

· 临床研究 ·

儿童表皮葡萄球菌脑膜炎脑脊液蛋白质组学的初步研究

彭镜¹, 尹飞¹, 张红媛², 段元冬¹, 甘娜¹, 吴丽文¹

(1. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南长沙 410008; 2. 中南大学湘雅二医院, 湖南长沙 410011)

[摘要] 目的 细菌性脑膜炎是致残、致死率较高的儿童时期常见中枢神经系统感染性疾病,其预后与诊断时间的早晚、是否及时治疗密切相关。而目前脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中细菌培养的阳性率较低,使其确诊困难。该实验拟通过建立正常中国儿童 CSF 蛋白质双向凝胶电泳图谱,筛选表皮葡萄球菌脑膜炎(*Staphylococcus epidermidis meningitis*, SeM)特异性蛋白,为 SeM 的早期诊断提供线索,同时也为进一步治疗提供靶参考。方法 收集 SeM 患儿和同年龄正常儿童 CSF 各 4 mL,固相 pH 梯度二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)技术分离蛋白质,以正常儿童 CSF 的 2-DE 凝胶为参考胶,将 SeM 患儿 CSF 的凝胶与之进行比较分析,寻找两组患儿 CSF 蛋白质谱的异常变化斑点。结果 正常儿童 CSF 分离获得蛋白质斑点 438 个,SeM 患儿 CSF 分离获得蛋白质斑点 425 个,其中发现有 25 个蛋白质点仅在正常 CSF 表达,在 SeM CSF 中表达而在正常 CSF 中无表达的蛋白质点为 12 个;与正常 CSF 蛋白质点表达量比较,SeM 有 6 个蛋白质点表达量有 2 倍以上上调,而 19 个蛋白质点表达量有 2 倍以上下调。结论 该实验成功建立了正常儿童和 SeM 患儿 CSF 蛋白质 2-DE 图谱,通过凝胶图像分析和计算机信息处理,发现了一些与 SeM 相关的蛋白质差异位点。对这些差异位点的进一步分析和鉴定,可能有助于发现与 SeM 相关的疾病特异性蛋白,为早期诊断及寻找新的药物靶点提供了新的思路。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(3): 280-284]

[关键词] 细菌性脑膜炎; 表皮葡萄球菌脑膜炎; 蛋白质组学; 脑脊液; 儿童

[中图分类号] R446.14; R378.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)03-0280-05

A pilot study on the proteome of cerebrospinal fluid of *Staphylococcus epidermidis meningitis* in children

PENG Jing, YIN Fei, ZHANG Hong-Yuan, DUAN Yuan-Dong, GAN Na, WU Li-Wen. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China (Yin F, Email: yf3079@hotmail.com)

Abstract: Objective Bacterial meningitis is a kind of central nervous system infection with a high incidence, disability and fatality in children. Prompt diagnosis and treatment are associated with an improved prognosis. Low positive rate of bacterial cultures of the cerebrospinal fluid (CSF) makes it difficult to make a definite diagnosis. This experiment aimed to investigate a proteome profile of normal CSF of Chinese children by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE), and to sieve the disease-specific proteins of *Staphylococcus epidermidis meningitis* (SeM) to provide basis for early diagnosis and treatment of SeM. **Methods** Four mL CSF samples were obtained respectively from SeM and normal children. The separated proteins with immobile pH gradient (IPG) 2-DE technology and protein spots were visualized by Coomassie Brilliant Blue staining. The stained 2-DE gels were scanned on the Imagescanner and pictures were obtained through Labscan software. The images were analyzed with PDQuest software and the differences of protein spots were compared between the SeM and normal children. **Results** Mean protein spots of the 2-DE gels were 438 and 425 in the SeM and normal groups respectively. Twenty-five protein spots only occurred in normal CSF and 12 spots only occurred in the SeM group. The expression of 6 protein spots showed up-regulation and that of 19 showed down-regulation in the SeM group compared with that in the normal group. **Conclusions** A 2-DE profile of CSF proteome was successfully established in SeM and normal children through proteomic technique. By the differentiated analysis of these CSF 2-DE gels, the differences of CSF proteome profiles were found between SeM and normal children. Future analysis and identification of these spots will contribute to find out the disease specific proteins of SeM and to provide basis for early diagnosis and therapy of this disorder. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(3): 280-284]

