

基于 iTRAQ 技术的慢性心力衰竭气虚血瘀证及气阴两虚证组差异蛋白质组学研究

孟永梅¹ 王 伟²

(1 内蒙古医科大学, 呼和浩特, 010110; 2 北京中医药大学, 北京, 100029)

摘要 目的: 寻找慢性心力衰竭(CHF)(Chronic Heart Failure, CHF)气虚血瘀证及气阴两虚证的相关蛋白质组学特征, 探讨证候发生发展机制的可能生物学通路。方法: 研究设计分为 CHF 气虚血瘀证、气阴两虚证、健康对照组, 利用 iTRAQ 标记定量结合串联质谱技术分析 CHF 气虚血瘀证及气阴两虚证的相关表达差异蛋白质, 为蛋白质组学层面的疾病与证候生物学基础提供实验依据, 可以在一定层面上揭示证的内涵。结果: 与健康对照组比较, 在 CHF 气虚血瘀证组表达差异蛋白质有 16 个, 其中载脂蛋白 E、半乳糖凝集素-3 结合蛋白等 11 个蛋白质表达上调, 维生素 D 结合蛋白、胰蛋白酶抑制剂等 5 个蛋白质表达下调; 与健康对照组比较, 在 CHF 气阴两虚证组表达差异的蛋白质有 15 个, 其中补体 9、间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白等 10 个蛋白质表达上调, 前血清淀粉样蛋白 P、维生素 D 结合蛋白等 5 个蛋白质表达下调。结论: 蛋白质组检测结果能够反映 CHF 气虚血瘀证及气阴两虚证的生物学基础, 从而能客观的评价证候特征, 为病证结合的研究开拓了新的视野。

关键词 慢性心力衰竭; 中医证候; iTRAQ 技术; 蛋白质组学

Differential Proteomics Study of Chronic Heart Failure with Qi Deficiency and Blood Stasis Syndrome and Qi and Yin Deficiency Syndrome Based on iTRAQ Technology

Meng Yongmei¹, Wang Wei²

(1 Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To explore proteomics characteristics of chronic heart failure (CHF) with qi deficiency and blood stasis syndrome and qi and yin deficiency syndrome and possible biological pathways of the mechanism. **Methods:** This study was designed to divide the participants into CHF with qi deficiency and blood stasis syndrome group, qi and yin deficiency syndrome group, healthy control group. Quantitative iTRAQ marker as a new quantitative proteomics technology combined with tandem mass spectrometry was used to analyze the differential protein expression of CHF with qi deficiency and blood stasis syndrome group and qi and yin deficiency syndrome, which may provide experimental evidence for the disease and biological basis in protein level, and reveal the content of syndrome in a certain level. **Results:** Compared with healthy control group, a total of 16 kinds of protein had differential expression in qi deficiency and blood stasis group. The expressions of apolipoprotein E, galectin-3-binding protein and other 9 kinds of proteins were up-regulated. The expressions of vitamin D-binding protein (DBP), trypsin inhibitor and other 3 proteins were down-regulated. Compared with health control group, there were 15 kinds of proteins which had differential expressions in qi and yin deficiency group, and complement 9, inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP) and other 8 proteins expressions were up-regulated. The expressions of pre-serum amyloid P component, DBP and other 3 proteins were down-regulated. **Conclusion:** Proteomic detection results can reflect the biological basis of CHF qi deficiency and blood stasis syndrome, qi and yin deficiency syndrome factor, which can objectively evaluate characteristics of this syndrome and provide new view of combined research of disease and syndrome.

Key Words Chronic heart failure; Traditional Chinese Medicine syndrome; iTRAQ; Proteomics

中图分类号: R2-03 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.09.004

慢性心力衰竭(CHF)是大多数心血管疾病的最终归宿,也是最为主要的死亡原因之一。CHF是目前唯一发病率仍在显著上升的心血管疾病,且医疗

费用比较高^[1]。最新研究结果表明衰弱的心肌从代偿期转变为失代偿期发生的细胞改变中,发现 RB-Fox2 减少与心肌衰弱之间的功能联系^[2]。在人群

基金项目: 国家自然科学基金项目(81260596)——“利用 microRNA 芯片技术寻找慢性心力衰竭血瘀证素相关的血清标志物研究”; 国家中医药管理局中医药行业科研专项(200807007)

