

PHÂN TÍCH SỰ THAY ĐỔI CỦA CÁC GLYCOPROTEIN TRONG HUYẾT THANH BỆNH NHÂN ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYPE 2

NGUYỄN THỊ MINH PHƯƠNG, TRẦN THẾ THÀNH,
NGUYỄN BÍCH NHÌ, PHAN VĂN CHI

Viện Công nghệ sinh học

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một bệnh rối loạn chuyển hoá glucose thường gặp và có tỷ lệ người mắc bệnh ngày càng tăng, đặc biệt ở các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam. Năm 2002, theo tài liệu nghiên cứu của tổ chức Y tế thế giới, tại Việt Nam, tỷ lệ bệnh nhân mắc bệnh ĐTĐ là 0,12%. Với tính chất là một bệnh mãn tính, kéo dài gần như suốt đời, lại kèm theo nhiều biến chứng nguy hiểm như béo phì, tăng huyết áp, tăng lượng lipid máu, bệnh tim mạch [1], nên ĐTĐ không chỉ làm giảm chất lượng cuộc sống của người bệnh, mà còn gây ra những gánh nặng về mặt kinh tế do làm giảm lực lượng lao động xã hội và các chi phí tốn kém cho điều trị bệnh. Với lí do đó ĐTĐ là một vấn đề cần được quan tâm đầu tư nhiều hơn nữa.

Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu trên hệ proteome ở bệnh nhân ĐTĐ type 2. Các công bố cho thấy mức độ biểu hiện của các protein như haptoglobin, complement component 3, complement component 4, alpha2-HS glycoprotein, Alpha 1B-glycoprotein, Alpha-1-antichymotrypsin, Apolipoprotein AI, Apolipoprotein B100, Factor H, Pro-platelet basic protein, Serine (hoặc cysteine) proteinase Inhibitor clade A, Serine (hoặc cysteine) proteinase Inhibitor clade C, Vitronectin precursor, Fibronectin, C1 inhibitor, Alpha-2 macroglobulin có sự thay đổi ở bệnh nhân ĐTĐ type 2 [10]. Ở Việt Nam, ĐTĐ type 2 cũng được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu như quan hệ giữa nồng độ của CRP (C reactive protein) với BMI (body mass index), hay giá trị của HBA_{1c} huyết thanh trong chẩn đoán ĐTĐ [5]. Tuy nhiên, phương pháp chẩn đoán bệnh

cho đến nay thường mới chỉ dựa vào nồng độ đường huyết và bệnh thường được phát hiện khi nồng độ đường trong máu đã tăng. Hệ thống dự phòng, chẩn đoán bệnh sớm chưa được hoàn thiện. Do đó, mỗi năm có trên 70% bệnh nhân không được phát hiện và điều trị. Vì vậy, việc tìm kiếm các phương pháp chẩn đoán sớm bệnh ĐTĐ type 2 dựa trên các chỉ thị phân tử là rất cần thiết.

Ở bệnh nhân ĐTĐ type 2, nồng độ glucose máu tăng cao gây nên những bất thường trong quá trình glycosyl hóa protein và enzyme huyết thanh [2]. Vì vậy, có khả năng sử dụng glycoprotein huyết thanh trong nghiên cứu và chẩn đoán. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu dùng concanavalin A (Con A) làm chất ái lực để thu nhận các glycoprotein trong huyết thanh người. Các glycoprotein này tiếp đó được tiến hành điện di hai chiều và phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng kết hợp khối phổ liên tiếp, nhận dạng và so sánh giữa người bình thường và bệnh nhân ĐTĐ type 2.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Huyết thanh lấy từ 8 cá thể gồm cả nam và nữ (4 người bình thường, khỏe mạnh và 4 bệnh nhân ĐTĐ type 2, các bệnh nhân ĐTĐ type 2 có độ tuổi từ 46 - 69 tuổi, thời gian mắc bệnh từ 2 - 20 năm, người bình thường có sức khỏe tốt, không có biểu hiện mắc bệnh gì, và có độ tuổi từ 27 - 55), được chia nhỏ và bảo quản ở - 25°C đến khi sử dụng.

Các hóa chất đều có độ tinh sạch cần thiết: methanol, acetonitrile (ACN) được mua từ J.T. Barker (Pittsburgh, Mỹ); formic acid (FA), trifluor acetic acid (TFA) mua của Fluka (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland); dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), enzym trypsin, đường methyl alpha-D-glycopyranoside mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ); Agarose bound Concanavalin A mua từ Amersham Bioscience, GE. Các hóa chất dùng cho điện di mua từ Bio-Rad (Hercules, Mỹ).

