

无标记定量法研究冠心病不稳定性心绞痛血瘀证的差异蛋白质组

赵慧辉¹, 杨帆², 王伟¹, 王红霞³, 魏开华²

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206;
3. 军事医学科学院国家生物医学分析中心, 北京 100850)

摘要 应用高解析离子淌度质谱(HDMS)与纳升级超高效液相色谱(UPLC)联用,寻找冠心病不稳定性心绞痛血瘀证血浆差异蛋白,探索冠心病不稳定性心绞痛血瘀证的蛋白质组学特点.采用美国Agilent公司多克隆抗体亲和柱去除冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者和健康人血浆中6种丰度最高的蛋白后,进行无标记定量蛋白质组(Label free proteome)分析.结果表明,本方法的离子强度变异系数小于5%,保留时间变异系数小于3%,具有良好的重现性.动态范围约 10^4 数量级.总蛋白数3843种,差异倍数大于1.5倍的差异蛋白数25种,上调蛋白数13种(包括心绞痛血瘀证患者独有蛋白3种),下调蛋白数12种. ACTA1, ITIH3 和 LBP 仅在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者血浆中表达, Haptoglobin, SAA, CP, C6, MYH11, APOH 和 ANXA6 在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者中高表达,而 HBB, HBA, HBE, HBD, HBG, HRG, IGHG, GSN 和 TF 在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者中低表达.表达上调的差异蛋白根据功能可分为:(1)急性时相反应蛋白;(2)补体蛋白;(3)细胞骨架蛋白;(4)凝血相关蛋白.表达下调的差异蛋白根据功能可分为:(1)载脂蛋白;(2)运输蛋白;(3)抗凝血相关蛋白;(4)免疫球蛋白;(5)细胞骨架调控蛋白.以上结果提示,冠心病不稳定性心绞痛血瘀证可能属于一种炎症反应;冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者可能同时存在心肌损伤、凝血因子异常、脂代谢紊乱与氧运输障碍;这些方面相互影响,互为因果.这些差异蛋白可为研究或发现抗心绞痛药物作用的新靶标提供线索.本研究结果表明,非标记定量蛋白质组学(Label free proteomics)是疾病及证候生物标志物研究的一种有效手段.

关键词 质谱;心绞痛;血瘀证;无标记;蛋白质组学;生物标志物

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2010)02-0285-08

在蛋白质组学研究中,质谱的主要功能是鉴定蛋白质,定量分析则通过其它方法,如标记或染色等^[1-3]实现.目前,不借助其它方法,质谱可同时实现蛋白质的定性和定量,即无标记(Label-free)定量蛋白质组学研究.这是目前应用于定量蛋白质组学研究的新方法^[4-7],它直接利用蛋白质质谱鉴定中产生的肽段数据(重复肽段数和强度)进行蛋白相对定量. SynaptTM HDMSTM 质谱分析系统为美国 Waters 公司 2006 年推出的基于高效离子淌度测量和分离技术的高性能四极杆-飞行时间质谱仪,采用 MSe 技术,避免了“数据依赖的串联质谱采集(DDA)”模式中不同母离子选择时离子门开关时间不一致的局限,完全不进行母离子选择而进行串联质谱分析,可以获得高质量分辨率、高质量精确度及高重复性的检测结果.结合纳升级超高效液相色谱 nanoAcquity UPLC 系统所提供的保留时间稳定性,通过 PLGS Protein Expression 系统分析,可以定量测量控制样本及实验样本之间的差异,发掘可能的生物标志物.

冠心病已成为威胁我国人民身体健康的重要疾病.据统计,在冠心病住院患者中,60%的首要表现是不稳定性心绞痛(Unstable angina, UA).UA 已成为心血管内科最常见的综合征之一,UA 的防治已成为临床亟待解决的一个重大课题.血瘀证是 UA 中常见的中医证候^[8].UA 的发病机制仍不完全清

收稿日期: 2009-03-23.

基金项目: 国家“九七三”计划项目(批准号: 2003CB517105)和国家自然科学基金(批准号: 30902020)资助.

联系人简介: 王伟,男,博士,教授,博士生导师,主要从事心血管病症结合研究. E-mail: wangwei@bucm.edu.cn

魏开华,男,博士,研究员,主要从事生物质谱与蛋白质组学研究. E-mail: wkh2006@gmail.com

楚,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 UA 的发病机制和探索早期诊断的生物标记物提供了新的思路和技术平台.已有研究表明,ATT, apolipoprotein AI, γ -chain of fibrinogen, heavy chain of immunoglobulin 和 albumin 5 种蛋白在心肌梗塞和不稳定性心绞痛患者血浆中存在差异表达^[9].我们采用双向电泳^[10]、差异凝胶电泳(2-Dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)^[11]和基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱等技术对冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者和对照组人群的原血浆^[12]和去高丰度蛋白血浆^[13]进行研究,结果表明,二者均存在明显差异表达.但基于凝胶的定量蛋白质组学在分离范围上存在局限,为了得到更全面的 UA 血瘀证蛋白表达谱,本文采用 Label-free 定量蛋白质组学方法对 UA 血瘀证患者和对照组人群血浆进行研究,获得了十分有意义的差异蛋白,为后续的靶标确认奠定了基础.

