

PHÂN TÍCH CÁC GLYCOPROTEIN TRONG HUYẾT THANH BỆNH NHÂN HỘI CHỨNG MẠCH VÀNH CẤP

Đỗ Hữu Chí¹, Nguyễn Tiến Dũng¹, Phạm Đức Đan¹, Đặng Minh Hải²,
Đỗ Doãn Lợi², Nguyễn Bích Nhi¹, Phan Văn Chí^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *chi@ibt.ac.vn

²Viện tim mạch, Bệnh viện Bạch Mai

TÓM TẮT: Hội chứng mạch vành cấp (Acute Coronary Syndrome, ACS) hiện đang là vấn đề sức khỏe rất được quan tâm trên thế giới do bệnh thường uy hiếp tính mạng con người một cách đột ngột, tỷ lệ tử vong và di chứng do bệnh hội chứng mạch vành cấp vẫn chiếm hàng đầu và đang có xu hướng gia tăng nhanh chóng ở nhiều nước phát triển. Vì vậy, nghiên cứu tìm kiếm các biomarker để chuẩn đoán sớm bệnh hội chứng mạch vành cấp là một yêu cầu mang tính cấp thiết. Glycosyl hóa là một biến đổi sau dịch mã phổ biến, đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sinh lý như: đáp ứng miễn dịch, điều hòa chu trình tế bào, là nhân tố chỉ thị của môi trường ảnh hưởng lên các quá trình nội bào và liên quan đến nhiều con đường chuyển dạng từ tế bào bình thường thành tế bào ung thư. Những nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng, những protein bị glycosyl hóa thường liên quan đến các quá trình bệnh lý khác nhau như: tiểu đường, sơ nang, Alzheimer, viêm khớp, các bệnh tự miễn, bệnh tim, bệnh liên quan đến stress, ảnh hưởng đến chức năng thận và đặc biệt là ung thư. Hiện nay, bằng các kỹ thuật proteomics, đã có nhiều glycoprotein được xác định là chỉ thị phân tử đặc trưng cho nhiều bệnh lý trong đó có hội chứng mạch vành cấp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật điện di hai chiều kết hợp với sắc ký lỏng nano một chiều kết nối khối phổ liên tiếp (1D nanoLC-ESI MS/MS) để phân tích thành phần glycoprotein trong huyết thanh mẫu người bình thường và các bệnh nhân đau thắt ngực không ổn định, nhồi máu cơ tim cấp. Kết quả cho thấy, 3 glycoprotein có mức độ biểu hiện tăng (ceruloplasmin, haptoglobin và fibrinogen), 1 protein có mức độ biểu hiện giảm (Alpha-2-HS-glycoprotein) ở mẫu bệnh so với mẫu đối chứng.

Từ khóa: Đau thắt ngực không ổn định, glycoprotein, hội chứng mạch vành cấp, huyết thanh, khối phổ, nhồi máu cơ tim cấp, proteomics.

MỞ ĐẦU

Theo tổ chức Y tế thế giới (WHO), tim mạch là một căn bệnh có tỷ lệ tử vong cao nhất thế giới hiện nay. Các số liệu thống kê gần đây của Hoa Kỳ cho thấy, bệnh tim mạch đang ảnh hưởng đến hơn 60 triệu người Hoa Kỳ. Tại Việt Nam, theo thống kê của Hội Tim mạch học Việt Nam (6/2010), cứ 3 người Việt Nam trưởng thành thì có 1 người có nguy cơ mắc bệnh tim mạch, chủ yếu là hội chứng mạch vành cấp. Hội chứng mạch vành cấp có cơ sở sinh lý bệnh học là sự nứt hoặc vỡ của các mảng vữa xơ trên thành động mạch vành, gây hẹp hoặc tắc lòng mạch dẫn đến máu không lưu thông được trong cơ thể. Thuật ngữ hội chứng mạch vành cấp được sử dụng để chỉ toàn bộ bệnh lý cấp tính của động mạch vành mà theo truyền thống được chia thành cơn đau thắt ngực (angina), cơn đau thắt ngực không ổn định (unstable angina) và nhồi máu cơ tim cấp (myocardial infarction).

