

·基础研究·

本文引用:李琪琳,胡元会,霍艳明,王辉奇,王强,王欢.卡托普利干预心力衰竭大鼠心肌线粒体蛋白质组学研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(10):1104-1109.

卡托普利干预心力衰竭大鼠心肌线粒体蛋白质组学研究

李琪琳¹,胡元会^{2*},霍艳明¹,王辉奇¹,王强¹,王欢²

(1.中国中医科学院望京医院,北京 100102;2.中国中医科学院广安门医院,北京 100053)

【摘要】目的 研究卡托普利对心衰大鼠心肌线粒体蛋白质组学的影响。**方法** SD大鼠随机分为造模组与假手术组;造模组采用结扎冠脉致心梗后心衰模型,术后再随机分为模型组、卡托普利组;各组连续予以相应干预8周后采集大鼠心肌,采用双向凝胶电泳和质谱技术,分析各组大鼠心肌线粒体蛋白质组学变化,并运用Western blot技术对差异蛋白进行回复性验证。**结果** 模型组与假手术组相比有差异,且卡托普利能使差异趋势逆转的蛋白点为19个,其中11个表达上调,8个表达下调;经质谱分析成功鉴定出12个蛋白,主要涉及能量代谢、氧化损伤、应激反应、细胞骨架、细胞分化增殖等功能。Western blot结果显示模型组ATP- α 表达下调,Stress-70、Nucleophosmin表达上调;卡托普利组ATP- α 表达上调,Stress-70、Nucleophosmin表达下调,与蛋白质组学结果基本一致。**结论** 卡托普利可一定程度调节心衰大鼠心肌线粒体蛋白质组学变化,其干预机制可能与改善能量代谢、抗氧化损伤、减轻应激反应及调节细胞分化增殖等功能相关。

【关键词】 卡托普利;心力衰竭;心肌线粒体;蛋白质组学

【中图分类号】R393;R541

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.10.003

Effect of Captopril on Myocardial Mitochondrial Proteomics in Rats with Heart Failure

LI Qilin¹, HU Yuanhui^{2*}, HUO Yanming¹, WANG Huiqi¹, WANG Qiang¹, WANG Huan²

(1. Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 2. Guang'anmen Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of captopril on myocardial mitochondrial proteomics in rats with heart failure and its possible mechanism. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group and modeling group. The rats in the modeling group were treated with ligation of the coronary artery to induce myocardial infarction and to establish a model of heart failure. Then, the model rats were randomly divided into model group and captopril group. After 8 weeks of drug intervention, the changes in mitochondrial proteomics of myocardial tissue were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Furthermore, the expression levels of differentially expressed proteins were verified by Western blot. **Results** There were significant differences in the levels of some proteins between the model group and the sham-operation group ($P < 0.05$). The changes in the levels of 19 differentially expressed proteins (11 with up-regulated expression and 8 with down-regulated expression) between the model group and the sham-operation group were reversed in the captopril group; 12 differentially expressed proteins were successfully identified by MALDI-TOF-MS. Bioinformatics analysis showed that these differential proteins were mainly associated with energy metabolism, oxidative damage, stress response, cytoskeleton, and cell differentiation and proliferation. Western blot results showed that compared with the sham-operation group, the model group had significantly reduced expression of ATP- α and significantly increased expression of stress-70 protein and nucleophosmin; compared with the model group, the captopril group had significantly increased expression of ATP- α and significantly reduced expression of

【收稿日期】2018-09-11

【基金项目】北京市自然科学基金项目(7122154)。

【作者简介】李琪琳,男,医学博士,主治医师,研究方向:中西医结合治疗心血管疾病。

【通讯作者】* 胡元会,男,医学博士,主任医师,E-mail:huiyuhui55@sohu.com。

stress-70 protein and nucleophosmin. The results were consistent with those in proteomics. **Conclusion** Captopril can partly adjust the changes in myocardial mitochondrial proteomics in rats with heart failure, and its intervention mechanism may involve improving energy metabolism, anti-oxidative damage, and alleviating stress response, as well as regulating cell differentiation and proliferation.

