

·基础研究·

本文引用:刘培,肖隋熙,罗颖,陈偶英,刘天洋,郭心鸽,谭元生,简维雄.自发性高血压大鼠左心室肥厚的蛋白质谱研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(6):605-613.

自发性高血压大鼠左心室肥厚的蛋白质谱研究

刘培,肖隋熙,罗颖,陈偶英,刘天洋,郭心鸽,谭元生,简维雄*
(湖南中医药大学,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 研究自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats,SHR)左心室肥厚心肌组织的蛋白质变化。**方法** 对8只SHR与8只WKY大鼠组织蛋白质进行iTRAQ检测分析;通过对差异蛋白Pathway富集分析选择与通路相关的蛋白质。**结果** 筛选出与通路相关的40个差异蛋白,SHR与WKY比较上调的差异蛋白有:1主要组织相容性复合物、2血小板活化因子乙酰水解酶、3有丝分裂原蛋白激酶、4热休克27kDa蛋白、5 Ighg3、6 14-3-3 γ 蛋白、7纤维蛋白原、8蛋白酶体26S、9纤维蛋白原 γ 链、10中性胆固醇酯水解酶、11溶血PAF乙酰转移酶、12纤连蛋白。下调的差异蛋白有:13丝氨酸蛋白酶、14载脂蛋白H、15血清锌 α 2糖蛋白、16泛醌9、17泛醌7、18 α 2-AP、19激肽原、20肝素2、21未知蛋白、22钠钾ATP转移酶、23胶原蛋白、24集聚蛋白、25对羟基苯丙酮酸双氧化酶、26C反应蛋白、27整合素、28凝血因子XII、29胎球蛋白、30整合素 α 7、31碳酸酐酶、32CD36、33免疫球蛋白重链 γ 多肽、34转胶蛋白、35血红蛋白- α 。**结论** SHR左心室肥厚发生涉及心肌凋亡、细胞增殖增生、炎症等多种细胞因子,导致细胞损伤与保护作用失衡。

[关键词] 自发性高血压大鼠;左心室肥厚;蛋白质组学

[中图分类号]R544.1;R393

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.06.001

Proteomic Analysis of Left Ventricular Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats

LIU Pei, XIAO Suixi, LUO Ying, CHEN Ouying, LIU Tianyang, GUO Xinge, TAN Yuansheng, JIAN Weixiong*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the protein changes in the myocardium of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** The protein of 8 SHR and 8 WKY rats were detected and analyzed by iTRAQ detection and analysis technique. The proteins related to pathway were selected by enrichment analysis of differential protein pathway. **Results** The 40 differential proteins related to pathways were screened. Upregulated proteins in SHR compared with WKY: 1 major histocompatibility complex, 2 platelet activating factor acetylhydrolase, 3 mitogen activated protein kinase, 4 heat shock protein 27 kDa, 5 Ighg 3, 6 14-3-3 protein gamma, 7 fibrinogen, 8 fibrin and 26 S proteasome, 9 the original gamol/La chain, 10 neutral cholesteryl ester hydrolase, 11 hemolytic PAF acetyltransferase, 12 fibronectin. Down regulated differentially proteins: 13 serine protease, 14 apolipoprotein H, 15 serum zinc alpha 2 glycoprotein, 16 ubiquinone 9, 17 ubiquinone 7, 18 alpha 2-AP, 19 kininogen, 20 heparin cofactor 2, 21 unknown protein, 22 sodium-potassium ATP transferase, 23 collagen, 24 agrin, 25 concentration of HPPD, 26 C reactive protein, 27 integrin, 28 coagulation factor XII, 29 fetuin 30 integrin alpha 7, 31 carbonic anhydrase, 32 CD36, 33 immune globulin heavy chain gamma polypeptide, 34 transgelin, 35 hemoglobin alpha. **Conclusion** Left ventricular hypertrophy in SHR involves many kinds of cytokines, such as myocardial apoptosis, cell proliferation, proliferation, inflamol / Lation and so on, leading to the imbalance of cell injury and protection.

[Keywords] spontaneously hypertensive rats; left ventricular hypertrophy; proteomics

[收稿日期]2017-12-29

[基金项目]国家自然科学基金项目(81774207;81202647;81473616),中医诊断国家重点学科开放项目(2014-16)。

[作者简介]刘培,女,在读硕士研究生,研究方向:心病中医证治机制研究。

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

自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)是研究高血压疾病的经典鼠种,研究发现在第14周龄时,SHR的左心室质量和左心室质量指数已经显著高于对照组,说明此时左室肥厚已经基本形成^[1]。人体和各种生命物质是由蛋白质组成的,为了从整体角度分析左室肥厚时细胞内生命过程中动态变化的蛋白质组成、表达水平、修饰状况、蛋白质之间以及蛋白质与其它生物分子之间的相互作用。本项目应用相对和绝对定量同位素标记(iTRAQ)技术展开对左心室肥厚干预的蛋白质组学研究。

1 材料

1.1 动物

选用SPF级12周龄自发性高血压大鼠(SHR)8只,雄性,同龄血压正常的(wistar-kyoto, WKY)大鼠8只,雄性,质量180~220 g,大鼠及饲料均由湖南中医药大学动物实验中心提供(SHR大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格编号:20141020,饲料购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司),饲养环境温度(20.0±2.0)℃,相对湿度45%~70%。自由饮食饮水,早8点至下午5点自动灯光照明。

1.2 试剂

Trypsin(Promega公司,美国),三乙胺碳酸氢盐(Applied Biosystem公司,意大利),TEAB(Applied Biosystem公司,意大利),乙腈(Sigma公司,美国),甲酸(Sigma公司,美国),2-D Quant Kit(GE Healthcare公司,美国),8标iTRAQ试剂(Applied Biosystem公司,意大利)。

