

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.07.009

临床研究

缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者 特异性血清标志物研究

杨艳玲¹, 曹雪滨^{*}, 解亚楠¹, 王祥贺¹, 何建成², 张 刚¹, 胡元会³, 李俊峡⁴

(1. 中国人民解放军第二五二医院, 河北省保定市百花东路 991 号, 071000; 2. 上海中医药大学基础医学院; 3. 中国中医科学院广安门医院; 4. 北京军区总医院)

基金项目: “十一五”军队中医药研发推广专项资助项目 (2006021003); 上海市卫生系统优秀人才培养计划资助项目 (XBR2011070); 上海市博士点基金资助项目

摘要 目的 探讨缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者标志性的差异多肽, 寻找其特异性血清标志物。方法 收集缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者 30 例 (观察组) 以及健康体检者 20 例 (正常对照组) 的血清标本, 通过特异的液体磁珠分选后, 进行基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析得到缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者的血清多肽谱, 采用生物信息学分析软件 Clinprot tools2.1, 运用不同统计学方法进行差异分析, 建立缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者诊断的血清多肽谱模型。结果 观察组和正常对照组差异表达的蛋白峰有 47 个, 筛选最佳标志物共得出 5 个峰用来建模型, 其中 1866.17Da、7761.49Da、1848.81Da、2037.57Da 在观察组低表达, 2660.54Da 在观察组高表达; 进一步通过多肽氨基酸序列库查询这 5 种蛋白峰, 共得到 3 种肽段的氨基酸序列, 分别是补体 C3 f、纤维蛋白原和热休克蛋白 60。结论 补体 C3 f、纤维蛋白原和热休克蛋白 60 是缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者特异标志物。

关键词 缺血性心肌病; 血清多肽谱图; 气虚血瘀证; 心力衰竭; 质谱; 血清标志物

充血性心力衰竭 (congestive heart failure, CHF) 是心内科的常见病, 是多种心血管疾病的临床转归。前期研究证明, 气虚血瘀证是 CHF 发病的始动机制和关键环节^[1-3], 并可由此演变为虚实夹杂的复杂证候群, 表现为一系列随病情变化而动态变化的证候特点, 本虚标实, 虚实并见。本研究利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 技术, 对具有气虚血瘀证特点的缺血性心肌病心力衰竭患者进行血清检测, 并以健康人作对照, 从蛋白质分子水平探究疾病的病理机制, 研究其差异性蛋白, 旨在探究新的特异性较高的血清标志物。

1 资料方法

1.1 纳入标准

符合《内科学》^[4] 中缺血性心肌病诊断标准:

明确的冠状动脉疾病证据 (心绞痛、心肌梗死、冠状动脉造影阳性或心脏 CTA 提示明确的血管病变); 彩色多普勒超声和体格检查提示明显的心脏扩大, 尤以左心室扩大为主 [左心室舒张末期直径 ≥ 55 mm, 左室射血分数 (LVEF) $\leq 50\%$]; 出现心力衰竭症状; 中医辨证分型参照《中药新药临床研究指导原则》^[5] 及《中医临床诊疗术语·证候部分》^[6] 拟定, 气虚血瘀证: 主症: 心悸气短, 胸胁作痛, 颈部青筋暴露, 或胁下痞块; 次症: 头晕, 乏力, 面颧暗红; 舌脉: 舌淡红或兼有瘀斑, 苔薄白, 脉虚数无力或结代。

1.2 排除标准

冠心病并发症引起的心力衰竭 (室间隔穿孔、乳头肌功能不全及心律失常等); 其他心脏病或其他原因引起的心脏扩大和心力衰竭 (风湿性心脏病、高血压病、长期贫血、甲状腺功能亢进、心脏结节病等); 急性心肌梗死引起的心力衰竭; 合并

* 通讯作者: exb13633227588@126.com, 18931258090

严重慢性肝肾疾病。

1.3 研究对象

收集 2009 年 10 月至 2010 年 12 月于中国人民解放军第二五二医院心血管内科住院的缺血性心脏病心力衰竭气虚血瘀证患者 30 例（观察组），其中男 18 例，女 12 例；年龄 46 ~ 80 岁，平均年龄 (66.79 ± 7.96) 岁；病程 4 ~ 11 年，平均病程 (6.57 ± 1.96) 年；3 支病变 15 例，2 支病变 13 例，单支病变 2 例；心功能分级^[4] II 级 14 例，III 级 14 例，IV 级 2 例。另选本院体检中心的健康体检者 20 例（正常对照组），其中男 11 例，女 9 例，年龄 50 ~ 81 岁，平均 (64.25 ± 8.14) 岁。两组一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，具有可比性。

