基础研究 文章编号:0253-3626(2009)09-1228-07

卡维地洛预处理对大鼠缺血再灌注损伤心肌蛋白质组影响的初步研究

高 照[1],李法琦[2]

(1.海南省人民医院康复中心,海口 570311,2.重庆医科大学附属第一医院老年病科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究卡维地洛对大鼠心肌缺血再灌注(Ischemia-reperfusion, I/R)损伤蛋白质组的影响,探讨其新的心肌保护机制。方法:18 只大鼠随机分为假手术组、I/R 损伤组和卡维地洛预处理组。经结扎冠脉左前降支 30 min 钟再灌注 2 h 建立大鼠心肌 I/R 损伤模型,测定血清丙二醛(Malondiadehyde, MDA)浓度,采用二维电泳技术分离心肌富胞浆蛋白质,应用 PDQuest 软件寻找差异表达的蛋白质点,并通过搜索二维电泳数据库进行蛋白的初步鉴定。结果:与假手术组比较,I/R 损伤后血清 MDA 升高($P<0.05$),有 8 个蛋白点表达下调($P<0.05$),其中 1 个鉴定为超氧化物歧化酶,1 个蛋白点表达缺失。与 I/R 损伤组比较,卡维地洛预处理组大鼠血清 MDA 浓度明显下降($P<0.01$),5 个蛋白点表达上调、4 个蛋白点下调($P<0.05$),3 个蛋白点表达缺失,出现 1 个新表达蛋白点。卡维地洛预处理使 I/R 损伤后下调的超氧化物歧化酶表达正常化,使转甲状腺蛋白前体(Transthyretin precursor,TTRP)表达上调,肌球蛋白重链 1 碎片明显减少,使线粒体 ATP 合成酶 α 链前体和线粒体烯脂酰 -CoA 水化酶前体表达缺失。结论:心肌 I/R 损伤后胞浆蛋白质表达的变化以下调为主,其中超氧化物歧化酶的下调参与了心肌 I/R 损伤的分子机制;卡维地洛不仅通过恢复超氧化物歧化酶的表达,还通过上调 TTRP 表达这一新机制发挥其对心肌线粒体和结构收缩蛋白的保护作用。

【关键词】卡维地洛;心肌缺血再灌注损伤;二维凝胶电泳;蛋白质组学;大鼠

【中文图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-25

Preliminary proteomic study on protective mechanism of carvedilol pre-treatment for ischemia-reperfusion heart injury in rats

GAO Zhao, et al

(*Department of Rehabilitation Center, Hainan Provincial People Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of the protein expression in heart tissue of rats after ischemia-reperfusion (I/R) injury and pre-treatment of carvedilol, and to elucidate the new protective mechanism of carvedilol pre-treatment to I/R heart injury. *Methods*: 18 rats were randomly divided into sham-operation group, I/R injury group and carvedilol pre-treated group. The model of myocardial I/R injury was established by 30min ligation of the left anterior descending branch of the coronary artery and 2h reperfusion. Serum malondiadehyde (MDA) was determined, and the cytosolic fraction of myocardial tissue homogenate was separated applying two-dimensional gel electrophoresis technique. Differentially expressed protein spots were figured out with PDQuest software, while preliminary protein-identification was carried out by means of the two-dimensional gel electrophoresis database on the web. *Results*: Compared with the sham-operation group, after I/R injury, serum MDA was increased($P<0.05$), and 8 protein spots were differentially expressed with all of them down-regulated($P<0.05$), one of which was identified as Cu/Zn superoxide dismutase , while 1 protein spot was totally absent. Compared with the I/R injury group, serum MDA was significantly decreased($P<0.01$), 5 protein spots were up-regulated with 4 protein spots down-regulated($P<0.05$), while 3 protein spots were absent and 1 new protein spot appeared in the carvedilol pre-treated group. Pre-treatment of carvedilol enabled the expression of Cu/Zn superoxide dismutase normalized, transthyretin precursor (TTRP) up-regulated, myosin heavy chain 1 fragment down-regulated significantly, while the expression of ATP synthase α chain mito.precursor and Enoyl-CoA hydratase mito.precursor missed. *Conclusion*: The main characteristics of the cytosolic protein change after I/R injury is down-regulation. Among them the down-regulation of Cu/Zn superoxide dismutase is one of the molecular mechanisms inducing I/R injury. Carvedilol exerts its protection of mitochondrion, structural and contractile proteins, through not only recovering the expression of Cu/Zn superoxide dismutase but also up-regulating the TTRP expression.

