

## 基于蛋白质组学研究 NCAM1 在运动诱发的肺动脉高压及特发性肺动脉高压中的差异表达

何杨柯 易鑫 李卓霖 黄玮<sup>△</sup>

(重庆医科大学附属第一医院心血管内科 重庆 400016)

**【摘要】** 目的 研究通过侵入性心肺运动试验(invasive cardiopulmonary exercise testing, iCPET)确诊的运动诱发的肺动脉高压(exercise-induced pulmonary arterial hypertension, EiPAH)及特发性肺动脉高压(idiopathic pulmonary arterial hypertension, IPAH)患者血浆中人神经细胞黏附分子1(human neural cell adhesion molecule 1, NCAM1)的表达差异,并分析其表达差异与临床参数的相关性,以进一步探寻肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)新的分子标志物。**方法** 将研究对象分为右心导管确诊的IPAH患者组、iCPET确诊的EiPAH患者组及健康对照组。运用蛋白质组学LC-MS技术对各组血浆样本进行分析,采用ELISA进一步验证,并通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)分析,判断血浆中NCAM1与临床指标的相关性。**结果** EiPAH患者及IPAH患者血浆中NCAM1蛋白质水平与对照组相比均明显增高,差异倍数(fold change, FC)分别为4.32和4.91( $P < 0.01$ )。扩大各组样本,采用ELISA技术进一步验证:EiPAH及IPAH患者血浆中NCAM1蛋白质水平与对照组相比有明显升高( $P < 0.01$ )。ROC曲线结果表明,在IPAH组与EiPAH组中NCAM1血浆蛋白质的AUC分别为0.93和0.98。**结论** EiPAH及IPAH患者血浆中NCAM1蛋白质水平均明显增高,可能与PAH密切相关。

**【关键词】** 特发性肺动脉高压(IPAH); 运动诱发的肺动脉高压(EiPAH); 人神经细胞黏附分子1(NCAM1); 蛋白质组学

**【中图分类号】** R544.1, Q816 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2021.03.006

## Differential expression of NCAM1 in exercise-induced pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary arterial hypertension based on proteomics

HE Yang-ke, YI Xin, LI Zhuo-lin, HUANG Wei<sup>△</sup>

(Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**【Abstract】 Objective** To study the human neural cell adhesion molecule-1 (NCAM1) in the plasma of the patients with exercise-induced pulmonary arterial hypertension (EiPAH) and idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) confirmed by invasive cardiopulmonary exercise testing (iCPET), and to analyze the expression levels of NCAM1 and the association between the protein expression levels and clinical parameters in order to explore potential novel biomarker of pulmonary hypertension. **Methods** The subjects were divided into 3 groups: patients with IPAH confirmed by right cardiac catheterization, patients with EiPAH confirmed by iCPET, and health control group. The plasma samples of each group

重庆市卫健委中青年医学高端人才工作室项目(ZQNYXGDRCGZS2019001);重庆市卫健委医学科研计划项目(2016HBRC001)

<sup>△</sup>Corresponding author E-mail: weihuagcq@gmail.com

网络首发时间:2021-05-17 17:23:28 网络首发地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.R.20210517.1549.004.html

were analyzed by proteomics LC-MS.ELISA method and the subject operating characteristics were used to judge the correlation of NCAM1 in plasma with the clinical indicators. **Results** The results showed that NCAM1 protein levels in the plasma of patients with EiPAH and IPAH were significantly higher than that in the control group, and fold chang (FC) values were 4.32 and 4.91, respectively ( $P<0.01$ ). Then we expanded the samples of each group, and verified the protein expression levels of NCAM1 in the plasma samples of each group by ELISA technology, further confirmed that the protein levels in the plasma of both patients with IPAH and EiPAH were significantly higher than that of the control group ( $P<0.01$ ). The receiver operating characteristic (ROC) curve showed that AUCs of NCAM1 protein in IPAH group and EiPAH group were 0.93 and 0.98, respectively. **Conclusion** The protein expression levels of NCAM1 in the plasma of patients with EiPAH and IPAH increased significantly, therefore NCAM1 may be associated with EiPAH and IPAH.

**【Key words】** idiopathic pulmonary hypertension (IPAH); exercise-induced pulmonary hypertension (EiPAH); human neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1); proteomics

\* This work was supported by Middle-aged and Young Medical High-end Talents Studio Project of Chongqing Medical and Health Committee (ZQNYXGDRCGZS2019001) and Medical Scientific Research Project of Chongqing Medical and Health Committee (2016HBRC001).