1.3 仪器

离心机(德国,Eppendorf公司),Milli-Q Advantage超纯水系统(美国,密理博),precllys24多功能生物样品均质器(法国,Bertin),VCX130超声波细胞粉碎机(美国,Sonics),Mini-PROTEAN Tetra Cell小型垂直电泳槽(美国,伯乐),powerlook2100xl扫描仪(美国,UMAX),iMark酶联免疫吸附仪(美国,伯乐),SCX强阳离子交换液相色谱柱(美国,菲罗门公司),LC-20AD nanoHPLCOnline HPLC(日本,岛津公司),C-20AB HPLCOffline HPLC(日本,岛津公司),Q EXACTIVE质谱仪(中国,赛默飞世),Q-EXACTIVE(ThermoFisher Scientific, San Jose, CA)。

2 方法

2.1 蛋白制剂

2组大鼠处死后,分别剪取心脏左心室部分,每个样本剪碎后称取30 mg,用Lysis Buffer含有1 mol/L

PMSF和2 mol/L的EDTA(终浓度)萃取。5 min后,10 mol/L DTT(终浓度)加入到样品中。将悬浮液进行超声处理,在200 W 15 min,然后在4℃,30 000 g离心15 min,上清充分混合,上清加入5倍体积预冷丙酮,在-20摄氏度沉淀2 h,离心在4℃下,30 000 g后,弃去上清液。将沉淀物用冷冻丙酮3次。将沉淀风干,溶解于裂解缓冲液。将悬浮液进行超声处理,在200 W 15 min,并在4℃,30 000 g离心15 min。将上清转移到另一管中。上清液在56摄氏度条件下加入终浓度10 m MDTT处理1 h,还原打开二硫键。随后,加入55 mol/L IAM(终浓度)进行半胱氨酸的烷基化封闭,在暗室孵育1 h。上清充分混合,用5倍体积冷却的丙酮2 h在-20℃以沉淀蛋白质。在4℃下,30 000 g离心后,弃去上清液,将沉淀物风干5 min,溶解在500 μL的0.5 mol/L的三乙胺碳酸氢盐中(Applied Biosystems, 米兰, 意大利),并超声处理在200 W 15 min。最后,将样品在4℃,30 000 g离心15 min。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℃用于进一步分析。

2.2 分离部分iTRAQ标记和SCX分级

每个样品精确取出100 μg蛋白,然后按蛋白:酶=30:1的比例加入Trypsin,37℃酶解4 h。按上述比例再补加Trypsin1次,37℃继续酶解16 h。

胰酶消化后,肽通过真空离心干燥。样品标记用的iTRAQ标签如下:SHR(115标记),WKY组(113标记)。将肽标记的同量异序标记,在室温下孵育2 h。将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4.6 mm×250 mm型号的UltremexSCX柱对样品进行液相分离。将标记后抽干的混合肽段用4 mL buffer A (25 mol/L NaH₂PO₄ in 25% ACN, pH2.7)复溶。进柱后以1 mL/min的速率进行梯度洗脱:先在5% buffer B (25 mol/L NaH₂PO₄, 1 mol/L KCl in 25% ACN, pH2.7)中洗脱7 min,紧跟着一个20 min的直线梯度使buffer B由5%上升至60%,最后在2 min内使buffer B的比例上升至100%并保持1 min,然后恢复到5%平衡10 min。整个洗脱过程在214 nm吸光度下进行监测,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。

2.3 质谱鉴定

将抽干的每个组分分别用buffer A (2% ACN, 0.1% FA)复溶至约0.5 μg/μL的浓度,20 000 g离心10 min,除去不溶物质。每个组分上样10 μL(约5 μg蛋白),通过岛津公司LC-20AD型号的纳升液相色谱仪进行分离。所用的柱子柱包括Trap柱和分

析柱两部分。分离程序如下:先以 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速在 4 min 内将样品 loading 到 Trap 柱上,紧接着一个总流速为 300 nL/min 的分析梯度将样品带入分析柱,分离并传输至质谱系统。先在 2% bufferB (98% ACN,0.1% FA)下洗脱 5 min,跟着一个 35 min 的线性梯度使 bufferB 的比例由 2% 上升至 35%,在接下来的 5 min 内提高到 60%,然后在 2 min 内 buffer B 增加到 80% 并保持 4 min,最后在 1 min 内恢复至 5% 并在此条件下平衡 10 min。

经过液相分离的肽段进入到串联 ESI 质谱仪: Q-EXACTIVE(ThermoFisher Scientific,San Jose, CA)。一级质谱分辨率设置为 70 000,二级分辨率为 17 500。在母离子中挑选电荷为 $2^+ \sim 5^+$, 峰强度超过 20 000 的 15 个母离子进行二级分析,用碰撞能量为 $(27 \pm 12)\%$ 的 HCD 模式对肽段进行碎裂,碎片在 Orbi 中检测,动态排除时间设定为:色谱半峰宽时长。离子源电压设置为 1.6 kV。AGC 通过 orbi 来实现,其设置为:一级 3E6 到二级 1E5。扫描的质荷比范围为一级 350~2 000,二级 100~1 800。

2.4 蛋白质分析方法

2.4.1 数据库选择 Uniprot Rattus(36508sequences)。

2.4.2 Mascot 搜索 采用 Mascot 2.3.02 版本,操作时以 mgf 文件为原始文件,选择已经建立好的数据库,然后进行数据库搜索。

2.4.3 蛋白质丰度比分布 在相对定量时,如果同一个蛋白质的量在两个样品间没有显著的变化,那么其蛋白质丰度比接近于 1。当蛋白的丰度比即差异倍数达到 1.2 倍以上,且经统计检验其 p -value 值小于 0.05 时,视该蛋白为不同样品间的差异蛋白。对每个蛋白质差异倍数以 2 为底取对数后作出分布如图 1。表达量上调的蛋白居于横坐标 0 位置的右侧,表达量下调的蛋白居于横坐标 0 位置的左侧。

2.4.4 差异蛋白的 Pathway 富集分析 Pathway 显著性富集分析方法同 GO 功能富集分析,是以 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,找出与所有鉴定到蛋白背景相比,在差异蛋白中显著性富集的 Pathway。通过 Pathway 显著性富集能确定差异蛋白参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

3 结果

3.1 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 2 ppm。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 0.02 Da 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。

