

• 研究论文 •

## 缺氧预处理诱导心肌细胞蛋白质组变化的初步研究

徐菲菲\* 孙 胜 刘秀华\*

(中国人民解放军总医院基础所病理生理研究室 北京 100853)

**摘要** 缺氧预处理(hypoxia preconditioning, HPC)可模拟缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)对缺血/再灌注心肌的保护作用, 涉及细胞内众多分子事件. 本工作旨在采用双向电泳和质谱分析等蛋白质组分析技术, 发现缺氧预处理后心肌细胞蛋白质整体表达上的变化, 初步分析其与缺氧预处理心肌保护作用的关系. 将原代培养的 SD 乳鼠心肌细胞分为2组( $n=6$ ): (1)缺氧预处理组(HPC): 将细胞置缺氧仓内短暂缺氧 20 min 进行缺氧预处理(HPC), 制备心肌细胞蛋白提取物; (2)对照组(control): 细胞置于培养箱内持续常氧孵育至实验结束, 提取蛋白. 采用双向凝胶电泳和图像扫描, 经蛋白样本分离和考马斯亮蓝染色后比较分析, 选取 3 个差异表达蛋白点进行胶内酶切、肽质量指纹图谱分析和数据库检索. 双向电泳可分离约  $529 \pm 45$  个蛋白质, 点匹配率约为  $78\% \pm 7.5\%$ . 18 种蛋白质在 HPC 后发生明显表达差异, 其中 12 种蛋白质表达降低, 6 种表达增高. 经质谱分析鉴定出的 3 种蛋白质分别为 myosin light polypeptide 3, nucleoside diphosphate kinase (NDPK)和 calreticulin (CRT). 缺氧预处理引起心肌细胞蛋白质组变化, 初步发现其中 myosin light polypeptide 3 表达下调、nucleoside diphosphate kinase 和 calreticulin 表达增加, 可能通过调节心肌细胞的收缩性、激活 G 蛋白、调节细胞内  $Ca^{2+}$  浓度而保护心肌. 本工作通过研究缺氧预处理延迟保护过程中心肌内源性蛋白表达水平的变化, 有助于从细胞水平探讨预处理延迟保护机制.

**关键词** 缺氧预处理; 心肌细胞; 蛋白质组; 双向电泳; 质谱

## Pilot Study of Proteomic Changes of Cardiomyocyte Induced by Hypoxia Preconditioning

XU, Fei-Fei\* SUN, Sheng LIU, Xiu-Hua\*

(Department of Pathophysiology, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853)

**Abstract** Proteomic differential expression of cardiomyocyte after hypoxia preconditioning was investigated and protein spots with significant difference were identified using 2-D electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry to understand the intracellular mechanism of preconditioning. Cultured cardiomyocytes of neonatal Sprague-Dawley rat have been divided into two groups: hypoxia preconditioning (HPC), and control (C) ones. After protein extraction, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, Coomassie Brilliant Blue R-250 staining, followed by image analysis, was used to screen protein patterns of normal and cardiomyocytes after HPC for quantitative and qualitative differences in protein expression. Three protein spots with significant difference were picked out and subjected to in-gel digest and MALDI-TOF for identification. More than 529 protein spots were detected on each CBB R-250-stained gel and a match rate  $78\% \pm 7.5\%$  was achieved. The results also showed that 18 protein spots displayed quantitative changes in expression after HPC, of which, 12 proteins were decreased in abundance and 6 proteins showed higher expression. After mass spectrometry analysis, three protein spots were identified as myosin light polypeptide 3, nucleoside diphosphate kinase and calreticulin. HPC induced proteomic changes in cardiomyocyte. The decreased

\* E-mail: feiyang3012@yahoo.com.cn; xiuhualiu98@yahoo.com.cn

Received January 10, 2005; revised July 14, 2005; accepted November 16, 2005.

国家自然科学基金(No. 30270550)和北京市自然科学基金(No. 7032044)资助项目.

expression of myosin light polypeptide 3, and the increased expression of nucleoside diphosphate kinase and calreticulin induced by hypoxia preconditioning may be involved in the cardioprotection via decreasing contractibility of cardiomyocytes, activating G protein, and decreasing calcium concentration. It is helpful to discuss mechanism of preconditioning on cell level that can investigate proteomic differential expression of cardiomyocyte after hypoxia preconditioning.

**Keywords** hypoxia preconditioning; cardiomyocyte; proteome; two-dimensional electrophoresis; mass spectrometry

缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)对缺血/再灌注心肌的保护作用已在多种属动物在体、离体心脏和心肌细胞上得到证实, 该现象可以被缺氧预处理(hypoxia preconditioning, HPC)模拟. 缺氧预处理(HPC)是指用一次短暂的缺氧刺激使组织或细胞在后续的长期缺氧(或缺血)中得到保护, 目前已被用于器官和细胞水平预处理的研究之中. 1995年 Webster等<sup>[1]</sup>在培养的乳鼠心肌细胞上观察到短暂缺氧预处理可使细胞在后续的长期缺氧/复氧损伤中得到保护, 为细胞水平预处理研究提供了可行性.

预处理(preconditioning, PC)的保护作用具有时相性, 包括预处理后即刻出现并持续1~3h的早期保护和12~24h再度出现并持续24~72h的延迟保护<sup>[2]</sup>. 其中延迟保护作用具有更重要的临床意义.

现有研究资料显示, 预处理的延迟保护机理涉及腺苷、内皮源性舒张因子、一氧化氮等内源性保护介质释放, 蛋白激酶C和丝裂素活化蛋白激酶家系等细胞信号转导途径激活, 以及内源性保护蛋白转录、合成及翻译后修饰改变等多种因素<sup>[3]</sup>, 其中内源性保护蛋白合成上调是延迟保护的关键环节, 采用蛋白质组学研究技术, 探讨缺氧预处理减轻心肌损伤过程中心肌细胞蛋白表达模式的变化, 具有重要的理论和实际意义.

