文章编号:1000-5404(2011)03-0225-04

论著

人低温离体灌注心脏心肌缺血损伤早期蛋白组学研究

李继元[1,2],李 洪[1],杨天德[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院麻醉科[1];024053 内蒙古 赤峰,内蒙古赤峰市65657部队卫生队[2])

【摘要】 目的 分析离体心脏灌注早期心肌缺血损伤释放出的蛋白质组成,并探讨这些蛋白的生理学过程和功能。**方法** 收集人离体心脏停跳后即刻、30 min和60 min后的4 ℃灌注液,样品首先用MARS柱去除高丰度蛋白,用10×10^3分子筛脱盐浓缩、溶液内酶解,得到肽段用mRP柱进一步脱盐,通过液相-芯片-离子阱质谱(HPLC-Chip-MS/MS)技术进行鉴定和生物信息学分析,建立离体心脏灌注早期心肌缺血释放蛋白全谱图,通过GO注释和EBI数据库对这些蛋白进行功能和定位分析以及BLAST比对。**结果** 得到高可信蛋白176个(Score≥8,SPI≥70%);经GO注释分析,主要参与细胞、生物学调节、代谢等生理学过程,具有结合功能、催化活性以及酶调节活性等;通过EBI数据库对106×10^3未知蛋白和29×10^3未知蛋白进行BLAST比对发现前者是一种出胞蛋白,后者性质目前尚不明确。**结论** 离体心脏灌注获得的176个高可信蛋白对进一步研究心肌缺血损伤早期生物学标记物具有重要的意义。106×10^3和29×10^3的2个未知蛋白可能是未发现的心肌早期缺血损伤蛋白标记物。

【关键词】 离体心脏;心肌缺血;HPLC-Chip-MS/MS;生物信息学分析
【中图法分类号】 R394.3;R540.5;R654.1 **【文献标志码】** A

Proteomics in early myocardial ischemic injury of isolated human heart during hypothermia-perfusion

Li Jiyuan[1,2], Li Hong[1], Yang Tiande[1] ([1] Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2] Medical Team of No. 65657 Troop, Chifeng Inner Mongolia, 024053, China)

【Abstract】 **Objective** To analyze the components of proteins released from early ischemic myocardial injury of isolated human heart during hypothermia perfusion and study their physiological processes and functions. **Methods** Perfusate at 4℃ was harvested from isolated human hearts instantly, 30 and 60 min after arrest. Peptide fragments were obtained by removing abundant proteins from samples with MARS columns, desalinizing with a 10 kD molecular sieve, and digesting with enzyme in solution, desalinized again with mRP columns, identified by HPLC-Chip-MS/MS and analyzed. Spectra were established for all proteins released from early ischemic myocardial injury of isolated human heart during hypothermia perfusion. The functions and locations of these proteins were analyzed by GO and EBI, and compared with those of BLAST. **Results** A total of 176 high confidence proteins (score≥8, SPI≥70%) were obtained using the Agilent Spectrum Mill Home software. GO annotations showed that these proteins mainly participated in regulation of the physiological processes of cells, biology and metabolism, with blinding functions, catalytic activities and enzyme-modulating activities. The 106 kD agnoprotein was found to be an exocytosis protein by comparing 106 kD and 29 kD unknown proteins in BLAST and EBI database. **Conclusion** The 176 high-confidence proteins are of great significance for further study of biological markers for early myocardial ischemic injury, and the 106 and 29 kD agnoproteins may be two unknown proteins of early myocardial ischemic markers.

