

·基础研究·

基于 iTRAQ 技术的冠心病血瘀证蛋白质谱研究

肖隋熙,李杰,袁肇凯,李琳,王建国,胡志希,孙贵香,袁秀芳,简维雄*
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 探索冠心病血瘀证差异蛋白质谱,从蛋白水平阐释冠心病血瘀证的生物学机制。**方法** 对冠心病血瘀证与非血瘀证两组,应用同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术分离、鉴定两组的差异蛋白质。**结果** 鉴定到的蛋白质数量 780 个。两组共有 27 个蛋白点表达相差 1.5 倍以上,其中 11 个上调,16 个下调。上调的差异蛋白中主要功能涉及免疫反应、细胞间粘附作用主要指血小板参与的凝血反应、脂质代谢。下调的差异蛋白中主要功能涉及血小板细胞变形、细胞与细胞间关系迁移、细胞损伤表达。**结论** 冠心病血瘀证与免疫反应、血小板参与凝血反应的亢进,以及影响血小板形态变化、血小板间、血管内皮细胞与血小板的粘附迁移有密切的关系。

[关键词] 冠心病血瘀证; iTRAQ; 蛋白质谱; 差异蛋白

[中图分类号] R285.5; R393 **[文献标识码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.07.002

Study of Protein Mass Spectrometry of Coronary Heart Disease with Blood Stasis Syndrome Based on iTRAQ Technology

XIAO Suixi, LI Jie, YUAN Zhaokai, LI Lin, WANG Jianguo, HU Zhixi, SUN Guixiang, YUAN Xiufang, JIAN Weixiong*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To explore the differential protein mass spectrum of coronary heart disease (CHD) with blood stasis syndrome, and its biological mechanism. **Methods** The differential proteins in blood stasis syndrome and non-blood stasis syndrome groups were isolated and identified by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) technology. **Results** 780 proteins were identified. In the two groups, the expression difference of 27 protein spots was 1.5 times higher, and 11 of them were up-regulated and 16 of them were down-regulated. The up-regulated differential proteins were related with immune response, blood coagulation and lipid metabolism. The function of down-regulated proteins was related to platelet cytomorphosis, metastasis between cells. **Conclusion** The CHD with blood stasis syndrome has close relation with immune response, platelet participate in the coagulation reaction of hyperthyroidism, as well as with the influence of platelet morphology change, platelets, vascular endothelial cells and platelets adhesion and migration.

[Keywords] coronary heart disease with blood stasis syndrome; iTRAQ; protein mass spectrometry; differential proteins

本课题组近年来以“组学”技术从系统生物学角度对冠心病血瘀证展开“证”的生物学基础研究,代谢组学研究提示:心血瘀阻证与脂质代谢、糖代谢以及冠脉痹阻缺氧、剧痛引起的应激相关^[1]。但生命活动的功能执行体是蛋白质,绝大多数生命调控过程、疾病的原发过程以及大多数药物靶标均发生在蛋白质水平,且代谢产物是蛋白质作用的结果,为此本项目进行了基于同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术的冠心病血瘀证的蛋白质谱研究。现将结果报告如下。

1 方法

1.1 诊断标准

1.1.1 疾病诊断 参照中华医学会心血管病学分会“慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南”。通常见于冠状动脉至少一支主要分支管腔直径狭窄在 50% 以上的患者^[2]。

1.1.2 证候诊断 冠心病“血瘀证”及其他“非血瘀证”证候的辨证均按照《中华人民共和国中医药行业标准·中医病证诊断疗效标准》所制定的“中医心病诊断疗效标准与用药规范”进行^[3]。冠心病血瘀证

[收稿日期] 2015-11-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202647),中国博士后基金资助(2013M530355)。

[作者简介] 肖隋熙,女,在读硕士研究生,主要研究方向“心病中医证治机理研究”。

[通讯作者] * 简维雄,男,医学博士,E-mail: daxiong20001977@163.com。

证见:心胸阵痛,如刺如绞,固定不移,入夜为甚,伴有胸闷心悸面色晦暗。舌质紫暗,或有瘀斑,舌下络脉青紫,脉沉涩或结代。未见以上症状者纳入非血瘀证组。

1.2 纳入标准及排除标准

1.2.1 纳入标准 受试患者须符合“1.1.1”和“1.1.2”项下标准,并具备以下条件:(1)年龄在40~75岁;(2)健康对照者均经临床体格检查和生化检查证明无疾病者。

