

大鼠心肌梗死后差异蛋白质组学分析

张翠丽¹ 许玲¹ 王波² 臧师竹¹ 邹向阳¹ 辛毅¹ 姜涛^{1△}

(1 大连医科大学生物技术系 辽宁 大连 116044; 2 大连医科大学病理学与法医学教研室 辽宁 大连 116044)

摘要 目的:建立大鼠心肌梗死后蛋白表达变化谱,以进一步了解心肌梗死后心肌细胞重塑产生机制。方法:通过结扎大鼠冠状动脉左前降支建立急性心肌梗死模型,利用蛋白质双向凝胶电泳技术(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)分离心肌总蛋白,采用 PDQuest 7.3.1 软件比较分析,获得差异表达蛋白总体变化趋势。进一步通过蛋白免疫印记技术(Western-blotting)检测碱性成纤维生长因子(Base fibroblast growth factor, bFGF)在心肌梗死后的表达变化。结果:成功建立了大鼠急性心肌梗死模型;2-DE 结果表明:以假结扎组为对照,梗死 3 天组有 27 个蛋白显著上调,18 个蛋白显著下调,7 个蛋白表达明显差异(ratio>5)。进一步研究发现梗死区心肌组织 bFGF 表达明显升高。结论:心肌梗死后蛋白表达变化趋势的探讨为心室重塑机制研究提供线索。

关键词: 心肌梗死;双向电泳;蛋白印记;碱性成纤维生长因子

中图分类号: Q95-3, R542.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)02-230-03

Differential Proteomic Analysis after Myocardial Infarction in Rats

ZHANG Cui-li¹, XU Ling¹, WANG Bo², ZANG Shi-zu¹, ZOU Xiang-yang¹, XIN Yi¹, JIANG Tao^{1△}

(1 Biotechnology Department of Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

2 Pathology Forensic Medicine Department of Dalian Medical University, Dalian 116044, China;)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of ventricle remodeling after myocardial infarction by analyzing the proteins detected by ampholyte pH gradients based two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). **Methods:** The animal model of acute myocardial infarction was established by surgical ligation of the left coronary artery in rat. The total proteins of normal and infarcted cardiac muscle tissues were extracted. The differentially expression proteins were selected by using image analysis software. The expression of bFGF were analyzed by western-blotting. **Results:** The rat model of acute myocardial infarction was established and identified in ligation 3 days group. There were 27 up-regulated and 18 down-regulated, while 7 proteins specially expressed in infarcted tissue were obviously changed. **Conclusion:** Myocardial infarction caused differentially expression change for cardiac muscle tissues, which were helpful to study the metabolism of ventricle remodeling.

Key words: Myocardial infarction; Two-dimensional gel electrophoresis(2-DE); Western-blotting; Base fibroblast growth factor

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R542.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-230-03

前言

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是由于冠状动脉供血中断,引起供血区持续缺血而导致的较大范围的心肌坏死。心肌梗死后,梗死区心肌周围残存的心肌细胞接受心肌缺血、损伤的信息启动了众多蛋白质的表达,产生一系列心室重塑过程^[1],主要表现为残存的心肌细胞肥大,心肌细胞凋亡,同时伴随成纤维细胞增殖,纤维组织替代坏死心肌,最终发展为失代偿性心力衰竭而导致死亡^[2,3],因此,在心肌梗死早期有效抑制心室重塑的发生、发展对改善心肌梗死预后并发症具有重要意义。最近研究表明,碱性成纤维生长因子(Base fibroblast growth factor, bFGF)可以促进胶原蛋白合成,血管生成以及细胞增殖,对受损心肌细胞的功能修复具有重要作用^[4]。本研究首先利用蛋白质双向凝胶电泳技术分析心肌梗死后差异表达的蛋白,

进一步检测了 bFGF 的在梗死区和非梗死区的表达变化,从而为探讨心室重塑的机制和用药时间的选择提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立和分组

