

中国小型猪心肌梗死模型的比较蛋白质组学研究

赵艳峰, 叶能胜, 张荣利, 冯 雪, 罗国安, 王义明
(清华大学化学系分析中心, 北京 100084)

摘要 利用二维电泳(2DE)分离中国小型猪心肌梗死模型的正常与梗死心肌组织的蛋白提取液, 采用PDQuest 软件对比分析了两种心肌组织在 pH = 5 ~ 8 范围内的 2DE 谱图. 正常心肌组织检出 851 个蛋白点, 梗死组织检出 1 032 个蛋白点. 发现 13 个蛋白质点只在小型猪的正常心肌组织中表达, 而有 14 个蛋白质点只在梗死心肌组织中表达. 另外, 还有 49 个蛋白点在两种组织中表达量上有显著性变化($P < 0.05$), 选择进行质谱分析其中 11 个蛋白点, 成功地鉴定出 7 种蛋白, 蛋白功能分析结果表明, 这些蛋白的差异表达与心肌梗死过程相关.

关键词 心肌梗死; 心肌组织; 蛋白质组学; 二维凝胶电泳

中图分类号 O629.73; Q51 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2006)08-1467-05

蛋白质组学研究方法对疾病发病机理研究^[1]、发现疾病标志物^[2]和药物靶点的确证等方面有着重要意义. 对不同类型的心肌疾病进行蛋白质组学研究, 已经找到一些与心血管疾病相关的蛋白质^[3, 4], 这将有助于临床上对这类疾病的诊断、治疗和预后等研究. 通过心导管介入, 将栓子定位植入冠状动脉, 可以建立中国小型猪心肌梗死模型^[5], 为临床上研究心肌梗塞提供了新的动物模型.

我们在此模型的基础上, 对梗死模型的正常组织和梗死组织中的蛋白质组进行 2DE 分析, 寻找二者之间的差异蛋白, 并采用质谱法加以鉴定. 通过对差异蛋白进行功能分析, 初步探究了蛋白质分子在心肌梗死过程中所起的作用.

1 实验方法

1.1 仪器及试剂

PROTEAN IEF Cell 等电聚焦电泳仪、PROTEAN II Xi Cell 垂直电泳仪、PDQuest 凝胶分析软件购自 Bio-rad 公司; Power-look 2100XL 凝胶图像扫描仪购自美国 UMAX 公司; 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)购自德国 Bruker 公司.

固相 pH 梯度干胶条(pH = 3 ~ 10, 4 ~ 7, 5 ~ 8, 线性梯度, 17 cm), 两性电解质溶液(pH = 3 ~ 10, 5 ~ 8), 矿物油, 碘乙酰胺等购自 Bio-rad 公司; 丙烯酰胺, 二硫苏糖醇(DTT), TEMED 等购自 Promega 公司; 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS), 甲叉双丙烯酰胺, 甘氨酸, 尿素(Urea), 十二烷基磺酸钠(SDS), 溴酚蓝, 苯甲基磺酰氟(PMSF), Tris, 过硫酸铵, 低熔点琼脂糖, 硝酸银等购自 Amresco 公司; 脱氧核糖核酸酶(DNase)和核糖核酸酶(RNase)购自 Roche 公司; 甘油, 无水碳酸钠, 硫代硫酸钠均购自 Sigma 公司; 其它常用试剂为国产分析纯, 实验用水为 milli-Q 水. 中国小型猪购自中国农业大学.

1.2 动物模型及蛋白样品制备

按照文献[6]方法建立中国小型猪心肌梗死模型, 并收集正常及梗死心肌组织. 将组织剪碎, 加入提取液(9 mol/L 尿素含质量分数为 4% 的 CHAPS, 0.5% 的 DTT 和 0.14% 的 PMFS)中, 在冰水浴中 间歇匀浆. 冰水浴超声 10 min, 加入适量 DNase 及 RNase, 于 4 °C 下放置 15 min, 以 15 000 r/min 的速度离心 30 min. 弃去沉淀, 采用 Bradford 方法测定总蛋白浓度后, 置于 -80 °C 冰箱中保存.

收稿日期: 2005-09-06.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(批准号: 30271663, 90209005 和 90209035)资助.

