

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0183-03

•实验研究•

心功能衰竭大鼠模型心肌线粒体蛋白的差异表达分析

孙爱军¹, 王克强¹, 李杰¹, 王时俊¹, 樊惠芝², 杨原², 葛均波¹
(1. 上海市心血管病研究所, 上海市 200032; 2. 复旦大学化学系, 上海市 200433)

[关键词] 病理学; 心功能衰竭大鼠心肌线粒体蛋白的差异表达; 双向凝胶电泳; 线粒体; 蛋白质组; 质谱; 乙醛脱氢酶

[摘要] 利用差异蛋白质组的方法识别心功能衰竭大鼠心肌代谢的异常, 以期发现新的治疗靶点。对大鼠行冠状动脉左前降支结扎, 术后 4 周, 左心室射血分数达 46.4% ± 10.9%, 成功建立心功能衰竭大鼠模型。实验动物分心功能衰竭组 (n=8) 和对照组 (n=8), 分别取左心室进行线粒体抽提。利用双向凝胶电泳技术显示差异蛋白的表达谱。再经胶内酶解, 行质谱鉴定和蛋白数据库分析。结果发现, 双向电泳显示 3 个蛋白位点表达有显著差异, 其中一条蛋白被证实为乙醛脱氢酶 2, 它在心功能衰竭心肌中的表达显著下降。在心肌梗死后 3、7、14 及 28 天心肌乙醛脱氢酶 2 mRNA 的表达呈逐渐下降趋势。结果提示, 在心功能衰竭大鼠的心肌线粒体中乙醛脱氢酶 2 表达显著下调, 而乙醛脱氢酶与硝酸甘油的转化有关。这为临床心功能衰竭患者使用硝酸甘油提供了很有价值的依据。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Proteomic Analysis of Myocardial Mitochondrial Protein Expression in Rats with Heart Failure

SUN Ai-Jun, WANG Ke-Qiang, Li Jie, Wang Shi-jun, FAN Hui-Zhi, YANG Peng-Yuan, and GE Jun-Bo

(1. Shanghai Institute of Cardiovascular Disease, Shanghai 200032; 2. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

[KEY WORDS] Mitochondria; Proteomics; Spectrometry; Aldehyde Dehydrogenase; Heart Failure; Two-Dimensional Gel Electrophoresis

[ABSTRACT] **Aim** To determine the metabolic changes in rats with heart failure by the application of proteomics, in order to discover possible new therapeutic targets. **Methods** Myocardial infarction model was established by left anterior descending coronary artery ligation. 4 weeks after operation, left ventricular ejection fraction was about 46.4% ± 10.9%. Then it was used as heart failure model. The rats were killed, left ventricular was cut off and the mitochondrial protein was extracted.

Weight-age matched rats acted as control. The mitochondrial protein expression in the two groups was analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. **Results** 3 protein spots altered significantly and they were exercised, washed and analyzed by using liquid chromatography-mass spectrometry. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH-2) was identified using database comparison.

Expression of ALDH-2 decreased remarkably in heart failure group compared with control. Furthermore, ALDH-2 mRNA expression of rats was detected at 3, 7, 14 and 28 d after lactate dehydrogenase ligation, which decreased gradually after operation as a result.

Conclusions Mitochondrial ALDH has recently been identified as the enzyme that convert nitroglycerin into nitrate. The decreased expression of ALDH-2 in rats with heart failure may provide a clue for nitroglycerin tolerance in patients with heart failure.

随着人口老龄化进程的加快和高血压、冠心病等心血管疾病发病的升高, 心力衰竭的患病率逐渐上升。正常状态下, 心肌细胞的能量代谢非常旺盛, 而线粒体是细胞的能量化工厂。研究表明心肌线粒体 DNA 获得性损伤在衰竭心肌能量代谢失衡中起重要作用, 这种损伤机制引起心肌细胞能量代谢功能减弱, 从而导致心肌缺血加重, 心肌肥厚和心力衰

竭相继发生^[1,2]。那么研究正常和心功能衰竭心肌细胞线粒体的蛋白质组表达差异将进一步从代谢角度阐明心功能衰竭的发生发展机制, 为临床治疗提供新的用药靶点或方案。国外已有学者进行线粒体蛋白质组的研究^[3-5], 但在蛋白质组水平研究心功能衰竭心肌尚未见报道。本研究利用双向电泳对大鼠的正常和心功能衰竭心肌的线粒体蛋白质组进行分离, 通过对比电泳图寻找差异蛋白, 用液相色谱-质谱对差异蛋白进行鉴定, 并且对差异位点进行 mRNA 水平研究。

