

# 老年气虚血瘀型胸痹患者红细胞膜蛋白组成研究

李丽琦<sup>1</sup>, 牛雯颖<sup>2</sup>, 袁良杰<sup>2</sup>, 李凤金<sup>2</sup>, 张玉昆<sup>2</sup>, 刘莉<sup>2</sup>, 肖洪彬<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江省中医研究院, 哈尔滨 150046; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 目的: 利用 SDS-PAGE 法研究老年气虚血瘀型胸痹患者红细胞膜蛋白组成的变化。方法: 18 例老年气虚血瘀型冠心病(胸痹)患者, 以健康老年人(13 例)和健康青年人(10 例)为对照, 分析红细胞膜蛋白组成变化。结果: 与青年人比较, 冠心病组带 1 蛋白、带 3 蛋白、带 4.1 蛋白、带 4.2 蛋白、带 5 蛋白、原肌球蛋白和带 6 蛋白百分含量均显著降低; 且带 1、带 3、带 4.1、原肌球蛋白百分含量均显著低于健康老人组。结论: 气虚血瘀型冠心病心绞痛患者的膜蛋白组成发生变化, 可能是导致抗氧化能力低下, 膜流动性降低的原因之一。

**[关键词]** 冠心病; 气虚血瘀型; 膜蛋白组成; 红细胞膜

**[中图分类号]** R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0251-03

## The Composition of Erythrocyte Membrane Proteins of the Senile Coronary Heart Disease Patients with Qi Deficiency and Blood Stasis

LI Li-qi<sup>1</sup>, NIU Wen-ying<sup>2</sup>, YUAN Liang-jie<sup>2</sup>, LI Feng-jin<sup>2</sup>, ZHANG Yu-kun<sup>2</sup>, LIU Li<sup>2</sup>, XIAO Hong-bin<sup>2\*</sup>

(1. Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150046, China;

2. Heilongjiang University Of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the changes in the components of erythrocyte membrane proteins of the senile coronary heart disease patients with qi deficiency and blood stasis. **Method:** Eighteen coronary heart disease patients with Qi deficiency and blood stasis, thirteen healthy old people and ten healthy young people were the coronary patient group and healthy old people control group and healthy young people control group. The composition of erythrocyte membrane proteins was analysed by SDS-PAGE. **Result:** The percentage composition of band 1 protein, band 3 protein, band 4.1 protein, band 4.2 protein, band 5 protein, band 6 protein and tropomodulin of coronary patients were significantly lower than those of the healthy young people. The percentage composition of band 1 protein, band 3 protein and band 4.2 protein of the healthy old people were significantly higher than those of coronary patients. **Conclusion:** The mechanism of decreasing antioxidant ability and membrane fluidity may be related with the changes in composition of membrane protein.

**[Key words]** coronary heart disease; Qi deficiency and blood stasis; composition of membrane protein; erythrocyte membrane

**[收稿日期]** 20120104(102)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173186); 教育部高等学校博士学科点专项基金(20092327110005)

**[第一作者]** 李丽琦, 副主任医师, 在读博士, 从事中医肾病临床及实验研究, Tel: 15046081640, E-mail: liliyaheida@163.com

**[通讯作者]** \* 肖洪彬, 教授, 从事方剂配伍规律及方剂疗效客观化的研究, Tel: 0451-82193409, E-mail: hrhxiaohongbin@126.com

周期研究结果表明, 气虚血瘀型冠心病心绞痛患者全血黏度、血浆黏度显著升高, 红细胞变形能力明显降低, 而其红细胞表面唾液酸含量和巯基含量减少、膜胆固醇含量增多可能与上述血液流变学改变有关。此外, 红细胞膜的力学性质主要由膜骨架的结构决定, 如果构成膜骨架的各种蛋白相互之间的作用异常或某种蛋白有缺陷均可引起红细胞膜力学性质的改变, 从而导致膜流动性改变<sup>[1]</sup>。因此, 运用已经建立的红细胞膜成分研究平台, 以气虚血

