文章编号:1000-5404(2011)04-0345-04

论著

双向电泳结合 MDLC-MS/MS 法分析阿替洛尔对映异构体作用后的血管平滑肌细胞差异表达蛋白

邱 峰[1],郑姣妮[2],邱宗荫[1] (重庆 400016,重庆医科大学附属第一医院药剂科[1];400014 重庆,重庆市第四人民医院药剂科[2])

【摘要】 **目的** 以双向电泳结合多维色谱串联质谱策略,分析阿替洛尔对映异构体[(R)/(S)-ATN]作用于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)后的差异表达蛋白质。**方法** 以(R)/(S)-ATN 分别作用于 VSMCs,提取总蛋白质,双向电泳分离差异表达蛋白点,二维纳流液相色谱芯片(HPLC-CHIP,包含一支纳升级 Zorbax 300SB-C18 富集柱和一支纳升级 Zorbax 300SB-C18 分析柱)富集、分离差异表达蛋白酶解后的肽混合物,线性离子阱质谱进行在线分析,Spectrum Mill MS Proteomics Workbench 自动分析 MS 和 MS/MS 数据,通过 UniProt KB / SWISS-PORT 数据库进行搜索。**结果** 经比较、筛选,(S)-ATN 干预 VSMCs 后的蛋白质组中有 6 个蛋白质点表达上调,分别是 CrK 相关底物蛋白、接头蛋白-3 复合物 b-1 亚基、未定性蛋白 C3orf19、线粒体苹果酸脱氢酶前体 1、磷酸甘油醛脱氢酶、内皮细胞清道夫受体 2 前体。**结论** (R)/(S)-ATN 可引起广泛的蛋白质表达改变,除未定性蛋白 C3orf19 以外,其余 5 种蛋白质可能与细胞信号传导与跨膜转运、细胞能量代谢以及介导乙酰化低密度脂蛋白修饰与降解过程有关。

【关键词】 阿替洛尔;对映异构体;血管平滑肌细胞;蛋白质组;多维色谱;串联质谱
【中图法分类号】 R322.12;R394-33;R394.2 【文献标志码】 A

Proteomic analysis on differential protein expressions in VSMCs treated with atenolol enantiomers

Qiu Feng[1], Zheng Jiaoni[2], Qiu Zongyin[1] ([1]Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Pharmacy, Fourth People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** Chiral medicines selectively interact with biological macromolecules through strict chiral recognition and demonstrate different pharmacokinetic characteristics and drug effects. To investigate the differential protein expressions in vascular smooth muscle cells (VSMCs) treated with 2 atenolol enantiomers, (R)-ATN and (S)-ATN. **Methods** Cell proliferation was detected with MTT assay when VSMCs were treated with (R)-ATN or (S)-ATN at 0, 0.15, 1.5, 15, 30, 60, 120, 180 and 240 μmol/L respectively for 4 h. After the VSMCs were treated with 120 μmol/L (R)-ATN or (S)-ATN for 4 h, the cell proteins were extracted. Then, differential protein expression was assessed. The differential expression protein spots from (R)/(S)-ATN treated VSMCs were screened by 2-DE, and then analyzed by on-line two-dimensional nano liquid chromatography (HPLC-CHIP included an enrichment column of Zorbax 300SB-C18 and an analytical column of Zorbax 300SB C18) coupled with linear ion trap mass spectrometry. **Results** There were 6 differential proteins founded between VSMCs treated by (R)/(S)-ATN, including enhancer of filamentation 1, AP-3 complex subunit beta-1, malate dehydrogenase, mitochondrial precursor, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and uncharacterized protein C3orf19 were screened. The former 5 proteins were related to cardiovascular events. **Conclusion** Our results indicates that there are differential protein expressions in VSMCs treated with 2 atenolol enantiomers, (R)-ATN and (S)-ATN, so more attention should be paid chiral drugs.

