

冠心病不稳定型心绞痛血瘀证的蛋白质组学

赵慧辉, 王伟, 郭淑贞

(北京中医药大学, 北京市 100029)

[关键词] 分子生物学; 冠心病; 不稳定型心绞痛; 血瘀证; 双向凝胶电泳; 蛋白质组学; 生物标志物

[摘要] 目的 进行健康人和冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者血浆的双向电泳图谱检测, 寻找冠心病不稳定型心绞痛血瘀证血浆差异蛋白, 探索冠心病不稳定型心绞痛血瘀证的蛋白质组学特点。方法 采用双向凝胶电泳和基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱对 6 例心绞痛痰瘀互阻证患者、9 例心绞痛气虚血瘀证患者和 12 例健康人血浆进行比较蛋白质组学研究, 寻找冠心病不稳定型心绞痛血瘀证血浆差异蛋白。结果 初步发现 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白、结合珠蛋白 $\alpha 1$ 链、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、结合珠蛋白 β 链、结合珠蛋白 $\alpha 2$ 链在冠心病不稳定型心绞痛痰瘀互阻证和气虚血瘀证患者中水平升高, 载脂蛋白 A ApoA 、载脂蛋白 A ApoA iv、甲状腺转运蛋白在冠心病不稳定型心绞痛痰瘀互阻证和气虚血瘀证患者中水平降低。结论 冠心病不稳定型心绞痛血瘀证可能属于一种炎症反应, 并且与脂代谢紊乱有关。发现的差异蛋白可能为研究或发现抗冠心病不稳定型心绞痛药物作用的新靶标提供线索。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Proteomics Study on Unstable Angina Pectoris Patients with Blood Stasis Syndrome

ZHAO Hui-Hui, WANG Wei, and GUO Shu-Zhen

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Unstable Angina Pectoris; Blood Stasis Syndrome; Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis; Proteomics; Biomarker

[ABSTRACT] **Aim** To establish 2-dimensional gel electrophoresis images and seek differentially expressed plasma proteins of unstable angina pectoris patients with blood stasis syndrome. **Methods** 2-dimensional gel electrophoresis and Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry were used to screen the differentially expressed plasma proteins among unstable angina pectoris with blood stasis syndrome patients and health volunteers. **Results** $\alpha 1$ -acid glycoprotein, haptoglobin $\alpha 1$ chain, $\alpha 1$ -antitrypsin, haptoglobin β chain and haptoglobin $\alpha 2$ chain were significantly highly expressed in the plasma of unstable angina pectoris with blood stasis syndrome patients, while apolipoprotein A ApoA , apolipoprotein A ApoA iv and transthyretin were decreased in the plasma of unstable angina pectoris patients with blood stasis syndrome. **Conclusions** $\alpha 1$ -acid glycoprotein, haptoglobin $\alpha 1$ chain, $\alpha 1$ -antitrypsin, haptoglobin β chain, apolipoprotein A ApoA and apolipoprotein A ApoA iv are differentially expressed in the unstable angina pectoris patients with blood stasis syndrome and control group, and some differentially expressed proteins are correlated with inflammatory reaction or lipid metabolic disorder, and these proteins could provide clues for the study and discovery of new protein targets for antianginal drugs.

不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris, UAP)是冠心病中最常见的类型, 已经成为心血管内科最常见的综合征之一, 研究 UAP 的防治成为临床亟需解决的一个重大课题。血瘀证是心绞痛中常见的中医证候表现。心绞痛的发病机制现仍然不完全清楚, 尚无早期诊断的特异性标志物。近年来蛋白质组学技术的飞速发展, 为研究心绞痛的发病机制和探索早期诊断的生物标志物提供了新的思路和技术平台。冠心病心绞痛发生过程中, 人体器官病理变

化的产物可释放入血, 导致血浆蛋白在结构和数量上的改变, 因此, 研究心绞痛状态时的人体血浆蛋白质组变化有着非常重要的意义。本研究采用双向凝胶电泳和基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱技术发现心绞痛血瘀证患者和健康对照组人群血浆水平的确存在差异^[1], 为了寻找更多的差异蛋白, 现采用 Agilent 抗体柱去除血浆中的高丰度蛋白后, 再进一步行双向凝胶电泳分析。

1 对象和方法

1.1 研究对象

6 例冠心病不稳定型心绞痛痰瘀互阻证、9 例冠心病不稳定型心绞痛气虚血瘀证住院患者, 其中男 7 例, 女 8 例, 年龄 69 ± 14 岁, 均符合 ACC/AHA/ACP-

[收稿日期] 2007-08-20

[修回日期] 2008-07-02

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2003CB517105)