1.4 血清标本采集

收集两组受试者清晨空腹静脉血 4 ml，室温 (25°C) 垂直放置 1 h，室温下以 $1400 \sim 2000 \text{ r/min}$ 离心 10 min，取血清置于 -80°C 保存。将 $5 \mu\text{l}$ 分装血清加入已装有 $10 \mu\text{l}$ 磁珠和 $10 \mu\text{l}$ 磁珠结合缓冲液的样品管中，混匀，加入 $100 \mu\text{l}$ 磁珠清洗缓冲液 (WB) 两次，用加样枪吸去悬浮液体，再向样品管中加入 $5 \mu\text{l}$ 磁珠洗脱缓冲液 (EB)，混匀，将洗脱液移入已标记的 0.5 ml 样品管中，并加入 $5 \mu\text{l}$ 磁珠稳定缓冲液 (SB)，混匀，24 h 内进行质谱分析。

1.5 质谱检测方法

利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (布鲁克·道尔顿公司，德国) 进行数据分析，线性模式，扫描范围 $1 \sim 15 \text{ KDa}$ ，激光能量 340 k，累计点数 400。

1.6 数据处理

质谱原始数据通过 FlexAnalysis 2.4 软件进行分析，包括基线的平滑、衰减以及标峰，经过 FlexAnalysis 2.4 软件处理的质谱数据，运用 Clinprot 2.1 软件中遗传算法 (GA)、人工神经网络算法 (SNN)、快速分类算法 (GC) 的统计学算法进行

组间统计学差异分析。

2 结果

2.1 两组受试者血清蛋白质谱差异

MALDI-TOF-MS 一共检测到 139 个峰，其中具有显著差异的蛋白峰 ($P < 0.001$) 共计 47 个。用 Clinprot 2.1 软件筛选最佳标志物，共得出 5 个峰用来建模型 (见表 1)，质荷比分别是：1866.17Da、2660.54Da、7761.49Da、1848.81Da、2037.57Da。其中 1866.17Da、7761.49Da、1848.81Da、2037.57Da 在观察组低表达；2660.54Da 在观察组高表达。运用 GA、SNN、GC 三种不同的统计学算法来建立模型，得到的识别率与交叉验证数据均大于 95%，详细数据见表 2。这表明用这 5 个蛋白标志物组成的诊断模型能够很好的识别缺血性心脏病心力衰竭气虚血瘀证患者。同时软件分析还发现，运用这 3 种算法建立模型都用到的峰的质荷比是 1866.17Da，说明这个峰具有特别显著差异，提示在该类患者中质荷比 1866.17Da 所对应的蛋白质在其疾病的发生发展过程中发生了特征性变化。

表 1 两组受试者最佳标志物的差异多肽峰

分子量	平均峰面积	P 值	峰面积 1	峰面积 2	标准偏差 1	标准偏差 2
1866.17	448.6	<0.000001	488.16	39.56	99.19	31.94
1848.81	50.47	<0.000001	53.88	3.41	19.24	1.43
2037.57	28.78	<0.000001	36.56	7.78	13.72	8.62
2660.54	13.72	0.000118	10.29	24.01	5.19	37.69
7761.49	634.49	0.000361	1314.64	680.15	392.73	489.47

注：1：正常对照组；2：观察组

2.2 差异多肽的序列预测

通过对现有的多肽氨基酸序列库查询这 5 个蛋

表 2 两组受试者运用不同统计学算法建立模型

统计学算法	交叉验证	识别率
GA	97.49%	100%
SNN	100%	100%
QC	100%	100%

表 3 差异多肽可能的氨基酸序列

分子量	蛋白名称	氨基酸序列
1865.00281	IPI: IPI00739237.1 Gene_Symbol = LOC653879 similar to complement component 3	R. SSKITHRIHWESASLL. R
2659.25674	IPI: IPI00021885.1 Gene_Symbol = FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain precursor	A. DEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPV. R
2038.02266	IPI: IPI00784154.1 Gene_Symbol = HSPD1 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	R. IQEIIQLDVTITSEYEK. E