1 实验部分

1.1 样品来源

12 例冠心病不稳定性心绞痛血瘀证血浆样品取自北京中医药大学附属东直门医院住院患者,其中男患者 5 例,女患者 7 例,平均年龄(67 ± 12)岁;12 例健康人血浆样品由北京中医药大学体检正常人提供,年龄和性别相匹配,无血瘀证表现.样品采集对象均为知情同意.

1.2 材料与方法

1.2.1 材料与试剂 HPLC-S(ACN 公司)和超纯水(导电率 18.2 M Ω , Fisher Scientific 公司);甲酸(FA, 98% ~ 100%, Merck 公司,德国);缓冲液 A 和 B(Agilent 公司, 5188-5332 和 5185-5986, 美国);二硫苏糖醇(DTT)和碘乙酰胺(Sigma 公司);胰酶(Promega 公司, 美国);葡萄糖-纤维蛋白肽 B(Sigma 公司).

1.2.2 血浆采集与高丰度蛋白去除 12 例病人均于入院 2 d 内取清晨空腹肘静脉血 2 mL,加入 EDTA 抗凝,经 4 $^{\circ}\text{C}$, 3000 r/min 离心 10 min.取上清液,分装,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存.12 例正常人也于清晨取空腹肘静脉血,血浆采集方法同上.采用美国 Agilent 公司抗体柱(4.6 mm \times 50 mm Hu6-HC)特异性去除血浆中 6 种丰度最高的蛋白(albumin, IgG, IgA, antitrypsin, transferrin, haptoglobin).测定每个血浆样品的总浓度(BioRad 试剂盒),并将每 4 个样品混合为一个待测样本.

1.2.3 总蛋白变性与定量 缓冲液配方:8 mol/L 脲素,2 mol/L 硫脲,10 mmol/L DTT,1 mmol/L NaF,1 mmol/L Na_2NO_3 及 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂混合物.根据蛋白量,加适当变性缓冲液,在冰浴上超声 1 min,将混合物溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋涡混匀 30 min.然后以 14000 r/min 离心 30 min,取上清液,用 Bradford 法定量,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.2.4 总蛋白酶切 根据蛋白定量的浓度,用 50 mmol/L 碳酸氢胺将样品稀释至脲素浓度低于 2 mol/L.取适量样品,加入 DTT 至终浓度为 10 mmol/L,于 56 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 1 h,冷却至室温,加入碘乙酰胺至终浓度为 55 mmol/L,暗处反应 1 h,冷却至室温.加入适量胰酶溶液,使蛋白与酶的比例为 30:1,加入 CaCl_2 至终浓度为 2 mmol/L,充分振摇,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜反应 12 ~ 16 h.

1.2.5 nanoLC-MS^E 测定 取 0.5 μg 蛋白样品,加入 100 fmol 内标(GluFib, Sigma 公司)后进行纳升液相串联质谱表达分析(nanoLC-MS^E).根据内标量确定血清酶切样本的准确上样量,并调整进样体积,使柱上样品量为 0.5 μg (即捕获柱的最佳上样量),每个样品重复 3 次测量.

纳升液相色谱为 nanoACQUITY UPLC 不分流超高压液相色谱系统(美国 Waters 公司),配备自动进样器,捕获柱为 Symmetry C₁₈, 180 μm \times 20 mm,粒径 5 μm ,分析柱为 BEH C₁₈, 75 μm \times 250 mm,粒径 1.7 μm .柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,流速 200 nL/min.流动相 A:含 0.1% 甲酸的水溶液,流动相 B:含 0.1% 甲酸的乙腈.梯度洗脱 1% ~ 40% B(120 min) \rightarrow 65% B(5 min) \rightarrow 65% B(5 min) \rightarrow 1% B(1 min) \rightarrow 1% B(20 min 平衡).

质谱仪为 Synapt High Definition Mass Spectrometry 高解析质谱(HDMS, 美国 Waters 公司),纳升正离子模式,工作模式为 MS^E.低能量采集时固定碰撞能量为 3 V, Transfer 能量为 1 V;高能量采集时碰

撞能量在 15 ~ 45 V 范围变化. Transfer 能量为 3 V. 扫描时间为 1 s, 扫描范围 m/z 50 ~ 1990. 质谱数据采集时间范围 20 ~ 120 min. 质量锁定采用 200 fmol/ μ L Glufib 的双电荷离子 (m/z 785.8426), 每 30 s 锁定 1 次. 毛细管电压 2500 ~ 3000 V, 锥孔电压 40 V, 源温 90 °C.

1.2.6 数据分析 采用 Waters 公司的专用软件 ProteinLynx Global Server v2.2.5. 经过自动平滑、减背景、取中心、去同位素、多电荷转换为单电荷以及根据内标进行质量校准等方法进行数据处理. 信号过滤主要考虑肽段强度, 其阈值设定分别为低能量模式的 150 counts 和高能量模式的 60 counts; 总离子强度阈值为 1500 counts. 数据检索采用的蛋白数据库为 IPIhuman (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html>).

