

冠心病证候的蛋白质组学初探*

魏 营,杜武勋,刘长玉,刘 梅,宋启刚,朱明丹,冯利民

关键词:冠心病;证候学;蛋白质组学

中图分类号:R587.1 文献标识码:A 文章编号:1673-9043(2008)04-0290-03

21 世纪,冠心病仍是一项全球关注的公共卫生问题。随着中国经济发展和人们生活方式的改变,人群血压、血清总胆固醇水平以及体质指数等均呈现上升趋势,预示着中国冠心病的发病率将可能逐渐上升,应引起足够重视^[1]。

辨证论治是中医理论的特点,识证是基础。如何利用各种科技手段揭示冠心病证候的现代科学内涵成为中医药理论发展的关键所在。本文就冠心病中医证候学与蛋白质组学的相关问题进行初步探讨。

1 蛋白质组学的概述

蛋白质组概念是由澳大利亚学者 wilkins 等^[2]于 1995 年首先提出的,其含义为基因组所表达的全部蛋白质,可以是细胞、组织或机体在特定的时间和空间上基因组所表达的全部蛋白质;它不同于传统的单个蛋白质或某一类蛋白质研究。

蛋白质组学(Proteomics)^[3]随着蛋白质组的提出也自然地孕育产生。蛋白质组学作为一个衍生概念,是研究某一层面上所有蛋白质及其动态变化规律的科学,包括蛋白质的定性、定量、动态变化和整体演变规律等。

蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象的新领域,分为表达蛋白质组学、结构蛋白质组学和功能蛋白质组学。

表达蛋白质组学的目的是检测特定条件下细胞内的蛋白质表达谱,以及每一种蛋白质的表达水平。结构蛋白质组学是侧重描绘蛋白质在亚细胞水平的分布和空间结构特征。

功能蛋白质组学的目的是阐明蛋白质和蛋白质之间相互作用的问题^[4]。蛋白质组学最基本的技术是蛋白质分离技术和蛋白质鉴定技术。根据不同的研究目的,采取不同的蛋白质组研究方法。

2 冠心病中医证候的现代研究方法

通常,所研究的证候是在致病因素作用下,机体内外环境各系统之间相互关系发生紊乱所产生的综合反应,是反映疾病处于某一阶段病因、病性、病位、病势等病理要素的综合性诊断概念。

“证”是生命物质在疾病过程中具有时相性的本质反映,

* 基金项目:国家科学自然科学基金重大项目(NO:90709003)。

作者单位:300193 天津中医药大学(魏 营,宋启刚)

300150 天津中医药大学第二附属医院(杜武勋,刘长玉,刘 梅,朱明丹,冯利民)

作者简介:魏 营(1981-),女,2006 级硕士研究生,主要从事中医内科学心血管专业临床和科研工作。

“候”的原意是说明事物变化的情状,在医学范畴是指病变的临床表现。“证候”说明了中医学是通过观察病人的异常表现来把握疾病本质的。冠心病属于中医胸痹范畴,临床根据脏腑、气血、阴阳、寒热、虚实等不同的病理变化表现出心气虚弱、心肾阴虚、痰浊内阻、心血瘀阻等多种证候类型。

目前,冠心病中医证候学研究的主要方法有:1)借用数学模型进行多学科多层次多因素分析,达到辨证的计量目的。2)以辨证为基础,用现代医学的方法,寻找证的客观指标。3)根据冠心病的现证,用传统的辨证方法分析综合,临床实践,反复修证,制定辨证标准。4)主症辨证法,主症通常是诊断该证必须依靠的特征症状或非特异性症状的特意组合,在证中起决定和主导作用,而次症只起补充和参考作用,此法将复杂的辨证条理化、简明化、系统化。

3 冠心病的蛋白质组学研究

冠心病作为全球发病率和病死率都占前列的疾病,其发病机制尚未完全阐明,有待进一步研究。蛋白质组学技术的出现,更清楚地认识该病提供了一个新的方法。

急性冠脉事件的发生主要由于冠状动脉斑块的不稳定性,而斑块的稳定性主要由于斑块内不同细胞成分间的慢性炎症反应发展而来。目前对于冠心病蛋白质组学的研究主要集中在血管斑块组织和血管细胞两方面。