作者简介: 孟永梅(1978.09—),女,博士,教授,研究方向: 中蒙医药研究, E-mail: mym930@126.com

通信作者: 王伟(1964.09—),男,博士,教授,研究方向: 中医药防治心、血管疾病的药理研究 E-mail: wangwei@bucm.edu.cn

心力衰竭的发病率为 1.5%~5.6%,65 岁以上者达到 7.4%,2 年死亡率为 37%,6 年死亡率为 82%,5 年存活率与恶性肿瘤相仿。可见心力衰竭严重影响着患者的生命质量和寿命,故心力衰竭的防治一直成为现代医学界研究领域中的核心问题。

差异蛋白质组学是当今生物学研究领域的一个重要组成部分,它通过比较生理和病理状态下细胞或组织中蛋白质的表达和修饰,揭示其疾病的病理生理过程具有重要意义。iTRAQ 技术是由美国应用生物系统公司(ABI)2004 年开发的同位素标记相对和绝对定量(Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation,iTRAQ)技术,它是建立在 iTRAQ™ 试剂的基础上,可同时对多种样品进行绝对和相对定量的研究方法,该项技术广泛应用于现代生命科学领域^[3-6]。该方法具有较好的精确性和可重复性,故弥补了 DIGE 及 ICAT 的不足。迄今为止多数方法只能进行 2 个蛋白质样品的同步比较,目前 iTRAQ 试剂能够同时进行 8 个样品的标记和同步分析比较。随着蛋白质组学、质谱技术、软件分析系统的不断的发展和改进,iTRAQ 技术很有可能成为定量蛋白质组学研究中的支撑技术^[7]。

蛋白组学与证候研究的结合,可以在一定层面上揭示中医证候的内涵,对证候的相关指标体系的研究起到了积极的推动作用。我们利用 iTRAQ 技术结合二维液相色谱-串联质谱分析 CHF 气虚血瘀证及气阴两虚证组的相关表达差异蛋白,并为蛋白质层面的疾病与证候生物学基础提供部分实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2009 年 4 月至 2010 年 12 月内蒙古医学院附属医院心内科、急诊心内科、蒙医科、体检中心等收治的慢性心力衰竭患者 45 例,随机分为 CHF 气虚血瘀证组,CHF 气阴两虚证组,健康对照组,每组 15 例,性别不限。在中医理论指导下,严格遵循流行病学的原则,采用横断面的调查方法,采集信息以面访方式进行记录,归档。每 5 例混合为一个样品,每组 3 个样品,共计 9 个样品。

1.2 诊断标准 1)诊断依据慢性心力衰竭诊断标准及分期依据(2007 年中国慢性心力衰竭诊断治疗指南);2)证候诊断依据 2002 年国家食品与药品监督管理局颁布的《中药新药临床研究指导原则》,且由 3 名中医医师盲诊,经辨证一致者入选。

1.3 试剂与仪器 台式电动离心机(80-1,杰瑞尔);万分之一天平(HangPingFA1004,上海);超声

仪(KQ-250DE);数显电热培养箱(HPX-9082ME,上海博讯);飞行质谱仪(MALDETOF,Bruker);振荡器(HY-5 型,江苏省金坛市);高效液相色谱(HPLC)(岛津半制备型 HPLC 系统流动相,A 液:10 mM KH_2PO_4 ,25% ACN,用 H_3PO_4 pH3.0;B 液:10 mM KH_2PO_4 ,2M KCl,25% CAN,用 H_3PO_4 pH3.0,阳离子交换柱:Phenomenex Luna 5u SCX 100A);制冰机(SIM-F124,sanyo);纳升级液相色谱(Nano LC,Proxeon Easy nano-LC,流动相 A:H₂O,0.1% FA,B:ACN,0.1% FA,色谱柱,C18 反相色谱微柱(100 mm×75 μm),5 micron);纯水机(Milli-Q,Millipore);酶标仪(BIO-TEX 公司,德国);高压灭菌器(Labo Autoclave,sanyo)等。实验材料包括:Triton X-100(Amersham Bioscience);BCA Protein Assay Reagent Kit(Pierce);iTRAQ® Reagent-8 Plex Multi-plex Kit(113-119,121)(Applied Biosystems Foster City,CA 94404 USA,批号:1006023);proteoExtract Albumin/IgG Removal Kit Cat. No. 122642(Merck);疏水性 C18 柱(Strata™ XPalentpending Polymeric Reversed Phase)(phenomenex);2D QUANT Kit(GE Healthcare);Triethylammonium bicarbonate buffer(TEAB)(Sigma-Aldrich);Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade(promega);Zip Tip® Pipette Tips(Millipore);TFA(MERCK);CHCA(BRUKER);CAN(fisher scientific);IAM(CALBIOCHEM)。