[**Keywords**] captopril; heart failure; myocardial mitochondria; proteomics

心力衰竭是一组常见的临床综合征,是大多数心血管疾病发展的最终归宿。随着人口老龄化进程的加快和高血压、冠心病等发病人数增多,心衰发病率和病死率逐年上升,已成为人类健康的重大挑战之一^[1]。血管紧张素转化酶抑制剂(angiotension converting enzyme inhibitors, ACEI)被公认为治疗心衰的重要药物,卡托普利作为 ACEI 的代表,证实其可以有效抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS),逆转心室重构,降低心衰的发病率和死亡率^[2]。线粒体蛋白质组学是研究线粒体在生理、病理过程中的功能变化及其与疾病发生发展关系和机制的重要方法,目前已越来越受到医学界的重视和广泛关注。本实验采用双向凝胶电泳和质谱技术,以心肌线粒体为切入点,研究卡托普利对心衰大鼠心肌线粒体蛋白质组学的影响,探讨其可能的作用机制,以期为寻找治疗心衰的新靶点提供思路。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

正常雄性 SD 大鼠 30 只,体质量(200±20)g,购自北京维通利华实验动物有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001,饲养于中国中医科学院广安门医院 SPF 级动物房。

1.2 主要仪器

HP5500 彩色多普勒超声显像仪(PHILIPS, USA);HX-300S 动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司,中国);Multiphor II 多功能电泳系统(Amersham, USA);PowerLook 2100XL 扫描仪(UMAX, USA);4700 MALDI-TOF/TOF 质谱仪(AB SCIEX, USA);Gel Doc XR+凝胶成像分析系统(Bio-Rad, USA)。

1.3 主要试剂及药品

固相 pH 梯度干胶条(IPG strip pH3-10L 18 cm)、IPG 缓冲液(pH3-10)购自美国 Bio-Rad 公司;溴酚蓝、乙二胺四乙酸(EDTA)购自美国 Sigma 公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)购自美国 Promega 公司;考马斯亮蓝、标准蛋白标志物购

自美国 Amersham pharmacia 公司;甘氨酸(USB)、胰蛋白酶(Trypsin)购自美国 Fisher 公司;转印膜(PVDF 膜)购于美国 Millipore 公司;无水醋酸钠、戊二醛、乙醇等为国产分析纯。一抗:Anti-ATP5A antibody、Anti-GRP75 antibody、Anti-Nucleophosmin antibody 购自美国 Abcam 公司;二抗:羊抗兔、羊抗小鼠购自北京中杉金桥公司。卡托普利片(中美上海施贵宝制药有限公司,规格:12.5 mg/片,批号:1207031)。

2 方法

2.1 动物模型制备

参照 Pfeffer^[3]报导的方法,结扎冠脉左前降支,制备心梗后心衰大鼠模型,术后连续 3 d 注射 20 万单位青霉素抗感染。假手术组制备:仅在冠脉前降支起点下约 2 至 3 mm 穿线而未结扎。

2.2 实验分组及干预

SD 大鼠 30 只,随机分为假手术组与造模组,假手术组 8 只,造模组 22 只。造模组按“2.1”方法造模,术后第 2 周对模型大鼠行心脏超声检测,以 EF 降低>15%为模型组入选标准。将入选模型大鼠随机分为模型组、卡托普利组,每组大鼠 8 只。干预:假手术组与模型组以生理盐水 4.0 mL/kg 灌胃;卡托普利组:卡托普利 100 mg/kg 溶于生理盐水灌胃。连续干预 8 周,每天 1 次。