3.2 蛋白质鉴定

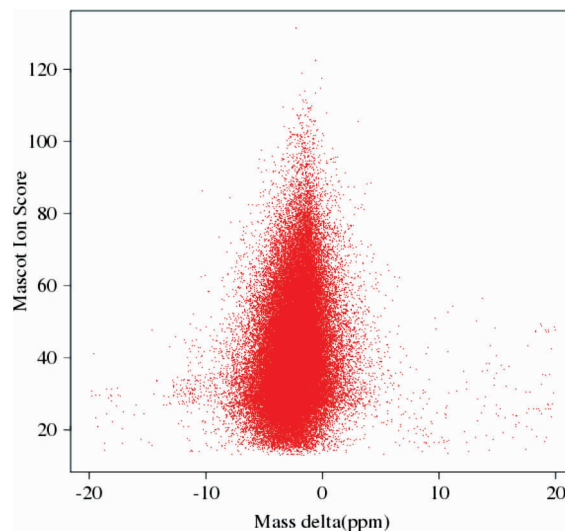


图 1 肽段匹配误差分布

3.2.1 基本鉴定信息 二级谱图总数(TotalSpectra) 344 342,为匹配到的谱图数量(Spectra)82 990,为匹配到特有肽段的谱图数量(UniqueSpectra)69 574,鉴定到特有肽段序列的数量(UniquePeptide)11 135,鉴定到的蛋白质数量(Protein)2 783。

3.2.2 差异蛋白质定量信息统计 在相对定量时,如果同一个蛋白质的量在两个样品间没有显著的变化,那么其蛋白质丰度比接近于 1。当蛋白的丰度比即差异倍数达到 1.2 倍以上,且经统计检验其 $P < 0.05$ 时,视该蛋白为不同样品间的差异蛋白。差异结果表明 SHR 组与 WKY 组比较两组共有 183 个蛋白达相差 1.2 倍以上,其中 68 个上调,115 个下调。

3.3 差异蛋白的 Pathway 富集分析

3.3.1 富集 Pathway 见表 1。

3.3.2 富集 Pathway 蛋白质 见表 2。

4 讨论

心肌肥厚是一个因子、多途径的作用的结果,单一蛋白的改变是可以导致心肌肥厚,但是多个蛋白失衡的交互作用,可能是关键性要素,为此本项目在筛选出差异蛋白后,结合蛋白的 Pathway 通路,从多个蛋白角度出发,试图从整体性层面的失衡来解释 SHR 左心室肥厚的机理及其药物干预的机制。为此是以 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,找出与所有鉴定到蛋白背景相比,在差异蛋白中显著性富集的 Pathway。通过 Pathway 显著性富集能确定差异蛋白参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

表 1 SHR/WKY 差异蛋白富集 Pathway

Number	Pathway	Pvalue	Proteins
1	Autoimol/Lune thyroid disease	0.0008495973	tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q3B8R6 Q3B8R6 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr Q9QYP9 Q9QYP9 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT
2	Allograft rejection	0.0008495973	tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q3B8R6 Q3B8R6 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr Q9QYP9 Q9QYP9 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT
3	Complement and coagulation cascades	0.001017014	tr Q5PQU1 Q5PQU1 RAT, tr Q3T940 Q3T940 RAT, tr Q80ZA3 Q80ZA3 RAT, tr Q5M7T5 Q5M7T5 RAT, sp P14480 FIBB RAT, sp Q64268 HEP2 RAT, tr Q6IRS6 Q6IRS6 RAT, sp D3ZTE0 IFA12 RAT, sp P02680-2 FIBG RAT
4	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	0.002334719	tr G3V879 G3V879 RAT, sp Q68FU7 COQ6 RAT, sp P32755 HPPD RAT
5	Primary imol/Lunodeficiency	0.00862698	tr F1LZG3 F1LZG3 RAT, tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr MOR813 MOR813 RAT, tr F1LUS1 F1LUS1 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT
6	Bile secretion	0.0108685	sp P06687 AT1A3 RAT, sp P14141 CAH3 RAT, sp P06686 AT1A2 RAT, sp B2GV54 NCEH1 RAT, tr H6X2S9 H6X2S9 RAT
7	Natural killer cell mediated cytotoxicity	0.01202738	sp P31232 TAGL RAT, tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q3B8R6 Q3B8R6 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr Q9QYP9 Q9QYP9 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT
8	Staphylococcus aureus infection	0.01318665	tr Q3T940 Q3T940 RAT, tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT, sp P02680-2 FIBG RAT
9	Asthma	0.01620397	tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT
10	Intestinal imol/Lune network for IgA production	0.01620397	tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT
11	Graft-versus-host disease	0.02240244	tr Q3B8R6 Q3B8R6 RAT, tr Q9QYP9 Q9QYP9 RAT
12	Proximal tubule bicarbonate reclamation	0.02434578	sp P06687 AT1A3 RAT, sp P14141 CAH3 RAT, sp P06686 AT1A2 RAT, tr H6X2S9 H6X2S9 RAT
13	Malaria	0.02895900	tr Q3T940 Q3T940 RAT, tr Q63910 Q63910 RAT, sp Q07969 CD36 RAT
14	ECM-receptor interaction	0.03118832	tr F1LZX9 F1LZX9 RAT, tr D4A051 D4A051 RAT, sp P04937-2 F1LZX9 RAT, tr F1LXF2 F1LXF2 RAT, sp P02454 CO1A1 RAT, sp Q07969 CD36 RAT
15	Hematopoietic cell lineage	0.03490329	tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT, sp Q07969 CD36 RAT
16	Antigen processing and presentation	0.03490329	tr Q4V8N0 Q4V8N0 RAT, tr Q3B8R6 Q3B8R6 RAT, tr Q9QYP9 Q9QYP9 RAT, tr A0A023IM54 A0A023IM54 RAT
17	Ether lipid metabolism	0.03578091	tr G3V7W1 G3V7W1 RAT, sp O35264 PA1B2 RAT
18	Epstein-Barr virus infection	0.04690502	tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr G3V913 G3V913 RAT, tr Q3B8R6 Q3B8R6 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, sp P61983 I433G RAT, tr Q9QYP9 Q9QYP9 RAT, tr MORAK2 MORAK2 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT, tr Q5U2S7 Q5U2S7 RAT
19	African trypanosomiasis	0.0477381	tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q63910 Q63910 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT
20	Cell adhesion molecules (CAMs)	0.0477381	tr F1LZX9 F1LZX9 RAT, tr Q3T940 Q3T940 RAT, tr Q3B8R6 Q3B8R6 RAT, tr Q9QYP9 Q9QYP9 RAT
21	Fc epsilon RI signaling pathway	0.04971352	sp P31232 TAGL RAT, tr M9mol/LN0 M9mol/LN0 RAT, tr Q5I0J0 Q5I0J0 RAT, tr MORAK2 MORAK2 RAT, tr MORA79 MORA79 RAT