用 Protein Expression (美国 Waters 公司) 软件进行无标记多肽和蛋白质差异统计分析. 用于差异分析的肽段数据必须符合以下条件: (1) 在 3 次重复测样中, 至少 2 次测到相同肽段且鉴定相同蛋白质; (2) 数据库检索的可信度大于 95%, 假阳性小于 5%; (3) 人工排除倍数小于 1.5 倍及得分小于 150 分的蛋白质; (4) 所鉴定的蛋白全部人工去冗余化.

2 结果与讨论

2.1 方法的可靠性分析

nanoLC-MS^E 分析的基本要求是液相色谱分离具有较高的重复性和质谱分析具有较高的分辨率和质量准确度. 数据通常包括保留时间、离子质荷比和离子峰强度信息, 要保证数据的可靠性, 主要需减少因保留时间或离子质荷比上的微小变化所引起的强度值偏差. 对于保留时间的一致性, 一方面要考察色谱系统的稳定性, 寻找最合适的色谱流速、上样量和溶剂等条件, 保证相同肽段在相同的色谱

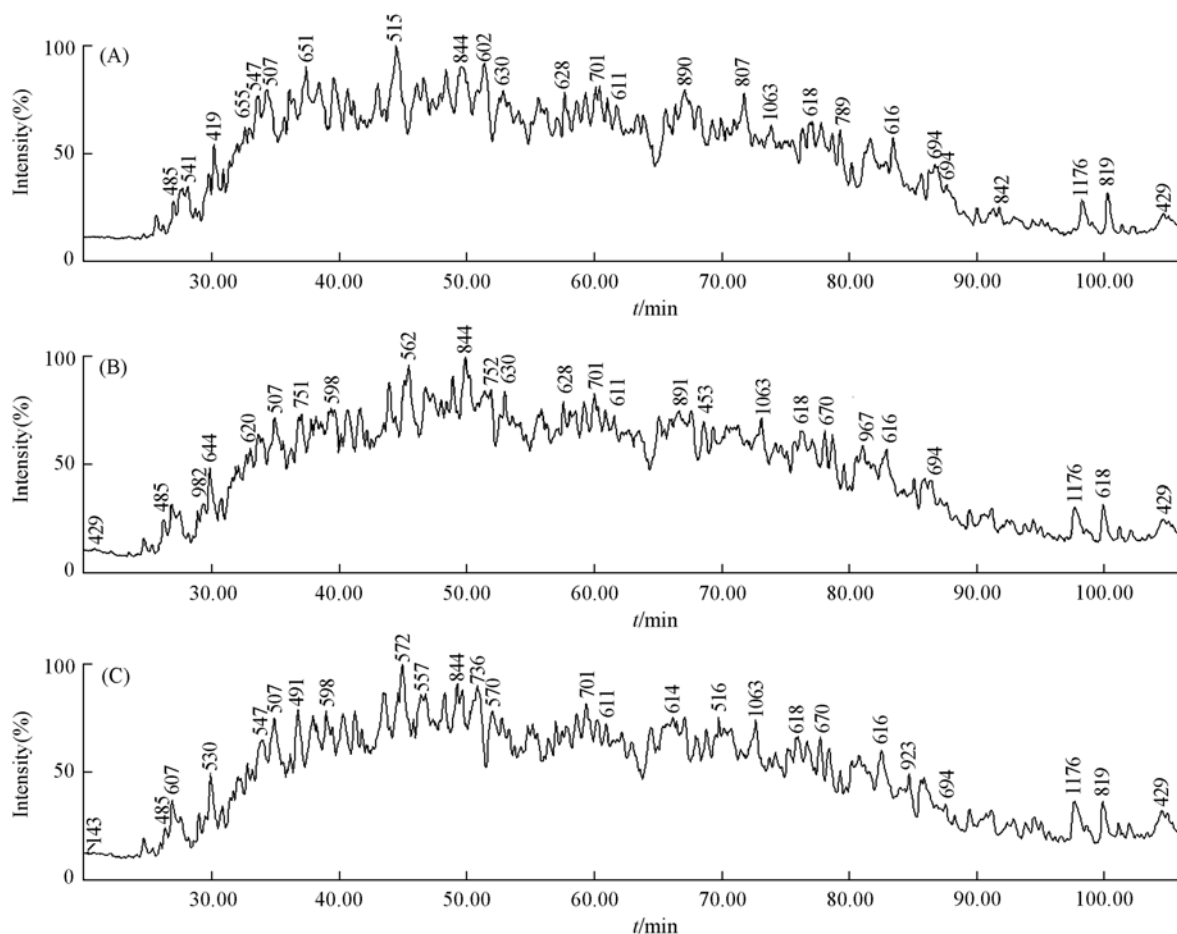


Fig. 1 Reproducibility of LC-MS^E for blood health volunteers

(A) The first time injection; (B) the second time injection; (C) the third time injection.

条件下的保留时间偏差降到最低,另一方面,对保留时间存在的微小偏差,本文 PLGS 系统有一套严格的“保留时间对齐规则”,即比较母离子和子离子的色谱峰形状,只有当二者的形状在允许的误差范围,才能把保留时间微小变化的肽段视为同一肽段,否则,将在数据统计分析时当作不同肽段处理.而对于离子峰强度的稳定性的影响因素包括肽段的离子化效率、溶剂、流速以及质谱检测器对不同的肽段质量的“歧视”效应,尽量保证在不同质量端的离子强度偏差小且一致,再通过其它统计学手段减小这些数据误差^[14].