1.2.2 排除标准 (1)严重高血压、糖尿病、恶性肿瘤、及肝肾疾病、甲状腺病患者;(2)下列各种心脏病:糖尿病性心脏病、甲状腺功能亢进性心脏病、高血压性心脏病、肺源性心脏病、贫血性心脏病、系统性硬皮病性心脏病、风湿性心脏病等;(3)肝炎、结核等传染病;(4)精神系统疾病。

1.3 一般资料

112例患者来源于湖南中医药大学第一附属医院、湖南省中医院、湖南省中医药研究院、长沙市砂子塘社区卫生服务中心、长沙市黑石铺社区卫生服务中心、冶金部长沙冶金研究设计院卫生服务中心、湘潭江麓建设社区社区卫生服务中心、星沙鼎公桥卫生院。其中血瘀证组患者78例,男性45例,女性33例,平均年龄(62.39±7.41)岁;非血瘀证组患者34例,男性19例,女性15例,平均年龄(66.86±12.41)岁。以上两组一般情况经统计学分析差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.4 样本采集

所有受试者,禁食12h,于清晨8时空腹坐位抽取左肘前静脉血3mL,用于蛋白质组学研究。

1.4.1 蛋白质提取 血瘀证组与非血瘀证组各提取180 μ L上清,使用Proteominer试剂盒富集蛋白,向富集好的蛋白样品加入终浓度10mol/L的DTT,56 $^{\circ}$ C水浴1h,冷却至室温后,加入终浓度55mol/L的IAM,暗室放置45min。加入5倍体积的冷丙酮,于-20 $^{\circ}$ C沉淀过夜,4 $^{\circ}$ C条件下30000g离心15min,风干沉淀中残余丙酮,加入适量0.5mol/L的TEAB,冰浴超声5min。4 $^{\circ}$ C条件下30000g离心15min,取上清,定量冠心病血瘀证组蛋白总量261.3 μ g,冠心病非血瘀证组蛋白总量225.19 μ g。

1.4.2 蛋白制剂 提取100 μ g蛋白,用裂解缓冲液(7mol/L尿素,2mol/L硫脲,4%CHAPS,40mol/L的Tris-盐酸,pH8.5)含有1mol/LPMSF和2mol/L的EDTA(终浓度)萃取。5min后,10mol/LDTT(终浓度)加入到样品中。将悬浮液进行超声处理,在200w15min,然后在4 $^{\circ}$ C,30000g离心15min,上清充分混合,上清加入5倍体积预冷丙酮,在-20 $^{\circ}$ C沉淀2h,在4 $^{\circ}$ C下,30000g离心后,弃去上

清液。将沉淀物用丙酮冷冻三次。将沉淀风干,溶解于裂解缓冲液。将悬浮液进行超声处理200W15min,并在4 $^{\circ}$ C,30000g离心15min。将上清转移到另一管中。上清液在56 $^{\circ}$ C条件下加入终浓度10mol/L DTT处理1h,还原打开二硫键。随后,加入55mol/L IAM(终浓度)进行半胱氨酸的烷基化封闭,在暗室孵育1h。上清充分混合,在-20 $^{\circ}$ C以5倍体积冷却的丙酮沉淀蛋白质2h。4 $^{\circ}$ C,30000g离心后,弃去上清液,将沉淀物风干5min,溶解在500 μ L的0.5mol/L的三乙胺碳酸氢盐中(Applied Biosystems, 米兰, 意大利),并超声处理200W15min。最后,将样品在4 $^{\circ}$ C,30000g离心15min。将上清液转移到新管中并定量。上清液中的蛋白质被保存在-80 $^{\circ}$ C用于进一步分析。

1.5 分离鉴定

1.5.1 iTRAQ 标记和强阳离子交换(SCX)分离

从血瘀证组与非血瘀证组各精确称取100 μ g蛋白,然后按蛋白:酶=30:1的比例加入Trypsin(Promega公司),37 $^{\circ}$ C酶解4h。按上述比例再补加Trypsin一次,37 $^{\circ}$ C继续酶解16h。