2. Thu nhận glycoprotein bằng sắc ký ái lực với Con A

Glycoprotein huyết thanh được thu nhận qua cột sắc ký ái lực Con A theo quy trình [8]. 200 μ l huyết thanh được hòa trong 10 lần thể tích đệm cân bằng và đưa lên cột sắc ký với tốc độ dòng ra khỏi cột là 0,12 ml/phút. Sau 15 phút, phần không bám cột được rửa bằng 10 ml đệm cân bằng. Thành phần glycoprotein bám trên cột con A được thổi ra bằng 5 ml dung dịch thổi mẫu chứa 0,3 M methyl- α -D-glucopyranoside.

3. Điện di hai chiều (2DE)

Hỗn hợp glycoprotein (160 μ g) sau khi qua cột sắc ký ái lực được rửa bằng acetone lạnh với tỷ lệ mẫu/acetone:1/3 (v/v) tại -20°C qua đêm và sau đó được hòa lại trong 125 μ l dung dịch rehydration (8 M Urea, 2% CHAPS, đệm 0,8% IPG pH 4-7, 13 mM DTT). Hỗn hợp mẫu được rehydrate hóa trên thanh strip cố định (7 cm, pH 4-7; Bio-Rad, Mỹ) trong 12 h. Quá trình điện di đẳng điện được tiến hành trên hệ thống PROTEAN IEF cell (Bio-Rad, Mỹ) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, strip được khử bằng đệm cân bằng 1 (đệm 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, 1% DTT) và alkyl hoá bằng đệm cân bằng 2 (Urea 6M, SDS 2%, Tris-HCl pH 8,8 nồng độ 0,375M, Glycerol 20% và IAA 40 mg/ml). Các glycoprotein được phân tách chiều hai trên gel SDS-PAGE 12,6% sử dụng hệ thống điện di Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, Mỹ). Gel được nhuộm bằng dung dịch Commassie Brilliant Blue R-250 (CBBG). Bản gel sẽ được quét và phân tích hình ảnh bằng phần mềm Quantity One v 1.8.

4. Thủy phân glycoprotein trên gel và trong dung dịch

Hỗn hợp glycoprotein được thủy phân bằng

trypsin theo qui trình đã được mô tả [8] (1 phần được thủy phân trong dung dịch để nhận dạng tổng thể, 1 phần chạy 2DE). Trypsin được bổ sung vào dung dịch với tỷ lệ enzyme: cơ chất là 1:50 và ủ qua đêm tại 37°C .

5. LC MS/MS và nhận dạng protein

Hỗn hợp peptide sau khi thủy phân được phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng nano (nanoLC Packing, Dionex, Netherland) kết nối khối phổ liên tục LC/MS/MS. Các protein được nhận dạng thông qua phần mềm MASCOT v.1.4 (MatrixScience Ltd., London, UK) trên cơ sở dữ liệu NCBI nr. Các tham số tìm kiếm được thiết lập gồm: dữ liệu protein *Homo sapiens*, enzyme thủy phân trypsin, sửa đổi cố định và biến đổi được thiết lập tương ứng là carbamidomethyl (C) và oxidation (M), sai số của mảnh peptide và phổ MS/MS là 0,5 Dalton.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thu glycoprotein qua cột Con A

Chất ái lực sử dụng trong thí nghiệm này là Con A, một lectin có ái lực với các gốc alpha mannose, là thành phần tương đối phổ biến trong glycoprotein loại N-linked glycan. Như vậy nếu cho dung dịch huyết thanh đi qua cột thì chỉ các glycoprotein có ái lực với Con A được giữ lại trên cột, còn các protein khác sẽ bị loại bỏ. Các glycoprotein bám cột tiếp đó được thổi ra bằng methyl- α -D-glucopyranoside. Nồng độ protein trong huyết thanh nguyên, protein bám trên cột sắc ký và các protein không bám cột được xác định tương đối bằng hai phương pháp là đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 280 nm và quan sát trên bản gel SDS-PAGE 12,6%. Kết quả nhận được cho thấy hàm lượng protein bám cột được xác định bằng cả hai phương pháp đều xấp xỉ là 25% so với huyết thanh nguyên và trong thành phần protein bám cột không có mặt albumin là một protein có hàm lượng lớn, chiếm khoảng 50% protein huyết thanh tổng số, thường gây cản trở quá trình phân tích và không bị glycosyl hóa. Như vậy bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột Con A hầu hết glycoprotein đã được thu nhận và loại bỏ được protein hàm lượng lớn, làm giảm bớt độ phức tạp của mẫu phân tích, tạo điều kiện thuận lợi cho những nghiên cứu tiếp theo.