联系人简介: 罗国安(1946 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事生命分析化学相关研究. E-mail: luoga@mail.tsinghua.edu.cn

1.3 2DE 分离蛋白及蛋白检测

取适量组织蛋白样品与水化上样缓冲液(8 mol/L 尿素含质量分数为 4% 的 CHAPS, 65 mmol/L DTT, 质量分数为 0.2% 的两性电解质和 0.001% 的溴酚蓝)混合, 银染上样量 100 μg , 考染上样量 1 000 μg . 等电聚焦极限电流为 50 $\mu\text{A}/\text{gel}$, 分离程序: 于 50 V 水化 15 h; 250 V 除盐 30 min; 1 000 V 除盐 1 h; 线性升压 5 h 到 10 000 V; 于 10 000 V 聚焦 60 000 V \cdot h. 然后, 将胶条在平衡液 I (6 mol/L 尿素含 0.375 mol/L Tris, 质量分数为 20% 的甘油, 2% 的 SDS 和 2% 的 DTT) 中平衡 10 min, 在平衡液 II (6 mol/L 尿素含 0.375 mol/L Tris, 质量分数为 20% 的甘油, 2% 的 SDS 的 2.5% 碘乙酰胺) 中平衡 10 min, 转移至分离胶 (12T) 上端, 进行 SDS-PAGE 分离. 电泳采用恒电流方式, 起始电流 10 mA/gel, 蛋白运行到分离胶顶端后, 用 30 mA/gel 继续分离, 至溴酚蓝前沿迁移至距凝胶底边 1 cm 处停止. 凝胶采用银染^[7]方法检测蛋白点.

1.4 图像采集分析

染色后的凝胶用凝胶扫描仪扫描成像, 用 PDQuest 软件进行分析. 图像分析过程包括蛋白点的检测、凝胶匹配、相对分子量和等电点的确定. 主要考察每块凝胶中的总蛋白质点数、蛋白质点的缺失和出现以及多块胶之间蛋白质点的表达丰度变化.

1.5 胶内酶切及质谱分析

质谱技术广泛应用在比较蛋白组学和信号肽蛋白组学^[8]等方面. 选择具有特征变化的蛋白点作为质谱分析对象, 参照文献^[7]方法对蛋白点胶内酶切, 提取多肽混合物进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析. 蛋白检索采用 3 种数据库互补检索: Mascot (www.matrixscience.com), Profound (http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe), PeptIdent (www.expasy.ch/tools/peptident/html).

2 结果与讨论

2.1 不同 IPG 蛋白的分离比较

图 1 是中国小型猪正常心肌组织的 2-DE 谱图. 用 PDQuest 软件进行图像分析, 在正常心肌组织

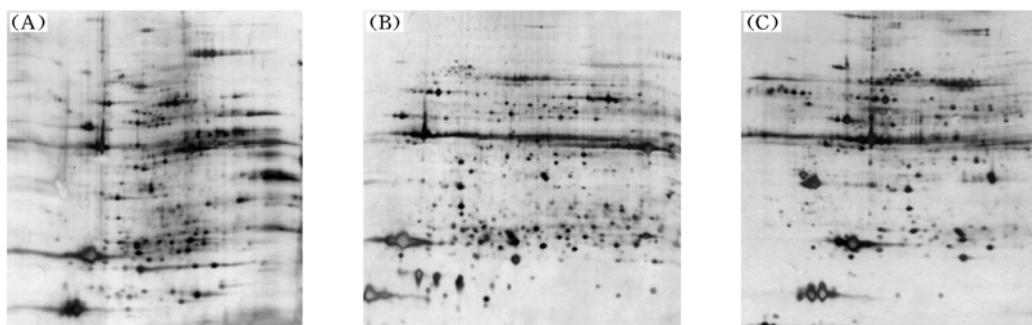


Fig. 1 The 2DE maps of normal myocardium

Proteins were detected by silver staining method. The 17 cm-IPG strips of pH=3–10(A), pH=5–8(B) and pH=4–7(C).

pH = 3 ~ 10 的谱图[图 1(A)]中检出约 830 个蛋白点, 其中以 $pI = 4.5 \sim 9.0$ 和 $M_r = 20\,000 \sim 100\,000$ 范围的蛋白斑点分布最多. 大部分蛋白点集中在胶条 pH = 5 ~ 8 的范围内, 并且在 pH = 4 ~ 6 的区域有几个表达量较大的点. 采用范围较宽的 pH = 3 ~ 10 胶条能够确定心肌组织中蛋白大致分布情况. 与 pH = 3 ~ 10 的胶条相比, pH = 5 ~ 8 的胶条分离效果明显提高[见图 1(B)]. 正常心肌组织 pH = 3 ~ 10 和 pH = 4 ~ 7 的凝胶局部图像见图 2, 说明窄范围 pH 胶条分离效果明显高于宽范围 pH 胶条.