【**Key words**】 atenolol; enantiomers; vascular smooth muscle cells; proteomics; multidimensional chromatography; tandem mass spectrometry

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2005BB5227). Corresponding author: Qiu Feng, Tel: 86-23-68811793, E-mail: qiufeng.cn@gmail.com

阿替洛尔(atenolol, ATN)为选择性 β_1 受体阻滞剂,临床用于治疗心律失常,也用于治疗青光眼。因 ATN 分子结构中含有一个手性中心,因此,具有(R)-

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2005BB5227)
【通信作者】 邱 峰,电话:(023)68811793,E-mail:qiufeng.cn@gmail.com

ATN 和(S)-ATN 两个对映异构体,目前临床所用 ATN 是含有等量(R)/(S)-ATN 的外消旋体。但是,ATN 的两种对映体不仅在药理作用特点、强度及体内药动学过程等方面都存在显著差异,(S)-ATN 的 β-受体阻断活性是(R)-ATN 的 46 倍[1]。近年来,有关 ATN 在临床治疗中的副作用多有报道,并由此引起了关于 β 受体阻滞剂是否应该从一线药物中撤除的热烈讨论[2-5]。因此,研究 ATN 两种对映异构体的分子作用机制差别,对于深入阐明 β-受体阻断剂的分子作用特点,以及临床合理用药和新药开发有着重要的理论和实际意义。

本研究分别以(R)/(S)-ATN 作用于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs),分别提取总蛋白质,以双向电泳分离得到差异表达蛋白点,经胰蛋白酶酶解,HPLC-CHIP 富集、分离酶解后的肽混合物,以线性离子阱质谱在线鉴定差异表达蛋白质,旨在对 ATN 对映异构体的作用机制有更深入的了解。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

超净工作台,细胞培养箱(德国 Heraeus 公司);Protean IEF cell 型等电聚焦仪、Protean Ⅱ XI cell 型垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);Agilent 二维纳流液相色谱芯片-离子阱质谱系统(HPLC-CHIP/MS system,美国 Agilent 公司)。

兔主动脉平滑肌细胞(上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所),DMEM 培养基(高糖)(美国 HyClone 公司),Starter Reagent Kit for Spin Cartridges(美国 Agilent 公司),(R)-ATN、(S)-ATN(TCL 级)(美国 Sigma 公司),固相 pH 梯度干胶条(IPG strip pH3-10NL,17 cm),30% 聚丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺(美国 Bio-Rad 公司),细胞全蛋白提取试剂盒(Mammalian Cell Extraction Kit)(BioVision 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白样品的制备

1.2.1.1 VSMCs 培养 VSMCs 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,于 37 ℃、5% CO_2、湿度为 90% 的环境中,培养至细胞对数生长期时,分别用含有(R)-ATN 和(S)-ATN 的培养液培养。

1.2.1.2 MTT 试验 以 MTT 试验确定后续细胞实验中的药物浓度。接种对数生长期的细胞于 96 孔板,用分别含消旋 ATN 0、0.15、1.5、15、30、60、120、180、240 μmol/L 的无血清培养液孵育细胞 4 h,弃去培养液,用含 5 mg/ml MTT 的 PBS 溶液作用 4 h,洗涤后,用 100 μl DMSO 溶解,测量光密度值[D(570)]。

1.2.1.3 细胞总蛋白质提取 分别用含(R)/(S)-ATN(120 μmol/L)的培养液孵育细胞 4 h,用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次,刮取法收集细胞,按试剂盒说明书方法提取细胞总蛋白质,以 Bradford 法进行蛋白质定量,将蛋白质溶液于 -80 ℃保存备用。

1.2.2 双向电泳[6-7] 蛋白质样品 100 μg 于重泡胀液(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、30 mmol/L DTT、0.5% IPG 缓冲液、痕量溴酚蓝)中重悬,被动水化过夜(12 ~ 16 h),进行双向电泳(第一向:以固相 pH 胶条进行 IEF 电泳;第二向:12% SDS-PAGE 电泳)。根据 Bio-Rad 双向电泳实验指南进行,每个样品重复试验 3 次。