【Key words】 isolated heart; myocardial ischemia; HPLC-Chip-MS/MS; bioinformatics analysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871061) and the National Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5016).
Corresponding author: Yang Tiande, Tel: 86-23-68755634, E-mail: 31011@sina.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30871061);重庆市自然科学基金(CSTC 2009BA5016)
【通信作者】 杨天德,电话:(023)68755634,E-mail:31011@sina.com

心血管疾病的发生率很高。据美国心脏病协会数据统计显示,2003年美国有720万急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)患者[1]。世界心脏

联盟分析预计,2020年全球心血管病死亡率将增加50%,心肌梗死将从目前死因排行榜的第5位上升至第1位。早期明确诊断是对症治疗和降低死亡率的关键。心脏特异性肌钙蛋白(cardiac specific troponin, cTn)检测被认为是诊断心肌梗死的金标准,但实践证明cTn的释放代表着心肌细胞发生了不可逆的坏死损伤,并不适用于心肌缺血的早期诊断。因此对心肌缺血早期损伤特异性生物标记的筛选将具有非常重要的理论意义和应用价值。本实验对人离体心脏进行灌注,收集缺血早期灌注液,通过去除高丰度蛋白后,采用HPLC-CHIP-MS/MS质谱技术对早期心肌缺血损伤释放的蛋白进行鉴定,运用生物信息学技术对鉴定出的高可信蛋白生理学过程和功能进行初步分析,为寻找和研究心肌缺血损伤早期生物学标记物提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent HPLC-Chip-MS/MS ION TRAP 6330(美国);电子分析天平(美国);多振幅轨道摇床(上海智城分析仪器制造有限公司);Eppendorf台式高速离心机(德国);Multl Affinity Removal Column4.6×50 mm(美国);10×10^3分子筛(美国Millipore公司);mRP-C18(美国);Large Capacity Chip(160 nL)150 mmC18(美国Agilent公司);甲酸、甲醇、乙腈为色谱纯(美国TETIA公司);胰酶(美国Promega公司)。停跳保护液由新桥医院心外科自制,500 ml林格液+1 g硫酸镁+3 g氯化钾+10%碳酸氢钠10 ml。心脏离体灌注装置制备[2]。选用一次性输血器的排气针头作为灌注针,术前将一次性输血器的排气针塑料管在距针尾4 cm处剪断,连接到一次性输血器另一端,并且用4号线扎紧,然后接上4 ℃供心保护液进行排气,让灌注管充满液体后,用带橡皮管的小弯止血钳夹紧灌注管两端,等待灌注。

1.2 标本收集

3例离体心脏均来自脑死亡者(经医院伦理委员会批准)。供体死亡后,全身肝素化,胸骨正中切口,离断,取下供心置入4 ℃停跳液中冲掉心腔积血,再放入第2个4 ℃停跳液中漂洗干净进行心脏灌注,收集停跳液4 ml,进行编号(A_0、B_0、C_0),然后完全将心脏浸泡在第3个4 ℃停搏液中,间隔30 min和60 min,同样方法灌注收集停跳液4 ml,编号处理(A_1、A_2;B_1、B_2;C_1、C_2),然后在4 ℃条件下离心20 min,3 000 r/min,留取上清液-80 ℃保存。

1.3 实验方法

1.3.1 去除样品中高丰度蛋白 采用MARS柱处理(4.6×50 mm)。将30 μl样品以90 μl Buffer A稀释(1∶3)混匀离心(16.1 r/min×10 min)后取上清放入进样瓶;接上MARS柱,以Buffer A平衡(1.0 ml/min×4 min,20 ℃),打开检测器(VWD),待其基线平稳,调用方法、编辑序列(Method:MARS_H_7,检测器波长:280 nm,Temp:20 ℃),进行样品分离,收集去除高丰度蛋白后的馏份于-80 ℃保存。

1.3.2 浓缩、脱盐 将样品置于10×10^3分子筛中离心(14 000 r/min×30 min,4 ℃),用8 mmol尿素溶液清洗样品液,如前方法离心3次,反转分子筛离心(3 000 r/min×5 min,4 ℃)收集馏份,用Bradford法定量,制作标准曲线,测定浓度。

1.3.3 溶液内酶解 按照溶液内酶解的标准方法配备试剂。按40 μg的蛋白量分装样品,向分装后的每个样品内加入10 μl的10 mmol DTT溶液于多振幅轨道摇床37 ℃反应1 h;向每个样品内加入20 μl 20 mmol IAM溶液,室温避光反应1 h;向每个样品内加入10 μl的10 mmol DTT溶液于多振幅轨道摇床37 ℃反应1 h;最后向每个样品内加入40 μl的12.5 ng/μl胰酶溶液于多振幅轨道摇床37 ℃反应过夜。