白峰所对应的蛋白质,依据分子量有 3 种蛋白峰查到对应肽段的氨基酸序列,分别是补体 C3 f、纤维蛋白原和热休克蛋白 (HSP) 60,具体见表 3。其中补体 C3 f 和 HSP60 在观察组低表达,纤维蛋白原在观察组高表达。特异性最高的是 HSP60。

3 讨论

CHF 属于本虚标实之疾,本虚主要为心气不足,帅血无力;标实主要为血脉瘀阻。气为血帅,心力衰竭时心力匮乏,气虚不能行血而致血脉瘀阻。气虚及阳,水湿不化,凝聚为痰,停聚为水,可进一步加重病情。气虚血瘀进一步发展可致气阳两虚、阳气虚脱、水湿内停、痰浊内阻等一系列虚实夹杂的证候群。

在不同的病理生理状态下, DNA 的表达不同,机体细胞和组织分泌、脱落的蛋白质不断地进入到血液循环中。因此,疾病状态下血清中蛋白质的表达水平和种类不同,这些变化蕴藏着大量与疾病相关的信息^[8]。血清蛋白质组学是指研究选定的目标人群血清中表达的全部蛋白质,在建立正常蛋白质表达谱图的基础上寻找目标血清中的差异蛋白点,并鉴定与疾病相关的蛋白质,因此为深入探索疾病发生的病理生理学机制、发病初期特异性血清标志物、药物作用靶点等寻找到新的研究途径^[9]。20 世纪 80 年代后期,随着 Hillenkamp^[10] 发明的基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 和 Fenn^[11] 发明的电喷雾离子化 (ESI) 两种质谱软电离方法在质谱领域的应用,生物大分子的质谱分析得以实现。利用 Clinprot 系统又称液体芯片飞行时间质谱技术,可以从复杂体液中发现潜在的生物标志物。本研究以缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者为研究对象,并以正常人作为对照,筛选两组血清中的差异多肽,进一步建立缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证的诊断模型,为缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证的早期诊断提供依据。本研究结果表明,运用 5 种蛋白峰所建立的模型,经过不同的统计学算法来检测其识别率与交叉验证数据均大于 95%。进一步通过多肽氨基酸序列库查询这 5 种蛋白峰,共得到 3 种肽段的氨基酸序列,分别是补体 C3 f、纤维蛋白原和热休克蛋白 60。提示在缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证的发生和发展过程中,患者体内有一系列蛋白质的代谢发生了异常变化,它们之间的联合和/或相互的变化与疾病密切相关。

补体是存在于正常人或动物血清中的一组球蛋

白,具有酶活性^[12]。在补体蛋白中, C3 是目前已知的功能最复杂多样的补体成分, C3 与其他补体蛋白和受体的相互作用在宿主防御中起关键作用。血液循环中的补体 C3 作为肝脏和巨噬细胞合成的一种急性期蛋白,是一种有效的炎症标志。本研究结果提示,免疫反应参与了缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证的发生、发展过程。目前已有实验研究及流行病学资料显示血浆纤维蛋白原与冠心病发病密切相关^[13]。纤维蛋白原水平的增高会使血液处于高凝状态,有助于动脉粥样斑块部位的血栓形成。Sanchez-Lazaro 等^[14] 研究表明,血浆纤维蛋白原水平与冠心病患者心功能密切相关,而血浆纤维蛋白原增高所致的机体高凝状态可能是大多数晚期 CHF 患者血栓事件发生率明显增高的原因之一。HSP 是从细菌到哺乳动物中广泛存在的一类热应激蛋白质,按照蛋白的大小共分为五类,分别是 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 及小分子 HSP。有研究认为, HSP 在动脉粥样硬化的发生发展过程中发挥重要作用,人类 HSP60 的 IgG 抗体水平升高与冠心病及其严重程度密切相关^[15-16],但亦有相反结论^[17-18]。本研究结果表明,缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者的 HSP60 水平相对于健康人群为低表达,其意义有待进一步深入研究和探讨。

综上所述,本研究对于缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者进行蛋白指纹图谱,并查询到 3 种相关蛋白质,初步建立了此病证的诊断模型,也为进一步建立缺血性心肌病心力衰竭气虚血瘀证患者模型及发现特异的分型蛋白奠定了基础。但这些结果的客观性及临床应用价值尚有待于今后大样本量的盲法验证、评估及修正。

参考文献

- [1] 曹雪滨,王士雯,黄河玲,等. 充血性心力衰竭中医辨证分型与心功能的关系 [J]. 新中医, 2000, 32(2): 37-39.
- [2] 李小茜,何建成,曹雪滨. 基于系统和网络生物学的充血性心力衰竭中医证候规律研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(1): 57-59.
- [3] 李小茜,何建成,黄品贤. 基于临床病例回顾的充血性心力衰竭中医证候规律研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1339-1345.
- [4] 陆再英,钟南山. 内科学 [M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 298-299.
- [5] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 (试行) [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002: 80.
- [6] 国家技术监督局. 中医临床诊疗术语·证候部分 [M]. 北京:中国标准出版社, 1997: 9.

