

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2005)13-04-0456-05

大鼠心肌缺血预适应延迟相的差异蛋白质的分离及鉴定

王尧玲, 王建设, 刘双, 袁灿, 吕青兰, 刘梅冬, 刘可, 肖献忠

(中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理学与病理生理学; 缺血预适应延迟相的差异蛋白质分析; 双向凝胶电泳; 缺血预适应; 蛋白质组; 质谱

[摘要] 目的 采用蛋白质组学技术探讨缺血预适应心肌内源性保护的分子机制。方法 应用双向凝胶电泳技术分离假手术组和心肌缺血预适应延迟相组大鼠的心肌总蛋白质。结果 在假手术组的双向凝胶电泳图谱上展示 704 ± 27 个蛋白质点, 而在心肌缺血预适应延迟相组展示 778 ± 35 个蛋白质点。经凝胶图像分析找到的差异蛋白质 23 个, 基质辅助激光解析-电离飞行时间质谱对差异蛋白进行鉴定, 共鉴定出 12 个蛋白质。这些蛋白质包括应激反应蛋白、代谢相关蛋白、信号调节蛋白、结构蛋白等。结论 这些差异蛋白可能通过其分子伴侣功能、清除自由基、改善能量代谢等发挥心肌缺血预适应延迟相的心肌保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Seperation and Identification of Differential Proteins of Late Phase of Myocardial Ischemic Preconditioning in Rats

WANG Yao-Ling, WANG Jian-She, LIU Shuang, YUAN Can, LU Qing-Lan, LIU Mei-Dong, LIU Ke, and XIAO Xian-Zhong
(Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Ischemic Preconditioning; Proteome; Mass Spectrometry; Two Dimensional Electrophoresis; Free Radical; Energy Metabolism

[ABSTRACT] **Aim** To search for global protein changes in ischemic preconditioning (IP) using proteomic technology.

Methods The SD rats were divided into two groups including IP group and sham groups. The left ventricle tissues of preconditioned and sham groups were directly sampled for proteomic analysis.

Results Analysis of two dimensional electrophoresis (2-DE) showed: 704 ± 27 protein spots were seen in Sham ventricle gels and 778 ± 35 protein spots in IP ventricle gels. Differential analysis using the Student's *t*-test ($P < 0.05$) showed that the expression of 23 protein spots changed, 12 protein spots were identified by mass spectrometry.

Conclusions Myocardial IP resulted in the changes of protein expression profiles in the myocardium. The differential proteins might function as molecular chaperone, decrease free radical and promote the energy metabolism of myocardium to confer cardioprotection.

心肌缺血预适应(ischemic preconditioning, IP)延迟相持续时间较长,可以减轻心肌顿抑、心肌梗死,具有更大的临床应用价值。它是由多个基因、多种蛋白参与的复杂的心肌保护作用。自该现象发现以来,许多研究集中于单个基因、蛋白质在IP中的作用及其相互关系^[1,2]。这些方法所获得的信息有限,不足以在整体上把握IP时多分子之间复杂的相互作用。而在功能基因组学时代兴起的基因表达谱的研究^[3]只显示了基因转录水平的变化,仍无法确定蛋白质水平的变化。本研究拟采用双向凝胶电泳(two dimensional electrophoresis, 2-DE)技术和基质辅助激光解析-电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser-

desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术观察大鼠心肌IP延迟相的蛋白质表达谱的变化,以从蛋白质水平进一步揭示IP延迟相心肌内源性保护的分子机制,寻找IP延迟相的关键的调控因子和可能的治疗靶点,为心肌缺血、缺血再灌注损伤的防治提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 Sprague-Dawley 大鼠来自本校实验动物中心。固相 pH 梯度干胶条(IPG strip pH3-10L, 24 cm)和载体两性电解质(pharmalyte, pH3-10L)均为 Amersham Biosciences 产品,二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IDA)、甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲一酮-胰蛋白酶(TPCK-Trypsin)和 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CCA)均为 Sigma 公司产品。IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT 垂

[收稿日期] 2004-06-14

[修回日期] 2005-01-08

[作者简介] 王尧玲,医学硕士,主要研究方向为心血管内源性保护机制。王建设,医学硕士,主要研究方向为心血管内源性保护机制。肖献忠,教授,博士研究生导师,主要研究方向为败血症休克机制和心血管内源性保护机制。