胰酶消化后,肽通过真空离心干燥。将iTRAQ标记后的各组肽段混合,用SCX柱进行液相分离。采用岛津LC-20AB液相系统、分离柱为4.6mm \times 250mm型号的UltremexSCX柱对样品进行液相分离洗脱。整个洗脱过程在214nm下进行监测,经过筛选得到12个组分。每个组分分别用StrataX除盐柱除盐,然后冷冻抽干。

1.5.2 质谱鉴定

将抽干的每个组分分别用缓冲液A(2%ACN,0.1%FA)复溶至约0.5 μ g/ μ L的浓度,20000g离心10min,除去不溶物质。每个组分上样10 μ L(约5 μ g蛋白),通过岛津公司LC-20AD型号的纳升液相色谱仪进行分离。经过液相分离的肽段进入到串联ESI质谱:Q-EXACTIVE(ThermoFisher Scientific, San Jose, CA)。

1.6 信息学处理方法

本次使用蛋白质鉴定数据库:UNIPROTHomo_sapiens(127497sequences)。依据蛋白质丰度水平,当差异倍数达到1.5倍以上,且经统计检验其p-value小于0.05时,视为差异蛋白。

2 结果

2.1 肽段匹配误差分布

Q-Exactive质谱仪的一级质谱和二级质谱质量精确度都小于2ppm。但为了防止遗漏鉴定结果,因此基于数据库搜索策略的肽段匹配误差控制在20ppm以下。图1显示了所有匹配到的肽段的

相对分子量的真实值与理论值之间的误差分布。

2.2 蛋白质鉴定基本信息

二级谱图总数(TotalSpectra)390 775,为匹配到的谱图数量(Spectra)66 259,为匹配到特有肽段的谱图数量(UniqueSpectra)47 827,为鉴定到的肽段的数量(Peptide)3 858,鉴定到特有肽段序列的数量(Unique Peptide)3 168,鉴定到的蛋白质数量(Protein)780。两组共有 27 个蛋白点表达相差 1-5 倍以上,其中 11 个上调,16 个下调,对 27 个蛋白进行 GO(gene ontology)分析。

2.3 血瘀证组/非血瘀阻证上调蛋白

两组蛋白点表达相差 1-5 倍以上的上调蛋白共有 11 个,见表 1。

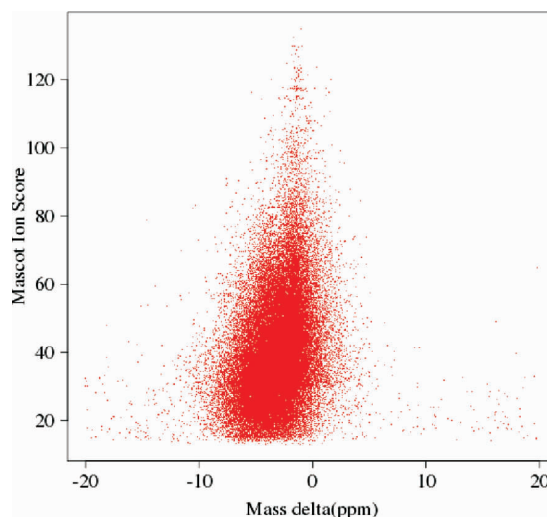


图 1 肽段匹配误差分布

表 1 血瘀证与非血瘀阻证比较上调的蛋白质

ID	登录号	蛋白功能注释	比例
1	trIA0A096LPJ9 A0A096LPJ9_HUMAN	Alpha-crystallin A chain	2.219
2	trIA0A024R6X1 A0A024R6X1_HUMAN	Carboxylesterase 2 (Intestine, liver), isoform CRA_b	2.098
3	trIB4DN21 B4DN21_HUMAN	cDNA FLJ53365, highly similar to Homo sapiens fibronectin	1.736
4	trIQ9NSD0 Q9NSD0_HUMAN	1 (FN1), transcript variant 4, mRNA Protein S	1.728
5	spIP06312 KV401_HUMAN	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)	1.698
6	trIA0N8J1 A0N8J1_HUMAN	V(k)3 sequence of NG9 gene from fetal liver DNA (Fragment)	1.653
7	trIA0A024CIM4 A0A024CIM4_HUMAN	Butyrylcholinesterase p.Val204Asp splice variant	1.614
8	spIQ13103 SPP24_HUMAN	Secreted phosphoprotein 24	1.565
9	spIP06311 KV311_HUMAN	Ig kappa chain V-III region IARC/BL41	1.549
10	spIP04180 LCAT_HUMAN	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	1.517
11	spIP02745 C1QA_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit A	1.508