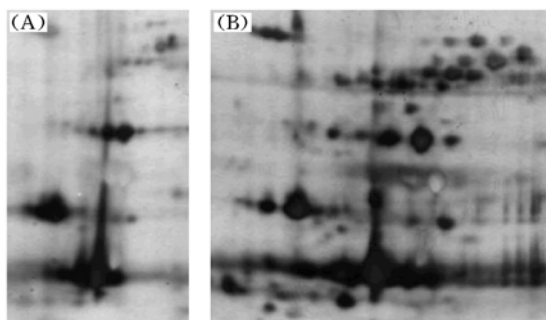


Fig. 2 Comparison of pH = 3–10(A) and pH = 4–7(B) strips for the separation of proteins

2.2 2DE 蛋白点的重复性

以 pH = 4 ~ 7 胶条分离正常心肌组织蛋白, 重复 4 次实验. 选取 4 块胶中相互匹配且图像清晰的蛋白点 21 个, 以其中一个点为参考点, 测量出其它点与此点在直角坐标中的距离 (x 方向为等电聚焦方向, y 方向为 SDS-PAGE 方向). 计算 4 块胶中相应的两点分别在 x , y 方向上距离的标准偏差 (S_x , S_y), 用来分析 2DE 中蛋白质点的重复性. 所选 20 个点相对于参考点的 x , y 方向上的距离分布在 0.6 ~ 100.6 mm, S_x 与 S_y 的范围在 0.3 ~ 2.5 mm, 表明 4 块胶中蛋白质点在位置上有较好的重复性. 而 20 个 S_y 的均值为 1.38 mm, 大于 S_x 的均值 1.23 mm, 说明 SDS-PAGE 方向上的平均偏差大于 IEF 方向上的平均偏差, 在本实验中 IEF 方向的位置重复性优于 SDS-PAGE 方向上的位置重复性.

2.3 差异蛋白的比较

采用 pH = 5 ~ 8 的 IPG 分析正常和梗死心肌组织间的蛋白差异, 2DE 实验重复 3 次. 用 PDQuest 软件进行分组比较分析, 发现在正常心肌组织中 [图 3(A)] 检测到 851 个蛋白点, 在梗死组织中 [图 3(B)] 检测到 1 032 个蛋白点, 匹配率 42. 13 个蛋白质斑点只在小型猪的正常心肌组织中表达, 在梗死组织中未检出 [见图 3(A) 中 A01 ~ A13]; 而有 14 个蛋白质斑点只在梗死组织中表达 [见图 3(B) 中 B01 ~ B14]. 18 个蛋白点在梗死组织中含量明显增加, 其中一个蛋白点在梗死组织中的表达量是正常组织中的 5 倍以上, 其它点在梗死组织中的表达量也达到正常组织中的 2 倍以上 [见图 3(B) 中 C01 ~ C18]; 另有 31 个蛋白点在梗死组织中的含量明显减少 [见图 3(A) 中 D01 ~ D31].

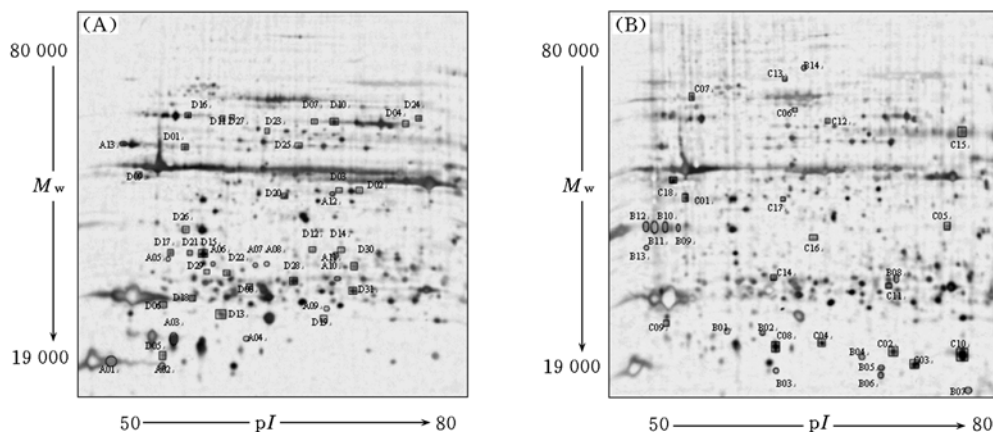


Fig. 3 The proteins expressed differently between normal (A) and infarcted (B) myocardium

2.4 蛋白鉴定

2.4.1 蛋白鉴定结果 分别从不同差异表达类型中选取蛋白点进行质谱分析, 鉴定结果见表 1.