Key words: Bacterial meningitis; *Staphylococcus epidermidis meningitis*; Proteomics; Cerebrospinal fluid; Child

[收稿日期] 2007-10-12; [修回日期] 2007-11-26

[基金项目] 湖南省卫生厅基金(B2007027); 湖南省科技厅项目(obsk3005)

[作者简介] 彭镜,女,硕士,主治医师。主攻方向:儿童神经系统疾病。

[通讯作者] 尹飞,教授,主任医师,博士生导师,中南大学湘雅医院儿科,邮编:410078。

自 Vieusseux 1806 年首次报道细菌性脑膜炎以来,细菌性脑膜炎一直被认为是一种致死性疾病,随着新的高效抗生素不断出现及现代医疗技术的日新月异,其病死率有所下降,但其发病率、死亡率和致残率仍较高^[1]。细菌性脑膜炎的预后与诊断的早晚、是否及时治疗密切相关。而目前脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中细菌培养的阳性率较低,使其确诊困难^[2]。本研究拟采用双向凝胶电泳及生物信息学技术开展 CSF 蛋白质组学研究,通过对正常儿童与表皮葡萄球菌脑膜炎(*Staphylococcus epidermidis meningitis*, SeM)患儿 CSF 蛋白质表达谱的比较分析,寻找 CSF 中差异表达蛋白质,以期发现 SeM 相关生物学标志,即疾病特异性蛋白(disease specific proteins, DSPS),为其早期诊断和治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本和临床资料 表皮葡萄球菌脑膜炎患儿 2 例,CSF 培养表皮葡萄球菌阳性;同年龄儿童 2 例(我院外科需要腰麻的手术儿童,所有患儿均无神经系统受累表现)为正常对照。于 4℃, 2 000 r/min, 10 min 离心后,储存于 -80℃ 冰箱。

1.1.2 试剂 硫脲、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(ICH₂CONH₂)、过硫酸胺(APS)、尿素、三氯乙酸(TCA)、TPCK 处理的胰蛋白酶(TPCK-Trypsin)、基质 α-氰基-4-羟基肉桂酸(CCA)、三氟乙酸(TFA)均购于 Sigma 化学药品公司。固相 pH 梯度干胶条(IPGstrip pH3-10NL, 24 cm)、IPG 缓冲液(pH3-10NL)、覆盖液为瑞士 Amersham Biosciences 公司产品。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、三羟基甲基氨基甲烷(Tris)、EDTA-2Na、CHAPS、十二烷基磺酸钠(SDS)、TEMED 来源于美国 Amresco 公司。考马斯亮蓝 G-250 购自 Fluka。

1.1.3 实验所需液体 ①裂解液:尿素(7 mol/L)、硫脲(2 mol/L)、4% CHAPS、1% DTT、Tris(40 mmol/L)、EDTA(0.5 mmol/L)、2% NP-40;②水化液:尿素(8 mol/L)、2% CHAPS、痕量溴芬蓝、DTT(65 mmol/L);③平衡贮液:尿素(6 mol/L)、Tris-HCl(pH8.8, 1.5 mmol/L)、99% 甘油、2% SDS、痕量溴芬蓝;④平衡液 A:平衡贮液、1% DTT;⑤平衡液 B:平衡贮液、2.5% 碘乙酰胺;⑥30% 单体:30% 丙烯酰胺、0.8% 甲叉双丙烯酰胺;⑦12.5% SDS-PAGE 分离胶:30% 单体、0.1% SDS、Tris-HCl(pH 8.8, 1.5 mmol/L)、0.5% APS、0.03% TEMED;⑧电泳缓