1.3.4 样品脱盐 用甲酸和乙腈冲洗管路进行上柱前准备,接mRP柱平衡30 min,进空白水样(2针×100 μl)冲洗进样回路(Method:Desalt,Temp:20 ℃),将样品用110 μl去离子水完全溶解,离心(16.1 r/min×15 min),取104 μl样品于进样瓶内分别标记,另每个样品剩余的6 μl组成混合样,作为对照样品,根据对照样品各组分的保留时间编辑收集方法时间表,编辑序列进行上样分析,设置馏分收集模式为Time based,Method:Desalt,Temp:80 ℃,收集到馏分于-80 ℃保存。

1.3.5 质谱分析 根据Agilent HPLC-Chip-MS/MS ION TRAP 6330系统使用说明书,选用芯片为Large Capacity Chip 150 mm C18,设置毛细泵(Capillary Pump)流动相100% B(90%乙腈+1‰甲酸水溶液),设置纳流泵(Nano Pump)流动相为95% B(90%乙腈+1‰甲酸水溶液)、5% A(1‰甲酸水溶液),其中设定Capillary Pump流速为4 μl/min,设定Nano Pump流速为0.3 μl/min,冲洗Chip时间为30 min,调用方法(method:Chip-Peptide-Long-Hwf-1000-1600)此时Nano Pump为95%、5% B,Capillary Pump为100% A;设置其他参数:capillary为1 850 V,Dry temp为325 ℃,Dry Gas为5 L/min,End plate off set为-500 V,Capi exit为96.4 V,Skimmer为40.0 V;电脑运行自动记录结果。

1.3.6 质谱数据分析 采用Spectrum Mill(Rev A.03.02.060;Agilent)蛋白数据库专业统计分析处理软件进行数据分析。根据使用说明书,将获得的质谱结果在国际人类蛋白质索引[3](international protein index, IPI)数据库中检索,允许有2个不完全裂解位点,并且包括在搜索中氧化甲硫氨酸和N-末端谷胺酰胺转化成5-氧-2-吡咯烷羧酸的变量修正。参数设置:如果前向-逆转得分大于2,列1-列2得分大于2,得分阈值大于7.67,得分百分比峰强度大于70%,我们认为肽段是有效的。只有当蛋白具有2个或2个以上的有效肽段、总得分大于25的时候,认为是有效的,可以报告[4]。为了比较处理组间的鉴定的蛋白,我们采用每个蛋白光谱的数目和肽段的总计离子强度(总离子强度)作为蛋白量的指标。因为这些都是半定量的方法,我们只考虑那些有至少5个额外光谱以及至少在总离子强度有10倍增加的蛋白为足够差异的进行报告。

1.3.7 GO分析 用蛋白质分类软件[5]基因本体论(gene ontology, GO)(http://61.50.138.118/gofact/cgi/guestbook.cgi)对所鉴定到的蛋白质进行生物学过程和功能分析。

1.3.8 EBI分析 用欧洲生物信息学研究所(european bioinformatics institute,EBI)(http://www.ebi.ac.uk/)蛋白质组

分析数据库对 106×10^3 和 29×10^3 进行数据检索分析。

2　结果

2.1　去除样品中高丰度蛋白

样品经过 Agilent 免疫亲和高丰度蛋白去除柱(MARS 柱)去除高丰度蛋白获得色谱图。对离体心脏停搏液 A_1 样品进行亲和层析去除高丰度蛋白后,获得的色谱图如图 1 所示。