【Key words】Carvedilol; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Two dimensional gel electrophoresis; Proteomics; Rat

作者介绍:高 照(1979-),女,硕士,研究方向:老年心血管疾病基础与临床研究。

通讯作者:李法琦,男,教授,E-mail:faqili_2006@yahoo.com.cn。

缺血再灌注(Ischemia-reperfusion,I/R)损伤发病机理有多种学说,包括氧自由基、钙超载、能量代谢障碍、炎性反应等[1],但至今尚未完全阐明。卡维地洛作为兼有 α1 受体阻滞和抗氧化作用的非选择性 β 受体阻滞剂已广泛用于高血压病、冠心病和心力衰竭的临床治疗,在 I/R 损伤中的心肌保护作用也已有相关实验研究报道[2-6],但卡维地洛对 I/R 损伤心肌蛋白质组学的研究报道甚少。蛋白质组学技术,可以对细胞内各种蛋白的变化进行高通量的、没有意向性的筛查分析,从中可发现更多可揭示疾病发生或药物作用机制的新线索,克服了传统研究方法低通量、主观假设再验证的局限性。在心肌细胞中,肌纤蛋白占细胞总蛋白的 50%以上,会干扰低丰度的胞浆蛋白的充分聚焦与检测,因此分别对富肌纤蛋白和胞浆蛋白的亚蛋白质组分析,能够从一个心肌样本中获得更多的蛋白质信息[7]。本研究建立大鼠心肌 I/R 损伤模型,应用蛋白质组学二维凝胶电泳(Two-dimensional gel electrophoresis,2-DE)分离技术,观察卡维地洛对在体大鼠 I/R 损伤心肌胞浆蛋白质表达谱的影响,探讨其心肌保护作用的新机制或新靶点。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组

18 只健康成年雄性 SD 大鼠,体重 200 ~ 300 g,随机分为假手术组、I/R 损伤组、卡维地洛预处理组。20% 乌拉坦(0.5 ml/100 g)腹腔麻醉,接电极,记录Ⅱ导联心电图,气管插管,接小动物呼吸机,胸骨左缘开胸,于左冠状动脉前降支中 1/3 段穿线(3/8 针,6/0 眼科无创缝合线),放一根折叠的双线作为松结时的拉线,平稳 10 min 后结扎,观察心室壁颜色变暗,心电图 QRS 波群高尖呈单峰状,即为结扎成功,30 min 后松结,再灌注 2 h。术毕,直接右室取血后,取左室游离壁结扎点以下心肌组织超低温保存。假手术组穿线,不结扎。卡维地洛预处理组术前连续 7 d 卡维地洛(北京巨能制药有限责任公司,20030301)5 mg/(kg·d)灌胃,同期假手术组和 I/R 损伤组给予等容量生理盐水。

1.2 血清 MDA 的测定

采用硫代巴比妥酸比色法,按血清丙二醛(Malondiadehyde,MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书操作。

1.3 心肌胞浆蛋白 2-DE 图谱的制备

参考国外每组做 2 ~ 5 只动物且对同一样本很少做平行胶设计的报道[7,8],我们每组做 3 只大鼠、3 张图谱。

1.3.1 样品处理(富胞浆蛋白组分的提取)[9] 心肌组织称重剪碎后转入装有 1∶5(w/v)的裂解液(含 protease inhibitor cocktail、2 mmol/L $EDTANa_2$、20 mmol/L Tris)4℃预冷的匀浆管中,上下旋转研磨 20 次匀浆,4℃ 16 000 g × 5 min 离心,取上清液超低温保存。

1.3.2 二维凝胶电泳 取样品蛋白 15 μl(约 150 μg,各样品的蛋白提取浓度为 10.35 ± 0.63 μg/μl)与水化上样缓冲液(8 mol/L 尿素、2.5 mol/L 硫脲、4% CHAPS、2 mmol/L $EDTANa_2$、100 mmol/L 二硫苏糖醇、0.5%两性电解质 ampholyte pH 3 ~ 10)450 μl 充分混匀,与固相 pH 梯度胶条(17 cm pH 3 ~ 10)共置于等电聚焦(IEF,isoelectric focusing)电泳仪(Bio-Rad 公司 Protean IEF cell) 聚焦槽中水化 13 h 后, 等电聚焦 65 kVh(25 Vh/100 V、125 Vh/500 V、250 Vh/1000 V、65000 Vh/8000 V)。等电聚焦后的胶条先后置于平衡缓冲液Ⅰ(含二硫苏糖醇 100 mg)10 ml 和平衡缓冲液Ⅱ(含碘乙酰胺 250 mg)10 ml 中振荡 15 min 平衡。将平衡后的胶条移至 12.5% SDS 胶上,在其一侧用电极纸上 SDS marker 10 μl,垂直平板电泳仪(Bio-Rad 公司 Protean Ⅱ xi Cell)按每块胶 10 mA 电泳 30 min 后,再以每块胶 30 mA 恒流电泳 8.5 h。随后参照 Shevchenko[10]的方法进行银染色。