为了考察本方法的适用性和可靠性,首先对已知浓度的大肠杆菌总蛋白酶切溶液进行分析,从上样量、流速、保留时间、柱压、质谱准确度、蛋白鉴定率和定量结果等多个因素出发,建立优化的实验条件.

图 1 是健康人血浆样品的 3 次 nanoUPLC 分离在低能量模式下的总离子色谱图(TIC).基峰离子的强度分别为 1.43 e^6 , 1.42 e^6 和 1.40 e^6 ,具有高重复性.从各局部的离子峰形和峰高看,3 次进样之间的差异很小,离子强度的变异系数 CV 小于 5%,主要集中在 2%~3%之间[图 2(A)],保留时间的变异系数小于 3%,主要集中在 1%附近[图 2(B)].说明本方法的蛋白定量、进样量、捕获柱、分析柱和质谱检测的重复性高,可满足无标记定量的要求.

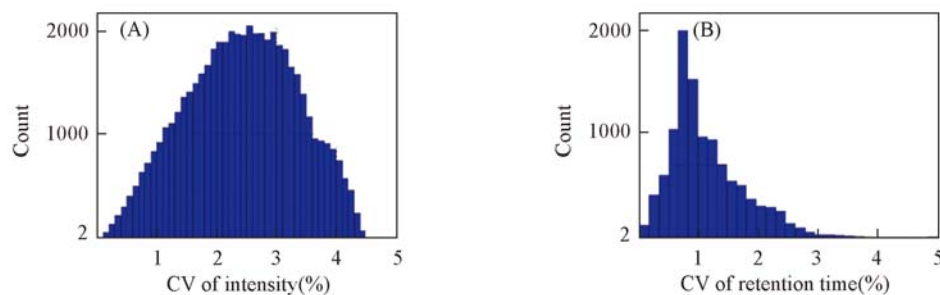


Fig. 2 Injection reproducibility of LC-MS^E for CV of intensity(A) and retention time(B)

图 3 是冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者和健康人样本之间在低能量模式下的总离子色谱图的比较.从总体上看两者比较相似,说明色谱条件和质谱条件比较稳定.从图 3 可以看到几个较为明显的差异峰,如 33.17 min[图 3(A)], 36.73 min[图 3(B)], 72.68 min[图 3(B)]和 85.82 min[图 3(A)]等,说明色谱和质谱实验条件大致可以区分不同样品组之间肽段的差异,将 TIC 小范围放大后,

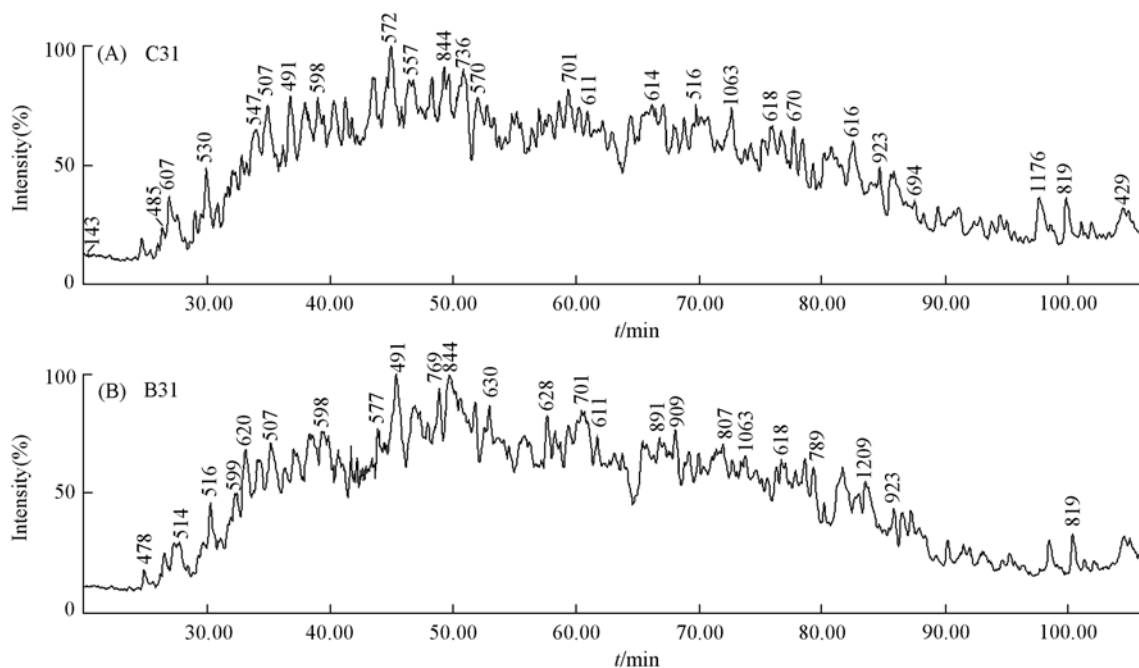


Fig. 3 LC-MS^E spectra of health volunteers(A) and unstable angina blood stasis syndrome(B)

