

## 颅内动脉瘤患者血清蛋白组变化的研究

朱永华<sup>1</sup>, 刘 炜<sup>2</sup>, 石忠松<sup>1</sup>, 刘少军<sup>2</sup>, 李明昌<sup>3</sup>, 黎明涛<sup>2</sup>, 潘伟生<sup>4</sup>, 黄正松<sup>1</sup>

( 中山大学 1. 附属第一医院神经外科, 2. 基础医学院蛋白质组学实验室, 广东 广州 510080; 3. 广州医学院第二附属医院神经外科, 广东 广州 510260; 4. 香港中文大学威尔斯亲王医院外科学系, 香港 610015 )

**摘 要:** 【目的】寻找颅内动脉瘤患者血清中表达差异的蛋白。【方法】采集 12 例血清蛋白样本(颅内动脉瘤患者 4 例、脑挫裂伤患者 4 例及正常成人本 4 例)用不同的 CyDye 染料交叉标记后依次进行双向胶内差异凝胶电泳(2-D DIGE)、图像分析及基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定。【结果】发现胶号为 1119 的蛋白质点,在颅内动脉瘤患者血清中比正常成人组表达达升高 1.82 倍( $P < 0.05$ ),而在脑挫裂伤患者血清中与正常成人的表达差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。该蛋白点经质谱鉴定为结合珠蛋白。【结论】结合珠蛋白在颅内动脉瘤患者血清中表达升高,可能参与了颅内动脉瘤的形成及扩张。

**关键词:** 双向胶内差异凝胶电泳; 图像分析; 血清蛋白; 颅内动脉瘤; 基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱; 结合珠蛋白

中图分类号: R732.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0652-05

### Serum Proteomic Variation Study of Patients with Intracranial Aneurysm

ZHU Yong-hua<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, SHI Zhong-song<sup>1</sup>, LIU Shao-jun<sup>2</sup>, LI Ming-chang<sup>3</sup>, LI Ming-tao<sup>2</sup>, POON WS<sup>4</sup>, HUANG Zheng-song<sup>1</sup>

(1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, 2. The Laboratory of Proteomics, The School of Preclinical Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China; 4. Department of Surgery, Prince of Wales Hospital, Faculty of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong 610015, China)

**Abstract:** 【Objective】 To search differentially expressed proteins in serum of patient with intracranial aneurysm. 【Methods】 12 Serum protein samples were recruited (4 cases of patients with intracranial aneurysm, 4 cases of patients with brain laceration and 4 cases of natural adults), cross-labeled with variant CyDye, and then followed by two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2-D DIGE), image analysis, and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). 【Results】 Spot 1119 was found highly expressed as 1.82 folds in serum of patients with intracranial aneurysm compared with that of normal adults ( $P < 0.05$ ), while the differential expression of this protein between patients with brain laceration and normal adults was of no significance ( $P > 0.05$ ). The protein was identified as haptoglobin using mass spectrometry. 【Conclusion】 Haptoglobin is highly expressed in patients with intracranial aneurysm, and probably contribute to formation and expansion of intracranial aneurysm.

**Key words:** 2-D DIGE; image analysis; serum protein; intracranial aneurysm; MALDI-TOF-MS; haptoglobin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):652-656]

血清中含有丰富的蛋白质成分, 这些蛋白质成分在不同疾病状态下其丰度和结构发生不同的变化。从血清中寻找各种疾病的分子标记物, 对疾病的早期诊断有一定的作用, 已有研究表明一些

蛋白质与特定神经系统疾病密切相关<sup>[1,2]</sup>。对未破裂的动脉瘤患者进行早期诊断和有效治疗可大幅降低患者死亡率<sup>[3]</sup>。然而迄今为止, 脑动脉瘤的病因、病理仍不十分清楚。寻找颅内动脉瘤患者血清

收稿日期: 2006-05-22

基金项目: 中山大学凯思奖学金海外研究资助项目(2005)

作者简介: 朱永华(1971-), 男, 山东菏泽人, 博士生; 黄正松, 教授, 导师, 通讯作者。E-mail: aist306@163.com

中蛋白质表达差异,可以更好理解颅内动脉瘤的病理改变,为将来进一步研究确定其可能的分子标记物铺平道路。双向差异凝胶电泳(two-dimensional difference in-gel electrophoresis, 2-D DIGE)是近年发展起来的一种蛋白质组学新技术,与以往传统双向电泳技术相比,其灵敏性和可重复性大幅度提高,明显减少了所需的凝胶数<sup>[4]</sup>。本研究采用2-D DIGE分析了颅内动脉瘤患者血清,发现结合珠蛋白(haptoglobin, HP)在颅内动脉瘤患者血清中表达升高。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂及仪器