直电泳槽和 Imagescanner 扫描仪 (Amersham Biosciences 公司); Applied Biosystem Voyager-DE STR Biospectrometry™ workstation System 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪 (ABI 公司)。

1.2 缺血预适应延迟相的差异蛋白的分离

1.2.1 动物模型的制备 雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 麻醉下开胸结扎左冠状动脉前降支, 缺血 3 min, 灌注 10 min, 共 4 个循环, 为 IP 组。假手术组开胸不予结扎冠状动脉。两组恢复 24 h 后, 开胸迅速摘取心脏, 浸入 4℃生理盐水中冲洗, 并立即从主动脉口用生理盐水灌洗心脏, 取左心室组织, 于液氮中速冻, 而后置于 -80℃冰箱备用。

1.2.2 样本处理 取 40 mg 心肌组织放入预冷的研钵中加液氮磨成粉末状, 转移至 1.5 mL 的离心管中, 加入 400 μ L 裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% NP-40, 1% 曲拉通, 100 mmol/L 二硫苏糖醇, 5 mmol/L PMSF, 4% CHAPS, 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸, 40 mmol/L Tris, 2% Pharmalyte), 漩涡 30 s 后, 37℃水浴 1 h, 4℃、15 000 r/min 离心 30 min, 上清液转移入新的离心管中。Bradford 法进行蛋白定量。

1.2.3 双向凝胶电泳 两组各 3 个样本, 分别取自 3 个不同的动物, 经蛋白裂解, 样本制备后, 进行双向凝胶电泳。每个样本的上样量保持一致, 为 100 μ g。第一向使用 pH3-10L, 长度为 24 cm 的 IPG 胶条, 水化和等电聚焦在 IPGphor 水平电泳仪上先后进行, 时间电压总乘积为 69kVh; 经平衡后, 恒定功率下于 12.5%T 进行第二向的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 直到溴酚蓝迁移至凝胶的底端, 结束电泳^[4]。而后使用 Amersham Biosciences 公司提供的银染法进行染色鉴定。

1.2.4 图像分析及统计学处理 对银染后的凝胶以数字模式扫描, 并进行图像分析, 选取两组凝胶的公共差异点: 只在其中一组出现, 而在另一组并不出现; ④Volume 值相差 2 倍以上, 并用 *t* 检验进行统计学分析有显著差异的点。

1.3 基质辅助激光解析-电离飞行时间质谱鉴定

1.3.1 蛋白质斑点的胶上原位酶解及质谱鉴定

蛋白质原位酶按照 Fernandez 等^[5]方法进行, 制备好的样品在 Voyager-DE STR MALDI-TOF-MS 仪上分析, 使用 ACTH 作为外部标准校正, 获得肽质量指纹图。

1.3.2 数据库搜索 使用 Matrix Science 的 Mascot 软件搜索 TrEMBL 和 SWISS-PROT 数据库, 搜索条件为 肽片段质量最大误差控制在 0.5 Da, 获得肽片段所选用的酶为胰酶, 酶解片段不完全位点数选择为

1 个, 物种来源为鼠类, 离子选择 $[M+H]^+$ 和 monoisotopic, 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化, 可变修饰为蛋氨酸氧化, Mascot 配套软件 Mascot Distiller 过滤肽质量峰。

2 结果

2.1 心肌组织的差异蛋白质

假手术组的蛋白点数平均为 704 ± 27 , IP 组的蛋白点数平均为 778 ± 35 。以 IP 组中的一块凝胶作为参考胶, 它和 IP 组与假手术组凝胶的匹配率分别为 88.4% 和 75.0%。IP 组不同胶间蛋白质点在 IEF 方向的偏差为 0.96 ± 0.21 mm, 在 SDS-PAGE 方向上的偏差为 1.65 ± 0.38 mm; 假手术组不同胶间蛋白质点在 IEF 方向的偏差为 0.85 ± 0.34 mm, 在 SDS-PAGE 方向上的偏差为 1.24 ± 0.31 mm, 每组凝胶在水平和垂直方向的偏差为 1 mm 左右, 因此获得了重复性较好的大鼠心肌组织的双向凝胶电泳图谱。其典型的图谱见图 1 (Figure 1)。IP 组与假手术组心肌组织总蛋白经分离后, 共获得 23 个差异蛋白质点 (表 1, Table 1)。