表2 富集 Pathway 蛋白质详表

ID	蛋白标识	蛋白质名称	比值
1	trlQ9QYP9IQ9QYP9 RAT	主要组织相容性复合物	2.877 ↑
2	splO35264PA1B2 RAT	血小板活化因子乙酰水解酶	1.72 ↑
3	trlM0RAK2IM0RAK2 RAT	有丝分裂原蛋白激酶	1.521 ↑
4	trlG3V913IG3V913 RAT	热休克 27kDa 蛋白	1.476 ↑
5	trlM9mol/LN0IM9mol/LN0 RAT	Ighg3	1.412 ↑
6	splP61983I1433G RAT	14-3-3γ 蛋白	1.303 ↑
7	splP14480IFIBB RAT	纤维蛋白原	1.287 ↑
8	trlQ5U2S7IQ5U2S7 RAT	蛋白酶体 26S	1.283 ↑
9	splP02680-2IFIBG RAT	纤维蛋白原 γ 链	1.221 ↑
10	splB2GV54INCEH1 RAT	中性胆固醇酯水解酶	1.208 ↑
11	trlG3V7W1IG3V7W1 RAT	溶血 PAF 乙酰转移酶	1.206 ↑
12	splP04937-2IFINC RAT	纤连蛋白	1.201 ↑
13	trlQ5M7I5IQ5M7I5 RAT	丝氨酸蛋白酶	0.824 ↓
14	trlQ3T940IQ3T940 RAT	载脂蛋白 H	0.82 ↓
15	trlQ3B8R6IQ3B8R6 RAT	血清锌 α2 糖蛋白	0.819 ↓
16	splQ68FU7ICOQ6 RAT	泛醌 9	0.809 ↓
17	trlG3V879IG3V879 RAT	泛醌 7	0.8 ↓
18	trlQ80ZA3IQ80ZA3 RAT	α2-AP	0.793 ↓
19	trlQ5PQU1IQ5PQU1 RAT	激肽原	0.783 ↓
20	splQ64268IHEP2 RAT	肝素 2	0.76 ↓
21	trlF1LUS1IF1LUS1 RAT	未知蛋白	0.76 ↓
22	splP06687IAT1A3 RAT	钠钾 ATP 转移酶	0.749 ↓
23	splP02454ICO1A1 RAT	胶原蛋白	0.746 ↓
24	trlF1LPF2IF1LPF2 RAT	集簇蛋白	0.736 ↓
25	splP32755IHPPD RAT4	对羟基苯丙酮酸双氧化酶	0.725 ↓
26	trlH6X2S9IH6X2S9 RATRT	C 反应蛋白	0.715 ↓
27	trlF1LZX9IF1LZX9 RAT	整合素	0.703 ↓
28	splD3ZTE0IFA12 RAT	凝血因子 XII	0.707 ↓
29	trlQ6IRS6IQ6IRS6 RAT	胎球蛋白	0.693 ↓
30	trlD4A051ID4A051 RAT	整合素 α7	0.671 ↓
31	splP14141ICAH3 RAT	碳酸酐酶	0.604 ↓
32	splQ07969ICD36 RAT	CD36	0.442 ↓
33	trlQ5I0J0IQ5I0J0 RAT	免疫球蛋白重链 γ 多肽	0.441 ↓
34	splP31232ITAGL RAT	转胶蛋白	0.429 ↓
35	trlQ63910IQ63910 RAT	血红蛋白-α	0.115 ↓

注: ↑代表上调, ↓代表下调。

本项目通过 Pathway 富集分析筛选出;SHR 与 WKY 比较上调的差异蛋白有:1 主要组织相容性复合物、2 血小板活化因子乙酰水解酶、3 有丝分裂原蛋白激酶、4 热休克 27 kDa 蛋白、5 Ighg3、6 14-3-3γ 蛋白、7 纤维蛋白原、8 蛋白酶体 26S、9 纤维蛋白原 γ 链、10 中性胆固醇酯水解酶、11 溶血 PAF 乙酰转移酶、12 纤连蛋白。下调的差异蛋白有:13 丝氨酸蛋白酶、14 载脂蛋白 H、15 血清锌 α2 糖蛋白、16 泛醌 9、17 泛醌 7、18α2-AP、19 激肽原、20 肝素 2、21 未知蛋白、22 钠钾 ATP 转移酶、23 胶原蛋白、24 集簇蛋白、25 对羟基苯丙酮酸双氧化酶、26C 反应蛋白、

27 整合素、28 凝血因子 XII、29 激肽原、30 整合素 α7、31 碳酸酐酶、32CD36、33 免疫球蛋白重链 γ 多肽、34 转胶蛋白、35 血红蛋白-α。

4.1 上调蛋白质意义

主要组织相容性复合物(MHC)的功能是以其产物提呈抗原肽而激活 T 淋巴细胞,与 T 细胞表面的 T 细胞受体结合,实现对抗原和 MHC 分子的双重识别。在缺血、缺氧、炎症反应等刺激影响下 MHC 分子表达上调,可被各种炎性因子激活而发挥作用^[2]。炎症反应介导了高血压病左心室肥厚已经是研究者的共识。

