetuin A)	P02765	95	8	55403/4.61	54800/4.60	负急性反应蛋白
4	C- 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)	P02741	128	13	23760/5.12	23200/5.20	炎症反应
5	载脂蛋白 A (apolipoprotein A, ApoA)	P02647	102	9	23000/5.22	23000/5.30	肝脏分泌功能
6	结合珠蛋白 (haptoglobin, HPT)	P00738	112	5	42000/5.37	43000/5.20	肝脏分泌功能
7	结合珠蛋白 (haptoglobin, HPT)	P00738	105	7	38206/5.69	38000/5.60	肝脏分泌功能
8	甲状腺运载蛋白 (transthyretin, TTR)	P02766	92	4	35391/5.52	35000/5.50	肝脏分泌功能

3 讨论

Hpx是一种由肝细胞合成的急性时相蛋白,对T细胞介导的炎症反应具有负调节作用^[7];临床研究发现,在严重脓毒症感染等疾病中血液中

的Hpx浓度会明显下降,这使得Hpx浓度的测量可作为感染标志的生物标志物^[8-9]。DBP,主要在肝脏中合成,在血液中主要与VitD3结合成结合型VitD在血中运输,还参与机体的免疫调节及炎症反应^[10]。Fetuin A也是由肝细胞合成分泌的,研究

发现在各种损伤和炎症性疾病中其血清浓度很低,被认为是一种负性的急性反应蛋白^[11]。CRP是由肝脏合成的急性时相反应蛋白,在许多炎性疾病、免疫性疾病中其血浆浓度急剧升高^[12],然而本研究发现CRP在IM组血浆中含量明显下降,不过这与van de Veerdonk等^[13]研究小组研究的EB病毒急性感染结果一致。可见,血浆CRP浓度减低有可能是IM患儿的一个标志性生物分子。ApoA-1是肝细胞合成的一种载脂蛋白,当肝脏病理炎症活动度越严重,ApoA-1降低越明显。有文献报道,血清ApoA-1水平与肝脏严重程度密切相关,能可靠地反映肝细胞损害的程度,比血清胆固醇、甘油三酯更敏感^[14]。TTR是55 kDa的同源四聚体蛋白,在血中主要运载甲状腺激素。在肝脏疾病、营养不良和急性炎症时,TTR在血清中的表达量会降低^[15]。由此可见,以上在IM患儿组血浆含量明显下降的这些蛋白均主要在肝脏合成,且以上很多研究证实以上蛋白大都在肝功能损伤时表现为明显下降,这充分说明IM患儿多伴有不同程度的肝功能损伤。

此外,本研究发现在IM组血浆含量明显升高的蛋白—HPT也主要由肝细胞合成。HPT是一种具有免疫调节特性的血红蛋白结合蛋白,也是一种急性时相蛋白,在慢性肝病,如肝纤维化、肝硬化中其血浆含量明显降低^[16],但在肝脏的急性损伤中,HPT却明显升高,在肝损伤的急性反应期作为积极保护作用的抗氧化剂以预防肝损伤^[17]。以上在IM组血浆含量明显降低的蛋白提示,IM患儿伴有明显的肝功能损伤,再结合HPT的升高现象,综合提示IM患儿伴有的肝功能损伤处于损伤急性期。

IM是一种由EB病毒感染引起的全身免疫异常的疾病,容易发生免疫功能紊乱,出现肝脏功能受损^[18],这一结论支持该研究结果。由此可见,通过比较蛋白质组学分析获得的IM患儿血浆差异表达蛋白,能够为IM的临床诊断和治疗提供一定的参考价值。若对本研究获得的7个明显差异表达血浆蛋白做进一步分析,特别是对减低的CRP与升高的HPT进行联合分析,可望能够找到为儿童IM的早期诊断和治疗提供一定参考价值的血浆特异性标志物,以减少临床误诊及漏诊现象。同时提示:只要疾病确诊,在进行抗病毒、对症治疗过程中,一定要尽早进行保肝护肝治疗。

[参 考 文 献]

- [1] 李中跃,楼金环,陈洁. 儿童EB病毒感染首发症状及相关疾病谱分析[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(1): 20-22.
- [2] 段红梅,姚瑶,谢正德,等. 91例EB病毒相关疾病儿童血浆EB病毒DNA的检测[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(12): 897-900.
- [3] 罗晓明,周馥英,周永列,等. 儿童传染性单核细胞增多症B淋巴细胞及其活化状况的研究[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(9): 701-704.
- [4] 胡亚美,江载芳,诸福棠. 实用儿科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2005: 824.
- [5] 何大澄(主译). 蛋白质与蛋白质组学实验指南(理查德J. 辛普森主编)[M]. 北京:化学工业出版社, 2006: 134-150.
- [6] 魏峨,刘友平,郭芳宏,等. 慢性乙型肝炎病毒湿热中阻证血浆蛋白质组学分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(10): 1341-1345.
- [7] Rolla S, Ingoglia G, Bardina V, et al. Acute-phase protein hemopexin is a negative regulator of Th17 response and experimental autoimmune encephalomyelitis development[J]. J Immunol, 2013, 191(11): 5451-5459.
- [8] Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis[J]. Sci Transl Med, 2010, 2(51): 51-71.
- [9] Lin T, Sammy F, Yang H, et al. Identification of hemopexin as an anti-inflammatory factor that inhibits synergy of hemoglobin with HMGB1 in sterile and infectious inflammation[J]. J Immunol, 2012, 189(4): 2017-2022.
- [10] Speeckaert MM, Speeckaert R, van Geel N, et al. Vitamin D binding protein: a multifunctional protein of clinical importance[J]. Adv Clin Chem, 2014, 63: 1-57.
- [11] Dziegielewska KM, Brown WM, Gould CC, et al. Fetuin: an acute phase protein in cattle[J]. J Comp Physiol B, 1992, 162(2): 168-171.
- [12] Kang WC, Ahn TH, Moon CI, et al. Impact of arterial remodeling on high sensitive C-reactive protein after a DES implantation[J]. Ant J Cardiol, 2010, 145(2): 325-326.
- [13] van de Veerdonk FL, Wever PC, Hermans MH, et al. IL-18 serum concentration is markedly elevated in acute EBV infection and can serve as a marker for disease severity[J]. J Infect Dis, 2012, 206(2): 197-201.
- [14] 何凯茵,肖光明,张春兰. 慢性乙型肝炎患者血脂和载脂蛋白水平变化及其意义[J]. 实用肝脏病杂志, 2005, 8(6): 326-327.
- [15] Kaysen GA. Malnutrition and the acute-phase reaction in dialysis patients-how to measure and how to distinguish[J]. Nephrol Dial Transplant, 2000, 15(10): 1521-1524.
- [16] Sarvari J, Mojtahedi Z, Kuramitsu Y, et al. Differential expression of haptoglobin isoforms in chronic active hepatitis, cirrhosis and HCC related to HBV infection[J]. Oncol Lett, 2011, 2(5): 871-877.
- [17] Borlak J, Chatterji B, Londhe KB, et al. Serum acute phase reactants hallmark healthy individuals at risk for acetaminophen-induced liver injury[J]. Genome Med, 2013, 5(9): 86-99.
- [18] Yao Y, Duan HM, Yan HM, et al. Clinically controlled study on children, S infectious mononucleosis treated by Chinese medicine[J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(5): 347-352.