

基于血小板蛋白质组学探讨小型猪痰瘀互结证冠心病的发病机制

李 瑛, 李 磊, 孟红旭, 王奥奥, 王紫艳, 张国瑗, 史 跃,
马彦雷, 林 力*, 刘建勋*

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

摘要: 基于血小板蛋白质组学技术研究分析痰瘀互结证冠心病的关键调节蛋白和发病机制。基于前期实验室研究基础复制小型猪痰瘀互结证冠心病动物模型, 通过血脂及心肌组织特征变化进行模型判断, 进一步通过定量蛋白质组学技术对血小板蛋白进行研究, 筛选得到差异蛋白, 并通过生物信息学分析痰瘀互结证冠心病的关键调节蛋白及生物途径。动物实验已获得中国中医科学院西苑医院伦理委员会的批准(伦理号 2021XLC037)。研究结果表明, 模型组在造模 10 周后总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL-C)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 及肌酸激酶 (creatinase, CK) 和肌酸激酶同工酶 (creatinase-MB, CK-MB) 水平均明显升高, 反映模型组出现血脂升高、凝血功能异常及心肌缺血等病理变化特征。此外, 相比于假手术组, 模型组血小板中有 26 个上调蛋白, 8 个下调蛋白。生物信息学分析发现, 差异蛋白主要参与糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、脂质与动脉粥样硬化、Ras 蛋白信号转导等。其中乳酸脱氢酶 B (lactate dehydrogenase B, LDHB)、乙醇脱氢酶 5 (alcohol dehydrogenase 5, ADH5)、神经母细胞瘤病毒癌基因 RAS 同系物 (neuroblastoma ratsarcoma viral oncogene homolog, NRAS) 和 Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (Kirsten ratsarcoma viral oncogene homolog, KRAS) 与其他蛋白质相互作用时起到中枢作用, 并同时参与多条作用通路。结果显示, LDHB、ADH5、NRAS 和 KRAS 可能是痰瘀互结证冠心病中的标志性蛋白, 通过调节糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、脂质与动脉粥样硬化、Ras 蛋白信号转导等生物过程, 从而导致痰瘀互结证冠心病的发生。

关键词: 痰瘀互结证; 冠心病; 血小板; 蛋白质组学; 糖酵解/糖异生

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)07-1904-09

The coronary heart disease of phlegm-stasis cementation syndrome in mini-swine based on platelet proteomics

LI Ying, LI Lei, MENG Hong-xu, WANG Ao-ao, WANG Zi-yan, ZHANG Guo-yuan, SHI Yue,
MA Yan-lei, LIN Li*, LIU Jian-xun*

(Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Beijing 100091, China)

Abstract: Based on the technology of platelet proteomics, the key regulatory proteins and pathogenesis of coronary heart disease with phlegm and blood stasis syndrome were explored and analyzed. Based on the previous laboratory research, the model of coronary heart disease in mini-swine with phlegm-stasis cementation syndrome was duplicated. The model was judged by the changes in blood lipid and myocardial tissue characteristics. Furthermore, the platelet proteins were studied by quantitative proteomics, and the differentially expressed proteins

收稿日期: 2022-11-30; 修回日期: 2023-02-09.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (82030124); 国家自然科学基金面上资助项目 (81873041); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04508).

*通讯作者 Tel: 86-10-62835618, E-mail: tcmlinli@163.com;

Tel: 86-10-62835608, E-mail: liujx0324@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1294

were screened. The critical regulatory proteins and biological pathways of coronary heart disease with phlegm-stasis cementation syndrome were analyzed by bioinformatics. After ten weeks of modeling, the levels of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), very low density lipoprotein (VLDL-C), triglyceride (TG), creatine kinase (CK) and creatine kinase-MB (CK-MB) in the model group were significantly increased, reflecting the pathological changes such as increased blood lipid, abnormal coagulation function and myocardial ischemia in the model group. In addition, compared with the sham group, there were 26 up-regulated proteins and 8 down-regulated proteins in the platelets of the model group. Combined with bioinformatics analysis, it was found that differential proteins mainly involved in glycolysis/gluconeogenesis, pyruvate metabolism, lipid and atherosclerosis, Ras protein signal transduction. Among them, lactate dehydrogenase B (LDHB), alcohol dehydrogenase 5 (ADH5), neuroblastoma ratsarcoma viral oncogene homolog (NRAS) and Kirsten ratsarcoma viral oncogene homolog (KRAS) play a central role when interacting with other proteins and simultaneously participate in multiple action pathways. The results showed that LDHB, ADH5, NRAS, and KRAS may be the marker proteins in CHD with phlegm-stasis cementation syndrome by regulating glycolysis/gluconeogenesis, pyruvate metabolism, lipid and atherosclerosis, Ras protein signal transduction and other biological processes.

Key words: phlegm-stasis cementation syndrome; coronary heart disease; platelet; proteomics; glycolysis/gluconeogenesis

冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)是由于冠状动脉粥样硬化斑块形成导致血管管腔狭窄甚至阻塞,冠状动脉血流减少,心肌组织氧供失衡,从而引发心绞痛心肌梗死等临床综合征,属于中医“胸痹、心痛”的范畴^[1,2]。痰瘀互结是冠心病在中医临床上常见的证型之一,本病的发生多由正气亏虚或痰浊、瘀血、气滞、寒凝而引起心脉痹阻不畅,目前对于痰瘀互结证冠心病的发病机制的研究报道仍然较少,其科学内涵还有待于进一步阐释。

蛋白质组学是一门可以鉴定和量化生物体中蛋白质含量的研究技术,可以进一步阐明蛋白质的特性并认识特定蛋白质的结构和功能。同时,蛋白质组学具有特异性、整体性、动态性等特点^[3],这与中医认识疾病的整体观、辩证观有一定的趋同性,利用其理论方法探索中医学证候本质^[4],能为中医辨证的客观化提供方法^[5]。利用蛋白质组学技术筛选痰瘀互结证冠心病相关的蛋白质,将有利于临床上的诊断和治疗、预后研究。