[作者简介] 赵慧辉, 博士, 助理研究员, 主要从事冠心病生物学研究, E-mail 为 hh686@126.com。通讯作者王伟, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中西医结合基础研究, E-mail 为 wangwei26960@126.com。郭淑贞, 博士, 助理研究员, 主要从事冠心病生物学研究。

ASIM 联合议定的“慢性稳定型心绞痛诊疗指南(1999年)”以及中华医学会心血管病学分会2000年制订的“不稳定型心绞痛诊断和治疗建议”标准。气虚血瘀证的诊断采用2002年国家食品药品监督管理局《中药新药临床研究指导原则》制定的标准,痰瘀互阻证为兼有心血瘀阻证和痰阻心脉证者。同时排除以下疾病患者:急性心肌梗死、心肌炎、心脏神经官能症、肋间神经痛;其他疾病引起的心绞痛,如风湿热、梅毒、先天性冠状动脉畸形、肥厚型心肌病、主动脉瓣狭窄或关闭不全者;合并有脑中风、糖尿病、肺部感染、肾炎、肾功能衰竭、泌尿系感染、风湿病、肝、肾、造血系统、内分泌系统等严重疾病及关节病者;妊娠期或哺乳期患者,过敏体质患者。12例健康人年龄、性别相匹配,无血瘀证表现,其余基本情况一致。

1.2 样品采集

15例患者于入院2天内取清晨空腹肘静脉血2 mL, EDTA 抗凝,经4℃、3 000 r/min 离心10 min。取上清,分装,-80℃保存。健康人也于清晨取空腹肘静脉血,方法同上。

1.3 材料

pH4-7 固相 pH 梯度干胶条(IPG)、IPG buffer (pH3-10NL)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、矿物油、尿素、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)及考马斯亮蓝 R350 购自美国 GE 公司,过硫酸铵(AP)、琼脂糖和甘氨酸购自美国 Amresco 公司,其它试剂购自北京试剂公司。实验用水为 Milli-Q 去离子水。

1.4 仪器及分析软件

Ettan IPGphor ①等电聚焦仪、Ettan DALT six 双向垂直电泳仪、Multi Temp ②温控循环水浴及 EPS601 电源均为美国 GE 公司产品。质谱仪为 Bruker 公司 Ultraflex tof/tof。分析软件为 Imagemaster 6.0, GE healthcare。

1.5 血浆高丰度蛋白的去除

将各样品加入3倍量的 Buffer A, 15000 g 离心10 min, 取上清进样,根据保留时间、色谱峰分别收集高丰度和低丰度蛋白。色谱条件:流速为0.25 mL/min,柱温为室温,检测波长250 nm,进样量30 μ L,得到了较高的重复性(图1)。

1.6 双向电泳

将各组样品分别混合,参照 Amersham 公司双向电泳手册和 Gorg 等的方法进行。采用 IPG 预制胶条24 cm pH3-10NL。用 Bradford 法进行蛋白定量,再用水化液调整到合适浓度后上样。蛋白质上样量

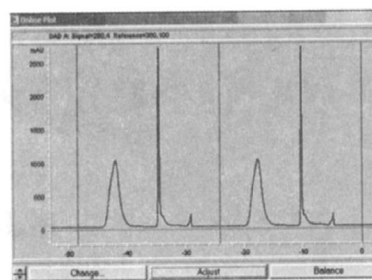


图1. 去高丰度蛋白的重复性

1.3 mg, 梯度升压, 等电聚焦总伏小时为100 kVh。平衡后胶条转移至13.5%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上进行第2向电泳。16℃恒温,采用恒功率电泳,开始时2.5 W、1 h,再用15 W至溴酚蓝到达凝胶的底部边缘。1.7 凝胶染色

电泳结束后,凝胶固定过夜,R350 90℃染色10 min,脱色至背景透明。

1.8 图像扫描及分析

凝胶通过 UMAX 2100XL 扫描,胶图数据存储后,采用 Imagemaster 2D Platinum 6.0 软件进行凝胶的蛋白点检测及匹配,配合三维图像、Histogram 及人工校对等方法,以保证点检测及匹配的准确性。

1.9 质谱鉴定

切割蛋白质点置于 Eppendorf 管中,进行胶内蛋白质酶解后,将从蛋白质差异点抽提所得的肽段通过质谱仪进行分析,获取蛋白样品的肽质量指纹图(由北京华大蛋白质组研发中心完成),最后应用 Mascot 软件在人类蛋白质公共数据库(NCBI、SWISS-PROT)中搜寻,获得蛋白质的相关信息。

2 结果

2.1 双向电泳与图像分析情况

经 Imagemaster 2D Platinum 6.0 软件进行图像的强度校正、点检测、匹配等分析,根据1.5倍水平差异作为标准,在冠心病不稳定型心绞痛气虚血瘀证和痰瘀互阻证中检测出16个差异点(图2)。