将蛋白质组的方法运用于寻找冠状动脉粥样硬化生物标志物研究。

You 等^[5]利用蛋白质组学技术发现冠心病患者的冠状动脉与正常相比铁蛋白轻链表达明显增高。

Duran 等^[6]将正常动脉、颈动脉内膜切除术中得到的非复杂性斑块、复杂性斑块分别培养,然后用二维超声法(2DE)分析分泌蛋白,结果显示粥样硬化动脉分泌的蛋白数量较正常明显增高,且病变越复杂,分泌的蛋白质数量越多。

Kaul 等^[7]探讨受体蛋白激酶(Ck)的功能蛋白质组学和人动脉粥样硬化主动脉壁发展阶段之间的关系,提出胆固醇特异性的受体 Ck 依赖性的基因调节可能在动脉粥样硬化形成中具有重要作用。

国内学者将蛋白质组学技术应用于药物治疗研究^[8]:给予高脂饮食 8 周的兔喂养辛伐他丁 4 周,观察该药抑制动脉粥样硬化的疗效,结果显示辛伐他丁促进血液中的脂质代谢,但粥样硬化动脉壁的内层病变并未恢复。

血管平滑肌细胞(VSMC)是参与动脉粥样硬化的重要成

分,在冠心病发病后血管重构中起着关键作用。

Dupont 等^[9]培养了人乳腺内动脉来源的血管平滑肌细胞(SMCs),对培养的 SMCs 细胞裂解物及其分泌上清的蛋白质组学进行研究,获得了体外培养的 SMCs 的蛋白质组学和分泌组学参考图谱,这两张参考图谱对于将来研究疾病中 SMCs 的蛋白质组学及其作用机制具有重要的参考意义。

Mayr 等^[10]已证实蛋白激酶 C(PKC- δ)缺乏的大鼠与野生型大鼠相比,新内膜形成明显增加,以联合蛋白质组学和代谢方法分析来源于 PKC- δ +/+和 PKC- δ -/-大鼠的 SMC,发现 PKC- δ -/-大鼠 SMC 中有 30 种以上的蛋白质发生改变,包括与糖和脂质代谢及谷胱甘肽再循环有关的酶、伴侣分子和细胞骨架蛋白。SMC 增殖力增强是动脉粥样硬化病理机制中的关键事件。

转化生长因子- β (TGF- β)是 SMC 增殖的一种抑制剂,Khanna^[11]也应用 2DE 研究正常 SMC 和 TGF- β 处理的 SMC,分析与细胞增殖和动脉粥样硬化有关的差异表达蛋白。SMC 凋亡也是血管疾病的重要病理机制。

内皮细胞是血管的重要组成成分,在病理生理过程中具有不同的作用,如凝血、血管内稳态、炎症反应、动脉粥样硬化、新血管生成等。

早期 PortigI 等^[12]利用 2DE 分离内皮细胞中的应激蛋白,通过免疫印迹和氨基酸序列分析,鉴定出一系列如泛素、热休克蛋白(HSP)等应激相关蛋白。

吕俊萍等^[13]研究了肿瘤坏死因子 α (TNF- α)对培养的人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)蛋白质表达谱的影响。结果发现 TNF- α 作用 HUVECs 后有 21 个蛋白质表达量显著改变,其中 11 个蛋白质下调和 9 个蛋白质上调,并且有一个蛋白质只出现在 TNF- α 刺激的 HUVE 中。

FuehsD 等^[14]研究 γ -羟基异黄酮对氧化低密度脂蛋白(OX-LDL)诱导的人血管内皮细胞蛋白质组改变的逆转作用,这些由三羟基异黄酮引起的蛋白质组的改变与阻止 OX-LDL 诱导的细胞凋亡有关。