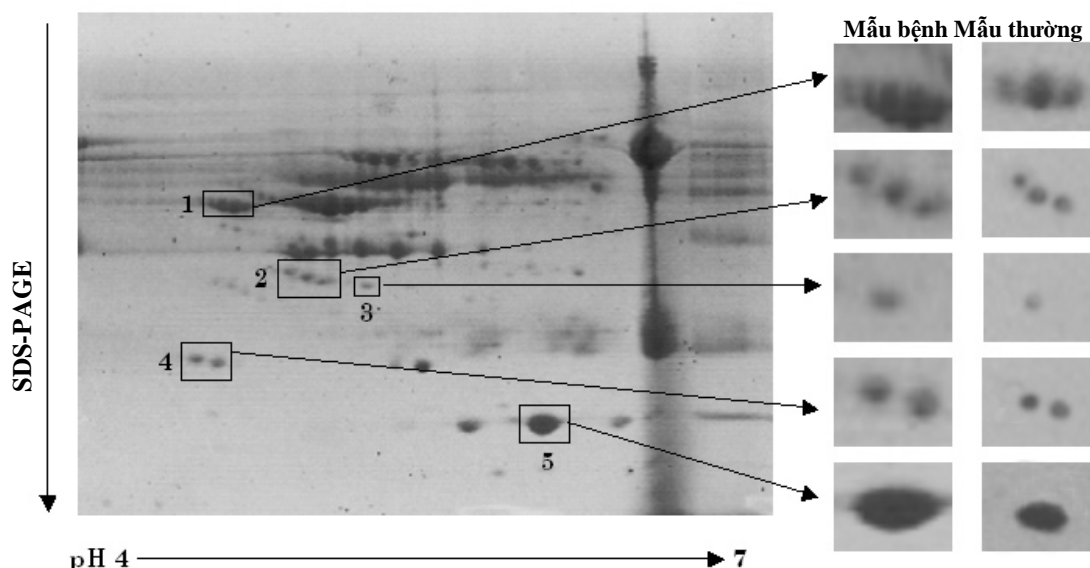
2. Nhận dạng glycoprotein bằng khối phổ liên tiếp MS/MS

Các phân đoạn protein thu nhận từ sắc ký ái lực Con A được thủy phân bằng trypsin và phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hai chiều nano kết nối khối phổ (LC MS/MS). Chỉ những protein có điểm số của ion peptide lớn hơn 30 mới được xác định. Các protein nhận dạng trong kết quả tìm kiếm, được xác định là glycoprotein khi so sánh với cơ sở dữ liệu glycoprotein của SwissProt (<http://us.expasy.org/sprot>). Kết quả là chúng tôi đã nhận dạng được 57 loại glycoprotein (số liệu cụ thể không trình bày trong bài báo này), bao gồm các loại immunoglobulin, các thành phần bổ thể, các

protein liên kết, enzyme, thụ thể, có sự phù hợp về hầu hết các thành phần cơ bản trong huyết thanh. Để so sánh mức độ biểu hiện các glycoprotein giữa bệnh nhân ĐTD type 2 và người bình thường chúng tôi tiến hành điện di hai chiều (2-DE).

3. Xác định sự thay đổi hàm lượng glycoprotein huyết thanh bằng 2-DE

Thành phần và nồng độ glycoprotein của bệnh nhân ĐTD type 2 và người bình thường được so sánh trên bản điện di hai chiều với hỗ trợ bằng phần mềm Quantity One v 4.4. Kết quả điện di 2DE glycoprotein huyết thanh được thể hiện trong hình 1.



Hình 1. Hình ảnh điện di hai chiều glycoprotein từ huyết thanh của người bình thường và bệnh nhân ĐTD type 2

Bảng 1

Các glycoprotein được nhận dạng bằng khối phổ liên tiếp LC - MS/MS

STT	Số đăng ký trên NCBI nr	Tên glycoprotein	Khối lượng (kDa)	Số mảnh peptide bất cập	Mức độ thay đổi
1	gil2521983	Alpha-2-HS-glycoprotein	40,1	75/2	↑
2	gil178855	Clusterin precursor	38,05	47/5	↑
3	gil4557325	Apolipoprotein E precursor	34	59/6	↑
4	gil11275306	Anti TNF α antibody light chain	23,65	353/6	↑
5	gil4826762	Haptoglobin alpha 2 chain	16,8	545/28	↑