11 个上调蛋白的 GO 注释如下。

生物过程:代谢过程 9,对刺激的反应 8,生物过程调控 8,单生物过程 8,生物调节 8,细胞过程 6,多细胞生物过程 6,细胞组成的组织或合成 4,免疫系统过程 4,生物过程的正调控 4,发育过程 3,生物过程的负调控 3,运动 2,信号 2,生物粘附 1,增长 1。

细胞成分:细胞 12,细胞外区域 11,细胞器 9,膜 6,细胞外基质 4,大分子复合物 4,膜封闭腔 4。

分子功能:结合 7,催化活性 3,酶调节活性 3,结构分子活性 2。

2.4 血瘀证组/非血瘀阻证下调蛋白

两组蛋白点表达相差 1-5 倍的下调蛋白共有 16 个,见表 2。

16 个下调差异蛋白 GO 注释如下。

生物过程:细胞过程 12,单生物过程 11,多细胞生物过程 9,生物调节 8,生物过程调控 8,对刺激的反应 8,代谢过程 7,生物粘附 6,细胞组成的组织或合成 6,构建 6,发育过程 5,生物过程的正调控 5,免

疫系统过程 4,运动 4,信号 4,生物过程的负调控 4,繁殖 1。

细胞成分:细胞部分 18,细胞器 14,细胞膜 10,细胞外区域 10,细胞 9,细胞外基质 8,大分子复合物 7,细胞连接 3,突触 1。

分子功能:结合 10,催化活性 3,结构分子活性 1,转运蛋白活性 1,抗氧化活性 1。

3 讨论

通过 iTRAQ 鉴定到的技术蛋白质数为 780。差异表达结果表明,两组共用 27 个蛋白点表达相差 1.5 倍以上,其中血瘀阻证与非血瘀证比较有 11 个蛋白上调,16 个蛋白下调。上调的差异蛋白:免疫球蛋白轻链、补体 C1q、 α B-晶状体蛋白、纤连蛋白、蛋白 S、分泌磷蛋白、卵磷脂胆固醇酰基转移酶、丁酰胆碱酯酶(Butyrylcholinesterase, BuChE)等。下调的差异蛋白:肌球蛋白、原肌球蛋白、粘附 parvin、髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)、Raichu、磷脂酶 D(Phospholipase, PLD)、血清淀粉酶 A(SAA)、踝蛋

表2 血瘀证与非血瘀阻证比较下调的蛋白质

ID	登录号	蛋白功能注释	比例
1	trIA0A024R3S7IA0A024R3S7_HUMAN	Phospholipase D family, member 5, isoform CRA_a	0.039
2	trIQ6ZRC8IQ6ZRC8_HUMAN	cDNA FLJ46365 fis, clone TEST14051054	0.109
3	trIA0A087WZB5IA0A087WZB5_HUMAN	Beta-parvin	0.302
4	trID3DQX7ID3DQX7_HUMAN	Serum amyloid A protein	0.382
5	trIB4DVY2IB4DVY2_HUMAN	cDNA FLJ54184, highly similar to Tropomyosin alpha-4 chain	0.385
6	trIQ53FB0IQ53FB0_HUMAN	Chloride intracellular channel 1 variant (Fragment)	0.547
7	trIQ59GZ2IQ59GZ2_HUMAN	PLEK protein variant (Fragment)ph	0.561
8	trIA0A087WU8IA0A087WU8_HUMAN	Tropomyosin alpha-3 chain	0.576
9	spIQ9Y490TLN1_HUMAN	Talin-1	0.582
10	trILOR6E1ILOR6E1_HUMAN	Alternative protein CACNA2D2	0.602
11	trIA2IRNOIA2IRNO_HUMAN	Raichu404X	0.613
12	trILOR4T3ILOR4T3_HUMAN	Histone H2B	0.639
13	trIB4E3S1IB4E3S1_HUMAN	cDNA FLJ57040, highly similar to Myosin-9	0.640
14	trIMOR0A5IMOR0A5_HUMAN	Dermokine	0.641
15	spIP0DJJ9ISAA2_HUMAN	Serum amyloid A-2 protein	0.648
16	spIP05164IPERM_HUMAN	Myeloperoxidase	0.662