蛋白质组(Proteome)的概念是1994年由Wilkins和Williams首次提出的<sup>[4]</sup>, 包括细胞内由基因转录或翻译后修饰产生的所有蛋白质. 到目前为止, 蛋白质组研究技术和方法已经从蛋白质组作图, 蛋白质组成分鉴定等扩展到基因产物的识别和功能鉴定、细胞分化与发育等重要生命活动的研究和医药靶分子的寻找和分析等, 并已开始应用于对肿瘤和一些重要疾病病理进程等多个领域的研究<sup>[5-7]</sup>.

本工作采用蛋白质组研究技术, 首先对正常和缺氧预处理心肌细胞蛋白质进行双向凝胶电泳(2-DE)分离和计算机软件分析, 发现缺氧预处理后心肌细胞蛋白质整体表达上的变化, 结合质谱分析技术, 对差异显示的蛋白质进行鉴定, 初步分析其与缺氧预处理心肌保护作用的关系.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

Sprague-Dawley (SD)乳鼠由解放军总医院医学实验动物中心提供. DMEM培养基为Gibco公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所; EDTA, PMSF, CHAPS, SDS, 丙烯酰胺, *N,N'*-methylenebisacrylamide, 过硫酸胺, TEMED和DTT为Sigma产品; Trypsin, Tris Base, 甘氨酸为Promega产品; IPG buffer (pH 3~10), Destreak Reagent, 低分子量 marker, 上样滤纸(IEF Sample Appl Piece), IPG干胶条(pH 3~10)为Amersham Biosciences产品; 蛋白酶抑制剂(cocktail tablets)为Roche产品; 碘乙酰胺为Acros organics产品; 乙腈(色谱级)为J. T. Baker公司产品; 三氟乙酸(TFA)为Merck公司产品; HCCA(质谱基质)购自Bruker公司.

### 1.2 实验仪器

双向电泳所用仪器IPGphor<sup>TM</sup> Isoelectric Focusing System和Ettan<sup>TM</sup> DALT six electrophoresis unit购自Amersham Pharmacia Biotech公司, 循环水冷却器Julabo F10为德国Julabo Labortechnik公司产品, 图像扫描仪Powerlook 2100XL购自美国UMAX公司, 质谱分析仪Bruker Ultraflex TOF/TOF购自德国Bruker公司.

### 1.3 乳鼠心肌细胞培养

参照Simpson方法<sup>[8]</sup>加以改进, 无菌操作取出生24h内SD乳鼠心尖组织, 立即在4℃无菌磷酸缓冲液(PBS)中洗去残血, 分离附着组织后, 剪成约1mm<sup>3</sup>大小碎块, 经0.08%胰蛋白酶37℃反复消化, 并利用差速贴壁法分离纯化去除成纤维细胞等非心肌细胞, 制备心肌细胞悬液, 用含20%胎牛血清的DMEM培养基稀释成细胞密度为1×10<sup>7</sup>/mL, 加入5-溴脱氧核苷0.01mmol/L(抑制非心肌细胞增殖), 接种于250mL培养瓶中, 置CO<sub>2</sub>孵箱中37℃原代培养.

### 1.4 实验分组与操作程序

待细胞培养至对数生长期, 搏动细胞数>90%以上时, 更换无血清培养基24h(同步化处理)后随机分为以下2组(本实验共进行6次原代培养, 分别接种, n=6):

(1)缺氧预处理组(HPC): 按文献[9]报道方法将细胞置缺氧仓内短暂缺氧 20 min 进行 HPC, 更换预平衡的无血清培养基, 置细胞培养箱内常氧培养 24 h 结束实验, 收集心肌细胞, 提取蛋白. (2)对照组(control): 细胞置于 37 °C 培养箱内持续孵育至实验结束.

### 1.5 心肌细胞蛋白提取

贴壁细胞以 4 °C PBS 液润洗 2 次, 用滤纸吸干培养瓶内剩余液体, 加入蛋白提取液[Tris-base 40 mmol/L, Urea 7 mol/L, Thiourea 2 mol/L, CHAPS 4%, DTT 1%, EDTA 1 mmol/L, 蛋白酶抑制剂(cocktail) 25 µg/mL, PMSF 20 µg/mL], 轻轻刮下细胞, 以巴氏德吸管转移入离心管, 经超声破碎充分裂解细胞后, 加入 RNase 25 µg/mL 和 DNase I 100 µg/mL 冰浴 20 min, 低温高速离心 (4 °C 14000 r·min<sup>-1</sup>, 20 min), 收集上清液, Bradford 法(考马斯亮蓝法)蛋白定量后分装, -70 °C 保存.

### 1.6 心肌细胞蛋白质双向电泳

#### 1.6.1 固相 pH 梯度等电聚焦

按照 Sanchez 等<sup>[10]</sup>改进的胶内加样方法, 取分装乳鼠心肌细胞蛋白样品, 使用 18 cm Immobiline DryStrip (pH 3~10)胶条, 上样量为 1 mg 蛋白, 加入重泡胀液[Urea 8 mol/L, CHAPS 2%, Bromophenol Blue trace], IPG buffer 0.5% (V/V), Destreak 2% (V/V), 加入 IPG 干胶条容器, 小心放入 IPG 干胶条, 随后用 IPG 覆盖液封闭, 置于 IPGphor 电泳仪上. 重泡胀和等电聚焦在 20 °C 条件下自动进行. 等电聚焦参数设置如下: Rehydration 0 V 12 h; 200 V 1 h; 500 V 1 h; 1000 V 1 h; 3000 V 1 h; 4000 V 1 h; 8000 V 7 h. 总电压时为 65 kV·h.

#### 1.6.2 SDS-PAGE

配制平衡液(50 mmol/L Tris-HCl, Urea 6 mol/L, Glycerine 30%, SDS 2%, Bromophenol Blue)中分别加入 DTT 1%或 Iodoacetamide 2.5%各平衡 15 min.