瘀冠心病心绞痛患者作为研究对象,旨在从红细胞膜蛋白组成的变化探讨红细胞变形能力改变在红细胞膜上的发生机制,为今后活血化瘀方药在红细胞膜上的可能作用机制、作用靶点的研究提供技术平台。

## 1 资料

**1.1 临床资料** 所有病例均为黑龙江中医药大学附属第一医院心血管一科 2010 年 7 月至 2011 年 1 月住院患者,共 18 例,男 9 例,年龄( $57.2 \pm 13.5$ )岁;女 9 例,年龄( $65.1 \pm 7.1$ )岁;平均( $61.2 \pm 11.2$ )岁。同时选择黑龙江中医药大学附属第一医院保健科 2010 年 9 月至 2010 年 12 月体检的老年健康者 13 例,男 8 例,年龄( $58.3 \pm 5.6$ )岁;女 5 例,年龄( $55.2 \pm 6.8$ )岁;平均( $57.1 \pm 6.0$ )岁。冠心病(气虚血瘀型胸痹)患者组与健康老年人组年龄、性别比例无统计学差异。另外收集黑龙江中医药大学附属第一医院保健科 2010 年 9 月至 2010 年 12 月青年健康者 10 例作为青年对照组,男 4 例,年龄( $26.8 \pm 0.5$ )岁;女 6 例,年龄( $24.0 \pm 1.1$ )岁;平均( $25.1 \pm 1.7$ )岁。上述所有入选者皆知情同意。

## 1.2 诊断标准

**1.2.1 西医诊断标准** 参照国际心脏病学会和协会及世界卫生组织临床命名标准化联合专题组报告《缺血性心脏病的命名及诊断标准》<sup>[2]</sup>。

**1.2.2 中医诊断标准** 参照《中药新药治疗冠心病心绞痛的临床研究指导原则》(2002 年版)<sup>[3]</sup>。

**1.3 纳入标准** ①冠心病心绞痛(气虚血瘀型胸痹)患者纳入标准:符合上述诊断标准者;全血黏度或者血脂指标检查,其中之一高于正常值;年龄 45 ~ 75 岁者;知情同意者。②健康老人纳入标准:符合中华医学会老年医学分会制定补充修订的我国健康老年人的标准。③健康青年纳入标准:体格检查及理化检查为正常健康人;年龄 18 ~ 27 岁;知情同意者。

## 1.4 排除标准

**1.4.1 西医排除标准** ①急性心肌梗死、急性心力衰竭、合并严重高血压血压控制欠佳、重度心律失常者(持续性快速房颤、房扑,频发室早,室速);②合并糖尿病酮症酸中毒;③合并肝、肾、造血系统等严重原发性疾病者;④过敏体质者;⑤智力障碍,精神、神志障碍者;⑥妊娠或哺乳妇女。⑦不符合纳入标准者。

**1.4.2 中医排除标准** 根据冠心病心绞痛(胸痹)气虚血瘀证的中医证候诊断标准,出现气虚证或血

瘀证并见且难以区分偏向者。

**1.5 仪器** DYY-11 型电泳仪及垂直板电泳装置,北京市六一仪器厂;凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

**1.6 试剂** SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒,康为世纪生物科技有限公司;蛋白 ladder( $10 \sim 250 \times 10^{-3}$ ),钮英伦生物技术(北京)有限公司。

## 2 方法

**2.1 红细胞膜制备** 取新鲜肝素抗凝血 5 mL,  $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$  离心 10 min,除去中间白细胞和血小板层,以 1:3 比例加入等渗 pH 7.4 PBS,  $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$  离心 10 min,反复洗涤 3 次,得干净红细胞。按 1:80 比例向红细胞中加预冷  $5\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.4 Tris-HCl 溶液<sup>[4]</sup>,同时加入  $0.1\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  蛋白酶抑制剂 PMSF,超声 15 min(80 Hz, 20 °C),4 °C 冰箱过夜。红细胞溶血液以  $15\ 000\ r \cdot \min^{-1}$  离心 10 min,弃上清液,加入  $5\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 7.4 Tris-HCl 溶液,以  $15\ 000\ r \cdot \min^{-1}$  离心 10 min,反复洗涤 3 次,最后得到乳白色膜,将其 1:1 悬浮于 PBS 溶液中,膜蛋白定量后置入低温冰箱备用。