2.3 心肌线粒体分离

采用差数离心法提取心肌线粒体。造模后第 8 周末,麻醉大鼠后开胸取出心脏,PBS 缓冲液洗净,称取 100 mg 心肌,加入 1.5 mL 匀浆介质,冰浴匀浆。4 ℃ 1 300 r/min 离心 15 min,保留上清,重复该步骤 2 次;取上清液于另一离心管中,4 ℃ 17 000 r/min 离心 15 min,弃上清,沉淀用 0.2 mL 匀浆介质悬浮,重复该步骤 2 次,弃上清,所得沉淀即为线粒体。

2.4 线粒体蛋白提取

于心肌线粒体样品中加入 1 mL 裂解液,涡旋振荡破碎,冰浴中静置 4 min,4 ℃ 40 000 r/min 离

心1 h,弃沉淀,上清液即为线粒体蛋白。采用Bradford法测蛋白含量,-80℃保存。

2.5 双向凝胶电泳

取蛋白样品0.8 mg,加泡胀缓冲液稀释至350 μL,混匀;于泡胀盘内加入上述样品混合液,将胶条放入泡胀盘,水化12 h。水化完毕后,将胶条于等点聚焦仪内聚焦电泳,温度为20℃,程序设置如表1。聚焦结束,将胶条取出,在平衡液I中平衡15 min,然后换平衡液II中平衡15 min。将平衡后的胶条放到SDS-PAGE凝胶上端,用0.5%的琼脂糖封严,并将胶板固定于电泳槽内。加入电泳缓冲液,接通电源,至溴酚蓝前沿距离凝胶底部0.5 cm时停止电泳。电泳结束后,行考马斯亮蓝染色。

表1 等点聚焦程序设置

程序步骤	电压/V	电压时间积/Vh
S1	0-500	500
S2	500	2 500
S3	500-3 500	10 000
S4	3 500	50 000
S5	3 500-500	8 000

2.6 图像扫描与分析

凝胶通过UMAX PowerLook 2100XL扫描仪透射扫描获取图像。扫描后采用Imagemaster2D Platinum 5.0软件对胶图进行蛋白点的检测、背景扣除、标准化及人工校对处理,寻找差异蛋白点。

2.7 差异蛋白质点的胶内酶解

将差异蛋白点切下,用NH₄HCO₃溶液脱色30 min,重复2~3次,脱色后离心干燥20 min,再加入6 μL胰蛋白酶液,4℃放置30 min,后加入20 μL胰酶覆盖液,置于37℃水浴箱酶解20 h。在胶块内加入15 μL 5%TFA,37℃温育30 min,吸取上清,然后加入15 μL 5%TFA/50%ACN,37℃温育30 min,吸取上清与上一次吸取液合并,再加入15 μL 100%ACN,室温静置5 min,吸取上清与上两次吸取液合并,离心干燥。用3 μL含0.5%TFA溶液溶解肽段,即可用于质谱分析。

2.8 质谱分析及数据库检索

采用AB 4700型MALDI-TOF/TOF质谱仪进行质谱检测。用1 μL标准品与基质混合肽作为外标进行校正,获得相应的肽质量指纹图。根据质荷比(M/Z)用Mascot软件在线检索Swiss Prot数据

库(<http://www.matrixscience.com>)以确定结果。

2.9 Western blot 验证

采用差数离心法提取大鼠心肌线粒体蛋白。取蛋白样品50 μg,加入等体积样品缓冲液,混匀,100℃变性5 min;12%SDS-PAGE电泳,结束后半干转至PVDF膜。摇床上封闭2 h;杂交一抗,4℃过夜,洗膜,杂交二抗,室温摇床上2 h,洗膜。用发光剂浸膜5 min,取出后置曝光匣中曝光。扫描曝光片后,应用Gel Doc凝胶成像系统分析底片的目的条带。