表 1. 双向凝胶电泳分离的差异蛋白质点

Table 1. Differential protein spots separated by 2-DE

蛋白 质点	标准化的 Volume 值		P 值	等电点/ 分子量 (kDa)
	假手术组	IP 组		
1	0	6.09 ± 1.41		4.02/20.23
2	0	11.05 ± 1.56		4.15/20.54
3	0	2.74 ± 0.75		4.43/29.92
4	0	1.42 ± 0.20		4.53/24.95
5	3.85 ± 0.62	17.58 ± 1.68	0.023	5.51/28.25
6	0	2.19 ± 0.86		6.02/22.77
7	0.49 ± 0.02	3.82 ± 0.74	0.048	6.69/28.62
8	1.37 ± 0.07	6.08 ± 0.53	0.013	6.91/31.16
9	0	3.14 ± 0.83		7.50/30.18
10	0	6.02 ± 0.39		7.63/31.12
11	1.13 ± 0.15	9.70 ± 1.00	0.017	4.98/43.97
12	1.15 ± 0.08	7.90 ± 0.54	0.008	5.19/43.61
13	2.22 ± 0.64	14.39 ± 1.29	0.022	5.51/63.03
14	0	1.41 ± 0.14		6.35/68.54
15	1.95 ± 1.73	5.18 ± 0.80	0.008	6.51/67.39
16	0	46.47 ± 1.63		7.01/23.84
17	1.75 ± 0.52	15.05 ± 2.09	0.015	7.69/58.09
18	5.74 ± 2.13	31.26 ± 3.33	0.042	6.13/17.65
19	0	14.70 ± 1.16		6.02/56.87
20	30.12 ± 1.24	5.00 ± 0.34	0.004	8.04/18.66
21	0	11.42 ± 2.21		6.04/28.68
22	0	7.89 ± 2.58		5.36/44.73
23	1.86 ± 0.75	10.91 ± 1.99	0.022	7.26/43.30

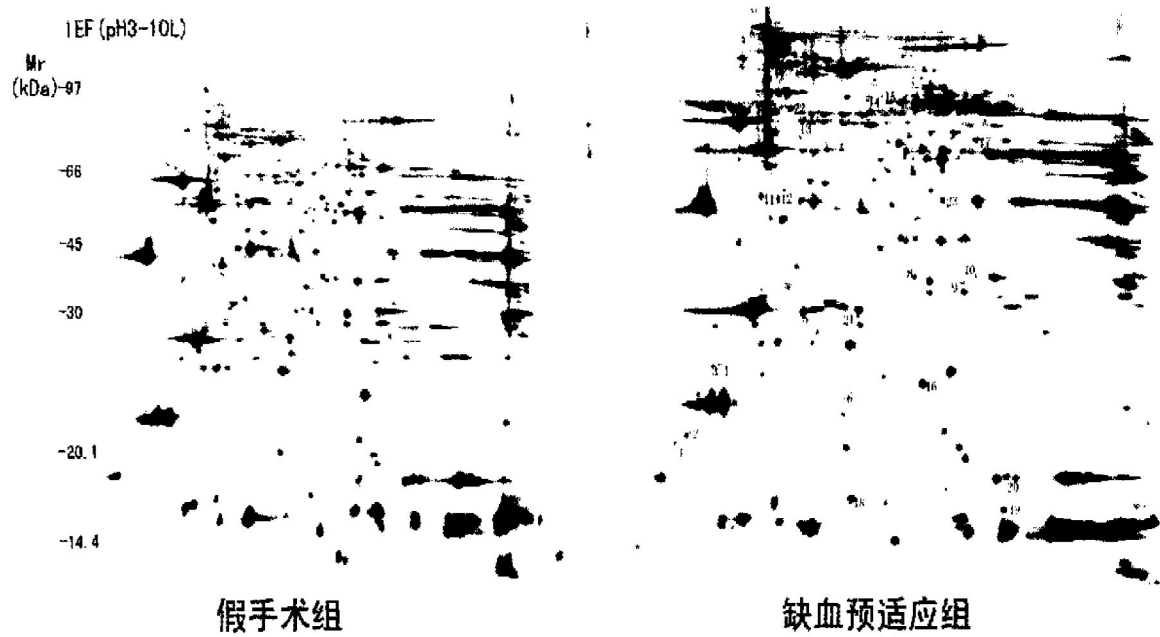


图 1. 大鼠左心室组织的双向凝胶电泳图谱
Figure 1. 2-DE map of rat left ventricle proteins

2.2 差异蛋白质的质谱分析情况

对所获得的差异蛋白质点切取、酶解消化后的多肽混合物进行 MALDI-TOF 质谱分析, 得到 20 张肽质量指纹图谱, 图 2(Figure 2) 为蛋白点 17 的肽质

