

文章编号 1006-8147(2019)01-0010-05

论著

系统性老年性淀粉样变患者血清转甲状腺素蛋白出现三种修饰基团减少

赵莉邈, 刘晓丹, PUREVDORJ Narangerel, 王 然, 李 蕾, 孙续国
(天津医科大学医学检验学院临床检验和血液教研室, 天津 300203)

摘要 目的:探讨转甲状腺素(TTR)蛋白代谢修饰与淀粉样变形成的分子机制。方法:本研究首先利用 ProteomeLabPF-2D 系统依据蛋白质等电点分选各个 pH 值范围蛋白质,然后利用抗人 TTR 抗体,点免疫印迹实现鉴定 TTR 蛋白存在于被收集的范围。利用硫黄素 T(ThT)试剂,测定各个收集部分溶液中淀粉样变的含量,进一步利用飞行质谱的表面增强激光解吸/电离时间(SELDI-TOF-MS)分析各个部分 TTR 蛋白的修饰类型。结果:系统性老年性淀粉样变(SSA)患者和健康志愿者血清 pH 范围分别为 8.1~8.0, 4.0~4.6 及 6.8~5.8 范围时出现高丰度蛋白。并且 SSA 患者 pH6.8~5.8 范围淀粉样变含量明显高于对照组($P<0.05$),其中 SSA 组与健康组相比,血 TTR 蛋白 N 端氨基酸修饰基团包括磷酸基(Phosphoryl)、羟基(Hydroxyl)、葡萄糖胺(O-GlcNac)基团修饰阴性。结论:SSA 患者血 TTR 蛋白 N 端氨基酸修饰基团 Phosphoryl、Hydroxyl、O-GlcNac 的减少可能与淀粉样蛋白的形成有关。**关键词** 甲状腺素运载蛋白;化学修饰;老年系统性淀粉样变;飞行时间质谱

中图分类号 Q7

文献标志码 A

Three modified groups to decrease in serum transthyroxine protein in patients with systemic senile amyloidosis

ZHAO Li-li, LIU Xiao-dan, PUREVDORJ Narangerel, WANG Ran, LI Lei, SUN Xu-guo

(Department of Clinical Laboratory and Blood, School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

Abstract Objective: To explore TTR event protein metabolism and the molecular mechanism of amyloid formation. **Methods:** We first used ProteomeLabPF-2D system to separate protein on the basis of protein isoelectric point(IP) in each pH range and then western blot was applied to identify the TTR range. We used sulfur flavin T (ThT) reagent quantitative to sort out the collection part of the content of amyloidosis, further flight mass spectrometry of surface-enhanced laser desorption/ionization-time (SELDI TOF MS) to analyze each part of TTR event protein modification type. **Results:** It was found that SSA patients and healthy volunteers whose serum pH were 8.0-8.6, pH 4.0-4.6 and pH 5.8-6.8 had a high abundance of protein. Moreover, during pH 6.8 to 5.8, the amyloidosis content of SSA patient group had significantly higher pH than the control group. The TTR N-terminal amino acid modified groups: Phosphoryl, Hydroxyl, O-GlcNac were negative. **Conclusion:** The reduction of TTR event N-terminal amino acid modified protein was found in SSA patients and Phosphoryl (Phosphoryl), Hydroxyl (Hydroxyl), glucosamine (O-GlcNac) may be associated with the formation of amyloid protein.