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是死亡率高、诊断时间晚且无法彻底治愈的恶性病。在我国,未经治疗的PAH患者5年生存率仅为21%<sup>[1]</sup>。PAH早期症状隐匿,经常被误诊和漏诊,患者从出现症状到确诊,平均需要27个月,对于无典型危险因素的特发性肺动脉高压(idiopathic PAH, IPAH)患者,诊断时间可长达47个月<sup>[2]</sup>。临床上,超过75%的PAH患者确诊时WHO心功能为Ⅲ或Ⅳ级<sup>[3]</sup>。早期诊断并得到有效治疗的PAH患者远期生存率远高于中晚期诊断的PAH患者,因此早期诊断对改善PAH患者的预后至关重要。目前临床常用的PAH筛查方法,如超声心动图、心电图、MRI、B型钠尿肽、肌钙蛋白等,均不能提示早期改变。无创的心肺运动试验(cardiopulmonary exercise testing, CPET)会发现PAH患者早期运动耐量下降,但不能早期诊断PAH。侵入性心肺运动试验(invasive cardiopulmonary exercise testing, iCPET)是美国哈佛医学院率先开展的新技术,可诊断运动诱发的PAH(exercise induced PAH, EiPAH)。与非侵入性CPET不同的是,iCPET运动前需要置入肺动脉导管和桡动脉导管,这一关键区别可提供休息和运动时完整的心肺血流动力学和外周组织血气分析的相关数据。如果患者有不明原因的呼吸困难(排除心力衰竭、PAH及原发性肺病),静息状态下右心导管检查平均肺动脉压力

(mean pulmonary arterial pressure, mPAP)  $< 25$  mmHg (1 mmHg=0.133 kPa,下同),各项检测值均正常,即可行iCPET检查,通过运动时mPAP $\max \geq 30$  mmHg且肺血管阻力(pulmonary vascular resistance, PVR)  $PVR_{\max} \geq 120$  dyne $\cdot$ s $\cdot$ cm $^{-5}$ ,即可诊断为EiPAH,其可能是PAH早期阶段。

本研究旨在通过蛋白质组学液相质谱等技术,观察在EiPAH、IPAH患者血浆中人神经细胞黏附分子1(human neural cell adhesion molecule 1, NCAM1)的蛋白质表达水平,为进一步揭示其与疾病的关系以及研究PAH早期生物标志物提供实验数据。

## 资 料 和 方 法

**患者资料及分组** 经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准,根据入组诊断标准,回顾性分析2016年1月至2018年11月我院心血管内科收治的14例EiPAH及IPAH患者。IPAH诊断标准:2015年欧洲心脏病学会/欧洲呼吸学会《肺动脉高压诊断和治疗指南》<sup>[4]</sup>,由我院心血管内科导管室行右心导管术后确诊。EiPAH诊断标准:依据美国哈佛医学院附属Brigham and Women's Hospital肺血管中心主任Waxman等<sup>[5]</sup>制定的iCPET诊断标准,由我院心血管内科导管室iCPET中心行iCPET后确诊。排除以下影响NCAM1血浆浓度

的疾病:冠心病<sup>[6]</sup>,癫痫等神经系统病变<sup>[7]</sup>,其他恶性肿瘤疾病。对照组:2018年10月在我院体检合格或行右心导管及iCPET检查排除心血管内科相关疾病,排除心、脑、肝、肾、内分泌腺等重要脏器疾患,肝肾功能试验正常,家族中无心血管内科相关疾病病史,与实验组和疾病对照组在性别、年龄、体重方面差异无统计学意义。扩大样本检验中纳入标准未变。

**试剂与仪器** 试剂:ELISA试剂盒购自美国Thermo Scientific公司,小样品研磨试剂盒、IPG 13 cm (pH3-10 NL)非线性胶带、DIGE染料(Cy2TM, Cy3TM, Cy5TM)、EDTA抗凝管购自美国GE Healthcare公司。无水乙醇、乙酸等常用试剂均为国产分析纯。仪器:电泳仪(SE-600全套电泳设备,瑞典Amersham公司),Typhoon扫描仪和De图谱分析软件(美国GE healthcare公司),光密度扫描仪(型号:GS-710,美国Bio-Rad公司);质谱平台(型号:Thermo Q Exactive™ HF-X)和色谱平台(型号:Easy nanoLC 1200)(美国Thermo Scientific公司);Bioworks软件(美国Ginkgo Bioworks公司)。