内皮细胞的复制衰老促进动脉粥样硬化的发生,Kamin^[15]应用 2DE 比较衰老和年轻的 HUVECs 的差异蛋白表达,结果发现衰老 HUVECs 与年轻 HUVECs 相比,有 3 个蛋白上调和 5 个蛋白下调,而在原代的人成纤维细胞的复制衰老中并未观察到这些改变。

4 冠心病证候的蛋白质组学研究

证候是具有一定规律的病理表现,就必然有其附着的物质基础。冠心病同其他疾病一样均存在相关基因表达的变化,基因又要表达为相应的蛋白质才能影响生物功能,其表达类型与表达程度均受外界环境及内在状态变化的影响,蛋白质组研究正是从蛋白质水平的特异性和表达模式上反映了冠心病发生时机体的内在变化,与临床症状和体征有着必然联系。

吴辉等^[16]检测 82 例冠心病患者血清主要炎症因子并经统计发现如纤维蛋白原(FIB)、白介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因

子-OL(TNF-OL)及高敏感性 c 反应蛋白(hs-CRP)等指标在痰热型患者明显高于非痰热型差异有非常显著性意义,可能提示冠心病痰热证之实质所在。

吴红金等^[17]采集正常人、冠心病心血瘀阻证患者的血浆,用双向电泳、图像分析技术发现冠心病血瘀证患者血浆与正常相比有 3 个蛋白质下调和 6 个蛋白质上调,胶内酶切提取蛋白进行质谱鉴定,其中冠心病血瘀证患者血浆与正常相比升高的蛋白质有免疫球蛋白、纤维蛋白原、粒酶,与正常相比降低的蛋白有 CD44SP。这些蛋白有望发展成为冠心病血瘀证患者血浆中的诊断标志物。曾武雄等^[18]通过蛋白质分离、鉴定将冠心病寒凝证患者与正常人的蛋白质表达差别加以甄别、测定、分析。

Naito M^[19]认为高纤维蛋白原血症在动脉内壁的沉积可能先于低密度脂蛋白的沉积,在冠心病的发展中,特别是早期其作用可能比低密度脂蛋白更重要。

血浆蛋白质组学的研究表明,循环系统(AS)患者血浆中粒酶的水平升高,粒酶是细胞毒性淋巴细胞分泌的一种颗粒,在冠心病中中介细胞免疫反应引起血管内皮细胞凋亡,加重内皮损伤而促进冠状动脉粥样硬化^[20-21]。

蛋白质组学研究技术已被应用于医学和药学的各个领域,在阐明疾病的分子机制、发现新的疾病标志分子、研究药物新靶点和药物毒理学方面都有广泛的应用。蛋白质组学的出现,为冠心病证候学研究提供了一个可行的方法。

5 问题与展望

冠心病“证候”规范化研究包括证名的规范、证的诊断标准的规范、四诊的规范化等。但是由于证是一种功能态,不断发展转化,辨证也因人而异,只凭医生的分析概括水平,很难定性、定量以及定位,推广应用更为困难,因此以蛋白质组作为冠心病证候规律研究的物质基础,用蛋白质组学研究手段和方法对这一物质基础进行定量和定性,了解其变化规律,对了解证候实质及临床辨证的规范化具有十分重要的意义。

冠心病中医证候蛋白质组学研究的目的在于,坚定证候的总体蛋白质表达图谱,通过对冠心病不同证候蛋白质表达差异的研究,揭示决定该证候的关键蛋白质,阐明不同证候状态时所表达的或差异表达的所有蛋白质,以及蛋白质翻译后的修饰情况,结合生物信息学和统计学的比较分析,建立冠心病证型相关的蛋白质表达图谱和数据库。

进一步探讨证候各个症状、体征与相关蛋白质之间的关系,通过对冠心病证候产生前后蛋白质组学的研究来探索冠心病不同证型产生的物质基础并了解其变化规律,研究证候与蛋白质组学之间的关系,建立“冠心病证候—蛋白质表达谱”以此来揭示冠心病中医证候的科学内涵,能够为冠心病中医辨证的客观化提供依据和方法。