Key words transthyretin; chemical modification; senile systemic amyloidosis; SELDI-TOF-MS

转甲状腺素蛋白(transthyretin, TTR), 是肝脏分泌的一种具有转运甲状腺素、视黄醇的功能性蛋白, 是在老年性系统性淀粉样变(senile systemic amyloidosis, SSA)^[1]及家族型多发性神经性损害(familial amyloidotic polyneuropathy, FAP)^[2-3]等疾病淀粉样变的前蛋白。通过分析 SSA 患者发生 TTR 相关淀粉样变沉积组织特点^[4], 发现淀粉样变主要沉积于心脏组织^[5-6]、中枢神经^[7]、血管壁等, 但是这些组织细胞非均表达、分泌 TTR 蛋白^[8-9]。大量研究表明 SSA 患者组织器官沉积的淀粉样变的前蛋白成分为 TTR 蛋白^[10-12], 由于 TTR 为机体内存在的一

种生理蛋白, 形成淀粉样变后可以沉积于人体的组织器官导致器官损害及功能障碍。探究淀粉样变相关蛋白的代谢修饰可能有助于解析 SSA 淀粉样变形成的分子机制。前期本组利用基质飞行质谱技术(MALDI-TOF-MS)建立直接分析血液中 TTR 蛋白修饰的方法^[13-14], 并且最近有报道 ProteomeLab PF-2D 技术分析蛋白等电点的变化^[15-16], 利用两项结合可以分析 SSA 患者 TTR 蛋白的化学修饰类型, 辅助解析 SSA 患者形成淀粉样变的分子机制。

1 材料与方法

1.1 患者标本收集 收集 30 位健康的志愿者以及经临床影像和病理诊断为 SSA 的患者的血清。

1.2 血清总蛋白、白蛋白、TRR 定量 根据操作指导, 应用 TOSHBA-120RF 全自动生化分析仪测定人血

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30973157);天津市科学技术基金国家资助(15JCYBJC268000)

作者简介 赵莉邈(1990-), 女, 初级检验师, 硕士, 研究方向: 智能医学检测;通信作者: 孙续国, E-mail: sunxuguo@tjmu.edu.cn。

清总蛋白和白蛋白含量,用 UniCelDxI 800 来检测血清 TTR。

1.3 蛋白分离 首先,根据操作说明将高效聚焦层析柱用于蛋白质分离。缓冲液以 0.2 mL/min 的流速平衡 130 min,之后手动将样本用注射器推入层析柱内。在第一相中,蛋白与强阴离子交换剂交换,并从 pH 8.5 到 4.0 范围内进行连续洗脱。40~45 min 后,pH 开始下降。以间隔 0.2 个单位的 pH 值在 48 孔深孔板中收集蛋白。应用高效反相梯度分离蛋白,并在第二相将其分离。

1.4 免疫印迹法检测 TTR 将从层析柱中收集得到的蛋白溶解在 2.0 μ L 溶液中,然后转至硝酸纤维素薄膜上,并用兔抗人 TTR 抗体孵育 1 h。应用抗兔第二抗体孵育结合后检测结果。

1.5 检测硫磺素(ThT)标记的淀粉样纤维荧光强度 取 5 μ L 血清,向其中加入 200 μ L 50 mmol ThT 缓冲液(pH 8.5, sigma),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后检测。

1.6 利用 UPLC-Q-TOF/MS(Waters,America) 分析 TTR 蛋白的化学修饰^[7] Waters ACQUITY UPLC 分系统,蛋白分离柱为 BEH C18(2.1 \times 100 mm,1.7 μ m),利用 0.1% methanoic acid acetonitrile (solvent A) 和 0.1% methanoic acid (solvent B) 试剂按照仪器操作说明仔细操作。质谱用仪器内标分子为: Leucineenkephalin (LE), C28H37N5O7 TyrGlyGlyPheLeu(M+H)⁺ M/Z 556.2771, (M-H)⁻ M/Z 554.2615. [Glu1]-FibrinopeptideB (GluFib), C66H95N19O26GluGlyValAsnAspAsnGluGluGlyPhePheSerAlaArg, (M+H)⁺ M/Z 1570.6774, (M+2H)²⁺ M/Z 785.8426, (M-H)⁻ M/Z 1568.6618 ESI。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件分析数据。数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间均数比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床收集 SSA 患者的基础资料 依据 SSA 临床诊治指南,收集 SSA 患者 30 例,同时收集年龄与性别相匹配的健康体检志愿者 30 名。发现 SSA 患者与健康志愿者在 3 项指标中无显著性差异($P>0.05$)。结果见表 1。