1.4 方法 1)样品制备:在患者入院第 2 天早晨 6:00—8:00 取被检者空腹静脉血 5 mL,装入血清管,4℃,3 000 r/min,离心 20 min,取上清,分装至冻存管,-80℃保存;2)血清高丰度蛋白的去除;3)样品沉淀及重溶;4)蛋白烷基化;5)2D QUANT Kit(GE)定量及消化;6)蛋白复溶及标记;7)标记肽段混合及 SCX 分离;8)除盐及冻干;9)样品复溶,MALDI 检测及上样;10)数据库搜索及统计学处理。

1.5 统计学方法 NCBI homan 库;Mascot 软件。得到质谱的 wjf,xmi 文件格式的数据用数据库搜索,软件提取搜索结果中匹配肽段的保留时间、报告离子的强度等信息进行蛋白鉴定及定量。数据都递交至 NCBI(homan 库)人数据库进行相应的搜索。我们运用 david(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)对差异蛋白进行富集分析,数据分析采用 fisher Exact test 方法。鉴定到 2 个以上来自于同一个蛋白的肽段,认为此蛋白可信,两两比值不等于 1 的肽段认为存在差异。我们在本此实验选取两两比值≥1.2 或≤-1.2,且 P 值<0.05,认为二者之间存在显著差

异,正负值表示该蛋白显著上调或显著下调。

2 结果

我们使用 iTRAQ 技术结合二维液相色谱-串联质谱分析方法对健康对照组、CHF 气虚血瘀证组、CHF 气阴两虚证组的血清蛋白质组进行了较为系统的研究,研究设计每组 15 例,每 5 例混合为一个样品,每组 3 个样品,共计 9 个样品。比较 CHF 气虚血瘀证、气阴两虚证组分别与健康对照组比较,找出各组表达的差异蛋白,具体结果及详细描述如下。

2.1 流行病学一般资料 30 例 CHF 患者合并疾病情况分析,所有入组 CHF 病例基础病因均为冠心病,其中合并高血压者 14 例,合并陈旧心梗者 7 例,合并糖尿病和高血脂者各 3 例。见表 1。

表 1 30 例 CHF 患者合并疾病的构成情况[例(%)]

组别	比例(%)
冠心病(<i>n</i> = 30)	100.0
高血压(<i>n</i> = 14)	46.7
陈旧心梗(<i>n</i> = 7)	23.3
糖尿病(<i>n</i> = 3)	10.0
高血脂(<i>n</i> = 3)	10.0

2.2 30 例 CHF 患者性别年龄分布情况 所有入组 CHF 病例在性别及年龄上比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05),具有可比性。见表 2。

表 2 30 例 CHF 组性别年龄分布情况

组别	男(例)	女(例)	平均年龄(岁)
气虚血瘀组(<i>n</i> = 15)	6	9	64.93 ± 12.16
气阴两虚组(<i>n</i> = 15)	8	7	65.33 ± 10.28

2.3 2 与健康对照组比较各组间表达差异的蛋白质 我们选取以 119(或 121)标记的健康对照组的蛋白质作为参照,平行检测,3 次生物学重复。那么,3 次 iTRAQ 的结果如何呢?经分析得知,第 1 组已鉴定的蛋白质和表达差异蛋白质分别是 387 个和 34 个,第 2 组已鉴定的蛋白质和表达差异蛋白质分别是 305 个和 29 个,第 3 组已鉴定的蛋白质和表达差异蛋白质分别是 386 个和 36 个。去除冗余,实际得到 58 个蛋白,这 58 个蛋白质在健康对照组、CHF 气虚血瘀证、气阴两虚证组血清中分别被标记了已知的同位素。比较某一蛋白质在不同组分之间的表达差异,我们通过该蛋白在不同标记下的峰面积之间的比值来计算。我们选取两两比值 ≥ 1.2 或 ≤ -1.2,且同时满足 *P* < 0.05 时,我们认为该蛋白在相应组中明显上调或明显下调。