1.3.3 图像扫描及分析鉴定 用 GS-800 (Bio-Rad 公司)扫描仪,在 400dpi(63.5 μm)的分辨率下,对银染后的 2-DE 胶扫描。用 PDQuest 7.3.1 软件对蛋白点进行定性和定量分析。通过蛋白点检测,高斯拟合,选择一张有代表性的高斯图作为标准,其它图与之匹配,从而构建一个匹配组(Match set)和一张 Master 胶。蛋白点均经归一化处理(Normalization),将每个点的量表示为体积百分含量,即一个蛋白点的量占该胶内总有效点总量的百分含量,以消除各胶间因各种非蛋白表达差异引起的误差。通过对比网上 RAT HEART-2DEPAGE 数据库(http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/RAT-HEART/2d/)[11], 参照 SDS-PAGE marker,确定 7 个蛋白点作为标准蛋白(①Albumin,②ATP synthase beta subunit,③Actin,④Tropomyosin,⑤Myosin light chain-1,⑥Myoglobin,⑦Fatty acid binding protein),以其分子量(Mr)/ 等电点(pI)作为标准(Mr 12.6 ~ 68.7 kD,pI 4.6 ~ 8.8), 确定胶中其它蛋白点的 Mr/pI(软件对标准蛋白等电点范围以外的蛋白点不予计算 pI 值)。软件自动计算各胶间蛋白点量的相关系数,可反映 2-DE 胶量的重复性。从所有胶完全匹配的 278 个点中随机抽取 50 个点,计算每个点在 9 张胶中位置坐标的变异(用标准差表示),再对各点的变异进行总体分析,可反映 2-DE 胶位置的重复性。将差异表达蛋白点与数据库中已鉴定蛋白点的 Mr/pI 值进行比对进行初步的定性鉴定(pI 误差为 ± 0.2,Mr 误差为 ± 1 kD),为进一步进行质谱或针对性 Western blotting 鉴定确认提供基础。

1.4 统计学分析

MDA 测定采用 SAS 8.01 统计软件,两两组间比较采用 ANOVA 分析,蛋白点的定量差异分析由 PDQuest 7.3.1 软件内置的 Student's t-test 统计功能完成,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

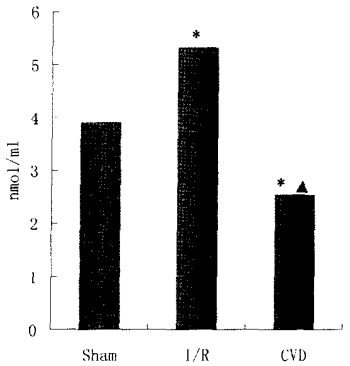
2.1 卡维地洛对心肌 I/R 损伤大鼠血清 MDA 的影响

与假手术组比较,I/R 损伤组大鼠血清 MDA 浓

度明显升高($P<0.05$),卡维地洛预处理组则明显减少($P<0.05$);与 I/R 损伤组比较,卡维地洛预处理组大鼠血清 MDA 减少更明显($P<0.01$);与假手术组比较,卡维地洛组的血清丙二醛也有明显减少($P<0.05$)。见图 1。

2.2 卡维地洛对在体大鼠 I/R 损伤心肌胞浆蛋白质表达谱的影响

平均每张胶上有 453±66 个点与 Master 胶匹配(共 589 个有效点),假手术组 459±48 个、I/R 损伤组 433±97 个、卡维地洛预处理组 465±70 个,其中在所有胶完全匹配的点有 278 个,Sham 组内完全匹配 365 点,I/R 组 326 点,CVD 组 392 点,平均匹配



* 与 Sham 组比较,$P<0.05$; ▲与 I/R 组比较,$P<0.01$

Sham 为假手术组;I/R 为 I/R 损伤组;CVD 为卡维地洛预处理组

图 1 I/R 及卡维地洛预处理对血清 MDA 的影响($n=6$)

率为 76%,各组代表图和 Master 胶见图 2。各组间蛋白点的平均相关系数为 0.81±0.02,各胶间的平均相关系数为 0.74±0.06。各胶间蛋白点的等电聚焦(IEF,isoelectric focusing)方向偏差(1.30±0.15) mm,SDS-PAGE 方向偏差 1.21±0.31 mm。

(1)组间蛋白点的定量差异表达分析:与假手术组比较,I/R 损伤后,有 8 个蛋白点表达下调;与 I/R 损伤组比较,卡维地洛预处理后,有 5 个蛋白点表达上调,4 个蛋白点表达下调。差异表达点的编号、Mr/pI 值、蛋白点的量(体积百分含量)、组间的变化倍数(x-fold)和 P 值见表 1。与假手术组比较:卡维地洛预处理组有 20 个蛋白点发生了量的变化,8 个蛋白点发生了下调,12 个蛋白点上调(其中有SSP4004 TTRP),具体数据未列出($P<0.05$)。