**2.2 红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 电泳** 取红细胞膜液加 50  $\mu\text{L}$  SDS 裂解液,混匀,静置 10 min,离心( $15\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ , 10 min)。取 100  $\mu\text{L}$  上清液加 100  $\mu\text{L}$  样品处理液,沸水中煮沸 3 ~ 5 min,离心( $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ , 5 min)后进行电泳,以 80 V 电压电泳,到分离胶处变电压为 160 V,电泳约 2 h,0.5% 考马斯亮蓝染色 2 h,再用脱色液脱色 1 夜,次日用凝胶成像系统观察成像情况,对条带进行定量分析,膜蛋白各组分的含量以膜蛋白与蛋白 ladder 积分灰度的比值表示。

## 3 结果

因血量不够,最后取得有效数据的人数为冠心病组 15 人,健康老人组 10 人,青年人组 10 人。青年人组带 1 蛋白、带 3 蛋白、带 4.1 蛋白、4.2 蛋白、带 5 蛋白、带 6 蛋白和原肌球蛋白百分含量均显著高于冠心病病人组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );健康老人组带 1 蛋白、带 3 蛋白、带 4.1 蛋白和原肌球蛋白百分含量均显著高于冠心病病人组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。说明冠心病病人红细胞膜蛋白含量同青年人和健康老年人比较有一定的改变。同时亦证明,青年人组的带 4.1 蛋白和原肌球蛋白百分含量明显高于健康老人( $P < 0.01$ )。见表 1、图 1 和图 2。

## 4 结论与讨论

膜蛋白是决定膜流动性的重要因素,许多改变

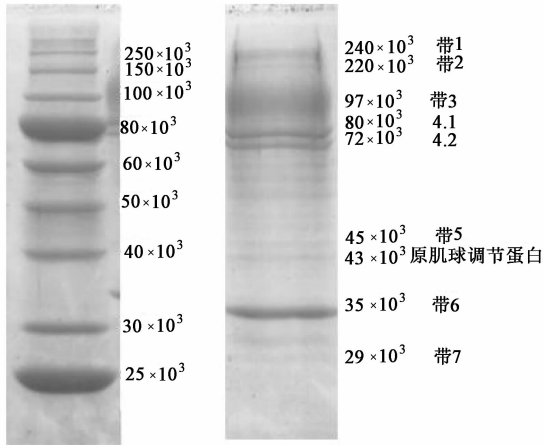
表1 气虚血瘀型冠心病患者红细胞膜

蛋白含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )

%

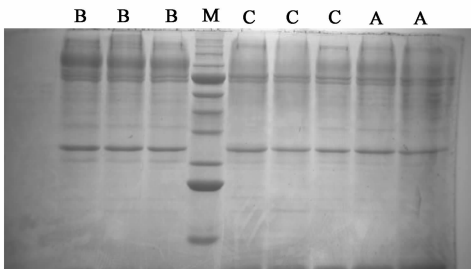
组别	蛋白含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )		
	冠心病病人 (n=15)	健康老人 (n=10)	青年人 (n=10)
带1蛋白(240 kD)	1.24 ± 0.50	1.68 ± 0.62 <sup>1)</sup>	1.76 ± 0.58 <sup>2)</sup>
带2蛋白(220 kD)	1.45 ± 0.62	1.65 ± 0.58	1.79 ± 0.76
带3蛋白(97 kD)	4.64 ± 2.95	6.80 ± 2.60 <sup>1)</sup>	7.81 ± 1.96 <sup>2)</sup>
带4.1蛋白(80 kD)	2.05 ± 0.71	2.56 ± 0.46 <sup>2)</sup>	2.99 ± 0.51 <sup>2,4)</sup>
带4.2蛋白(72 kD)	2.08 ± 0.59	2.28 ± 0.38	2.46 ± 0.37 <sup>1)</sup>
带5蛋白(45 kD)	1.53 ± 0.36	1.71 ± 0.45	1.97 ± 0.53 <sup>1)</sup>
原肌球蛋白(43 kD)	1.46 ± 0.31	1.69 ± 0.24 <sup>1)</sup>	2.07 ± 0.44 <sup>2,4)</sup>
带6蛋白(35 kD)	3.59 ± 1.56	4.22 ± 0.67	4.56 ± 0.84 <sup>1)</sup>
带7蛋白(29 kD)	1.58 ± 0.29	1.43 ± 0.27	1.63 ± 0.42