2.4 与健康对照组比较 CHF 气虚血瘀证组表达差

异的蛋白质 选择以 119(或 121)标记的健康对照组的蛋白质作为参照,保证每一个样品技术重复 2 次并且在 3 次 iTRAQ 实验中至少 2 次或 3 次出现表达差异的蛋白质作为入选标准,共找到 CHF 气虚血瘀证表达差异蛋白质 16 个,其中 11 个蛋白质表达上调(向上的箭头),5 个蛋白质表达下调(向下的箭头)。具体分析结果见表 3。

表 3 与健康组比较 CHF 气虚血瘀证差异蛋白质列表

序号	蛋白质名称	表达变化
1	apolipoprotein E	↑
2	galectin-3-binding protein	↑
3	complement 9	↑
4	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain(ITIH1)	↑
5	apolipoprotein D precursor	↑
6	complement C5 preproprotein	↑
7	inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein(IHRP)	↑
8	alpha-2-macroglobulin precursor	↑
9	serum amyloid A-4 protein precursor	↑
10	gi 37138 unnamed protein product *	↑
11	gi 16553735unnamed protein product *	↑
12	Vitamin D-binding protein(DBP; VDB)	↓
13	trypsin inhibitor	↓
14	ceruloplasmin precursor	↓
15	transthyretin precursor(TBPA; TTR)	↓
16	apolipoprotein C-III precursor(ApoC-III)	↓

注:1、差异倍数 ≥ 1.2 倍;2、* 示:NCBI 数据库中未找见的无名蛋白质

表 4 与健康组比较 CHF 气阴两虚证差异蛋白质列表

序号	蛋白质名称	表达变化
1	complement 9	↑
2	IHRP	↑
3	alpha-2-macroglobulin precursor	↑
4	ITIH1	↑
5	serum amyloid A-4 protein precursor	↑
6	trypsin inhibitor	↑
7	TBPA	↑
8	apolipoprotein C-II	↑
9	complement C5 preproprotein	↑
10	gi 16553735unnamed protein product *	↑
11	pre-serum amyloid P component	↓
12	DBP	↓
13	immunoglobulin heavy chain variable region(IgVH)	↓
14	ceruloplasmin precursor	↓
15	galectin-3-binding protein	↓

注:1、差异倍数 ≥ 1.2 倍;2、* 示:NCBI 数据库中未找见的无名蛋白质

2.4 与健康对照组比较 CHF 气阴两虚证组表达差异的蛋白质 选择以 119(或 121)标记的健康对照组的蛋白质作为参照,保证每一个样品技术重复 2 次并且在 3 次 iTRAQ 实验中至少 2 次或 3 次出现表

达差异的蛋白质作为入选标准,共找到 CHF 气阴两虚证表达差异蛋白质 15 个,其中 10 个蛋白质表达上调(向上的箭头),5 个蛋白质表达下调(向下的箭头)。具体分析结果见表 4。

3 讨论

本研究拟通过运用 iTRAQ 技术结合二维液相色谱-串联质谱技术研究 CHF 气虚血瘀证及气阴两虚证患者血清样品,比较并归类血清表达差异的蛋白质,筛选及可能做为 CHF 证候特异性标志物。对表达差异的蛋白进行归类,试图寻找可能与 CHF 中医证候有关联的生物学指标或群,进而为 CHF 证型规范化研究提供实验依据,有望更好的指导临床。