白(talin)、血小板-白细胞 C 激酶底物同源区(PLEK protein varian, PH)结构域、胞外组蛋白、Dermokine (DK)等。

上调差异蛋白中的 α B-晶状体蛋白、纤连蛋白、蛋白 S、分泌磷蛋白与体内血小板参与的凝血反应的变化相关。其中可以抑制因凝血酶或波特洛蛇毒素诱发的血小板凝集,也能降低凝血酶诱导的 Ca^{2+} 内流和磷酸肌醇水解通过磷脂酶 C 血小板聚集^[4]。并且 α B-晶状体蛋白能抑制血小板粒分泌,还抑制 ADP 诱导的分泌物 5-羟色胺和血小板衍生的生长因子抗体^[5]。这些数据表明, α B-晶状体蛋白具有抗血小板功能^[6]。羧酸酯酶 2 可以水解氯吡格雷,降低其抗血小板的作用^[7]。纤连蛋白在血凝块形成过程中,可促进血小板附着于血管受损部位^[8]。蛋白 S 是活化蛋白 C 的重要辅因子,与蛋白 C(PC)蛋白 C 抑制物和血栓调节蛋白共同组成 PC 抗凝系统。PC 是 PC 系统最主要的组成成分,是体内重要的抗凝因子^[9]。推测这几个蛋白及酶水平上调提示血小板参与的凝血反应亢进。分泌磷蛋白与动脉粥样硬化斑块的钙化密切相关^[10]。参与动脉粥样硬化和血管成形术再狭窄的细胞因子:血小板衍生生长因子 PDGF、成纤维细胞生长因子 bFGF、TGF β 等均能刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞过度表达分泌磷蛋白。分泌磷蛋白经凝血酶酶切以后,能够与巨噬细胞表面的 CD44 受体结合,对巨噬细胞具有趋化功能;也可与细胞表面的整合素受体 $\alpha v \beta 1$ 相互作用,介导巨噬细胞的黏附和迁移,从而启动免疫工程^[11]。炎症和凝血之间相互联系,相互影响,炎症可以促进凝血系统激活,凝血过程中产生的活化因子反过来

可以影响炎症过程^[12],炎症-凝血网络是血栓形成的基础,血小板黏附、聚集,激活并释放各种炎性介质、细胞因子、黏附分子等,如二磷酸腺苷、血栓烷素 A2、IL-1、IL-6 等,从而激活凝血途径并影响炎症过程,从而诱导细胞介导的免疫反应,包括免疫球蛋白轻链以及补体 C1q^[13]。免疫球蛋白轻链以及补体 C1q 水平蛋白上调可能与此有关。

卵磷脂胆固醇酰基转移酶、丁酰胆碱酯酶则与体内脂质代谢状况相关。丁酰胆碱酯酶在代谢综合症和心血管疾病领域中的研究认为高脂诱导血清 BuChE 活性可以更直接地反映血脂的代谢功能,血脂增高时脂肪酶合成和转移增加,继而产生酰基胆碱增多,如乙酰胆碱、丁酰胆碱,后两者均为血清 CHE 的主要生理性底物,从而诱导肝脏合成胆碱酯酶增多^[14]。最近有学者提出卵磷脂胆固醇酰基转移酶拮抗 As 在于它能水解血浆中氧化的 LDL,继而抑制巨噬细胞吞噬氧化 LDL 形成泡沫细胞^[15],从而起到抗 As 作用。研究发现,在 CHD 患者中,LCAT 活性降低与 HDLC 浓度呈高度正相关,而与 As 的发生呈高度负相关。转基因动物研究也提示,LCAT 活性与 TC 水平和 As 严重程度负相关,LCAT 过表达使 HDLC 浓度升高,能降低动物 As 的易感性,具有抗 As 的作用^[16]。其与冠心病血瘀证的深层次关系还需进一步探索。