能观察到更多的差异肽段峰。

肽段平均强度的 \log_e - \log_e 分析是寻找差异肽段的关键方法之一。当 2 组样本之间的 \log_e - \log_e 为一条直线时(常为对角线形式), 表明 2 组之间高度重复。那些分布在对角线外的数据点则代表两组样本之间的差异。距离对角线越远, 则差异倍数越大。图 4 为样本的 \log_e - \log_e 分析结果。在 2 组样本中, 共检测到 362799 个离子峰, 其中 5544 个离子峰符合设定的阈值要求(见数据分析部分)。图 4 对角线以上的点表示在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者血浆中含量高于健康人的肽段; 对角线以下的点则表示含量低于健康人的肽段。图 4 结果显示, 离子的归一化强度(Normalized intensity)在 $e^6 \sim e^{15}$ 之间, 动态范围约为 7×10^3 。大多数离子的强度在对角线附近, 大约有 10% 的离子在 2 组中有显著差异。这一结果表明, 该方法既有良好的重复性又有较高的分辨率和灵敏度。

利用 2 组间的差异肽段所鉴定的差异表达蛋白进行差异倍数(Ratio)统计分析, 以每个肽段在全部实验中的强度进行权重求和与平均, 获得该蛋白的差异倍数统计平均值。以差异倍数大于 1.5 倍的参考标准^[15~17] 筛选差异蛋白, 结果见图 5 和图 6。差异倍数的对数图呈现平滑的二次方特征, 说明差异蛋白的上、下调有一定的规律而不是零散的。至于为何该差异倍数的 \log_e (Ratio) 图呈现典型的二次方曲线, 应该与具体的实验生物体系有关。比如大肠杆菌在不同的温度处理后的 \log_e (Ratio) 图类似直线关系, 但它是否为冠心病病人血清蛋白的独特特征, 还需要更广泛的实验进行验证(图 5)。另外, 差异表达蛋白的标准偏差集中在一个较小的范围内, 说明结果可信度较高, 系统稳定、可靠(图 6)。

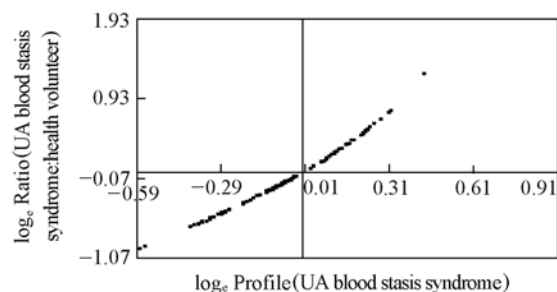


Fig. 5 \log_e - \log_e analysis of differentially expressed proteins

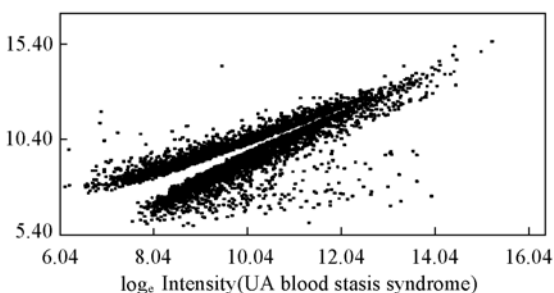


Fig. 4 \log_e - \log_e normalized intensity visualization of exact mass/retention time clusters

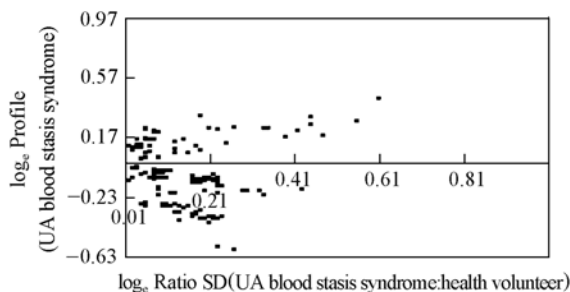


Fig. 6 \log_e - \log_e analysis of the standard deviation of differentially expressed proteins

2.2 差异表达蛋白分析

与健康人相比, 冠心病不稳定性心绞痛血瘀证在血浆蛋白质组学水平有明显差异表达。差异倍数大于 1.5 倍的差异蛋白数 25 种, 分为 3 个层次, (1) 仅在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者血浆中检出的 3 种蛋白(在健康对照组中未检出, 见表 1); (2) 在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证表达降低的 12 种蛋白质(见表 1 和图 7); (3) 在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证血浆表达升高的 10 种蛋白(与健康人相比差异大于 1.5 倍, $P < 0.05$, 见表 1 和图 7)。

Table 1 Differentially expressed proteins in the plasma of unstable angina blood stasis syndrome patients

Accession	Description	Score	pI	M_w	Ratio ^a	Expression in unstable angina blood stasis syndrome ^b
IPI00515047.1	ACTA1 Actin, alpha 1, skeletal muscle	127.63	5.18	32275	—	+
IPI00028413.8	ITIH3 (Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor)	171.86	5.49	99849	—	+
IPI00032311.4	LBP (Lipopolysaccharide-binding protein precursor)	62.12	6.23	53384	—	+
IPI00789295.1	TF 11000 protein	117.79	4.79	11162	-2.56	↓