量指纹图谱。这些肽质量指纹图谱进行数据库查询并结合该蛋白质点在 2-DE 图谱上的表观分子量和等电点, 成功鉴定出了其中 12 个蛋白质。该 12 个蛋白质点的质谱鉴定结果见表 2(Table 2)。

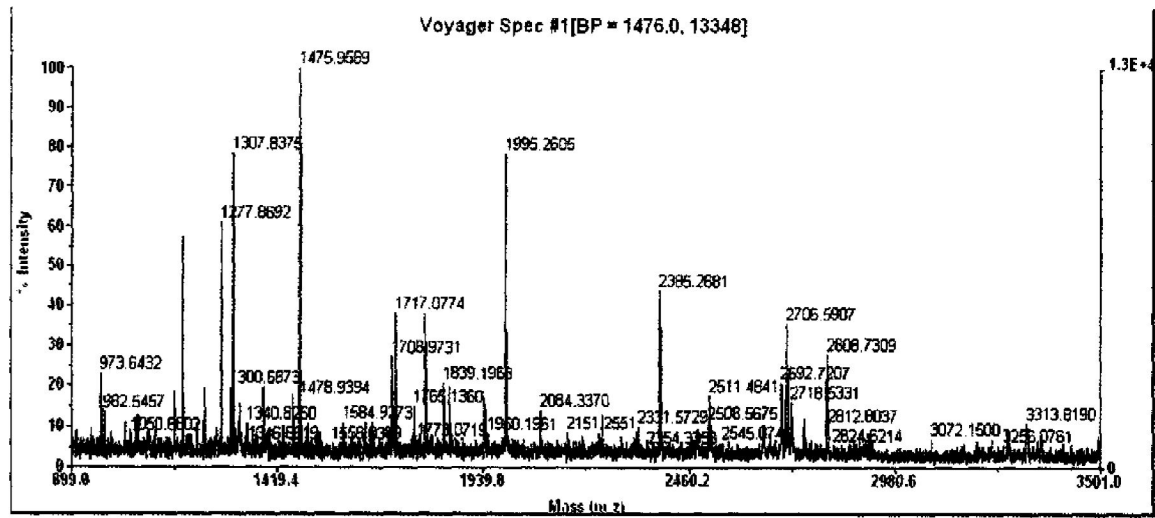


图 2. 蛋白点 17 的肽质量指纹图谱
Figure 2. Peptide mass fingerprint of spot 17

表 2. 基质辅助激光解析—电离飞行时间质谱鉴定的差异蛋白质

Table 2. Identification of differential protein spots by MALDI-TOF-MS

蛋白 质点	等电点/ 分子量 (kDa)	匹配的 肽片段	序列 覆盖率	蛋白质 序列号 (AC)	蛋白质名称
1	4. 86/18. 7	6/29	46%	P08733	myosin regulatory light chain 2, ventricular
2	5. 64/22. 4	12/24	11%	IL. ivR	interleukin 1 receptor type iv precursor
5	5. 52/30. 1	5/10	27%	P04639	apolipoprotein A iv precursor (APA_RAT)
7	6. 13/25. 6	4/64	24. 3%	Q9WU21	Glutathione S-transferase Yb4
9	undefinded	4/56	39. 2%	Q924N2	recombination activating protein 2 (fragment)
10	6. 58/43. 2	8/15	28%	P00564	creatin kinase, M chain (KCRM_RAT)
13	6. 54/79. 1	7/22	16%	P33124	long_chain_fatty_acid_CoAligase 6 (LCF6_RAT)
15	undecided	6/49	13. 4%	Q63477	protein tyrosine phosphatase epsilon C
16	6. 76/20. 1	4/12	25. 1%	P23928	Alpha crystalline B chain, RAT
17	6. 17/35. 0	8/34	30%	P09330	ribose phosphate pyrophosphokinase ⑤
21	5. 64/22. 4	12/24	27%	P02564	myosin heavy chain (MYH7_RAT)
22	5. 65/55. 0	8/28	22%	P04276	vitamin D-binding protein precursor

