

引用:刘垠浩,陈丽贞. III ~ IV期糖尿病肾病不同中医证型的血清蛋白组学研究[J]. 湖南中医杂志,2020,36(1):7-10.

III ~ IV期糖尿病肾病 不同中医证型的血清蛋白组学研究

刘垠浩,陈丽贞

(福建中医药大学附属漳州市中医院,福建 漳州,363000)

[摘要] 目的:探索III ~ IV期糖尿病肾病(DN)患者血清差异蛋白,同时筛选不同中医证型的血清差异蛋白。方法:收集III ~ IV期DN患者70例(气阴两虚证19例,脾肾气虚证18例,血瘀证16例,湿热证17例),同时选择健康受试者35例(健康对照组),应用表面加强激光解吸电离-飞行时间-质谱(SELDI-TOF-MS)技术检测各组血清蛋白指纹图谱,并对差异蛋白峰进行对比分析。结果:1)DN组与健康对照组之间共有9个蛋白峰存在显著差异,质荷比(M/Z)分别为2042.57、3291.28、4986.15、5312.69、5564.09、9861.47、10786.53、13392.89、17395.27;2)气阴两虚证与脾肾气虚证之间共有4个蛋白峰存在显著差异,M/Z分别为2994.77、4986.15、7937.25、2758.91;3)气阴两虚证与血瘀证之间共有4个蛋白峰存在显著差异,M/Z分别为4986.15、16982.62、6819.69、9947.36;4)气阴两虚证与湿热证之间共有3个蛋白峰存在显著差异,M/Z分别为4986.15、11741.33、7001.54;5)脾肾气虚证与血瘀证之间共有3个蛋白峰存在显著差异,M/Z分别为3448.22、8063.43、9787.21;6)脾肾气虚证与湿热证之间共有5个蛋白峰存在显著差异,M/Z分别为2144.34、3992.01、8871.35、10568.32、14643.47;7)血瘀证与湿热证之间共有6个蛋白峰存在显著差异,M/Z分别为4233.15、5771.32、5987.18、8496.76、6651.25、13551.94。结论:III ~ IV期DN组与健康对照组血清蛋白表达存在差异,该差异或可作为相关临床诊断的标志物,对探索DN的发病机制具有重要的参考价值;在不同中医证型之间能够找到差异血清蛋白,可能反映“证”的实质内涵,对今后建立诊断决策模型具有积极意义。

[关键词] 糖尿病肾病;中医证型;血清蛋白组学;表面加强激光解吸电离-飞行时间-质谱技术

[中图分类号]R259.872 **[文献标识码]**A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.01.003

Serum proteomics of different traditional Chinese medicine syndrome types of stage III - IV diabetic nephropathy

LIU Yin hao, CHEN Lizhen

(Zhangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Zhangzhou 363000, Fujian, China)

[Abstract] Objective: To investigate the differentially expressed proteins in the serum of patients with stage III - IV diabetic nephropathy (DN) or those with different syndrome types. Methods: A total of 70 patients with stage III - IV DN were enrolled as DN group, among whom 19 had deficiency of both Qi and Yin, 18 had spleen - kidney Qi deficiency, 16 had blood stasis syndrome, and 17 had damp - heat syndrome, and 35 healthy individuals were enrolled as healthy control group. Surface - enhanced laser desorption/ionization - time of flight - mass spectrometry was used to obtain the fingerprints of serum proteins, and the peaks of differentially expressed proteins were analyzed. Results: There were significant differences in 9 protein peaks between the DN group and the healthy control group, with a mass - to - charge ratio (M/Z) of 2042.57, 3291.28, 4986.15, 5312.69, 5564.09, 9861.47, 10786.53, 13392.89, and 17395.27, respectively. There were significant differences in 4 protein peaks between the patients with deficiency of both Qi and Yin and those with spleen - kidney Qi deficiency, with an M/Z of 2994.77, 4986.15, 7937.25, and 2758.91, respectively. There were significant differences in 4 protein peaks between the patients with deficiency of both Qi and Yin and those with blood stasis syndrome, with an M/Z of 4986.15, 16982.62, 6819.69, and 9947.36, respectively. There were significant differences in 3 protein peaks between the patients with