冲液:甘氨酸(192 mmol/L)、Tris-HCl(pH 8.3, 25 mmol/L)、0.1% SDS;⑨琼脂糖封闭液:0.5% 琼脂糖、电泳缓冲液、痕量溴芬蓝;⑩考马斯亮蓝染色液:磷酸、无水甲醇、0.12% 考马斯亮蓝、10% 硫酸胺;⑪脱色工作液:NH₄CO₃(200 mmol/L)、100% ACN 乙氰等体积混合;⑫酶解缓冲液:200 μL NH₄CO₃(200 mmol/L)、90 μL 100% 乙氰、710 μL DDH₂O;⑬萃取工作液:100% 乙氰、5% 三氟乙酸等体积混合;⑭CCA 基质工作液 L:1% CCA、5% TFA 20 μL、100% CAN 500 μL、DDH₂O 480 μL。

1.1.4 仪器 IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT II 垂直电泳槽、Imagescanner 扫描仪、Labscan 扫描控制和前处理软件均为瑞士 Amersham Biosciences 公司产品;Power PAC 3000 电泳仪、PDQuest 7.0 凝胶图像分析软件为美国 Bio-Rad 公司产品;SaVant 冷冻浓缩机购自美国;Stat Fax-2100 酶标仪购自广州倍肯公司;低温离心机系 Beckman 公司产品;Voyager-DETM STR MALDI-TOF-MS 质谱仪为 ABI 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 CSF 样品制备 ①蛋白提取:分别取 SeM(2 例患儿 CSF 混合)和正常儿童的 CSF(2 例混合)于 1.5 mL EP 管中,8 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 取上清。加入 TCA,使其最终浓度为 10%,充分混匀,冰上放置 1 h。然后 12 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 弃上清。沉淀用乙醚:乙醇混合液(1:1, v/v)洗两次,充分干燥。②蛋白定量:2-D Quant Kit 测蛋白质浓度,余样品 -80℃ 保存。

1.2.2 双向凝胶电泳 分别取总蛋白质 1 000 μg 与水化液充分混合,使总体积达到 450 μL,在 IPGphor 等电聚焦仪上进行等电聚焦,总电压时间为 74 690 Vh(30 V 水化 13 h 后,依次经 100 V 30 min, 500 V 30 min, 1 000 V 1 h, 5 000 v 1 h, 最后稳定在 8 000 V 下进行等电聚焦 8.5 h)。然后取出 IPG 胶条分别在平衡液 A、平衡液 B 中平衡 15 min 后移至 0.75 mm 厚的凝胶上端,排尽气泡后,用琼脂糖封固,进行第二向垂直 SDS-PAGE 电泳。电泳条件为每胶 2.5W 恒流电泳 30 min 后,改用每胶 11 W 恒流电泳至溴酚蓝离胶底缘约 1 mm 处停止电泳。

1.2.3 考马斯亮蓝染色 将凝胶转入染色盘中倒入考染液,振荡染色过夜,约 12 h。染色结束后以 20% 乙醇双蒸水洗涤脱色一次,再以双蒸水洗涤两次至背景清晰。

1.2.4 图像分析 通过 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描软件对凝胶进行扫描获取图像,借

助图像分析软件 PDQuest 7.0 进行详细分析,比较蛋白质斑点差异。以正常患儿 CSF 的 2-DE 凝胶为参考胶,将 SeM 患儿 CSF 的凝胶与之进行比较。根据斑点的位置、大小、形状等参数,软件自动将不同图谱中的相同蛋白质点匹配。不能匹配的蛋白质斑点视为差异点。

1.2.5 质谱分析 切割选定蛋白质点置于 1.5 mL 的 Ep 管中,双蒸水振荡洗涤 3 次。每点加脱色工作液 50 μ L 水浴 37 $^{\circ}$ C 共 30 min 脱色,100% ACN 乙氰脱水两次,冷冻抽干仪抽干 50 min 至胶块完全脱水。每点加酶解工作液并冰上吸胀 60 min 后加酶解缓冲液 37 $^{\circ}$ C 酶解过夜。

取上清,将上清液收集于 0.5 mL Ep 管中。每胶点加萃取工作液水浴 37 $^{\circ}$ C 共 60 min,冷冻抽干仪浓缩至总体积 2~5 μ L 后点板。

