基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1622-04

西维来司钠对脑缺血/再灌注大鼠全脑蛋白质组的影响

胡 月,董 志

(重庆医科大学生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究西维来司钠(Sivelestat sodium hydrate,ONO-5046)对脑缺血/再灌注(Cerebral ischemia/ reperfusion,CI/R)大鼠全脑蛋白质表达的影响。方法:大鼠随机分为假手术组、CI/R 组和 CI/R +ONO-5046 组 (6 mg/kg)。采用四血管阻断法制备 CI/R 模型,缺血 15 min,再灌注 24 h。提取脑组织总蛋白进行双向电泳,对差异蛋白点用 HPLC-Chip-MS/MS 纳流液质联用技术进行序列分析,经 Spectrum Mill 搜索 NCBInr 数据库后鉴定蛋白质。结果:成功获得了分辨率和重复性好的大鼠脑组织蛋白 2-DE 图谱,经质谱鉴定最终获得了巨噬细胞炎性蛋白 1-beta、白细胞弹性蛋白酶 A、α2- 巨球蛋白、谷胱甘肽 S- 转移酶 omega-1、谷氨酸脱氢酶 -1、细胞色素 C 还原酶铁硫亚单位、硫氧还蛋白过氧化物酶 1 等 19 个差异蛋白点相关信息。结论:大鼠脑缺血后脑组织蛋白质表达存在明显差异,西维来司钠可通过调节有关蛋白质的表达,参与大鼠脑缺血神经元保护作用。

【关键词】西维来司钠;脑缺血;蛋白质组学;双向电泳

【中国图书分类法分类号】R322.8;Q51 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-13

Effect of sivelestat sodium hydrate on proteomics in rats with global cerebral ischemia/reperfusion

HU Yue, et al

(*Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of Sivelestat sodium hydrate (ONO-5046) on brain proteomics in rats with cerebral ischemia/reperfusion(CI/R). *Methods*: SD rats were randomly divided into sham operated group, CI/R group and CI/R+ONO-5046 group(6 mg/kg). CI/R was induced by four-vessel occlusion method, with ischemia for 15 min, and reperfusion 24 h. After 2-dimensional electrophoresis and PDQuest for gel image analysis, analysis, the MS/MS of the peptides from the differential proteins digested by tripsin were analyzed by HPLC-Chip-MS/MS and the original data were pre-processed by Spectrum Mill then searched in NCBInr database. *Results*: Well resolved, reproducible 2-DE profiles of rat brain proteome were obtained. Among the differential protein spots, 19 were identified, Such as small inducible cytokine A4, Leukocyte elastase inhibitor A, Alpha-2-macroglobulin, Glutathione S-transferase omega-1, glutamate dehydrogenase-1, Thioredoxin peroxidase 1, Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske and so on. *Conclusion*: The cerebral proteomics expreesion after CI/R has obvious difference, Sivelestat sodium hydrate may promote the survival of injured neurons in rats by virtue of up or down-regulating the expression levels of proteins concerned with cerebral ischemia injury.

【Key words】Sivelestat sodium hydrate; Cerebral ischemia; Proteomics; Two-dimensional electrophoresis

西维来司钠(Sivelestat sodium hydrate,ONO-5046)作为全球首个特异性中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂,在体内外研究表明 ONO-5046 对缺血性神经元损伤均有明显的保护作用[1,2]。本文采用蛋白质组学研究技术—即常用的双向凝胶电泳技术(2-DE)[3]结合质谱,分析假手术、脑缺血再灌注和给予 ONO-5046 后大鼠脑组织差异表达的蛋白,为进一步探讨 ONO-5046 脑保护机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验设备

高速低温离心机(SIGMA 公司),超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),紫外分光光度计(Thermo 公司),PROTEAN IEF Cell 等电聚焦电泳仪、PROTEAN-Ⅱ(R) xi Cell 型垂直电泳槽、GS-800 校准型光密度仪、PDQuest 7.4.0 分析软件 (美国 BIO-RAD 公司)、HPLC-Chip-MS/MS (美国 Agilent 公司),ION TRAP 6330(美国 Agilent 公司)。

作者介绍:胡 月(1984-),女,硕士,研究方向:神经药理。

通讯作者:董 志,男,教授,E-mail:zhidong073@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30572074)。