Nếu người bệnh được phát hiện trong giai đoạn cấp tính, quá trình điều trị bệnh sẽ hết sức khó khăn. Xem xét sự xuất hiện của các protein chỉ thị bệnh rất cần thiết trong quá trình chuẩn đoán, đặc biệt là chuẩn đoán sự có mặt của bệnh ở giai đoạn sớm và theo dõi sự tiến triển của bệnh để có thể áp dụng hướng điều trị hợp lý, tăng cường hiệu quả điều trị bệnh, nhờ đó bệnh nhân sớm hồi phục trở lại và kéo dài sự sống. Ngày nay, có nhiều protein chỉ thị bệnh đã được phát hiện, trở thành các chỉ tiêu xét nghiệm sinh hóa quan trọng không thể thiếu trong chuẩn đoán lâm sàng đối với hội chứng mạch vành cấp như: Hs-CRP (High-sensitivity C-reactive protein), BNP (Brain natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide), NT-proBNP (N-terminal pro-BNP), CK-MB (Creatine kinase-myocardial band), troponin...

Tuy nhiên, hệ protein trong huyết thanh người hết sức đa dạng và phức tạp, trong đó chỉ

tính riêng 22 loại protein có hàm lượng cao nhất đã chiếm đến 99% lượng protein tổng số [14]. Các protein này gây nhiều khó khăn cho quá trình nghiên cứu các protein có hàm lượng thấp và chính các protein có hàm lượng thấp này mới thực sự có nhiều ý nghĩa trong nghiên cứu sinh học và y học [1]. Vì vậy, việc phân đoạn protein trong huyết thanh trước khi nghiên cứu là rất cần thiết. Hiện nay, có rất nhiều phương pháp để phân đoạn protein như phương pháp sắc ký, cut-off (sử dụng màng lọc với các kích thước khác nhau), biến tính nhiệt... Trong đó, phương pháp sắc ký cột với chất giá Lectin Concanavalin A (conA) là một phương pháp phân đoạn huyết thanh hay được sử dụng và hiệu quả cao. Do đó, phân đoạn protein bằng phương pháp sắc ký ái lực được chúng tôi sử dụng để làm giảm bớt mức độ phức tạp của mẫu huyết thanh đồng thời giúp thu nhận thêm các glycoprotein phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Quá trình glycosyl hóa chiếm hơn 50% các biến đổi sau dịch mã và nhiều nghiên cứu đã chỉ ra sự liên quan của các glycoprotein đến nhiều bệnh lý khác nhau [9], trong đó, có hội chứng mạch vành cấp. Những glycoprotein bình thường cũng như các loại glycoprotein bị biến đổi bất thường từ các cơ quan, mô và tế bào có thể đi vào trong hệ thống tuần hoàn và trở thành các chất lưu chuyển trong huyết thanh. Vì lý do này, các glycoprotein huyết thanh trở thành đối tượng lý thú được sử dụng trong cả nghiên cứu và chẩn đoán bệnh. Gần đây trên thế giới, các kỹ thuật proteomics đã và đang phát triển mạnh mẽ trong lĩnh vực nghiên cứu về hội chứng mạch vành cấp, tuy nhiên tiềm năng ứng dụng vẫn còn rộng mở, đặc biệt là việc phát hiện các biomarker. Hiện tại, ở Việt Nam chưa có công bố nào liên quan đến việc áp dụng các kỹ thuật proteomics để nghiên cứu hệ glycoprotein ở những bệnh nhân mắc hội chứng mạch vành cấp. Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký ái lực với chất giá ConA được sử dụng để thu giữ các glycoprotein trong huyết thanh bệnh nhân. Sau đó, hỗn hợp glycoprotein này được thủy phân bằng trypsin, phân tích và nhận dạng bằng hệ thống sắc ký lỏng nano một chiều kết nối khối phổ liên tiếp (1D-LC ESI MS/MS). Kết quả đã xác định, nhận dạng được một số

glycoprotein có liên quan đến sự phát sinh và phát triển của bệnh, mở ra triển vọng cho việc tìm kiếm các chỉ thị có khả năng sử dụng trong chuẩn đoán lâm sàng với hội chứng mạch vành cấp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Vật liệu là mẫu huyết thanh người bình thường và người mắc bệnh hội chứng mạch vành cấp (40 mẫu được lựa chọn từ 120 mẫu) ở các giai đoạn bệnh, lứa tuổi khác nhau được tuyển chọn và cung cấp bởi Viện Tim mạch, Bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội.