PROT-BA Kit 购自美国 Sigma 公司, 2-D Clean-up Kit 购自瑞典 GE Healthcare 公司, Ettan™ 2-D Quant Kit、Cye 染料、IPG 胶条、Ettan™ DALT 6 电泳仪、Typhoon Imager 9400 成像仪、DeCyder V6.0 软件、MALDI EVALUATION V2.0 软件、Deep Purple 全蛋白染料、Ettan™ 全自动斑点处理工作站、Ettan™MALDI-TOF 质谱仪均购自瑞典 Amersham Bioscience 公司。

### 1.2 实验分组及标本采集

分别收集颅内动脉瘤、脑挫裂伤患者和正常人各 4 例血清标本,颅内动脉瘤及脑挫裂伤患者均系中山大学附属第一医院神经外科及香港中文大学威尔斯亲王医院外科学系 2004 年 7 月至 2005 年 9 月收治的住院病人。其中 4 例脑动脉瘤患者均为破裂性前交通动脉瘤,男性 3 例,女性 1 例,年龄 40~51 岁,平均年龄 45 岁,入院时 Hunt-Hess 分级 ~ 级, Fisher 分级 ~ 级,不伴有其它疾病,后来的血管造影均未发现血管痉挛。在动脉瘤破裂后第 7 天清晨采集血清样本。4 例脑挫裂伤伴蛛网膜下腔出血患者,男性 3 例,女性 1 例,年龄 41~50 岁,平均 44 岁,在伤后第 7 天采集血清样本。4 例正常成人,男性 3 例,女性 1 例,年龄 40~53 岁,平均 45 岁,作为正常对照组。所有病例均来自,采集空腹静脉血 5 mL,室温下放置 20 min, 3 000 ×g 4 离心 10 min, 收上清液存放于 -80 冰箱保存备用。

### 1.3 样品蛋白的处理、纯化和 CyDye 染料标记

使用 PROT-BA Kit 和 2-D Clean-up Kit 试剂盒去除血清样本中的白蛋白、球蛋白等高丰度蛋

白以及盐等杂质。蛋白重悬于由 30 mmol/L Tris、7 mol/L Urea、2 mol/L Thiourea、40 mL/L CHAPS 组成的 pH 8.5 缓冲液中, Ettan™ 2-D Quant Kit 试剂盒测定样本中蛋白浓度,内部标准样本即内标由样品蛋白各取 4.17 μg 混合而成,总量为 50 μg。使用三种特殊的荧光染料 Cy2、Cy3、Cy5 以 50 μg 蛋白:200 pmol 荧光染料的比例进行标记反应(表 1),标记反应在冰浴、无光的条件下进行 30 min,然后加入 20 mmol/L 赖氨酸,继续冰浴 10 min,终止标记反应。

表 1 CyDye 染料标记方法  
Table 1 CyDye labeling scheme

Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	Internal standard (50)	A1 <sup>1)</sup> (50)	C3 <sup>3)</sup> (50)
2	Internal standard (50)	B1 <sup>2)</sup> (50)	A3 <sup>1)</sup> (50)
3	Internal standard (50)	C1 <sup>3)</sup> (50)	B3 <sup>2)</sup> (50)
4	Internal standard (50)	A2 <sup>1)</sup> (50)	C4 <sup>3)</sup> (50)
5	Internal standard (50)	B2 <sup>2)</sup> (50)	A4 <sup>1)</sup> (50)
6	Internal standard (50)	C2 <sup>3)</sup> (50)	B4 <sup>2)</sup> (50)
7	Preparative gel (500)		
8	Preparative gel (500)		

Internal standard was pooled by 4.17 μg of each sample; The data in the brackets were mass of the samples dyed, whose unit was μg. 1) A1, A2, A3, A4 were serum proteins of patients with brain laceration; 2) B1, B2, B3, B4 were serum proteins of patients with intracranial aneurysm; 3) C1, C2, C3, C4 were serum proteins of normal adults

### 1.4 双向差异凝胶电泳

标记好的样品蛋白上样到 PH3-10 的 24 cm 非线性 IPG 胶条,置入 Ettan™ DALT 6 进行第一向电泳,至 6 5000 Vh (伏特小时)为止。按照 Amersham Ettan DIGE 实验操作指南,在第二向电泳 SDS-PAGE 前,对 IPG 胶条依次用二硫苏糖醇 SDS 平衡液(含二硫苏糖醇 10 g/L)、碘乙酰胺 SDS 平衡液(含碘乙酰胺 25 g/L)进行平衡,各 15 min。用 Ettan™ DALT 6 电泳仪进行第二向电泳,将平衡好的 IPG 胶条放置于 125 g/L 的聚丙烯酰胺胶上端,采用恒定功率,首先每张胶 2.5 W,电泳 40 min。然后,恒定功率每张胶 17 W 下电泳,至看到溴酚蓝移至胶外为止。