1.2 实验药物和试剂

ONO-5046，由重庆医药工业研究院有限责任公司提供(纯度≥99.5%，批号：G030620)。pH3～10 非线性(NL)17 cm 固相化 pH 梯度(IPG)预制胶条、20%(w/v)两性电解质(Ampholyte)购自美国 BIO-RAD 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、尿素(Urea)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、乙二氨四乙酸(EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)、硝酸银($AgNO_3$)、低熔点琼脂糖、甘氨酸(Glycine)、DNase、RNase、蛋白酶抑制剂为 BBI 分装。过硫酸胺(AP)、硫脲(Thiourea)、十二烷基硫酸钠(SDS)、碘乙酰胺，矿物油购自生工生物工程(上海)有限公司，其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 溶液配制

1.3.1 细胞裂解液 参照国外的文献报道，略作改进[4]。7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4%CHAPS、65 mmol/L DTT、1 mmol/L EDTA、Tris 40 mmol/L，-20℃保存。

1.3.2 IPG 胶条水化上样缓冲液 7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4%(w/v)CHAPS、65 mmol/L DTT、0.001% 溴酚监、0.2%(w/v) Biolyte。

1.3.3 IPG 胶条平衡缓冲液母液 0.375 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)，6 mol/L 尿素、20%甘油、2%SDS，-20℃保存。胶条平衡缓冲液Ⅰ：使用前在 10 ml 胶条平衡缓冲液母液中加 0.2 g DTT。胶条平衡缓冲液Ⅱ：使用前在 10 ml 胶条平衡缓冲液母液中加 0.25 mg 碘乙酰胺。

1.3.4 SDS-PAGE 电泳缓冲液 25 mmol/L Tris，192 mmol/L Glycine，0 1%(w/v) SDS，pH 8.3。

1.4 方法

1.4.1 动物模型及分组 SD 大鼠(重庆医科大学实验动物中心提供)随机分为假手术组、模型组(采用经典 Pulnelli-Brierley 四血管阻断法[5]建立大鼠脑缺血模型，缺血 15 min，再灌注 24 h)和 ONO-5046 组(于再灌注时经股静脉用微量输液泵以 2 mg/(kg·h)，持续输注 3 h)。

1.4.2 蛋白样品制备与定量 大鼠再灌注 24 h 断头取脑，用预冷超纯水洗去血迹，取左侧脑后 1/2 精密称重，剪碎置玻璃匀浆器中，参考文献[6]，按 1/10 加入细胞裂解液，并加入 50×Cocktail 蛋白酶抑制剂(500 μmol/L AEBSF，150 nmol/L Aprotinin，1 μmol/L E-64，0.5 mmol/L EDTA Na_2 和 1 μmol/L Leupeptin)，4℃充分匀浆；混匀后置液氮中反复冻融 3 次；冰浴下超声裂解 8 min(强度为最大强度的 3/4，裂解 15 s，间隔 20 s)；加入 50 μg/ml RNase，200 μg/ml DNase，4℃放置 30 min；15 000 r，4℃离心 60 min，收集上清夜，分装冻存于 -80℃冰箱。Bradford 法进行蛋白定量[7]。

1.4.3 第一向固相 pH 等电点聚集电泳(IEF) 采用胶内上样法，30 μg 蛋白质样本溶解于 370 μl 水化上样缓冲液，加入 PROTEAN IEF Cell 等电聚焦槽中，IPG 干胶条胶面向下放入聚焦槽，主动水化 1 h 后，表面覆盖矿物油，在 17℃条件下，胶条极限电流为 50 μA/根，按以下程序进行第一向等电聚焦：100 V，5 h；250 V，3 h；500 V，2 h；1 000 V，2 h；10 000 V，6.5 h；总 Vh 为 60 000。

1.4.4 第二向垂直平板十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 第一向聚焦完成后在平衡缓冲液Ⅰ中振荡平衡 15 min，再于平衡缓冲液Ⅱ中振荡平衡 15 min。将胶条移至铺好的 20 cm×20 cm，1.5 mm 厚的 12%SDS 均匀胶上端，酸性端加入中分子量蛋白质标准，0.8%低溶点琼脂糖封胶，电流 10 mA/gel 持续 1 h 换用 30 mA/gel 直至溴酚蓝到达距凝胶下缘 1 cm 处终止电泳。

1.4.5 凝胶染色 银染程序按郭尧君的方法[8]，略作改进进行。固定 2 h(甲醇 150 ml，冰醋酸 30 ml，甲醛 0.15 ml，加超纯水使容积达 300 ml)，敏化 2 min(硫代硫酸钠 1.177 g，甲醛 15 μl，加超纯水使容积达 300 ml)，超纯水漂洗 3×5 min，银染 25 min($AgNO_3$ 0.6 g，甲醛 600 μl，加超纯水使容积达 300 ml)，漂洗 3×1 min，显色 0～8 min(Na_2CO_3 18 g，甲醛 480 μl，加超纯水使容积达 300 ml)，终止 10 min(甲醇 150 ml，冰醋酸 30 ml，加超纯水使容积达 300 ml)。