Các hóa chất và enzyme sử dụng đều có độ tinh sạch cần thiết cho sinh học phân tử. Hệ thống máy sử dụng có độ tin cậy cao như: hệ thống máy khối phổ QSTAR[®] XL MS/MS (Applied Biosystem/MDS Sciex, Toronto, Canada), sắc ký lỏng nano đa chiều (bao gồm cột SCX, cột Reversed Phase trap, cột C18) được cung cấp bởi LC Packings/Dionex (Amsterdam, Hà Lan). Các thiết bị điện di 1 chiều SDS-PAGE, điện di 2-DE mua từ Bio-Rad (Hercules, CA, Hoa Kỳ) cùng với các trang thiết bị khác của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp

Thu nhận glycoprotein bằng sắc ký ái lực

ConA được hòa vào trong đệm cân bằng (Tris-HCl 20 mM NaCl 0,5 M; pH 7,4) và nhồi lên cột có đường kính 1 cm, thể tích gel nhồi trên cột được tính toán phù hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 300 µl huyết thanh nguyên (tương đương khoảng 20 mg protein) được hòa trong 10 lần thể tích đệm cân bằng và được đưa lên cột sắc ký với tốc độ dòng 0,1 ml/phút. Sau đó, cột được rửa với 10 ml đệm cân bằng để loại các protein không bám cột. Các glycoprotein được thổi ra bằng 8 ml đệm thổi (0,25 mM methyl- α -D-glucopyranoside) ở tốc độ dòng 0,1 ml/phút. Nồng độ glycoprotein được xác định bằng phương pháp Bradford.

Phân tách protein bằng kỹ thuật điện di hai chiều (2DE)

Hỗn hợp glycoprotein được làm sạch bằng

phương pháp tủa với acetone lạnh theo tỷ lệ thể tích protein/acetone là 1/4, và giữ qua đêm ở -20°C . Sau đó, hỗn hợp glycoprotein tinh sạch được thu nhận bằng ly tâm ở 12000 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút. Hỗn hợp glycoprotein (chứa khoảng 170 μg protein) sau đó được hòa trong 125 μl dung dịch rehydration và đưa lên thanh gel kích thước 7 cm, pH 4-7 (Bio-Rad, Hoa Kỳ). Quá trình điện di chiều 1 (điện di đẳng điện) và chiều 2 (SDS-PAGE, 12,6%) được thực hiện trên hệ thống thiết bị của hãng Bio-Rad (Hercules, Hoa Kỳ) theo khuyến cáo. Các bản gel sau đó sẽ được nhuộm bằng Commassie Brilliant Blue R-250 trước khi xử lý với phần mềm PD Quest v8.1.

Thủy phân protein trong gel bằng trypsin

Các điểm glycoprotein huyết thanh khác biệt giữa người bình thường và bệnh nhân có hội chứng mạch vành cấp trên bản điện di 2-DE được cắt, rửa loại thuốc nhuộm bằng dung dịch rửa (50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; pH 8,0; 50% ACN). Sau đó, các mảnh gel được làm khô bằng 100% ACN (Acetone nitrile) và khử bằng DTT (Dithiothreitol) với dung dịch khử chứa 5 mM DTT ở 56°C trong 30 phút. Sau khi khử, gel được alkyl hóa bằng IAA (Iodoacetamide) với dịch alkylation chứa 5 mM IAA trong tối, 1 giờ, ở nhiệt độ phòng. Enzyme trypsin (loại sử dụng cho đọc trình tự, Sigma-Aldrich) được thêm vào với tỷ lệ enzyme/cơ chất là 1/30, ở 37°C qua đêm. Hỗn hợp peptide sau đó được chiết ra khỏi gel bằng dung dịch chiết chứa 50% ACN; 1% TFA.

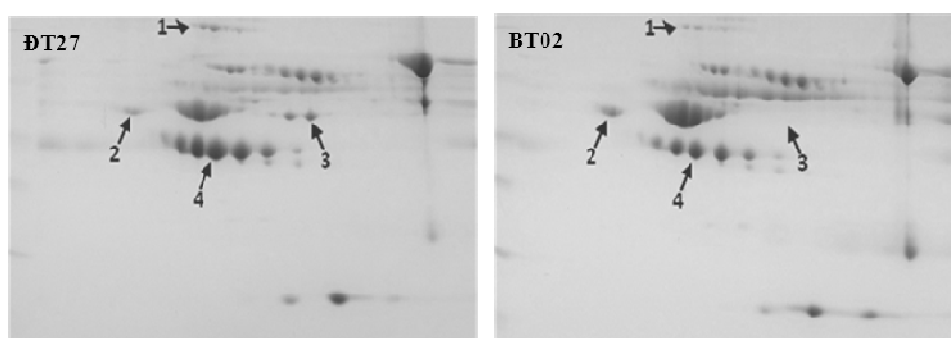
Nhận diện protein bằng sắc ký lỏng nano 1 chiều kết nối khối phổ