[收稿日期] 2003-07-07 [修回日期] 2003-12-12

[作者简介] 孙爱军, 博士, 主要从事分子心脏病学研究, E-mail 为 ajsun@zshospital.net。王克强, 卫生部病毒性心脏病重点实验室主任, 主要从事心脏解剖研究, E-mail 为 Wkq2000@yahoo.com.cn。葛均波, 研究所副所长, “长江学者计划”特聘教授, 973 计划科学家, 上海市重大公关项目带头人, 211 工程项目负责人, 发表的文章被 SCI 收录 80 余篇, 主要从事心脏介入治疗研究, E-mail 为 JBGE@ZSHOSPITAL.NET。

1 材料与方法

1.1 设备与试剂

尿素、硫脲和电泳标准蛋白购自 Bio-Rad 公司, 固相化 pH 梯度干胶条购自 Amersham Pharmacia 公司, 色谱纯乙腈购自 Merck 公司。质谱仪型号为 Bruker Esquire 3000 离子阱质谱。

1.2 心功能衰竭大鼠模型和心肌线粒体

提取 2 μg/g 盐酸异丙酮腹腔内麻醉大鼠, 气管插管, 行呼吸机支持。开胸, 断肋, 暴露心脏, 结扎冠状动脉左前降支, 缝合后常规饲养^[6]。4 周后超声心动图显示心脏射血分数约 46.4% ± 10.9%, 成功建立心功能衰竭动物模型。取左心室, 水杨酸甲酯缓冲液清洗, 冰浴匀浆, 4℃、1 300 g 离心 10 min, 重复 3 次, 合并上清, 再以 17 000 g 离心 15 min, 重复 3 次, 弃上清, 沉淀即为线粒体。线粒体纯度用扫描电镜检测。

1.3 双向凝胶电泳

将 3 mg 线粒体用裂解液溶解并稀释至 350 μL。第一向采用 18 cm pH 3~10 固相化 pH 梯度干胶条, 等电点聚焦仪。第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 11% 非梯度胶, 胶厚 1 mm。考马斯亮蓝染色, 凝胶图像用 Bio-Rad 公司的二维电泳图像分析软件 (PDQuest) 进行数字化分析。

1.4 胶内酶解

用手术刀把蛋白点切下, 将凝胶脱色, 脱水, 干燥后加入适量胰蛋白酶液, 4℃放置 30 min, 使凝胶完全泡胀。再加 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液 20 μL 覆盖, 37℃保温 12 h。加入 60 μL 5% 甲酸-50% 乙腈超声提取, 重复 2 次, 每次 15 min。合并上清及提取液后浓缩至 5 μL, 以供质谱分析。

1.5 液相色谱法—质谱法鉴定与分析

液相色谱仪为 Agilent 公司的 1100 型, 色谱柱型号为 ZORBAX SB-C18 (0.3 × 150 mm, 5 μm)。流动相 A 为水/0.1% 甲酸; B 为乙腈/0.1% 甲酸。流速 4.5 μL/min。梯度程序: 0~60 min, B 相由 0 升至 60%; 60~70 min, B 相升至 90%; 70~80 min, B 相保持 90%。质谱仪为 Bruker Esquire 3000 离子阱质谱, MS/MS 能量为 1 V。蛋白分析采用 MASCOT 检索软件, 数据库为 NCBI nr。

1.6 逆转录—聚合酶链反应检测乙醛脱氢酶 mRNA 的表达

大鼠模型制备同方法 1.2。在冠状动脉结扎后 3、7、14 及 28 天分别处死大鼠, 每个时相组 4 只大鼠。取左心室心肌, 经组织匀浆后用 RNA 提取试剂 Trizol 采用一步法提取总 RNA。A_{260/280} 比值在 1.8~2.0 之间。采用一步法 RNA 逆转录试剂盒 (Promega 公司) 扩增线粒体乙醛脱氢酶基因, 磷酸甘油醛脱氢