(2)组间蛋白点的差异表达分析:与假手术组比较,有 1 个蛋白点 I/R 损伤后表达缺失;与 I/R 损伤组比较,卡维地洛预处理后有 3 个蛋白点表达缺失,但发现 1 个新的蛋白表达点,见表 2。与假手术组比较,5 个蛋白点在卡维地洛预处理组特异表达,7 个蛋白点在假手术组特异表达(其中有 SSP5012、SSP8122,即线粒体 ATP 合成酶 α 链的前体和线粒体烯脂酰-CoA 水化酶的前体),具体数据未列出。

(3)上述有明确 Mr/pI 值的 20 个差异表达蛋白点通过与网上 2-DE 数据库比对,可初步鉴定出 5 个蛋白点,它们分别为:①Cu/Zn 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)在 I/R 损伤后明显下调($P<0.05$,x-fold:-1.82),卡维地洛预处理组与 I/R 损伤组相比 SOD 有所上升($P>0.05$,x-fold:1.37),虽无统计学意义,但与假手术组比较亦无统计学差异($P>0.05$,x-fold:-1.22),接近于正常水平。②转甲状腺蛋白前体(Transthyretin precursor,TTRP)在 I/R 损伤后较假手术组即有轻度升高($P>0.05$,x-fold:1.45),卡维地洛预处理后进一步升高 3.67 倍($P<0.05$,x-fold:3.67)。③肌球蛋白重链 1(myosin heavy chain1,MHC1)碎片在卡维地洛预处理后明显减少($P<0.05$,x-fold:-1.45)。④线粒体 ATP 合成酶 α 链的前体(ATP synthaseαchain,mito.precursor)和线粒体烯脂酰-CoA 水化酶的前体(Enoyl-CoA hydratase,mito.precursor)在卡维地洛预处理后表达缺失。结果见表 1、表 3、表 4、图 3、图 4。MHC1 碎片在 3 组中都有表达,但仅 I/R 损伤组与卡维地洛预处理组间差异有统计学意义($P<0.05$),卡维地洛预处理后该点表达下调。线粒体 ATP 合成酶 α 链的前体、线粒体烯脂酰-CoA 水化酶的前体在卡维地洛预处理后均缺失,在 I/R 损伤组与假手术组间的表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

3 讨 论

IPG 胶条的应用及商品化较大程度提高了凝胶电泳的重复性。就同一样本平行胶的高重复性已在多项研究中得到验证,如 Wu 等[12]对支气管上皮组织的 2-DE 分析示蛋白点的平均匹配率为 89.3%,IEF 方向位置偏差为(0.865±0.247) mm,SDS-PAGE 方向偏差(0.971±0.104) mm;Wang 等[13]对肝癌患者的血清 2-DE 重复性分析示蛋白点的平均匹配率为 70.2%,IEF 方向位置偏差为(1.02±0.22) mm,SDS-PAGE 方向偏差(0.97±0.14) mm;Terry 等[14]实验的匹配率为 92%,相关系数为 0.82。基于 IPG 胶条的稳定性和高重复性,近年来多项比较蛋白质组学实验设计中均未再单独进行平行胶的设计验证。De Celle[15]各组小鼠心肌样本间的平均相关系数分别为 0.81、0.83。本研究的重复性分析示各胶间蛋白点的

表 1 组间蛋白点的定量差异表达分析

(a) Sham 组 -I/R 组

编号	pI	Mr(kD)	Sham 组的蛋白定量	I/R 组的蛋白定量	变化比值	变化倍数 x-fold▲	P 值
3001	5.4	21.3	0.592 3 ± 0.073 0	0.367 7 ± 0.085 6	0.62	-1.61	0.025 9
3011	5.4	13.0	0.195 9 ± 0.102 7	0.010 0 ± 0.001 7	0.05	-19.59	0.035 0
3602	5.4	73.1	0.639 9 ± 0.165 4	0.358 7 ± 0.027 6	0.56	-1.78	0.043 9
4001*	6.1	16.2	0.695 1 ± 0.136 4	0.381 0 ± 0.100 4	0.55	-1.82	0.032 5
4414	6.3	48.1	1.223 4 ± 0.125 9	0.583 8 ± 0.147 7	0.48	-2.10	0.004 7
4611	6.3	69.1	0.251 8 ± 0.006 2	0.135 9 ± 0.029 6	0.54	-1.85	0.002 7
6004	7.3	17.3	0.518 1 ± 0.095 7	0.302 7 ± 0.081 3	0.58	-1.71	0.041 1
7017	7.4	16.1	0.022 9 ± 0.012 5	0.000 5 ± 0.000 6	0.02	-45.8	0.036 4