1.2.6 MALDI-TOF-MS 肽质量指纹图搜集和分析 将样品放入质谱仪中,采用反射模式,正离子谱测定,使用基质峰和胰蛋白酶自动降解离子峰作为内对照进行标准校正。采用 Data explorer 软件分析。通过 Mascot Distiller 软件扫描质谱峰的高度和坐标值,输入 Mascot 数据库中搜索 (www. matrix-

science.com)。当未知蛋白与数据库中已知蛋白的匹配分数达到或超过 64 分时,说明二者间氨基酸序列同源性比较高,在统计学上有意义 ($P < 0.05$),一般认为它们属同一种蛋白。

2 结果

2.1 2-D Quant Kit 测蛋白质浓度

根据所测 OD 值,得到线性方程 $y = -0.0033x + 0.4179$,相关系数 $r = 0.9957$ 。据此方程,测得处理好的 SeM CSF 蛋白浓度为 10.95 μ g/ μ L,正常 CSF 蛋白浓度为 7.15 μ g/ μ L。

2.2 SeM 患儿 CSF 图谱与正常儿童 CSF 图谱比较

正常儿童与 SeM 患儿 CSF 2-DE 图谱见图 1、图 2。选择图 1 作为参考胶,将图 2 与其进行匹配。结果测得图 1 有蛋白质斑点 438 个,图 2 有蛋白质斑点 425 个。有 25 个蛋白质点仅在正常 CSF 中表达 (图 3),有 12 个蛋白质点仅在 SeM CSF 中表达 (图 4);与正常 CSF 蛋白质点表达量比较,SeM CSF 有 19 个蛋白质点表达量有 2 倍以上下调 (图 5),而 6 个蛋白质点有 2 倍以上上调 (图 6)。