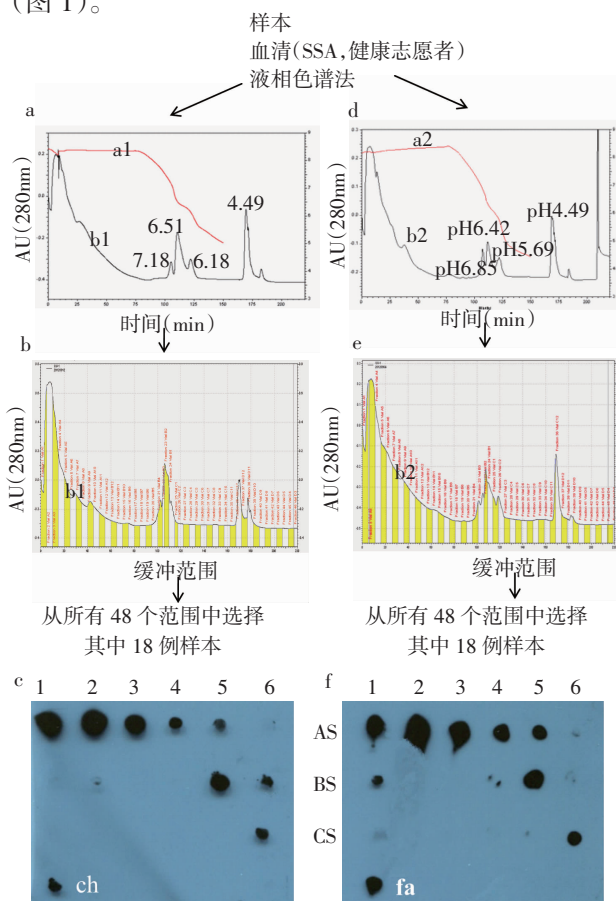
表 1 患者的临床特征

Tab 1 Clinical characteristics of patients

指标	SSA(n=30)	志愿者(n=30)
年龄	60.5 \pm 8.9	58.7 \pm 7.5
性别	1.12 \pm 0.35	1.03 \pm 0.31
总蛋白/(g/L)	65.7 \pm 1.36	69.8 \pm 1.23
白蛋白/(g/L)	32.6 \pm 1.68	31.5 \pm 1.75
TTR/(mg/L)	231.5 \pm 9.75	265.4 \pm 9.82

2.2 利用 PF-2D 系统分析 SSA 及志愿者人群血清各个 pI 区域的蛋白丰度 利用 PF-2D 分析系统,分选各个等电点的蛋白质,两项电解质的 pH 分别为 pH4.0 及 pH8.0。利用波长 208 nm 直接检测蛋白的相对强度,以每 0.2pH 为一个样品采集点,采集各个 pI 点的蛋白质。SSA 患者结果在 pH 8.1~pH 8.0,pH 6.42 范围、pH 5.69 范围及 pH 4.49 范围内存在高蛋白丰度(图 1a,b,c,d)。同样分析方法分析健康志愿者,结果在 pH 8.1~pH 8.0,pH 6.51 范围、pH 6.18 范围及 pH 4.49 范围发现高丰度蛋白(图 1a,b,c,d)。