(b) I/R 组 -CVD 组

编号	pI	Mr(kD)	I/R 组的蛋白定量	CVD 组的蛋白定量	变化比值	变化倍数 x-fold▲	P 值
1508	4.8	59.3	0.275 1 ± 0.012 4	0.161 2 ± 0.040 8	0.59	-1.71	0.009 8
2403	4.9	42.7	0.545 1 ± 0.163 0	0.081 6 ± 0.082 9	0.15	-6.68	0.011 8
4004*	6.1	14.2	0.011 0 ± 0.001 6	0.040 4 ± 0.008 7	3.67	3.67	0.049 2
4308	6.2	41.9	0.328 2 ± 0.040 6	0.484 7 ± 0.064 6	1.48	1.48	0.023 7
4312*	6.5	38.9	0.373 9 ± 0.048 2	0.257 7 ± 0.042 7	0.69	-1.45	0.035 3
5011	6.6	14.4	0.000 8 ± 0.000 5	0.007 7 ± 0.002 9	9.63	9.63	0.016 2
5221	6.7	33.6	0.023 4 ± 0.004 6	0.010 3 ± 0.003 7	0.44	-2.27	0.018 0
6610	7.1	72.1	0.241 6 ± 0.057 8	0.583 0 ± 0.126 3	2.41	2.41	0.013 1
7509	7.6	64.6	0.005 1 ± 0.004 3	0.041 3 ± 0.006 3	8.10	8.10	0.001 2

注：*初步鉴定蛋白点；▲①当变化比值 <1 时，变化倍数＝1/ 比值，表示减少的倍数，用负数表示；②当变化比值 >1 时，变化倍数就是变化比值，表示增多的倍数（Sham 为假手术组，I/R 为 I/R 损伤组，CVD 为卡维地洛预处理组）

表 2 组间蛋白点的定性差异表达分析

Sham 组 -I/R 组				I/R 组 -CVD 组			
编号	pI	Mr/kDa	有表达的组	编号	pI	Mr/kDa	有表达的组
8124	—▲	24.7	Sham 组	5012*	6.8	21.5	I/R 组
				6114	7.2	25.7	I/R 组
				8122*	8.0	29.1	I/R 组
				8124	—▲	24.7	CVD 组

注：*已鉴定蛋白点；▲在标准蛋白 pI4.6~8.8 范围外，不能计算 pI 值（Sham 为假手术组，I/R 为 I/R 损伤组，CVD 为卡维地洛预处理组）

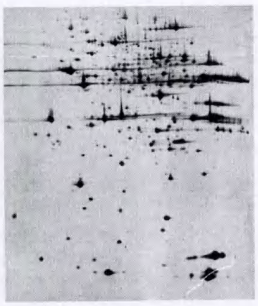
表 3 差异表达蛋白点的 2-DE 数据库搜索鉴定

本地胶			网上数据库参考胶		
编号	pI	Mr(kD)	蛋白名称	pI	Mr(kD)
4001	6.1	16.2	Cu/Zn SOD	6.1	15.2
4004	6.1	14.2	TTRP	6.2	13.4
4312	6.4	38.9	MHC1,fragment	6.2	38.8
5012	6.8	21.5	ATP synthase α chain, mito.precursor	6.7	22.2
8122	8.0	29.1	Enoyl-CoA hydratase, mito.precursor	8.1	28.2

表 4 蛋白点 SSP 4001（SOD）、SSP4004（TTRP）的量变分析

编号	Sham 组	I/R 组	CVD 组	Sham 组 -I/R 组		I/R 组 -CVD 组		Sham 组 -CVD 组	
				P 值	x-fold	P 值	x-fold	P 值	x-fold
4001	0.6399 ± 0.1654	0.3810 ± 0.1004	0.5216 ± 0.1699	0.0325	-1.82	0.2848	1.37	0.2399	-1.23
4004	0.0076 ± 0.0044	0.011 ± 0.0016	0.0404 ± 0.0087	0.5684	1.45	0.0492	3.67	0.0034	5.32