Hỗn hợp peptide sau khi thủy phân được phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng nano 1 chiều kết nối khối phổ. Peptide sẽ được loại muối và cô đặc trên cột TRAP C18 (LC Packing, Dionex, Hà Lan) trước khi phân tách trên cột sắc ký ngược pha C18 (GraceVydac, Hesperia, CA, Hoa Kỳ). Mẫu được hòa trong dung dịch đệm A (FA 0,1%) và đưa lên cột với tốc độ dòng 0,2 μl /phút. Các peptide được thổi ra khỏi cột C18 bằng gradient dung dịch đệm B (85% ACN trong 0,1% FA) trong 60 phút. Từ phổ khối peptide thu được, quá trình nhận diện protein được tiến hành với phần mềm Mascot v1.8 (Matrix Science Ltd., London, Anh) trên cơ sở dữ liệu Swiss-Prot.

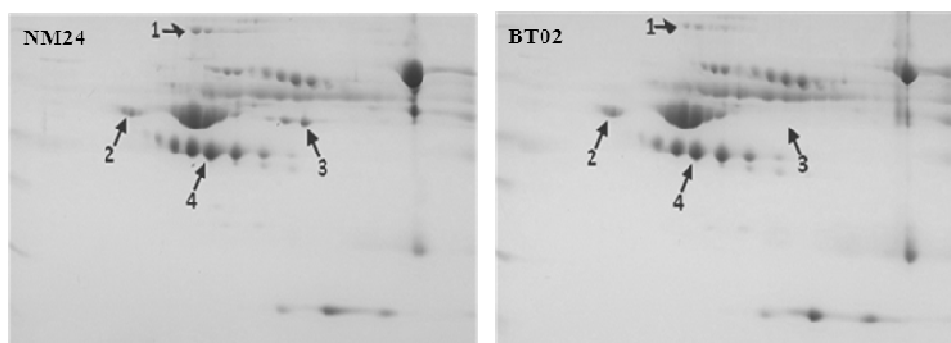
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tách protein bằng điện di 2DE

Nồng độ glycoprotein huyết thanh sử dụng trong phân tích của các mẫu bệnh hội chứng mạch vành cấp và mẫu đối chứng được tính toán tương đương nhau bằng phương pháp Bradford. Mức độ biểu hiện của các glycoprotein huyết thanh mẫu bệnh và đối chứng được so sánh trên bản điện di hai chiều. Kết quả phân tách 2DE glycoprotein huyết thanh được thể hiện ở hình 1 và 2. Dưới sự hỗ trợ của phần mềm PD Quest v8.1, 4 vùng điểm có mức độ biểu hiện thay đổi giữa các mẫu bệnh và đối chứng (được đánh dấu bằng mũi tên) đã được phát hiện trong đó: 3 vùng điểm có mức độ biểu hiện tăng (vùng điểm 1, 3, 4) và 1 vùng điểm có mức độ biểu hiện giảm (vùng điểm 2) ở mẫu bệnh so với mẫu đối chứng.



Hình 1. So sánh mức độ biểu hiện của các protein huyết thanh bệnh nhân mắc hội chứng đau thắt ngực không ổn định (mẫu ĐT27) và mẫu đối chứng (mẫu BT02) trên hình ảnh điện di 2 chiều, các protein có mức độ biểu hiện thay đổi được đánh dấu từ 1→4.



Hình 2. So sánh mức độ biểu hiện của các protein huyết thanh bệnh nhân mắc hội chứng nhồi máu cơ tim cấp (mẫu NM24) và mẫu đối chứng (mẫu BT02) trên hình ảnh điện di 2 chiều, các protein có mức biểu hiện thay đổi được đánh dấu từ 1→4.

Kết quả phân tách bằng điện di 2DE trên hình 1 và 2 cho thấy, có sự khác biệt về mức độ biểu hiện của khá nhiều điểm/vùng điểm protein. Tuy nhiên, rõ nét nhất là vùng điểm được đánh dấu trên ảnh, trong đó vùng 1 và 4 có biểu hiện tăng ở bệnh nhân, vùng 2 có mức độ biểu hiện giảm, vùng 3 xuất hiện ở huyết thanh bệnh nhân mà không thấy ở mẫu đối chứng, các thay đổi này có sự lặp lại ở các mẫu nghiên cứu. So sánh mức độ biểu hiện giữa mẫu NM24 và ĐT27, chúng tôi nhận thấy, ở bệnh nhân nhồi máu cơ tim cấp có mức biểu hiện thay đổi rõ hơn ở bệnh nhân đau thắt ngực không ổn định.