小型猪在心血管解剖生理和病理机制等方面与人类非常相似,被认为是制备心血管疾病动物模型的最适动物^[6]。本课题组前期已经成功建立符合临床发病过程的小型猪冠心病血瘀证病证结合模型^[7],并且通过血清蛋白质组学分析发现了痰瘀互结证冠心病的关键调节蛋白与调节脂质代谢、炎症、免疫调节等作用相关^[8]。本研究在此病证结合模型的基础上,采用蛋白质组学技术检测血小板样本中蛋白质含量,进一步筛选得到差异蛋白,并通过蛋白互作网络找出痰瘀互结证冠心病的关键调节蛋白及相关生物途径,以期明确痰瘀互结证冠心病的发生机制。

材料与方法

动物 中国实验小型猪 (Chinese experimental min-swine, CEMS) 24只,雌雄不拘,体重15~20 kg,由北京北七家美乐养殖场提供,动物合格证号 SCXK(京)2018-0004。

仪器 MP150 多导生理信息分析系统(美国 Biopac 公司); BV Pulsera 型 C 型臂 X 光机(荷兰飞利浦公司); BioX 心脏血流动力学监测仪(美国 THEICG 公司); 快速交换 PTCA 球囊扩张导管(管径 1.3:1, 美国 Boston 公司); 导引导丝、6F Cordis 血管造影导管和球囊(美国 Abbott 公司); ICECL31R 低温离心机(美国 Thermo 公司); TEC-7621C 型心电监护仪(日本光电工业株式会社); Vivid S5 彩色超声诊断仪(美国 GE 公司); HMIAS-2000 病理图像分析系统(北京利金阳科技发展有限公司); RA-1000 全自动生化分析仪(美国 Technicon 公司)。Easy nLC1000 纳升级液相色谱仪、Q Exactive Plus 四级杆-静电场轨道阱质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); Synergy UV 型超纯水机(美国 Millipore 公司)。

试剂 戊巴比妥钠,德国进口分装,每瓶 25 g,北京化学试剂公司提供,批号: 020402; 肝素钠注射液,每支 2 mL: 12 500 U,上海第一生化药业有限公司生产,批号: 070702; 76% 复方泛影葡胺注射液,每支 20 mL、15.2 g,上海旭东海普药业有限公司生产,批号: 071101。高脂饲料配方参考文献^[9]并加以调整,每 100 kg 普通饲料中加入胆固醇 2 kg、胆盐 0.5 kg 和猪油 10 kg,由北京科澳协力饲料有限公司提供,许可证编号: SCXK(京)2005-0007。弹力纤维 EVG 染液,珠海贝索生物技术有限公司提供,批号: 071220。尿素购自

美国 Affymetrix 公司, 货号 57-13-6; 测序级胰蛋白酶购自美国 Promega 公司, 货号 V511A; 甲酸、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、乙腈 (acetonitrile, CAN) 购自美国 Thermo Fisher 公司, 货号分别为 212454、3483-12-3、214241; 碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAA) 购自美国 Sigma 公司, 货号 I1149; 碳酸氢铵购自美国 Amresco 公司, 货号 1066-33-7。

痰瘀互结证冠心病小型猪模型的建立 基于本课题组^[10,11]前期已经建立的方法, 高脂饲料喂养结合冠状动脉血管内皮损伤的方法建立痰瘀互结证冠心病小型猪模型。小型猪以高脂饲料喂养 2 周, 每只每天 900 g 模拟饮食不节, 过食肥甘厚味, 导致动物脾失健运、聚湿生痰。在高脂饲料喂养的基础之上, 用介入法行冠状动脉血管内皮损伤。具体操作: 耳静脉注射戊巴比妥钠 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉后, 分离右侧颈总动脉, 结扎远心端, 置入 6F 动脉鞘管, 从动脉鞘管的侧管注入肝素 $200 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在 C 型臂 X 光机透视下, 以 6F 35 L 右冠导引导管置于左冠状动脉开口行左冠状动脉造影, 观察猪冠状动脉的分布情况, 造影后置入交换导丝, 将导丝置入冠状动脉前降支 (LAD) 中部, 将球囊沿导丝进入 LAD 中部。根据实验动物间 LAD 血管直径的差异进行球囊加压 $8 \sim 12$ 大气压 (ATM), 持续 30 s, 反复 3 次, 每次间隔 1 min, 间隔期间球囊不加压, 扩张后维持球囊压力 $4 \sim 6$ ATM, 同时轻微拉动球囊, 距离约 $0.5 \sim 1.0 \text{ cm}$ 。完成后撤除导丝、球囊, 再次造影观察 LAD 扩张情况, 撤除导引导管, 结扎颈总动脉, 伤口清创, 局部给予 $1\ 500\ 000 \text{ U}$ 青霉素, 无菌缝合, 单笼喂养观察, 术中连续心电监护。术后继续给予高脂饲料 (每只每天 900 g) 喂养 8 周。假手术组给予普通饲料, 仅冠脉造影, 不行介入损伤术。动物饲养及实验均按中国中医科学院西苑医院《实验动物饲养及使用指南》进行, 通过中国中医科学院西苑医院伦理委员会审查 (伦理号 2021XLC037)。

样本采集 采集假手术及模型动物血液, 按照本课题组建立的方法分离血小板, 取 2 mL 全血于 3.2% 枸橼酸钠抗凝管中, $1\ 100 \times \text{g}$ 离心 15 min , 取上层。 $1\ 800 \times \text{g}$ 离心 15 min , 血小板沉淀于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存^[12]。

生化检测 取血 3 mL , $1\ 600 \times \text{g}$ 离心 10 min , 分离血清, 采用全自动生化分析仪进行血脂测定和心肌酶检测, 血脂测定包括总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL-C)、甘油三酯 (triglyceride, TG)。心肌酶检测包括肌酸激酶 (creatinase kinase, CK) 和肌酸激酶同工酶 (creatinase kinase-MB, CK-MB)。