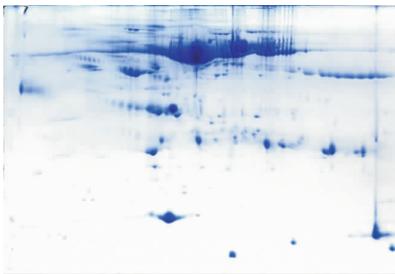


图 1 正常儿童 CSF 双向电泳图谱共分离获得蛋白质斑点 438 个

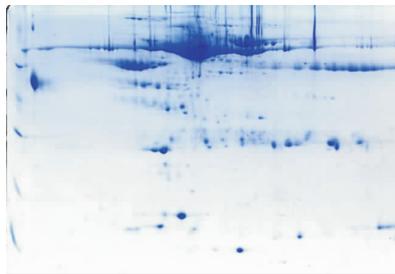


图 2 SeM 患儿 CSF 双向电泳图谱共分离获得蛋白质斑点 425 个

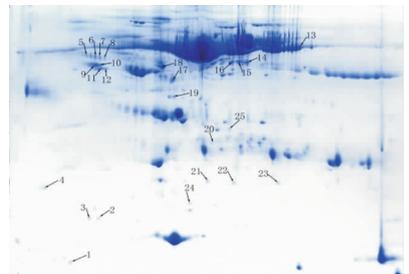


图 3 箭头所示为在正常 CSF 中表达而 SeM CSF 中无表达的蛋白质点

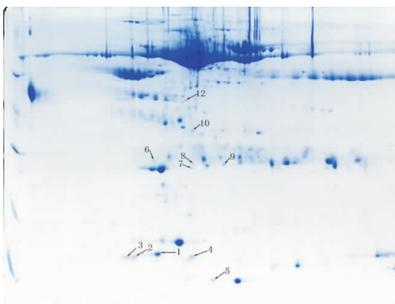


图 4 箭头所示为 SeM CSF 中表达而正常 CSF 中无表达的蛋白质点

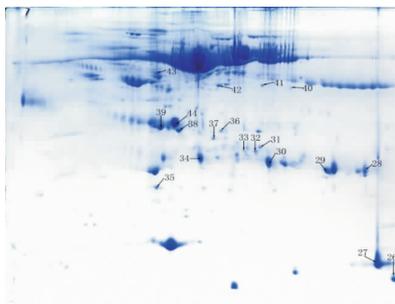


图 5 箭头所示为 SeM CSF 较正常 CSF 有 2 倍以上下调的蛋白质点

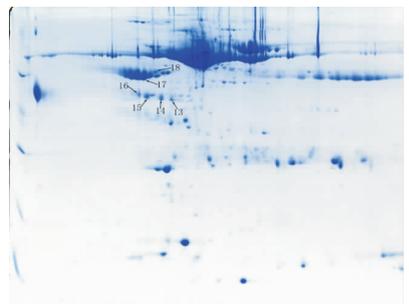


图 6 箭头所示为 SeM CSF 较正常 CSF 有 2 倍以上上调的蛋白质点

2.3 正常 CSF 与 SeM CSF 差异蛋白质点

通过 PDQuest V7.0 2D 分析软件对两张图谱进行比较发现有 25 个蛋白质点在 SeM CSF 中表达缺

失,有 12 个蛋白质点在 SeM CSF 中新表达,其等电点 (PI) 及分子量 (Mw) 信息 (表 1,2);有 25 个蛋白质点在正常 CSF 与 SeM CSF 中表达量有两倍以上

差异,其PI及Mw信息(表3)。

表1 正常CSF中表达而SeM CSF中无表达的蛋白质点

编号	等电点	分子量
N-1	4.39	11300
N-2	4.63	15600
N-3	4.55	15600
N-4	4.16	19600
N-5	4.52	67500
N-6	4.6	65700
N-7	4.64	65100
N-8	4.68	64600
N-9	4.6	60600
N-10	5.43	40098
N-11	4.65	58600
N-12	4.7	58600
N-13	6.71	71700
N-14	6.2	62200
N-15	6.12	62000
N-16	6.06	62500
N-17	5.46	52700
N-18	5.31	59700
N-19	5.47	44700
N-20	5.86	28800
N-21	5.81	20600
N-22	6.07	20300
N-23	6.51	20300
N-24	5.63	17500
N-25	6.03	32700

表2 SeM CSF中表达而正常CSF中无表达的蛋白质点

编号	等电点	分子量
Se1	5.53	57403
Se2	5.20	12600
Se3	5.18	12600
Se4	5.63	12700
Se5	5.85	10900
Se6	5.19	23300
Se7	5.63	12700
Se8	5.63	22900
Se9	5.97	22800
Se10	5.63	31100
Se11	5.67	38700
Se12	5.55	41600

2.4 部分差异蛋白质点的质谱鉴定结果

从差异蛋白质斑点中筛选出分辨清楚、差异明显的蛋白质斑点,切取后进行MALDI-TOF-MS分析,获得肽质量指纹图谱,进入数据库搜索,获取蛋白的基本信息,寻找疾病特异性蛋白。共选出5个差异比较明显的蛋白质点进行分析,获得了5张肽质量指纹图谱。软件识别其有效肽片断峰后查询数据库,搜索后匹配到蛋白质的点有5个,其基本信息(表4)。

表3 SeM CSF中表达量与正常CSF有2倍以上差异的蛋白质点

编号	等电点	分子量	表达量
13	5.33	41800	Up-regulated
14	5.21	42000	Up-regulated
15	6.06	25727	Up-regulated
16	5.18	44000	Up-regulated
17	5.19	51700	Up-regulated
18	5.14	54700	Up-regulated
26	9.56	10300	Down-regulated
27	9.35	11400	Down-regulated
28	7.4	23400	Down-regulated
29	7.03	23600	Down-regulated
30	6.45	23600	Down-regulated
31	7.15	27523	Down-regulated
32	6.32	28600	Down-regulated
33	6.21	29000	Down-regulated
34	5.78	26700	Down-regulated
35	5.28	20700	Down-regulated
36	5.98	35000	Down-regulated
37	5.91	32500	Down-regulated
38	5.57	35100	Down-regulated
39	5.81	36242	Down-regulated
40	6.67	53400	Down-regulated
41	6.39	54900	Down-regulated
42	5.95	54800	Down-regulated
43	5.29	62200	Down-regulated
44	5.54	38400	Down-regulated
45	5.38	26500	Down-regulated