参考文献:

- [1] 张海澄,郭继鸿.冠心病流行病学与一级预防[J].中国实用内科杂志,2002,22(8):449-451.
- [2] Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA. Progress with pro-

- teome projects; why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13: 19-27.
- [3] Dove A. Proteomics: translation genes into products[J]. *Nature Biotechnol*, 1999, 17(3): 233-234.
- [4] Nguyen A., Ya MB. Proteomics and systems biology approaches to signal transduction in sepsis[J]. *Crit Care Med*, 2003, 31: 1-6.
- [5] You SA, Archacki SR, Angheloiu G, et al. Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker; evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis[J]. *Physiol Genomics*, 2003, 13: 25-30.
- [6] Duran MC, Mas S, Martin Ventura JL, et al. proteomic analysis of human vessels; application to atherosclerotic plaques[J]. *Proteomics*, 2003, 3(6): 1-6.
- [7] Kaul D, Kaur R, Baba I, et al. Functional proteomics of receptor-CK in the developmental stages of human atherosclerotic arterial wall[J]. *Indian Heart J*, 2003, 55(3): 252-255.
- [8] Yu YI, Rui YC, Yang PY, et al. Studies on the simvastatin effect on the artery of atherosclerotic rabbit using proteomics approaches [J]. *Acta Pharm Sin*, 2003, 38(7): 511-514.
- [9] Dupont A, Corseaux D, Dekeyser O, et al. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells [J]. *Proteomics*, 2005, 5: 585-596.
- [10] Mayr M, Siow R, Chung YI, et al. Proteomic and metabolomic analysis of vascular smooth muscle cells; role of PKC δ [J]. *Circ Res*, 2004, 94(10): 87-96.
- [11] Khanna A. Concerted effect of transforming growth factor- β , cyclin inhibitor p21, and c-myc on smooth muscle cell proliferation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(3): 1133-1140.
- [12] Portig I, Pankuweit S, Lottspeich F, et al. Identification of stress proteins in endothelial cells[J]. *Electrophoresis*, 1996, 17(4): 803-808.
- [13] 吕俊萍, 王树人, 马增春, 等. 运用蛋白质组学技术研究 TNF- α 对血管内皮细胞的作用机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(7): 1121-1125.
- [14] Fuchs D., Erhard P, Tumer, et al. Genistein reverses changes of the proteome induced by oxidized-LDL in EA.hy 926 human endothelial cells[J]. *J Proteome Res*, 2005, 4(2): 369-376.
- [15] Kamino H, Hiratsuka M, Toda T, et al. Searching for genes involved in arteriosclerosis; proteomic analysis of cultured human umbilical vein endothelial cells undergoing replicative senescence[J]. *Cell Struct Funct*, 2003, 28(6): 495-503.
- [16] 吴辉, 洪永敦, 吴伟, 等. 冠心病痰热证候与炎症因子相关性探讨[J]. *辽宁中医杂志*, 2004, 31(7): 542-543.
- [17] 吴红金, 马增春, 高月, 等. 蛋白质组学技术对冠心病血瘀证相关蛋白的研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3(3): 189-201.
- [18] 曾武雄, 秦鉴, 冠心病寒凝证的蛋白组学分析[J]. *现代保健·医学创新研究*, 2007, (7): 17-20.
- [19] Naito M. Effects of fibrinogen, fibrin and their degradation products on the behaviour of vascular smooth muscle cells[J]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, 2000, 37(6): 458-460.
- [20] Choy J C, McDonald P C, Suarez A C, et al. Granzyme B in atherosclerosis and transplant vascular disease; association with cell death and atherosclerotic disease severity[J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(5): 460-467.
- [21] Choy J C, Podor TJ, Yanagawa B, et al. The regulation and consequences of immune-mediated cell death in atherosclerotic diseases[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2003, 3(3): 269-272.

(收稿日期: 2008-06-28)