

颈动脉粥样硬化斑块的非标记定量蛋白质组学研究

邹璇¹, 王辰², 刘一静³, 施铭岗⁴, 安中平¹, 黄慧玲², 周官恩¹

摘要: **目的** 建立颈动脉粥样硬化不稳定斑块和稳定斑块的表达图谱,进行差异蛋白质组学分析,鉴定出差异表达蛋白,寻找对颈动脉粥样硬化不稳定斑块诊断有特异性和敏感性的生物学标志物。**方法** 依据颈动脉B超检查结果初步分为颈动脉不稳定斑块组、颈动脉稳定斑块组。募集经颈部血管超声检查发现颈动脉狭窄,且做颈动脉内膜剥脱术的缺血性卒中患者20例,分为不稳定斑块组10例和稳定斑块组10例。利用SDS-PAGE酶解后反相色谱Orbitrap Fusion进行蛋白质分析,并质谱数据处理,检索软件,产生的质谱原始文件采用MaxQuant软件处理。**结果** 运用蛋白质组学技术鉴定出差异常表达蛋白1240个,在不稳定斑块中,表达下调的蛋白有432个,表达上调的有808个。COG分析显示主要与信号转导、脂质转运和代谢、细胞翻译后修饰、细胞骨架、蛋白酶解等方面相关。**结论** 颈动脉粥样硬化不稳定斑块和稳定斑块的表达图谱是有差别的,进行差异蛋白质组学分析,鉴定出差异常表达蛋白,为进一步筛选特异性功能相关蛋白和干预靶位奠定了基础。

关键词: 动脉粥样硬化; 斑块; 蛋白质组学

中图分类号:R743.1

文献标识码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Proteomics analysis of distinct proteins in carotid atherosclerotic plaques ZOU Xuan, WANG Chen, LIU Yijing, et al. (Department of Neurology, Huanhu Hospital Affiliated to Nankai University, Tianjin 300350, China)

Abstract: **Objective** We used proteomics technologies in an attempt to differentiate and identify histological proteins that were associated with carotid atherosclerotic plaques and further understanding of the pathogenesis. **Methods** Carotid atherosclerotic plaques were obtained from the patients who undergo carotid endarterectomy in the Tianjin Huanhu Hospital. Plaques divided into two groups: stable group and unstable group. We comparatively analyzed the proteome of 10 unstable plaques and 10 stable plaques. The differentially expressed proteins were visualized by two dimensional electrophoresis (2DE) and were analyzed by a coupled label-free and mass spectrometry approach. The protein identification program was used to search the Uniprot. **Results** A total of 1240 different proteins were identified by label-free and mass spectrometry. A total of 808 proteins were upregulated, and 432 proteins were downregulated in unstable plaques group compared to stable plaques group. They are referring to signal transduction, lipid transport and metabolism, posttranslational modification, cytoskeleton and Proteolysis. **Conclusion** Proteomics analysis can be used to investigated differentially expressed proteins. However, Additional confirmatory studies are required to elucidated their role in the atherosclerotic process.

Key words: Atherosclerosis; Plaque; Proteomics

颈动脉粥样硬化是缺血性脑卒中的危险因素之一。动脉粥样硬化研究表明,不稳定斑块即使不引起严重的动脉狭窄,也会造成不同程度的缺血性脑卒中。与动脉狭窄比较,斑块本身成分及稳定性与缺血性脑血管事件密切相关,因此,不稳定性斑块检测、影响因素及治疗方法的选择具有重要意义^[1]。由于受手术标本的限制,有关颈动脉粥样硬化斑块的蛋白质组学研究尚少。本研究试图建立颈动脉粥样硬化不稳定斑块和稳定斑块的表达图谱,进行差异蛋白质组学分析,鉴定出差异常表达蛋白,寻找对颈动脉粥样硬化不稳定斑块诊断有特异性和敏感性的生物学标志物。

1 资料与方法

1.1 研究对象与分组

1.1.1 纳入标准 ①临床诊断明确的新发急性缺血性卒中患者;②年龄>18岁(本组均为>60岁的患者),汉族;③发病距就诊日期在7d内;④完成颅脑磁共振弥散加权成像(diffusion weighted imaging, DWI)检查;⑤实验方案通过我院伦理委员会批准,全部研究对象均签署书面知情同意书。