表4 正常CSF与SeM CSF图谱部分差异蛋白质点的鉴定结果

编号	名称	等电点	分子量	匹配分数(%)
Se1	high affinity glutamate transporter	5.53	57403	(23)
N-10	alpha-2-HS-glycoprotein	5.43	40098	(35)
31	Kallikrein 6	7.15	27523	(65)
39	apolipoprotein E	5.81	36242	(22)
15	HP protein	6.06	25727	(40)

3 讨论

近年细菌性脑膜炎的主要致病菌为流感嗜血杆菌、肺炎链球菌和脑膜炎奈瑟球菌^[3]。而表皮葡萄球菌脑膜炎在颅脑手术后脑膜炎中占有较高的比例,为医院感染的重要病原菌。早期诊断和恰当干预是降低本病死亡率 and 后遗症发生率的关键。但由于应用传统的脑脊液涂片查找细菌和细菌培养阳性率不高,且大多数患儿在诊断表皮葡萄球菌之前已用过抗生素,造成病原学诊断的困难。故寻找疾病特异性蛋白对于提高早期诊断率,改善预后具有十分重要的临床意义。蛋白质组学是一门研究细胞内全部蛋白质的组成及其活动规律的新兴学科。高通量、大规模的蛋白质组学技术应用于生物学及医学

领域已取得了许多令人瞩目的进展^[4~7]。其中枢神经系统疾病方面的应用也在逐步的完善。

CSF 存在于脑室及蛛网膜下腔内,循环流动于脑和脊髓表面,中枢神经系统疾病能够显著影响 CSF 中蛋白质的浓度以及蛋白质存在的模式^[8]。正常情况下,CSF 的蛋白质浓度仅为血浆的 1/100~400,使得其更适合蛋白质组学技术的应用。且临床标本较易获得,因此 CSF 成为寻找中枢神经系统疾病生物标志物的首选。因为细菌性脑膜炎的致病菌包括多种,而临床上 CSF 细菌培养的阳性率较低,寻找相同致病菌引起的病例比较困难,所以本实验仅取 2 例由 CSF 培养表皮葡萄球菌阳性的患者进行实验研究。

实验利用固相 pH 梯度 2-DE 技术,成功建立了正常儿童、SeM 患儿 CSF 的 2-DE 表达图谱,并对其进行分析,发现两者之间存在点分布、点数以及点表达量的不同,说明正常儿童 CSF 与 SeM 患儿 CSF 蛋白质谱存在蛋白量与质的差别。要获得具有高分辨率又重复性好的 2-DE 凝胶图谱,样品的制备是关键。CSF 中盐浓度高(150 mmol/L)而蛋白浓度低(大约为 200~700 μg/L),高盐使等电聚焦时的电流增加而大大影响 2-DE 的结果。因此,在 CSF 做 2-DE 之前必须除盐及浓缩蛋白。我们选用了三氯乙酸(TCA)沉淀后真空抽干提纯法,结果表明可以有效的达到除盐及浓缩蛋白的目的。另外,CSF 中含有丰富的白蛋白及免疫球蛋白,其对 CSF 中某些低丰度蛋白的掩盖也是进行 CSF 蛋白质组学研究必须考虑的问题。但在去除高丰度蛋白的同时常常也会去除掉标本中的某些有价值的蛋白成分。因此,在我们的实验中没有预先去除 CSF 中高丰度的白蛋白及免疫球蛋白,结果表明对差异蛋白质点的分析影响不大。但是固相 pH 梯度 2-DE 技术作为蛋白质组学研究的主要方法之一,也存在一些的限制性:如有些蛋白质是非水溶性的(脂蛋白、膜蛋白),这些蛋白很难被分离出来,此外有些低丰度蛋白质尚无满意的方法分离出来等。