心肌组织病理观察 实验结束后, 各组动物颈动脉放血处死, 取被处死动物心脏, 生理盐水冲洗, 称重。血栓栓塞部位以下, 平行于冠状沟处均匀地将心室部分切成 5 片, 置于 TTC 染液中, 常温染色 15 min , 区分梗死区 (TTC 非染色区) 与非梗死区 (TTC 染色区), 以病理图像分析系统描记梗死区心肌面积和心室面积。取第 3 片梗死交界区心肌置于 10% 甲醛固定、包埋、切片, 行 HE 染色及 Masson 染色光镜下观察其组织结构。

血小板蛋白质组学样品制备 取血小板加入 RIPA 匀浆 ($1:100$), 冻融超声 3 次, 离心后取上清液, BCA 定量。将上述蛋白用尿素溶解, 转移到 10 K 超滤管内超滤离心, 浓缩完成后将溶剂置换成 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 先加 DTT 至终浓度 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 还原 30 min , 然后用 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素洗涤 3 次, 浓缩到 $50 \mu\text{L}$, 加入终浓度 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, 于黑暗处 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 30 min 。 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素洗涤 3 次, 随后采用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液洗涤 3 次, 浓缩到 $50 \mu\text{L}$ 。以 $1:25$ 的质量比例 (胰蛋白酶: 蛋白) 加入胰蛋白酶, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴 16 h , 加入 0.1% (v/v) 甲酸水溶液终止酶切, 更换接收管, 离心, 离心液用于质谱分析。每组取 3 个样品进行处理。

样品检测 使用 Easy nLC 1000 纳升级液相色谱仪对处理后的样品进行检测。流动相 A: 0.1% 甲酸-水, 流动相 B: 0.1% 甲酸-乙腈。洗脱梯度: $0 \sim 25 \text{ min}$, $5\% \sim 9\% \text{ B}$; $25 \sim 65 \text{ min}$, $9\% \sim 23\% \text{ B}$; $65 \sim 75 \text{ min}$, $23\% \sim 32\% \text{ B}$; $75 \sim 76 \text{ min}$, $32\% \sim 95\% \text{ B}$; $76 \sim 90 \text{ min}$, $95\% \sim 95\% \text{ B}$ 。流动相流速为 $420 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。质谱分析在 Q Exactive Plus 质谱仪上采集完成, 模式为数据依赖型 (data dependent acquisition, DDA)。相关参数如下: 一级质谱的分辨率为 $70\ 000 \text{ FWHM}$, 扫描范围 m/z $400 \sim 1\ 600$, 自动增益控制值为 3×10^6 , 注入时间 50 ms 。二级质谱的分辨率设为 $17\ 500$, 自动增益控制值 1×10^5 , 注入时间 45 ms , 碰撞能量 27 NCE 。二级采集的标准设为前 20 个最强离子作为母离子, 再进行 Orbitrap 检测。每个样品平行测定 3 次。

蛋白质鉴定及定量分析 蛋白质鉴定通过 Proteome Discoverer 2.5 软件进行, 将质谱所得到的原始数据 RAW 文件导入软件, 在 UniProt 蛋白质数据库 (<http://www.uniprot.org/>, 包含 $49\ 792$ 蛋白序列) 中搜索。参数条件设定如下: 肽段置信度设置为高, 最多蛋白漏切位点数 2 个, 肽段的长度范围 $6 \sim 144$ 个氨基酸, 母离子质量偏差为 10 , 碎片离子质量偏差 0.02 Da , 固定修饰选择半胱氨酸碘乙酰胺化, 可变修饰选择甲硫氨酸氧化和 N-乙酰化, 肽段搜库假阳性率 (false positive rate, FDR) 设置为 1% 。定量分析通过 Maxquant 软件进行。参数设定: 最多漏切位点 2 个, 固

定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化, 可变修饰为甲硫氨酸氧化和N-乙酰化, 先驱离子质量偏差为20, 碎片离子质量偏差为0.02 Da, 可检测到的肽段最小值为7个氨基酸, 肽段搜库假阳性率FDA为1%。

生物信息学分析 将差异倍数 (fold change) > 1.20 和 $P < 0.05$ 的蛋白作为差异蛋白, 基于GO (<http://www.geneontology.org/>) 进行蛋白本体分析, 基于KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 进行蛋白生物功能富集。运用STRING (<https://string-db.org/>) 分析蛋白质之间的相互作用。

统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析 (one way ANOVA) 方法, 方差齐性应用 student-Newman-Keuls 检验, 方差不齐采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结果

1 生化指标的变化

本研究发现, 假手术组和模型组小型猪所有指标

在0周时均无差异, 在造模结束 (即10周) 显示出了一定的差异。与假手术组比较, 模型组血清TC、LDL-C、VLDL-C及CK、CK-MB水平均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。与模型组0周相比, 模型组在造模10周后TC、LDL-C、VLDL-C、TG及CK、CK-MB水平均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.001$) (图1)。

2 病理切片观察

HE染色可见假手术组心肌细胞形态正常, 分布均匀, 心肌纤维排列整齐, 横纹清晰。模型组心肌细胞肥大, 排列紊乱、心肌细胞核有增大融合现象, 间质水肿。心肌纤维排列无序, 可见断裂、肌纤维束增宽现象。

Masson染色可见假手术组心肌细胞呈红色, 心肌细胞排列整齐, 结构清晰, 细胞间无明显胶原纤维沉积; 相比于假手术组, 模型组胶原呈蓝色, 可见心肌细胞及间质有大量胶原纤维增生, 心肌细胞发生严重坏死, 结构模糊, 可见炎性细胞浸润 (图2)。