收稿日期:2020-07-10;修订日期:2020-09-10

基金项目:天津市卫生计生委科技基金(No. 15KG109)

作者单位:(1.南开大学附属环湖医院神经内科,天津300350;2.南开大学附属环湖医院,天津市神经外科研究所,天津300350;3.天津医科大学研究生院,天津300070;4.南开大学附属环湖医院神经外科,天津300350)

通讯作者:周官恩, E-mail: tjzge@163.com

1.1.2 排除标准 存在脑供血动脉粥样硬化的患者出现心源性脑栓塞;存在严重心、肝、肾功能障碍的患者;风湿性疾病、慢性炎症性疾病以及结核、恶性肿瘤、妊娠者。患者或家属不同意参加此项研究。

1.1.3 分组 依据颈动脉B超检查结果分为颈动脉不稳定斑块组、颈动脉稳定斑块组。颈部血管超声检查发现颈动脉狭窄,且做颈动脉内膜剥脱术的缺血性卒中患者20例。收集所有入组患者的临床资料,具体包括性别、年龄、既往疾病、吸烟史、饮酒史、白蛋白、总蛋白、空腹血糖、甘油三脂、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、尿酸。

1.2 颈内动脉多普勒超声检查 颈动脉超声检查由超声诊断科从事血管超声的两名高年资医师独立操作。取其结果一致的病例入组。将所有大动脉型粥样硬化型脑梗死患者于入院2d内完善颈动脉多普勒超声检查,当一侧颈动脉内膜中层厚度 ≥ 1.2 mm时提示斑块形成,将斑块分为稳定斑块和不稳定斑块。稳定斑块(硬斑块)为超声提示斑块强回声伴声影、表面光滑、质地均匀;不稳定斑块(软斑块)为超声提示低回声或回声强弱不均、表面高低不平、质地不均匀等。混合型斑块(既有稳定斑块又有不稳定斑块)归类为不稳定斑块组^[2,3]。

1.3 标本的采集 标本采集颈动脉内膜剥脱术患者术后取得的斑块直接放入冻存管中, -80 °C保存。

1.4 试验方法

1.4.1 样本蛋白的提取 取样品加入适量 lysis buffer(7 M 尿素,2 M 硫脲,0.1% CHAPS),涡旋混匀,(裂解液:蛋白酶抑制剂 50:1 加入蛋白酶抑制剂)组织破碎仪 70 Hz,60 s,重复3次。细胞样本加入适量 lysis buffer(7 M 尿素,2 M 硫脲,0.1% CHAPS),涡旋混匀,超声 1 s,停 1 s,累计 20 s。14000 r/min,离心 30 min,取上清,分装,留取 5 μ l 定量,其余冻入 -80 °C。

1.4.2 蛋白定量 采用 Bradford 法测定提取的蛋白浓度。先将样本用 lysis buffer 进行一定倍数稀释使其终浓度落在标准曲线范围内,稀释好的样本和标准品(将 BSA 用 lysis buffer 溶解成系列浓度的标准蛋白)各取 10 μ l 分别和 300 μ l 蛋白定量染料避光反应 20 min,用酶标仪同时测定标准品和样本在 595 nm 下的吸光值,根据标准品每管吸光值和浓度的关系绘制标准曲线,然后计算样本浓度。

1.4.3 利用 SDS-PAGE 酶解 用手术刀将每块胶切成 1 mm³ 小块儿,置于 1.5 ml Eppendorf 管

中;用 200 μ l 双蒸水洗 2 次,每次 10 min;加考染脱色液[50 mmol/L NH_4HCO_3 与 ACN(1:1)]或银染脱色液 200 μ l { $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(1:1)$ }, 脱色 15 min,双蒸水洗,重复 3 次,直至脱色完全;加 ACN 100 μ l 脱水至胶粒变白,真空抽干 10 min;加 10 mmol/L DTT(25 mmol/L NH_4HCO_3 溶解)200 μ l, 37 °C 水浴 1 h,加 ACN 100 μ l 脱水至胶粒变白;加 55 mmol/L IAA(25 mmol/L NH_4HCO_3 溶解)200 μ l, 置于暗室 30 min,加 ACN 100 μ l 脱水至胶粒变白;依次用下列溶液进行混悬清洗:双蒸水(1 次)、ACN(1 次)、双蒸水(1 次)、ACN(1 次)每次 10 min;将 0.01 μ g/ μ l 胰蛋白酶工作液(酶液用 25 mmol/L NH_4HCO_3 稀释),每管加 100 μ l,稍微离心一下,让酶液与胶粒充分接触,4 °C 放置 30 min。待酶液被胶粒完全吸收,再加 25 mmol/L NH_4HCO_3 100 μ l,37 °C 过夜;次日离心收集酶解上清液,置于另一 Eppendorf 管中;剩余胶粒用抽提缓冲液(5% TFA、95% ddH₂O)1 h,收集酶解上清液,置上一 Eppendorf 管中合并;剩余胶粒再用抽提缓冲液(2.5% TFA、50% ACN、47.5% ddH₂O)1 h,收集酶解上清液,置于一 Eppendorf 管中合并;真空冻干, -20 °C 保存。