2.3 进一步分析 SSA 及志愿者 TTR 蛋白的 pI 为分析各个 pH 值范围内可存在 TTR 蛋白,利用点免疫印迹的方法鉴定 TTR 的存在,结果在 pH 6.8~pH 5.8 范围及 pH 4.0~pH 4.5 范围发现高丰度 TTR 蛋白(图 1)。



a,b:pH 梯度中总蛋白的色谱法。在色谱图中,x 轴代表柱内的保留时间,y 轴(a1,a2)代表 pH,y 轴(b1,b2)代表 AU(UV 吸光度,280 nm)。分析平台 ProteomeLab PF-2D 提供了二维分馏,在此分馏过程中,完整的蛋白首先通过等电点(pI)与聚焦层析蛋白分离,然后在二维空间中通过其疏水性性质分离。从 280 nm 的第一次分离中获得色谱吸收的 pH 曲线,从 48 个组分中选取 18 个样品进行抗 TTR 抗体免疫印迹鉴定。a,b,c:健康志愿者血清;d,e,f:SSA 患者血清。c,f:抗 TTR 抗体免疫印迹(ch,fa):TTR 蛋白

图 1 使用 ProteomeLab PF-2D 系统对 SAA 患者和健康志愿者血清蛋白进行色谱分析

Fig 1 Chromatographic analysis of serum proteins of SAA patients and healthy volunteers using ProteomeLab PF-2D

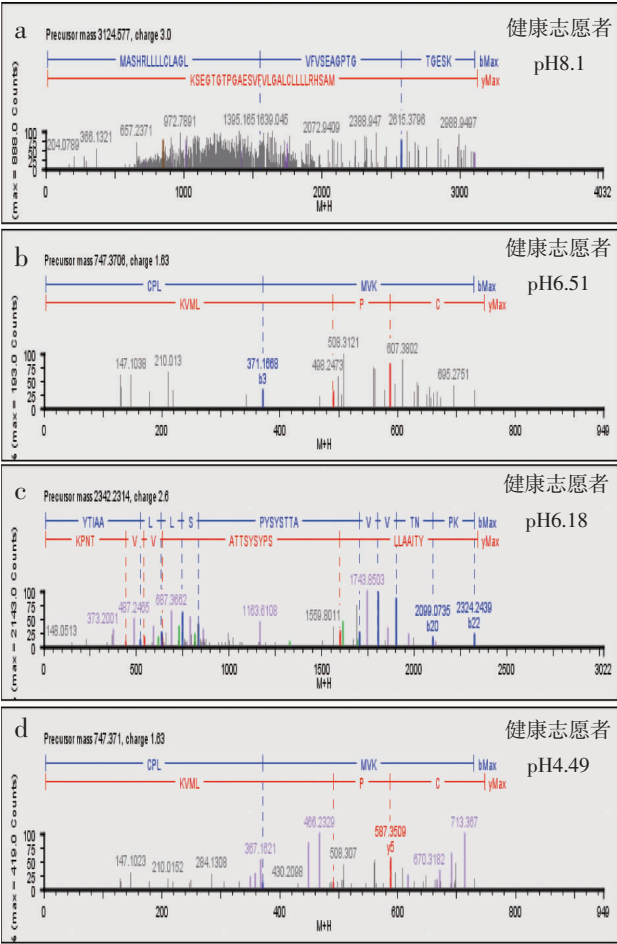
2.4 利用 ThT 测定各个部分收集液中淀粉样变的强度 利用 ThT 荧光试剂为一种可以检测淀粉样变成分含量的一种特异性试剂,可以分析被检测部分淀粉样变成分的浓度,结果见表 2,SSA 患者 pH6.40~pH6.60 范围内,淀粉样变成分显著高于对照组。

表 2 血清淀粉样蛋白在每段 pH 范围形成的荧光强度
Tab 2 The fluorescence intensity of serum amyloid formation in each pH fraction

SSA		健康志愿者		<i>t</i>	<i>P</i>
pH	荧光强度	pH	荧光强度		
6.42	676.57±91.752	6.51	398.56±83.63	16.247	0.00 [*]
5.69	296.87±71.890	6.18	330.30±72.170	-0.228	0.820
4.49	345.43±70.583	4.49	349.77±76.488		
<i>t</i>	15.668		-1.014		
<i>P</i>	0.00 [*]		0.315		