3.1 与健康对照组比较 CHF 气虚血瘀证组表达差异的蛋白质

3.1.1 表达上调的蛋白质 1)代谢紊乱:物质在体内的消化、吸收、运转、分解等与生理有关的代谢过程称为物质代谢。物质代谢既有同化作用又有异化作用。提起代谢紊乱 CHF 气虚血瘀证组在本实验中主要涉及到脂质代谢紊乱及透明质酸代谢异常。前者主要包括载脂蛋白 E、载脂蛋白 D 前体,而后者主要包括 ITIH1、IHRP。众所周知,脂类向身体各部位的运输是靠脂蛋白(Lipoproteins)来完成的。血浆中的各类脂蛋白都由蛋白质和脂类两部分组成,其蛋白质部分主要为载脂蛋白(Apolipoprotein, apo)。目前发现的载脂蛋白有 20 种之多,主要有 apoA、apoB、apoC、apoD、apoE、apoJ 等类型。主要在肝(部分在小肠)合成,载脂蛋白是运载脂类物质及稳定脂蛋白的结构等功能。载脂蛋白 D(Apolipoprotein D, apoD)是一个 29 kD 的糖蛋白,它最初是在人血浆的高密度脂蛋白中被分离出来的。apoD 在结构上与其他类型的载脂蛋白存在很大的差异,被归入脂肪促成素家族。apoD 可以与胆固醇、黄体酮、胆红素等多种疏水性小分子结合,另外,apoD 在多种脊椎动物的各类组织中广泛表达,提示 apoD 在脊椎动物中重要的生理功能。近来研究表明,apoD 可作为多种癌症及神经系统疾病的早期诊断标记物而备受关注^[8]。在本实验中我们发现 CHF 气虚血瘀证组有载脂蛋白 D 前体,并且表达上调,可能说明 CHF 气虚血瘀证有脂类代谢的变化。除此之外还有 ApoE,它是存在于多种脂蛋白颗粒中,是正常人血浆脂蛋白中重要的载脂蛋白成分,主要功能为运输并介导某些脂蛋白与相应的受体。在神经系统中,ApoE 参与磷脂及胆固醇的动员和再分布,调节脂质代谢、维持胆固醇平衡,同时还参与神经系统发育和损伤后

的修复过程。ApoE 主要由肝脏产生,还有脑、脾、肾上腺等组织和单核巨噬细胞也合成 ApoE(约为总量的 10%~20%)^[9]。另有文献指出 ApoE 可作为肝细胞癌 HCC 的一个组织学标记物^[10]。间 α 胰蛋白酶抑制剂(Intertrypsininhibitor,ITI)家族是在人和动物的血液中存在的一种蛋白质^[11],ITI 包括 ITIH1, ITIH2, ITIH3, ITIH4 和 ITIH5,以及轻链 bikunin。Bour-guignon 对人类健康肺组织和恶性组织中 ITI 轻链和重链进行免疫组化观察,发现不但 ITI 轻链与恶性肿瘤的发生有关,ITI 重链也与肿瘤的恶性转化有关^[12]。本实验中发现的此类蛋白质有间-α 胰蛋白酶抑制剂重链(ITIH1)、α-胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白(IHRP)在 CHF 气虚血瘀证组均上调。ITI 家族所有成员在恶性肿瘤的发展进程中均起着不同的重要作用^[13]。2)补体相关:补体是存在于正常人和动物血清与组织液中的一组经活化后具有酶活性的蛋白质。主要承担机体调节、免疫、炎症反应、信号转导等多种功能。本实验中 CHF 气虚血瘀证组与补体系统相关表达差异的蛋白质有 C9、补体 C5 前蛋白原,且在 CHF 气虚血瘀证组的表达均上调。有研究证明脑出血后补体级联激活 C9 高表达并有沉积^[14-15]。另有研究指出,与良性卵巢肿瘤比较,在卵巢上皮性癌中,铜蓝蛋白、C9 蛋白表达上调^[16]。3)免疫相关:α-2 巨球蛋白前体(Alpha-2-macroglobulin precursor)为 α-2 巨球蛋白的前体物质。α-2 巨球蛋白是血浆中一种主要的四聚体糖蛋白,是由肝细胞与单核吞噬细胞系统中合成,是所有已知内蛋白酶的循环性抑制剂。对人体许多病理、生理过程发挥重要作用^[17]。它与淋巴网状系统细胞的发育和功能有密切联系。该蛋白在 CHF 的气虚血瘀证组中表达上调。4)炎症反应相关:与炎症反应相关蛋白质主要是血清淀粉样蛋白 A-4 蛋白前体(SAA4)。我们知晓血清淀粉样蛋白 A(Serum Amyloid A, SAA)通常被认为是炎症反应的主要蛋白之一,SAA 家族有 4 个成员,分别按被发现的顺序命名为 SAA1、2、3、4,最近越来越多的报道 SAA 参与了多种恶性肿瘤发生发展^[18]。5)细胞凋亡相关:半乳糖凝集素-3 结合蛋白(Galectin-3-binding Protein)为一种 β 半乳糖苷结合的凝集素,是脊椎动物半乳糖凝集素家族中的一种亚型,相对分子质量为 31 000,它可通过与配体的反应发挥很多生物学效应。半乳糖凝集素 3 在活化的嗜碱性细胞、巨噬细胞、上皮细胞及一些感觉神经元中表达最多。它主要存在于细胞浆中,尚可存在于细胞核、表面或胞外^[19]。