血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)具有水解血小板活化因子和相关磷脂片段并使之失活的作用。血小板活化因子(PAF)能促使血小板和中性粒细胞聚集;促使多种细胞使之产生趋化性及化学激动;参与呼吸暴发和超氧化物的形成、蛋白质的磷酸化;作用于蛋白激酶 C(PKC)、花生四烯酸及磷酸肌醇的代谢;促使糖原的分解;促使肿瘤坏死因子的产生;调节白介素的分泌、TIMP-1,具有触发和放大炎症的作用^[9]。PAF 在生物体内在溶血 PAF 乙酰转移酶、与 PAF 乙酰水解酶(LPCAT)作用下以动态形式存在,细胞受到刺激时生成,随后很快被代谢消除。PAF 的代谢失活是由 PAF 乙酰水解酶水解。溶血 PAF 乙酰转移酶具有将 PAF 水解片段,合成 PAF 的作用^[4]。我们推测这个两个酶水平上调显示血小板活化因子体系处于激活状态。

丝裂原活化蛋白激酶3(MKK3)是 p38 MAPK 的上游激活分子,能够特异性激活 p38MAPK。p38 MAPK 信号通路除了参与基因转录调控外,p38MAPK 还参与细胞凋亡、细胞因子生成、细胞骨架重构等生物事件发挥其重要作用,被认为是细胞信息传递的交汇点和共同通路。在正常生理状态下细胞的生长和增殖中有重要作用,在病理性因素刺激引起的心肌细胞肥大的信号转导中也起到重要作用^[5]。

热休克蛋白 27 是小热休克蛋白家族中最具代表性的成员,其水平的增高,是否是心肌细胞肥大时的代偿作用,有学者的研究证实了这一点。在运动诱导的生理性心肌肥厚模型中,HSF1 和热休克蛋白如 Hsp27 和 Hsp70 的表达明显上调。国内也有学者证实心脏特异性高表达 Hsp27 具有的诱导小鼠心肌肥厚的作用,ERKs 的激活可能是其中的重要分子通路^[6]。

IgG 中重链 CH3 功能区,具有结合组织细胞的作用。IgG 是属于抗体,表明各种损伤因素增加,导致心肌细胞损伤。

14-3-3 是一个调节蛋白家族,能与 Raf-1,PKC,细胞分裂周期蛋白 25 同源蛋白 C(Cdc25C),Ras 激酶抑制因子(KSR),Bcr,Ca²⁺/CaM 激酶,Bad 和跨膜蛋白受体等多种信号蛋白结合,说明 14-3-3 蛋白在信号转导过程中发挥重要作用。而以上这些蛋白在心肌肥厚的过程中发挥着重要的作用^[7]。

纤维蛋白原(fibrinogen,Fg)在分子结构上包含三条多肽链: A α 、B β 和 γ , 分别被纤维蛋白原 α (FGA)、纤维蛋白原 β (FGB)和纤维蛋白原 γ (FGG)

三种独立基因所编码。近来的研究表明纤维蛋白原 β 链的合成是 Fg 合成的限速步骤。虽在肝细胞内合成,但也可在上皮细胞和成纤维细胞等合成,并与纤维黏连蛋白、层黏连蛋白、透明质酸等协同构成细胞外基质,并通过细胞间黏附分子-1 介导的 P38、ERK 及 JNK 通路导致心肌细胞异常增生^[8]。心肌细胞外基质(ECM)由胶原、纤粘连蛋白、层粘连蛋白及弹性蛋白、蛋白聚糖等组成,其中主要成分是胶原。I 型胶原占胶原总量的 85%,有较大的张力,伸展回弹性小,主要聚合成粗纤维网^[9-10]。过量的胶原沉积在心肌间质,可使胶原网络增粗变密,心室被动回弹性下降、心壁硬度增大,心肌顺应性下降,从而导致心脏舒张功能障碍。不同原因所致的间质重构,胶原纤维的变化不同。压力超负荷性左室肥大时,心肌间质胶原合成增加。但心肌缺血或缺血再灌注时心肌胶原纤维出现断裂,含量减少。压力负荷过重导致的左心室肥厚中初期质胶原合成增加,而在第 4 周时肌胶原纤维量减少^[11]。

蛋白酶体可分为 20S 蛋白酶体和 26S 蛋白酶体两种形式,细胞内最普遍存在的蛋白酶体是 26S 蛋白酶体,它是一种包含有 1 个 20S 核心颗粒和 2 个 19S 调节颗粒的桶状结构,也是一种依赖 ATP 的蛋白水解复合体尽管蛋白酶体在心肌肥厚中的具体作用有待研究,但在一些心肌肥厚的模型中检测出了蛋白酶体亚单位蛋白质表达的增强,这是因为蛋白酶体促进了心肌肥厚的抑制因子的降解,如早期诱导环腺苷酸抑制因子。此外蛋白酶体还参与了蛋白质降解、修改延长因子的活动等机制^[12]。

中性胆固醇酯水解酶 1(nCEHs),在中性 PH 环境下,催化胆固醇酯(CE)水解作用的酶有多种,被称为中性胆固醇酯水解酶。不仅可以清除已蓄积于泡沫细胞中的 CE,而且能够防止 CE 的积聚。nCEHs 可不同程度的影响炎症 CD40-CD40L 系统,从而参与炎症反应过程,与心室重构有着密切的关系^[13]。

纤连蛋白(fibronectin,Fn)作为细胞外基质(ECM)中重要的黏附分子之一,通过与细胞膜上的整合素受体(av β 3,av β 1,av β 5, α 4 β 1, α 9 β 1)结合,从而刺激 P38 MAPK 下在促进心肌细胞黏附、迁移、增殖等过程中发挥着重要作用^[14-15]。