酶 (GAPDH) 基因作为内参。线粒体乙醛脱氢酶基因的上游引物为 5'-AGAGAGGACGCTTGCTGAAC-3', 下游引物 5'-GCAGGGCCTATCTTCCAAAT-3'。反应总体积 50 μL, 包括 RNA 1 μg, 1 × 缓冲液, dNTP 0.2 μmol/L, MgSO₄ 1 mmol/L, 上下游引物 1 μmol/L, 逆转录酶 (AMVase) 5 u, 去 RNA 酶 (Tflase) 5 u。反应程序: 48℃ 45 min → 94℃ 2 min, 接下来, 94℃ 30 s → 60℃ 1 min → 68℃ 2 min, 40 个循环, 随后 68℃ 7 min。

1.7 统计学分析

采用 *t* 检验进行统计分析, *P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 双向电泳图谱

线粒体纯度超过 95%。正常心肌和心功能衰竭心肌的电泳图谱约有 100 个蛋白点得到了可靠识别。差异比较结果发现, 有 3 个蛋白点有显著性差异 (*P* < 0.01), 1 号蛋白点在心功能衰竭组中低表达 (图 1, Figure 1)。该现象在所有重复实验中都能很好地重现。

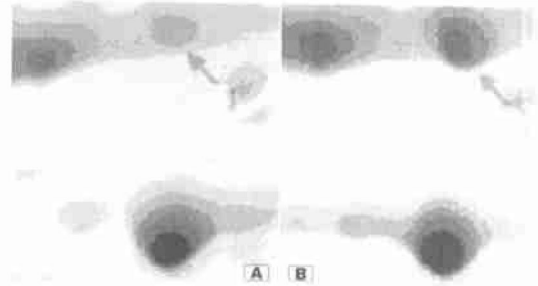


图 1. 大鼠心肌线粒体蛋白的二维电泳图谱 A 为心功能衰竭心肌; B 为正常心肌。

Figure 1. 2-D electrophoresis maps for rat heart mitochondrial proteins (*n* = 4)

2.2 差异表达蛋白的液相色谱法—质谱法鉴定

1 号蛋白点的数据库搜索结果、匹配的肽段数以及理论与实测的分子量和等电点信息。其等电点与双向电泳图上的信息相吻合, 进一步验证了鉴定的正确性 (表 1, Table 1)。

2.3 逆转录—聚合酶链反应结果

正常大鼠左心室心肌组织乙醛脱氢酶 2 (aldehyde dehydrogenase-2, ALDH-2) 呈高表达, 左冠状动脉结扎后 3 天, ALDH-2 表达下降, 并随时间延迟, 在术后 7、14 及 28 天逐渐下降。

表 1. 差异表达蛋白点的质谱鉴定结果

Table 1. Identification of differentially expressed protein

蛋白差异位点	序列号	蛋白名称	匹配的肽段数	分子质量 (kDa)		等电点	
				理论	实测	理论	实测
1 号	14192933	乙醛脱氢酶 2 (线粒体)	19	56.5	57	6.6	6.5

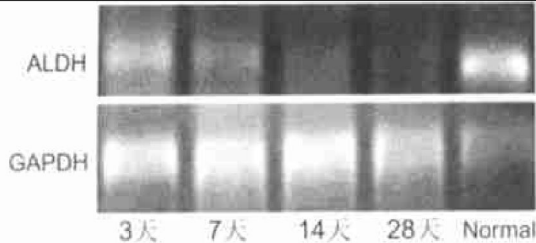


图 2. 大鼠左冠状动脉结扎后不同时间心肌乙醛脱氢酶和线粒体乙醛脱氢酶基因的表达

Figure 2. ALDH mRNA expression of rats after LAD ligation at different time ($n = 3$)

3 讨论

蛋白质组学是使用生物化学技术对蛋白质进行大规模研究的方法。目前主要使用双向聚丙烯酰胺凝胶显示特定细胞或组织中的多种蛋白质。由于高等生物真核细胞的复杂性,很难对全部蛋白质组同时进行分析鉴定。目前主张以亚细胞蛋白质组为研究对象,以便得到更快捷、明确的研究结果。本研究以差速离心法分离纯化,得到高纯度的线粒体,为下一步实验奠定了基础。