1.4.6 图像分析 每组样品常规进行 3 次二维电泳，染色后的胶用 GS-800 校准型光密度仪扫描，PDQuest 7.4.0 软件进行图像分析，得到各个点的等电点、分子量、相对含量等信息并用 CORBETT 等的方法计算斑点位置的重复性。以假手术组胶作为参考胶，其他胶与之进行匹配，上调或下调 200%者被定为差异点。

1.4.7 差异蛋白质鉴定 差异表达的蛋白点经切胶、脱色、酶解、萃取得到多肽，真空冷冻干燥后，HPLC-Chip-MS/MS 分析，条件为：①纳流泵：流速，0.3 μl/min，流动相，A 为 99.9%水 +0.1%甲酸；B 为 99.9%的乙腈 +0.1%甲酸；梯度洗脱。②毛细管泵：流速，4 μl/min；流动相，99%水 +1%乙腈。③进样量：8 μl。④质谱采集参数：CapV，1 800；Ion Source Type，ChipESI；Dry Temp(set)，325℃；DryGas(set)，6.00 L/min；HV Capillary，-2050 V；Scan Begin，300 m/z；Scan End，1 600 m/z。质谱数据用 Spectrum Mill MS Proteomics Workbench(Rev A.03.03.083.SR3)自动分析后，搜索 NCBInr 数据库进行鉴定。检索物种选择 RATI'US NORVEGICUS，消化酶选 Trypsin，仪器选择 Agilent ESI *ion trap*，最大允许漏切点设为 2，母离子质量误差为 ± 2.5 D，子离子质量误差为 ± 0.7 D。

2 结 果

2.1 蛋白质定量

Bradford 法测得蛋白标准曲线的线性方程为 y=0.0098x+0.266 6，相关系数 R^2=0.785 7；在 595 nm 处测定各组样品的的吸光度，代入方程求出蛋白浓度分别为空白组：7.30 μg/μl；模型组：7.17 μg/μl；ONO-5046 组：6.95 μg/μl。

2.2 双向凝胶电泳图谱的活动及图谱分析

分别取等量的假手术组、模型组和 ONO-5046 组大鼠全脑蛋白质进行双向电泳，每组样品跑 3 块胶，得到极其相似的蛋白质分布图，用 PDQuest 7.4.0 软件进行图像分析，可分辨出 1 000 个左右的蛋白质点(见图 1)。每组选取 1 块胶作为参考胶进行 3 块胶间的蛋白质匹配分析，平均匹配率分别为 84.4%，81.7%和 82.6%。然后，选取假手术组凝胶作

为参考胶进行匹配，为避免来自实验操作与仪器分析等方面的误差，差异点表达上调或下调 200%，其水平的变化可能有意义。模型组与假手术组比较发现 41 个差异蛋白点，其中新出现 2 个，表达上调 17 个，下调 22 个。ONO-5046 组与模型组比较有 35 个差异蛋白点，其中在 ONO-5046 组表达上调 19 个，下调 16 个。选取有代表性的差异蛋白点局部图(见图 2)。

2.3 质谱鉴定

HPLC-Chip-MS/MS 获得的质谱数据经 Spectrum Mill 处理后，查询 NCBInr 数据库并结合 2-DE凝胶上蛋白点的分子量和等电点，最终获得 19 个差异蛋白的相关信息，见表 1。

3 讨 论

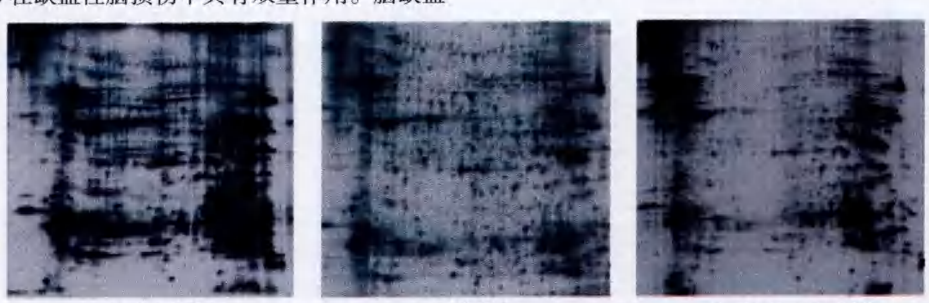
目前研究药物的脑保护作用，主要的检查指标是基于对动物神经症状的改善；脑梗死体积、脑含水量等病理形态学改变的影响；以及对引起和加重脑损伤的相关物质如自由基、Ca^{2+}、炎症介质等表达的影响，从蛋白质组学层面系统的研究药物脑保护作用的文章还很少见。本课题组多年来对整体动物及体外细胞培养的缺血性脑血管疾病中的药效药理、作用机理、作用方式研究的研究表明，ONO-5046 对大鼠脑缺血再灌注损伤有明显的保护作用。本研究是建立在分辨率和重复性良好的正常 SD 大鼠脑组织蛋白质组 2-DE 图像，依托计算机软件和图像分析技术对蛋白质图像进行初步分析并结合质谱鉴定得到 19 个差异蛋白点表达的相关信息。