Hình 1 cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa hệ glycoprotein huyết thanh giữa bệnh nhân ĐTĐ type 2 và người bình thường. Có nhiều điểm protein đã được phát hiện trên hai bản điện di trong đó có 5 vùng protein với các vị trí tương ứng là 1 - 5 ở mẫu huyết thanh bệnh nhân ĐTĐ type 2 có nồng độ cao hơn so mẫu đối chứng. Các điểm này được cắt ra, thủy phân bằng enzyme trypsin và nhận dạng bằng khối phổ liên tiếp LC - MS/MS với hỗ trợ của phần mềm MASCOT v1.4, 5 loại glycoprotein được nhận dạng với các thông số như: số đăng ký trên NCBI nr, khối lượng, điểm số, trình tự peptide bất cập và số mảnh peptide được nhận dạng được thể hiện trong bảng 1.

Như vậy bằng hệ thống LC/MS/MS đã nhận dạng được 5 glycoprotein có nồng độ tăng hơn hẳn trong huyết thanh bệnh nhân ĐTĐ type 2. Điều này hoàn toàn phù hợp với cơ sở lý thuyết vì ĐTĐ là một bệnh chuyển hóa mà trong đó hàm lượng glucose trong máu tăng cao, dẫn đến những bất thường trong quá trình glycosyl hoá [2] các protein huyết thanh.

Gen Haptoglobin (Hp) là một gen đa hình với 3 kiểu hình khác nhau là (Hp 1-1, Hp 2-2, và Hp 1-2), được biểu hiện từ hai alen là (Hp1 và Hp2) của gen Hp nằm trên nhiễm sắc thể 16q22. Protein Hp được tổng hợp trong gan và giải phóng vào huyết thanh, liên kết lỏng lẻo với Hb, chuyển Hb đến các protease trong gan để phân hủy. Do đó, haptoglobin đa hình có liên quan đến sự phát triển của nhiều bệnh viêm nhiễm bao gồm sự nhiễm trùng, chứng xơ vữa động mạch và bệnh tự miễn [3]. Kết quả điện di 2 chiều (hình 1) cho thấy nồng độ haptoglobin alpha 2 chain tăng cao hơn hẳn trong huyết thanh của các bệnh nhân ĐTĐ type 2.

Alpha 2 HS glycoprotein (α_2 -HSG) là một glycoprotein hàm lượng cao trong huyết thanh với nồng độ từ 300 đến 600 mg/l, được tổng hợp trong gan, cấu tạo bởi hai chuỗi liên kết với nhau bằng cầu disulfua. Gen α_2 -HSG định vị trên nhiễm sắc thể 3q27, nhạy cảm với bệnh ĐTĐ type 2 và các bệnh trao đổi chất. Protein α_2 -HSG được chứng minh là có tương tác với thụ thể insulin (IR), kìm hãm hoạt tính tyrosine kinase và tự phosphoryl hóa [4]. Sự thay đổi nồng độ của α_2 -HSG còn quan sát thấy ở các bệnh nhân ung thư máu. Hình 1 đã chỉ ra nồng

độ α_2 -HSG tăng lên rõ rệt trong các bệnh nhân ĐTĐ type 2. Kết quả của chúng tôi đã thực sự bổ sung cho những nghiên cứu trước đây về mối liên hệ giữa gen α_2 -HSG với bệnh ĐTĐ type 2.

Clusterin là một glycoprotein, được mã hóa bởi một gen nằm trên nhiễm sắc thể số 8 (8q21). Những nghiên cứu trên mRNA và phát hiện sự thay đổi hàm lượng protein trong các giai đoạn bệnh lý và ở mức độ *in vitro* đã chứng minh rằng clusterin có vai trò trong tái sinh màng lipid, màng tế bào, điều khiển các bề mặt trung gian phân giải màng, chu trình chết của tế bào, tương tác giữa tế bào và tế bào [7].

Apolipoprotein E (Apo-E) là một protein mang có mặt trong huyết thanh với nồng độ 5 mg/dl, gồm 299 amino acid, có khối lượng xấp xỉ 34 kDa. Apo E trong huyết thanh được tổng hợp chủ yếu từ gan và một số cơ quan khác như não, lá lách, phổi, thượng thận, buồng trứng, thận, tế bào cơ, đại thực bào. Apo-E tham gia vào quá trình vận chuyển cholesterol, phân phối lại cholesterol, và chống lại sự phát triển của thương tổn. Zhang và cộng sự (2001) đã chứng minh rằng sự thay đổi nồng độ Apo-E liên quan đến bệnh Alzheimer's [9].