下调差异蛋白中的肌球蛋白,原肌球蛋白主要与血小板细胞变形相关。肌球蛋白,在冠心病的发展中起着重要的作用。肌球蛋白磷酸化,可以导致内皮细胞收缩,细胞间隙扩大,脂质浸润,形成斑快^[17]。血小板胞内肌球蛋白轻链磷酸化,促进肌球蛋白与肌动

蛋白结合,导致微丝收缩,血小板活化,血液凝固^[18]。肌球蛋白下调可能提示肌球蛋白磷酸化增多,血小板活化程度升高。原肌球蛋白则与血管平滑肌细胞类型转换有关,其类型转换与游走和增殖密切相关,对许多血管疾病如动脉硬化、血管形成术后再狭窄等的病理发生具有重要意义。研究发现在合成型平滑肌细胞中,原肌球蛋白及其他细胞骨架蛋白表达均下降^[19]。而血管形成术后再狭窄则与血液高凝状态、脂质沉积密切相关。

粘附 parvin、髓过氧化物酶、Raichu、磷脂酶 D、血清淀粉酶 A、踝蛋白、PH 结构域则和细胞与细胞间粘附迁移相关。parvin 参与了血管形成,在血管发展至关重要,有研究证实 parvin 缺乏会导致血管受损或内皮暴露,引起血小板与内皮下基质直接接触、发生粘附,引发血小板活化、聚集^[20]。血小板与 PINCH,整合素连接激酶形成 PIP 复合物,当钙蛋白酶的活化时可使 PIP 复合物解聚,从而改变血小板的粘附和伸展,影响血小板的正常功能^[21]。冠心病患者髓过氧化物酶水平升高,这一点是公认的。事实上,大量证据表明,大部分 MPO 直接来自于冠状动脉粥样硬化的斑块。所以支架植入后冠状动脉斑块损伤后 MPO 水平急剧增加是由动脉粥样硬化斑块大量释放,而不是由中性粒细胞分泌的^[22]。Raichu 属于白细胞跨内皮细胞迁移、趋化因子信号通路途径的蛋白,具体在心血管病的研究尚未见报道。磷脂酶 D 可被细胞外多种信号分子如生长因子、趋化因子、神经递质、激素等激活,蛋白酪氨酸激酶、蛋白激酶 C 等均参与对 PLD 激活的调节^[23]。PLD 激活后水解 PC 生成磷脂酸 (PA),PA 被磷脂酶 A2 作用下生成磷脂酸 (LPA)。而 LPA 有促上皮细胞增殖、平滑肌收缩及血小板聚集等作用。当 LPA 水平升高时提示体内血小板已经活化,血栓形成过程已经启动或已经形成血栓^[24]。磷脂酶 D 激活 LPA 的途径是在胞内完成,但是血浆中游离 PLD 变化与冠心病血瘀证的关系有待进一步探索。SAA 主要来源于肝细胞,病理状态时为了免疫防御分子抵抗局部的炎症损伤在动脉粥样硬化斑块中的多种细胞也能合成。急、慢性炎症或感染时,SAA 在体内的降解速度明显减慢,合成增加和降解减慢导致血中 SAA 持续升高。肝外细胞产生的血清淀粉酶 A 主要通过细胞间的黏附及内吞作用经细胞表面或细胞内的蛋白酶降解^[25]。其具有双向调节斑块的作用。这种水平高低的不同是否会影响血液的高凝状态,将有待进一步研究。踝蛋白是连接细胞粘附受体(如整合素家族)与肌动蛋白的衔接蛋白。脊椎动物有两种 talin 基因:TLN 1 和 TLN 2,分别编码 talin 1 和 talin 2 两种蛋白,其中 talin1 是 talin

主要成分,可以活化整合素,并将其与胞内的肌动蛋白相连接,实现细胞粘附和细胞的迁移^[26]。有研究揭示,talin1 以特定模式参与整合素的双向信号转导,在整合素活化中介导内-外信号产生过程中需要的是 talin1;通过血小板的粘附、聚集和伸展形成血栓子的过程,则需要依赖 talin1 活化之后的整合素参与^[27]。PH 结构域是存在于多种信号蛋白和细胞骨架相关蛋白中的一种功能性结构域^[28]。在介导蛋白质之间的相互作用、蛋白质的定位和调节蛋白质活性方面,PH 结构域都发挥着重要作用。如果缺失这一 PH 结构域,就会减弱 kindlin 与 talin 协同活化整合素 α II b β 3 的作用^[29]。而整合素 α II b β 3 是血小板上的黏附受体,对于血小板活化具有重要的作用^[30]。

