

腺苷 A1 受体激动剂预处理兔延迟相 心肌蛋白质组学分析

周建美^{1,2}, 邹定全^{1,2}, 冉珂^{1,2}, 常业恬^{1,2}

(中南大学 1. 湘雅二医院麻醉科; 2. 麻醉医学研究所, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 研究腺苷 A1 受体激动剂 2-氯环戊腺苷(2-chloro-N6-cyclopentyladenosine, CCPA) 预处理延迟相缺血再灌注心肌保护的蛋白质表达谱的变化。方法: 8 只新西兰大白兔随机分为 CCPA 预处理组(CCPA 组)和生理盐水预处理组(NS 组)。CCPA 组用 100 μg/kg CCPA 预处理大白兔, NS 组用生理盐水预处理。24 h 后冠状动脉左前降支 30 min 缺血/2 h 再灌注, 然后取左心室缺血区心肌组织进行蛋白质组学研究。另取 12 只新西兰大白兔随机分为假手术组(Sham 组)、生理盐水预处理组(NS 组)和 CCPA 预处理组(CCPA 组), 每组 4 只, 用 Western 印迹验证差异蛋白 αB-晶状体蛋白的表达。结果: 双向凝胶电泳分析发现 2 组表达明显差异的蛋白点有 55 个。其中 17 个差异蛋白质点用基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱技术以及 Mascot 和 ExPASy 软件分析, 初步鉴定出 17 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、离子通道蛋白、免疫相关蛋白等。Western 印迹证实 αB-晶状体蛋白在 CCPA 组中的表达明显上调。结论: CCPA 预处理延迟相缺血再灌注心肌组织的蛋白质表达谱发生改变, 这些蛋白质可能与腺苷 A1 受体激动剂预处理延迟相缺血再灌注心肌保护作用有关。

[关键词] 腺苷 A1 受体激动剂; 2-氯环戊腺苷; 预处理; 延迟相; 心肌保护; 蛋白质组

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.10.011

Proteomics analysis of adenosine A1 receptor agonist-induced delayed myocardial protection in rabbits

ZHOU Jianmei^{1,2}, ZOU Dingquan^{1,2}, RAN Ke^{1,2}, CHANG Yetian^{1,2}

(1. Department of Anesthesiology, Second Xiangya Hospital;

2. Institute of Anesthesiology, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of myocardial protein expression profiles in 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine (CCPA), an adenosine A1 receptor agonist-induced delayed myocardial protection in New Zealand rabbits. **Methods** A total of 8 rabbits were randomly divided into a CCPA group (CCPA group) and a normal saline group (NS group). CCPA and NS were infused into rabbits in the CCPA group and the NS group respectively. Twenty-four hours later, the rabbits were subjected to 30 min left anterior descending coronary artery occlusion and were reperused for 2 hours, then the ischemic zone tissues of left ventricle were sampled for proteomic analysis. A total of 12 other New Zealand rabbits were divided into a sham group (Sham group), a normal saline group (NS group) and a CCPA group (CCPA group). The expression of αB-crystalline, one of the differential proteins, was confirmed by Western blot. **Results** Analysis of two dimensional gel electrophoresis showed that the expression of 55 protein spots were different between the two groups, 17 protein spots were preliminarily identified with the matrix-assisted laser desorption/ionization

time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and Mascot and ExPasy bioinformatics software. These proteins included stress proteins, metabolism-associated proteins, signal transduction pathway-related proteins, ionophorous proteins, immunity-associated proteins, and so on. Western blot showed that the expression of α B-crystalline was significantly up-regulated in the CCPA group. **Conclusion** The myocardial protein expression profiles are changed markedly in the preconditioning late phase of CCPA. The differential proteins might be involved in the delayed cardioprotection induced by CCPA.

Key words: adenosine A1 receptor agonist; 2-chloro-N6-cyclopentyl-adenosine; preconditioning; late phase; cardioprotection; proteomics

腺苷 A1 受体激动剂 2-氯环戊腺苷(2-chloro-N6-cyclopentyladenosine, CCPA) 预处理, 可诱导延迟相心肌保护作用^[1-2]。而预处理的延迟相心肌保护作用的机制非常复杂, 涉及内源性保护介质释放、蛋白激酶 C 及丝裂素活化蛋白激酶家系等细胞信号转导途径, 以及内源性保护蛋白质的合成等多种因素。其中内源性蛋白质合成上调是延迟保护的关键环节。因此, 本实验采用蛋白质组学技术, 从整体上初步分析 CCPA 预处理延迟相心肌保护的蛋白质表达的变化, 并对其部分差异蛋白质进行鉴定, 为进一步寻找防治心肌缺血再灌注损伤的蛋白质靶标提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验方法

