

· 论著 ·

硫化氢延迟预处理对大鼠心肌蛋白质组学的研究

冉珂 唐正国 肖艳英 常业恬 徐军美

【摘要】 目的 采用蛋白质组学技术,观察硫化氢延迟预处理对大鼠心肌蛋白质表达的影响。**方法** 16 只 SD 大鼠按随机数字表法分为生理盐水对照组和硫化氢预处理组,每组 8 只。尾静脉注射生理盐水和硫化氢预处理后 24 h 建立心肌缺血/再灌注模型(缺血 30 min,再灌注 120 min)。用双向凝胶电泳(2-DE)分离两组大鼠心肌组织蛋白质,2-DE 图谱分析后找出表达差异的蛋白质,并用基质辅助激光解析-电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定差异蛋白质。**结果** 对照组的蛋白质点数平均为 929 ± 14 ,硫化氢组的蛋白质点数平均为 906 ± 10 ,经凝胶图像分析找到表达差异蛋白质 15 个;用 MALDI-TOF-MS 对差异蛋白进行鉴定,共鉴定出 11 个蛋白质,包括多(聚)脱氧核糖核苷酸合酶、胱硫醚- γ -裂解酶、转录起始因子、NADH 脱氢酶、鸟嘌呤核苷酸释放因子、果糖二磷酸醛缩酶 A、糖原合成酶激酶-3、电子转移黄素蛋白、谷胱甘肽 S 转移酶、钙活化核苷酸酶、S-腺苷蛋氨酸合成酶。**结论** 硫化氢延迟预处理可使大鼠心肌组织蛋白表达发生改变,其心肌保护作用可能与改善能量代谢、抗氧化反应、细胞保护和保护呼吸链等有关。

【关键词】 硫化氢; 延迟预处理; 心肌; 蛋白质组学

Proteomics analysis of myocardium after delayed preconditioning with hydrogen sulfide in rat RAN Ke*, TANG Zheng-guo, XIAO Yan-ying, CHANG Ye-tian, XU Jun-mei. *Department of Anesthesiology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan, China

Corresponding author: TANG Zheng-guo, Department of Anesthesiology, the Third Hospital, Changsha 410015, Hunan, China, Email: tangzhengguo2007@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes in protein of myocardium after hydrogen sulfide delayed preconditioning by using proteomics technology. **Methods** Sixteen Sprague-Dawley rats were randomly assigned to control (group S) or hydrogen sulfide group (group H), $n=8$ for each group. Myocardial ischemia/reperfusion injury model (ischemia 30 minutes followed by reperfusion 120 minutes) was reproduced at 24 hours after preconditioning either with normal saline or hydrogen sulfide for proteomics analysis in group S or group H, and the myocardial tissue was harvested. The total proteins were extracted and separated by two dimensional gel electrophoresis (2-DE), and the differential protein expression spots were analyzed with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Results** Analysis of 2-DE showed that 929 ± 14 protein spots were found in group S and 906 ± 10 protein spots in group H, and the expression of 15 protein spots was different between two groups. These protein spots were chosen to undergo MALDI-TOF-MS analysis, and 11 proteins were preliminarily identified, including DNA ligase, cystathionine gamma-lyase, transcription initiation factor, NADH dehydrogenase, guanine nucleotide-releasing factor, fructose-bisphosphate aldolase A, glycogen synthase kinase-3, electron transfer flavoprotein subunit beta, glutathione S-transferase, soluble calcium-activated nucleotidase and S-adenosylmethionine synthetase. **Conclusions** Hydrogen sulfide delayed preconditioning of myocardium resulted in the changes in protein expression profiles in the myocardium. The differential proteins might function as anti-oxidants, to improve the energy metabolism of myocardium, confer cytoprotection and protection of respiratory chain, thus conferring cardioprotection.