将雄性 SD 大鼠(250g±50g),投入麻醉缸中,至大鼠出现深慢呼吸状态时取出,将其四肢和牙齿固定于鼠板,剪毛后用 75% 的酒精消毒其胸部皮肤,剪开皮肤,钝性分离胸肌,将心脏挤出。辨认心脏结构,在左心耳下 1.5 厘米肺动脉圆锥处穿零号线,结扎冠状动脉左前降支,闭合胸腔,夹闭皮肤,按压胸部助其恢复心跳和呼吸,待其呼吸平稳后,缝皮。假结扎组,只在相同部位穿线并将线留在心肌内,其余操作同上。将 SD 大鼠随机分为假结扎组、结扎 3 天组。分别在假结扎组、结扎 3 天组大鼠结扎线下方(左前降支供血区域)取材,各组保持一致^[5]。

1.2 主要试剂

载体两性电解质(ampholyte)购自 Amersham Biosciences 公司,尿素(urea)、丙烯酰胺(actylamide)、甲叉双丙烯酰胺(Bisacrylamide)均为美国 Sigma 公司产品;Tris-base、SDS 购自天津科密欧化学试剂有限公司。

作者简介: 张翠丽(1963 年-),女,本科,实验师,主要研究方向:天然产物研究与开发

△通讯作者: 姜涛(1973-),女,硕士,副教授,

E-mail:jiangtaodl@163.com

(收稿日期:2010-09-25 接受日期:2010-10-20)

1.3 主要仪器

圆盘电泳仪(大连竞迈生物科技有限公司);高压电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);MV II型垂直板电泳槽(大连竞迈生物科技有限公司);TGL-16B高速台式离心机(上海安亭科技仪器厂);JY92-II超声波细胞破碎机(宁波新艺生物科技股份有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色鉴定心肌梗死区域 假结扎组和结扎组大鼠结扎部位取材后,生理盐水清洗干净,液氮冷冻后作冰冻切片,丙酮浸润切片5分钟,双蒸水清洗一次,干燥后加入苏木精浸泡0.5小时(室温),可根据着色情况调定。双蒸水浸泡3分钟两次,将水分甩掉,浸入伊红,37℃,30分钟(时间温度均可根据染色强弱而调定至满意效果),取出甩干染液,用双蒸水冲洗干净,取出依次放入50%、70%、80%、95%、95%、100%酒精中分化脱水。镜检,二甲苯3分钟两次,中性树脂滴一滴封片,50℃-80℃干烤2小时。

1.4.2 大鼠心肌总蛋白的制备 分别取各组大鼠心肌组织1g,在4℃预冷的生理盐水中清洗组织至发白,滤纸吸干,并将组织剪碎,置于匀浆器中,加入裂解液(50 mmol L⁻¹ Tris-HCl)1 mL,DTT 100 mmol L⁻¹,PMSF 10 mmol L⁻¹,在冰上充分匀浆至无肉眼可见组织块,分装EP管中,冰置10 min。超声破碎裂解心肌细胞(200 W,工作时间2 s,间隔2 s,共10次),4℃离心(12,000 r min⁻¹,10 min),上清液即为心肌总蛋白。以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白(100 μg mL⁻¹),利用考马斯亮蓝法测定样品蛋白浓度。

1.4.3 蛋白质双向凝胶电泳 第一向电泳为聚丙烯酰胺等电聚焦电泳(IEF-PAGE)。采用载体两性电解质制造pH梯度,上样量为50 μg,蛋白样品与等体积2×样品缓冲液混合,室温放置2 h。制备等电聚焦柱^[67],组装圆盘电泳槽,调节好各等电聚焦柱高度,确定上槽与玻璃管之间无渗漏,分别加入电泳缓冲液(阴极电泳缓冲液:500 mmol L⁻¹ 氢氧化钠 150 ml,阳极电泳缓冲液:500 mmol L⁻¹ 磷酸 200 ml),用微量注射器将样品液缓慢从玻璃管的上端注入,使样品沉于胶面上。接通电源,开启高压电泳仪,室温下预电泳30 min,2000 V恒压等电聚焦电泳4 h。电泳完毕后,取下胶管,用双蒸水将胶管和两端洗2次,用恒压转柄推动注射器使胶条自行滑出,并置于小培养皿内,在平衡缓冲液(5% 2-巯基乙醇,62.5 mmol L⁻¹ Tris-HCl(pH 6.8),2.5% SDS,10%甘油)中平衡30 min后进行第二向电泳。