基金项目:福建省卫生健康委员会青年科研课题(2016-2-42)

第一作者:刘垠浩,男,医学硕士,主治医师,研究方向:中西医结合内科学

deficiency of both Qi and Yin and those with damp – heat syndrome, with an M/Z of 4986. 15, 11741. 33, and 7001. 54, respectively. There were significant differences in 3 protein peaks between the patients with spleen – kidney Qi deficiency and those with blood stasis syndrome, with an M/Z of 3448. 22, 8063. 43, and 9787. 21, respectively. There were significant differences in 5 protein peaks between the patients with spleen – kidney Qi deficiency and those with damp – heat syndrome, with an M/Z of 2144. 34, 3992. 01, 8871. 35, 10568. 32, and 14643. 47, respectively. There were significant differences in 6 protein peaks between the patients with blood stasis syndrome and those with damp – heat syndrome, with an M/Z of 4233. 15, 5771. 32, 5987. 18, 8496. 76, 6651. 25, and 13551. 94, respectively. Conclusion: There are significant differences in the expression of serum proteins between patients with stage III – IV DN and healthy individuals, which can be used as markers for clinical diagnosis and have an important value in exploring the pathogenesis of DN. Differentially expressed proteins are observed in patients with different syndrome types and may reflect the essence of the syndrome, which has great significance in establishing the decision – making models for diagnosis.

[Key words] diabetic nephropathy; traditional Chinese medicine syndrome type; serum proteomics; surface – enhanced laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病主要的微血管并发症之一, 以持续蛋白尿、肾功能进行性下降和心血管疾病高发病率及高病死率为特征^[1]。中医学中虽无 DN 病名, 但根据其临床症状, 可将其归属于“肾消”“关格”“尿浊”“水肿”等范畴^[2]。DN 的发病受多种因素的影响, 其发病机制至今尚未完全阐明, 目前大多学者认为该病与高血糖、肾脏血流动力学改变、氧化应激和炎症反应等因素有关。目前临床上主要采用 ACEI、ARB 类药物来控制该病, 但其对延缓 DN 的进展收效甚微^[3]。因此, 如何尽早发现 DN 并进行干预是临床上亟待解决的问题。蛋白组学是一种将基因所表达的蛋白质作为一个整体来进行研究的科学, 因其可提供疾病病理过程中丰富的生物学信息, 从而有望揭示 DN 的发病机制及探寻新的治疗靶点。笔者对 III ~ IV 期 DN 不同中医证型的血清蛋白组学进行了研究, 现将研究结果报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2018 年 6 月于我院就诊的 III ~ IV 期 DN 患者 70 例 (气阴两虚证 19 例, 脾肾气虚证 18 例, 血瘀证 16 例, 湿热证 17 例) 和健康受试者 35 例作为研究对象, 并将其分为 DN 组和健康对照组。气阴两虚证中, 男 10 例, 女 9 例, 平均年龄 (40.93 ± 12.47) 岁; 脾肾气虚证中, 男 8 例, 女 10 例, 平均年龄 (50.69 ± 11.36) 岁; 血瘀证中, 男 9 例, 女 7 例, 平均年龄 (47.72 ± 9.89) 岁; 湿热证中, 男 6 例, 女 11 例, 平均年龄 (45.32 ± 14.58) 岁。健康对照组中, 男 15 例, 女 20 例, 平均年龄 (39.11 ± 10.75) 岁。各组一般资料