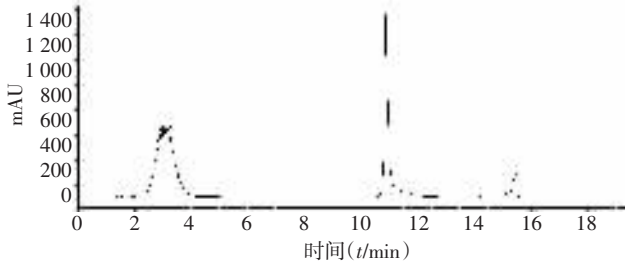


图 1　亲和色谱柱去除高丰度蛋白色谱分析

2.2　HPLC-Chip-MS/MS 鉴定结果

将溶液内酶解得到的肽段进行质谱分析,采用 Agilent Spectrum Mill 蛋白数据库专业统计分析处理软件处理 MS/MS 谱图,共得到 176 个(Score≥8,SPI≥70%)高可信蛋白,其中心型脂肪酸结合蛋白(Heart-type fatty acid-binding protein, H-FABP)的典型分析图谱如图 2 所示。

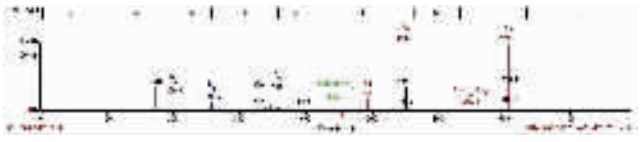


图 2　H-FABP 的 HPLC-Chip-MS/MS 鉴定结果

2.3　GO 分析结果

我们将 176 个高可信蛋白通过 GO 注释进行生理学过程和功能分析,结果显示这些高可信蛋白主要参与了细胞过程(cellular process)、生物学调节(biological regulation)、代谢过程(metabolic process)、刺激反应(response to stimulus)、定位确立(establishment of localization)、发育过程(developmental process)等方面的生理学过程(图 3),具有结合功能(blinding)、催化活性(catalytic activity)、酶调节活性(enzyme regulator activity)以及结构分子活性(structural molecule activity)、转运活性(transporter activity)、转录活性(transcription regulator activity)、抗氧化活性(antioxidant activity)等功能(图 4)。

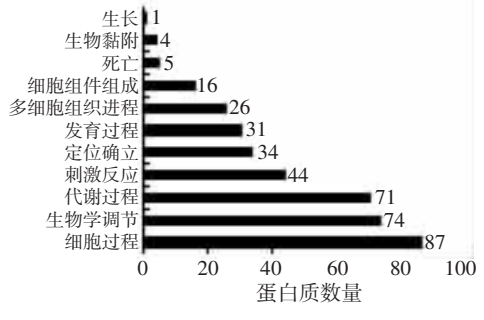


图 3　高可信蛋白的生理学过程分析

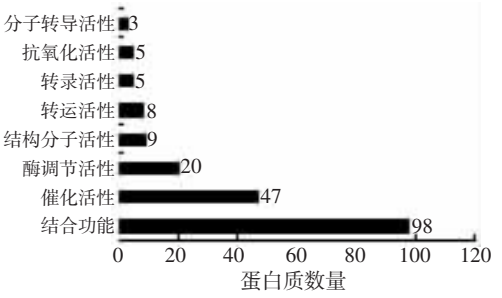


图 4　GO 对高可信蛋白的功能注释

2.4　EBI 分析结果

相对分子质量为 106×10^3 蛋白通过 EBI 数据库 BLAST 比对,与 Protein unC-13 同源性达到 100%;相对分子质量为 29×10^3 蛋白通过 BLAST 比对,与 LOC339524 同源性达到 99%,局部对比分析(表 1)。

表 1　29×10^3 蛋白 Local alignment 序列

蛋白名称	氨基酸序列局部对比
29×10^3 蛋白	CPGAAA + GGPAVLHPWRRAGGRVRGASPPQGPQTARGFP-LPSRWSSSPIPGCISI　111 – 165
LOC339524	CPGAAAAGGPAVLHPWRRAGGRVRGASPPQGPQTARGFPL-PSRWSSSPIPGCISI　111 – 165