1.4.4 反相色谱 OrbitrapFusion 进行蛋白质分析 将冻干样本用 60 μ l 2% 甲醇,0.1% 甲酸复溶。12,000 r/min 离心 10 min,吸取上清上样。每次上样体积 10 μ l,采取夹心法上样,重复 3 次。Loading-Pump 流速 300 nl/min,15 min。分离流速 600 nl/min。

1.4.5 质谱数据处理

1.4.5.1 数据库 数据库的选择是以所需物种、数据库注释完备性及序列可靠性为参考依据的。在选择数据库时,遵循如下原则,若为已经测序生物,直接选用该物种数据库,若为非测序生物,则选择与被测样品最为相关的大类蛋白质组数据库。本次使用数据库:Uniprot-HUMAN(20190420 Download)数据库。

1.4.5.2 检索软件 Label-free 的质谱分析是由 Orbitrap Fusion 型质谱完成,产生的质谱原始文件采用 MaxQuant 软件处理。

2 结果

2.1 不稳定斑块组与稳定斑块组间临床资料比较 10 例不稳定斑块组男性 6 例,女性 4 例;年龄(66.5 \pm 5.5)岁。10 例稳定斑块组男性 5 例,女性 5 例;年龄(64.3 \pm 4.2)岁。单因素分析显示,不稳定斑块组与稳定斑块组间在性别、年龄、糖尿病病史、吸烟史、饮酒史、高密度脂蛋白、白蛋白、总蛋白、

尿酸等方面差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 鉴定结果的总体分析和差异蛋白筛选

2.2.1 全局分析 直接提取 Maxquant 搜索后的结果中各样品的定量值,去除有 0 的结果后,得到 Global 目录下的 proteinGroups_normalize_rm0_heatmap.txt 文件,聚类分析的结果显示不稳定斑块组与稳定斑块组之间蛋白表达存在明显差异(见图 1)。

2.2.2 差异蛋白筛选 定量值在进行中值归一化后得到 proteinGroups_normalize_keep.txt 文件的结果,进一步用 perseuse 归一化后,得到 proteinGroups_normalize_keep_imputation.txt 的结果。由于样品的重复次数大于等于 3 次,因此直接采用 *t*-test 进行差异分析,卡 p value 0.05, Fold change 1.2 倍,得到差异蛋白的分析结果。定出差异表达蛋白 1240 个,在不稳定斑块中,表达下调的蛋白有 432 个,表达上调的有 808 个(见图 2)。

2.2.3 COG 分析 COG (Clusters of Orthologous Groups) 分析是基于 COG 数据库是对基因产物进行同源分类的而建立的,COG 建立了一个识别直系同源基因(指不同物种之间同源的基因,是因为物种分化而逐渐产生差异的)的数据库,通过对多种生物的蛋白质序列大量比较而来的。COG 分析显示差异表达蛋白涉及信号转导、脂质转运和代谢、翻译后修饰、细胞骨架、蛋白酶解等方面(见图 3)。