比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 纳入标准 1) 符合《中国糖尿病防治指南》^[4] 中“糖尿病肾病的表现及分期”标准及 2007 年中华中医药学会肾病分会制定的《糖尿病肾病诊断、辨证分型及疗效评定标准 (试行方案)》^[5]; 2) 年龄 ≥ 18 岁或 ≤ 70 岁; 3) 采用西药 + 运动 + 饮食降糖治疗 2 周后, 空腹血糖 ≤ 7mmol/L 和餐后 2h 血糖 < 10mmol/L, 或糖化血红蛋白 ≤ 7%; 4) 血压 < 160/100mmHg; 5) 肾小球滤过率 60 ~ 130ml/min 或 24h 尿蛋白定量 ≤ 3.5g; 6) 自愿参加本研究并签署知情同意书。

1.3 排除标准 1) 糖尿病酮症酸中毒者; 2) 因其他原因所致的尿蛋白增多者 (如免疫疾患、泌尿系统感染、心力衰竭、高血压等); 3) 合并有乙肝、结核等传染性疾病者; 4) 肝功能异常者。

2 研究方法

2.1 材料与方 1) 用促凝管采集受试者静脉血 5ml, 经 4℃ 低温静置 1h、2 次离心 (3600r/min) 处理后, 取约 100μl 血清装入 EP 管中, 放置 -80℃ 冰箱保存备用, 直至所有标本收集完毕, 并统一置于冰盒上溶解; 2) 将制备好的约 10μl 血清加入含 20μl U9 裂解液的 EP 管中混匀, 4℃ 下静置 30min 后加入 370μl CM10 缓冲液进行混匀并吹打血清样品, 至此血清样品处理完毕; 3) 把芯片装入生物芯片处理器中, 在每孔加入约 200μl 结合缓冲液, 震荡甩出 2 次后, 将制备好的血清样品约 100μl 加入孔中, 于 4℃ 低温震荡 1h、甩出样品; 4) 将 200μl 的结合缓冲液加入芯片, 室温震荡 5min, 甩出液体, 共操作 2 次;

5)每孔加入200 μ l HPLC水,立刻甩出;6)将基质物质(芥子酸,SPA)同富集的蛋白液混合,而后将其加到蛋白芯片上风干,直至达到共结晶状态;7)送入SELDI-TOF-MS中检测。将检测出的数据运用CIPHERGEN ProteinChip、Biomarker WizardTM和Biomarker PatternsTM Software等软件进行收集,并进行对比分析,经过BPS软件处理后生成最终结果。

2.2 统计学方法 采用SPSS 18.0软件对所有数据进行统计学分析,各组组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 研究结果

3.1 DN组与健康对照组血清蛋白比较 70例DN组患者与35例健康对照组中,共检测出78个差异表达蛋白($P < 0.05$),其中有9个蛋白峰存在显著差异($P < 0.01$)。(见表1)

表1 DN组与健康对照组差异蛋白峰

质荷比(M/Z)	P值	高表达组
2042.57	<0.01	DN组
3291.28	<0.01	DN组
4986.15	<0.01	DN组
5312.69	<0.01	DN组
5564.09	<0.01	DN组
9861.47	<0.01	DN组
10786.53	<0.01	DN组
13392.89	<0.01	DN组
17395.27	<0.01	DN组

3.2 气阴两虚证与脾肾气虚证血清蛋白比较 DN组中,19例气阴两虚证与18例脾肾气虚证共检测出69个差异表达蛋白($P < 0.05$),其中有4个蛋白峰存在显著差异($P < 0.01$)。(见表2)

表2 DN气阴两虚证与脾肾气虚证差异蛋白峰

质荷比(M/Z)	P值	高表达组
2994.77	<0.01	气阴两虚证组
4986.15	<0.01	气阴两虚证组
7937.25	<0.01	气阴两虚证组
2758.91	<0.01	脾肾气虚证组

3.3 气阴两虚证与血瘀证血清蛋白比较 DN组中,19例气阴两虚证与16例血瘀证共检测出55个差异表达蛋白($P < 0.05$),其中有4个蛋白峰存在显著差异($P < 0.01$)。(见表3)

3.4 气阴两虚证与湿热证血清蛋白比较 DN组中,19例气阴两虚证与17例湿热证共检测出61个差异表达蛋白($P < 0.05$),其中有3个蛋白峰存在显著差异($P < 0.01$)。(见表4)