银染显色:将凝胶置于固定液中[50% 甲醇,10% 冰醋酸,0.05% 福尔马林,40% 去离子水(de-ionized water,diH_2O)]固定过夜;洗涤 3 次(洗涤液:35% 乙醇,65% 去离子水),敏化 2 min(敏化液:0.2% $Na_2S_2O_3$);diH_2O 洗涤 3 次后,以银染液(0.2% $AgNO_3$,0.076% 甲醛)染色 30 min;diH_2O 洗涤后,于显色液(6% Na_2CO_3,0.05% 甲醛)中充分显色。

用 Image Scanner 扫描凝胶,PDQuest 7.4 图像分析软件进行图解分析,根据 Normalised Volume 值的变化来判断蛋白质斑点表达量的变化,获取斑点的相关信息。

切割差异蛋白点,diH_2O 洗涤,置 0.5 ml 微量离心管,于 -80 ℃ 冻干保存。

1.2.3 HPLC-CHIP/MS 分析 样品以 0.10 ml 尿素(8 mol/L)溶解后室温放置 30 min,依次加入 0.01 ml 二硫苏糖醇(DTT)(10 mmol/L)于 37 ℃还原 60 min,0.02 ml 碘乙酰胺(20 mmol/L)避光烷基化 60 min,0.04 ml 碳酸氢铵(100 mmol/L)升高 pH 值,0.04 ml 胰酶 37 ℃酶解过夜,0.50 ml 高纯甲酸终止反应,-20 ℃冻存,分析前转移至进样瓶。

酶解肽混合物采用 HPLC-CHIP(Agilent 1100 Series HPLC systems)富集、分离,CHIP 包含 1 支 Zorbax 300SB-C18 富集柱(5 mm × 300 μm,5 μm)和 1 支 Zorbax 300SB-C18 分离柱(43 mm × 75 μm,3.5 μm)。取 0.008 ml 样品进样到富集柱,经富集柱等度洗脱、分离柱梯度洗脱后,在线进行 MS 和 MS/MS 分析。富集柱等度洗脱条件:流动相为 0.1% 甲酸-超纯水溶液,流速 4 μl/min;分离柱梯度洗脱条件:流动相 A 为 0.1% 甲酸-超纯水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸-乙腈溶液,起始流动相为 3% B,保持 2 min,17 min 时流动相 B 为 55%,20 min 时 B 为 75%,保持 5 min,流速 0.3 μl/min。Ultra XCT ion trap Mass Spectrometer 以 CHIP cube 作为离子源,毛细管电压 2 000 V,干燥气流速 0.32 L/min,干燥气温度 325 ℃,质量扫描范围 m/z:300 ~ 1 500。

以 Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Rev A.03.03.078) 自动分析 MS 和 MS/MS 数据,搜索 UniProtKB/SWISS-PORT,Homo Sapiens (Human)数据库。数据库搜索参数设置:胰蛋白酶(trypsin),单同位素质量(monoisotopic mass values),母离子质量允差(peptide tol.)±2.5,MS/MS 质量允差(MS/MS tol.)±0.7,carbamidometholation(C)修饰。搜索后自动以下列条件进行有效性验证:蛋白质评分大于 11.0;肽评分大于 6.0;SPI(structure predictability index for protein sequences)大于 60%。

2 结果

2.1 不同浓度 ATN 对 VSMCs 生长的影响

以 MTT 法考察了不同浓度 ATN 对 VSMCs 生长情况的影响,以确定细胞实验中的(R)/(S)-ATN 浓度。ATN 的体内最高血药浓度(C_{max})为 1.5 μmol/L,本研究选用 0.1、1、10、20、40、80、120、160 倍 C_{max} 作为 MTT 实验的浓度点,浓度范围 0.15 ~ 240 μmol/L。

MTT 实验结果表明,以不含 ATN 的培养液为对照,用浓度为 120 μmol/L 的 ATN 作用 4 h 后,对 VSMCs 没有明显的抑制作用。见表 1。

表 1　不同浓度 ATN 作用于 VSMCs 4 h 后的 MTT 实验结果
($n=6, \bar{x} \pm s$)