现已证实半乳糖凝集素 3 在许多上皮细胞和免疫细胞中有表达且参与多种细胞功能,尤其在 mRNA 剪接过程中发挥重要的作用,它还参与细胞生长,免疫调节等。有一项研究证明,恶性肿瘤中半乳糖凝集素 3 表达增高可能与它刺激细胞增殖及抑制细胞凋亡相关^[20]。本实验中半乳糖凝集素-3-结合蛋白在 CHF 气虚血瘀证组表达上调。6) 无名蛋白质:发现 2 个 NCBI 库中无名蛋白质分别为 gi137138 和 gi16553735,前者 13 个肽段被标记,后者 2 个肽段被标记。

3.1.2 表达下调的蛋白质 1) 代谢相关:代谢相关的蛋白质主要有胰蛋白酶抑制剂、TBPA、载脂蛋白 C-Ⅲ前体,下面逐一探讨。胰蛋白酶抑制剂(Trypsin Inhibitor),它抑制胰蛋白酶及糜蛋白酶,从而阻止胰腺中其他活性蛋白酶原的激活及其他的自身激活。本次实验中 CHF 气虚血瘀证组该蛋白表达下调。TBPA 是甲状腺素运载蛋白的前体物质,有报道称,肺淀粉样病变的淀粉样物的来源主要来自血浆甲状腺素运载蛋白。本实验中发现,与健康对照组比较该蛋白在 CHF 气虚血瘀证组下调。我们晓得载脂蛋白 C 是目前所记载脂蛋白中分子量最小的一类,在本实验中与健康对照组比较 CHF 气虚血瘀证组 ApoCⅢ前体下调。50 年代 Shore 等分别报道,VLDL 中 ApoA 和 B 外,还有第 3 种载脂蛋白。2) 免疫相关:DBP 是一种具有多种功能的蛋白质,主要参与维生素 D 的转运和清除肌动蛋白,并具有免疫调节作用^[21]。本实验中 CHF 气虚血瘀证组表达下调。3) 炎性反应相关:我们知道炎性反应在冠心病发病过程中的作用,但是炎性反应是否参与 CHF 的形成机制呢?我们在 CHF 组中发现铜蓝蛋白前体(Ceruloplasmin Precursor),是铜蓝蛋白(CP/CER)的前体物质。CP 是血清中的含铜蛋白质,结合 6 或 7 个铜离子,亮蓝色,在铜解毒和贮存以及铁代谢中起重要作用,有可能参与清除氧自由基和超氧阴离子。本实验中发现,与健康对照组比较该蛋白在 CHF 气虚血瘀证组表达下调。

3.2 与健康对照组比较 CHF 气阴两虚证组表达差异的蛋白质

3.2.1 表达上调的蛋白质 与健康对照组比较,CHF 气阴两虚证组表达上调的蛋白质有 C 9、IHRP、 α -2 巨球蛋白前体、ITIH1、SAA4 前体、胰蛋白酶抑制剂、TBPA、补体 C5 前蛋白原、ApoC-II 和 gi16553735,以上 10 个蛋白在前面均已叙述过,在此省略。

3.2.2 表达下调的蛋白质 与健康对照组比较,CHF 气阴两虚证组表达下调的蛋白质有 DBP、铜蓝蛋白前体、半乳糖凝集素-3 结合蛋白、前血清淀粉样蛋白 P(Pre-serum Amyloid P Component,SAP)、免疫球蛋白重链可变区(Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region,IgVH),其中前 3 者均已在前面叙述过,下面主要详细探讨后两者蛋白质。