目前,对 CSF 蛋白质组的研究已初具规模,但对细菌性脑膜炎 CSF 的蛋白质组学研究国内外尚未见报道。本实验首次建立了 SeM 患儿 CSF 的 2-DE 表达图谱,并比较了其与自然 CSF 2-DE 表达图谱的差别,发现有 25 个蛋白质点仅在正常 CSF 表达,在 SeM CSF 中表达而在正常 CSF 中无表达的蛋白质点为 12 个;另外,与自然 CSF 蛋白质点表达量比较,SeM CSF 有 6 个蛋白质点表达量有 2 倍以上上调,19 个蛋白质点表达量有 2 倍以上下调。说明 SeM CSF 与自然 CSF 蛋白质不仅存在量的差别,还有质的不同,进一步分析和鉴定这些“全或无”的蛋白质分子,可能有助

于发现与 SeM 相关的疾病特异性蛋白,为早期诊断及寻找新的药物靶点提供了新的思路。

从所有差异蛋白质点中选取了 5 个差异比较明显的蛋白质斑进行质谱分析,结果显示高亲和力的谷氨酸转移酶和 α2-HS 糖蛋白仅在 SeM CSF 中表达,HP 蛋白在 SeM CSF 中表达量上调,载脂蛋白 E 和激肽释放酶 6 在 SeM CSF 中表达量下调。可能成为 SeM 的特异性蛋白质分子。

综上所述,本实验利用蛋白质组学技术,成功建立了 SeM 患儿和正常儿童 CSF 全蛋白 2-DE 图谱,通过凝胶图像分析和计算机信息处理,发现了一些与 SeM 相关的蛋白质差异位点。在后续的实验中,通过对这些差异蛋白位点的鉴定及功能的进一步研究,有望筛选出 SeM 的 CSF 蛋白质分子标志物,并为深入研究化脑的发生机制提供依据,而这些蛋白质分子标志物还有可能成为早期诊断的依据及治疗的药物靶标。

[参 考 文 献]

- [1] Anderson V, Anderson P, Grimwood K, Nolan T. Cognitive and executive function 12 years after childhood bacterial meningitis: effect of acute neurologic complications and age of onset[J]. *J Pediatr Psychol*, 2004, 29(2):67-81.
- [2] Fuglsang-Damgaard D, Pedersen G, Schønheyder HC. Positive blood cultures and diagnosis of bacterial meningitis in cases with negative culture of cerebrospinal fluid[J]. *Scand J Infect Dis*, 2008, 40(3):229-233.
- [3] Theodoridou MN, Vasilopoulou VA, Atsali EE, Pangalis AM, Mostrou GJ, Syriopoulou VP, et al. Meningitis registry of hospitalized cases in children: epidemiological patterns of acute bacterial meningitis throughout a 32-year period[J]. *BMC Infect Dis*, 2007, 7:101.
- [4] Patil ST, Higgs RE, Brandt JT, Knierman MD, Gelfanova V, Butler JP, et al. Identifying pharmacodynamic protein markers of centrally active drugs in humans: a pilot study in a novel clinical model[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(3):955-966.
- [5] Pan S, Zhu D, Quinn JF, Peskind, Montine TJ, Lin B, et al. A combined dataset of human cerebrospinal fluid proteins identified by multi-dimensional chromatography and tandem mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2007, 7(3): 469-473.
- [6] Conti A, Sanchez Ruiz Y, Bachi A, Beretta L, Grandi E, Beltramo M, et al. Proteome study of human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury indicates fibrin (ogen) degradation products as trauma-associated markers[J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21(7):854-863.
- [7] Fonteh AN, Harrington RJ, Huhmer AF, Biringer RG, Riggins JN, Harrington MG. Identification of disease markers in human cerebrospinal fluid using lipidomic and proteomic methods[J]. *Dis Markers*, 2006, 22(1-2): 39-64.
- [8] Pan S, Zhu D, Quinn JF, Peskind, Montine TJ, Lin B, et al. A combined dataset of human cerebrospinal fluid proteins identified by multi-dimensional chromatography and tandem mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2007, 7(3): 469-473.

(本文编辑:吉耕中)