Anti TNF α antibody light chain là một kháng thể kháng TNF α . Mà TNF α là một protein do các đại thực bào tiết ra, gây nên quá trình hoại tử do ung thư. Thông thường, kháng thể này chỉ xuất hiện trong các trạng thái bệnh lý, ít khi thấy ở người bình thường [6]. Kết quả nghiên cứu bước đầu của chúng tôi cho thấy nồng độ của 3 loại glycoprotein này tăng cao trong huyết thanh bệnh nhân ĐTĐ type 2. Tuy nhiên, cho đến nay vai trò của Clusterin, Apolipoprotein E (Apo-E), Anti TNF α antibody light chain trong bệnh ĐTĐ type 2 còn chưa được biết rõ. Để có thể khẳng định sự thay đổi của các glycoprotein này có thể chỉ thị cho sự xuất hiện bệnh cần những nghiên cứu tiếp tục.

III. KẾT LUẬN

Bằng sắc ký ái lực Con A để thu giữ glycoprotein, phân tách các glycoprotein trên bản điện di hai chiều và xác định nhờ hệ thống LC/MS/MS chúng tôi đã nhận dạng được 57 glycoprotein trong huyết thanh các bệnh nhân ĐTĐ type 2, trong đó có 5 glycoprotein (Alpha

2-HS-glycoprotein, Clusterin precursor, ApolipoproteinE, Anti TNF α antibody light chain precursor, Haptoglobin) có mức độ biểu hiện tăng rõ rệt trong huyết thanh bệnh nhân ĐTĐ type 2 so với người bình thường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Korc M.**, 2003: Molecular & Cellular Proteomics, 2: 399-404.
2. **Lê Thị Thu và cs.**, 2006: Hội nghị Khoa học Hóa sinh Y Dược học, 99-108.
3. **Langlois M. R., Delanghe J. R.**, 1996: Clinical Chemistry, 42(10): 1589-1600.
4. **Mathews S. T. et al.**, 2002: Mol Cell Endocrinol., 264: 87-98.
5. **Nguyễn Thị Mai Phương và cs.**, 2006: Hội nghị Khoa học Hóa sinh Y Dược học, 92-99.
6. **Okubo A. et al.**, 1990: Jpn. J. Cancer Res., 81(4): 403-409.
7. **Redondo M. et al.**, 2000: Am. J. Pathol., 157: 393-399.
8. **Vũ Minh Thiết và cs.**, 2006: Tạp chí Công nghệ Sinh học, 4(1): 13-22.
9. **Zhang D. et al.**, 2001: Alzheimer's Reports, 4: 67-79.
10. **Zhang R. et al.**, 2004: Proteomics, 4: 244-256.

ANALYSIS OF GLYCOPROTEINS IN SERUM OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS

NGUYEN THI MINH PHUONG, TRAN THE THANH,
NGUYEN BICH NHI, PHAN VAN CHI

SUMMARY

Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disorder that is primarily characterized by insulin resistance. This disease is not infectious but common in the world. Type 2 diabetes mellitus may lead to many dangerous complications such as diabetic retinopathy, possible blindness, risk of heart stroke, diabetic neuropathy, chronic diarrhea, kidney failure... Recently, many investigations have been carried out to search for effective therapies which can then be used to diagnose and cure this disease. However, most of known therapies are mainly based on measurement of blood glucose levels, which does not allow detecting the early stage of diabetes disease. To overcome this disadvantage, biomarkers, that are very promising factor to early prognosis of type 2 diabetes mellitus, have recently been considered and searched. In this study, such biomarkers were looked for by employing proteomics tools. Lectin concanavalin A (ConA) was used to receive glycoproteins from human serum. These collected glycoproteins were then digested and analyzed by nanoLC coupled with ESI MS/MS. Afterward, 57 glycoproteins were identified. In addition, glycoprotein expression level of the patients was compared with that of healthy individuals by using 2-D electrophoresis technique. As a result, expression of five proteins (haptoglobin alpha 2 chain, alpha-2-HS-glycoprotein, clusterin precursor, Apolipoprotein E precursor, Anti TNF α antibody light chain) increased significantly.

Key words: 2-D electrophoresis, Concanavalin A, glycoprotein, marker, type 2 diabetes mellitus, nano chromatography-tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS).

Ngày nhận bài: 27-3-2007