**标本采集** 对符合纳入标准的对照组及患者(行右心导管前),使用EDTA抗凝管采集静脉血2 mL,上下颠倒混匀10次,于4℃、1 600×g离心10 min。用移液器将上层血浆转移至1.5 mL离心管中,添加蛋白酶抑制剂混匀,于-80℃保存备用。

**去除白蛋白的血浆样品制备及处理** 血样品解冻后,各取1 mL样品,于4℃、12 000×g离心1 min,吸取中间层,除去上层油脂。稀释后用0.22 μm滤膜过滤,用高丰度蛋白分离柱(美国Agilent公司)处理去除高丰度蛋白质。使用Bradford法对蛋白质进行定量,并进行Cy2、Cy3、Cy5标记。将标记样品加入同一EP管中,震荡混匀,点动离心。同时设置内标,加入等体积的2×样品缓冲液,冰浴10 min。进行IEF与SDS-PAGE。电泳结束后采用硝酸银染色方法染色。

**扫描及凝胶图像分析** 使用Typhoon扫描仪和eCyderTM v6.5软件(美国GE Healthcare公司)进行扫描,获取图像进行分析。1张胶片经过扫描后得到3张胶图,对胶图上每个蛋白点扫描进行胶内分析(differential in-gel analysis, BVA),匹配后再对各个蛋白点的相对量进行比较(Cy3/Cy2或Cy5/

Cy2)以确定差异蛋白质,组间差异蛋白质采用*t*检验等统计方法进行定量比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

**质谱鉴定** 对差异蛋白质点进行酶解、MALDI质谱分析,并用BIOWORKS软件搜索ipi HUMAN v3.53蛋白质库,鉴定差异蛋白质。

**ELISA检测** 样本扩增后,运用ELISA方法检测各组血浆中NCAM1的蛋白质表达水平,ELISA按试剂盒(美国Thermo Scientific公司)说明书执行。

## 结 果

**各组患者临床资料的比较** 该研究招募的患者及健康对照组的基线统计如表1所示。与EiPAH组比较,IPAH组静息时常规右心导管测得值肺动脉收缩压 $[(45.63 \pm 9.01) \text{ mmHg}]$ 和血管阻力 $[(805 \pm 394) \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}]$ 均远高于EiPAH组( $P<0.05$ )。IPAH组与EiPAH组相比,血尿酸、肌酐、总胆红素水平更高,肾小球滤过率(glomerular filtration rate, eGFR)更低。两组患者的血尿酸与静息时mPAP、肺血管阻力呈正相关,而与心率、体循环血压和肺毛细血管楔嵌压无相关性(表2)。

**蛋白质组学质谱结果** 分析凝胶图像发现,IPAH组与对照组共有119种差异表达蛋白质,其中66种表达上调,53种表达下调;EiPAH组与对照组相比,共有115种差异表达蛋白质,其中44种表达上调,71种表达下调。与对照组相比,两实验组NCAM1均上调。IPAH组和EiPAH组的NCAM1相对定量值分别为 $19\,997.4 \pm 5\,471.1$ 和 $21\,538.4 \pm 5\,938.4$ ,相比于对照组的 $4\,991.4 \pm 1\,046.4$ ,差异有统计学意义( $P=0.001$ ,  $P=0.003$ ),两组NCAM1的差异倍数(fold change, FC)分别为4.01和4.32。

**ELISA验证血浆中NCAM1蛋白质水平** 采用ELISA法检测各组血浆中NCAM1蛋白质水平。与对照组 $[(2\,188.03 \pm 207.995) \text{ pg/mL}]$ 相比,IPAH组和EiPAH组血浆中NCAM1蛋白质水平明显增高,分别为 $(2\,704.667 \pm 380.402) \text{ pg/mL}$  ( $P=0.002$ )和 $(2\,864.222 \pm 288.602) \text{ pg/mL}$  ( $P=0.001$ )。检测结果与蛋白质组学结果一致,EiPAH组增高更明显,EiPAH组与IPAH组比较差异有统计学意义( $P=0.004$ )。

**受试者工作特征曲线** 从受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线数据可

表1 IPAH组、EiPAH组和对照组的临床资料比较

Tab 1 Comparison of clinical characters between IPAN group, EiPAH group and control group ( $\bar{x} \pm s$ )