3 心肌梗死面积观察

实验10周时, 假手术组未见明显心肌梗死区域。

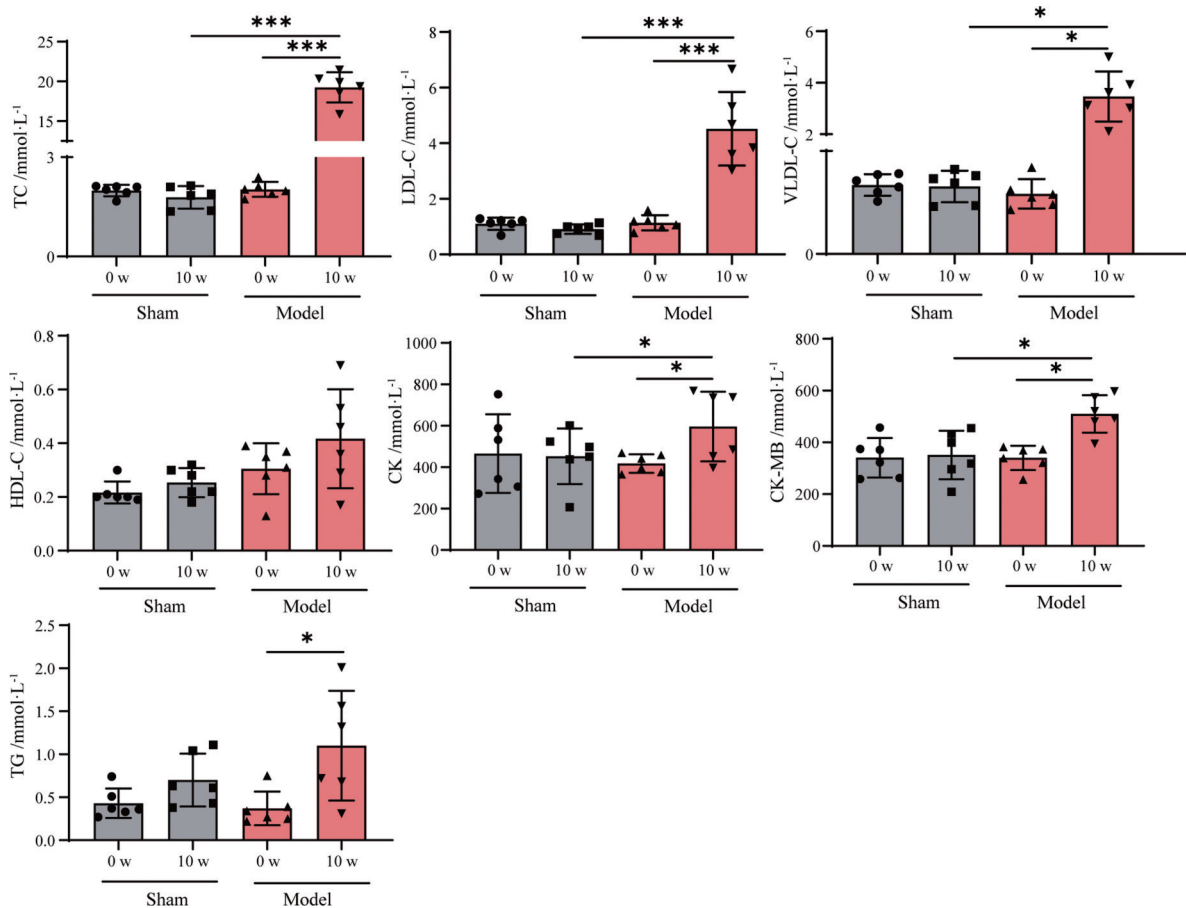


Figure 1 Biochemical index results of coronary heart disease of phlegm-stasis cementation syndrome in mini-swine. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Sham: Sham operation group; Model: Model group; TC: Total cholesterol; LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: Very low density lipoprotein; HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; CK: Creatine kinase; CK-MB: Creatine kinase-MB; TG: Triglyceride

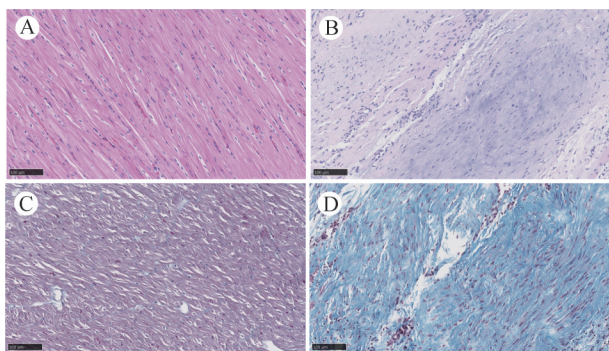


Figure 2 Myocardial histopathology. A: HE Sham operation group; B: HE model group; C: Masson sham operation group; D: Masson model group. (HE: $\times 200$; Masson: $\times 200$)

模型组可见较明显心肌梗死区域, 心室损伤部位心肌厚度变薄趋势 (图3)。

4 血小板蛋白质组学结果

4.1 定量蛋白质组学分析 蛋白质组学分析显示, 两组血小板样本中有 2 024 个非冗余蛋白。样本之间的 PCA 和相关性分析如图 4 所示, 由图可以看出, 两组样本呈现两组聚类, 同组样本相关性较大, 而两组之间的相关系数较低, 表明两组间的样本相对独立, 结果表明



Figure 3 Myocardial infarction area of sham group (A) and model group (B)

本研究的痰瘀互结证冠心病小型猪模型造模成功, 与假手术组呈现明显不同的聚类。

4.2 差异蛋白的筛选 为进一步探索小型猪痰瘀互结证冠心病的发病机制, 使用 $P < 0.05$ 和 $\text{fold change} > 1.2$ 作为分析标准。与假手术组比较, 在痰瘀互结证冠心病模型组中共鉴定出 34 个差异表达蛋白, 其中 26 个上调蛋白, 8 个下调蛋白。根据显著性水平和差异倍数进一步绘制火山图 (图 5A), 红点代表上调的蛋白质, 蓝点代表下调的蛋白质, 灰点代表非差异表达的蛋白质。差异蛋白热图显示, 相比于假手术组, 痰瘀互结证冠心病模型组差异蛋白在两组中的含量存在明显差异, 并且呈现明显聚类现象。