配制 12.5%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶上方, 加入低分子量 marker 后, 用 0.5%琼脂糖封闭. 采用 Tris-Gly-SDS 电泳缓冲液, 在 16~18 °C时, 以 2.5 W/胶进行预电泳 45 min, 再以 15 W/胶电泳, 直至溴酚蓝前沿至玻璃板下缘为止, 时间约为 5 h. 凝胶的考马斯亮蓝染色参照文献[11]方法.

#### 1.6.3 凝胶扫描与图像分析

采用 Powerlook 2100XL 扫描仪, 以 300 dpi (dot per inch)的分辨率、256 灰阶对考染凝胶进行扫描, 利用 Image Master 2D Elite 图像分析软件进行分析. 蛋白点分子量和等电点采用二维校正法(2D Calibration)确定.

#### 1.6.4 质谱分析

对缺氧预处理组和对照组凝胶中 Volume 值[即蛋白

点的面积(Area)与灰度值(Intensity)的积分]相差≥2.5 倍的 3 个蛋白点进行胶内酶切和肽质量指纹图谱分析, 步骤如下:

蛋白质斑点用 50%乙腈脱色 1 h; 100%乙腈脱水 20 min; 冷冻抽干 30 min; 加入 Trypsin (20 ng/spot); 37 °C 酶切 11 h; 5% TFA 40 °C 1 h, 收集上清液; 2.5% TFA +50%乙腈 30 °C 1 h; 合并两次上清液(含萃取肽段); 抽干浓缩; 5 µL 1% TFA 溶解肽段干粉; 制备质谱基质 HCCA 饱和溶液(溶剂含 33%乙腈、67% 1% TFA); 1 µL 基质+1 µL 肽段溶液, 点样至样品靶上(Bruker 公司); 干燥后, 进行 Bruker ultraflex TOF/TOF 质谱分析.

对所得肽质量指纹图谱采用 Flex Analysis Version 2.2 软件分析选择信噪比≥3 的峰值, 经 Bruker Daltonics Bio Tools 2.2 软件处理后, 采用 Mascot 软件在 NCBI nr 数据库中进行检索.

## 2 实验结果

### 2.1 2-DE 分辨率

用 pH 3~10, 18 cm IPG 干胶条和 12.5%聚丙烯酰胺凝胶进行双向电泳, 经考马斯亮蓝 R-250 染色、Powerlook 2100XL 扫描后, 可分辨蛋白点 529±45 个. 凝胶图像如图 1 所示.

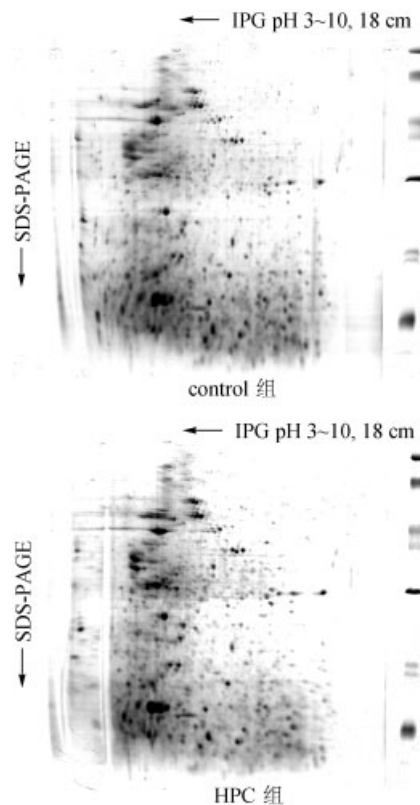


图 1 心肌细胞蛋白样本双向电泳凝胶图像

Figure 1 2-D SDS-PAGE of cardiomyocyte electrophoresis of cell lysates

## 2.2 2-DE 重复性

Control 组和 HPC 组从培养到双向电泳各重复 4 次, 分别以每组中一张胶作为参考胶, 其余胶与其配比, 平均配比率为  $78\% \pm 7.5\%$ .

## 2.3 正常组和缺氧预处理组心肌细胞蛋白质组谱图差异性显示

心肌细胞蛋白质成分图谱多数集中于等电点 4~8,

分子量 14.4~97.0 kD 区域. 利用 Image Master 2D Elite 软件进行分析, 发现 12 种蛋白表达水平在缺氧预处理后明显下降, 6 种蛋白表达水平在缺氧预处理后明显升高 (HPC 组和 control 组蛋白点的 Volume 值相差  $\geq 1.5$  倍, 认为有显著差异). 差异蛋白点如图 2 所示; 差异蛋白点的等电点、分子量和 Volume 值差异见表 1.