Clinical characters	IPAH group (n=8)	EiPAH group (n=6)	Control group (n=9)	$P^a$	$P^b$	$P^c$
Age (y)	36 ± 6	44 ± 12	29 ± 8	0.387	0.020	0.066
Female (%)	50	50	60	0.832	0.847	0.988
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23 ± 2	23 ± 1	21 ± 2	0.124	0.051	0.522
WHO FC I / II / III / IV	0/1/5/2	0/4/2/0	—	—	—	—
Transverse diameter of right atrium (mm)	44 ± 9	34 ± 4	—	—	—	<b>0.012</b>
Right ventricular end-diastolic diameter (mm)	29 ± 10	20 ± 2	—	—	—	<b>0.002</b>
NT-proBNP (pg/mL)	731 ± 831	32 ± 19	—	—	—	<b>&lt;0.001</b>
Bilirubin (μmol/L)	20 ± 17	9 ± 3	—	—	—	0.112
Creatinine (μmol/L)	76 ± 28	67 ± 12	—	—	—	0.441
Uric acid (μmol/L)	447 ± 138	295 ± 72	—	—	—	<b>0.003</b>
eGFR (mL·min <sup>-1</sup> ·1.73m <sup>-2</sup> )	98 ± 24	111 ± 15	—	—	—	0.364
Mean pulmonary artery pressure (mmHg)	46 ± 9	17 ± 4	—	—	—	<b>&lt;0.001</b>
Mean pulmonary pressure during exercise (mmHg)	—	33 ± 1	—	—	—	—
Pulmonary vascular resistance (dyn·s·cm <sup>-5</sup> )	805 ± 394	104 ± 15	—	—	—	<b>&lt;0.001</b>
Pulmonary vascular resistance during exercise (dyn·s·cm <sup>-5</sup> )	—	243 ± 44	—	—	—	—

<sup>a</sup> IPAH group vs. Control group; <sup>b</sup> EiPAH group vs. Control group; <sup>c</sup> IPAH group vs. EiPAH group. FC: Fold change.

表2 IPAH组和EiPAH组的血尿酸水平与平均肺动脉压,肺血管阻力的相关性

Tab 2 Correlation between blood uric acid levels and mean pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular resistance in IPAH group and EiPAH group

Factors	$r$	$P$
Mean pulmonary artery pressure	0.71	<b>&lt;0.01</b>
Pulmonary vascular resistance	0.83	<b>&lt;0.01</b>
Heart rate	0.27	0.489
Mean systemic artery pressure	0.15	0.708
Pulmonary capillary wedge pressure	0.31	0.419

知(图1),IPAH组与EiPAH组NCAM1的AUC<sub>ROC</sub>分别为0.93和0.98,表明该指标能较好地预测疾病。然而,对NCAM1与两组患者的血流动力学指标进行相关性分析,包括静息时和运动高峰时的肺动脉平均压、肺血管阻力、肺毛细血管嵌顿压、心排量等指标,未获得有意义的结论。

讨 论

我们与美国哈佛医学院附属 Brigham and Women's Hospital 肺血管中心主任 Aaron B.

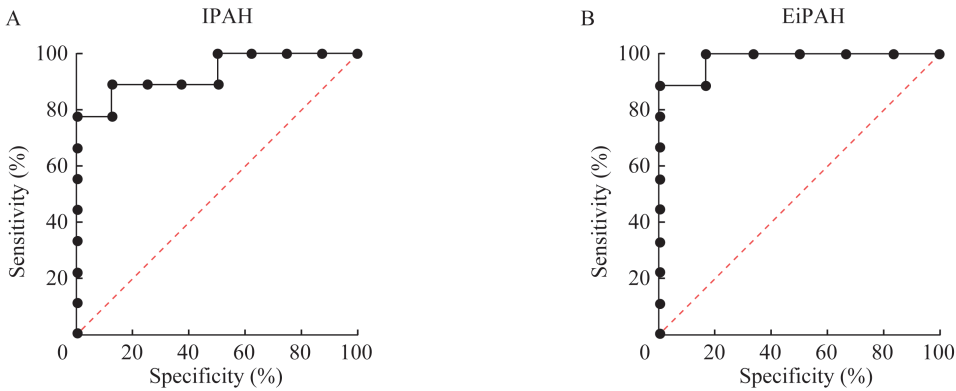


图1 IPAH及EiPAH患者血浆中NCAM1蛋白的ROC曲线

Fig 1 ROC curves for NCAM1 in the plasma of patients with IPAH and EiPAH



Waxman教授合作,于2017年5月在中国开展第1例iCPET诊断EiPAH<sup>[8]</sup>,同时建立了EiPAH的生物样本数据库和随访队列,并在全国推广这项新技术,协助广州医科大学附属第一医院于2018年4月开展此项新技术。2017年,我们报道了iCPET诊断EiPAH、早期舒张性心力衰竭等疑难呼吸困难的价值<sup>[9]</sup>。2018年,我们在国际上首次报道舒张性心力衰竭合并早期肺动脉功能障碍的患者再住院率明显增加<sup>[10]</sup>。然而,iCPET为侵入性检查,操作复杂,系统配置较昂贵,检查费用高,尚不能在全国范围广泛开展。因此,研究早期诊断PAH的血浆生物标志物是目前临床急需解决的问题。