4.2 下调蛋白质意义

血清锌 α 2 糖蛋白(ZAG)对目前的热点如瘦素,脂联素(APN)等脂肪因子有强烈的调节作用,能够上调脂联素的表达^[16]。而 APN 通过抑制细胞外调节

蛋白激酶(ERK)信号通路,激活磷酸腺苷活性蛋白酶(AMPK)抑制心肌细胞的肥大^[17]。

激肽原 1(HKa)是激肽释放酶-激肽系统中的成员之一,作用极其复杂。已经肯定的功效是增强机体的血管舒张能力,促进免疫炎症反应。被证实具有抗粘附特性,HKa 能够与带负电荷物质表面上的粘附蛋白结合并将其置换出来;HKa 能竞争性抑制纤维蛋白原和体外连接蛋白(VN)等粘附蛋白与细胞表面结合;HKa 能抑制细胞粘附到蛋白包被的表面上。激肽释放酶-激肽系统(KKS)具有强大的心血管保护作用,通过抑制 JNK/P38MAPK 的磷酸化,抑制 NF- κ B-DNA 结合活性后,抑制了 MCP-1,VCAM-1 从损伤部位的释放,抑制心肌肥厚的形成的作用^[18]。

近年来大量研究显示,载脂蛋白 H 及其抗体与动脉粥样硬化和体内血栓形成血压增高有较大的相关性。有研究发现载脂蛋白 H 沉积在缺血性心肌病心肌中而在其他病变心肌样本中没有发现的沉积。推测存在心肌中的载脂蛋白 H 与炎症过程有关^[19],进一步研究发现载脂蛋白 H 可以调节腺苷酸环化酶的活力,而腺苷酸环化酶具有心肌细胞的保护作用^[20],抑制心肌肥厚。

α 2-AP 中 α -2 抗纤溶酶是纤维蛋白溶解酶的重要抑制因子,其表达的下调可导致活化的纤维蛋白溶解酶含量增高,而后者则会改变 ECM 的完整性,从而影响纤维化的发生,在一项肝纤维化的研究中发现肝纤维化组织中 α 2-AP 水平含量降低,而经干预后肝纤维化程度降低后, α 2-AP 水平上调。心室肥厚也存在心肌纤维化, α 2-AP 也可能呈现下调趋势^[21]。

肝素 2 是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族之一,是存在于体内外的另外一种主要的抗凝血酶物质,还参与炎症反应过程,可以被中性粒细胞释放的弹性蛋白酶水解,释放出来的 N 端多肽片段对中性粒细胞和单核细胞具有趋化作用,在肺内的作用可能是防止肺内纤维蛋白的沉积的作用^[21-22]。在心室肥厚中水平下调可能是炎症过程中分解的结果。

凝血因子 VII (FXII)是肝脏合成的一种丝氨酸蛋白酶,是凝血接触途径的重要组成因子,在分子量激肽(HK)和血浆激肽释放酶(PK)共同参与下激活内源性凝血途径^[23]。还具有促炎症作用,主要通过诱导

中性粒细胞聚集和脱颗粒,以及面通过高分子量激肽(HK)生成缓激肽,进一步增强血管壁通透性等功能。在心室肥厚的作用有待进一步探索。

对羟基苯丙酮酸双氧化酶(HPPD)是近年来在除草剂靶标探索中发现的一种靶标酶,参与植物中质体酮和生育酚的生物合成,同时也参与了大多数生物体的酪氨酸和苯丙氨酸分解代谢。HPPD 在人及其它哺乳动物体内的主要作用是促进酪氨酸的代谢涉及泛醌等萘醌生物合成^[24]。辅酶 Q 又称泛醌,辅酶 Q 作为心肌线粒体内膜的一种递氢体,参于电子传递过程,是细胞呼吸和代谢的激活剂。以人类辅酶 Q10,节心肌细胞的代谢功能,能减轻心肌细胞因缺血或充血造成的组织损伤,从而保护心肌功能,并提供充足的 ATP^[25]。

钠钾 ATP 酶,或称钠泵、钠钾离子激活的腺苷-5'-三磷酸酶。 Na^+ - K^+ -ATP 的主要功能是将细胞内的 Na^+ 泵出和将胞外的 K^+ 泵入,平衡细胞内外 Na^+ 、 K^+ ,是生物电产生的基础,也是细胞膜继发性主动转动的能量来源; Ca^{2+} -ATP 的主要功能是将细胞内 Ca^{2+} 泵入肌浆网,它同 Na^+ - Ca^{2+} 交换共同维持细胞内 Ca^{2+} 稳态。心肌肥厚时 Na^+ - K^+ -ATP 酶及 Ca^{2+} -ATP 酶活性下降,导致细胞内 Ca^{2+} 、 Na^+ 增多。胞内 Na^+ 增多引起 Na^+ - Ca^{2+} 交换增加,进一步加剧细胞内 Ca^{2+} 超载,从而引起心肌细胞凋亡^[26]。

碳酸酐酶 3(CA3)的可能生理作用主要有清除胞内 CO_2 、调节胞内 pH 值、维持组织酸碱平衡、抗氧化、能量代谢和信号转导等方面均发挥重要的作用。由于 CA3 具有磷酸酶活性作为一种的新的蛋白质酪氨酸磷酸酯酶(PTP),它可能参与细胞内的信号转导。鉴于 PTP 可作为酪氨酸激酶的天然拮抗剂,因此 CA3 很可能对依赖酪氨酸磷酸化的信号转导通路会产生负面影响。而酪氨酸激酶与 MAPK 级联反应参与细胞的生长、增殖、分化,在高血压左心室肥厚心肌中呈现高表达^[27]。这种碳酸酐酶 3 水平的降低将导致心肌细胞肥大,而增高将有助于抑制心肌细胞的进一步肥大、增生。

Transgelin 也称转胶蛋白,是一种肌动蛋白压力纤维素相关的蛋白质,与凝胶剂起反应并能稳定体外的肌动蛋白凝胶剂。最本源功能是和肌动蛋白结合,从而参与细胞骨架重构和调整。可降低 Rho 激酶相关信号通路并增加肌动蛋白解聚,最终降低肌

球蛋白轻链磷酸化。在心肌肥厚时 Rho 激酶相关信号通路被激活, Rho mRNA 呈现出高表达^[28]。Transgelin 基因敲除小鼠研究表明该基因敲除后能改变血管平滑肌形态, 增加 ROS 表达, 激活 NF- κ B 等炎症通路^[29]。