2.2.4 GO 分析 基因本体 (Gene Ontology, GO) 是描述基因的功能、定位和活动的标准词汇表,具有树形结构,是分子生物学领域应用最广的本体,已经成为生物信息领域中一个极为重要的方法和工具(见图 4)。

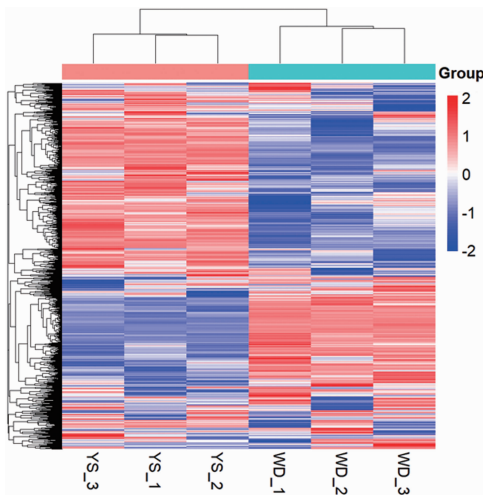


图 1 全局分析聚类热图

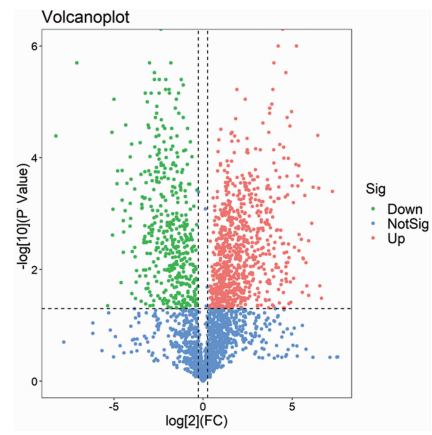


图 2 差异蛋白火山图

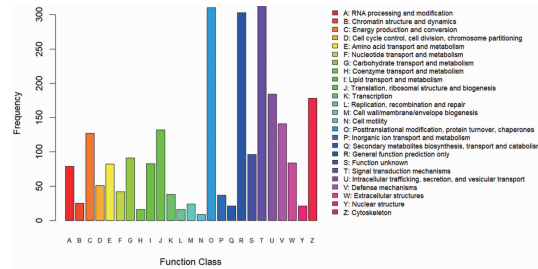


图 3 COG 功能分类统计图

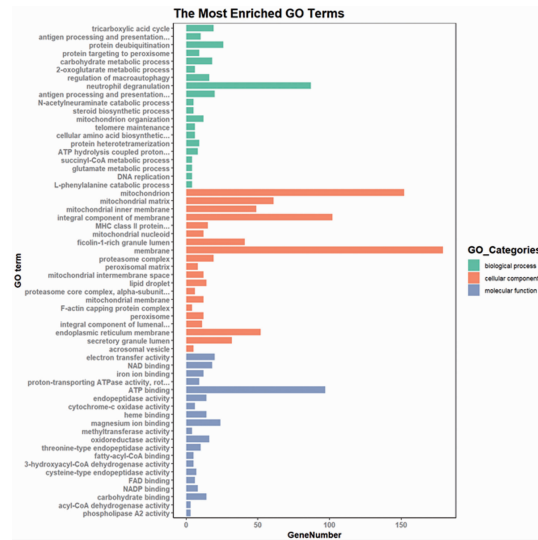


图 4 细胞组分富集度分析

3 讨论

蛋白质组 (Proteome) 的概念由澳大利亚学者 Wilkins 和 Willian 于 1994 年提出,指由一个基因组 genome 或一个细胞、组织表达的所有 protein,也可以说是指细胞或组织或机体全部蛋白质的存在及其活动方式^[3]。蛋白质组学旨在阐明生物体全部蛋白质的表达模式及功能模式。蛋白质组技术的出现是生命科学领域的一个巨大进步。蛋白质组学被认

为是后基因组研究中的最主要部分。蛋白质组学作为一门系统的高通量差异蛋白筛查技术,在疾病的发病机制、标志物筛选中发挥着越来越重要的作用。非标记定量蛋白质组学近年来成为重要的质谱定量方法^[3,4],按照其原理分,主要有两种。其中 spectrum counts 类的非标记定量方法,发展比较早,也形成了多种算法进行定量,但是主要的原理都是根据 MS2 的鉴定结果作为定量的基础,各种方法的差别在于后期算法在大规模数据上的修正。第二种非标记定量方法的原理是以 MS1 为基础,计算每个肽段信号在 LCMS 质谱上的积分,这个也是本研究所采用的 Maxquant 算法的原理。Label free (LFQ) 算法,简单的来说,首先是对每个 LCMS 数据中的肽段信号进行识别并定量,然后使用内置的 Andromeda 算法对所有肽段信号的 MS2 进行数据库检索,完成定性工作,最后整合所有的定性定量数据,完成整个定量蛋白质组学数据工作^[5]。