第二向电泳为SDS-PAGE。将IEF-PAGE后的凝胶进行SDS-PAGE电泳。30 mA恒流电泳1小时左右,当溴酚蓝距离胶底部1 cm处,停止电泳。考马斯亮蓝染色、脱色后扫描分析。

1.4.4 Western-blotting方法检测bFGF蛋白水平表达 将制备好的样品采用10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,按常规方法将凝胶蛋白带转移到硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉在室温封闭2 h,中间换液一次,加入一抗(1:500)4℃过夜,TBST(150 mM NaCl,50 mM Tris-Cl,0.1% Tween-20)洗10 min,共3次,然后加入二抗(1:1000),室温孵育1 h。反应结束TBST洗10 min共3次,TBS洗10 min 1次,DAB试剂显色。

1.4.5 图像扫描分析 染色后的凝胶用扫描仪扫描,获取的数字图像,采用PDQuest 7.3.1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,获取斑点位置坐标等分析。

2 结果

2.1 心肌组织的病理切片鉴定

心肌组织病理切片的HE染色结果显示:假结扎组大鼠心肌组织纤维排列整齐,未见断裂、溶解、变性坏死。结扎组大鼠心肌组织内可见大量心肌细胞坏死,溶解,炎细胞浸润等病理改变(图1)。

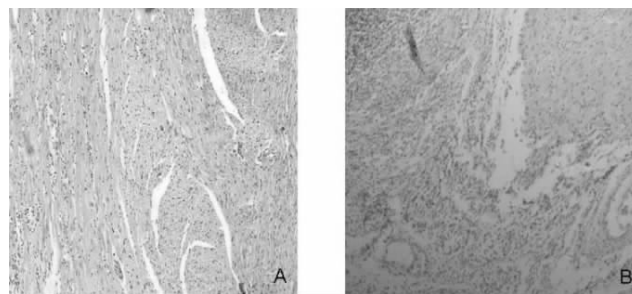


图1 假结扎组和结扎组大鼠的心肌组织HE染色分析(80×):

A.假结扎组;B.心肌梗死3天组

Fig.1 HE staining analysis of heart tissues for myocardial infarction(MI) group and sham ligation group (80×): A. sham ligation group; B. MI 3 days group

2.2 心肌梗死后心肌蛋白表达变化的双向凝胶电泳分析

由图2可见,两组蛋白点在pH 4.0~6.0范围内均匀分布,利用PDQuest 7.3.1软件分析双向电泳图谱发现:假结扎组可以检测出51个蛋白点,结扎3天组检测出52个蛋白点。对比假结扎组,梗死3天组有27种蛋白上调,18种蛋白下调,(图2)。心肌梗死后有7种蛋白表达变化趋势超过80%,其中有4个下调蛋白,3个上调蛋白,且这些表达差异显著蛋白点均分布在pH 4~5范围。其中Spot3602和Spot4501是两个显著下调蛋白,该蛋白等电点接近于5,为酸性蛋白。

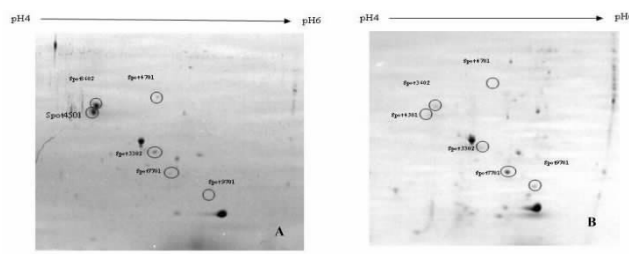


图2 心肌梗死后蛋白表达变化的双向凝胶电泳图谱:A.假结扎组;B.结扎3天组;标记点为具有显著性差异的蛋白

Fig.2 Two-dimensional gel electrophoresis images of protein expression changes after myocardial infarction; A. sham group; B. ligation 3 days group; marked spot, differentially expressed proteins.