有报道显示血红蛋白- α (Hb- α) 与脂多糖的相互反应能使脂多糖的生物学活性显著增加。此外脂多糖的致命性毒素的侵蚀性由 Hb- α 的出现而加强。Hb- α 是通过裂解脂多糖来加强其生物学活性的。进一步的研究显示交链 Hb- α 与酰化内毒素的相互反应有静电性也有非静电的疏水性, 这种性质使内毒素由非惰性转为活性形式, 不同交联 Hb- α 的浓度和不同的反应温度对 Hb- α 与内毒素的反应均有影响^[30]。而脂多糖 (LPS) 广泛存在的致热原, 是最常见诱导炎症反应的物质之一, 它能够通过诱导 NF- κ B 信号通路心肌细胞肥大^[31]。在心室肥厚的作用有待进一步探索。

CD36 基因 (亦成为脂肪酸转位酶基因) 编码有助于脂肪酸吸收及组织代谢的蛋白, 在多种细胞表面表达, CD36 在大鼠模型中对心肌有保护性作用。研究发现, CD36 缺乏大鼠的心脏质量/体重指数比正常大鼠高 10%, 并且 CD36 缺乏的大鼠心肌对缺血的耐受性下降, 表明 CD36 与左心室肥大相关^[32]。

整合素家族是一类细胞粘附受体蛋白, 其不仅能够介导细胞与胞外基质之间的粘附, 还可以调节并整合胞内外信号激活相关信号通路从而影响多种细胞生物学功能。心脏中的心肌细胞和非心肌细胞都表达整合素, 研究表明, 整合素可以介导碱性成纤维生长因子 (bFGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF), 而这两种因子在促心肌细胞的肥大中重要的作用^[33]。在心室肥厚的作用有待进一步探索。

集聚蛋白对免疫细胞、神经细胞粘附分子、细胞外基质、蛋白多糖具有聚集作用, 将疏散状态变成成簇状态以至能紧密结合^[34]。蝰抗凝血肽 (TAP) 是从毛白钝缘蝰中分离的 Xa 因子的抑制剂。TAP 是新型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 由 60 个氨基酸组成的单链酸性多肽, 包括 6 个半胱氨酸残基, 体外实验显示能抑制正常人血浆的凝固。在心室肥厚中的变化有待进一步探讨。

多项研究证实在高血压状态时 C 反应蛋白水平增高, 且具有促进心室肥厚的作用, 本项目研究显示在左室肥厚时下调, 其反常变化需进一步探索。

4.3 SHR 左心室肥厚的机制

血流动力学超负荷通过机械拉伸的直接作用及

激活神经体液因子的间接作用引起是引起高血压左心室肥厚的起始动因。高血压时心肌细胞受到机械拉伸力的作用。从而导致细胞膜、以及细胞器上离子通道、跨膜蛋白的改变引起细胞内因子及其介导的信号通路的传导, 而激活的信号途径又会导致多种因子的活化, 影响到细胞凋亡、炎性表达、细胞增殖分化, 而促进心肌肥大, 以代偿机械拉伸力。由于增高血压的持续性, 导致细胞因子 \rightarrow 信号途径 \rightarrow 细胞因子呈现出恶性循环状态。本项目研究显示主要涉及 Ca^{2+} 介导的信号通路; 有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路; 蛋白激酶 C (PKC) 信号通路; 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路; 核因子- κ B 信号通路。

乙酰水解酶与乙酞水解酶属血小板活化因子体系, 两者水平的上调表明血小板活化因子呈激活状态这将介导蛋白激酶 C (PKC) 信号通路, 另外 14-3-3 蛋白、纤维蛋白原、 α 2-AP 蛋白水平上调也会激活 PKC, 过量表达的 PKC 可显著诱导心肌肥厚。

丝裂原活化蛋白激酶 3、中性胆固醇酯水解酶 1 (nCEHs)、纤连蛋白 (Fn) 过度表达可以激活 P38 MAPK 途径, 而激肽原 1、碳酸酐酶 3 (CA3) 的低表达可以解除对 P38 MAPK 途径抑制, 过量表达的 P38 MAPK 途径可以促进细胞的肥大以及基质的增生。

纤维蛋白原水平上调可以激活 ERK 途径, 血清锌 α 2 糖蛋白 (AG) 水平下调可以解除脂联素对 ERK 途径的抑制, 激活 ERK 途径致使热休克蛋白代偿性增高, 最终导致心室向心性肥厚。

14-3-3 蛋白、纤维蛋白原水平上调可以激活 Ca^{2+} 介导的信号通路, 导致钠钾 ATP 水平降低, 细胞内钙超载, 发生心肌肥厚。

血清锌 α 2 糖蛋白 (ZAG)、载脂蛋白 H 水平下调导致 AMPK 途径下调, 而 AMPK 可以保护心肌缺血损伤, 限制各种因素所致的心肌肥厚。

中性胆固醇酯水解酶 1 (nCEHs) 水平上调激活 NF- κ B 途径、胶转蛋白水平下调可以解除对核因子 NF- κ B 途径抑制, 共同导致 NF- κ B 途径表达上调, 导致心肌肥厚。通过上述 5 条信号通路的协同作用, 从心肌凋亡、细胞增殖增生、炎症等不同角度导致细胞内蛋白合成增加, 细胞基底膜增生导致心室肥厚的发生, 其余的蛋白则从促进抑制心肌肥厚蛋白降解 (蛋白酶体), 调节心肌能量代谢 (HPPD、辅酶 Q10), 缺乏心肌保护 (CD36) 免疫反应 (Ighg3) 促心肌肥厚的作用。

4.4 小结

通过前期研究^[5]及对以上变化蛋白质生物机制的研判:SHR左心室肥厚发生涉及心肌凋亡、细胞增殖增生、炎症等多种细胞因子,导致细胞损伤与保护作用失衡。

参考文献:

[1] 熊兴江.补肾降压理论及补肾降压方对自发性高血压大鼠 miR-1 调控心室肥厚 ERK 通路的影响[D].北京:中国中医科学院,2013.