【Key words】 Hydrogen sulfide; Delayed preconditioning; Myocardium; Proteome

研究发现,硫化氢延迟预处理对缺血/再灌注(I/R)心肌具有保护作用^[1-2],但其具体的作用机制目前尚未完全阐明。因此,本研究中拟采用双向凝胶电泳(2-DE)技术和基质辅助激光解析-电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术,观察硫化氢延迟预处理对大鼠心肌蛋白质表达的影响,从分子水

平进一步揭示硫化氢延迟预处理对心肌保护作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器:固相 pH 梯度(IPG)干胶条(pH3-10NL, 18 cm, 安玛西亚公司,瑞典),IPG 缓冲液、尿素、过硫酸铵、丙烯酰胺、四甲基乙二胺、硫脲、二硫苏糖醇、碘乙酰胺、2-DE 标准蛋白质、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠(SDS)、胎牛血清白蛋白、硫代硫酸钠、 α -氰基-4-羟基肉桂酸、乙腈、硫化钠(均为 Sigma 公司,美国),三氟乙酸

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.04.006

基金项目:湖南省卫生厅资助项目(B2009110)

作者单位:410011 湖南长沙,中南大学湘雅二医院麻醉科(冉珂、肖艳英、常业恬、徐军美);长沙市第三医院麻醉科(唐正国)

通信作者:唐正国,Email: tangzhengguo2007@163.com

(Merck公司, 德国), 胰蛋白酶 (Promega 公司, 美国), 考马斯亮蓝染色剂、无水乙醇、琼脂糖(均为国产分析纯试剂)。IPGphor 等电聚焦仪(Amersham Pharmacia Biotech 公司, 美国), Autoflex MALDI-TOF-MS 仪(Bruker 公司, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型复制:SD 大鼠 16 只, 按照随机数字表法分成 2 组, 每组 8 只。参考文献^[1-3]方法尾静脉注射给药预处理, 硫化氢组硫化氢钠 0.05 mg/kg, 对照组生理盐水 1.0 ml/kg。预处理后 24 h 采用缺血 30 min、再灌注 120 min 复制 I/R 模型。取左心室前壁缺血区心肌组织, -70 °C 下保存备检。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2.2 心肌蛋白质样品的制备:取心肌组织, 用蛋白裂解缓冲液制备组织匀浆, 离心取上清液, 冰丙酮沉淀, 沉淀物加裂解缓冲液, 再离心取上清液, 用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度。

1.2.3 2-DE:每组取 3 个样本, 分别经蛋白裂解, 样本制备后进行 2-DE。样本的上样量均为 1000 μg。第一向采用 IPG 胶条, 在 IPGphor 等电聚焦仪上先后进行水化和等电聚焦(IEF), 程序设置: 分离电压 30 V 12 h, 500 V 1 h, 1000 V 1 h, 3000 V 1 h, 8000 V 7 h, 共 60 860 Vh; 经平衡后, 进行第二向的 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 直到溴酚蓝迁移至凝胶的底端结束电泳, 然后采用考马斯亮蓝染色法对凝胶进行染色以备分析。

1.2.4 图像分析及统计学处理:对染色后的凝胶进行数字扫描和图像分析, 选取硫化氢组和对照组凝胶的公共差异点(蛋白质表达量相差 1.5 倍以上), 用 *t* 检验分析差异有统计学意义的蛋白质点。

1.3 MALDI-TOF-MS 鉴定:在 MALDI-TOF-MS 仪上进行蛋白质点的胶上原位酶解及质谱鉴定, 使用促肾上腺皮质激素(ACTH)作为外部标准校正, 获得肽质量指纹图。搜索 Swiss-Prot 数据库, 肽片断质量最大误差控制在 0.5, 获得肽片断所选用的酶为胰酶, 物种来源为大鼠, 离子选择 $[M+H]^+$ 和同位素单离子峰, 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化, 可变修饰为蛋氨酸氧化, 并过滤肽质量峰。