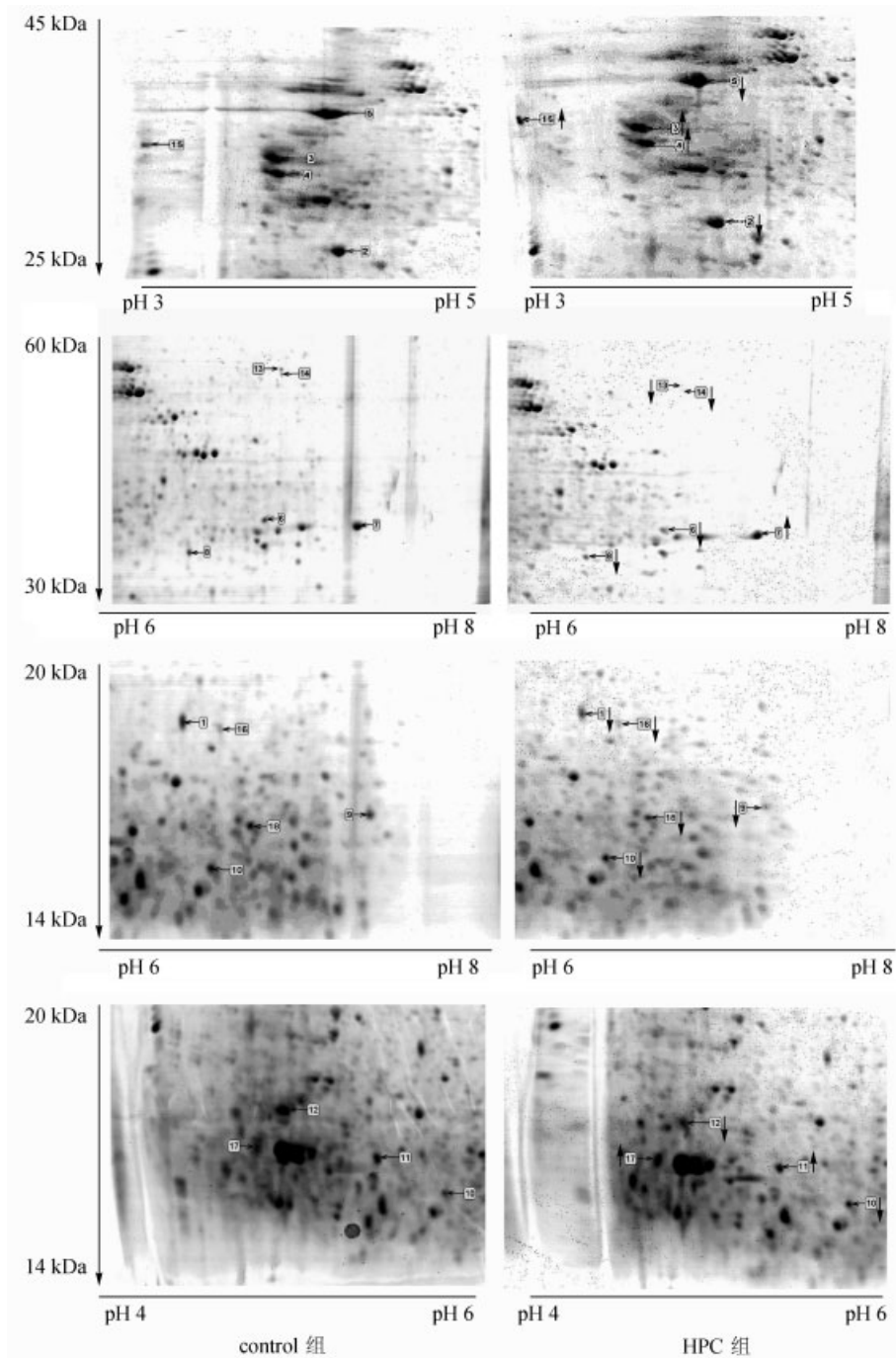


图 2 心肌细胞蛋白质组谱图差异显示

↑表示 HPC 后蛋白表达增加; ↓表示 HPC 后蛋白表达降低

Figure 2 Different expression of protein spots in cardiomyocyte 2-DE maps

表1 缺氧预处理诱导的蛋白表达变化

Table 1 Alteration of protein expression induced by HPC

Spot No.	pI	M <sub>r</sub> /kDa	Volume 变化 (HPC vs. Control)
1	6.129	22.68	↓ 1.5 倍
2*	5.114	27.44	↓ 2.5 倍
3	5.810	41.16	↑ 1.5 倍
4	6.686	37.63	↑ 1.5 倍
5	5.076	52.51	↓ 1.5 倍
6	6.795	32.34	↓ 2.2 倍
7	7.776	31.20	↑ 1.6 倍
8	6.086	28.95	↓ 2.4 倍
9	7.729	17.21	↓ 1.7 倍
10	6.390	15.44	↓ 2.4 倍
11*	5.762	16.74	↑ 3.1 倍
12	4.957	18.63	↓ 1.5 倍
13	6.952	65.10	↓ 2.1 倍
14	6.952	63.31	↓ 2.1 倍
15*	3.605	41.72	↑ 3.2 倍
16	6.443	21.57	↓ 1.7 倍
17	4.719	16.72	↑ 1.8 倍
18	6.705	16.86	↓ 1.7 倍

↑表示 HPC 后表达增加, ↓表示 HPC 后表达降低, “\*”点 volume 值相差 ≥ 2.5 倍.

## 2.4 质谱分析结果

### 2.4.1 Volume 值相差 ≥ 2.5 倍的蛋白点肽质量指纹图谱

Volume 值相差 ≥ 2.5 倍的蛋白点肽质量指纹图谱见图 3.

### 2.4.2 数据库检索分析

对 2, 11, 15 号蛋白点的肽质量指纹图谱采用 Mascot 检索法进行 NCBI nr 数据库检索: 当所测蛋白点的鉴定分值 Score ≥ 58 ( $P < 0.05$ ) 时, 认为有显著性差异. 3 个点鉴定后的数据库序列号(Accession)、鉴定分值(Score)、理论等电点(theoretic pI)、理论分子量(theoretic M<sub>r</sub>)、匹配的肽段数(sequence coverage)、蛋白名称(Description)见表 2 所示.