1.1.1 实验分组及造模

健康成年新西兰大白兔 8 只, 体质量 2.0 ~ 2.5 kg, 雌雄各半, 随机分为 CCPA 预处理组 (CCPA 组) 和生理盐水预处理组 (NS 组), 每组 4 例。CCPA 组静脉注射 100 μ g/kg CCPA (总体积 1 mL), NS 组静脉注射 1 mL 生理盐水。24 h 后 2 组均分离兔左冠状动脉前降支, 结扎 30 min, 再灌注 2 h。摘取心脏, 浸入冷生理盐水中冲洗, 去除血液。取左心室缺血区心肌组织, 滤纸吸干后置于液氮, 转移至 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.1.2 心肌蛋白质样品的处理

取冷冻心肌 200 mg, 剪碎, 加 3 倍体积的蛋白裂解缓冲液 (含尿素 8 mol/L, 硫脲 2 mol/L, 丙基硫酸盐 4%, 三羟甲基氨基甲烷碱 40 mmol/L, 乙二醇四乙酸 1 mmol/L, 二硫苏糖醇 65 mmol/L, 苯甲基磺酰氟 35 mmol/L, 脱氧核糖核酸酶 1 mg/mL, 核糖核酸酶 250 μ g/mL), 0 $^{\circ}$ C 水浴中匀浆约 2 min, 36 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 15 000 r/min 离心 45 min, 取上清液加 3 倍冰丙酮沉淀, 离心后去上清液, 沉淀物加裂解缓冲液复溶, 再用 28 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 超速离心 1 h, 取上清液以

考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度。

1.1.3 双向凝胶电泳及凝胶图像分析

取蛋白质 2 000 μ g 上样。第一向固相 pH 梯度等电聚焦的电泳程序设置为: 30 V \times 12 h, 500 V \times 1 h, 1 000 V \times 1 h, 3 000 V \times 1.5 h, 6 000 V \times 1.5 h, 8 000 V \times 5 h。电泳结束后采用二硫苏糖醇平衡液和碘乙酰胺平衡液两步平衡; 用 12% 的二硫苏糖醇-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶, 以 0.5% 琼脂糖封胶。用 PRO-TEAN II Xi 垂直电泳槽进行第二向电泳。电泳结束后采用考马斯亮蓝染色法凝胶染色。用 UMAX Powerlook III 扫描仪和 Image Scanner 的 LabScan 软件扫描凝胶, 用 Image Master 2D Elite 3.01 系统进行图像分析。图像分析过程包括蛋白点的检测、背景消减、点的匹配, 合并后进行蛋白质含量变化的分析。

1.2 质谱分析

经常规切胶、脱色、还原与烷基化、原位酶解、萃取, 并采用基质辅助的激光解吸-飞行时间质谱 (matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 技术^[3-4] 以获得肽质量指纹图, 通过因特网利用 Matrix Science 的 Mascot 与 ExPASy 的 Peptide 查询软件搜索鉴定。

1.3 Western 印迹检测 α B-晶状体蛋白的表达

另取新西兰大白兔 12 只, 体质量 2.0 ~ 2.5 kg, 雌雄各半, 随机分为假手术组 (Sham 组)、生理盐水预处理组 (NS 组) 和 CCPA 预处理组 (CCPA 组), 每组 4 只。Sham 组仅行开胸, 左冠状动脉前降支套带, 不行缺血再灌注。NS 组和 CCPA 组预处理和心肌缺血再灌注实验方法同 1.1.1。再灌注后提取缺血心肌组织蛋白, 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭, 与第一抗体 (1:1 000 稀释兔抗 α B-晶状体蛋白) 反应, 与第二抗体 (1:1 000 过氧化物酶标记亲和纯化的抗兔免疫球蛋白 G) 反应。显色后用 Bandleader 3.0 软件对 Western 印迹条带进行灰度扫描, 按下述公式分别计算 3 次实验中 α B-晶

状体蛋白的相对含量:蛋白相对含量=(该蛋白条带的灰度值-背景的灰度值)/(上样对照条带的灰度值-背景的灰度值),以此比值计算均数与标准差。

2 结 果

2.1 双向凝胶电泳和差异蛋白质点分析

获得较满意的双向凝胶电泳图(图1,2)。图像分析结果:NS组与CCPA组的蛋白质点分别为 861 ± 42 和 859 ± 38 个,组内匹配率分别为85.8%和87.1%,组间匹配率为75.2%。比较分析CCPA组与NS组心肌蛋白谱,发现表达明显差异的蛋白点有55个,其中CCPA组表达明显增强的有25个,表达明显降低的有16个,仅在CCPA组表达的有14个。