Table 1 Proteins identified by MS

No.	Protein name (gene name)	AC for databases	M_w/pI (theoretical)	Score	Matched peptides/ all peptides	Seq. cov. (%)
A11	Tubulin <i>beta</i> chain	gi 135490, P02554	32.1/6.53 (49.83/4.78)	161	18/29	41
B05	α -b Crystallin (Cryab)	gi 7441290, P41316	20.5/6.67 (20.12/6.76)	64	6/35	44
B06	α -b Crystallin (Cryab)	gi 7441290, P41316	20.0/6.67 (20.12/6.76)	66	7/43	46
C02	α -b Crystallin (Cryab)	gi 7441290, P41316	21.9/6.75 (20.12/6.76)	102	11/61	53
C03	α -b Crystallin (Cryab)	gi 7441290, P41316	20.8/7.05 (20.12/6.76)	118	12/54	62
C10	α -b Crystallin (Cryab)	gi 7441290, P41316	21.0/7.15 (20.12/6.76)	161	17/62	66
C08	Myosin heavy chain, cardiac muscle <i>beta</i> isoform (Fragment) (MYH7)	gi 55741486, P79293	22.3/5.91 (223.66/5.59)	327	45/50	28
D07	Microsomal protease ER-60	gi 1583929	55.5/6.36 (57.01/5.88)	224	20/34	42
D10	Lipoamide dehydrogenase	gi 47522940, P09623	56.6/6.52 (54.72/7.59)	177	17/34	45
D25	α -Enolase (Eno1)	gi 4927286, Q9XSJ4	51.0/6.29 (47.59/6.44)	89	10/28	24
D26	Cardiac <i>alpha</i> tropomyosin (TPM1)	gi 1927, P42639	35.8/5.53 (32.72/4.69)	137	18/56	51

二维电泳分离得到的蛋白和多肽会受到多种肽链修饰作用的影响, 比如酰胺甲基化、氧化、氨基末端的乙酰化作用以及丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸在染色过程中可能发生磷酸化等^[9], 进行质谱数据的

生物信息检索时,应适当考虑到可能发生的修饰作用. B05, B06, C02, C03, C10 这几个点虽然在 2DE 的分离结果中表达出不完全相同的等电点和分子量,但是质谱鉴定结果却证明是同一种蛋白,也是由于在肽链不同位点发生修饰作用的结果. 以 C03 点为例(见图 4),氨基酸序列覆盖率为 58%,已鉴定出的序列段中有一处(APSWIDTGLSEMR)被氧化;而 C10 质谱鉴定覆盖率为 72%,有两处(APSWIDTGLSEMR 和 APSWIDTGLSEMRLEK)被氧化. 这就造成了二者虽然为同一种蛋白,但是在 2DE 中却表现为不同蛋白点.

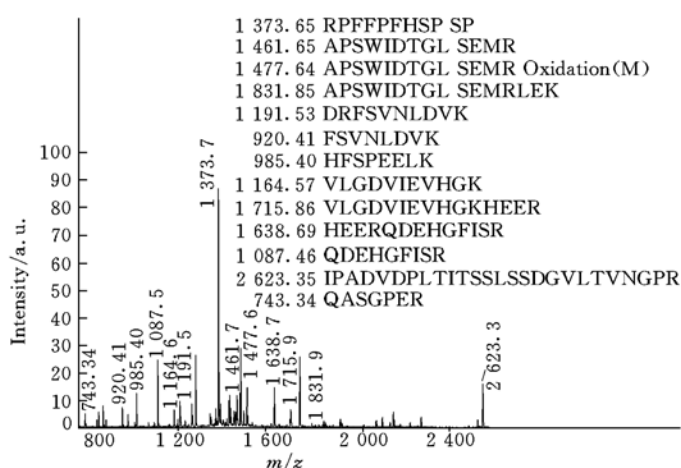


Fig. 4 MS spectrum of protein spot C03

α -b Crystallin 的氨基酸序列和 C03, C10 匹配上的氨基酸段如下:

C03:	1 MDIAIHPWI	RRPFFPFHSP	SRLFDQFFGE	HLLESDLFPA	STSLSPFYFR
	51 PPSFLRAPS	IDTGLSEMRL	EKDRFSVNL	VKHFSPEELK	VKVLGDVIEV
	101 HGKHEERQDE	HGFISREFHR	KYRIPADVDP	LTITSSLSSD	GVLTVNGPRR
	151 QASGPRTIP	ITREEKPAVT	AAPKK		
C10:	1 MDIAIHPWI	RRPFFPFHSP	SRLFDQFFGE	HLLESDLFPA	STSLSPFYFR
	51 PPSFLRAPS	IDTGLSEMRL	EKDRFSVNL	VKHFSPEELK	VKVLGDVIEV
	101 HGKHEERQDE	HGFISREFHR	KYRIPADVDP	LTITSSLSSD	GVLTVNGPRR
	151 QASGPRTIP	ITREEKPAVT	AAPKK		

2.4.2 鉴定蛋白的生物学意义 在中国小型猪心肌蛋白质组分析中发现多种细胞蛋白发生显著性变化,包括骨架蛋白、收缩蛋白及其调节蛋白以及与能量相关的酶蛋白.

微管(Tubulin)是构成细胞骨架的主要成分,作为维持细胞结构和功能的完整网络系统,与心力衰竭发生发展的关系密切. Iwai 等^[10]认为心肌骨架系统破坏是缺血再灌注损伤发生的机制,微管蛋白遭到破坏导致细胞膜失去支持,脆性增加,线粒体因失去骨架支持发生移位,加速心肌细胞的损伤. 本实验结果也证明,微管蛋白在正常心肌组织中适量表达,而在缺血性心肌梗死的心肌组织中大量破坏而未被检测出来.

原肌球蛋白(又称原肌凝蛋白, Tropomyosin, TM)可影响并调控肌动蛋白与肌球蛋白之间的相互作用,安静时具有抑制二者结合的效应,还可以增强肌钙蛋白 I 的抑制作用,成为肌肉收缩过程中重要的调节蛋白^[11]. 本实验中发现原肌球蛋白在梗死心肌组织中的含量明显减少,与心肌梗死以收缩蛋白的减少为特征相符合,并从分子生物学水平上指出了收缩调节蛋白在心肌梗死中的重要意义.

肌球蛋白是负责收缩的主要蛋白,心脏肌球蛋白重链(MHC)有 α -MHC 和 β -MHC 两种基因表达,有 V1($\alpha\alpha$), V2($\alpha\beta$), V3($\beta\beta$) 3 种同工酶. α -MHC 与肌动蛋白亲和力高于 β -MHC,故肌球蛋白以 V1 占优势的心肌 ATP 酶的活性最高,肌肉收缩速率最快,耗能也最多^[12]. 当能量供不应求时,肌球蛋白异构体向 V3 转化,使 ATP 酶活性下降,心肌收缩功能降低,耗氧量下降,可见 β -MHC 含量增加是一种生理适应性的表现,同时也预示了心脏正处于功能不足的状态.

α B-晶状体球蛋白(α B-crystallin, α B-C)又称 Hsp22,是热休克蛋白(Hsp)家族中的一员,在心脏的表达极为丰富. Golenhofen 等^[13]研究证实,大鼠或猪心脏缺血后可诱导 α B-C 由胞质向细胞骨架结构转移,表明其与细胞骨架有密切关系. Bluhm 等^[14]证明, α B-C 可以保护模拟缺血损伤的心肌细胞中微管系统的完整性. 本文结果表明, α B-C 在梗死组织中的表达量明显高于正常组织,从而进一步肯定 α B-C 对心肌细胞缺血性损伤的保护作用,其过度表达可使心肌细胞耐受严重的缺血性损伤.

硫辛酰胺脱氢酶(Lipoamide dehydrogenase or diaphorase, Dia4)和烯醇酶(Alpha enolase)都属于酶

类蛋白, 其功能与能量代谢相关. Dia4 是氧化磷酸化呼吸链重要的传递电子体. 吕青兰等^[15] 在研究缺血预适应后大鼠心肌基因表达谱的改变中, 发现 Dia4 等一些能量相关基因在缺血预适应时表达水平明显下调, 这表明心肌经短暂缺血后能量代谢受抑. 本文结果则在蛋白质组学研究领域证明了 Dia4 与心肌细胞供能相关的蛋白在缺血性心肌梗死时会有明显下调. 烯醇化酶是糖酵解过程中的水解酶, 其功能有调控缺氧诱导因子、核呼吸因子 1, 参与糖分解酶的调控. 实验结果表明^[16], 缺血再灌注时 α -烯醇酶 mRNA 和蛋白均下降, 由此 ATP 水平下降, 从而在心肌收缩及存活性能方面发挥作用.