胞外组蛋白、DK 的改变与体内细胞损伤表达相关。胞外组蛋白主要来自死亡的实质组织细胞释放。此时,染色质降解,细胞膜破裂,细胞溶解,大量核内组蛋白释放至胞外^[31]。由白细胞特别是中性粒细胞释放,在急性期反应中性粒细胞大量急剧增加而形成中性粒细胞胞外诱捕网时,组蛋白随 DNA 和高迁移率族蛋白 B1 等一起释放至胞外^[32]。表明胞外组蛋白、血小板和免疫受体之间存在复杂的相互作用^[33]。有研究表明 DK 作为一种新的角质形成细胞分泌的肽,与其他 2 个角质形成细胞分泌的肽形成一个新的分层上皮细胞基因复合体。研究结果表明,炎症条件下相关组织的上皮细胞层的 DK 基因表达差异有统计学意义,在上皮细胞层广泛受损中存在 DK 高表达,DK 与上皮细胞受损程度密切相关^[34]。

在上调的差异蛋白中主要功能涉及免疫反应(免球蛋白轻链、补体 C1q)、细胞间粘附作用主要指血小板参与的凝血反应(α B-晶状体蛋白、纤连蛋白、蛋白 S、分泌磷蛋白)、脂质代谢(卵磷脂胆固醇酰基转移酶、丁酰胆碱酯酶)。

在下调的差异蛋白中主要功能涉及血小板细胞变形(肌球蛋白,原肌球蛋白)、细胞与细胞间关系迁移(粘附 parvin、髓过氧化物酶、Raichu、磷脂酶 D、血清淀粉酶 A、踝蛋白、PH 结构域)、细胞损伤表达(胞外组蛋白、Dermokine)。

本项目在进行组间对照时,选择非血瘀证,并无明确针对性的原因就是突出了心血瘀阻证的独特变化机制。通过分析发现,冠心病血瘀证与:免疫反应、血小板参与凝血反应的亢进,以及影响血小板形态变化、血小板间、血管内皮细胞与血小板的粘附迁移等有密切的联系。在血瘀证中这些蛋白反应之间即上调蛋白与下调蛋白之间的关系是下一步需要探索的内容。

参考文献:

- [1] 简维雄,袁肇凯,黄献平,等.冠心病心血瘀阻证血浆代谢组学的检测分析[J].中国中西医结合杂志,2010,30(6):579-584.
- [2] 中华医学会心血管病学分会中华心血管病杂志编辑委员会.慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南 [J]. 中华心血管病杂志,2007,35(3):195-206.
- [3] 国家中医药管理局.中华人民共和国中医药行业标准中医病证诊断疗效标准[S].南京:南京大学出版社,1994:18.
- [4] Kozawa O, Matsuno H, Niwa M, et al. AlphaB-crystallin, a low-molecular-weight heat shock protein, acts as a regulator of platelet function[J]. Cell Stress Chaperones, 2001(6): 21-28.
- [5] Enomoto Y, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, et al. alphaB-crystallin extracellularly suppresses ADP-induced granule secretion from human platelets [J]. FEBS Lett, 2009, 583: 2 464-2 468.
- [6] Reddy VS, Reddy GB. Emerging Role for α B-Crystallin as a Therapeutic Agent: Pros and Cons [J]. Current Molecular Medicine, 2015, 15(1):47-61.
- [7] Parker RB, Hu ZY, Meibohm B, et al. Effects of Alcohol on Human Carboxylesterase Drug Metabolism [J]. Clinical Pharmacokinetics, 2014, 54:1-12.
- [8] 李亚楠,李京宝,商 澎,等.调控纤连蛋白表达的信号通路[J].中国细胞生物学学报,2013,35(1):98-103.
- [9] 王宗奎,林方昭,肖小璞,等.蛋白 C、蛋白 S 的研究与应用[J].中国输血杂志,2010,23(4):322-326.
- [10] Kikuo I, Kenichirou N, K Yashuhiro, et al. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation [J]. Circulation Research, 2002, 91(1): 77-82.
- [11] 于洪伟,刘奇峰,王玉亭,等.骨桥蛋白和基质金属蛋白酶-9 对经皮冠状动脉介入治疗后支架内再狭窄的诊断价值[J].中国循环杂志,2015,30(7):635-638.
- [12] Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation[J]. British Journal of Haematology, 2005, 131(4): 417-430.
- [13] 周 敏,李晓静,李晓辉,等.丹参酮 II-A 对免疫性血管炎、血小板及凝血功能影响的实验研究[J].血栓与止血学,2009,15(1): 8-12.
- [14] 王昭君.乙肝肝硬化患者血清胆碱酯酶的测定及其临床意义[D].银川:宁夏医科大学,2013.
- [15] Foger B, Chase M Amer MJ, et al. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice[J]. J Biol Chem,1999,274(52):36 912-36 920.
- [16] Furbee JW, Sawyer JK, Parks JS.Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency increases atherosclerosis in the low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E knock-out mice[J]. J Biol Chem,2002,277:3 511-3 519.
- [17] 朱华庆,程筱雯,张 慧,等.高脂血症对大鼠动脉肌球蛋白轻链激酶活性及表达的影响[J].安徽医科大学学报,2005,40(6):504-507.
- [18] 杨桂芝.肌球蛋白轻链激酶及其抑制剂[J].生命的化学,1999,19(6):279-281.
- [19] 徐 丹.原肌球蛋白对血管平滑肌细胞游走能力影响的研究[D].大连:大连医科大学,2003.
- [20] 左元玲,赵益明.血小板与内皮细胞相互作用的研究进展[J].中国实验血液学杂志.2013;21(4):1 078-1 082.
- [21] Voahanginirina R, Johann I, Amro E, et al. Calpain inhibition stabilizes the platelet proteome and reactivity in diabetes [J]. Blood, 2012, 120(2): 415-423.
- [22] 王大海,李 特,程 熠.髓过氧化物酶与动脉粥样硬化的研究进展[J].中国老年学杂志,2013,33(7):1 722-1 724.
- [23] 卢韵碧,周汉良.磷脂酶 D 在胞吞与胞吐中的作用[J].生理科学进展,2001,32(2):121-124.
- [24] 孙 磊,杨 涛,曹文东.深静脉血栓患者血浆中溶血磷脂酸与 D-二聚体的变化和意义[J].中国医药导报,2014,11(14):24-27.
- [25] 陈长强,顾志冬,樊绮诗.血清淀粉样蛋白 A 在疾病应用中的研究进展[J].检验医学,2012,27(9):776-779.
- [26] Ohmori T, Kashiwakura Y, Ishiwata A, et al. Silencing of a targeted protein in in vivo platelets using a lentiviral vector delivering short hairpin RNA sequence [J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2007, 27(10):2 266-2 272.
- [27] Davide P, Ana N, Collier B S, et al. Talin - driven inside - out activation mechanism of platelet α IIb β 3 integrin probed by multimicrosecond, all - atom molecular dynamics simulations [J]. Proteins Structure Function & Bioinformatics, 2014, 82(12): 3 231-3 240.
- [28] 张 巍,杜 丽,王凤阳,等.胰岛素受体底物 PH 结构域相互作用蛋白结构和功能研究进展[J].生物技术通讯,2009,20(9):270-272.
- [29] 艳 春,药立波,苏成芝.PH 结构域研究进展 [J]. 生命科学,2000,12(3):177-181.
- [30] 李益婷,徐 杨,蔡镇西,等.整合素 α II b β 3 信号转导通路相关蛋白的研究进展 [J]. 上海交通大学学报 (医学版),2013,33(9):1 311-1 314.
- [31] Tadie J M, Bae H B, Jiang S, et al. HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4 [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 304(5): 1 342-1 349.
- [32] Longstaff C, Varjú I, Sótónyi P, et al. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones[J]. J Biol Chem, 2013, 288(10): 6 946-6 956.
- [33] 蒋 训,高 蕾,余卫平.胞外组蛋白-一种新发现的内源性损伤相关分子模式分子[J].安徽医科大学学报,2013,48(11):1 421-1 424.
- [34] 付汉东,张爱华,刘汉忠. Dermokine- β mRNA 在结肠癌组织中的水平及临床意义[J].检验医学与临床, 2015,12(21):3 137-3 139.