2.3 心肌组织bFGF表达鉴定

根据Western blotting结果显示,非梗死区组织中bFGF表达较低,而大鼠心肌梗死后,梗死区bFGF表达明显升高,但结扎区远端组织也未见bFGF的显著表达。

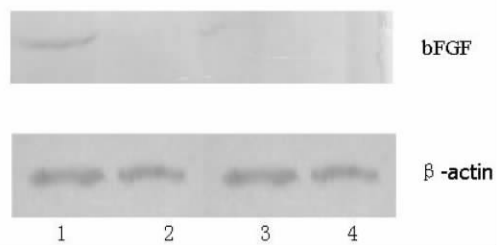


图3 Western blotting 法鉴定 bFGF 蛋白的表达变化:

1.结扎 3 天组结扎区组织;2.结扎 3 天组结扎远端组织;
3.假结扎区组织;4.假结扎远端组织。

Fig.3 Expression change of bFGF after myocardial infarction by Western blotting: Lane 1, ligation area tissue of ligation 3 days group; Lane 2, unligation area tissue of ligation 3 days group; Lane 3, sham ligation area tissue; Lane 4, un-sham tissue area.

3 讨论

心肌梗死后,心脏自身出现保护性修复,继而发生心肌细胞凋亡、纤维化等病理过程,心肌内环境也随之发生明显改变,同时伴随大量蛋白表达变化。而利用蛋白质双向凝胶电泳技术鉴定心肌梗死早期蛋白表达改变,为心肌梗死早诊断,早治疗提供重要理论基础^[6]。本研究利用蛋白质双向凝胶电泳技术,从蛋白质组水平分析心肌梗死早期基因表达变化谱,2-DE 结果表明:心肌梗死后,大量基因表达发生变化,本方法检测出超过 50 个差异蛋白点,与假结扎组相比,梗死 3 天组有 27 个蛋白点显著上调,18 个蛋白点显著下调,有 7 个蛋白点灰度扫描差异大于 80%,其中 Spot3602 和 Spot4501 是两个显著下调蛋白,这两种差异性表达的蛋白为等电点和分子量相似的酸性蛋白,其进一步质谱鉴定将具有重要意义。

心室重塑是心肌梗死后的最大的威胁,其初始目的是在心肌梗死初期保持有效的心脏功能,但长时间作用后果是有害的,最终导致心力衰竭,威胁到生命^[9]。目前,临床上采用 bFGF (Basic fibroblast growth factor, bFGF) 对恢复期心肌梗死病人进行治疗,效果显著。bFGF 是成纤维细胞表达的细胞因子,具有抑制心肌细胞的胞间信号转导,促进 Mg^{2+} 释放、诱导血管内皮细胞增殖、分化和新生血管形成,改善缺血组织供血等作用^[4,10-11]。动物实验研究表明,bFGF 具有减少心肌梗死面积,促进心室功能恢复、抑制心室重塑等作用^[12-13]。本研究进一步通过 Western-blotting 技术对心肌梗死 3 天后 bFGF 表达情况进行鉴定。结果表明,在结扎 3 天组梗死区部位检测到 bFGF 表达明显增高。假结扎组和结扎组非梗死区部位均未见明显表达。表明在急性心肌梗死前期,bFGF 表达上调可能与促进微血管增生,减少受损面积,诱导成纤维细胞分裂,有效填补因心肌坏死而产生的空缺等方面发挥积极作用, bFGF 的高表达可能与心肌细胞的自身修复有密切关系。临床上采用 bFGF 对心肌梗死进行治疗时需考虑心肌组织自身表达变化。