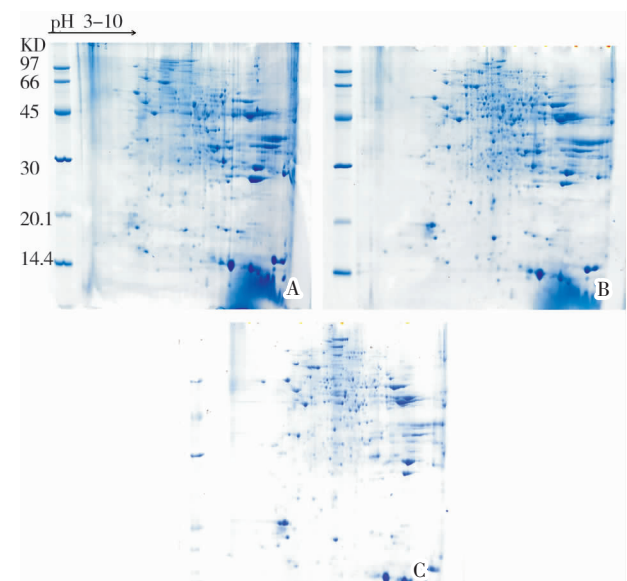
2.10 统计分析

模型组与假手术组、卡托普利组与模型组灰度值相比大于2或小于0.5的蛋白点定义为差异蛋白点(大于2为表达上调,小于0.5为表达下调)。PMF图谱分析以Mascot Score得分>55为鉴定成功蛋白。

3 结果

3.1 双向凝胶电泳结果分析

各组双向凝胶电泳图谱如图1所示。图像经Imagemaster软件分析,假手术组可分辨蛋白点为(698±35),模型组为(712±42),卡托普利组为(677±53),双向电泳各组重复3次,每组分别将其中的一块分辨率高、质量好的凝胶定为参考胶,进行组内3块胶间的蛋白质点匹配。



注:A.假手术组;B.模型组;C.卡托普利组。

图1 双向凝胶电泳图

3.2 差异蛋白点质谱鉴定结果

模型组与假手术组相比有差异,且卡托普利可

使差异趋势逆转的蛋白点为 19 个,对这 19 个蛋白点进行质谱分析,获得 19 张肽质量指纹谱(peptide mass fingerprinting,PMF)(图 2 为 459 号点 PMF 图),PMF 图谱经数据库检索,成功鉴定出 12 个蛋白(如表 2)。其中卡托普利组上调的蛋白为鸟氨酸转氨酶(ornithine aminotransferase)、精氨基琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthase)、ATP 合成酶 α 亚基(ATP synthase subunit α)、谷胱甘肽 S-转移酶 P (glutathione S-transferase P)、乳酸脱氢酶 B 链(lactate dehydrogenase B chain)、果糖二磷酸醛缩酶

(fructose-bisphosphate aldolase)、丙酮酸激酶同工酶 M1/M2(pyruvate kinase M1/M2),下调的蛋白为 B 型肌酸激酶(creatine phosphokinase B)、线粒体应激蛋白 70(stress-70 protein)、细胞质肌动蛋白 2(actin cytoplasmic 2)、核内不均一核糖核蛋白 A2/B1(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1)、核仁磷酸蛋白(nucleophosmin)。根据功能分类,这 12 个蛋白主要与能量代谢、氧化损伤、应激反应、细胞骨架、细胞分化增殖等功能相关。