Continued

Accession	Description	Score	pI	M _w	Ratio ^a	Expression in unstable angina blood stasis syndrome ^b
IPI00816618.1	HGB2[Hemoglobin γ -G(Fragment)]	146.34	6.41	16594	-1.96	↓
IPI00217471.3	HBE1(Hemoglobin subunit epsilon)	138.55	8.67	16203	-1.89	↓
IPI00829896.1	HBD[Hemoglobin lepre-baltimore(Fragment)]	219.42	6.17	11346	-1.85	↓
IPI00854874.1	HBB β -globin gene from a thalassemia patient	458.33	—	4508	-1.82	↓
IPI00853068.1	HBA1; HBA2[α 2 globin variant(Fragment)]	464.47	8.72	15281	-1.75	↓
IPI00646799.1	A1BG(Putative uncharacterized protein DKFZp686F0970)	431.76	5.96	35271	-1.64	↓
IPI00641047.4	GSN(Gelsolin)	853.55	7.72	28954	-1.64	↓
IPI00022463.1	TF(Serotransferrin precursor)	939.9	6.81	77050	-1.61	↓
IPI00304273.2	APOA4(Apolipoprotein A-IV precursor)	1977.25	5.28	45399	-1.59	↓
IPI00022371.1	HRG(Histidine-rich glycoprotein precursor)	1179.08	7.09	59578	-1.47	↓
IPI00829940.1	IGHG3(Uncharacterized protein IGHG3)	173.57	8.38	38109	-1.47	↓
IPI00009920.2	C6(Complement component C6 precursor)	205.02	6.41	105752	1.49	↑
IPI00299615.3	LHCGR(Isoform long of lutropin-choriogonadotropic hormone receptor precursor)	119.47	8.82	78616	1.49	↑
IPI00477597.1	HPR(Isoform 1 of Haptoglobin-related protein precursor)	382.66	6.41	39008	1.58	↑
IPI00022417.4	LRG1(Leucine-rich α -2-glycoprotein precursor)	127.48	6.45	38178	1.63	↑
IPI00641737.1	HP(Haptoglobin precursor)	602.48	6.28	46723	1.67	↑
IPI00793108.1	CP 20000 protein	156.71	5.27	20194	1.72	↑
IPI00298828.3	APOH(β -2-glycoprotein 1 precursor)	189.31	8.34	38298	1.84	↑
IPI00002459.4	ANXA6(Annexin)	208.65	5.46	75277	1.95	↑
IPI00024870.1	MYH11(Smooth muscle myosin heavy chain 11 isoform SM2A)	557.89	5.44	227339	2.16	↑
IPI00006146.4	SAA1; SAA2(Serum amyloid A2)	123.16	9.20	13527	3.46	↑

a. Protein concentration ratio between two groups; b. ↓: Down-regulated; ↑: up-regulated; +: expressing.

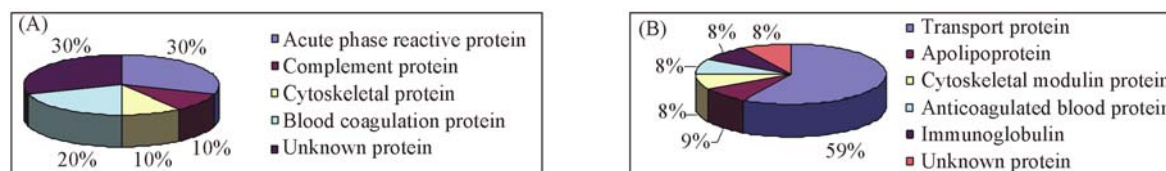


Fig. 7 Function of up-regulated proteins(A) and down-regulated proteins(B)

可以看出, ACTA1, ITIH3 和 LBP 是仅在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者血浆中表达的蛋白, 其中 ACTA1 属于细胞骨架蛋白, 在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者血浆中出现的 ACTA1 很可能是心肌损伤的标志物^[18]. ITIH3 在血液中是透明质酸的载体, 虽然目前还没有研究表明 ITI 与冠心病相关, 但透明质酸与冠心病的关系已经开始引起重视. ITIH3 作为透明质酸代谢的主要蛋白, 可能是比透明质酸更敏感的指标. LBP 是一种能结合和转移细菌内毒素脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) 的分子量为 60000 的糖蛋白, 属于 I 型急性期反应蛋白^[19], 有保护机体免受细菌侵袭的作用^[20], 在本研究中表达升高, 很可能反映冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者抵抗细菌侵袭的一种状态.

在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者血浆中表达上调的差异蛋白根据功能可分为: (1) 急性时相反应蛋白, 如 Haptoglobin, SAA 和 CP. Haptoglobin 作为一种急性期蛋白, 具有多种生物活性, 如抗氧化、抗菌及促进胆固醇结晶的潜在作用^[21], 其表达量与炎症反应密切相关. SAA 是反映 AS 斑块稳定性的炎症标志^[22]. 而血清铜和 CP 水平升高是急性心肌梗死发病的独立正相关危险因素^[23]; (2) 补体蛋白, 如 C6. 补体参与动脉粥样硬化发生、发展的整个过程^[24]; (3) 心肌损伤蛋白, 如 MYH 的高表达, 可能为心肌缺血损伤的间接证据; (4) 凝血相关蛋白, 如载脂蛋白 H(Human apolipoprotein H, ApoH) 和膜联蛋白 6(Annexin 6). ApoH 在阻制动脉硬化中起着重要的作用^[25], 作为一种血浆抑制因子, 抑制内源性凝血旁路的接触激活^[26]. Annexin 具有明显的抗血细胞凝集和抑制血栓形成功能^[27]. 此外, 有 3 种上调蛋白功能未知.