利用蛋白质组学工具从某一时间点的细胞蛋白全谱着手分析,进行质谱数据的生物信息检索,了解心肌梗死后心肌细胞蛋白表达的改变,将有助于研究心肌梗死后心室重塑的机制,

为急性心肌梗死的治疗提供线索。

参考文献(References)

- [1] H.Skalicka, Jr., J.Horak, M.Aschermann, et al. Myocardial infarction, left ventricle remodeling and cellular therapy [J]. Vnitr.Lek, 2009, 55 : 37-44
- [2] J.A.de Fockert. Clinical presentation of acute myocardial infarct in the elderly[J]. Tijdschr.Gerontol.Geriater, 1987,18:305-308
- [3] Y.Sugano, T.Anzai, T.Yoshikawa, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction[J]. Cardiovasc.Res, 2005, 65:446-456
- [4] J.A.Virag, M.L.Rolle, J.Reece, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function[J]. Am.J.Pathol. 2007,171:1431-1440
- [5] Zhao HY, Guan HH, Zhong XY, et al. Making rat myocardial infarction model by thoracotomy and ligating coronary arter [J]. Foreign Medical Sciences, 2005, 32(12):540-542
- [6] 湛焱焱,龙潜,卢晓霞等.乙胺丁醇处理前后耻垢分支杆菌 mc²155 细胞蛋白双向电泳图谱的差异分析 [J]. 大连医科大学学报,2007,29 (1):1-3
- Zhan Yao-yao, Long Qian, Lu Xiao-xia, et al. Simultaneous detection of proteins expression of Mycobacterium smegmatis mc2155 after treatments of ethambutol (EMB) by two - dimensional electrophoresis [J]. Journal of Dalian Medical University, 2007,29(1):1-3
- [7] 许玲,姜涛,张翠丽等.大鼠心肌蛋白双向凝胶电泳技术的建立[J]. 大连医科大学学报,2008,30(5):483-486
- Xu Ling, Jiang Tao, Zhang Cui-li, et al. Establishment of a two-dimensional electrophoresis technology on proteins of cardiac muscle [J]. Journal of Dalian Medical University, 2008,30(5):483-486
- [8] 刘贤锡.蛋白质工程原理与技术 [M]. 济南:山东大学出版社,2002,105
- Liu Xian-xi. Principle and Technology of protein engineering [M]. Shandong University Press, 2002,105
- [9] 姜涛,王春梅,来仪等.大鼠心肌梗死后心脏发育相关基因表达变化 [J].中国生物化学与分子生物学报,2004,20(6):833-837
- Jiang Tao, Wang Chun-mei, Lai Yi, et al. Cardiogenesis-related Gene Expression Changes after Myocardial Infarction in Rats [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 20(6), 833-837
- [10] Wu Q, Li LG, Geng ZH. Changes of cardiomyocyte apoptosis and expression of apoptosis-associated gene during heart failure following myocardial infarction in rats [J]. Third Military Medical University, 2004, 24(4):434-436
- [11] 林波,张永雪.碱性成纤维细胞生长因子对大鼠心肌保护机制研究 [J].医药论坛杂志, 2004,17:121-123
- Lin Bo, Zhang Yong-xue. Research of Protective Effect of bFGF in Rat Heart [J]. Journal of Medical Forum, 2004,17:121-123
- [12] Virag JA, Rolle ML, Reece J, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function [J]. American Journal of Pathology, 2007, 171(5):1431-40
- [13] Zhu HS, Lian, Zheng JH, et al. The effect of basic fibroblast growth factor slow-release microcapsules on angiogenesis in infarcted rabbit myocardium [J]. Chin Med Sci J, 2000,15(4):210-213