4.3 差异蛋白生物功能分析

使用 DAVID 分类系统

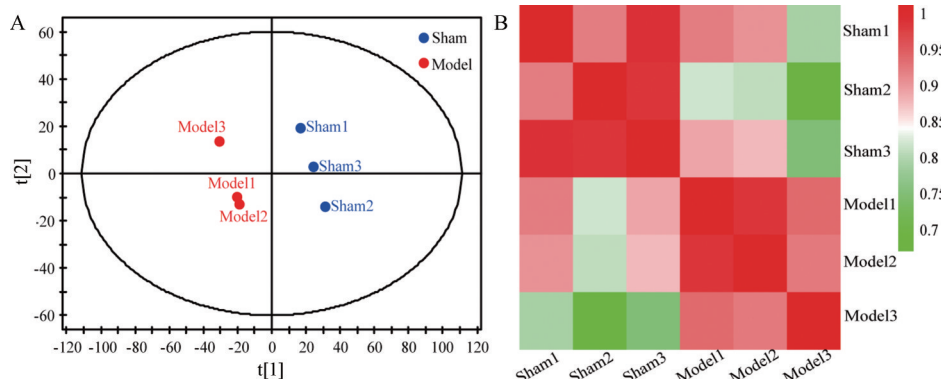


Figure 4 PCA analysis (A) and correlation analysis (B) of platelet proteomics of coronary heart disease of phlegm-stasis cementation syndrome in mini-swine

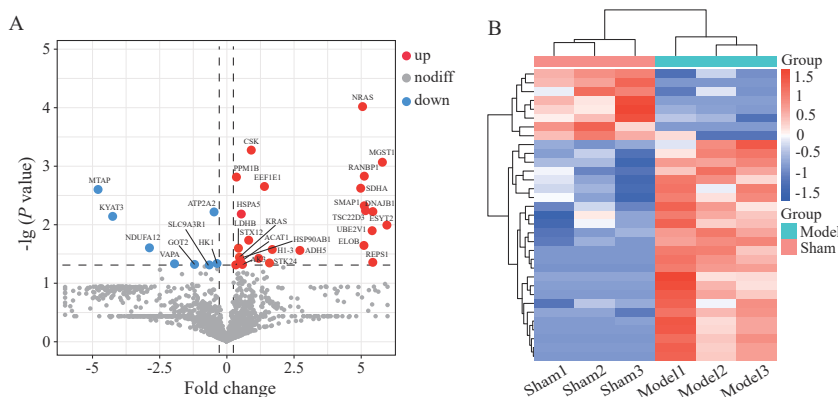


Figure 5 Differential expression protein volcano diagram (A) and heap-map analysis (B) of platelet proteomics of coronary heart disease of phlegm-stasis cementation syndrome in mini-swine

(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) 对所有差异蛋白进行GO分析。GO涵盖3个领域: 生物过程、分子功能和细胞成分, 分析结果如图6。坐标标尺上包含圆圈外的基因数; 第二个圆圈是背景基因的数量和 P 值。基因越多, 条形越长。颜色越深, P 值越小; 第三圈是每个分类的基因总数; 第四个圆圈代表每个类别的丰富因子^[13]。细胞成分富集项表明, 大部分差异表达蛋白位于线粒体 (GO: 0005739)、线粒体内膜 (GO: 0005743)、胞浆 (GO:0005829) 等。GO分析发现, 差异表达蛋白的分子功能主要包括参与蛋白质折叠的蛋白质结合 (GO:0044183)、ATP结合 (GO:0005524)、蛋白质结合 (GO:0005515) 等。生物学过程主要涉及谷胱甘肽转运 (GO:0034635)、白细胞介素-4的细胞反应 (GO:0071353)、Ras蛋白信号转导 (GO:0007265)、细胞增殖的负调节 (GO:0008285) 等。

4.4 差异蛋白的通路分析 使用DAVID分类系统 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) 和KEGG数据库进行了途径富集分析。选取前10个相关通路作图, 如图7A所示, 差异蛋白与各种生物学途径相关, 包括半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丙酮酸代谢、脂质与动脉粥样硬化、HIF-1信号通路、雌激素信号通路和胰岛素信号通

路等途径。

4.5 PPI蛋白互作分析 结合差异蛋白的通路分析及GO分析结果, 运用STRING (<https://string-db.org/>) 分析差异蛋白之间的相互作用, 构建蛋白质互作网络如图7B, 发现热休克蛋白90 α 家族B类成员1 (heat shock protein 90 alpha family class b member 1, HSP90AB1)、Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (Kirsten ratsarcoma viral oncogene homolog, KRAS)、琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDHA)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, GOT2)、乳酸脱氢酶B (lactate dehydrogenase B, LDHB)、Kynurenine氨基转移酶3 (kynurenine aminotransferase 3, KYAT3)、乙醇脱氢酶5 (alcohol dehydrogenase 5, ADH5)、神经母细胞瘤病毒癌基因RAS同系物 (neuroblastoma ratsarcoma viral oncogene homolog, NRAS) 位于该网络的中心, 在与其他蛋白质相互作用时起到中枢作用。研究提示, 以上中心蛋白可能为痰瘀互结证冠心病的发病机制中的关键蛋白。

4.6 差异蛋白和通路关联网络分析 将KEGG通路富集结果和PPI蛋白互作网络中关键蛋白整合分析, 发现HSP90AB1、KRAS、GOT2、LDHB、KYAT3、