- 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. 急性心力衰竭诊断和治疗指南(2010) □ . 中华心血管病杂志, 2010, 38(3): 195-208.
- 杨艳玲, 曹雪滨. 血浆/血清蛋白质组学在心血管疾病的应用 □ . 军医进修学院学报, 2011, 32(8): 876-877.
- 廖秋林, 陈晓东, 丁彦青. 血清蛋白质组学技术及研究进展 □ . 中国病理生理杂志, 2008, 24(2): 402-407.
- [10] Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons □ . Anal Chem, 1988, 60(20): 2299-2301.
- [11] Fenn JB, Mann M, Meng CK, et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules □ . Science, 1989, 246(4926): 64-71.
- [12] 张景洪. 冠心病患者血清中 IgG、IgA、IgM、C3、C4、CRP 含量的检测与结果分析 □ . 医学检验与临床, 2008, 19(3): 124-125.
- [13] Fibrinogen Studies Collaboration, Kaptoge S, White IR, et al. Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: the fibrinogen studies collaboration □ . Am J Epidemiol, 2007, 166(8): 867-879.
- [14] Sanchez-Lazaro IJ, Almenar L, Reganon E, et al. Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional class □ . Int J Cardiol, 2007, 129(3): 388-393.
- [15] Zhang X, He MA, Cheng L, et al. Joint effects of antibody to heat shock protein 60, hypertension, and diabetes on risk of coronary heart disease in Chinese □ . Clin Chem, 2008, 54(6): 1046-1052.
- [16] Zhu J, Quyyumi AA, Rott D, et al. Antibodies to human heart-shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherogenesis □ . Circulation, 2001, 103(8): 1071-1075.
- [17] Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Autoimmunity to human heat shock protein 60, Chlamydia pneumoniae infection, and inflammation in predicting coronary risk □ . Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(3): 431-437.
- [18] Zhu J, Kata RJ, Quyyumi AA, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with coronary calcification levels: suggestion of pathogen-triggered autoimmunity in early atherosclerosis □ . Circulation, 2004, 109(1): 36-41.

Specific Serum Markers of Heart Failure Patients With Ischemic Cardiomyopathy and Qi-Deficiency Blood-Stasis Pattern

YANG Yanling¹, CAO Xuebin¹, XIE Yanan¹, WANG Xianghe¹, HE Jiancheng², ZHANG Gang¹, HU Yuanhui³, LI Junxia⁴

(1. 252 Hospital of Chinese PLA, Hebei Province 071000; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 3. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences; 4. General Hospital of Beijing Military Region)

ABSTRACT Objective To research the spectra of serum peptides and serum markers of heart failure patients with ischemic cardiomyopathy and qi-deficiency blood-stasis pattern. **Methods** The serum samples from 30 heart failure patients with ischemic cardiomyopathy and qi-deficiency blood-stasis pattern (observation group) and 20 healthy persons (normal control group) were collected. The spectra of serum peptides was obtained by matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The spectra model of serum peptides was established with Clinprot tools 2.1 and statistical methods. **Results** There were 47 differentially expressed protein peaks in the observation group and normal control group. The model was established with five peaks obtained from screening the best markers. There were low expressions of 1866.17Da, 7761.49Da, 1848.81Da and 2037.57Da in the observation group. There was a high expression of 2660.54Da in the observation group. Three kinds of amino acid sequences such as complement C3f, fibrinogen and heat shock protein 60 were obtained by searching five protein peaks in the polypeptide amino acid sequence database. **Conclusion** The specific markers of heart failure patients with ischemic cardiomyopathy and qi-deficiency blood-stasis pattern are complement C3f, fibrinogen and heat shock protein 60.

Keywords ischemic cardiomyopathy; spectra of serum peptides; qi-deficiency blood-stasis pattern; heart failure; mass spectrometry; serum marker

(收稿日期: 2013-09-25; 修回日期: 2013-12-23)

编辑: 邓 媛