3 讨论

本文在假手术组和 IP 组进行了心肌缺血预适应延迟相的比较蛋白质组学研究。2-DE 凝胶上的差异蛋白质点经 MALDI-TOF 质谱共鉴定出 12 个蛋白质。还有些蛋白未得到鉴定,可能是由于质谱技术的限制或这些蛋白是未知蛋白,在数据库中没有登记。这些已鉴定的差异蛋白包括应激反应蛋白、代谢相关蛋白、信号调节蛋白和结构蛋白等。他们可能通过分子伴侣功能、清除自由基、改善能量代谢等发挥缺血预适应延迟相的心肌保护作用。

3.1 应激反应蛋白

缺血预适应(IP)是心肌对亚致死性缺血的应激反应,热休克蛋白作为应激反应蛋白,通过抗氧化,抗凋亡或抗炎反应等发挥重要的保护作用。蛋白点 16 经质谱鉴定为 α B-晶状体蛋白,它只在 IP 组心肌中表达。在心肌 IP 的基因表达谱研究中,也发现 α B-晶状体蛋白表达上调^[6],这个结果和我们的蛋白质组学研究结果是一致的。 α B-晶状体蛋白属于小分子热休克蛋白 HSP20 家族,与其他热休克蛋白一样也具有分子伴侣的功能。我室近年发现,在短暂心肌缺血后, α B-晶状体蛋白分布于蛋白质聚集物中及 Z 线两侧,表明其在蛋白质聚集物的解聚及复性,细胞骨架的稳定中可能发挥重要作用^[7]。 α B-晶状体蛋白在心肌 IP 组中表达,可能通过解聚及复性受损蛋白质,保护细胞骨架,抗氧化,抗凋亡等机制发挥心肌保护作用。

细胞因子也参与 IP 的心肌保护。近来,Yammshita 等研究发现由锻炼、高温诱导内源性白细胞介素 1 表达可以激活 Mr-SOD,而 Mr-SOD 是心肌 IP 保护中清除氧自由基,发挥抗氧化作用的重要蛋白质。同时他们还发现,在心肌 IP 之前使用白细胞介素 1 抗体可破坏 IP 的保护作用^[8]。我们的研究发现白细胞介素 1 受体的前体(蛋白点 2)只在 IP 组表达,白细胞介素 1 受体的前体在 IP 组表达的意义及其是否与 Mr-SOD 的抗氧化作用相关,有待进一步阐明。

3.2 代谢相关蛋白

肌酸激酶(creatin kinase, CK)为二聚体酶,在心肌组织中主要为 MM 型及 MB 型存在,它能够催化 ADP 和磷酸合成肌酸和 ATP,为心肌组织提供能量。研究发现,心肌梗死发生后 CK 在存活心肌细胞中表达减少,可能是梗死发生后存活心肌收缩能力下降的重要机制^[9]。我们的比较蛋白质组学研究发现在 IP 组心肌组织中 CK-M(蛋白点 10)表达升高。推测 IP 组 CK-M 升高可增加心肌细胞能量供应,是心肌细胞遭受应激时重要的促存活因素。另外,还有报道 CK 基因敲除的心脏其钙自稳功能受到损伤^[10],提示 CK 在心肌缺血及缺血再灌注损伤时保持钙自稳也发挥重要作用。

3.3 信号调节蛋白

蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)和蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)对细胞内信号起着广泛的调节作用,包括细胞的分

化、生长、代谢和凋亡等;另外 PTK/PTP 还可通过对通道蛋白酪氨酸残基的磷酸化和去磷酸化调节细胞膜上离子通道的开闭。研究表明 PTK/PTP 对心肌细胞膜上 KATP 通道具有重要的调节作用^[11],而 KATP 通道的开放在 IP 心肌保护中具有重要的作用。本研究发现 PTP α C(蛋白点 15)在 IP 组上调,其表达升高是否对 IP 处理所致 KATP 通道的开放进行反馈调节或发挥了其他作用,有待于进一步研究。