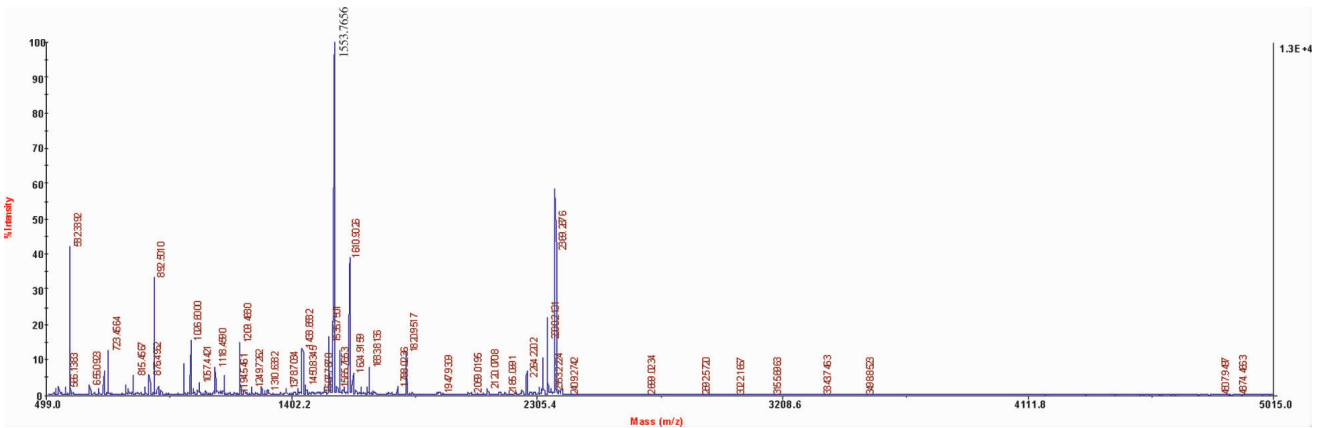


图 2 459 号点 PMF 图

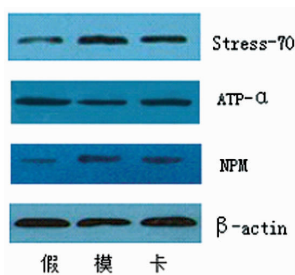
表 2 12 个质谱鉴定成功蛋白

蛋白点号	蛋白编码 (蛋白名称)	理论分子量 /等电点	序列覆盖 率/%	质谱得分 >55	表达变化	
					模型组*	卡托普利组◆
68	GRP75_MOUSE (Stress-70 protein, mitochondrial)	73416/5.81	19%	57	↑	↓
75	OAT_MOUSE (Ornithine aminotransferase, mitochondrial)	48324/6.19	17%	66	↓	↑
108	ASSY_MOUSE(Argininosuccinate synthase)	46555/8.36	34%	81	↓	↑
258	GSTP2_MOUSE(Glutathione S-transferase P)	25685/7.63	47%	82	↓	↑
439	ALDOB_MOUSE(Fructose-bisphosphate aldolase B)	39482/8.52	43%	69	↓	↑
459	ATPA_MOUSE(ATP synthase subunit alpha, mitochondrial)	59716/9.22	51%	67	↓	↑
582	KCRB_MOUSE(Creatine kinase B-type)	42686/5.40	73%	123	↑	↓
666	LDHB_MOUSE(L-lactate dehydrogenase B chain)	36549/5.70	38%	59	↓	↑
688	ACTG_MOUSE(Actin, cytoplasmic 2)	41766/5.31	58%	85	↑	↓
711	KPYM_MOUSE(Pyruvate kinase isozymes M1/M2)	57808/7.18	53%	114	↓	↑
715	NPM_MOUSE(Nucleophosmin)	32540/4.62	41%	83	↑	↓
729	ROA2_MOUSE(Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1)	37380/8.97	59%	130	↑	↓

注:* 与假手术组比较,◆与模型组比较;↑:表达上调;↓:表达下调。

3.3 部分差异蛋白回复性验证结果

与假手术组比较,模型组 ATP- α 表达明显降低, Stress-70、Nucleophosmin 表达明显升高;与模型组比较,卡托普利组 ATP- α 表达明显升高, Stress-70、Nucleophosmin 表达明显降低。见图 3。



注:从左至右分别为假手术组、模型组、卡托普利组。

图 3 Western blot 验证结果

4 讨论

线粒体与心衰的发生发展关系密切。研究发现,无论心衰的基础原因是血流动力学异常、神经体液过度激活、功能性心肌丧失还是瓣膜异常等,均伴有线粒体结构和功能的改变^[4-6]。因此,深入线粒体蛋白质组学研究,对阐明心衰发病机制、寻找新的治疗靶点具有重要的意义。