浓度 (μmol/L)	光密度值[D(570)]	细胞存活分数(%)
0.00	0.736 ± 0.066	100.00 ± 8.64
0.15	0.726 ± 0.115	98.72 ± 14.67
1.50	0.732 ± 0.120	99.54 ± 14.21
15.00	0.736 ± 0.102	100.01 ± 12.08
30.00	0.719 ± 0.103	97.69 ± 13.46
60.00	0.727 ± 0.084	98.86 ± 11.67
120.00	0.718 ± 0.083	96.59 ± 9.52
180.00	0.558 ± 0.068	70.33 ± 8.34
240.00	0.362 ± 0.048	55.12 ± 7.07

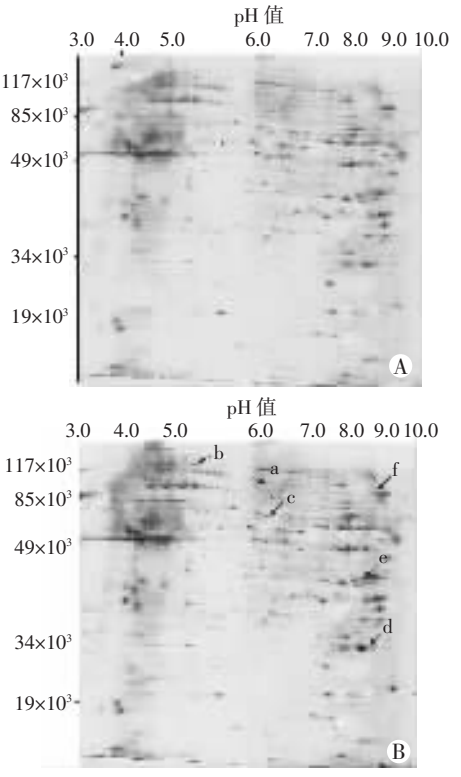
2.2　双向电泳实验

分别以(R)/(S)-ATN 孵育 VSMCs 4 h 后,提取总蛋白质,进行双向凝胶电泳(2-DE)(图 1),以 PDQest 7.4.0 图像分析软件分析凝胶并寻找差异点。

差异蛋白质点的选择:(R)-ATN 组与(S)-ATN 组各选定 1 块“平均胶”作为基准胶。所谓“平均胶”即通过对组内各块凝胶进行匹配分析,蛋白质点显示比较均匀,杂质斑点少,最能体现该组蛋白质点分布状态的 1 块凝胶。以平均胶为基准,选择组间表达在 1.5 倍以上的光密度差异点为差异蛋白点。实验共重复 3 次,每次均采用相同实验条件,结果表明凝胶图像匹配率为 90%,有良好的可重复性。通过比较,共选出 6 个表达差异的点,分别以 a、b、c、d、e、f 表示。