3　讨论

心肌损伤早期标志物普遍具有敏感性高而特异性差的特点[6],寻求理想的血生物标记来诊断心肌缺血损伤一直是众多学者关注的焦点[7]。但一般都是采用血液作为分析样品,由于血液中富含白蛋白、球蛋白等大量的高丰度蛋白,从而很难把低丰度的靶蛋白分离、筛选出来。Koomen 等[8]通过大鼠离体心脏灌注回流液中筛选心肌损伤生物标记的研究,为人心肌缺血特异生物标记筛选提供了新的思路。在离体心脏灌注过程中,尽管通过心脏停跳和低温的方法来降低心肌氧耗,但由于是无氧灌注,此时心肌仍是氧耗大于氧供,因而存在缺血损伤。由于缺血时间短,心肌这种缺血损伤较轻,主要表现为心肌顿抑等可逆性损伤[9],若有细胞死亡也是以凋亡的形式出现[10]。故心肌就不会释放出 cTn,但可能释放一些细胞膜成分或与心肌代谢有关的生物标记。理论上考虑单纯用晶体停跳液灌注离体心脏,如果在收集液中检测到蛋白,应该是心肌细胞释放的或者说与心肌细胞活动有关,由此我们选用 3 例脑死亡捐献者的心脏,进行离体灌注的科学研究,以期在心肌缺血早期标记物筛选方面有所突破。

我们通过 IPI 数据库索引获得 176 个高可信蛋白,经过分析发现有几个特点:①文献[6]报道的心肌损伤标志物都有出现,如肌红蛋白、乳酸脱氢酶、肌酸激酶、碳酸酐酶、心型脂肪酸结合蛋白、天冬氨酸氨基转移酶;②高可信蛋白中没有发现 cTn,说明离体灌注一个小时时间内没有出现心肌坏死,从而确保心肌早期缺血的实验过程;③高可信蛋白中出现了大量补体

复合物，C3、C5、C6、C9以及补体复合物C4A、CFB、CFH、CFI，既往研究[11]表明动脉粥样硬化的斑块中可检测到补体的终末复合产物C5b-9和补体C3，由此考虑可能是积聚动脉粥样硬化斑块中的补体大量释放；④未发现如CRP、TNF-α、IL-6、IL-8等细胞因子，但发现了α-1糖蛋白和血浆铜蓝蛋白等急性期反应蛋白，它们都与CRP的炎症反应显著相关[12]，由此提示心肌缺血早期损伤中炎症因子可能继发于急性期反应蛋白后升高；⑤本研究检测到的肌动蛋白、纤维连接蛋白、铜蓝蛋白、补体C6与赵慧辉等[13]应用高解析离子淌度质谱与纳升级超高效液相色谱技术（LC-MSE）寻找冠心病不稳定心绞痛气虚血瘀证的生物标志物报道一致。

通过GO注释，我们初步分析了这些高可信蛋白的生理学过程和功能情况。从图3可以看出，87个蛋白参与了细胞过程，包括线粒体、细胞骨架、细胞器等组织；74个蛋白参与了生物学调节，包括生物和代谢过程的调节以及基因表达调节；71个蛋白参与代谢过程，包括分解代谢过程和生物合成代谢过程，以及蛋白修饰过程等；44个参与了对刺激的反应，包括应激反应、免疫应答等；34个参与了定位确立，包括离子转运和蛋白质转运等；31个蛋白参与了发育过程，包括细胞分化和细胞发育过程等；其他的包括生物学黏附、多细胞生物过程等。在功能方面，98个具有结合功能，47个具有催化活性，20个具有酶调节活性，其他功能有结构分子活性、转运活性以及转录活性及抗氧化活性（图4）。通过EBI蛋白数据库搜索，106 $\times 10^3$未知蛋白序列长度为1703AA，序列同源性属于unC-13家族，通过BLAST比对，与Protein unC-13同源性达到100%，该蛋白质家族的功能信息显示是一种出胞作用的蛋白，在泡囊成熟中作为二酰甘油第二信使通路靶点胞吐过程，由此推测106 $\times 10^3$未知蛋白是一种出胞作用的蛋白。29 $\times 10^3$未知蛋白序列长度276AA，通过BLAST比对，与LOC339524同源性达到99%，搜索发现该蛋白性质不明确，是一个没有特征性蛋白，2008年1月第1次报道（http://www.ebi.ac.uk/），进一步局部对比发现在该序列117位置缺如（表1）。