卡托普利是临床常用的一种 ACEI 制剂,研究表明,其不但可以抑制 RAAS 系统,还可以抑制缓激肽的降解,增加前列腺素水平,防治心室重构;同时,还能抑制 SNS 活性,纠正电解质紊乱,从而降低心律失常及猝死的发生率^[7]。

本研究结果表明,模型组与假手术组相比有差异而卡托普利可使差异趋势逆转的蛋白点为 19 个,质谱分析鉴定出 12 个蛋白,其中 7 个与能量代谢相关,1 个与氧化损伤相关,1 个与应激反应相关,1 个与细胞骨架相关,2 个与细胞分化增殖相关。

4.1 与能量代谢相关蛋白

心力衰竭时,心肌能量代谢模式发生改变,表现为脂肪酸有氧氧化降低,氧化磷酸化减弱,无氧糖酵解增强,ATP 生成总量下降^[8-9]。本实验结果表明,与假手术组比较,参与氧化磷酸化的关键酶 ATP- α 在模型组表达下调,卡托普利组表达上调,说明卡托普利可保护受损心肌氧化磷酸化过程。郭向阳等研究显示,卡托普利能调节缺血再灌注心肌细胞氧的供需平衡,增加 ATP、ADP 含量,改善心肌能量代谢及心功能^[10],这与本研究结果类似。同时,研究团队也

发现,卡托普利组与糖酵解相关酶果糖二磷酸醛缩酶 B、丙酮酸激酶同工酶 M1/M2、乳酸脱氢酶 B 链表达上调,考虑其原因可能与卡托普利一定程度增强了心肌细胞糖酵解、代偿性弥补 ATP 生成不足有关。

此外,本实验还发现精氨酸琥珀酸合成酶和鸟氨酸转氨酶在卡托普利组表达上调,说明卡托普利可调节模型动物氨基酸代谢失衡。

4.2 与氧化损伤相关蛋白

研究发现,心衰动物模型中氧自由基明显增加,当氧自由基生成过多或抗氧化物质活性降低,引起氧自由基堆积,可导致氧化损伤^[11]。GSTP 是谷胱甘肽转移酶家族中的成员之一,本实验中,模型组 GSTP 表达下调,卡托普利组表达上调,表明卡托普利可减轻模型动物氧化损伤,推测其机制可能与其抗自由基、维持自由基清除系统平衡有关。

4.3 与应激反应相关蛋白

结扎冠脉致心梗后心衰,可诱导心肌细胞发生内质网应激,同时 RAAS 和 SNS 被激活。应激蛋白 70 家族又名热休克蛋白 70 家族(HSP70),在防止应激引起的细胞损害和修复受损细胞方面发挥着重要作用。研究发现,在心衰犬心肌细胞中,HSP70 升高^[12]。更有实验表明,HSP70 血浆浓度越高,心衰越严重^[13]。本实验结果表明,与假手术组相比,模型组 Stress-70 表达上调,卡托普利组表达下调,说明卡托普利可减轻模型动物的应激反应,这可能与其阻断 RAAS、抑制 SNS 活性有关。此前有学者研究证实,卡托普利能降低高血压心肌组织内质网应激反应水平^[14],这对解释本实验结果可提供一些借鉴和线索。

4.4 与细胞骨架相关蛋白

肌动蛋白是细胞骨架的重要组成成分。研究发现,缺血缺氧可直接导致心肌细胞骨架损伤^[15]。本实验结果显示,模型组细胞质肌动蛋白 2 表达上调,卡托普利组细胞质肌动蛋白 2 表达下调,说明卡托普利可一定程度保护细胞骨架免于受损裂解。

4.5 与细胞分化增殖相关蛋白

核仁磷酸蛋白是一种多功能核仁磷酸化蛋白,参与核糖体前体运输和合成、中心体复制、有丝分裂、DNA 修补等生命活动。核内不均一核糖核蛋白 A2/B1 是一种重要的 RNA 连接蛋白,与细胞有丝分裂、分化及凋亡相关。研究发现,以上两种蛋白与肿