注：Sham 为假手术组，I/R 为 I/R 损伤组，CVD 为卡维地洛预处理组



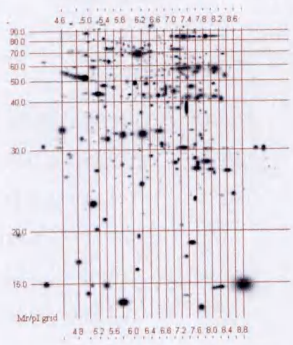
A. 假手术组



B. I/R 损伤组

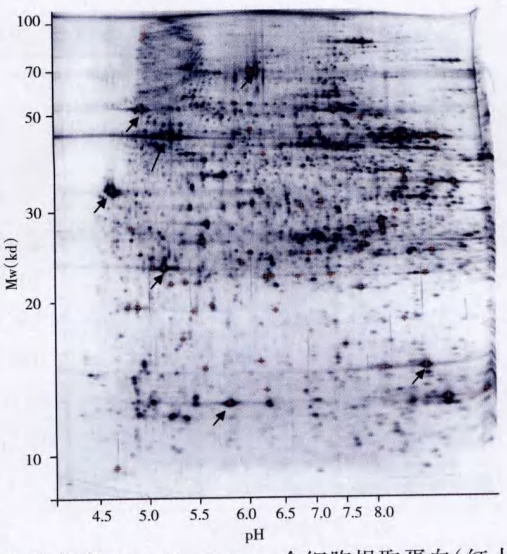


C. 卡维地洛预处理组



D. Master 胶 (pI 在 4.6~8.8 外的点不予计算)

图 2 同题





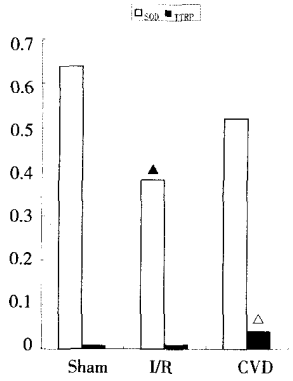
(a)网上参考胶，23 × 30 × 0.1cm，全细胞提取蛋白（红十字为已鉴定蛋白，箭头为 Mr/pI 的标准蛋白）(b)本地胶，20 cm × 22 cm × 0.1 cm，富胞浆蛋白亚组（红点为可鉴定的差异表达蛋白和点 8124，绿色标记为 Mr/pI 的标准蛋白）

图 3 本地胶与网上 2-DE 参考图谱的比较

表 5 肌球蛋白重链 1 碎片（SSP 4312）、线粒体 ATP 合成酶 α 链的前体（SSP 5012）、线粒体烯脂酰-CoA 水化酶的前体（SSP 8122）各组间的比较

SSP	Sham	I/R	CVD	*P* 值		
				Sham-I/R	I/R-CVD	Sham-CVD
4312	0.336 1 ± 0.068 6	0.373 9 ± 0.048 2	0.257 7 ± 0.042 7	0.478 6	0.035 3▲	0.167 8
5012	0.003 ± 0.000 6	0.004 7 ± 0.005 3	(-)	0.692 3	—	—
8122	0.040 7 ± 0.047 8	0.011 6 ± 0.002 5	(-)	0.480 5	—	—

注：Sham 为假手术组，I/R 为 I/R 损伤组，CVD 为卡维地洛预处理组



▲与 Sham 组比较,$P<0.05$;△与 I/R 组比较,$P<0.05$

Sham 为假手术组;I/R 为 I/R 损伤组;CVD 为卡维地洛预处理组

图 4 蛋白点 SSP 4001(SOD)、SSP4004(TTRP)的量变分析

平均匹配率为 76%, IEF 方向偏差(1.30±0.15) mm, SDS-PAGE 方向偏差(1.21±0.31) mm,平均相关系数 0.74,重复性尚满意。

多项研究显示卡维地洛能抑制心脏重塑,减少梗死面积,对抗再灌注所致的恶性心律失常,其抗心肌细胞凋亡作用强于普萘洛尔[2,3,16,17],但其机制尚未完全阐明。本研究从卡维地洛对 I/R 损伤心肌蛋白质组学影响的新角度进行研究,结果显示,I/R 损伤后大鼠血清 MDA 明显升高,且心肌胞浆蛋白亚组有 8 个蛋白点表达差异($P<0.05$),且全为表达下调,其中 1 个鉴定为 Cu/Zn SOD,有 1 个蛋白点在 I/R 损伤后表达缺失,与 I/R 大鼠心肌 SOD 蛋白表达下调和 SOD mRNA 水平也下调的结果一致[18],提示 I/R 损伤主要导致胞浆正常蛋白点的减少。卡维地洛预处理显著降低 MDA,同时使 I/R 损伤后下调的胞浆 Cu/ZnSOD 正常化,提示卡维地洛通过上调 Cu/Zn SOD 蛋白,以强大的抗氧化作用[19,20]保护 I/R 损伤心肌。

I/R 时,能量代谢障碍,细胞内 Ca^{2+}超载,黄嘌呤氧化酶形成增多、次黄嘌呤大量堆积,中性粒细胞呼吸爆发,线粒体受损,儿茶酚胺的氧化增多等过程都会产生大量具有细胞毒性的活性氧,而机体抗氧化酶的活性则降低,氧化与抗氧化失衡[1]。活性氧可直接损伤生物大分子如脂类、蛋白质、核酸,造成肌原纤维结构蛋白 MHC1 受损,局部心肌收缩功能障碍;线粒体膜受损,位于其内膜上的 ATP 合成酶和基质中的烯脂酰-CoA 水化酶(参与脂肪酸的 β 氧化)可被释放、降解。Sawicki 等[21]对离体大鼠心肌 I/R(I 20min/R 30min)的蛋白质组学研究观察到 MLC1 的降解,但未发现 MHC1 的明显变化。Jugdutt 等[22]研究狗心肌梗死再灌注(I 90min/R 120min)的蛋白质组学研究发现线粒体 ATP 合成酶 α 链前体和 MHC1、肌酸激酶 M 链表达下调。本实验在体大鼠心肌 I/R(I 30min/R 120min)未发现 I/R 损伤前后 MHC1 碎片、线粒体 ATP 合成酶 α 链前体和线粒体烯脂酰-CoA 水化酶前体表达的统计学差异,但卡维地洛预处理后,胞浆中的 MHC1 碎片明显减少,线粒体 ATP 合成酶 α 链前体和线粒体烯脂酰-CoA 水化酶前体的表达缺失($P<0.05$),提示了卡维地洛在 I/R 损伤早期保护线粒体酶,避免细胞能量代谢障碍,保护肌纤维结构蛋白,改善局部收缩功能的心肌保护作用,与文献报道一致[23,24],也可能与其特有的抗氧化作用相关。