Nhận diện protein bằng hệ nanoLC-ESI-MS/MS

Các điểm/vùng điểm glycoprotein có mức biểu hiện thay đổi được cắt, thủy phân với trypsin và phân tích trên hệ thống 1DnanoLC-MS/MS, nhận diện bằng phần mềm Mascot v1.8 trên cơ sở dữ liệu NCBI cập nhật với hơn 8,3 triệu trình tự khác nhau. Tổng hợp kết quả nhận diện bằng phần mềm Mascot v1.8 và đối chiếu với cơ sở dữ liệu về điện di 2-DE từ EXPASY, 4 glycoprotein có mức độ biểu hiện thay đổi ở mẫu bệnh so với mẫu đối chứng đã được xác định (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả nhận diện các glycoprotein biểu hiện thay đổi giữa mẫu ĐT27, NM24 và BT02 (Đau thắt: đau thắt ngực không ổn định, nhồi máu: nhồi máu cơ tim cấp)

Thứ tự Spot	Số đăng ký	Tên protein	Mức độ biểu hiện	
			Đau thắt	Nhồi máu
1	gi 1620909	Ceruloplasmin (CP)	Tăng	Tăng
2	gi 178284	Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG)	Giảm	Giảm
3	gi 7924018	Fibrinogen (FGB)	Tăng	Tăng
4	gi 4826762	Haptoglobin (HP)	Tăng	Tăng

Thảo luận

Phương pháp sắc ký ái lực với ConA đã phân tách các glycoprotein ra khỏi hỗn hợp protein không bị glycosyl hóa, đồng thời loại những protein có hàm lượng lớn (như albumin) cản trở quá trình phân tích [9]. Như vậy, phương pháp này đã giảm được độ phức tạp của mẫu phân tích, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phân tách protein bằng điện di 2 chiều và

nhận dạng bằng khối phổ. Nhờ phân tích hình ảnh gel bằng các phần mềm chuyên dụng, sự có mặt và mức độ biểu hiện của hệ glycoprotein trong huyết thanh bệnh nhân đã được phát hiện. Các glycoprotein được nhận dạng nằm trong các nhóm: kháng thể, bổ thể, protein vận chuyển, chất ức chế protease, các thụ thể truyền tin hoặc là các protein đa chức năng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định được sự thay đổi rõ rệt của 4 loại glycoprotein liên quan đến bệnh 3

protein có mức độ biểu hiện tăng (ceruloplasmin, haptoglobin, fibrinogen), 1 protein có mức độ biểu hiện giảm (Alpha-2-HS-glycoprotein).

Ceruloplasmin (ferroxidase) là α -glycoprotein, được hình thành bởi một chuỗi polypeptide đơn gồm 1046 amino acid và có trọng lượng phân tử khoảng 132 kDa. Ceruloplasmin là một loại protein đa chức năng, đó là vận chuyển Cu, oxi hóa các amin hữu cơ, oxi hóa Fe^{2+} thành Fe^{3+} , điều tiết nồng độ sắt trong tế bào và đặc biệt là có cả tính năng oxy hóa và chống oxy hóa ở hai vùng hoạt tính khác nhau [8]. Chính vì vai trò quan trọng trong các quá trình trao đổi chất và có hàm lượng cao trong huyết thanh nên ceruloplasmin có liên quan đến nhiều bệnh lý khác nhau như: bệnh Wilson [18], ung thư vú [22], ung thư phổi [17] và bệnh Alzheimer [15]. Đối với bệnh tim mạch, ceruloplasmin được coi là có vai trò trong oxidative stress biểu hiện ở các bệnh nhân mang bệnh tim mạch [3]. Lượng ceruloplasmin tăng đáng kể trong máu của các bệnh nhân có mang bệnh động mạch vành [12] và có thể là marker độc lập cho chứng xơ vữa động mạch vành [20]. Ceruloplasmin còn biểu hiện là một nhân tố tiên đoán kết quả lâu dài của bệnh đau thắt ngực không ổn định tốt hơn fibrinogen, CRP và IL-6 [24]. Do ceruloplasmin có cả tính oxy hóa và chống oxy hóa, cộng đồng khoa học còn đang tranh luận sự tăng nồng độ của ceruloplasmin là phản ứng của cơ thể nhằm kiểm chế mức độ oxy hóa [23], hay là tác nhân góp phần sinh bệnh [5]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy sự gia tăng đáng kể nồng độ của ceruloplasmin trong huyết thanh bệnh nhân có triệu chứng đau thắt ngực không ổn định và bệnh nhân bị nhồi máu cơ tim cấp.

Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG) là một glycoprotein hàm lượng cao trong huyết thanh với nồng độ từ 300 đến 600 mg/l, được tổng hợp trong gan và tiết vào máu, là một protein có nồng độ biến đổi trong các giai đoạn cấp tính, AHSG cấu tạo bởi hai chuỗi liên kết với nhau bằng cầu disulfua. Nồng độ của AHSG trong huyết thanh thường giảm đi khi xuất hiện các triệu chứng viêm nhiễm hay các khối u ác tính [2]. Các nghiên cứu sử dụng phương pháp phân tích hóa sinh truyền thống đã cho thấy, sự giảm

của nồng độ protein này ở bệnh nhân động mạch vành [10]. Nghiên cứu của chúng tôi, với hướng tiếp cận proteomic cũng nhận thấy, sự giảm của nồng độ protein này trong huyết thanh, kết quả có sự tương đồng với các nghiên cứu trước đây.

Để phát hiện chứng viêm các mảng bám của động mạch vành cách tốt nhất là xác định qua protein C phản ứng (C-reactive protein, CRP) hoặc fibrinogen, trong khi sự hình thành cục máu đông có thể được đánh giá qua test sự hình thành sợi huyết (fibrin) và sự kích hoạt tiểu cầu [6]. Fibrinogen là một glycoprotein hòa tan, trọng lượng phân tử 340 kDa, bao gồm ba chuỗi polipeptit liên kết với nhau bởi cầu disulphit. Fibrinogen chủ yếu được tổng hợp trong gan và quyết định độ nhớt của huyết tương trong khi gây ra sự tập kết thuận nghịch của tế bào hồng cầu. Bước cuối cùng thông thường của các hệ thống làm đông máu bên ngoài và nội tại liên quan đến việc kích hoạt yếu tố X thành Xa và sau đó kích hoạt prothrombin thành thrombin. Thrombin thúc đẩy sự phân cắt fibrinogen thành fibrin monome liên kết với nhau, với sự hỗ trợ của yếu tố XIII, để tạo thành cục máu đông [7]. Nồng độ fibrinogen trong huyết thanh thông thường từ 1,5-2,77 g/l, tùy thuộc vào phương pháp đo sử dụng. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy sự gia tăng nồng độ của protein này trong huyết thanh bệnh nhân tim mạch [11]. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu được công bố liên quan đến vai trò tiềm năng của fibrinogen như là 'dấu hiệu sinh học' của các bệnh tim mạch, tuy nhiên, vai trò về nồng độ fibrinogen trong huyết tương như một yếu tố nguy cơ của bệnh này vẫn còn là vấn đề được tranh luận. Các nghiên cứu quan sát tiên lượng cùng với các nghiên cứu dịch tễ học đã chứng minh rằng, nồng độ fibrinogen có thể tiên đoán về nguy cơ của bệnh động mạch vành [16]. Tuy nhiên, chứng xơ vữa động mạch đã tồn tại cũng có thể làm tăng nồng độ fibrinogen và do đó làm thay đổi quan hệ nhân-quả của fibrinogen khi tiên đoán đối với bệnh động mạch vành [19]. Đặc biệt, các chất đặc hiệu thuộc nhóm fibrate (một dẫn chất của acid fibric) như clofibrate và bezafibrate làm giảm nồng độ fibrinogen nhưng không cho thấy bất cứ tác động tích cực nào trong các nghiên cứu được theo dõi một cách

ngẫu nhiên [11]. Vì vậy, đến nay vẫn chưa rõ ràng rằng fibrinogen là một yếu tố có quan hệ nhân quả với bệnh động mạch vành hay chỉ đơn thuần là một dấu hiệu của cả hai tình trạng do bệnh đã tồn tại từ trước và các yếu tố nguyên nhân khác [21].