2.2 差异蛋白点的质谱分析及搜库情况

对差异蛋白点进行酶解、质谱分析,用 Mascot 软件搜索鉴定出8种蛋白质。其中 α 1-酸性糖蛋白、结合珠蛋白 α 1 链、 α 1-抗胰蛋白酶、结合珠蛋白 β 链和结合珠蛋白 α 2 链在冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者血浆中水平升高,载脂蛋白 A ③载脂蛋白 A iv 和甲状腺转运蛋白在冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者血浆中水平降低(表1和图3)。

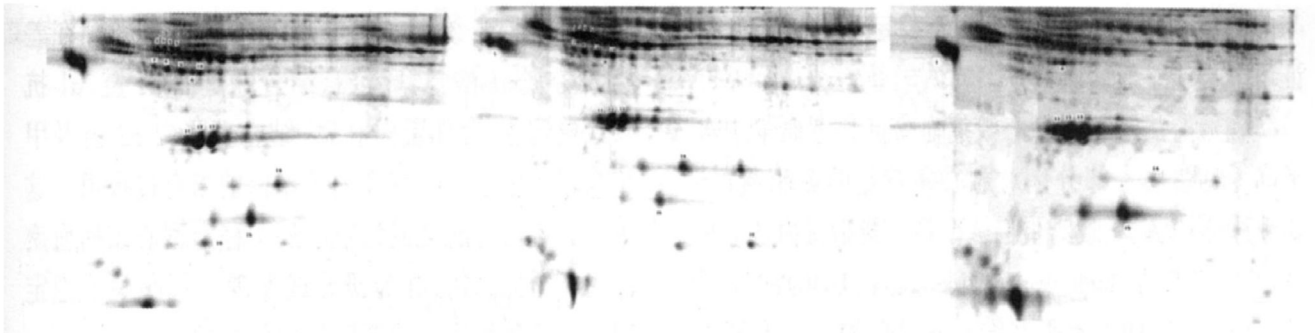
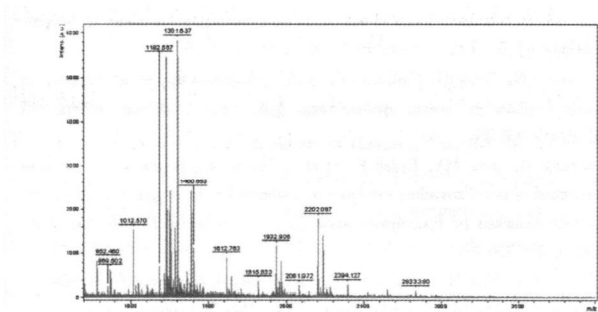


图 2. 血浆二维电泳图和部分差异点 左为冠心病不稳定型心绞痛气虚血瘀证, 中为冠心病不稳定型心绞痛痰瘀互阻证, 右为健康对照。

表 1. 冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者与健康人血浆差异蛋白质搜库鉴定结果

编号	鉴定方法	检索 ID	蛋白质名称	Mascot 肽质量 指纹图谱检索得分	蛋白质 分子量(Da)	理论等 电点
1	MS-MS, 2D map	IPI00022429	α1- 酸性糖蛋白	385	23496. 8	4. 93
2	MS-MS, 2D map	gil 1942629	α1- 抗胰蛋白酶	212	44280	5. 37
3-5	2D map	——	α1- 抗胰蛋白酶	——	——	——
6	MS-MS, 2D map	gil 178779	载脂蛋白 A ②	212	43358	5. 22
7	MS-MS, 2D map	IPI00641737	结合珠蛋白 β 链	267	46693. 4	6. 28
8-10	2D map	——	结合珠蛋白 β 链	——	——	——
11	MS, 2D map	gil 2914175	载脂蛋白 A iv	114	23389	5. 55
12-13	2D map	——	载脂蛋白 A iv	——	——	——
14	MS-MS, 2D map	gil 223976	结合珠蛋白 α2 链	116	41716. 9	6. 23
15	MS-MS, 2D map	IPI00022432	甲状腺转运蛋白	371	15877	5. 52
16	2D map	——	结合珠蛋白 α1 链	——	——	——