[2] NAGARAJU K, RABEN N, LOEFFLER L, et al. Conditional upregulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmunity/myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000,97(16):9209-9214.

[3] NINIO E. Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2005,8(2): 123-131.

[4] NAKANISHI H, SHHDOU H, HISHIKAWA D, et al. Cloning and characterization of mouse lung α -type acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production[J]. *J Biol Chem*, 2006,281(29):20140-20147.

[5] 黄朝阳,朱建华.丝裂原活化蛋白激酶信号途径在心肌肥厚中的作用[J].*中国病理生理杂志*,2005,21(4):1435-1439.

[6] 余鹏,涂飞,张霞,等.热休克蛋白 27 心肌特异性高表达诱导小鼠产生心肌肥厚[J].*实用老年医学*,2014,28(6):506-509.

[7] 潘伟男,陈锋,封芬,等.14-3-3 蛋白的研究进展[J].*国际病理科学与临床杂志*,2007,27(3):262-265.

[8] 林威.纤维蛋白原 β -455G_A、Arg448Lys 基因多态性与血浆纤维蛋白原浓度、下肢深静脉血栓[D].福州:福建医科大学,2009.

[9] BORG T K, BURGESS M L. Holding it all together: organization and function of the extracellular matrix in the heart[J]. *Heart failure*, 1993,9(8):30-23.

[10] SAHINGUR S E, SHARMA A, G ENCO R J, et al. A association of increased levels of fibrinogen and the 455G/A fibrinogen gene polymorphism with chronic periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2003, 74:329-337.

[11] 郭志坤,武俊芳,单卫华,等.异丙肾上腺素诱导的大鼠肥厚心肌组织中 I、III 型胶原蛋白的表达[J].*解剖学报* 2012,43(1):93-97.

[12] 张文斌,唐其柱,李金.泛素-蛋白酶体系统与心肌肥厚[J].*医学研究杂志*,2014,43(11):9-12.

[13] 孟磊,谭艳美,袁中华.中性胆固醇酯水解酶与动脉粥样硬化[J].*中南医学科学杂志*,2015,43(2):217-221.

[14] 冯兵,王德文,何作云,等.细胞外间质整合素在牵张刺激心肌细胞肥大中的作用[J].*生物物理学报*,2000,16(2):346-351.

[15] 李亚楠,李京宝,商澎,等.调控纤维蛋白表达的信号通路[J].*中国细胞生物学学报*,2013,35(1):98-103.

[16] 饶志坚,袁海平,史仍飞.锌 α 2 糖蛋白生物学功能[J].*中国生物*

化学与分子生物学报,2014,30(12):1197-1201.

[17] CHAN A, SOLTYS C L, YOUNG M, et al. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(31):32771-32779.

[18] 汪涛,康毅,娄建石.激肽释放酶-激肽系统的心血管领域研究进展[J].*中国药理学与毒理学杂志*,2003,17(6):466-470.

[19] NIESSEN H W, LAGRANDE W K, RENSINK H J, et al. Apolipoprotein H, a new mediator in the inflammatory changes ensuring in jeopardised human myocardium[J]. *Clin Pathol*, 2000, 53(11):863-867.

[20] 曲春雁.载脂蛋白 H 基因多态性与冠心病及血脂代谢关系的研究[D].青岛:青岛大学,2007.

[21] 陈怀霞.抗凝血酶-III 和肝素辅因子 II 在两种易栓性风湿免疫病中的测定及意义[D].青岛:青岛大学,2012.

[22] 邓明扬,张广森.肝素辅因子 II 的研究进展[J].*国外医学输血及血液学分册*,2003,62(2):128-131.

[23] 韩艳鑫.中国健康人群凝血因子 XII 正常值水平及其基因学研究[D].北京:北京协和医院,2015.

[24] 刘海春.HPPD 酶结构与功能理论研究及其抑制剂设计[D].杭州:浙江大学,2006.

[25] 桑艳双,魏敏吉.辅酶 Q10 的生化作用机理和药物临床应用进展[J].*中国医药导刊*,2005,7(5):371-372.

[26] 黄志华,李良东,曾靖,等.拳参正丁醇提取物对大鼠心肌肥厚时钠钾及钙 ATP 酶活性的影响[J].*时珍国医国药*,2010,21(1): 112-123.

[27] 尚西亮,鲍苑苑,任惠民,等.碳酸酐酶 III 在疾病和肌肉疲劳发生发展中的作用[J].*生命科学*,2011,23(5):429-433.

[28] 管楠,王文倩,徐玉东.肌动蛋白结合蛋白 2 (Transgelin-2)生物学特性和功能研究进展[J].*现代生物医学进展*,2015,15(14): 2774-2776,2779.

[29] 张颖,王学春.Transgelin 研究新进展[J].*泰山医学院学报*.2011,32(1):78-80.

[30] 王贝,韩世愈.血红蛋白 α 、血红蛋白 β 与卵巢癌的相关性[J].*中国优生与遗传杂志*,2008,16(11):125-126.

[31] 周振华,王洪新,赵素玲,等.黄芪多糖对脂多糖诱导大鼠心肌细胞肥大的保护作用[J].*中草药*,2012,43(3):524-528.

[32] IRIE H, KRUKENKAMP I B, BRINKMANN J F, et al. Myocardial recovery from ischemia is impaired in CD36 null mice and restored by myocyte CD36 expression or medium chain fatty acids[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:6819-6824.

[33] 井超.1miR-17/20a 调控 TGF- β 通路抑制食管癌浸润转移的机制研究 2.miR-92b 调控 ITGAV 抑制食管癌浸润转移的机制研究[D].北京:北京协和医学院,2015.

[34] 武卫华.螯抗凝肽 RGDS 双功能分子的构建和表达[D].重庆:重庆医科大学,2004.

[35] 简维雄,肖隋熙,刘培,等.自发性高血压大鼠左心室肥厚的代谢组学研究[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(4):365-371.

(本文编辑 杨瑛)