Haptoglobin (HP) là một glycoprotein được sinh ra chủ yếu bởi các tế bào gan và một số mô khác trong cơ thể như da, phổi, thận. HP có cấu trúc tetramer gồm hai chuỗi alpha và hai chuỗi beta, liên kết với nhau bằng cầu disulfide. HP được coi là chất phản ứng trong các giai đoạn cấp tính. Chúng liên kết với các phân tử hemoglobin tự do, làm giảm sự lưu thông của các phân tử này và qua đó giúp cơ thể ngăn chặn các tổn thương ở thận và sự mất mát các chất sắt sau quá trình hemolysis. Mức độ glycosyl hóa haptoglobin bất thường sẽ liên quan đến các trạng thái bệnh lý của cơ thể như: quá trình phá hủy mô, các phản ứng viêm nhiễm do sự hoại tử (necrosis) hoặc là ung thư. Đã có nhiều nghiên cứu về sự biến đổi bất thường của nồng độ HP trong huyết thanh của các đối tượng bệnh khác nhau. Nghiên cứu của Ghadam P [4] đã cho thấy sự liên quan của các kiểu hình của gen HP đến các bệnh nhân tiểu đường type 2 có biến chứng tim mạch. Một nghiên cứu khác của Lavie et al. (2003) [13] đã cho thấy, sự gia tăng đáng kể nồng độ của HP trong huyết thanh bệnh nhân động mạch vành.

KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật điện di hai chiều kết hợp sắc ký lỏng nano một chiều kết nối khối phổ liên tiếp (1D-NanoLC-ESI MS/MS) đã xác định được 4 glycoprotein huyết thanh bệnh nhân hội chứng mạch vành cấp có mức độ biểu hiện thay đổi so với mẫu đối chứng, trong đó có 3 protein (ceruloplasmin, fibrinogen, haptoglobin) có mức độ biểu hiện tăng và 1 protein (alpha-2-HS-Glycoprotein) có mức độ biểu hiện giảm. Kết quả có tính lặp lại ở mẫu bệnh so với mẫu đối chứng.

Lời cảm ơn: Công trình này được hỗ trợ về kinh phí của đề tài độc lập thuộc Phòng thí nghiệm Trọng điểm Quốc gia, Bộ Khoa học và Công nghệ (2011-2013), mã số: 03/2011/PTNTĐ/HĐ-ĐTĐL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anderson N. L., Anderson N. G., 2002. The human plasma proteome, history, character and diagnostic prospects. *Molecular Cellular Proteomics.*, 1: 845-867.
2. Daveau M., Davrinche C., Djelassi N., Lemetayer J., Julien N., 1990. Partial hepatectomy and mediators of inflammation decrease the expression of liver alpha 2-HS glycoprotein gene in rats. *FEBS Lett.*, 273: 79-81.
3. Fox P. L., Mazumder B., Ehrenwald E., Mukhopadhyay C. K., 2000. Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.*, 28: 1735-1744.
4. Ghadam P., Abadi A., Asadzadeh A., Safari N., Shabani A., Sharifian M., 2008. The Relationship of Haptoglobin Polymorphism and Cardiovascular Diseases in Some of Iranian Diabetic Patients. *Journal of Biological Sciences.*, 8(6): 1100-1103.
5. Gocmen A. Y., Sahin E., Semiz E., Gumuslu S., 2008. Is elevated serum ceruloplasmin level associated with increased risk of coronary artery disease? *Can J. Cardiol.*, 24(3): 209-212.
6. Gil M., Zarebinski M., Adamus J., 2002. Plasma fibrinogen and troponin I in acute coronary syndrome and stable angina. *Int. J. Cardiol.*, 83: 43-46.
7. Herrick S., Blanc-Brude O., Gray A., Laurent G., 1993. Fibrinogen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31: 741-746.
8. Healy J., Tipton K., 2007. Ceruloplasmin and what it might do. *J. Neural Transm Netherlands.*, 114: 777-781.
9. Jakob B. B., Alexandre J. P., Jacok R. V., Wisniewski P., 2004. Screening for N-glycosylate proteins by liquid chromatography mass spectrometry. *Proteomics*, 4: 454-465.
10. Joachim H., Barrett-Connor E., Wassel C. L., Cummins K., Bergstrom J., Daniels L. B., Laughlin G. A., 2011. The Associations of Fetuin-A With Subclinical Cardiovascular Disease in Community-