* 显著的统计学差异

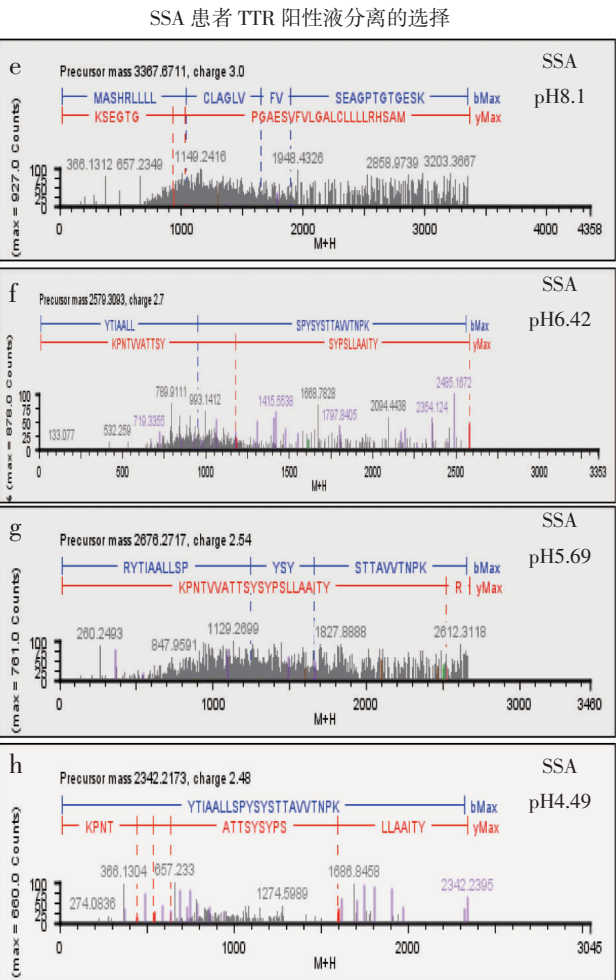
2.5 利用 MALDI-TOT-MS 分析 TTR 蛋白的化学修饰 对上述各个部分的 TTR 均进行质谱分析,健康志愿者 TTR 阳性液分离的选择



TTR 蛋白发生的修饰类型结果见表 3 及图 2。对于利用质谱技术解析 TTR 蛋白发生化学修饰类型及发生位点,其标记结果见图 3。

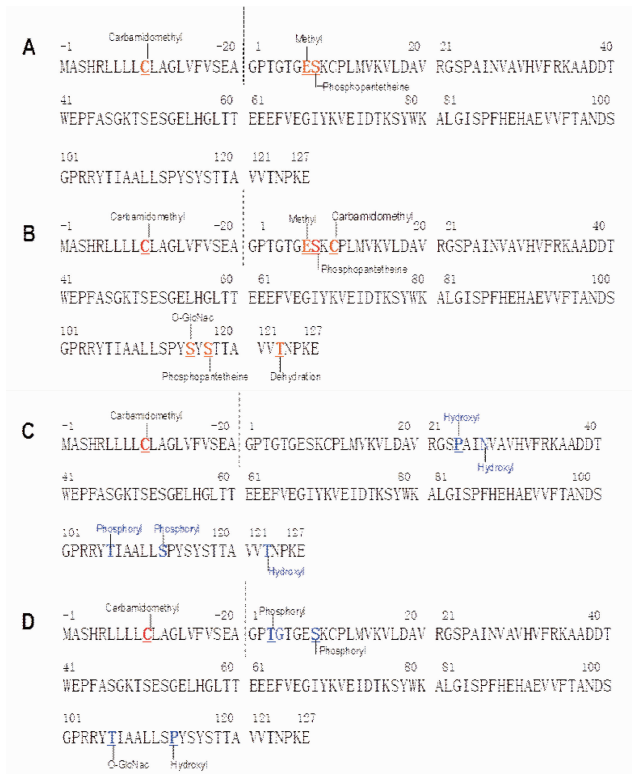
表 3 血清 TTR 在每段 pH 范围中的修饰
Tab 3 The serum TTR modification in each pH fraction