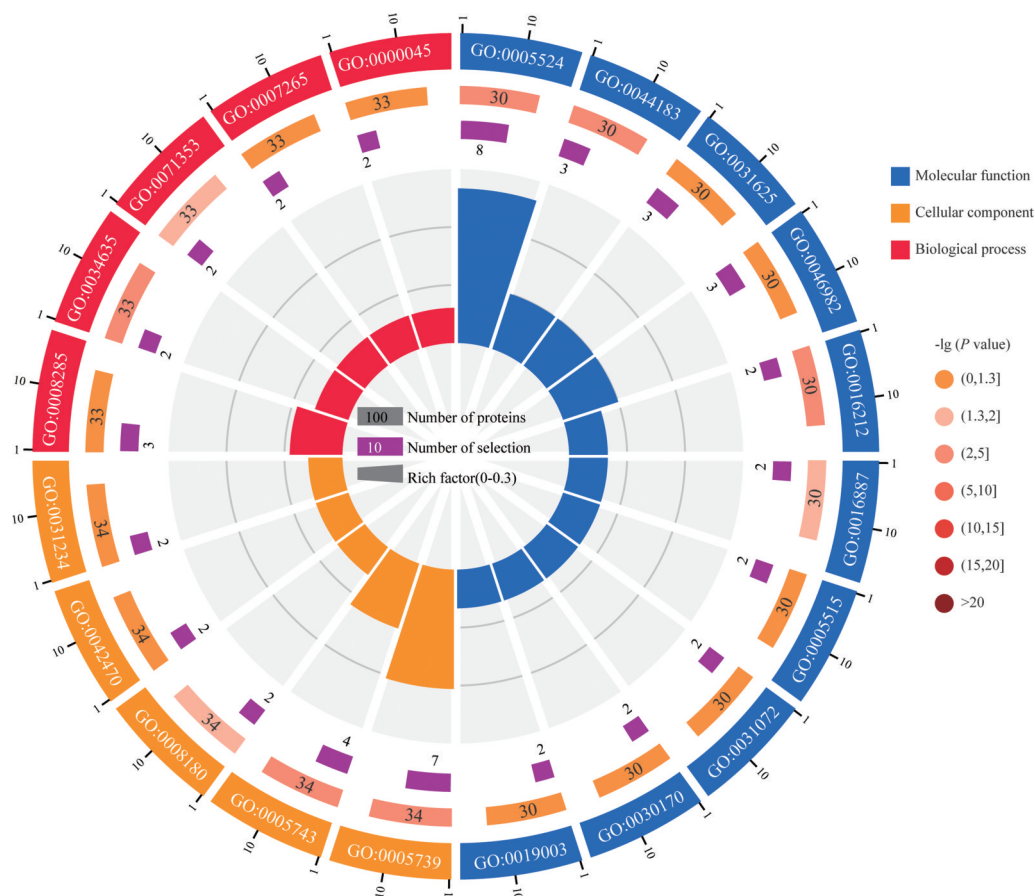


Figure 6 GO analysis of differential expression protein of coronary heart disease of phlegm-stasis cementation syndrome in mini-swine

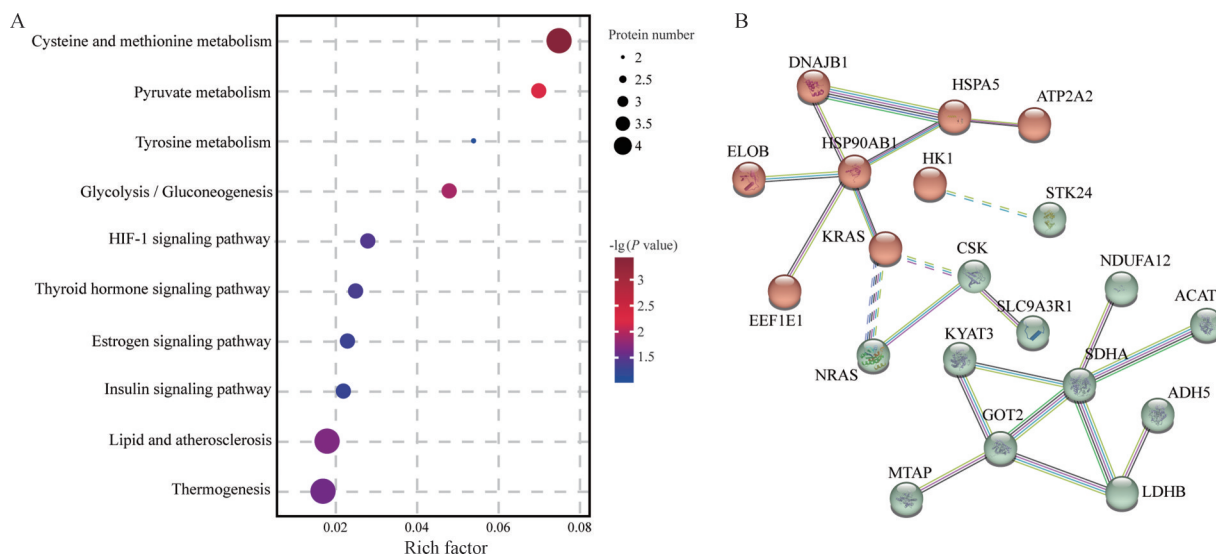


Figure 7 KEGG pathway enrichment (A) and differential expression protein PPI network (B) of coronary heart disease of phlegm-stasis cementation syndrome in mini-swine

ADH5、NRAS 蛋白质相互协调参与痰瘀互结证冠心病的多种生物过程, 包括半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生、HIF-1 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、甲状腺激素信号通路和胰岛素信号通路等通路, 这些差异蛋白的功能部分主要与脂质代谢、氨基酸代谢、能量代谢、免疫调节等作用相关 (图8)。

被证明不仅与血小板结构、血管内皮细胞功能、动脉粥样硬化危险因素及冠状动脉狭窄程度密切相关^[14], 在基因层面也存在许多调控靶点和调控网络^[15,16]。本研究采用病证结合动物模型痰瘀互结证冠心病小型猪作为研究对象, 研究发现模型组在造模后出现血脂升高、凝血功能异常及心肌缺血等病理变化特征。为进一步探究其发病机制, 通过非标记定量蛋白质组学技术比较假手术组和模型组血小板蛋白的表达水平。经过筛选和鉴定, 最终获得了 34 个差异表达蛋白, 大部分差