- Dwelling Persons. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 58: 2372-2379.
11. Kaptoge S., White I. R., Thompson S. G., Wood A. M., Lewington S., Lowe G. D., Danesh J., 2007. Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: Individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: The Fibrinogen Studies Collaboration. *Am. J. Epidemiol.*, 166: 867-879.
 12. Kaur K., Bedi G., Kaur M., Vij A., Kaur I., 2008. Lipid peroxidation and the levels of antioxidant enzymes in coronary artery disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry India.*, 23(1): 33-37.
 13. Lavie L., Lotan R., Hochberg I., Herer P., Lavie P., Levy A. P., 2003. Haptoglobin polymorphism is a risk factor for cardiovascular disease in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep (Rochester).*, 26(5): 592-595.
 14. Li J., Kelly J. F., Chernushevich I., Harrison D. J., Thibault P., 2000. Separation and Identification of Peptides from Gel-Isolated Membrane Proteins Using a Microfabricated Device for Combined Capillary Electrophoresis/Nanoelectrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 72: 599-609.
 15. Lutsenko S., Gupta A., Burkhead J. L., Zuzel V., 2008. Cellular multitasking: The dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Arch. Biochem. Biophys.*, 476(1): 22-32.
 16. Maresca G., Di Blasio A., Marchioli R., Di Minno G., 1999. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 19: 1368-1377.
 17. Poukkula A., Hakala M., Huhti E., 1987. Serum copper, zinc and ceruloplasmin concentrations in patients with lung cancer. *Respiration international review of thoracic diseases.*, 51(4): 272-276.
 18. Scheinberg I. H., Gitlin D., 1952. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science.*, 116(3018): 484-485.
 19. Stefanadi E., Tousoulis D., Papageorgiou N., Briasoulis A., Stefanadis C., 2010. Inflammatory biomarkers predicting events in atherosclerosis. *Curr. Med. Chem.*, 17: 1690-1707.
 20. Mori T., Sasaki J., Kawaguchi H., Handa K., Takada Y., Matsunaga A., Kono S., Arakawa K., 1995. Serum glycoproteins and severity of atherosclerosis. *Am. Heart J.*, 129(2): 234-238.
 21. Tousoulis D., Papageorgiou N., Androulakis E., Briasoulis A., Antoniadis C., Stefanadis C., 2011. Fibrinogen and cardiovascular disease: Genetics and biomarkers. *Blood Rev.*, 239-245.
 22. Vaidya S. M., Kamalakar P. L., 1998. Copper and ceruloplasmin levels in serum of women with breast cancer. *Indian Journal of Medical Sciences.*, 52(5): 184-187.
 23. Verma V. K., Ramesh V., Tewari S., Gupta R. K., Sinha N., Pandey C. M., 2005. Role of bilirubin, vitamin C and ceruloplasmin as antioxidants in coronary artery disease (CAD). *Indian J. Clin. Biochem.*, 20(2): 68-74.
 24. Ziakas A., Gavriliadis S., Souliou E., Giannoglou G., Stiliadis I., Karvounis H., Efthimiadis G., Mochlas S., Vayona M. A., Hatzitolios A., Savopoulos C., Pidonia I., Parharidis G., 2009. Ceruloplasmin is a better predictor of the long -Term prognosis compared with fibrinogen, CRP and IL-6 in patients with severe unstable angina. *Angiology.*, 60(1): 50-59.

ANALYSIS OF HUMAN SERUM GLYCOPROTEINS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

Do Huu Chi¹, Nguyen Tien Dung¹, Pham Duc Dan¹, Dang Minh Hai²,
Do Doan Loi², Nguyen Bich Nhi¹, Phan Van Chi¹

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Vietnam heart institute, Bach Mai hospital

SUMMARY

Acute coronary syndrome (ACS) is a health issue of great concern worldwide due to its sudden attack, high mortality rate and serious sequelae, with the number of patients increasing rapidly in both developing and developed countries. For this reason, research on diagnostic biomarkers for early diagnosis ACS is very important. Nowadays, glycoprotein has become a main research trend of proteomics. Glycosylation is a common post-translational modification, playing an important role in many processes of the body. At the same time, recent studies have shown that the glycosylated proteins are often related to pathologies of diseases: Arthritis, Alzheimer's, diabetes, leukemia, cardiovascular. Many glycoproteins identified by proteomics techniques have been currently applied as molecularly characteristic biomarkers for various diseases including acute coronary syndrome. In this study, we use two-dimensional electrophoresis technique combined with one-dimensional nano liquid chromatography connected to mass spectrometry (1D nanoLC-ESI MS / MS). Our results show that expression levels of 3 proteins, namely ceruloplasmin, haptoglobin and fibrinogen increased, and alpha-2-HS-glycoprotein had a decreased level in patient samples.

Keywords: Glycoprotein, acute coronary syndrome, mass spectrometry, nano LC-MS/MS, proteomics.

Ngày nhận bài: 30-7-2012