SSA		健康对照组	
pH	TTR 修饰	pH	TTR 修饰
6.42	脲甲基化(Carbamidomethyl) 甲基(Methyl) 磷酸泛酰巯基乙胺 (Phosphopantetheine)	6.51	脲甲基化 甲基 磷酸泛酰巯基乙胺 磷酸基(Phosphoryl) 羟基(Hydroxyl) 葡萄糖胺(O-GlcNac) 脱水(Dehydration)
4.49	脲甲基化 脱水 磷酸泛酰巯基乙胺 磷酸基 羟基	4.49	脲甲基化 脱水 磷酸泛酰巯基乙胺 磷酸基 羟基 葡萄糖胺



a、b、c、d:健康志愿者;e、f、g、h:SSA 患者;a、e:pH 8.1 范围,b:pH6.51 范围,f:pH6.42 范围,c:pH6.18 范围,g:pH5.69 范围,d、h:pH4.49 范围
图 2 SSA 患者和健康志愿者的 TTR 修饰鉴定

Fig 2 Identification of the TTR modification in those collected fraction in SSA patients and Healthy volunteers



A,C:SSA患者;B,D:健康志愿者;A:从SSA患者获取的pH 6.42范围,B:从健康志愿者获取的pH 6.51范围,C,D: pH 4.49范围

图3 TTR氨基酸位点修饰组化学结构总结

Fig 3 Summarizing chemical structure of the modified group in TTR amino acid sites

3 讨论

TTR蛋白的野生型(w-TTR)及发生基因突变的突变型(m-TTR)均可发生淀粉样变沉积,突变型TTR形成淀粉样变沉积发生于FAP患者,并且在杂合子FAP患者中约50%沉积的淀粉样变为w-TTR,说明野生型TTR也能够形成淀粉样变沉积^[10]。

最近有学者利用PF-2D系统分选蛋白,而淀粉样变蛋白研究的难点是在分析过程中不能改变相关蛋白分子结构,根据我们掌握的文献,利用PF-2D分析淀粉样变蛋白尚未见报道^[18-19],本论文依据蛋白pI的分选系统收集SSA患者及健康志愿者血清,确实发现在pH 8.1~pH 8.0范围、pH 6.8~pH 5.8范围以及pH 4.0~pH 4.6范围存在高丰度蛋白,这些蛋白是否存在TTR蛋白有待于进一步鉴定。

为进一步鉴定TTR蛋白存在的范围,采用抗人TTR抗体,点免疫印迹的方法鉴定TTR蛋白存在的部分,结果在pH 8.0~pH 8.1范围,SSA患者与志愿者人群均存在大量TTR蛋白。在pH 6.8~pH 5.8范围及pH 4.0~pH 4.6范围中,SSA患者与健康志愿者存在高丰度的pI发生改变,SSA患者在pH 6.42范围明显增高,并且化学修饰类型发生改变,定量分析

淀粉样变沉积成分定量也发现明显高于健康志愿者。SSA患者TTR与健康志愿者的TTR蛋白为w-TTR,即两组TTR蛋白质的氨基酸顺序、类型没有改变,两组TTR蛋白的pI应当相同,造成已经pI能够分选TTR蛋白的理论基础是TTR蛋白发生化学修饰,实验结果也显示TTR蛋白存在于不同的pH范围之内,说明TTR蛋白在人机体内能够发生化学修饰,以前也有报道TTR蛋白存在2个不同的pI,支持本实验结果。