SAP 是一种非纤维血浆糖蛋白,属于 pentraxin 家庭,系由肝脏合成的糖蛋白,广泛存在于所有脊椎动物的血液中,人血清中的含量约为 30 ~ 50 mg/L,它由 10 个相同的分子量均为 25KD 的亚基组成,亚基间通过非共价键连接而成 2 个完全相同的环状平行五聚体蛋白质^[22-23]。SAP 通过 Ca^{2+} 依赖性方式与多种配体结合,包括纤连蛋白、黏多糖、C4b 结合蛋白、补体成分、聚合 IgG、C 反应蛋白(CRP)、淀粉样原纤维、胶原蛋白等。SAP 可能通过激活并调节补体系统干扰脂蛋白代谢,参与淀粉样蛋白的形成^[24]。张凤珍等报道称^[25],血浆 HDL 的生理功能是完成胆固醇的逆转运,将肝外组织胆固醇转运到肝内转化排泄,故 HDL 有利于降低血胆固醇,将其视为有抗动脉粥样硬化作用。VLDL 可将肝内合成的内源性 TG 转运出肝到外周组织,经 LPL 催化降解为脂肪酸和甘油。LDL 将肝内合成内源性胆固醇转运到外周组织,故将其视为致动脉粥样硬化因子。人血清中,SAP 与 HDL 呈负相关,与 VLDL 呈正相关。SAP 与血浆 HDL、VLDL 结合,具有较高亲和力,而不与 LDL 结合。研究还显示,SAP 的功能与连接脂蛋白相互作用的能力相关,特别在动脉粥样硬化和淀粉样病变的发病机制中起了重要作用。还发现,它有助于保持淀粉样蛋白沉积的稳定。与健康对照组比较 SAP 在 CHF 气阴两虚证组表达下调,说明有脂类代谢的变化。

免疫球蛋白重链可变区(IgVH),重链大小约为轻链的 2 倍。根据 H 链抗原性的差异将其分为 5 类: μ 、 γ 、 α 、 δ 和 ϵ 链,不同 H 链和 L 链(κ 或 λ 链)组成完整 Ig 的分子分别称之为 IgM、IgG、IgA、IgD 和 IgE。 γ 、 α 和 δ 链上含有 4 个肽, μ 和 ϵ 链含有 5 个环肽。Ig 是体液免疫应答中,免疫功能最重要的免疫分子。该蛋白质在 CHF 气阴两虚证组表达下调。

总之,利用 iTRAQ 技术结合二维液相色谱-串联质谱技术检测结果在一定程度上能够反映 CHF 气虚血瘀证及气阴两虚证的生物学基础,可能更客观的评价证候特征,有可能为 CHF 证候的诊治提供新的血清标志物。但是,机体是一个完整的、相互联系

的复杂体系,而证候则是对机体在疾病某一阶段的整体状态的反应。因此,很难简单地用一个或几个蛋白质的变化来囊括此状态。某一个蛋白质的上调或下调往往会影响到上下游几个蛋白的表达状态。需要从“同病异证”和“异病同证”的蛋白表达谱差异中寻找证候的共同性和差异性,从而揭示证候的科学内涵。故,我们在将来的研究中,更应该深入研究,在中医证候学领域进行更广、更深的研究。