表2 蛋白点 Mascot 检索结果

Table 2 Mascot search results of three protein spots

Spot No.	Accession	Score	pI	M <sub>r</sub>	Sequence coverage/%	Description
2	gi 6981240	194	5.03	22256	81	Myosin, light polypeptide 3 [Rattus norvegicus]
11	gi 55778652	108	6.92	17386	70	Nucleoside diphosphate kinase [Rattus norvegicus]
15	gi 253851	111	4.08	29142	53	Calreticulin = 63 kDa calcium-binding protein [rats, liver, Sprague, Dawley, Peptide partial, 248 aa]

表内列出蛋白点的序列号、Mascot 评分、理论等电点、分子量、序列覆盖率和鉴定结果 Score 值 ≥ 58, 认为有统计学意义 ( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

蛋白质组学(Proteomics)研究主要利用双向凝胶电泳(2-DE)和质谱(MS)等技术对蛋白质进行分析鉴定, 建立包含蛋白质鉴定和相应功能特点等信息的蛋白质组数据库. 双向电泳(2-DE)将基于电荷分离的等电聚焦(第一向)和基于分子量分离的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE, 第二向)联合应用, 可获得蛋白质的等电点和分子量等信息, 已成为蛋白质组研究中分析复杂蛋白质复合物的基本工具. 在分离出感兴趣的蛋白质后, 可用质谱(MS)技术对其进行鉴定, 此方法对质量测定精确、敏感, 与传统的氨基酸分析法相比, 无需纯化蛋白, 可同时处理多种蛋白的混合物. 目前已建立起关于人、狗、小鼠和大鼠心肌组织的二向电泳数据库, 为特定组织的蛋白质分析比较奠定了基础; 国内外已开展心肌缺血/再灌注损伤、心肌肥大和心力衰竭过程中心肌蛋白质表达模式研究, 并对其中发生上调和下调的蛋白质进行分类、差异显示和鉴定<sup>[12]</sup>.

由于双向电泳后凝胶染色方法(如考马斯亮蓝染色、硝酸银染色等)的敏感性及计算机辅助图像分析软件(如 PDQUEST、Image Master 2D Elite 等)的类型和参数设置不同, 可检测到的蛋白点数及不同凝胶之间的图像匹配率有一定差异.

应用考马斯亮蓝染色的凝胶上大约可检测到 400~800 个蛋白点: Fountoulakis 等<sup>[13]</sup>研究肌间线蛋白(desmin)缺乏时扩张性心肌病、心肌坏死、心肌纤维化及心力衰竭等病理过程与心肌线粒体蛋白质组学变化的关系, 共分离出 380 种基因产物. Laussmann 等<sup>[14]</sup>从人局部血流不同的心肌组织取样 [ $<$  心肌局部平均血流 (MBF)50% 的部位和  $>$  150% 的部位], 进行双向电泳, 其分辨率为  $380 \pm 78$  点/胶. Schwertz 等<sup>[15]</sup>报道丝氨酸蛋白酶抑制剂 Futhan/nafamstat mesilate (FUT-175)可降低白细胞积聚, 减少缺血/再灌注后的心肌坏死, 减少肌酸激酶释放. 通过对正常、缺血/再灌注和预先给予 FUT-175 的兔心肌组织样本进行蛋白质组分析, 在凝胶上平均可

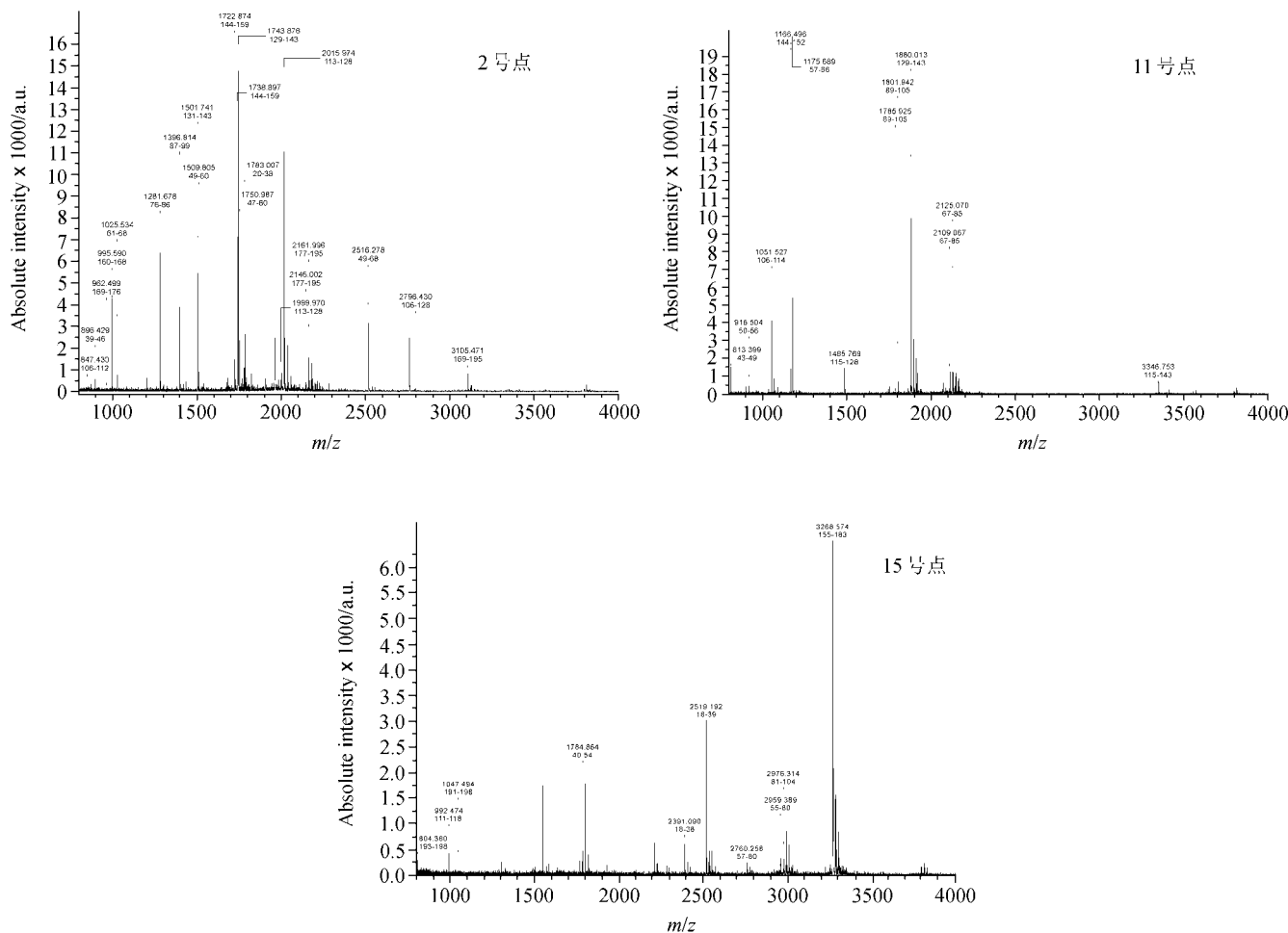


图3 Volume 值相差 $\geq 2.5$ 倍蛋白点的肽质量指纹图谱  
Figure 3 Peptide mass fingerprint of three spots (volume changes $\geq 2.5$ -fold)