总结上述实验发现SSA患者及健康志愿者血清TTR蛋白均存在化学修饰,但是SSA患者TTR蛋白在pI 6.42范围发生修饰的类型与健康志愿者不同,且淀粉样变成分含量显著高于对照组,提示机体代谢过程中TTR蛋白可发生化学修饰,其修饰类型与淀粉样变形成的相关性有待进一步研究。

(致谢感谢王卓伟在UPLC-MS/MS技术上的帮助)

参考文献:

- [1] 段红茹. 研究转甲状腺素蛋白化学修饰在老年性淀粉样变形成机制中的作用[D]. 天津医科大学临床医学;临床检验诊断学, 2013
- [2] Niemietz C, Roeken C, Schilling M, et al. Transthyretin-associated familial Amyloid Polyneuropathy When it is important to think about it[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2018, 143(6):427
- [3] Plante-Bordeneuve V. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy: an update[J]. J Neurol, 2018, 265(4):976
- [4] Latalova P, Holub D, Pika T, et al. Amyloid typing using immunohistochemical and proteomic analysis[J]. Virchows Arch, 2015, 467(1):S197
- [5] 刘世诺, 姚自鹏, 宗政, 等. 心肌淀粉样变性[J]. 中国老年学杂志, 2018(4):1020
- [6] Arbustini E, Verga L, Concardi M, et al. Electron and immunoelectron microscopy of abdominal fat identifies and characterizes amyloid fibrils in suspected cardiac amyloidosis[J]. Amyloid, 2002, 9(2):108
- [7] 崇丽. 脑淀粉样血管病研究现状[J]. 中风与神经疾病杂志, 2017(10):954
- [8] Southwell B R, Tu G F, Duan W, et al. Cerebral expression of transthyretin: evolution, ontogeny and function[J]. Acta Med Austriaca, 1992, 19(Suppl 1):28
- [9] Loughna S, Bennett P, Moore G. Molecular analysis of the expression of transthyretin in intestine and liver from trisomy 18 fetuses[J]. Hum Genet, 1995, 95(1):89
- [10] Westermark P, Bergstrom J, Solomon A, et al. Transthyretin-derived senile systemic amyloidosis: clinicopathologic and structural considerations[J]. Amyloid, 2003, 10:148
- [11] Phay M, Blinder V, Macy S, et al. Transthyretin Aggregate-Specific Antibodies Recognize Cryptic Epitopes on Patient-Derived Amyloid Fibrils[J]. Rejuvenation Res, 2014, 17(2):97
- [12] Yu L, Zheng Y, Xu J, et al. Site-specific determination of TTR-related functional peptides by using scanning tunneling microscopy[J]. Nano Res, 2018, 11(1):577

- [13] Ueda M, Ando Y, Haraoka K, et al. Aging and transthyretin-related amyloidosis: pathologic examinations in pulmonary amyloidosis[J]. Amyloid, 2006,13(1):24
- [14] Liu J P, Wang Q Y, Zheng F, et al. Effect of MPO/H2O2/NO- system on nitric oxide-mediated modification of TTR amyloid and serum TTR in FAP ATTR Val30Met patients[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(2):2368
- [15] Sun X G, Ueda M, Yamashita T, et al. Lipid droplets are present in amyloid deposits in familial amyloidotic polyneuropathy and dialysis related amyloidosis[J]. Amyloid, 2006,13(1):20
- [16] Harrison H H, Gordon E D, Nichols W C, et al. Biochemical and clinical characterization of prealbuminCHICAGO: an apparently benign variant of serum prealbumin (transthyretin) discovered with high-resolution two-dimensional electrophoresis[J]. Am J Med Genet, 1991,39(4):442
- [17] 方钱, 蔡秀军, 王卫军, 等. 串联飞行时间质谱分析人良性胆管瘢痕成纤维细胞差异蛋白表达[J]. 中华实验外科杂志, 2016(7): 1777
- [18] Yang J, Liu P, Tian M, et al. Proteomic identification of angiotensin by ProteomeLab PF-2D and correlation with clinical outcome in human clear cell renal cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2013,42(6):2078
- [19] Skalnikova H, Rehulka P, Chmelik J, et al. Relative quantitation of proteins fractionated by the ProteomeLab PF 2D system using isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)[J]. Anal Bioanal Chem, 2007,389(5):1639