2 结果

2.1 2-DE 技术分离心肌蛋白质:分别取对照组和硫化氢组大鼠心肌蛋白质样品, 进行 2-DE 分离, 然后进行考马斯亮蓝染色, 扫描染色后的胶片, 得到 2-DE 图谱(图 1)。

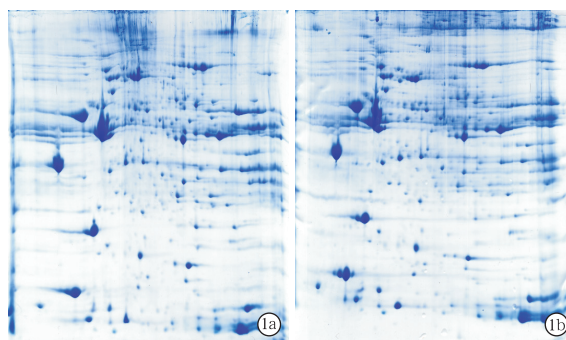


图 1 生理盐水(a)和硫化氢(b)延迟预处理后 24 h 心肌缺血 / 再灌注大鼠心肌蛋白质双向凝胶电泳考马斯亮蓝染色图谱

2.2 2-DE 图谱分析:重复分析 3 次, 结果显示对照组蛋白质点数平均为 929 ± 14 , 硫化氢组平均为 906 ± 10 。对照组和硫化氢组组内匹配率分别为 84.6% 和 85.3%, 组间匹配率为 72.8%。

2.3 蛋白质点位置的重复性检测,每组 3 块胶的蛋白质点有较好的重复性, 其中对照组在 IEF 方向的偏差为 (1.37 ± 0.41) mm, 在 SDS-PAGE 方向上偏差为 (1.59 ± 0.41) mm; 硫化氢组在 IEF 方向的偏差为 (1.53 ± 0.37) mm, 在 SDS-PAGE 方向上偏差为 (1.38 ± 0.17) mm。

2.4 2-DE 图谱的差异性分析:将硫化氢组蛋白质表达与对照组进行差异分析, 以校正后蛋白质点的表达量相差 1.5 倍以上的点为差异蛋白质点。结果显示, 硫化氢组表达明显差异的蛋白质点有 15 个, 其中表达上调(大于 3 倍)的有 7 个, 表达下调(大于 3 倍)的有 8 个(表 1)。图 2 为两组对比表达上调的 684 号蛋白质点局部比较。

表 1 双向凝胶电泳分离硫化氢和生理盐水延迟预处理后 24 h 心肌缺血 / 再灌注大鼠的心肌差异蛋白质点

序号	编号	表达量		硫化氢组较对照组 表达变化
		硫化氢组	对照组	
1	185	20 449.629	30 858.360	下调
2	254	6 811.138	11 029.887	下调
3	259	37 750.599	19 575.832	上调
4	335	32 188.610	3 222.253	上调
5	353	13 416.626	7 044.500	上调
6	498	1 557.035	5 753.337	下调
7	508	5 513.911	12 066.000	下调
8	525	7 377.968	12 380.315	下调
9	542	22 102.285	1 128.442	上调
10	585	3 359.671	29 445.345	下调
11	653	44 138.692	19 957.509	上调
12	684	11 376.412	3 794.904	上调
13	890	60 852.437	19 152.397	上调
14	895	7 980.475	42 428.677	下调
15	912	6 259.000	39 256.686	下调

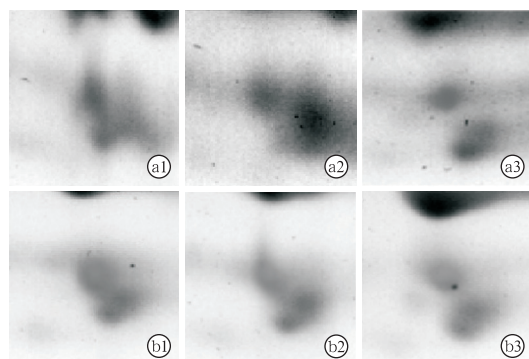


图2 硫化氢(a1~3)和生理盐水(b1~3)延迟预处理后 24 h 心肌缺血 / 再灌注大鼠心肌表达上调的 684 号蛋白质点局部比较(1~3 为重复检测 3 次)