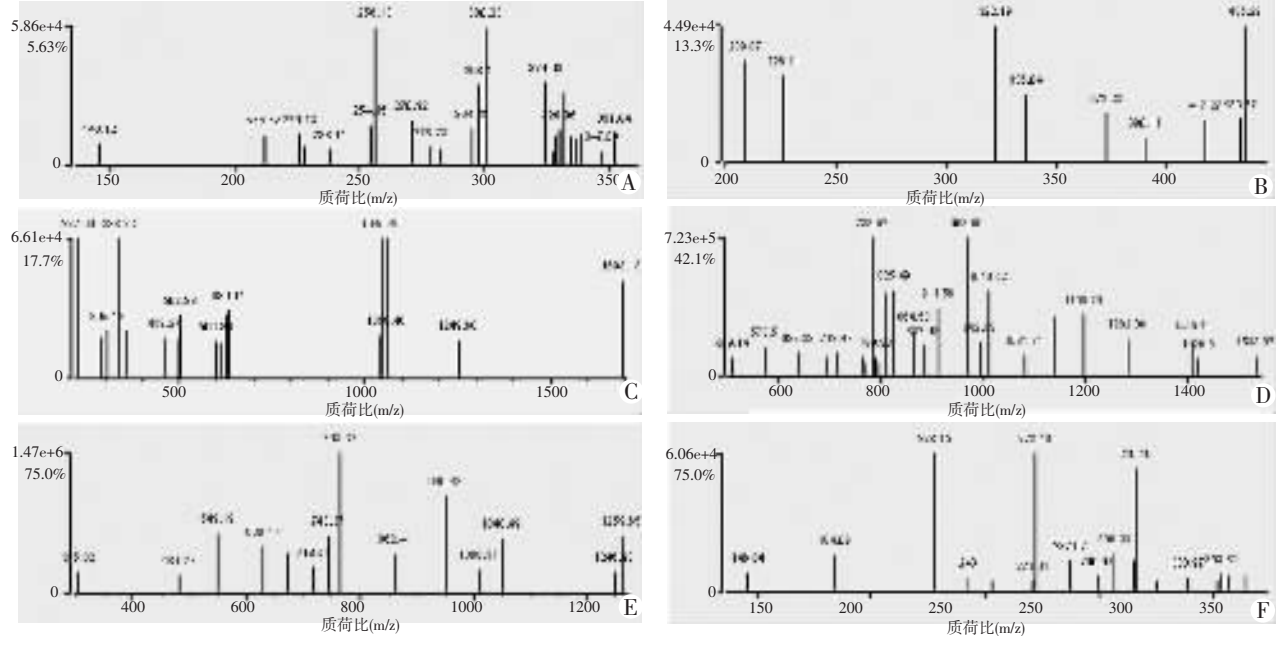
2.3　质谱分析结果

与(R)-ATN 干预 VSMCs 后的蛋白质组比较,(S)-ATN 干预 VSMCs 后的蛋白质组中有 6 个蛋白质点表达上调。采用多维色谱-串联质谱联用技术(multidimensional chromatography-tandem mass spectrometry)对这 6 个蛋白质点进行了进一步分离与分析,所得到的 MS/MS 分析结果见图 2。图中显示:6 个蛋白点的 MS/MS 谱中都含有丰富的 b、y 离子信息,为数据库搜索提供了重要的实验支持。



A:(R)-ATN 干预;B:(S)-ATN 干预

图 1　分别以(R)/(S)-ATN 作用于 VSMCs 后的双向凝胶电泳结果



A:a 表达差异点(CrK 相关底物蛋白);B:b 表达差异点(接头蛋白-3 复合物 β-1 亚基);C:c 表达差异点(未定性蛋白 C3orf19);D:d 表达差异点(线粒体苹果酸脱氢酶前体 1);E:e 表达差异点(磷酸甘油醛脱氢酶);F:f 表达差异点(内皮细胞清道夫受体 2 前体)

图 2　差异表达蛋白质点的 MS/MS 分析结果

通过对这些 MS/MS 数据进行数据库搜索，筛选获得了 6 种可能的差异表达蛋白，即 CrK 相关底物蛋白(Enhancer of filamentation 1)、接头蛋白-3 复合物 β-1 亚基(AP-3 complex subunit beta-1)、未定性蛋白 C3orf19 (Uncharacterized protein C3orf19)、线粒体苹果酸脱氢酶前体 1(Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor)、磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、内皮细胞清道夫受体 2 前体(Scavenger receptor class F member 2 precursor)。

3 讨论

手性药物是指由具有药理活性的手性化合物组成的药物，手性药物的不同对映体在生物学特征上常存在显著的差异，例如，(S)-ATN 对 β_1-受体的阻断程度是(R)-ATN 的 46 倍以上[8-9]。深入了解其生物学特征及其作用机制，对生命活动特征研究有重要意义。