瘤等增殖性疾病的发病密切相关^[16-17],与心血管疾病关系报道较少。本实验结果显示,模型组该两种蛋白表达上调,卡托普利组两者均下调,推测卡托普利可能参与了调节心肌细胞分化增殖、减缓细胞凋亡,但其作用机制有待进一步研究。

本实验采用 Western blot 技术,从蛋白水平验证线粒体 ATP- α 、Stress-70、Nucleophosmin 在各组的表达水平,结果表明,模型组 ATP- α 表达下调,Stress-70、Nucleophosmin 表达上调,卡托普利组 ATP- α 表达上调,Stress-70、表达下调,此结果与蛋白质组学变化趋势基本一致,说明采用双向凝胶电泳和质谱技术研究卡托普利对心衰大鼠心肌线粒体蛋白质组学的影响,结果真实可靠。

参考文献:

- [1] 许晓琼,杨德辉.难治性心力衰竭治疗最新进展[J].心血管康复医学杂志,2008,17(3):304-307.
- [2] 黄 峻.心力衰竭治疗的基石:血管紧张素转换酶抑制剂[J].中华心血管病杂志,2002,30(4):255-257.
- [3] PFEFFER M A, BRAUNWALD E. Ventricular remodelling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications[J]. Circulation, 1990,81(5):1161-1172.
- [4] MURRAY A J, EDWARDS L M, CLARKE K. Mitochondria and heart failure [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007,10(6):704-711.
- [5] TSUTSUI H. Mitochondrial oxidative stress and heart failure[J]. Intern Med, 2006, 45(13): 809-813.
- [6] TSUTSUI H, KINUGAWA S, MATSUSHIMA S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling [J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3): 449-456.
- [7] 伍尚强.卡托普利对心力衰竭患者的临床疗效观察[J].中国医疗前沿,2009,4(24):12-13.
- [8] HIROYUKI TSUTSUI. Mitochondrial Oxidative Stress and Heart Failure [J]. The Japanese Society of Internal Medicine, 2006,45(13):809-813.
- [9] ZHOU S G. Proteomic analysis of hypertrophied myocardial protein patterns in renovascularly hypertensive and spontaneously hyper-tensive rats[J].J Proteome Res,2006,5(11):2901-2908.
- [10] 郭向阳,徐守春,罗爱伦.卡托普利对心肌组织高能磷酸化合物代谢的影响[J].中华心胸血管外科杂志,1998,14(12):115-117.
- [11] AYGEN B, CELIKER H, DOGUKAN A, et al. The effects of trimetazidine on lipid peroxidation in patients with end-stage renal disease[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2008,30(10): 757-760.
- [12] HEINKEMY, WHEELERCH, CHANGD, et al. Protein changes observed in pacing-induced Heart failure using two-dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1988,19(11):2021-2030.
- [13] WJ WELCH. How cells respond to stress[J]. Sci Am, 1993,68: 56-64.
- [14] 林 可,赵连友,郑强.卡托普利对高血压大鼠心肌内质网应激时 GRP78 和 CHOP 的表达及心肌细胞凋亡的影响[J].科学技术与工程,2010,10(17):4139-4143.
- [15] IWAI K, HORI M, KITABATAKE A, et al. Disruption of microtubules as an early sign of irreversible ischemic injury-immunohistochemical study of in situ canine hearts[J]. Circulation Research,1990,67(3):694-706.
- [16] 韩 军,陆友金.核内不均一核糖核蛋白 A2/B1 研究进展[J].临床肺科杂志,2011,16(5):755-756.
- [17] 邵会媛,杨再林.核仁磷酸蛋白突变基因表达对 NIH3T3 细胞增殖和凋亡的影响[J].2010,32(8):783-785.

(本文编辑 杨 瑛)