检测到  $509 \pm 25$  个蛋白点, 有 480 个点在各实验组内位置相同, 对其中 10 个表达明显改变的点进行质谱分析(8 个点表达降低, 2 个点表达升高, 缺血/再灌注组 vs. 假手术组), 从中鉴定出超氧化物歧化酶前体和  $\alpha$ B-crystallin. Arrell 等<sup>[16]</sup>采用腺苷( $100 \mu\text{mol/L}$ )预处理成年兔心肌细胞, 经分步提取蛋白质、双向电泳分离后发现, 在生理 pH 条件下提取低丰度胞浆蛋白时可见约 800 个蛋白点, 有 3 个条带发生等电点迁移; Western Blot 显示该组蛋白质为磷酸化的 MLC1 (myosin light chain 1). Jiang 等<sup>[17]</sup>采用电起搏诱发犬心衰, 经双向电泳共分离出 700 个蛋白斑点, 其中 62 个点明显变化, 从中鉴定出 23 种蛋白, 发现心力衰竭与线粒体蛋白下调、糖酵解酶上调、细胞骨架蛋白改变有关.

双向电泳后的进行硝酸银染色的凝胶上大约可检测到 2000~3000 个蛋白点: Huang 等<sup>[18]</sup>研究动脉硬化症大鼠(CAHD rat)蛋白质组的变化发现, 在 pH 3~11 之间进行双向电泳可分离出超过 2500 种多肽片段, 采用 PDQUEST 软件对 2-DE 凝胶图谱进行分析, 在 CAHD 时

可检测到 38 种发生明显改变的蛋白. Jungblut 等<sup>[19]</sup>采用双向电泳和 MALDI 质谱分析扩张型心肌病(DCM)患者活检样本及正常供体心肌组织相关蛋白, 共分离出 3300 种心肌蛋白, 其中 25 种在 DCM 时发生显著变化, 已鉴定出 ATP 合酶  $\beta$  链、ATP 合酶、肌原纤维和线粒体的肌酸激酶、3-oxoacyl-CoA 硫解酶、异柠檬酸脱氢酶、结合珠蛋白片段、血红蛋白  $\alpha$  链、血红蛋白  $\beta$  链等 12 种蛋白质.

预处理的细胞保护机制尚未完全阐明, 现有研究资料显示 PC 延迟保护作用与诱导细胞内源性保护物质的生成有关. 主要包括热休克蛋白家族(HSP70, HSP90, HSP27)、氧自由基清除酶系统(Mn-SOD, catalase)等内源性保护蛋白含量升高<sup>[20,21]</sup>; HSP27 和  $\alpha$ B-crystallin 等小分子应激蛋白发生磷酸化并改善心肌收缩功能<sup>[22,23]</sup>. 本室以往工作表明, IPC 通过激活 ERKs、诱导金属硫蛋白合成上调导致心肌延迟保护作用, 单磷酸酯 A 预适应通过激活 p38MAPK、上调 NOS 介导心肌保护<sup>[24]</sup>, HPC 通过激活 PKC、诱导心肌细胞内 66, 31 kDa 蛋白质磷酸化

加强并参与细胞保护<sup>[25]</sup>。上述结果提示 IPC 的延迟心肌保护机制涉及多种蛋白质在多层次(转录、翻译和翻译后修饰)的变化。蛋白质是生命活动的直接执行者,其功能状况决定着缺血性心肌损伤的发生和程度。采用蛋白质组学研究技术,探讨缺氧预处理减轻心肌损伤过程中心肌细胞蛋白表达模式的变化,具有重要的意义。

本工作在已建立心肌细胞样品制备方法和双向电泳技术参数的基础上,对缺氧预处理心肌细胞和正常对照心肌细胞总蛋白质的表达模式进行了初步研究:双向电泳凝胶进行考马斯亮蓝染色,可分离约  $529 \pm 45$  个蛋白点,与文献报道的考染蛋白检测灵敏度相似;蛋白点匹配率约为  $78\% \pm 7.5\%$ ,与文献[15]报道的  $>85\%$  相比较,考虑可能的原因是所用的图像分析软件不同,参数设置有差别;另外,本工作为了保证质谱分析所需的蛋白量,在应用 Image Master 2D Elite 软件进行图像分析时,仅选择表达量差异  $\geq 1.5$  倍者,一些颜色较浅或体积较小的不明显蛋白点未计算在匹配范围内。经凝胶考染后扫描的 2-DE 图谱分析比较,发现 18 种蛋白质在 HPC 后发生明显表达差异,其中 12 种在 HPC 后表达降低,6 种表达增高,这些蛋白质在双向电泳凝胶上表示为蛋白质差异表达谱,有助于从总蛋白质水平揭示预处理延迟保护作用的分子机制。

在本研究中,选取其中 Volume 值相差  $\geq 2.5$  倍的 3 个蛋白质点,进行胶内酶切、质谱分析和数据库检索,分别鉴定为肌球蛋白轻链-3 (myosin, light polypeptide 3)、二磷酸核苷激酶(nucleoside diphosphate kinase, NDPK)、钙网蛋白(calreticulin)。本工作通过文献检索,初步分析了这三种蛋白与预处理延迟保护作用的关系。