表3 DN气阴两虚证与血瘀证差异蛋白峰

质荷比(M/Z)	P值	高表达组
4986.15	<0.01	气阴两虚证组
16982.62	<0.01	气阴两虚证组
6819.69	<0.01	血瘀证组
9947.36	<0.01	血瘀证组

表4 DN气阴两虚证与湿热证差异蛋白峰

质荷比(M/Z)	P值	高表达组
4986.15	<0.01	气阴两虚证组
11741.33	<0.01	气阴两虚证组
7001.54	<0.01	湿热证组

3.5 脾肾气虚证与血瘀证血清蛋白比较 DN组中,有18例脾肾气虚证与16例血瘀证患者共检测出67个差异表达蛋白($P < 0.05$),其中有3个蛋白峰存在显著差异($P < 0.01$)。(见表5)

表5 DN脾肾气虚证与血瘀证差异蛋白峰

质荷比(M/Z)	P值	高表达组
3448.22	<0.01	脾肾气虚证组
8063.43	<0.01	血瘀证组
9787.21	<0.01	血瘀证组

3.6 脾肾气虚证与湿热证血清蛋白比较 DN组中,18例脾肾气虚证与17例湿热证共检测出73个差异表达蛋白($P < 0.05$),其中有5个蛋白峰存在显著差异($P < 0.01$)。(见表6)

表6 DN脾肾气虚证与湿热证差异蛋白峰

质荷比(M/Z)	P值	高表达组
2144.34	<0.01	脾肾气虚证组
3992.01	<0.01	脾肾气虚证组
8871.35	<0.01	湿热证组
10568.32	<0.01	湿热证组
14643.47	<0.01	湿热证组

3.7 血瘀证与湿热证血清蛋白比较 DN组中,16例血瘀证与17例湿热证共检测出71个差异表达蛋白($P < 0.05$),其中有6个蛋白峰存在显著差异($P < 0.01$)。(见表7)

表7 DN血瘀证与湿热证差异蛋白峰

质荷比(M/Z)	P值	高表达组
4233.15	<0.01	血瘀证组
5771.32	<0.01	血瘀证组
5987.18	<0.01	血瘀证组
8496.76	<0.01	血瘀证组
6651.25	<0.01	湿热证组
13551.94	<0.01	湿热证组

4 讨论

DN是糖尿病重要的并发症之一,患病人数众

多,也是导致终末期肾病透析的主要原因。目前该病的发病机制尚未完全阐明,临床用药也暂时无法有效地逆转 DN 的进展。故了解 DN 的发病机制,早期筛查 DN 的高危患者,寻找新的诊疗靶点,进行针对性的预防和治疗,是我们面临的一大挑战。

“证”体现了中医学的特色,是中医学理论的基石,是疾病发展过程中某一阶段的病理概括。但“证”的内涵广泛,其物质和功能的基础是多方面的,涵盖了病因、病位、病性、病势以及邪正之间的关系,而非单一特异性物质^[6]。蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象,对组织、细胞的整体蛋白进行检测,在蛋白质水平上了解细胞各项功能、各种生理、生化过程及疾病的病理过程等^[7-8]。蛋白质组学在整体性、动态性、复杂性、阶段性理念与“证”的特征不谋而合,故运用该技术来探索疾病本质及不同中医证型的物质基础是合理可行的,将对揭示“证”的物质和功能基础具有积极的意义。

于漫等^[9]运用双向凝胶电泳和 MALDI 串联飞行时间质谱寻找脾阳虚证差异蛋白,发现差异表达蛋白质共有 8 个,其中有 4 个表达上调,4 个表达下调。马增春等^[10]运用蛋白质组学技术测定四物汤对血虚证小鼠血清中有关影响的蛋白,结果发现,四物汤可使血虚证小鼠血清中 12 个下调和 4 个上调的蛋白质有所恢复,从而得出四物汤可能通过对血虚证小鼠血清中蛋白的影响而促进骨髓造血、减轻辐射引起的机体损伤的结论。Kim MR 等^[11]应用蛋白组学技术发现, DN 患者血浆前激肽释放酶、补体因子 C4B3、糖化的丝氨酸蛋白酶抑制剂等升高,可能是 DN 潜在的生物标志物。