2.5 差异蛋白质点的 MALDI-TOF-MS 肽质量指纹图谱分析: 对差异表达的 15 个蛋白质点进行肽质量指纹图谱分析, 共有 11 个蛋白质点得到初步鉴定, 另有 4 个蛋白质点由于得分值较低未查询到(表 2)。图 3 为 684 号蛋白质点的肽质量指纹图谱, 鉴定为谷胱甘肽 S 转移酶(GST)。

表 2 基质辅助激光解析-电离飞行时间质谱技术检测硫化氢与生理盐水延迟预处理后 24 h 心肌缺血 / 再灌注大鼠心肌差异蛋白质的质谱鉴定结果

序 号	分子质量 (×10 ³)	匹配的肽片断	序列覆盖率(%)	蛋白质序列号	蛋白质名称
1	185	107.1	6	9	P18858 多(聚)脱氧核糖核苷酸合酶
2	259	43.5	5	19	Q8VCN5 胱硫醚-γ-裂解酶
3	335	28.9	3	8	Q16594 转录起始因子
4	353	40.2	5	24	Q9QYY9 NADH 脱氢酶
5	525	135.7	5	8	P70392 鸟嘌呤核苷酸释放因子
6	542	39.4	5	25	P05064 果糖二磷酸醛缩酶 A
7	585	46.7	6	21	Q9WV60 糖原合成酶激酶-3
8	653	27.6	5	30	Q9DCW4 电子转移黄素蛋白
9	684	27.4	8	49	P30713 谷胱甘肽 S 转移酶
10	890	45.6	7	24	Q8VCF1 钙活化核苷酸酶
11	912	43.5	3	15	Q91X83 S-腺苷蛋氨酸合成酶