### 1.5 分析胶的成像及图像分析

上述用 CyDye 染色的凝胶为分析胶。用 Typhoon Imager 9400 成像仪对电泳后的胶板图像

扫描, Cy2、Cy3 以及 Cy5 分别行 488 nm、532 nm、633 nm 波长激光扫描, DeCyder V6.0 软件处理后其图像分别为蓝色、绿色及红色。所有 Cy2 图像设为内标图像, 蛋白质点数最多的胶设为参考胶, 其余的胶与之相匹配, 匹配的点进入下一步分析。以蛋白点体积为指标, 点体积图像小于  $1.0 \times 10^6$  及大于  $1.0 \times 10^8$  (蛋白质点分别为太小及太大) 的蛋白质点不纳入差异分析, 用 DeCyder V6.0 分析软件行 DeCye 胶内差异分析, 寻找差异表达的蛋白点, 蛋白点平均体积差异大于 1.5 倍(表达差异上调 1.5 倍或下调 1.5 倍)。

### 1.6 制备胶 Deep Purple 蛋白染色

含有同等量各组样品蛋白的样品共 500  $\mu$ g 加样到制备胶进行电泳, 用 Deep Purple 全蛋白染料染色。简述步骤如下: 首先, 将胶放置于固定液 (75 mL/L 醋酸, 100 mL/L 甲醇) 过夜, 然后在双蒸水漂洗后, 放入 1 : 200 Deep Purple 染色液, 摇床上染色 1 h, 最后在信号固定液 (7.5 mL/L 冰醋酸) 中漂洗 20 min 以上。Typhoon Imager 9400 成像仪成像, 使用 532 nm 激光扫描。

### 1.7 MALDI-TOF-MS 质谱分析

分析胶上差异表达的蛋白质点与制备胶相匹配, 在制备胶上找到相应位置的蛋白点, 用 Ettan™ 全自动斑点处理工作站进行切点、脱色除盐、干燥、酶解、萃取等步骤处理后样品放入 Ettan™ MALDI-TOF 质谱仪, 设定参数进行质谱分析, 获得肽指纹图谱。以差异点的肽指纹图谱为检索目标, 用 MALDI EVALUATION V2.0 软件检索美国国家生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 非冗余 (nr) 的哺乳动物数据库及 Swiss-Prot 数据库。

### 1.8 统计分析

用 DeCyder v 6.0 软件中的胶内差异分析 (differential in-gel analysis, DIA) 及生物学差异分析 (biological variation analysis, BVA) 软件进行统计分析。多组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 然后两组间比较使用 Student's-t 检验, 所有统计分析均由软件自动完成, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 分析胶成像

经过双向差异电泳, 在所有 pH3-10 的梯度胶条上均得到了清晰的蛋白质表达谱, 经 DeCyder 软件处理, 不同染料标记的样本呈现不同颜色的图谱, 选取其中一张进行分析, 它由 3 张不同颜色的图谱融合而成, 其中蓝色图谱代表内标, 由 Cy2 标记; 绿色图谱代表正常成人的血清蛋白, 由 Cy3 标记; 红色图谱代表颅内动脉瘤患者的血清蛋白, 由 Cy5 标记 (图 1)。

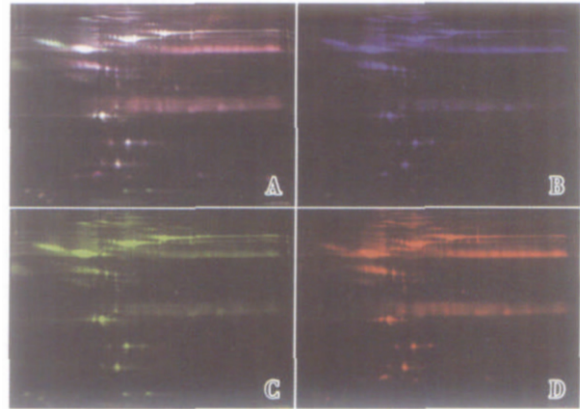


图 1 3 号胶双向差异凝胶电泳 (2-D DIGE) 图像

Fig.1 Representative 2-D DIGE of gel 3

A: merged image; It contained three images: B: Cy2 image (internal standard), C: Cy3 image (normal adult), D: Cy5 image (intracranial aneurysm)