目前对 myosin light chain 的研究主要集中于两个方面:一是在心肌收缩过程中,MLC 磷酸化增强,调节 actin-myosin 交互作用,引起肌肉收缩<sup>[26-30]</sup>。二是在急性心肌梗塞后,血浆 MLC 与心肌坏死的程度、左室功能的改变呈线性相关,可作为评价心绞痛并发心肌梗塞危险性大小,预测梗塞面积的重要生化指标<sup>[31-35]</sup>。

迄今为止,关于预处理保护作用中 myosin light polypeptide 3 表达的变化及功能尚未见报道,仅有 Huang 等<sup>[36]</sup>研究发现烧伤后缺血缺氧影响心脏功能时,心肌组织中 myosin light chain 含量明显增加,与后续心肌肥大的发生相关。本工作检测到缺氧预处理后 myosin light polypeptide 3 表达降低,推测其可能的作用机制是使心肌细胞的收缩性预先减弱,减少对能量的需求,提高心肌对后续缺血(缺氧)的抵抗力。

二磷酸核苷激酶(NDPK)是一种在进化中高度保守的酶,可催化磷酸基从三磷酸核苷转移至二磷酸核苷,

并参与多种生物功能,包括基因调节、细胞生长发育、代谢、信号传导等,已在多种属动物心脏中发现<sup>[37]</sup>。文献[38]报道 NDPK 的 B 型异构体可与 G 蛋白的  $\beta, \gamma$  亚单位形成复合物,使 G 蛋白的 His-266 发生磷酸化,催化高能磷酸键转位至 GDP,激活 G 蛋白。已有研究<sup>[39]</sup>证实细胞膜相关性 NDPK 可通过非受体依赖性途径提高 Gs 蛋白活性,激活腺苷酸环化酶,使 cAMP 增加,发挥信号转导作用。

钙网蛋白(calreticulin, CRT)是一种由单一基因编码高度保守的 46 kDa 蛋白,在多种高等生物体内均有表达<sup>[40]</sup>,主要分布于内质网,最初被认为是高亲和性的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白,作为内质网的  $\text{Ca}^{2+}$  缓冲器;后续研究发现 calreticulin 可与多种蛋白相互作用,参与不同的细胞功能,例如直接与类固醇受体结合,调节类固醇依赖性基因表达<sup>[41]</sup>;另外 calreticulin 是内质网中的分子伴侣,可参与糖蛋白的合成与正确折叠<sup>[42]</sup>;同时 calreticulin 可改变内质网的  $\text{Ca}^{2+}$  结合能力,调节  $\text{Ca}^{2+}$  从 ER 释放<sup>[43]</sup>,影响 ER 钙库操纵的跨膜  $\text{Ca}^{2+}$  流<sup>[90]</sup>,对于维持细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  稳态非常重要。Hung 等<sup>[45]</sup>报道在内质网应激时内质网钙结合蛋白 calreticulin 过表达可抑制  $\text{Ca}^{2+}$  解离,增强细胞对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导损伤的抵抗能力。HPC 后细胞内 calreticulin 表达增加,可降低细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,有助于减轻缺血再灌注后  $\text{Ca}^{2+}$  超载引起的损伤。

目前关于这三种蛋白在缺氧预处理延迟保护过程中的变化及作用尚未见报道。本工作根据已有研究结果推测,缺氧预处理引起 Myosin, light polypeptide 3 表达下调和 Nucleoside diphosphate kinase, Calreticulin 表达增加,可能通过调节心肌细胞的收缩性、激活 G 蛋白、调节细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度而保护心肌。

其它表达发生改变的 15 种蛋白,可能参与了缺氧预处理减轻心肌损伤的过程。这些蛋白的分子量和等电点已经初步确定,但它们是已知结构蛋白还是尚未发现的新蛋白,需进一步地分析鉴定。

**致谢** 感谢北京大学生命科学学院杨伟老师在质谱分析中的帮助。

## References

- 1 Webster, K. A.; Discher, D. J.; Bishopric, N. H. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1995**, 27, 453.
- 2 Marber, M. S.; Latchman, D. S.; Walker, J. M.; Yellon, D. M. *Circulation* **1998**, 88, 1264.
- 3 Parrr, J. R. *Trends Pharmacol. Sci.* **1994**, 15, 15.
- 4 Wilkins, M. *Nature* **1995**, 378, 653.
- 5 Yoshida, M.; Loo, J. A.; Lepleya, R. A. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, 7, 291.