参考文献

- [1] 陈莹,金艳蓉,杨海燕. 慢性心力衰竭康复治疗研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2015,13(1):25-27.
- [2] Wei C, Qiu J, Zhou Y, et al. Repression of the Central Splicing Regulator RBFOX2 Is Functionally Linked to Pressure Overload-Induced Heart Failure[J]. Cell Reports, 2015, 10(9):1521-1533.
- [3] 曹美群,吴正治,吴伟康. 应用同位素标记相对和绝对定量技术筛选白厚苔和黄厚苔乳腺癌患者唾液差异表达蛋白[J]. 中西医结合学报,2011,9(3):275-280.
- [4] 王黎熔,王静,王富强,等. iTRAQ 技术鉴定小鼠睾丸发育差异表达蛋白的研究[J]. 临床检验杂志,2010,28(6):441-443.
- [5] 魏哲,水稻对褐飞虱取食应答的蛋白质组学研究[D]. 武汉:武汉大学,2010.
- [6] 庞秋颖,盐胁迫盐芥和拟南芥的芥子油苷和蛋白质组比较[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2010.
- [7] 韩额尔德木图,孟永梅. iTRAQ 多重化学标记串联质谱技术在蛋白质组学中的应用[J]. 中华中医药学刊,2016(4):795-798.
- [8] 王磊,宿红艳,明永飞,等. 载脂蛋白 D 的结构、功能及临床应用[J]. 细胞生物学杂志,2008,30(1):50-54.
- [9] 陈晓红,王荫华. 载脂蛋白 E-Alzheimer 病的危险因子[J]. 中国康复理论与实践,2002,8(7):411-413.
- [10] Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, et al. Protein level of apolipoprotein E increased in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2006, 28(3):625-631.
- [11] 赵明,米田雅彦,术全弘治. 间 α 胰蛋白酶抑制剂与胞外间质[J]. 生物化学与生物物理学进展,1997,24(3):220-223.
- [12] 和桂琴,梁建芳,郑绘霞,等. 间 α 胰蛋白酶抑制剂重链 H4 在上皮卵巢癌组织中的表达及意义[J]. 中国药物与临床,2010,10(4):422-424.
- [13] Alexander H, Juergen V, Nuran B, et al. Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH) genes in multiple human solid tumors: a systematic expression analysis[J]. BMC Cancer, 2008, 8(1):25.
- [14] 马松岭,周向阳,费世早,等. 补体介导出血性脑损伤机制及 CVF 干预的实验研究[J]. 皖南医学院学报,2005,24(4):253-257.
- [15] 刘兵荣,肖瑾,丁新生. 大鼠脑出血后水肿周围补体 C9 和核因子- κ B6 表达及黄芪多糖的干预作用[J]. 中国脑血管病杂志,2007,4(1):26-31.
- [16] 栾晓蕊,张婷,吴霞,等. 利用液相色谱串联质谱技术检测卵巢上皮性癌血清标记物的研究[J]. 现代妇产科进展,2010,19(7):510-513.
- [17] 孙英,李仁忠,张宗玉,等. α -2 巨球蛋白在人胚肺二倍体成纤维细胞衰老过程中的作用[J]. 中华老年医学杂志,2005,24(11):858-861.
- [18] 周敏,欧阳建,富田毅,等. 人血清淀粉样蛋白 A 家族在肿瘤转移中的作用及机制的初步研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2010,17(21):1701-1704.
- [19] Yoshii T, Inohara H, Takenaka Y, et al. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells[J]. International Journal of Oncology, 2001, 18(4):787.
- [20] 张延美,蒋玲,曲卫,等. 半乳糖凝集素 3 表达在良恶性甲状腺肿瘤鉴别中的意义[J]. 中华内分泌代谢杂志,2005,21(2):121-125.
- [21] 张剑文,刘炜,傅斌生,等. 乙腈预处理血清寻找肝细胞癌发病相关的蛋白质[J]. 中山大学学报:医学科学版,2010,31(2):288-292.
- [22] 庞呈义,李祥安,马培珍,等. 人血清淀粉样蛋白 P 的分离、纯化及抗血清的制备[J]. 泰山医学院学报,1998,19(3):189-191.
- [23] Emsley J, White HE, O'Hara BP, et al. Structure of pentameric human serum amyloid P component[J]. Nature, 1994, 367(6461):338-345.
- [24] Ying SH, Gewuiz AT, Jiang H, et al. Human serum amyloid P component oligomers bind and activate the classical complement pathway via residues 14-26 and 76-92 of the chain collagen-like region of C1q[J]. J Immunol, 1993(150):169-176.
- [25] 张凤珍,郝冈平,孙凌云,等. 血清淀粉样蛋白 P 与血浆脂蛋白作用机制的研究[J]. 泰山医学院学报,2003,24(4):333-336.

(2018-08-18 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 2110 页)

- [17] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. Nature, 2011, 472(7341):57-63.
- [18] Karlsson C, Ahm  S, Molin G, et al. Probiotic therapy to men with incipient arteriosclerosis initiates increased bacterial diversity in colon: a randomized controlled trial[J]. Atherosclerosis, 2010, 208(1):228-233.
- [19] 王玲,李群. 冠心病患者肠道菌群分布及其与尿酸代谢的关系分析[J]. 现代消化及介入诊疗,2012,17(6):327-330.
- [20] Chen HC, Chang CC, Mau WJ, et al. Evaluation of N-acetylchitooligosaccharides As the main carbon sources for the growth of intestinal bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett. 2002, 209(1):53-56.
- [21] 蔡子微,康白. 关于中医学与微生物学在原理上的统一性[J]. 中国微生物学杂志,1995,7(4):43-48.
- [22] 张北平,赵喜颖,吴艺峰. 肠道微生态与中医理论相关性的研究进展[J]. 现代消化及介入诊疗,2011,16(4):276-277.

(2018-06-04 收稿 责任编辑:张文婷)