Donners 等选择动脉粥样硬化斑块稳定型和伴血栓斑块型,应用二维凝胶电泳和质谱技术,结果显示 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶在伴血栓斑块表达,研究者认为 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶在伴血栓斑块病变中表达上调是一种防御机制,能够抑制胶原蛋白酶和弹性蛋白酶活性,可能提高斑块的纤维化^[6]。Part 等利用 2DE 对颈动脉粥样硬化斑块核心区和周围正常区组织进行蛋白质组学研究。鉴定出 21 种差异蛋白,其中 hsp27 被验证并认为是潜在的动脉粥样硬化生物标志物^[7]。Bagnato 等利用蛋白质组学研究 35 个冠状动脉粥样硬化斑块样本。样本有石蜡、冰冻组织和多聚甲醛固定标本。从石蜡包埋组织可以鉴定 225 种蛋白,从冰冻组织中却可以鉴定出 558 种蛋白。而且他们对冠状动脉血管壁层进行了激光分割,通过 LC-MS/MS 分析,共鉴定出 806 种蛋白。并确认了 4 种在动脉粥样硬化疾病进展中发挥作用重要蛋白,包括:转化生长因子 β (TGF β)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、血小板衍生因子 β (PDGF β) 和基质细胞源性因子 1 α (SDF 1 α)^[8]。

本实验采用 Label Free 非标记定量蛋白质组学对颈动脉粥样硬化稳定斑块和不稳定斑块进行蛋白质组学差异比较,鉴定出差异表达蛋白 1240 个,在不稳定斑块中,表达下调的蛋白有 432 个,表达上调的有 808 个。并运用 COG 分析显示差异表达蛋白

涉及信号转导、脂质转运和代谢、翻译后修饰、细胞内转运、细胞骨架、蛋白酶解等方面。通过比较 Fold change 值,得出 Fold change 值大的差异蛋白为溶酶体膜蛋白 2,酰基丙酮酸酶 FAHD1,丙酮酸脱氢酶复合物的乙酰转移酶组分,三激酶/FMN 环化酶,聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1,复制蛋白 A 70 kDa DNA 结合亚单位,HLA I 类组织相容性抗原 B-81 α 链,蛋白质精氨酸 N-甲基转移酶 1,二氢嘧啶酶相关蛋白 3,热休克蛋白 75。

颈动脉粥样硬化斑块形成是一种涉及多种蛋白、细胞和组织异常的复杂疾病病理过程。虽然近年来国内外学者对动脉粥样硬化进行了广泛的多学科蛋白质组学研究,但还有许多问题需要做更深入的探讨,如组织分离技术还是不够精细;鉴定出动脉粥样硬化差异蛋白敏感性和特异性不高;一些作用不明的蛋白在不稳定斑块和稳定斑块之间存在明显差异^[9]。本研究标本量较少,对差异蛋白未在斑块组织进行免疫组织化学验证观察,需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘国荣,姚林,王大力. 颈动脉粥样硬化斑块易损性的临床研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2012,14(7):778-780.
- [2] 孙晓峰,李妍,白洋,等. 超声造影评价颈动脉粥样硬化斑块稳定性价值[J]. 中馈与神经疾病杂志,2013,30(10):924-927.
- [3] 高晓倩,李荔. 超声评估颈动脉粥样硬化斑块稳定性的方法[J]. 中华医学超声杂志(电子版),2017,14(9):660-663.
- [4] Mann B, Madera M, Sheng Q, et al. ProteinQuant Suite: a bundle of automated software tools for label-free quantitative proteomics[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(23):3823-3834.
- [5] Levin Y, Schwarz E, Wang L, et al. Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics for large-scale biomarker discovery in complex samples[J]. J Sep Sci, 2007, 30(14):2198-2203.
- [6] Donners MM, Verluyten MJ, Bouwman FG, et al. Proteomic analysis of differential protein expression in human atherosclerotic plaque progression[J]. J Pathol, 2005, 206(1):39-45.
- [7] Park HK, Park EC, Bae SW, et al. Expression of heat shock protein 27 in human atherosclerotic plaques and increased plasma level of heat shock protein 27 in patients with acute coronary syndrome[J]. Circulation, 2006, 114(9):886-893.
- [8] Bagnato C, Thumar J, Mayya V, et al. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(6):1088-1102.
- [9] Porcelli B, Ciari I, Felici C, et al. Proteomic analysis of atherosclerotic plaque[J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64(5):369-372.