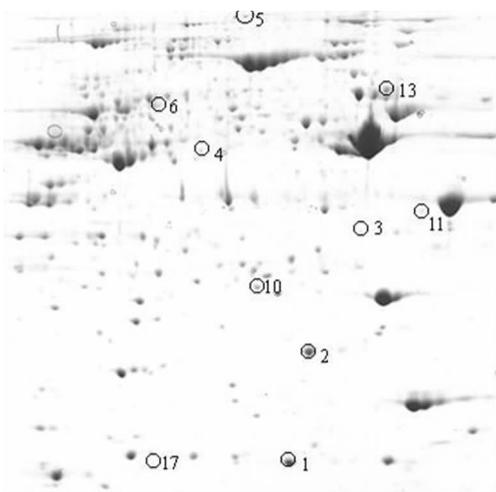


图1 生理盐水处理组兔左心室蛋白的二维电泳图谱(4个样本中的1次)。

Fig.1 2D map of rabbit left ventricle proteins in the NS group (one of four samples).

2.2 蛋白质点肽质量指纹图分析

对其中差异表达的17个蛋白质点进行MALDI-TOF-MS肽质量指纹图分析,共获得了17张肽质量指纹图谱。图3是其中2号蛋白点的肽质量指纹图谱。

2.3 数据库查询结果

用质谱鉴定了17个差异表达蛋白质。数据库搜索结果显示这些蛋白包括应激反应蛋白、代谢相关蛋白、信号调节蛋白、离子通道蛋白、免疫相关蛋白等。

2.4 Western印迹分析

Sham组中 α B-晶体蛋白表达很少,NS预处理组表达较多,而CCPA处理组 α B-晶体蛋白表达显著增高($P < 0.01$,图4)。

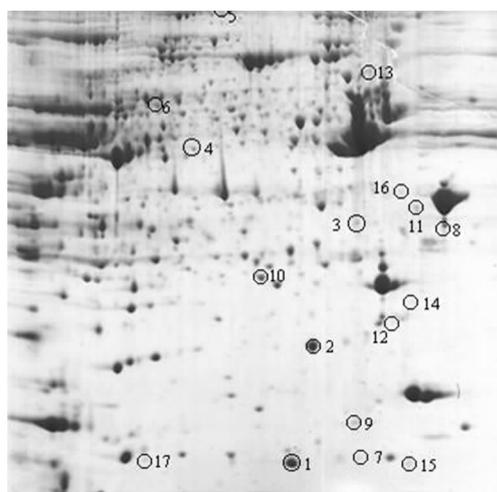


图2 CCPA处理组兔左心室蛋白的二维电泳图谱(4个样本中的1次)。

Fig.2 2D map of rabbit left ventricle proteins in the CCPA group (one of four samples).

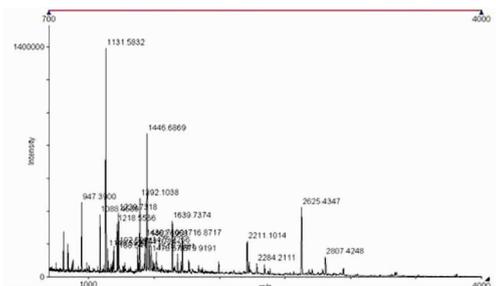


图3 第2号蛋白点的肽质量指纹图谱。

Fig.3. Peptide map fingerprint of spot 2.

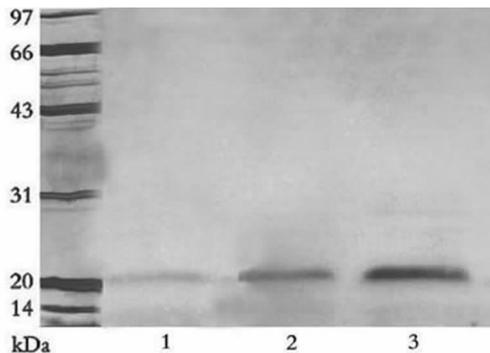


图4 Western印迹检测显示CCPA对 α B晶体蛋白表达的影响。1:Sham组;2:NS组;3:CCPA组。

Fig.4 Western blot showed the effect of CCPA on the expression of α B-crystalline. 1:Sham group; 2: NS group; 3: CCPA group.