应第二时间窗保护作用的机制之一^[5]。我们的研究与此一致。据此推测,冠心病不稳定型心绞痛血瘀证可能属于一种炎症反应。

在冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者血浆中水平降低的蛋白一部分是对冠心病有益的载脂蛋白,如载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 A Ⅴ等。载脂蛋白 A iv 是高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的主要蛋白成分,而 HDL 水平与冠心病呈负相关。大量临床和流行病学研究证实载脂蛋白 A iv 的降低是心肌梗死的独立危险因素^[6]。国内也有学者发现,冠心病患者载脂蛋白 A iv 水平较高脂血症患者有明显的下调^[7]。载脂蛋白 A Ⅴ是一种脂结合蛋白,载脂蛋白 A Ⅴ的主要作用是参与脂质代谢,载脂蛋白 A Ⅴ通过介导 HDL 与肝细胞的结合以及被摄取,参与了胆固醇逆向转运^[8]。载脂蛋白 A Ⅴ使 HDL 含量升高并改变其成分,进而影响脂蛋白的代谢,促进细胞内脂质外排,从而发挥抗动脉粥样硬化作用^[9],也有观点认为载脂蛋白 A Ⅴ可以通过不依赖于升高 HDL 的途径起到抗动脉粥样硬化的作用^[10]。此外,载脂蛋白 A Ⅴ还具有抗炎作用^[11],可以阻止 P 选择素介导的白细胞与血小板之间的粘附^[12]。本研究发现,冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者血浆中载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A Ⅴ水平降低,可能是脂代谢紊乱的标志。

另外,甲状腺转运蛋白在冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者血浆中水平也降低,它是一种急性时相负相蛋白,在机体内起运输营养物质、激素和代谢物等^[13]作用,可能是机体代谢失常的潜在标志物。这些微观物质的变化可能是引起冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者宏观表现的原因之一。

综上所述,本研究采用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS 技术对冠心病不稳定型心绞痛患者和对照者去高丰度蛋白血浆进行比较蛋白质组学研究,建立了相应的血浆去高丰度蛋白、双向电泳、质谱鉴定方法,初步发现了 α 1-酸性糖蛋白、结合珠蛋白 α 1 链、 α 1-抗胰蛋白酶、结合珠蛋白 β 链、结合珠蛋白 α 2 链、载脂

蛋白 A Ⅴ、载脂蛋白 A iv 及甲状腺转运蛋白在冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者血浆中水平存在差异。其中, α 1-酸性糖蛋白、结合珠蛋白 α 1 链、 α 1-抗胰蛋白酶、结合珠蛋白 β 链、结合珠蛋白 α 2 链及甲状腺转运蛋白与心绞痛的关系以前未有报道。这些差异蛋白可能会成为冠心病不稳定型心绞痛血瘀证的新的标志物,并为研究或发现抗冠心病不稳定型心绞痛药物作用的新靶标提供线索。

[参考文献]

- [1] 赵慧辉, 王伟, 王硕仁, 等. 冠心病心绞痛血瘀证的血浆双向电泳-质谱研究[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26 (4): 724-726.
- [2] Dobryszczyka W. Biological functions of haptoglobin: new pieces to an old puzzle [J]. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1997, 35 (9): 647-654.
- [3] Heliovaara MK, Teppo AM, Karonen SL, et al. Plasma IL-6 concentration is inversely related to insulin sensitivity, and acute-phase proteins associate with glucose and lipid metabolism in healthy subjects [J]. *Diab Obes Metab*, 2005, 7 (6): 729-736.
- [4] Schmitz G, Aslanidis C, Lackner KJ. Recent advances in molecular genetics of cardiovascular disorders - implications for atherosclerosis and diseases of cellular lipid metabolism [J]. *Pathol Oncol Res*, 1998, 4 (2): 153-161.
- [5] Daemen M, Heemskerk VH, Van't Veer C. Functional protection by acute phase proteins α 1-acid glycoprotein and α 1-antitrypsin against ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation [J]. *Circulation*, 2000, 102: 1420-1426.
- [6] Axel Schlitt, Stefan Blankenberg, Christoph Bickel, et al. Prognostic value of lipoproteins and their relation to inflammatory markers among patients with coronary artery disease [J]. *Inter J Cardiol*, 2005, 102 (3): 477-485.
- [7] 宋剑南, 牛晓红, 刘军莲, 等. 冠心病患者血浆蛋白质差异表达谱 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (7): 541.
- [8] Elena Dvorin, Corder NL, Benson DM, et al. Apolipoprotein A Ⅴ a determinant for binding and uptake of high density lipoproteins by rat hepatocytes [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261 (33): 15714-15718.
- [9] Cohen RD, Castellani LW, Qiao JH, et al. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A Ⅴ [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99: 1906-1916.
- [10] Duverger N, Trempe G, Caillaud JM, et al. Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A Ⅴ [J]. *Science*, 1996, 273 (5277): 966-968.
- [11] Recalde D, Ostos MA, Badell E, et al. Human apolipoprotein A Ⅴ reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerotic effects of a chronic infection mimicked by lipopolysaccharide [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 756-761.
- [12] Vowinkel T, Mori M, Kriegelstein CF, et al. Apolipoprotein A Ⅴ inhibits experimental colitis [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114: 260-269.
- [13] Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha 1-acid glycoprotein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1482: 157-171.

(此文编辑 文玉珊)