TTRP 主要由肝脏和脑室脉络丛合成分泌进入血液和脑脊液,转运脂溶性的维生素 A 和甲状腺素 T4,属于甲状腺激素结合蛋白家族,参与甲状腺激素在全身各组织的转运分布。一些严重的急性和(或)慢性全身性疾病、手术或禁食时常有甲状腺功能异常,称为正常甲状腺病态综合征或低 T3 综合征。其主要表现为血清 T3 水平降低并伴有 rT3 升高,这种变化与疾病的严重程度相关,TSH 可正常或低于正常水平,游离 T4 水平在危重患者中也可能降低。如果病情好转,以上改变可恢复正常。近来发现,临床急性心肌梗死后的早期再灌注、心肺旁路术后等心肌 I/R 现象也伴有甲状腺激素异常,血清总 T3 及游离 T3 于缺血后降低,并持续至再灌注后第 6 d,I/R 损伤后的心功能障碍可能与甲状腺激素水平降低有关。实验性治疗研究发现,甲状腺激素能明显改善心肌的舒张和收缩功能,而不增加心肌耗氧量,改善心肌能量代谢,促进 ATP 合成,保护 SOD 的活性,抑制氧自由基形成,保护心肌超微结构的完整[25-27]。本实验显示,TTRP 在心肌 I/R 损伤时即有上升趋势,卡维地洛促进其表达明显增多,提示 TTRP 在心肌中的表达可能是对早期再灌注外周低甲状腺激素水平的代偿性保护反应,并在卡维地洛干预后得到加强。卡维地洛通过上调心肌 TTRP,从低水平的外周甲状腺激素中转运尽可能多的 T4 到心肌组织中转化为 T3,发挥甲状腺激素心肌保护作用的干预方式,可能是其心肌保护作用的又一新机制和新靶点。

众所周知,β 阻滞剂包括普萘洛尔、美托洛尔等能够降低周围组织对甲状腺激素的敏感性,抑制 T4 转化为 T3。而同属 β 阻滞剂的卡维地洛却能在急性再灌注损伤早期提高心肌的 T3 水平,发挥其心肌保护作用的机制考虑与脱碘酶的分型分布有关:外周循环 T3 主要来自 1 型脱碘酶,主要分布于肝、肾和甲状腺,该酶可被丙基硫氧嘧啶、普萘洛尔抑

制；而 2 型脱碘酶表达于中枢神经系统、垂体前叶、棕色脂肪组织、甲状腺、骨骼肌、心脏、血管平滑肌细胞等组织，通常局部组织中的 T3 主要由它催化而来，即使在 T4、T3 血浆浓度不定的情况下，仍起到调节和维持局部组织 T3 浓度稳定的作用，该酶不被丙基硫氧嘧啶、普萘洛尔抑制[28]。我们推测卡维地洛对于外周 T3 的影响与同属 β 阻滞剂的普萘洛尔、美托洛尔等相似，是通过抑制 1 型脱碘酶发挥作用，但不会影响心肌中 2 型脱碘酶的活性。急性应激状态下，外周 T3 降低，游离 T4 一般变化不大，仅在极其危重患者中降低。卡维地洛通过提高心肌局部组织 TTRP 的合成，可以结合相对多的外周 T4 至心肌局部，通过心肌 2 型脱碘酶的催化，提高心肌局部 T3 浓度的含量，从而在急性早期再灌注损伤中发挥其心肌保护作用。

参 考 文 献

[1] 吴其夏，余应年，卢 建.新编病理生理学[M].北京：中国协和医科大学出版社，1999.191-200.

[2] Takusagawa M, Komori S, Matsumura K, et al. The inhibitory effects of carvedilol against arrhythmias induced by coronary reperfusion in anesthetized rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2000, 5(2): 105-112.

[3] Yue T L, Ma X L, Wang X K, et al. Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol[J]. Circ Res, 1998, 82: 166-174.