注:与冠心病病人组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与健康老人组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。



A. 蛋白 ladder; B. 青年人

图1 蛋白 ladder 和青年人红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 电泳图



A. 冠心病病人组; B. 健康老人组; C. 青年人组; M. 蛋白 ladder

图2 气虚血瘀型冠心病病人红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 电泳图

膜流动性的因素,亦可通过改变膜蛋白以及其和膜脂的相互作用而起作用。

随着蛋白 4.1 与带 3 蛋白的分离,带 3 蛋白与锚蛋白的相互作用增强,使细胞膜的变形性下降;此外,膜氧化可导致膜收缩蛋白、带 3 蛋白数量减少,减弱收缩蛋白结合带 4.1 蛋白的能力,从而降低结合肌动蛋白的能力,使膜分子结构改变,导致膜流动性改变;带 4.2 蛋白的缺失,减弱了肌动蛋白与带 3 蛋白的结合能力,进而影响到以肌动蛋白构成红细胞膜骨架蛋白为主的二维网状结构的功能,引起红细胞膜形状,寿命以及结构中其他蛋白含量变化;带 4.1 蛋白与血型糖蛋白作用,带 4.1 蛋白的 N 端带正电荷,唾液酸是细胞膜上糖蛋白和糖脂糖链末端的残基,因此血型糖蛋白带负电荷,两者通过静电作用在一起。如果带 4.1 蛋白含量降低,与血型糖蛋白相互作用减少,则可使膜表面所带唾液酸量减少,从而导致低切变率时全血黏度增高。前期实验结果表明,气虚血瘀型冠心病患者红细胞变形性降低。而本实验结果表明,气虚血瘀型冠心病患者红细胞膜蛋白含量同青年人和健康老年人比较有一定的改变。冠心病患者组红细胞膜蛋白中带 1 蛋白、带 3 蛋白,带 4.1 蛋白,带 4.2 蛋白,带 5 蛋白原肌球蛋白、带 6 蛋白含量均显著低于青年组,且其带 1 蛋白、带 3 蛋白、带 4.1 蛋白和原肌球蛋白均显著低于健康老人组。由此可见,带 1 蛋白、带 3 蛋白、带 4.1 蛋白和原肌球蛋白百分含量降低,可能导致构成膜骨架的各种蛋白相互之间的作用异常,或某种蛋白有缺陷,均可引起红细胞膜力学性质的改变,从而导致膜流动性改变。气虚血瘀型冠心病心绞痛患者红细胞膜蛋白组成的变化可能是导致红细胞膜流动性和变形性降低的原因之一。

[参考文献]

[1] 卢义钦,刘俊凡. 红细胞膜蛋白与膜骨架[J]. 生命科学,2005,9(4):283.  
 [2] 国际心脏病学会和协会/世界卫生组织临床命名标准化专题组的联合报告. 缺血性心脏病诊断的命名及标准[J]. 国际心血管病杂志,1979,6:365.  
 [3] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2002:69.  
 [4] 吕芳芳. 冠心病心绞痛不同证型与血液流变关系的探讨[J]. 北京中医,2004,23(6):327.

[责任编辑 何伟]