在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者血浆中表达下调的差异蛋白根据功能可分为: (1) 载脂蛋

白, 如 ApoA-IV 的主要作用是参与脂质代谢, 它通过介导 HDL 与肝细胞结合以及被摄取, 参与了胆固醇逆向转运^[28], 还具有抗炎作用^[29], 可以阻止 P-选择素介导的白细胞与血小板之间的黏附^[30]; (2) 运输蛋白, 如 HBB, HBA, HBE, HBD, HBG 和 TF. 血红蛋白 TF 是高等生物体内负责运载氧的一种蛋白质. 而冠心病患者的血清 TF 水平较正常人降低^[31]; (3) 抗凝血相关蛋白, 如 HRG, 其具有纤溶酶原结合的能力, 起着纤溶抑制剂的作用; (4) 免疫球蛋白, 如 IGHG; (5) 细胞骨架调控蛋白, 如 GSN. 凝溶胶蛋白(Gelsolin)为 Actin 调节蛋白之一, 其表达水平下调, 可能是心肌损伤的另一特征分子. 另外, 有 1 种下调蛋白功能未知.

结合国内外研究现状推测, 与冠心病不稳定性心绞痛其它证候特点不同^[32], 冠心病不稳定性心绞痛血瘀证可能属于一种炎症反应; 冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者可能同时存在心肌损伤、凝血因子异常、脂代谢紊乱与氧运输障碍; 这些方面相互影响, 互为因果. 其中, ApoA-IV, SAA 及 CP 与冠心病的关系已有文献报道, 且与本研究结论一致^[33-35]. 而 Haptoglobin β chain, C6, MYH11, APOH, ANXA6, HBB, HBA, HBE, HBD, HBG, HRG, IGHG, GSN 和 TF 与心绞痛的关系还未见报道, 尤其是仅在冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者血浆中表达的 ACTA1, ITIH3 和 LBP, 均为本课题的首次发现, 很可能成为冠心病不稳定性心绞痛血瘀证的新的标志物. Haptoglobin β chain, ApoA-IV, HBB 和 HBA 这 4 种蛋白的差异表达情况与本课题组 2D-DIGE 蛋白组学研究的结果相吻合.

参 考 文 献

- [1] Silva J. C., Denny R., Dorschel C. A. *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 2005, **77**: 2187—2200
- [2] Radulovic D., Jelveh S., Ryu S., *et al.*. *Mol. Cell Proteomics*[J], 2004, **3**: 984—997
- [3] Wiener M. C., Sachs J. R., Deyanova E. G., *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 2004, **76**: 6085—6096
- [4] Lu P., Vogel C., Wang R., *et al.*. *Nat. Biotechnol.* [J], 2007, **25**: 117—124
- [5] Mallick P., Schirle M., Chen S. S., *et al.*. *Nat. Biotechnol.* [J], 2007, **25**: 125—131
- [6] Radulovic D., Jelveh S., Ryu S., *et al.*. *Mol. Cell. Proteomics*[J], 2004, **3**: 984—997
- [7] Wiener M. C., Sachs J. R., Deyanova E. G., *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 2004, **76**: 6085—6096
- [8] ZHAO Hui-Hui(赵慧辉), WANG Shuo-Ren(王硕仁), WANG Wei(王伟). *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*(北京中医药大学学报)[J], 2008, **31**(1): 39—41
- [9] Mateos-Cúceres P. J., García-Méndez A., López Farré A., *et al.*. *J. Am. Coll. Cardiol*[J], 2004, **44**(8): 1578—1583
- [10] ZHAO Hui-Hui(赵慧辉), WANG Wei(王伟), WANG Shuo-Ren(王硕仁), *et al.*. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*(中华中医药学刊)[J], 2008, **26**(4): 724—726
- [11] ZHAO Hui-Hui(赵慧辉), WANG Wei(王伟). *Acta Chimica Sinica*(化学学报)[J], 2009, **67**(2): 167—173
- [12] ZHAO Hui-Hui(赵慧辉), WANG Wei(王伟). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析)[J], 2009, **29**(6): 1647—1650
- [13] ZHAO Hui-Hui(赵慧辉), WANG Wei(王伟), GUO Shu-Zhen(郭淑贞). *Chinese Journal of Arteriosclerosis*(中国动脉硬化杂志)[J], 2008, **16**(7): 545—548
- [14] SUN Ping(孙萍), LUO Guo-An(罗国安), QU Jun(曲峻). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2003, **24**(12): 2169—2172
- [15] JIANG Ning(蒋宁), ZHOU Wen-Xia(周文霞), ZHANG Yong-Xiang(张永祥), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(8): 1462—1466
- [16] WANG Ya-Dong(王亚冬), WU Jin-Dao(吴金道), JIANG Zhong-Li(江中立), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(11): 2065—2072
- [17] DONG Lei(董雷), JIANG Ning(蒋宁), ZHOU Wen-Xia(周文霞), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(2): 274—277
- [18] Martínez-Amat A., Boulaiz H., Prados J., *et al.*. *Br. J. Sports. Med.* [J], 2005, **39**: 830—834
- [19] Schumann R. R., Zweiger J. *Clin. Chem. Lab. Med.* [J], 1999, **37**: 271—274
- [20] Lamping N. R., Dettmer N. W. J., Schroeder D., *et al.*. *J. Clin. Invest.* [J], 1998, **101**: 2065—2071
- [21] Dobryszczyka W. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* [J], 1997, **35**(9): 647—654
- [22] Katayama T., Nakashima H., Yonekura T. *J. Cardiol.* [J], 2003, **42**: 49—56
- [23] Ehrenwald E., Chisolm G. M., Fox P. L. *J. Clin. Invest.* [J], 1994, **93**: 1493—1501
- [24] Yasojima K., Schwab C., McGeer E. G., *et al.*. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* [J], 2001, **21**: 1214—1219