缺血后急性炎性反应促进了继发性脑损害的进展，模型组中巨噬细胞炎性蛋白 1-beta(Small inducible cytokine A4)、白细胞弹性蛋白酶 A(Leukocyte elastase inhibitor A)及 α2-巨球蛋白(Alpha-2-macroglobulin)表达上调。白细胞弹性蛋白酶 A 能竞争性的抑制嗜中性粒细胞活性，α2- 巨球蛋白能水解蛋白酶，说明炎性反应参与了脑缺血再灌注损伤。同时，研究表明，NO 在缺血性脑损伤中具有双重作用。脑缺血再灌注早期 NO 含量迅速升高，此期内 NO 具有保护作用；随时间推移 NO 再度升高，对神经元产生明显的损害作用。脑缺血后一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase)活性增高致使 NO 生成增多，也可能是脑出血后神经元损伤的重要病理生理机制之一。

脑缺血再灌注损伤的程度及发生机制与能量代谢、脂质过氧化密切相关。脑缺血再灌注损伤后，产生大量的自由基、氧化损伤蛋白、脂质等使细胞坏死，还可间接导致细胞凋亡。本实验观察到，缺血再灌注后脑内谷胱甘肽 S- 转移酶 omega-1(Glutathione S-transferase omega-1)和谷胱甘肽 S-转移酶 Yb-3(Glutathione S-transferase Yb-3)表达下调，提示缺血后脑组织清除自由基的能力下降。谷氨酸脱氢酶 -1(Glutamate dehydrogenase-1)表达下调，它是谷氨酸代谢的关键酶，在神经递质谷氨酸代谢过程中起着举足轻重的作用，活性的降低可导致谷氨酸代谢受阻，引起脑组织氧化损伤。细胞色素 C 还原酶铁硫亚单位(Cytochrome b-c1 complex subunit rieske)是一产生与 ATP 合成配对的电化学潜能的呼吸链的组成成分，Zini R 等[9]研究发现白藜芦醇通过抑制线粒体呼吸链复合体Ⅲ(即细胞色素 C 还原酶)活性，不仅能够降低活性氧的生成，还能清除它们。硫氧还原蛋白过氧化物酶 1(Thioredoxin peroxidase 1)与细胞氧化还原反应的调节有关，除了具有清除自由基的作用外，还可以通过调节细胞内 H_2O_2 浓度参与生长因子和肿瘤坏死因子 -α 的信号转导作用。

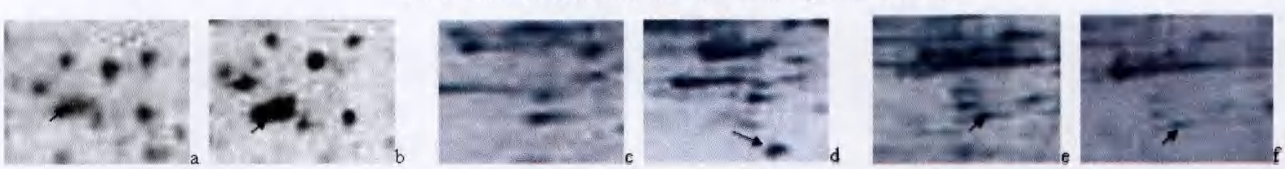
热休克蛋白又称应急蛋白热休克蛋白又称应激蛋白，是一类在结构上高度保守的多肽家族，广泛存在于原核、真核细胞中，参与多肽或蛋白质的折叠、组装或转运及细胞的损伤与修复等多种复杂的功能活动，脑缺血后热休克蛋白 70 表达还与神经元凋亡间有密切的联系[10]。本研究结果显示热休克蛋白 70 在脑缺血组表达量增高，提示缺血后氧化应激反应增强，脑缺血保护机制启动。