讨论

血瘀证是证候生物学研究的前沿领域, 血瘀证已

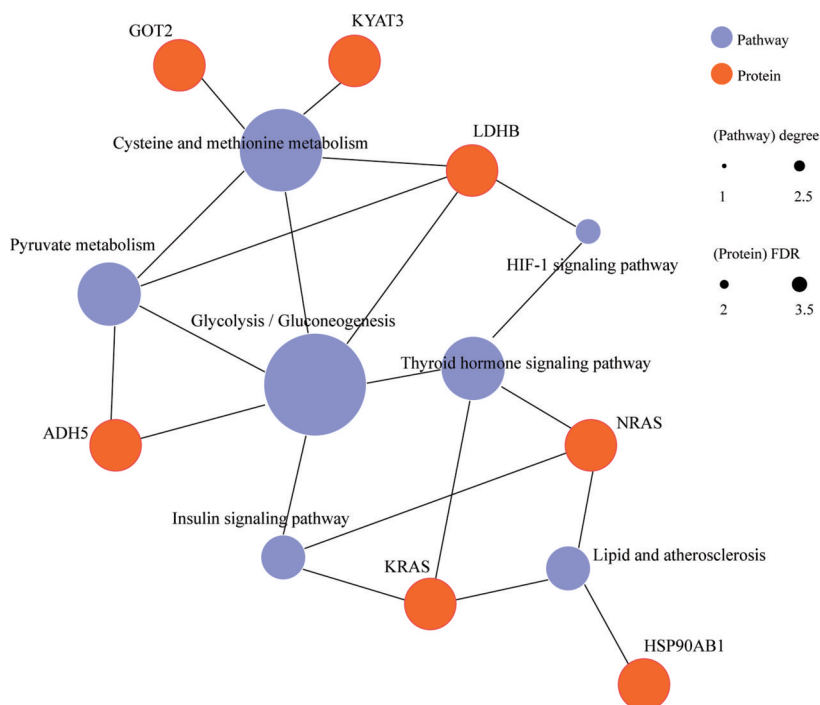


Figure 8 Correlation network analysis of differentially expressed proteins and pathways of coronary heart disease of phlegm-stasis cementation syndrome in mini-swine

异表达蛋白位于线粒体、线粒体内膜、胞浆等。差异蛋白的功能部分主要与脂质代谢、氨基酸代谢、能量代谢、免疫调节等作用相关,主要参与糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、脂质与动脉粥样硬化、Ras 蛋白信号转导等。研究发现,LDHB、ADH5、NRAS 和 KRAS 为关键蛋白,与其他蛋白质相互作用时起中枢作用,参与痰瘀互结证冠心病的多种生物过程。

LDHB 可同时参与半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生、HIF-1 信号通路。机体在缺氧条件下蛋白质功能产能不足,可通过糖酵解途径利用葡萄糖向乳酸转化获得能量,从而补充心肌能量的不足^[17]。LDHB 是糖酵解过程中重要的代谢酶之一,可催化乳酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 转化为丙酮酸、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和氢离子。丙酮酸是丙氨酸发生氨基化的底物,参与三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环的回补反应,维持 TCA 循环的进行^[18]。动脉粥样硬化引起心肌缺氧,使心肌能量发生代谢障碍, TCA 循环异常则是能量代谢紊乱的标志。本研究痰瘀互结证冠心病模型组中 LDHB 含量增加,表明其可能通过促进丙酮酸代谢和糖酵解过程产生能量以供应心肌^[19]。蛋氨酸代谢途径作为谷胱甘肽合成的主要补充途径,当其发生紊乱时将影响谷胱甘肽合成的主要原料半胱氨酸的含量,导致机体氧化还原失衡,使其更易受到自由基的攻击,造成损伤。

ADH5 主要参与丙酮酸代谢和糖酵解/糖异生,其大量存在于人和动物肝脏、植物及微生物细胞之中,是一种含锌金属酶,具有广泛的底物特异性,可催化谷胱甘肽的氧化。早期研究发现,胞质和线粒体叶酸通过 ADH5 介导单碳代谢和甲酸生成。ADH5 将 S-羟甲基谷胱甘肽 (S-hydroxymethylglutathione, 一种由甲醛和谷胱甘肽自发形成的分子) 氧化为 S-甲酰基谷胱甘氨酸 (S-formylglutathione), 进而转化为甲酸盐^[20]。癌调蛋白的生理功能不仅参与嘌呤和胸腺嘧啶核苷酸的生物合成并影响 DNA 的复制及修复,还为核酸、蛋白质和脂质的甲基化修饰提供原料^[21]。

GO 分析结果显示,差异蛋白参与 Ras 蛋白信号转导生物过程,其中 NRAS 和 KRAS 为不同突变亚型的 Ras 蛋白, Ras 蛋白是由 Ras 原癌基因编码而成,含有 189 个氨基酸,位于细胞膜内侧与鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate, GTP) 结合的球蛋白。Ras 蛋白作为分子开关,主要通过 GTP/鸟苷二磷酸 (guanosine diphosphate, GDP) 结合来调控信号通路,与 GTP 结合时激活下游通路,与 GDP 结合时则抑制下游通路^[22]。两种状态的转换依靠 Ras-GTP 酶活化蛋白和鸟嘌呤核苷酸

交换因子 (guanine nucleotide-exchange factor, GEF) 激活,并被 GTP 酶活化蛋白 (GTPase-activating protein, GAP) 灭活^[23]。RAS 信号传导还可以影响细胞内氧化还原平衡,即活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和抗氧化剂之间的平衡,通过 ROS 产生和 ROS 清除程序之间的平衡微调氧化还原对于机体稳态至关重要。Ras 是 MAPK 信号转导中的一个关键酶, Ras 处于其关键调控点,会导致炎症反应的发生发展, Ras 可以调控 MAPK 信号通路促进炎症因子的释放,导致机体一系列炎症反应的发生,其可作为治疗药物的重要靶标进行后续研究。NRAS 和 KRAS 可同时参与脂质与动脉粥样硬化、甲状腺激素信号通路和胰岛素信号通路。研究表明, KRAS 通过上调长链酰基辅酶 A 合成酶 3 (ACSL3) 来促进细胞中脂肪酸的细胞摄取、积累和 β -氧化,这与抗氧化剂的产生有关,因为脂肪酸氧化产生乙酰辅酶 A,乙酰辅酶 A 被代谢产生 NADPH,特别是在葡萄糖稀缺的情况下^[24]。因此, KRAS 驱动的脂肪酸氧化可能支持 NADPH 的产生并有助于细胞内抗氧化能力^[25]。另外, KRAS 也可以刺激 PI3K, 激活 mTOR 和 AKT 信号通路,其在细胞生长、分化、增殖的调控等方面具有重要作用^[26,27],但具体机制还需要进一步验证。