(2018-06-04 收稿)

文章编号 1006-8147(2019)01-0014-04

论 著

糖肾康胶囊成型辅料的选择与工艺研究

黄 涛

(天津市儿童医院药剂科, 天津 300134)

摘要 目的: 优选糖肾康胶囊的最佳辅料与制剂成型工艺。方法: 在胶囊成型工艺中以颗粒的成型率、细粉率和吸湿性为指标, 分别对辅料的种类、配比和润湿剂进行考察, 确定生产工艺参数。结果: 经考察确定以微晶纤维素与乳糖(1:1)为辅料, 以 90%乙醇为润湿剂, 按照确定的工艺制备颗粒 3 批并作评价。颗粒的成型率可达到 80%以上, 细粉率小于 12%, 颗粒脆碎度小于 5%; 颗粒水分测定结果为颗粒含水量小于 5%; 颗粒流动性考察结果为休止角在 30°左右, 表明所制颗粒的流动性好; 颗粒临界相对湿度(CRH)约为 64%。结论: 本品所选辅料合理, 成型制备工艺可行, 可为工业化生产提供依据。

关键词 糖肾康胶囊; 成型工艺; 休止角; 吸湿率

中图分类号 R94

文献标志码 A

糖肾康胶囊处方来源于临床经验方, 由淫羊藿、黄连、黄芪、知母、益母草和丹参等七味药材组成, 用于治疗糖尿病肾病, 疗效显著^[1]。原有糖肾康干燥浸膏粉吸湿性大, 流动性差, 难以满足生产的要求, 宜制粒后再装胶囊。文章以成型率、细粉率和吸湿百分率为指标, 筛选不同的辅料及配比, 并进一步对制粒后的颗粒的成型率、细粉率、颗粒硬度、流动性和临界相对湿度进行评价^[2-4]。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料 AB204-N 电子天平(万分之一, Mettler-Toledo); YK-160 摇摆制粒机(常州爱斯特干燥设备有限公司); 101-A 型数显式电热恒温烘箱(上海阳光仪器有限公司); SH-01N(C)恒温恒湿试验箱(重庆市永生实验仪器厂); 药典筛(浙江上虞市五星冲压筛具厂)。糖肾康干燥浸膏粉(自制)批号: 20180325; 各辅料均符合药用标准; 其它试剂

作者简介 黄涛(1985-), 男, 主管药师, 硕士, 研究方向: 医院药学; E-mail: 383577668@qq.com。

均为化学纯。

1.2 方法

1.2.1 评价指标

1.2.1.1 颗粒的成型率和细粉率测定: 取样品颗粒 30 g, 称定重量, 依次通过 20 目筛、50 目筛及 65 目筛。过筛时, 将筛保持水平状态, 左右往返轻轻筛动 5 min。以能通过 20 目筛, 但不能通过 50 目筛的颗粒为合格颗粒; 以能通过 65 目筛的粉末为细粉。分别精密称定合格颗粒和细粉重量, 按公式 1 和公式 2 计算成型率(%)和细粉率(%)。

$$\text{成型率}(\%) = \frac{\text{合格颗粒重量}}{\text{处方样品重量}} \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

$$\text{细粉率}(\%) = \frac{\text{细粉重量}}{\text{处方样品重量}} \times 100\% \quad (\text{公式 2})$$

1.2.1.2 颗粒的吸湿百分率测定: 预先将底部盛有氯化钠过饱和溶液的玻璃干燥器在室温放置 24 h, 使其达到平衡, 此时干燥器内的相对湿度为 75%。在已干燥恒重的称量瓶底部放入约 1 g 的样品, 精