- [25] Lin K. Y., Pan J. P., Yang D. L., *et al.*. Life Sci. [J], 2001, **69**(6): 707—719
- [26] Schousboe I., Rasmussen M. S. Int. J. Biochem. [J], 1988, **20**: 787—792
- [27] ZHANG Yi(张毅), CHEN Rui-Wen(陈蕊雯), SUN Shu-Han(孙树汉). Science in China, Series C(中国科学, C辑)[J], 2002, **32**(2): 172—176
- [28] Dvorin E., Corder L. N., Benson M. D., *et al.*. J. Biological Chemistry[J], 1986, **261**(33): 15714—15718
- [29] Recalde D., Ostos A. M., Badell E., *et al.*. Thromb. Vasc. Biol. [J]. 2004, **24**: 756—761
- [30] Vowinkel T., Mori M., Krieglstein C. F., *et al.*. J. Clin. Invest. [J], 2004, **114**: 260—269
- [31] Gupta R., Rastogi S., Nagar R., *et al.*. J. Assoc. Physicians India[J], 2000, **48**(5): 489—492
- [32] ZHAO Hui-Hui(赵慧辉), HOU Na(侯娜), WANG Wei(王伟), *et al.*. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine (中国中西医结合杂志)[J], 2009, **29**(6): 489—492
- [33] Ezeh B., Haiman M., Alber F. H., *et al.*. J. Lipid Res. [J], 2003, **44**: 1523—1529
- [34] Johnson B. D., Kip D. E., Marroquin O. C., *et al.*. Circulation[J], 2004, **109**: 726—732
- [35] Manttari M., Manninen V., Huttunen J. K., *et al.*. Eur. Heart J. [J], 1994, **15**(12): 1599—1603

Label Free Proteome Analysis of Plasma from Unstable Angina with Blood Stasis Syndrome Patients

ZHAO Hui-Hui¹, YANG Fan², WANG Wei^{1*}, WANG Hong-Xia³, WEI Kai-Hua^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029 China;

2. Beijing Proteomics Research Center, Beijing 102206, China;

3. National Center of Biomedical Analysis, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Label free LC-MS/MS method was used in seeking of unstable angina blood stasis syndrome(UABSS) differentially expressed plasma proteins. A polyclonal antibody affinity column, nanoAcquity UPLC and Synapt HDMS were used on plasma of two classes of samples(12 UABSS patients and 12 health volunteers). The results show that the method has a good reproducibility. The ionic strength coefficient of variability was less than 5%, retention time coefficient of variability was less than 3%. 3843 proteins were detected, among which 24 kinds of proteins differentially expressed large than 1.5 fold, include 11 down-regulated and 13 up-regulated(include 3 kinds of proteins only found in UABSS patients). The dynamic range was about 10⁴. ACTA1, ITIH3 and LBP were only found in the plasma of UABSS patients, Haptoglobin, SAA, CP, C6, MYH11, APOH and ANXA6 were significantly highly expressed in the plasma of UABSS patients, while HBB, HBA, HBE, HBD, HBG, HRG, IGHG, GSN and TF were lowly expressed in the plasma of UABSS patients. These identified increased expressed proteins could be divided into four categories according to their functions: (1) acute phase reactive protein; (2) complement protein; (3) cytoskeletal protein; (4) blood coagulation protein. The decreased expressed proteins could be divided into five categories: (1) apolipoprotein; (2) transport protein; (3) anticoagulated blood protein; (4) immunoglobulin; (5) cytoskeletal modulin protein. In conclusion, UABSS may correlated with inflammatory reaction, lipid metabolic disorder, myocardial damage, blood coagulation factor abnormal, oxygen transport obstacle, and these differentially expressed proteins could provide clues for the study and discovery of new protein targets for antianginal drugs. The label free proteomics is an efficient method for the discovery of differentially expressed proteins of complicated sample.

Keywords Mass spectrometry; Unstable angina; Blood stasis syndrome; Label free; Proteomics; Biomarker
(Ed.: H, J, Z)