### 2.2 图像分析

使用 DeCyder 软件分析, 在每块胶图上可以发现数以千计的蛋白质点。脑动脉瘤患者与正常成人血清中差异点 21 个, 脑挫裂伤患者与正常成人血清中差异点 19 个, 脑动脉瘤患者与脑挫裂伤患者差异点 10 个, 各组间差异点有部分交叉, 共有 38 个点差异表达 1.5 倍以上 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。其中, 胶号为 1119 的蛋白质点, 在 3 个实验组间进行 ANOVA 分析,  $P = 0.023 < 0.05$ ; 在颅内动脉瘤患者血清中比正常成人组高表达 1.82 倍,  $P = 0.0073 < 0.05$ ; 而脑挫裂伤组与正常成人组比较,  $P = 0.18 > 0.05$ , 其 2-D、3-D 图像可以清楚的看出该点在各组中的表达差异 (图 3)。

### 2.3 质谱分析

胶号为 1119 的蛋白质, 经 Ettan™ MALDI-TOF 质谱仪分析后获得其肽指纹图谱 (图 4), 其肽段输入 NCBI nr 数据库检索, 鉴定为 HP, 评分为 100。在该数据库检索评分大于 64, 则表明目的蛋白与标定蛋白为同一种蛋白或高度同源 ( $P < 0.05$ )。

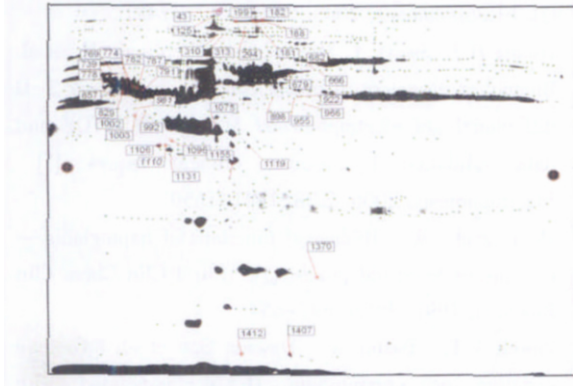


图 2 差异表达的蛋白点图像

Fig.2 Image of differentially expressed proteins

The differentially expressed protein spots were appointed out with red line and according master numbers

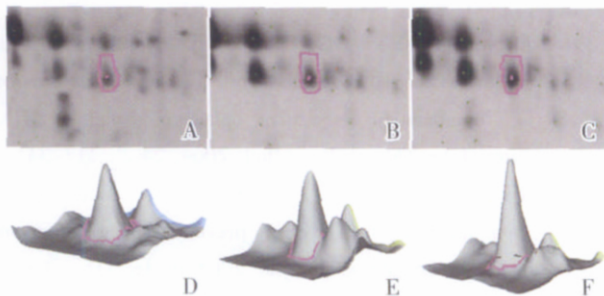
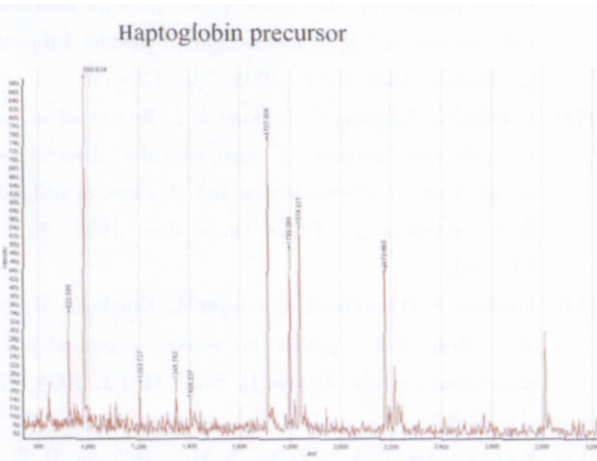


图 3 1119 点在各组血清蛋白中的差异表达

Fig 3 Differential expression of spot 1119 between each groups

The spot circled with red line represented protein. A: spot map of normal adult; B: spot map of patient with brain laceration; C: spot map of patient with intracranial aneurysm; D: 3- D view of normal adult; E: 3- D view of patient with brain laceration; F: 3- D view of patient with aneurysm