“鸟枪法”（Shotgun）蛋白质组学是将蛋白质混合物先进行酶解，然后通过鉴定酶解后的肽段来鉴定蛋白质的一种“从下至上”的蛋白质组学研究策略。毛细管纳升液相色谱与串联质谱联用是“鸟枪法”蛋白质组学的技术核心[14]，HPLC通过毛细管液相色谱对微量蛋白质酶解样品能进行高效分离，不受样品分子量和极性的影响，摆脱了传统的双向电泳凝胶分离技术的局限和不足，从而极大地提高了质谱对复杂样品进行蛋白质鉴定分析的能力[15]。在本研究中我们采用Shotgun的蛋白质组学研究策略，通过亲和层析法去除样品中的高丰度蛋白，利用HPLC-Chip-MS/MS质谱鉴定新技术结合生物信息学（Spectrum mill + Gene Ontology + EBI）分析技术对人离体心脏心肌缺血早期进行了蛋白组学的初步研究，鉴定出了176个高可信蛋白，为进一步研究心肌缺血损伤早期生物学标记物打下了坚实的基础，发现的2个未知蛋白通过BLAST比对，查找匹配的氨基酸序列，通过同源蛋白质家族查找进一步获取了2个蛋白的功能信息，但仍需进一步开展临床研究以证实和明确它们在心肌早期缺血损伤中的作用机制。

参考文献：

[1] Vasan R S. Biomarkers of cardiovascular disease：molecular basis and practical considerations[J]. Circulation, 2006, 113(19)：2335－2362.

[2] 过湘钗. 心脏移植中供心切取配合及保护方法[J]. 江西医药, 2007, 42(2)：181－182.

[3] 牛海涛，董胜国，孙光，等. 纯化浅表膀胱肿瘤蛋白质表达谱构建及尿液生物标记发现[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2009, 1(2)：94－97.

[4] 甘成军，谭江琳，胡婕，等. Jurkat T细胞质膜蛋白组学研究初探[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(3)：418－421.

[5] Li D, Li J Q, Ouyang S G, *et al*. An integrated strategy for functional analysis in large-scale proteomic research by gene ontology[J]. Prog Biochem Biophys, 2005, 32(11)：1026－1029.

[6] 张志辉，迟路湘. 心肌损伤早期标志物研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(23)：2173－2175.

[7] Lippi G, Montagnana M, Salvagno G L, *et al*. Potential value for new diagnostic markers in the early recognition of acute coronary syndromes[J]. CJEM, 2006, 8(1)：27－31.

[8] Koomen J M, Wilson C R, Guthrie P, *et al*. Proteome analysis of isolated perfused organ effluent as a novel model for protein biomarker discovery[J]. J Proteome Res, 2006, 5(1)：177－182.

[9] Anselmi A, Abbate A, Girola F, *et al*. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery：a review of evidence[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2004, 25(3)：304－311.

[10] Schmitt J P, Schroder J, Schunkert H, *et al*. Role of apoptosis in myocardial stunning after open heart surgery[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 73(4)：1229－1235.

[11] Cianflone K, Xia Z, Chen L Y. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1609(2)：127－143.

[12] Brunetti N D, Correale M, Pellegrino P L, *et al*. Acute phase proteins in patients with acute coronary syndrome：Correlations with diagnosis, clinical features, and angiographic findings[J]. Eur J Intern Med, 2007, 18(2)：109－117.

[13] 赵慧辉，杨帆，王伟，等. 无标记定量法研究冠心病不稳定性心绞痛血瘀证的差异蛋白质组[J]. 高等学校化学学报, 2010, 31(2)：285－292.

[14] 谢沙洁，王方军，晏丹，等. 毛细管整体柱在线二维分离系统应用于人体软骨的蛋白质组分析[J]. 色谱, 2010, 28(2)：140－145.

[15] Xu X, Li L, Weber S G. Electrochemical and optical detectors for capillary and chip separations[J]. Trends Analyt Chem, 2007, 26(1)：68－79.

（收稿：2010-09-24 修回：2010-10-22）

（编辑 王 红）