血管平滑肌细胞(VSMCs)是构成血管壁组织结构及维持血管张力的主要细胞成分，在高血压、动脉粥样硬化、再狭窄等心血管疾病发生、发展中的重要细胞病理学基础。

二维纳流液相色谱芯片-离子阱质谱(MDLC-MS/MS)系统适用于极少量样品分离分析技术，其对蛋白质的分析能力显著提高[10]。

本研究分别用(R)/(S)-ATN 作用于 VSMCs，以 2-DE 结合 MDLC-MS/MS 的比较蛋白质组学策略，研究了筛选出 6 种可能的差异表达蛋白质[11-14]：① 与细胞跨膜转运与信号传递有关的蛋白质：CrK 相关底物蛋白、接头蛋白-3 复合物亚单位 b-1 亚基。CrK 相关底物蛋白在基于酪氨酸激酶的细胞信号通路中扮演着重要的协调作用，接头蛋白-3 复合物亚单位 b-1 则在跨膜蛋白靶向溶酶体和与溶酶体有关的细胞器的通路具有重要作用。二者在(S)-ATN 组的高表达可能与(S)-ATN 阻断 β-受体脱敏(即恢复 β-受体通路)和阻断 Ang Ⅱ 信号通路的能力强于(R)-ATN 有关。② 与细胞代谢有关的蛋白质是：线粒体苹果酸脱氢酶前体 1、3-磷酸甘油醛脱氢酶。二者在(S)-ATN 组的高表达提示，VSMCs 分别经(R)/(S)-ATN 作用后，在能量代谢方面可能存在差异。③ 内皮细胞清道夫受体 2 前体是一种巨噬细胞受体，介导乙酰化低密度脂蛋白(Ac-LDL)的修饰与降解过程，而 Ac-LDL 可促进 ACAT-1(胆固醇酰基转移酶-1)基因表达增加，升高 ACAT-1 活性。④ 未定性蛋白 C3orf19，其功能尚不明确。

在上述差异表达蛋白质中，除未定性蛋白 C3orf19 以外，其余 5 种蛋白质可能与心血管功能有关。本研究为进一步以多技术手段，深入了解药物的手性生物学特征及其作用机制提供了新的线索，对促进临床合理用药和手性药物开发具有重要的意义。

参考文献：

[1] Stoschitzky K, Egginger G, Zernig G, *et al*. Stereoselective features of (R)- and (S)-atenolol: clinical pharmacological, pharmacokinetic, and radioligand binding studies [J]. Chirality, 1993, 5(1): 15-19.

[2] Oparil S, Zaman M A, Calhoun D A. Pathogenesis of hypertension [J]. Ann Intern Med, 2003, 139(9): 761-776.

[3] Williams B, Lacy P S, Thom S M, *et al*. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study [J]. Circulation, 2006, 113(9): 1213-1225.

[4] National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE). Clinical guideline 34 [M]. Hypertension: management of hypertension in adults in primary care. London: 2006: 8.

[5] Aursnes I, Osnes J B, Tvete I F, *et al*. Does atenolol differ from other beta-adrenergic blockers? [J]. BMC Clin Pharmacol, 2007, 7: 4.

[6] 赖国旗，邱宗荫，向廷秀，等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导 HeLa 细胞凋亡的差异蛋白质组分析[J]. 第三军医大学学报，2008，30(4)：318-321.

[7] 张渊，代义，邱峰，等. 尿蛋白质组双向电泳的样品制备[J]. 第三军医大学学报，2010，32(13)：1481-1483.

[8] 毛小琴，邱峰，邱宗荫，等. 普萘洛尔对映异构体诱导 HUVEC 细胞的蛋白质表达谱差异 [J]. 中国生物化学与分子生物学报，2008，24(2)：165-171.

[9] 邱峰，毛小琴，陈世知，等. 免疫共沉淀结合微流控芯片技术筛选 GBLP 相互作用蛋白[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2009，25(3)：276-281.

[10] Mohammed S, Kraiczek K, Pinkse M W, *et al*. Chip-Based Enrichment and NanoLC-MS/MS Analysis of Phosphopeptides from Whole Lysates [J]. J Proteome Res, 2008, 7(4): 1565-1571.

[11] Natarajan M, Stewart J E, Golemis E A, *et al*. HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells [J]. Oncogene, 2006, 25(12): 1721-1732.

[12] Dell'Angelica E C. AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(4): 552-559.

[13] Fu Y J, Xiong S, Lovell M A, *et al*. Quantitative proteomic analysis of mitochondria in aging PS-1 transgenic mice [J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29(5): 649-664.

[14] Yego E C, Mohr S. siah-1 Protein is necessary for high glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation and cell death in Muller cells [J]. J Biol Chem, 2010, 285(5): 3181-3190.

(收稿：2010-09-28 修回：2010-10-28)

(编辑 王小宴)