3 讨 论

本实验采用双向凝胶电泳分离、质谱分析和蛋白质数据库查询等技术和方法,比较了 CCPA 组与 NS 组的心肌蛋白表达谱,发现两组间表达明显差异的蛋白点有 55 个,其中 CCPA 组表达明显增强的有 25 个,表达明显降低的有 16 个,仅在 CCPA 组表达的有 14 个。说明 CCPA 预处理延迟相免缺血再灌注心肌的蛋白质表达谱有明显变化。进一步对其中的 17 个点进行了质谱分析,鉴定出的蛋白质包括:1) 应激反应蛋白: α B-晶状体蛋白; 2) 代谢相关蛋白: L-天门冬氨酸-O-甲基转移酶和鸟嘌呤结合蛋白; 3) 信号调节蛋白: 磷酸肌醇 3 激酶; 4) 离子通道蛋白: 电压依赖性阴离子选择性通道蛋白 2 和接头相关蛋白复合体 1; 5) 免疫相关蛋白: HLA-B 相关转录体 3, 主要组织相容性复合物-II DR 抗原 β 亚单位, 免疫球蛋白重链; 6) 其它: 血液结合素、血浆白蛋白前体、腱糖蛋白 N 等。

α B-晶状体蛋白是一种小分子热休克蛋白,具有分子伴侣的功能,并具有抗氧化、抗凋亡或者抗炎反应的功能,对心肌缺血再灌注损伤有保护作用^[5-7]。另有研究^[8]报道: α B-晶状体蛋白过表达可减少转基因鼠心肌缺血再灌注引起的细胞坏死。本实验中, α B-晶状体蛋白(2号蛋白点)在 CCPA 组表达明显上调,提示 α B-晶状体蛋白过表达可能与 CCPA 预处理延迟性心肌保护作用有关。

磷酸肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 1/ERK2 及蛋白激酶 C 等信号通路,是目前公认的细胞生存信号通路^[9-10]。研究表明:当细胞膜上 G 蛋白偶联受体激活后即可使 PI3K-AKT 生存信号通路激活,引起内皮型一氧化氮合酶磷酸化,进而引起心肌组织中一氧化氮的合成,达到保护心肌的作用。在缺血预处理以及其它药物预处理中,这一信号通路发挥了重要作用。但有研究^[11]认为 PI3K-AKT 这一信号通路并没有在腺苷受体激动剂所诱导的心肌延迟相中发挥保护作用。本研究中,CCPA 组 PI3K 明显低于 NS 组,也说明 PI3K 在 CCPA 所诱导的心肌保护效应中未发挥重要作用。

另外,本研究鉴定的蛋白点中还有 14 个蛋白质均是在 CCPA 组中高表达或仅在 CCPA 组中表达,

经美国国立生物技术信息中心/医学网站查询相关蛋白,并未查到与心肌保护相关的文献,因此这些蛋白质在 CCPA 预处理的延迟性心肌保护效应中发挥了何种作用,有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Dana A, Baxter G F, Yellon D M. Delayed or second window preconditioning induced by adenosine A1 receptor activation is independent of early generation of nitric oxide or late induction of inducible nitric oxide synthase[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001, 38(2):278-287.
- [2] Lasley R D, Keith B J, Kristo G, et al. Delayed adenosine A1 receptor preconditioning in rat myocardium is MAPK dependent but iNOS independent[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(2):785-791.
- [3] Arrenll D K, Neverova I, van Eyk J E. Cardiovascular proteomic: evolution and potential[J]. *Circ Res*, 2001, 88(8):763-773.
- [4] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. *Nature*, 2003, 422(6928):198-207.
- [5] 刘双,肖献忠. α B-晶体蛋白的功能与疾病[J]. *生命的化学*, 2005, 25(2):89-91.
LIU Shuang, XIAO Xianzhong. Functions of and diseases associated with α B-crystalline[J]. *Chemistry of Life*, 2005, 25(2):89-91.
- [6] Xiao X, Benjamin I J. Stress-response proteins in cardiovascular disease[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(3):685-690.
- [7] Kregel K C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance[J]. *J Appl Physiol*, 2002, 92(5):2177-2186.
- [8] Ray P S, Martin J L, Swanson E A, et al. Transgene overexpression of α B-crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion[J]. *FASEB J*, 2001, 15(2):393-402.
- [9] Yellon D M, Hausenloy D J. Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postconditioning[J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2005, 2(11):568-575.
- [10] Vinten-Johansen J, Zhao Z Q, Zatta A J, et al. Postconditioning: A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(4):295-310.
- [11] Button L, Mireylees S E, Germack R, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK1/2 are not involved in adenosine A1, A2A or A3 receptor-mediated preconditioning in rat ventricle strips[J]. *J Exp Physiol*, 2005, 90(5):747-754.