本研究结果表明,NCAM1血浆蛋白质表达水平在IPAH和EiPAH患者中明显升高。NCAM1是免疫球蛋白超家族分子,也是细胞黏附分子的一员,主要表达于神经系统,参与调节神经细胞功能,在神经细胞迁移中起关键作用。人NCAM1基因定位于11q22~23,是一种膜蛋白,既往关于该蛋白的研究均基于神经系统相关疾病。近年来的更多研究表明,该蛋白可能是重要的信号受体,参与影响细胞黏附、迁移、增殖、凋亡、分化,并进一步影响细胞存活及其他功能。该分子在缺血性心肌病的心肌细胞、急性心肌梗死的心肌细胞、冠状动脉粥样硬化性心脏病患者的血浆中都报道过不同程度的升高,但机制尚不明确<sup>[6]</sup>。目前,尚无文献报道NCAM1与肺血管相关疾病有相关性。同时,本研究结果表明IPAH患者尿酸、肌酐、胆红素水平增高,且尿酸水平与mPAP、肺血管阻力呈正相关,此结果与van Albada等<sup>[11]</sup>报道相似。该结果可能与IPAH患者的心输出量下降、通气血流比例失调、机体组织缺血缺氧、肾血流灌注下降所导致的尿酸产量增多而排泄减少有关。由于尿酸检测方法简单、费用低廉且非侵入性,可反复测量,本研究提示尿酸可能成为临床上反映IPAH疾病严重程度的实验室指标。

IPAH及EiPAH与PAH相关性的具体机制尚不明确,但平滑肌细胞的过度增殖和凋亡抵抗导致的肺血管重构被认为是IPAH的重要病理生理过程。已有研究表明,Wnt3a/ $\beta$ -catenin/survivin信号通路可能参与PAH发生发展,而该通路已被证实参与多种肿瘤细胞的凋亡抵抗、过度增殖的调控<sup>[12]</sup>。故有学者提出,IPAH与恶性肿瘤的发病机制或有共同点。近年来,在多种恶性肿瘤中发现神经细胞

黏附分子的含量异常升高。研究表明,NCAM1可使乳腺癌肿瘤细胞凋亡减少,并促进细胞运动,该作用机制可能激活了 $\beta$ -catenin的转录活性,导致细胞间黏附减弱,因此更具侵袭性<sup>[13]</sup>。Gavert等<sup>[14]</sup>通过研究神经细胞黏附分子与大肠癌的关系认为,该蛋白可以活化转录因子NF- $\kappa$ B,该信号通路与肿瘤的侵袭、转移密切相关,NF- $\kappa$ B激活又进一步加强NCAM1对肿瘤的侵袭、转移作用<sup>[15]</sup>。本研究首次发现EiPAH患者血浆中NCAM1较正常对照组明显升高,其在IPAH患者血浆中也有明显升高,但升高程度不及EiPAH患者。

由于EiPAH在国内为新技术,目前国内开展例数较少。该研究针对的疾病IPAH、EiPAH皆为罕见病,在扩大验证的情况下,本研究的样本量依然有限。对照组的受试者明显年轻,可能对研究结果有一定影响,但对已有的样本数据进行Pearson相关性分析可知,NCAM1与年龄的相关性不显著( $r=0.291$ , $P=0.179$ )。本课题组将继续扩大样本量,进一步验证NCAM1与IPAH及EiPAH相关性的机制。

**作者贡献声明** 何杨柯 数据采集,论文构思、撰写和修订。易鑫 数据采集,论文修订。李卓霖 论文构思、撰写和修订。黄玮 数据分析,论文构思和修订。

**利益冲突声明** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] 徐希奇,王晓建,彭富华,等.不同治疗时代特发性和家族性肺动脉高压临床特征和生存率的比较[J].中华心血管病杂志,2014,42(6):465-468.
- [2] FAN Y, ZHANG R, JIANG X, *et al.* The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil reduces oxidative stress while reversing pulmonary arterial hypertension[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(3):395-403.
- [3] GALIÈ N, CORRIS PA, FROST A, *et al.* Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(25Suppl):D60-D72.
- [4] GALIÈ N, MARC H, JEAN LV, *et al.* 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [J]. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2016, 69(2):177.

(下转第355页)