- 6 Grunenfelder, B.; Rummel, G.; Vohradsky, J.; Roder, D.; Langen, H.; Jenal, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 4681.
- 7 Vlahou, A.; Schellhammer, P. F.; Mendrinou, S.; Patel, K.; Kondylis, F. I.; Gong, L.; Nasim, S.; Wright, G. L. Jr. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158*, 1491.
- 8 Simpson, P.; Sacion, S. *Circ. Res.* **1982**, *50*, 101.
- 9 Shik, K.; Hearse, D. J. *Am. J. Physiol.* **1987**, *253*, b H1470.
- 10 Sanchez, J. C.; Rouge, V.; Pisteur, M.; Ravier, F.; Tonella, L.; Moosmayer, M.; Wilkins, M. R.; Hochstrasser, D. F. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 324.
- 11 Guo, Y. J. *Prog. Biochem. Biophys.* **1991**, *18*, 32 (in Chinese). (郭尧君, 生物化学和生物物理进展, **1991**, *18*, 32.)
- 12 Heinke, M. Y.; Wheeler, C. H.; Yan, J. X.; Amin, V.; Chang, D.; Einstein, R.; Dunn, M. J.; dos Remedios, C. G. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2086.
- 13 Fountoulakis, M.; Soumaka, E.; Rapti, K.; Mavroidis, M.; Tsangaris, G.; Maris, A.; Weisleder, N.; Capetanaki, Y. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2005**, *38*, 461.
- 14 Laussmann, T.; Janosi, R. A.; Fingas, C. D.; Schlieper, G. R.; Schlack, W.; Schrader, J.; Decking, U. K. *FASEB J.* **2002**, *16*, 628.
- 15 Schwertz, H.; Langin, T.; Platsch, H.; Richert, J.; Bomm, S.; Schmidt, M.; Hillen, H.; Blaschke, G.; Meyer, J.; Darius, H.; Buerke, M. *Proteomics*. **2002**, *2*, 988.
- 16 Arrell, D. K.; Neverova, I.; Fraser, H.; Marban, E.; Van Eyk, J. E. *Circ. Res.* **2001**, *89*, 480.
- 17 Jiang, L.; Tsubakihara, M.; Heinke, M. Y.; Yao, M.; Dunn, M. J.; Phillips, W.; dos Remedios, C. G.; Nosworthy, N. J. *Proteomics*. **2001**, *1*, 1481.
- 18 Huang, Z. Y.; Yang, P. Y.; Almofti, M. R.; Yu, Y. L.; Rui, Y. C.; Yang, P. Y. *Life Sci.* **2004**, *75*, 3103.
- 19 Jungblut, P. R.; Zimny-Arndt, U.; Zeindl-Eberhart, E.; Stultk, J.; Koupilova, K.; Pleissner, K. P.; Otto, A.; Muller, E. C.; Sokolowska-Kohler, W.; Grabher, G.; Stoffler, G. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2100.
- 20 Zhou, J. J.; Pei, J. M.; Wang, G. Y.; Wu, S.; Wang, W. P.; Cho, C. H.; Wong, T. M. *Am. J. Physiol.* **2001**, *281*, H40.
- 21 Yamashita, N.; Hoshida, S.; Otau, K.; Taniguchi, N.; Kuzuya, T.; Hori, M. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *131*, 415.
- 22 Sanada, S.; Kitakaze, M.; Papst, P. J.; Hatanaka, K.; Asanuma, H.; Aki, T.; Shinozaki, Y.; Ogita, H.; Node, K.; Takashima, S.; Asakura, M.; Yamada, J.; Fukushima, T.; Ogai, A.; Kuzuya, T.; Mori, H.; Teraka, N.; Yoshida, K.; Hori, M. *Circ. Res.* **2001**, *88*, 175.
- 23 Eaton, P.; Fuller, W.; Bell, J. R.; Shattock, M. J. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2001**, *33*, 1659.
- 24 Liu, X. H.; Wang, S. W.; Wu, X. D.; Tang, C. S. *Chin. Med. J.* **2000**, *113*, 5.
- 25 Liu, X. H.; Pang, Y. Z.; Tang, C. S.; Su, J. Y.; Qin, Z. Y.; Piao, H. *Acta Physiol. Sin.* **1997**, *49*, 455.
- 26 Saida, K.; Kohama, K. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **1993**, *102*, 181.
- 27 Grange, R. W.; Vandenboom, R.; Houston, M. E. *Can. J. Appl. Physiol.* **1993**, *18*, 229.
- 28 Adelstein, R. S.; Sellers, J. R. *Am. J. Cardiol.* **1987**, *59*, 4B.
- 29 Arner, A.; Bialojan, C.; Bruckner, U. B.; Frost-Arner, L.; Messmer, K.; Ruegg, J. C. *Pfluegers Arch.* **1993**, *425*, 82.
- 30 Olsson, M. C.; Patel, J. R.; Fitzsimons, D. P.; Walker, J. W.; Moss, R. L. *Am. J. Physiol.* **2004**, *287*, H2712.
- 31 Katus, H. A.; Diederich, K. W.; Hoberg, E.; Kubler, W. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1988**, *11*, 487.
- 32 Sonel, A.; Sasseen, B. M.; Fineberg, N.; Bang, N.; Wilensky, R. L. *Circulation* **2000**, *102*, 1107.
- 33 Isobe, M.; Nagai, R.; Yamaoki, K.; Nakaoka, H.; Takaku, F.; Yazaki, Y. *Circ. Res.* **1989**, *65*, 684.
- 34 Katus, H. A.; Diederich, K. W.; Mehmel, H. C.; Scheffold, T.; Schwarz, F.; Kubler, W. *Klin. Wochenschr.* **1988**, *66*, 784.
- 35 Isobe, M.; Nagai, R.; Takaku, F.; Kashida, M.; Yamaguchi, T.; Machii, K.; Yazaki, Y. *J. Cardiogr. Suppl.* **1986**, *10*, 13.
- 36 Huang, Y.; Li, Z.; Yang, Z. *Burns* **2003**, *29*, 828.
- 37 Heidbuchel, H.; Callewaert, G.; Vereecke, J.; Carmeliet, E. *Circ. Res.* **1992**, *71*, 808.
- 38 Lutz, S.; Hippe, H. J.; Niroomand, F.; Wieland, T. *Methods Enzymol.* **2004**, *390*, 403.
- 39 Niroomand, F.; Mura, R.; Jakobs, K. H.; Rauch, B.; Kubler, W. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1997**, *29*, 1479.
- 40 Michalak, M.; Corbett, E. F.; Mesaali, N.; Nakamura, K.; Opas, M. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 281.
- 41 Milner, R. E.; Baksh, S.; Shemanko, C.; Carpenter, M. R.; Smillie, L.; Vance, J. E.; Opas, M.; Michalak, M. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7155.
- 42 Helenius, A.; Trombetta, E. S.; Hebert, D. N.; Culina, S.; Lauvau, G.; Gubler, B.; van Endert, P. M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 54210.
- 43 John, L. M.; Lechleiter, J. D.; Camacho, P. *J. Cell Biol.* **1998**, *142*, 963.
- 44 Fasolato, C.; Pizzo, P.; Pozzan, T. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 1513.
- 45 Hung, C. C.; Ichimura, T.; Stevens, J. L.; Bonventre, J. V. *J. Biol. Chem.* **2003**, *273*, 29317.