参 考 文 献

- [1] ZHOU Bo(周 波), YANG Wei(杨 伟), ZHANG Jing-Hua(张景华) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2003, **24**(12): 2202—2207
- [2] LUO Guo-An(罗国安), DENG Bin(邓 斌), YE Neng-Sheng(叶能胜) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2005, **26**(9): 1645—1649
- [3] Huang Zhen-Yu, Yang Peng-Yuan, Mohamad R. A. . Life Sciences[J], 2004, (75): 3103—3115
- [4] Scobiala S., Klocke R., Michel G. *et al.*. Current Medicinal Chemistry[J], 2004, **11**(24): 3203—3218
- [5] LI Lian-Da(李连达), ZHANG Rong-Li(张荣利), FENG Xin-Qing(冯新庆) *et al.*. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology(中药新药与临床药理)[J], 2003, **14**(3): 143—146
- [6] Mortz E., Krogh T. N., Vorum H. *et al.*. Proteomics[J], 2001, **1**(11): 1359—1363
- [7] Ward L. D., Reid G. E., Moritz R. L. *et al.*. J. Chromatogr. [J], 1990, **519**: 199—216
- [8] DENG Bin(邓 斌), LUO Guo-An(罗国安). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2003, **31**(2): 232—238
- [9] Wang Daojing, Jennifer S. Park, Julia S. F. Chu *et al.*. The Journal of Biological Chemistry[J], 2004, **279**(42): 43725—43734
- [10] Iwai K., Hori M., Kitabatake A. *et al.*. Circulation Research[J], 1990, **67**: 694—706
- [11] Pervaiz S., Anderson F. P., Lohmann T. P. *et al.*. Clinical Cardiology[J], 1997, **20**(3): 269—271
- [12] JIANG Hong(姜 红). Foreign Med. Sci. Sect. Cardiovasc Dis. (国外医学心血管疾病分册)[J], 1996, **23**(2): 67—69
- [13] Golenhofen N., Ness W., Koob R. *et al.*. Am. J. Physiol. (Heart Circ Physiol.) [J], 1998, **274**: H1457—H1464
- [14] Bluhm W. F., Martin J. L., Mestrl R. *et al.*. Am. J. Physiol. (Heart Circ Physiol.) [J], 1998, **275**: H2243—H2249
- [15] LÜ Qing-Lan(吕青兰), YUAN Can(袁 灿), ZHANG Hua-Li(张华莉) *et al.*. Chinese Journal of Arteriosclerosis(中国动脉硬化杂志) [J], 2003, **11**(3): 189—193
- [16] QIU Jie(邱 洁), GAO Hai-Qing(高海青). Chin. J. Geriatr. (中华老年医学杂志)[J], 2005, **24**(2): 152—155

Different Protein Expression of Myocardium from Chinese Mini-swine Model of Myocardial Infarct

ZHAO Yan-Feng, YE Neng-Sheng, ZHANG Rong-Li, FENG Xue, LUO Guo-An*, WANG Yi-Ming
(Analysis Center, Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract High-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE), followed by computer assisted image analysis was used to screen protein patterns of normal and infarcted cardiac muscle tissue for quantitative and qualitative differences in protein expression. In the gels of pH = 5—8 IPG strips, 851 protein spots were detected in normal cardiac muscle tissues and 1 032 protein spots were resolved in infarcted cardiac muscle tissues. Thirteen protein spots were only expressed in normal cardiac muscle tissues, and 14 protein spots were only expressed in infarcted cardiac muscle tissues. The results also showed that 49 protein spots displayed quantitative changes in expression between normal and infarcted cardiac muscle tissue. Eleven protein spots were subjected to MS analysis and 7 proteins were identified by PMF. These proteins may be involved in the cardiovascular injury, and play an important role for the future treatment of coronary heart disease.

Keywords Myocardial infarct; Cardiac muscle tissue; Proteome; Two-dimensional gel electrophoresis
(Ed.: H, J, Z)