

基于 TMT 技术分析益气法干预心衰大鼠的机制

张君¹, 卢健棋², 潘朝铤², 李倩宇¹, 龙杰², 温志浩^{2*}

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530200;

2. 广西中医药大学第一附属医院, 国家中医心血管病临床医学研究中心分中心, 广西南宁 530023)

摘要:目的 利用串联质谱标签(TMT)技术分析益气法对心梗后心衰大鼠心肌线粒体蛋白质差异,探讨益气法对心梗后心衰的干预机制。方法 运用左冠前降支结扎法建立心梗后心衰大鼠模型,分别予黄芪党参、卡托普利及中西药联合干预8周,利用TMT技术对各组大鼠进行线粒体蛋白质组学分析。结果 共鉴定到633个蛋白,分析有重要生物意义的蛋白。结果显示,模型组抗心肌细胞凋亡相关蛋白水平上调,西药组保护心功能相关蛋白上调,细胞凋亡相关蛋白下调。中药组改善心肌能量代谢的蛋白上调,促心肌细胞凋亡蛋白下调,中西医结合组较其余各组可更好地抑制心肌细胞凋亡相关蛋白的表达。结论 益气法联合ACEI类药物,可更好地优化心肌梗死后心衰的心肌能量代谢,减少心肌细胞凋亡。

关键词:TMT技术; 心梗后心衰; 线粒体蛋白质组学

DOI标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2021.11.68

中图分类号:R2-03 文献标识码:A 文章编号:1008-0805(2021)11-2789-05

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)目前已成为严重威胁我国居民健康的疾病之一。《中国心血管健康与疾病报告2019概要》显示我国心血管病患率处于持续上升阶段,据推算心血管病现患人数3.30亿,其中心力衰竭患者人数为890万^[1]。因此,寻找新的预防手段和治疗目标已成为心力衰竭研究的迫切需要。有专家提出,改善心肌能量代谢是未来心衰治疗的核心^[2]。孙锴等^[3]提出线粒体是防治心衰的重要靶点,心衰发展是线粒体功能紊乱的过程,而心肌细胞中的线粒体与心肌能量代谢密切相关。近年来中医药防治心衰得到了广泛的关注,中医学认为慢性心力衰竭属本虚标实之证,心气亏虚为其发病之本^[4]。以心气亏虚一心肌能量代谢为切入点开展中西医结合研究,有可能找到防治心衰的新方法。本研究通过建立心气虚心衰大鼠模型,提取心梗后心衰大鼠的心肌线粒体,应用液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)定量蛋白质组学技术和串联质谱标签(Tandem Mass Tags, TMT)标记,发现心肌线粒体蛋白表达谱的差异,观察能量代谢调控机制的变化。同时运用蛋白质组学的方法,测定益气法对心衰大鼠心肌线粒体蛋白表达谱的影响,从蛋白质层次阐明益气法对心衰能量代谢障碍的干预作用,寻找益气法防治心衰的目标蛋白,进一步阐释心气虚证的实质。以期从心肌能量代谢角度进一步探讨心气虚的证候实质。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 25只SPF级健康SD大鼠雌雄各半,2月龄,体重(210±12)g。由广西医科大学动物实验中心提供,许可证编号:scxk(桂)2014-0002。

1.2 实验药品及制备 将黄芪和党参制成浓缩煎剂(黄芪为3g/mL,党参为1.5g/mL),卡托普利(规格:25mg/片,国药集团汕头金石制药有限公司生产,批号:160906)配置成5mL悬浊液。

1.3 主要实验试剂及仪器 线粒体提取试剂盒(碧云天,

1203021512), DTT(VETEC, V900830-5G), Tris(VETEC, V900483-1KG), 乙腈(ThermoScientific, A996-4), TMT(ThermoScientific, 90068), TCEP(ThermoScientific, T2556), TEAB(ThermoScientific, 90114), 组合式质谱仪(Thermo, LTQ Orbitrap Elite), 纳升级高效液相(Thermo, NanoLC 1000), 高效液相色谱(Waters, HPLC e2695/2998), C₁₈脱盐柱(Phenomenex, Strata X C₁₈)。