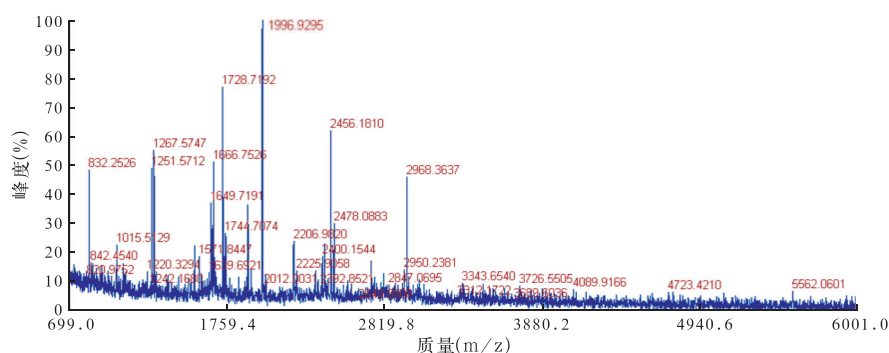


图3 基质辅助激光解析-电离飞行时间质谱技术检测硫化氢与生理盐水延迟预处理后 24 h 心肌缺血 / 再灌注大鼠心肌 684 号蛋白质点的肽质量指纹图谱

3 讨论

延迟预处理对缺血心肌的保护作用与影响心肌细胞内蛋白质合成及生物学变化相关。Arrell 等^[4]研究了腺苷或二氮嗪预处理对心脏 I/R 损伤心肌蛋白质表达的影响, 2-DE 图谱分析出 28 个明显差异的蛋白质点, 质谱鉴定得到 19 种蛋白质, 主要与线粒体能量代谢有关, 提示药物预处理诱发心肌细胞内蛋白质发生了质和量的变化。本研究中应用 2-DE 分离技术结合质谱分析对硫化氢延迟预处理诱导的心肌蛋白质表达谱进行了蛋白质组学的初步研究。2-DE 结果显示, 与对照组相比, 硫化氢组有 6 个蛋白质点增高, 9 个降低, 说明硫化氢延迟预处理后大鼠心肌蛋白质表达既可上调, 也可下调, 硫化氢延迟预处理对心肌的保护作用可能是这些蛋白质变化的共同作用结果。将差异蛋白质进行质谱分析, 初步鉴定出了 11 个蛋白质, 但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, 在数据库中未登记。对上述表达差异的蛋白质初步鉴定可分为以下几类: 与抗氧化相关的蛋白有 S-腺苷蛋氨酸合成酶、GST; 与呼吸链相关的蛋白有 NADH 脱氢酶、电子转移黄素蛋白; 与能量代谢相关的蛋白有果糖二磷酸醛缩酶 A(FBA); 与细胞保护相关的蛋白有胱硫醚-γ-裂解酶、糖原合成酶激酶-3(GSK-3); 其他。

FBA 是由 364 个氨基酸组成的蛋白质, 在体内是参与糖酵解和三羧酸循环的关键酶。在糖代谢过程中, FBA 可将 1,6-二磷酸果糖裂解为 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮, 3-磷酸甘油醛在能量消耗过程中经氧化还原反应转化为 1,3-二磷酸甘油酸, 再经磷酸化, 最后生成 ATP 供细胞利用, 这是线粒体能量产生的重要途径。在脑组织能量变化研究中发现, FBA 主要在神经元中表达^[5]。研究发现, 某些能耐受缺氧、缺血的动物中枢神经系统具有很强的耐受能量缺乏能力, 当缺氧或缺血发生时, 细胞 FBA 表达增强, 而 FBA 位于糖酵解途径上, 则可增强 ATP 生成和利用率, 为发生缺氧或缺血的神经元提供必要的能量, 以抵抗缺氧或缺血造成的能量耗竭^[6-7]。本实验发现, 硫化氢组 FBA 表达增加, 可能具有加强线粒体外能量生成的作用, 增强心肌耐受严重缺氧和缺血。

本研究中 684 号点是 GST。GST 属于可溶性同工酶超基因家族,在体内具有抗氧化作用,使进入体内的外源性异物失活,使细胞免受其细胞毒性作用。硫化氢是一种高反应性气体分子,容易与活性氧簇(ROS)和活性氮簇(RNS)等气体化合物反应。有研究证实,硫化氢可与超氧阴离子(O_2^-)^[8]、过氧化氢(H_2O_2)^[9]、次磷酸盐(ClO^-)^[10]、过氧亚硝酸盐($ONOO^-$)^[11]等活性氧、活性氮发生化学反应,从而阻止由活性氧/活性氮介导的对细胞蛋白质和磷脂氧化损伤。因此,本实验中通过采用硫化氢预处理上调 GST 表达,从而提高心肌抗氧化损伤的能力。

NADH 脱氢酶是呼吸链复合体 I 的重要组成部分,哺乳动物的复合体 I 由 45 个亚单位组成,亚单位由线粒体 DNA(mtDNA)编码而成,构成了呼吸链复合体 I 的催化核心^[12];当 mtDNA 参与编码的复合体 I 亚单位由于突变或其他损害而表达减少时,复合体 I 的含量或活性就会显著降低,一方面可使线粒体中 ROS 生成增多造成氧化损伤,另一方面使得线粒体 ATP 合成受抑^[13]。