本实验采用双向凝胶电泳技术对假手术组、全脑缺血模



A. 假手术组　　B. 模型组　　C. ONO-5046 组

图 1　各组大鼠脑组织蛋白 2D-PAGE(pH 3~10)图谱



a、b. 表示在模型组与空白组比较上调的蛋白点；c、d. 表示在模型组中新出现的蛋白点；e、f. 模型组中表达下调的蛋白

图 2　各组大鼠差异蛋白质点的代表性局部图

表 1 CI/R ONO-5046 作用的差异蛋白点

accession number:	蛋白名称	PI	Mw	CI/R compare with Sham	ONO-5046 compare with CI/R
P48721	Stress-70 protein, mitochondrial	5.97	73848	↑	↓
P31044	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	5.47	20801	↑	-
P35704	Thioredoxin peroxidase 1	5.34	21784	↑	↓
P39069	Adenylate kinase isoenzyme 1	7.66	21584	↓	-
O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6.16	36483	↑	-
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	5.38	70871	↑	↓
P05065	Fructose-bisphosphate aldolase A	8.30	39352	↑	↓
P29476	Nitric oxide synthase, brain	6.68	160559	↑	↓
P04905	Glutathione S-transferase Mu 1	8.27	25914	-	↑
P50230	Small-inducible cytokine A4 Macrophage inflammatory protein 1-beta	5.12	10234	↑	↓
P34067	Proteasome subunit beta type-4	6.45	29197	↓	
Q9Z339	Glutathione S-transferase omega-1	6.25	27669	↓	↑
P10860	Glutamate dehydrogenase 1,mitochondrial	8.05	61416	↓	↑
O08709	Antioxidant protein 2	5.71	24871	↑	↑
P08009	Glutathione S-transferase Yb-3	6.84	25681	↓	↑
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	9.04	29446	↑	↓
Q4G075	Leukocyte elastase inhibitor A	5.92	42727	↑	↓
P22985	Xanthine dehydrogenase/oxidase	6.96	146243	↑	↓
P06238	Alpha-2-macroglobulin	5.90	163785	↑	-

注：↑：表达上调；↓：表达下调；-：表达未见改变

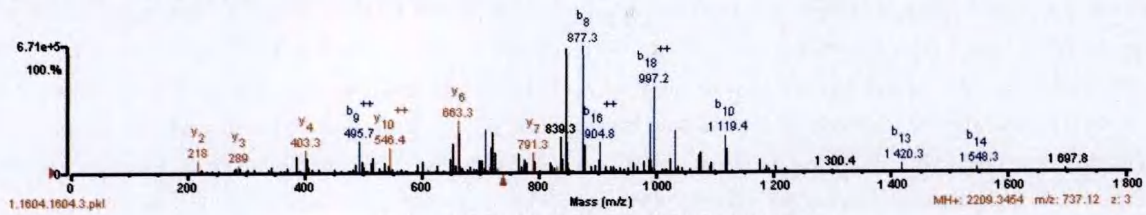


图 3 差异蛋白点的代表性总离子流图

型组和 ONO-5046 组大鼠全脑蛋白质进行分离，获得了高分辨率的电泳图谱，结合肽质量指纹图谱和氨基酸序列分析等手段鉴定获得了 19 个差异蛋白点的相关信息（见图 3）。为 ONO-5046 作用机制的研究提供了新的线索，其脑保护的作用是通过抑制炎症反应，改善能量代谢，减轻脂质过氧化等多环节、多层次、多途径的综合作用。

参 考 文 献

[1] Shimakura A, Kamanaka Y, Ikeda Y, et al. Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion[J]. Brain Research, 2000, 858(1): 55-60.

[2] 杨佳丹，董 志，欧阳净.西维来司钠对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].重庆医科大学学报，2007，32(6)：578-580.

[3] 王大东.蛋白质与蛋白质组学[J].国外医学分子生物学分册，2000，22(3)：129-133.

[4] Chung, Myung-Ah, Lee, et al. Alteration of collapsin response mediator protein-2 expression in focal ischemic rat brain[J]. Neuroreport, 2005, 16(15): 1647-1653.

[5] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the anaesthetized rat[J].Stroke, 1979, 10: 267-272.

[6] 周成林，王继生，李惠芝，等.大鼠脑组织蛋白质双向电泳技术的建立[J].重庆医科大学学报，2006，31(6)：794-797.

[7] Kruger N J.The Bradford method for protein quantitation[J].Methods Mol Biol, 1994, 32(1): 9-15.

[8] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京科学出版社，1999.142-156.

[9] Zincheno V A, Skorniakov.Creatine kinase in the cerebrospinal fluid of patients with stroke in the acute period[J]. Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova, 1989, 89(7): 92-99.

[10] Bivik C, Rosdahl I, Ollinger K. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(3): 537-544.

（责任编辑：冉明会）