本研究对 III ~ IV 期 DN 及其不同中医证型进行差异血清蛋白的筛选,结果显示:有 9 个显著差异蛋白在 DN 组与健康对照组之间被筛选出,有 4 个显著差异蛋白在 DN 气阴两虚证组与脾肾气虚证组之间被筛选出,有 4 个显著差异蛋白在 DN 气阴两虚证组与血瘀证组之间被筛选出,有 3 个显著差异蛋白在 DN 气阴两虚证组与湿热证组之间被筛选出,有 3 个显著差异蛋白在 DN 脾肾气虚证组与血瘀证组之间被筛选出,有 5 个显著差异蛋白在 DN 脾肾气虚证组与湿热证组之间被筛选出,有 6 个显著差异蛋白在血瘀证组与湿热证组之间被筛选出。M/Z 为 4986.15 的蛋白在 DN 组与健康对照组之间

存在显著差异($P < 0.01$),且在气阴两虚证与其他证型的比较中呈现特异高表达,故推测该蛋白可能成为诊断 III ~ IV 期 DN 新的生物学信息,还可能成为区分气阴两虚证与其他证型的潜在生物学标志物。

国内目前关于 DN 及其中医相关证型的血清蛋白组学研究较少,技术层面总体相对薄弱,且本研究尚处于初步阶段,仅发现了一些差异表达蛋白峰,并未对其进行进一步研究及鉴定,故克服以上不足是我们下阶段努力的主要方向。该研究所发现的差异蛋白可能对 DN 发病机制研究、发现特异性诊断指标及靶向治疗药物的开发有积极的影响,并可能会为中医不同证型发病机制进行阐释、形成新的中西医结合辨证体系、进一步建立中医诊断模型有一定帮助^[12]。

参考文献

[1] FLORETTO P, MAUER M. Histopathology of diabetic nephropathy [J]. Semin Nephrol, 2007 (27): 195 - 207.

[2] 张舒媛, 李博, 王东超, 等. 中药治疗糖尿病肾病研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(12): 121 - 123.

[3] 姚迪, 张红, 陆卫平. GLP-1 受体激动剂与糖尿病肾病[J]. 重庆医学, 2015, 44(7): 981 - 983.

[4] 中华人民共和国卫生部疾病控制司, 中华医学会糖尿病学分会. 中国糖尿病防治指南[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2003: 9 - 11.

[5] 中华中医药学会肾病分会. 糖尿病肾病诊断、辨证分型及疗效评定标准(试行方案)[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(7): 7 - 8.

[6] 张杰, 李浪. 关于中医证候物质基础研究路径的思考[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(5): 394 - 335.

[7] ANDERSON NI, ANDERSON NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words [J]. Electrophoresis, 1998, 19(2): 1853 - 1861.

[8] BLACKSTOCK WP, WERI WP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins [J]. Trends in Biotechnology, 1999, 17(3): 121 - 127.

[9] 于漫, 吕凌, 王彩霞, 等. 脾阳虚证模型大鼠回肠的比较蛋白质组学探析[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(1): 71.

[10] 马增春, 高月, 谭洪玲, 等. 四物汤对辐射致血虚证小鼠血清蛋白质表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1050 - 1053.

[11] KIM MR, YU SA, KIM MY, et al. Analysis of glycosylated serum proteins in type 2 diabetes patients with nephropathy [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 19(1): 83 - 92.

[12] 王端, 端燕妮, 贺文香, 等. 应用蛋白质组学技术筛选抽油障碍患儿不同中医证型血清相关蛋白[J]. 中国妇幼健康研究, 2018, 29(2): 149 - 153.