常用的基于物质谱的蛋白鉴定手段主要有肽质量指纹法和串联质谱法,前者速度较快,更适合于高通量筛选;而后者常常只需一两个肽段的信息就能实现蛋白的准确鉴定,因此更适合于对少量蛋白进行可靠的鉴定^[7]。由于本实验选用线粒体蛋白,差异点数量不多,所以选择了串联质谱法作为蛋白鉴定手段,使差异蛋白得到了高度唯一的确认。

本研究在蛋白质组水平证实线粒体 ALDH-2 在心功能衰竭心肌中低表达,进一步在 mRNA 水平证实心肌梗死后 3 天到 28 天心功能衰竭产生过程中 ALDH-2 水平持续下降,说明 ALDH-2 表达下调发生在转录水平。ALDH 参与乙醇代谢,ALDH-2 是 ALDH 的一种低 K_m 值(米歇尔常数)形式,它的主要功能是将乙醇的中间代谢产物乙醛氧化为乙酸。ALDH-2 位于 12 号染色体,ALDH-2 的缺陷基因型可导致饮酒后乙醛蓄积,后者是目前肯定的致癌剂^[8],ALDH-2 的缺陷基因型与肿瘤发生有关^[9,10]。

乙醛脱氢酶(ALDH)-2 与心血管疾病的关系研究资料甚少。最近 Stamler 等发现线粒体乙醛脱氢酶是一种硝酸还原酶,这个发现破解了 100 多年来

困扰人们的难题,即硝酸甘油何以缓解心绞痛和心功能衰竭,又为何产生耐受现象。线粒体乙醛脱氢酶使硝酸甘油转换为 1,2-二硝酸甘油和亚硝酸盐,亚硝酸盐继而转化为一氧化氮,发挥舒张血管的作用。而持续使用硝酸甘油可导致线粒体乙醛脱氢酶被过剩的亚硝酸盐氧化,一氧化氮不能持续产生,从而产生硝酸甘油耐受现象。线粒体乙醛脱氢酶的氧化提示硝酸甘油代谢系统“生锈”,代表了细胞水平的损坏,需要进行自身修复。本研究结果表明心功能衰竭大鼠左室心肌线粒体乙醛脱氢酶表达降低,提示临床使用硝酸甘油治疗心功能衰竭时,应特别注意间断用药,从而避免耐受现象和细胞毒性的发生。另外,水合氯醛、对乙酰氨基酚等药物抑制线粒体乙醛脱氢酶的活性,对急性心肌缺血或充血性心力衰竭患者因属禁忌。

[参考文献]

- [1] Schoffner J, Wallace DC. Heart disease and mitochondrial DNA mutations. *Heart Dis Stroke*, 1992, 1 (4): 235-238
- [2] 叶平. 过氧化体增殖物激活型受体对心肌能量代谢调控的病理生理机制. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (1): 81-83
- [3] Murray J, Gilkerson R, Capaldi RA. Quantitative proteomics: the copy number of pyruvate dehydrogenase is more than 10 (2)-fold lower than that of complex ⑥ in human mitochondria. *FEBS Lett*, 2002, 529 (2-3): 173-178
- [4] Kernek F, Unlu M, Labeikovsky W, Minden JS, Koretsky AP. Changes in the mitochondrial proteome from mouse hearts deficient in creatine kinase. *Physiol Genomics*, 2001, 6 (2): 117-128
- [5] Rabilloud T, Kieffer S, Procaccio V, Louwagie M, Courchesne PL, Patterson SD, et al. Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: Toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis*, 1998, 19 (6): 1006-1014
- [6] 胡琴, 吴强, 耿昭华, 李隆贵. 心肌梗死后大鼠心肌脂肪酸氧化酶基因表达下调. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (2): 143-146
- [7] Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev*, 2001, 101 (2): 269-295
- [8] Ferguson RA, Goldberg DM. Genetic markers of alcohol abuse. *J Clin Chim Acta*, 1997, 257 (2): 199-250
- [9] Watanabe S, Sasahara K, Kinokawa F, Uchida N, Masaki T, Kurokohchi K, et al. Aldehyde dehydrogenase-2 genotypes and HLA haplotypes in Japanese patients with esophageal cancer. *Oncol Rep*, 2002, 9 (5): 1063-1068
- [10] Matsuo K, Hamajima N, Hirai T, Kato T, Koike K, Inoue M, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH 2) genotype affects rectal cancer susceptibility due to alcohol consumption. *J Epidemiol*, 2002, 12 (2): 70-76

(此文编辑 文玉珊)