GSK-3 是糖原合成酶激酶的限速酶。有研究表明:GSK-3 β 是心肌 I/R 后细胞坏死和凋亡的共同通路,特别是在线粒体功能调控过程中起到负向调控作用^[14-15]。Gao 等^[16]研究发现,在心肌缺血前给予 GSK-3 β 的阻断剂(TDZD-8)可显著抑制核转录因子 κ B(NF- κ B) 和 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)表达,同时降低炎症因子白细胞介素-6(IL-6)水平,抑制 GSK-3 β 活性对 I/R 损伤心肌有保护作用。本研究结果显示,硫化氢组 GSK-3 表达降低,提示硫化氢预处理对心肌的保护作用可能与抑制 GSK-3 和线粒体渗透性转换孔(mPTP)开放有关。

本研究提示,硫化氢预处理通过上调 NADH 脱氢酶的表达,促进 ATP 合成以提高心肌抗氧化损伤的能力,从而发挥心肌延迟保护作用。

综上所述,硫化氢延迟预处理后心肌组织的蛋白表达发生改变,对心肌具有保护作用,其保护机制可能与改善能量代谢、抗氧化反应、细胞保护、保护呼吸链等有关。本研究不排除因蛋白质分离技术导致的蛋白质点丢失,同时由于条件的限制,也无法阐明实验过程中蛋白质的修饰情况,但本实验结果显示硫化氢预处理可以引起心肌蛋白质组变化,这些蛋白质的变化可能具有一定的心肌保护作用,这为研究心肌保护提供了一些新的思路。

参考文献

- [1] Hu LF, Pan TT, Neo KL, et al. Cyclooxygenase-2 mediates the delayed cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning in isolated rat cardiomyocytes. *Pflugers Arch*, 2008, 455:971-978.
- [2] Sivarajah A, McDonald MC, Thiemermann C. The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock*, 2006, 26: 154-161.
- [3] 冉珂,朱蓉,卢向航,等. 热休克蛋白 27 介导异氟醚预处理延迟相对缺血/再灌注损伤兔心肌的保护作用研究. *中国危重病急救医学*, 2007, 19:683-686.
- [4] Arrell DK, Elliott ST, Kane LA, et al. Proteomic analysis of pharmacological preconditioning: novel protein targets converge to mitochondrial metabolism pathways. *Circ Res*, 2006, 99:706-714.
- [5] Popovici T, Berwald-Netter Y, Vibert M, et al. Localization of aldolase C mRNA in brain cells. *FEBS Lett*, 1990, 268: 189-193.
- [6] Knull HR, Fillmore SJ. Glycolytic enzyme levels in synaptosomes. *Comp Biochem Physiol B*, 1985, 81:349-351.
- [7] Duncan JA, Storey KB. Subcellular enzyme binding and the regulation of glycolysis in anoxic turtle brain. *Am J Physiol*, 1992, 262:R517-523.
- [8] Mitsuhashi H, Yamashita S, Ikeuchi H, et al. Oxidative stress-dependent conversion of hydrogen sulfide to sulfite by activated neutrophils. *Shock*, 2005, 24:529-534.
- [9] Geng B, Chang L, Pan C, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318:756-763.
- [10] Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, et al. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain?. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326:794-798.
- [11] Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'?. *J Neurochem*, 2004, 90:765-768.
- [12] Lenaz G, Fato R, Genova ML, et al. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757:1406-1420.
- [13] Koopman WJ, Verkaart S, Visch HJ, et al. Human NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology?. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293: C22-29.
- [14] Miura T, Nishihara M, Miki T. Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)-mediated signal transduction pathway: role of GSK-3 β in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury. *J Pharmacol Sci*, 2009, 109: 162-167.
- [15] Juhaszova M, Zorov DB, Yaniv Y, et al. Role of glycogen synthase kinase-3 β in cardioprotection. *Circ Res*, 2009, 104:1240-1252.
- [16] Gao HK, Yin Z, Zhou N, et al. Glycogen synthase kinase 3 inhibition protects the heart from acute ischemia-reperfusion injury via inhibition of inflammation and apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, 52:286-292.

(收稿日期:2011-05-19) (本文编辑:李银平)