白酶(matrix metallo-proteinase, MMPs)抑制因子的表达,可以抑制动脉瘤壁退行性变,防止动脉瘤的进一步扩张,提示 MMPs 可能是动脉瘤形成及扩张的最终决定因子。炎症可以通过激活 MMPs,引起动脉壁的蛋白水解<sup>[11]</sup>,促进动脉瘤的形成及扩张。另外,在 Heliövaara 等<sup>[12]</sup>的研究中,通过检测 21 个‘正常成人’结合珠蛋白水平发现,该蛋白与血中总胆固醇水平、体重指数、肥胖率及脂质氧化代谢异常呈正相关。脂质过多沉积是动脉粥样硬化的最重要原因之一<sup>[13]</sup>。动脉粥样硬化使得血管弹性减退,在动脉壁的退行性改变中发挥重要作用<sup>[14]</sup>,可能也是颅内动脉瘤形成的重要分子机制之一<sup>[15]</sup>。目前的文献说明 HP 的表达水平与动脉瘤的形成、扩张存在相关性,可能通过炎症反应及脂质沉积参与了动脉瘤的形成及扩张。

本实验,通过 2-D DIGE,我们分析了颅内动脉瘤患者、脑挫裂伤患者及正常成人血清中的蛋白表达谱,发现 HP 只在颅内动脉瘤患者与正常成人间有表达差异。该蛋白可能通过不同的机制参与了动脉瘤的形成及扩张,其在颅内动脉瘤患者血清中表达升高的特点值得使用其它分子生物学方法进行大样本进一步研究,尤其重要的是,虽然收集未破裂动脉瘤患者血清样本十分困难,但是如果尽可能将该类患者血清样本纳入进一步研究中,将使结果更加可靠。

#### 参考文献:

- [1] Choe L H, Green A, Knight R S, et al. Apolipoprotein E and other cerebrospinal fluid proteins differentiate antemortem variant Creutzfeldt - Jakob disease from antemortem sporadic Creutzfeldt - Jakob disease [J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(14): 2242- 2246.
- [2] Davidsson P, Westman- Brinkmalm A, Nilsson C L, et al. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients[J]. *Neuroreport*, 2002, 13(5): 611- 615.
- [3] Ogilvy C S, Carter B S. Stratification of outcome for surgically treated unruptured intracranial aneurysms [J]. *Neurosurgery*, 2003, 52(1): 82- 87.
- [4] Van den Bergh G, Clerens S, Vandesande F, et al. Reversed -phase high -performance liquid chromatography prefractionation prior to two -dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identifies new differentially expressed proteins between striate cortex of kitten and adult cat [J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(9): 1471- 1481.
- [5] Huang H L, Stasyk T, Morandell S, Dieplinger H, et al. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2- D differential gel electrophoresis/ MALDI - TOF/TOF and data validation by routine clinical assays [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(8):1641- 1650.
- [6] Dobryszczyka W. Biological functions of haptoglobin - new pieces to an old puzzle [J]. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1997, 35(9): 647- 654.
- [7] Powell J T, Bashir A, Dawson S, et al. Genetic variation on chromosome 16 is associated with abdominal aortic aneurysm[J]. *Clin Sci (Lond)*, 1990, 78(1):13- 16.
- [8] Adamson J, Humphries S E, Ostergaard J R, et al. Are cerebral aneurysms atherosclerotic?[J]. *Stroke*, 1994, 25(5):963- 966.
- [9] Engstrom G, Borner G, Lindblad B, et al. Incidence of fatal or repaired abdominal aortic aneurysm in relation to inflammation - sensitive plasma proteins [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 337- 341.
- [10] Allaire E, Forough R, Clowes M M, et al. Local overexpression of TIMP - 1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(7): 1413- 1420.
- [11] Satta J, Laurila A, Paakko P, et al. Chronic inflammation and elastin degradation in abdominal aortic aneurysm disease: an immunohistochemical and electron microscopic study [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1998, 15(4): 313- 319.
- [12] Heliövaara M K, Teppo A M, Karonen S L, et al. Plasma IL - 6 concentration is inversely related to insulin sensitivity, and acute-phase proteins associate with glucose and lipid metabolism in healthy subjects [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2005, 7(6): 729- 736.
- [13] Schmitz G, Aslanidis C, Lackner K J. Recent advances in molecular genetics of cardiovascular disorders - implications for atherosclerosis and Diseases of cellular lipid metabolism[J]. *Pathol Oncol Res*, 1998, 4(2): 153- 161.
- [14] Finsterer J, Dossenbach- Glaninger A, Krugluger W, et al. Risk - factor profile in severe, generalized, obliterating vascular disease[J]. *South Med J*, 2004, 97(1): 87- 92.
- [15] Kosierkiewicz T A, Factor S M, Dickson D W. Immunocytochemical studies of atherosclerotic lesions of cerebral berry aneurysms[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1994, 53(4): 399- 406.

(编辑 张敏瑞)