[4] 范书英，柯元南，王 勇，等.卡维地洛对大鼠急性缺血再灌注损伤的心肌保护作用研究[J].中国药学杂志，2005，40(21)：1633-1636.

[5] 范书英，柯元南，曾玉杰，等.卡维地洛对大鼠心肌间隙连接通讯的影响及作用机制研究[J].中华心血管病杂志，2005，33(12)：1141-1145.

[6] 范书英，柯元南，曾玉杰，等.卡维地洛对大鼠缺血再灌注心肌间隙连接结构影响的研究[J].中日友好医院学报，2005，19(5)：265-268.

[7] Bezstarosti K, Das S, Lamers J M, et al. Differential proteomic profiling to study the mechanism of cardiac pharmacological preconditioning by resveratrol[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(4): 896-907.

[8] Jin X, Xia L, Wang L S, et al. Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats[J]. Proteomics, 2006, 6(6): 1948-1956.

[9] Neverova I, Van Eyk J E. Application of reversed phase high performance liquid chromatography for subproteomic analysis of cardiac muscle [J]. Proteomics, 2002, 2: 22-31.

[10] Shevchenko A, Wilm M, Voran O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels[J]. Anal Chem, 1996, 68(5): 850-858.

[11] Li X P, Pleissner K P, Scheler C, et al. A two-dimensional electrophoresis database of rat heart proteins[J]. Electrophoresis, 1999, 20: 891-897.

[12] Wu X Y, Li C, Xiao Z Q, et al. 2-DE profiling and differential analysis of human bronchial epithelial tissues in different stages of carcinogenesis[J]. Ai Zheng, 2004, 23(5): 522-530 (in Chinese).

[13] Wang Z, Ruan Y B, Guan Y. Analysis of proteomic components of sera from patients with hepatocellular carcinomas by two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flying mass spectrometry[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2003, 32(4): 333-336(in Chinese).

[14] Terry DE, Desiderio DM. Between-gel reproducibility of the human cerebrospinal fluid proteome[J]. Proteomics, 2003, 3(10): 1962-1979.

[15] De Celle T, Vanrobaeys F, Lijnen P, et al. Alterations in mouse cardiac proteome after in vivo myocardial infarction: permanent ischaemia versus ischaemia-reperfusion[J]. Exp Physiol, 2005, 90(4): 593-606.

[16] 张凤如，陈晓文，王 伟，等.卡维地洛治疗慢性心力衰竭的临床疗效及安全性观察[J].中华心血管病杂志，2004，32(9)：821-822.

[17] 曾和松，刘正湘，刘晓春.氯沙坦和卡维地洛对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响[J].临床心血管病杂志，2003，19(6)：367-371

[18] Mehta J L, Chen H, Li D, et al. Modulation of myocardiol SOD and iNOS during ischemia-reperfusion by antisense directed at ACE mRNA [J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(12): 2259-2268.

[19] Abunasra H J, Smolenski R T, Morrison K, et al. Efficacy of adenoviral gene transfer with manganese superoxide dismutase and endothelial nitric oxide synthase in reducing ischemia and reperfusion injury[J]. Euro J Cardiothorac Surg, 2001, 20(1): 153-158.

[20] Dandona P, Karne R, Ghanim H, et al. Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids[J]. Circulation, 2000, 101: 122-124.

[21] Sawicki G, Leon H, Sawicka J, et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2 [J].Circulation, 2005, 112: 544-552.

[22] Jugdutt B I, Sawicki G. AT1 receptor blockade alters metabolic, functional and structural proteins after reperfused myocardial infarction: detection using proteomics[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 263: 179-188.

[23] Habon T, Szabados E, Kesmarky G, et al. The effect of carvedilol on enhanced ADP-ribosylation and red blood cell membrane damage caused by free radicals[J]. Cardiovasc Res, 2001, 52(1): 153-160.

[24] Oliveira P J, Rolo A P, Monteiro P, et al. Impact of carvedilol on the mitochondrial damage induced by hypoxanthine and xantine oxidase--what role in myocardial ischemia and reperfusion[J]? Rev Port Cardiol, 2002, 21(12): 1447-1455.

[25] Pantos C, Mourouzis I, Tzeis S, et al. Dobutamine administration exacerbates postischaemic myocardial dysfunction in isolated rat hearts: an effect reversed by thyroxine pretreatment[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 460(2-3): 155-161.

[26] Pantos C, Malliopoulou V, Varonos D D, et al. Thyroid hormone and phenotypes of cardioprotection[J]. Basic Res Cardiol, 2004, 99(2): 101-120.

[27] 胡莉华，任江华，曹茂银，等.甲状腺素对在体兔心肌缺血再灌注损伤的影响[J].中国老年学杂志，2003，23：103-105.

[28] 蔡振伟，沈永年.脱碘酶及影响其酶活性的因素[J].中国煤炭工业医学杂志，2005，8(3)：209-211.

(责任编辑：冉明会)