3.4 心肌结构蛋白

蛋白点 1、21 分别是肌球蛋白重链和调节性轻链,这两个蛋白点只在 IP 组表达。RAT HEART-2D 数据库显示诸如肌球蛋白调节轻链等蛋白质由于翻译后修饰等原因,导致分子量和等电点发生改变,因此可以处于心肌蛋白质 2-D 图谱中不同的位置^[12]。因为我们鉴定的蛋白点数量有限,另外也没有检测蛋白质的翻译后修饰,所以不清楚新出现的这两个肌球蛋白点是由于 IP 致转录因子活化而新合成的,还是由于发生翻译后修饰导致等电点、分子量发生变化而位移出现的。Arrell 等^[13]用腺苷诱导心肌细胞 IP 后,胞浆和富含肌丝组分的蛋白质组学分析发现肌球蛋白的调节轻链在两个位点出现磷酸化修饰。本研究中蛋白点 1、21 在 IP 时可能的重要作用尚不清楚。

本文采用蛋白质组技术首次对大鼠心肌 IP 延迟相蛋白质表达谱进行了研究。所获初步结果为从功能基因组学角度全面揭示 IP 延迟相心肌保护的分子机制提供了重要信息,并为寻找参与心肌缺血延迟相的未命名新蛋白质打下了基础。

[参考文献]

- [1] Bolli R, Shimura K, Tang XL, Kodani E, Xuan YT, Guo Y, et al. Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc Res*, 2002, **55** (3): 506
- [2] Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, **35** (9): 1 063
- [3] 吕青兰, 袁 灿, 张华莉, 陈广文, 王尧玲, 肖献忠, 等. 用 cDNA 芯片检测大鼠心肌缺血预适应后基因表达谱的改变. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (3): 189-193
- [4] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1 037
- [5] Fernandez J, Gharahdaghi F, Mische SM. Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels or polyvinylidene difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Electrophoresis*, 1998, **19** (6): 1 036
- [6] Depre C, Tomlinson JE, Kudej RK, Gaussin V, Thompson E, Kim SJ, et al. Gene program for cardiac cell survival induced by transient ischemia in conscious pigs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (16): 9 336-341
- [7] 肖卫民, 黄 勤, 九家驹, 肖献忠. α B-晶状体蛋白在心肌预适应早期相及延迟相心肌保护中的作用. *中国病理生理杂志*, 2000, **16** (10): 968
- [8] Das DK, Maulik N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal. *Arch Biochem Biophys*, 2003, **420** (2): 305-311
- [9] Neubauer S, Frank M, Hu K, Remkes H, Laser A, Horn M, et al. Changes of creatine kinase gene expression in rat heart post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30** (4): 803-810
- [10] Spindler M, Meyer K, Stromer H, Leupold A, Boehm E, Wagner H, et al. Creatin kinase-deficient hearts exhibit increased susceptibility to ischemia/reperfusion injury and impaired calcium homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, Epub ahead of print
- [11] Stadnicka A, Kwok WM, Warltier DC, Bosnjak ZJ. Protein tyrosine kinase dependent modulation of isoflurane effects on cardiac sarcolemmal K (ATP) channel. *Anesthesiology*, 2002, **97** (5): 1 198-208
- [12] Li XP, Pleissner KP, Scheler C, Regitz-Zagrosek V, Salnikow J, Jungblut PR. A two-dimensional electrophoresis database of rat heart proteins. *Electrophoresis*, 1999, **20** (4-5): 891-897
- [13] Arrell DK, Neverova I, Fraser H, Marban E, Van Eyk JE. Proteomic analysis of pharmacologically preconditioned cardiomyocytes reveals novel phosphorylation of myosin light chain 1. *Circ Res*, 2001, **89**: 480-487

(此文编辑 文玉珊)

•你知道吗•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-04-0460-01

高血压病的分期

1979 年我国修订的高血压病临床分期标准中,按临床表现将高血压分为 3 期:

一期:血压达到确诊高血压水平,舒张压大部分时间波动在 12.0~13.3 kPa(90~100 mm Hg)之间,休息后能够恢复正常,临床上无心、脑、肾并发症表现。

二期:血压达到确诊高血压水平,舒张压超过 13.3 kPa(100 mm Hg)以上,休息后不能降至正常,并有下列各项中的一项者:(1)X 线、心电图或超声心动图检查,有左心室肥大的征象;(2)眼底检查,见有眼底动脉普遍或局部变窄;(3)蛋白尿(或)血浆肌酐浓度轻度升高。

三期:血压达到确诊高血压水平,舒张压超过 14.7~16.0 kPa(110~120 mm Hg),并有下列各项中的一项者:(1)脑血管意外或高血压脑病;(2)左心衰竭;(3)肾功能衰竭;(4)眼底出血或渗出。

(胡必利编写)