综上所述,此次研究通过运用蛋白质组学方法和信息分析技术发现 LDHB、ADH5、NRAS 和 KRAS 为痰瘀互结证冠心病生物过程中的关键蛋白,主要参与糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、脂质与动脉粥样硬化、Ras 蛋白信号转导等生物过程,对后续临床治疗和药物开发具有重要的指导意义。然而,本研究仅通过蛋白质组学的分析结果较为片面,本课题组后续将结合转录组学、代谢组学等进一步筛选痰瘀互结证冠心病的差异蛋白,以明确活血化瘀药物作用靶点为导向,系统开展实验揭示痰瘀互结证冠心病的科学内涵。

作者贡献: 李瑛为实验主要完成者及文章主要撰写者;李磊负责部分实验指导及提供修改意见;王奥奥、王紫艳、张国媛负责部分数据采集与处理分析工作;孟红旭、史跃、马彦雷负责部分实验操作;林力负责部分实验指导及提供修改意见;刘建勋提出本文研究思路并指导文章撰写与修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Yang G, He HQ, Dong Y, et al. Histological research progress and thinking on phlegm blood stasis syndrome of coronary heart disease [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2021, 62: 189-194.
- [2] Spertus JA, Jones P, McDonell M, et al. Health status predicts long term outcome in outpatients with coronary disease [J].

- Circulation, 2002, 106: 43-49.
- [3] Zhou YW, Xu PC, Cheng Y. Basic pathogenesis of asthenia of healthy energy and blood stasis in liver cirrhosis studied by serum proteomics [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2011, 31: 595-602.
- [4] Wang WQ. Research on the Formation Mechanism of Qi Stagnation and Blood Stasis Based on Qi Movement (基于气的运动对气滞血瘀形成机制的研究) [D]. Fujian: Fujian University of Chinese Medicine, 2010.
- [5] Wang J, Zhang Y, Liu YM, et al. Uncovering the protective mechanism of Huoxue Anxin Recipe against coronary heart disease by network analysis and experimental validation [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109655.
- [6] Liu Y, Wei H. Research status and trend of animal models of cardiovascular diseases in miniature swine [J]. Lab Anim Compar Med (实验动物与比较医学), 2011, 31: 322-329.
- [7] Li L, Lin CG, Ren JX, et al. Study on the diagnosis of coronary heart disease syndrome of phlegm and blood stasis syndrome in miniature swine [J]. World J Tradit Chin Med (世界中医药), 2013, 10: 1132-1136.
- [8] Liu JX, Miao L, Li XZ, et al. Serum proteomics of coronary heart disease model with phlegm and blood stasis syndrome in Chinese miniature swine [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2010, 26: 73-76.
- [9] Orbe J, Rodriguez JA, Calvo A, et al. Vitamins C and E attenuate plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in a hypercholesterolemic porcine model of angioplasty [J]. Cardio Res, 2001, 49: 484-492.
- [10] Li L, Liu JX, Ren JX, et al. Study on the formula and syndrome correspondence of coronary heart disease in miniature swine with phlegm and blood stasis syndrome [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1698-1704.
- [11] Li XZ, Liu JX, Ren JX, et al. Establishment of a mini swine model of coronary heart disease with phlegm and blood stasis syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2009, 29: 228-232.
- [12] Sun M, Li Y, Hu G, et al. Platelets lipidomics study of blood stasis rat model by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2022, 45: 4407-4415.
- [13] Qie C, Jiang J, Liu W, et al. Single-cell RNA-Seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of skin macrophages in *Vsirr*^{-/-} murine psoriasis [J]. Theranostics, 2020, 10: 10483-10497.
- [14] Tang JY, Wang Z, Shen CT. Modern Research Theory and Practice of TCM syndromes [S]. Beijing: People's Health Publishing House (人民卫生出版社), 2020: 290-295.
- [15] Liu LC, He QY, Chen HW, et al. Advances in genomics of coronary heart disease with blood stasis syndrome [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med (世界科学技术-中医药现代化), 2020, 22: 3810-3818.
- [16] Dong Y, Chen HW, Liu YM, et al. Clinical study on Xuesaitong soft capsule intervention of lncR CTB114C7.4-miR3656-BCL2A1 regulatory network in patients with coronary heart disease and blood stasis syndrome [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med (世界科学技术-中医药现代化), 2020, 22: 3846-3852.
- [17] Li J, Zhong SJ, Li L, et al. Study on the biological basis of rat model of coronary heart disease with blood stasis syndrome based on urine metabolomics [J]. Chin J Tradit Chin Med Infor (中国中医药信息杂志), 2021, 28: 63-68.
- [18] Wang QL, Chen L. The relationship between three kinds of ketoacids and metabolism of four kinds of substances [J]. Chem Life (生命的化学), 2019, 39: 204-210.
- [19] Shi L. SIRT5 Regulates Autophagy and Proliferation of Colorectal Cancer Cells by Deacetylation Modified LDHB (SIRT5 通过乙酰化修饰 LDHB 调节结肠癌细胞自噬和增殖) [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2019.
- [20] Duester G, Farrés J, Felder MR, et al. Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family [J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58: 389-395.
- [21] Bae S, Chon J, Field MS, et al. Alcohol dehydrogenase 5 is a source of formate for *de novo* purine biosynthesis in HepG2 cells [J]. J Nutr, 2017, 147: 499-505.
- [22] Gimble RC, Wang X. RAS: striking at the core of the oncogenic circuitry [J]. Front Oncol, 2019, 9: 965.
- [23] Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11: 761-774.
- [24] Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight [J]. Cancer, 2013, 13: 227-232.
- [25] Lim JKM, Leprivier G. The impact of oncogenic RAS on redox balance and implications for cancer development [J]. Cell Death Dis, 2019, 10: 955.
- [26] Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, et al. The PI3K pathway in human disease [J]. Cell, 2017, 170: 605-635.
- [27] Liu P, Wang Y, Li X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy [J]. Acta Pharm Sin B, 2019, 9: 871-879.