2 方法

2.1 动物模型 称取大鼠体重后,以10%的水合氯醛按0.3mL/100g剂量给予腹腔麻醉,待大鼠全身瘫软,将其固定在鼠板上。沿左腋前线至胸骨右缘1cm,胸骨左侧2~3肋间至肋弓区域备皮(约3cm×4cm),安尔碘常规消毒,持续心电图监护。气管切开,连接呼吸机。用指腹探寻心尖搏动最明显处向上约1个肋间,剪断肋骨,撑开肋骨及肌肉皮肤,充分暴露心脏,挑破心包膜,避免损伤肺脏。心脏随心跳向外跃,卡住心脏将底面反转,于左心耳下缘3mm处用6-0带针缝合线结扎左冠状动脉前降支,观察生理记录仪,以心电图出现ST段弓背向上抬高为急性心肌梗死模型的成功标志。层层关胸,并观察大鼠生命体征,清理伤口,消毒外部皮肤,注射青霉素G5万单位,待大鼠逐渐苏醒有自主呼吸后撤去呼吸机,气管切开处不予缝合,将大鼠搁置在烤灯处取暖,编号,等完全苏醒后送回鼠笼。术后禁食不禁水12h后常规饲养。存活动物纳入模型。假手术组穿线但不结扎冠状动脉。左冠状动脉前降支结扎后8周成模。

2.2 分组与给药方案 于造模后第一天开始进行药物干预,大鼠灌胃量为:黄芪3g/(kg·d),党参1.5g/(kg·d),卡托普利10·125mg/(kg·d)。实验共分五组:(1)假手术组:术后生理盐水灌胃;(2)模型组:术后生理盐水灌胃;(3)西药对照组:术后卡托普利灌胃;(4)中药干预组:术后黄芪党参浓缩煎剂灌胃;(5)中西医结合组:术后黄芪党参浓缩煎剂+卡托普利灌胃。

2.3 蛋白提取及浓度测定 于左冠状动脉前降支结扎术后8周取大鼠的左心室心肌并提取线粒体,液氮研磨后12000r/min,4℃离心10min,取上清液。-20℃沉淀2h以上加入100%TCA至终浓度为15%的上清液。丙酮洗涤后风干使残留的丙酮挥发干净,加入适量Resolution Buffer(含8mol/L Urea, 100mmol/L TEAB, pH 8.0)复溶。根据改良型Bradford Kit测定蛋白浓度。

2.4 蛋白酶解及肽段标记 根据质量比1:50加入trypsin,37℃酶解过夜后,按1:100的质量比加入trypsin,37℃二次酶解4h。除盐抽干后,用100mmol/L TEAB复溶肽段,乙腈复溶

收稿日期:2021-05-29; 修订日期:2021-09-22

基金项目:国家自然科学基金地区基金(81660778);

国家自然科学基金青年基金(81403381);

广西中医药适宜技术开发与推广资助项目(GZSY21-17)

作者简介:张君(1996-),女(汉族),广西桂平人,广西中医药大学在读硕士研究生,主要从事心血管疾病的防治工作。

* 通讯作者简介:温志浩(1987-),男(汉族),广西南宁人,广西中医药大学第一附属医院副主任医师,博士学位,主要从事心血管疾病的防治工作。

TMT 试剂并与 100 μ g 肽段合并后室温反应 1h。

2.5 高效液相色谱 (HPLC) 分级及质谱鉴定 通过 C₁₈ 柱经 HPLC 将肽段视蛋白复杂程度预分离成 10 ~ 20 个组分, 各组分经过 nanoLC 分离后采用 Orbitrap Elite (Thermo Scientific) 鉴定。

2.6 数据处理 对 LC - MS/MS 鉴定得到的数据进行数据库搜索, 分析差异蛋白。参数设置如下: 指定胰蛋白酶为裂解酶, 至多允许 2 个胰酶漏切。允许的最大质量误差设置为 20 ppm, 碎片离子为 0.02Da。指定半胱氨酸脲甲基, TMT6 标 (N) 和 TMT6 标 (K) 为固定修饰, 指定甲硫氨酸的氧化为可变修饰。FDR 设置为 <1% 和肽离子得分为 >20 分。对比两组的表达量差异比率 R 值 1.5 倍以上 (即小于 0.7 或大于 1.5), 且统计检验 p - value 值小于 0.05, 视为差异蛋白。

3 结果

3.1 数据处理及生物信息学分析结果

3.1.1 模型组与假手术组大鼠比较 显著差异表达的蛋白有 3 个 (见表 1), 均为高表达蛋白。

表 1 模型组与假手术组之间的差异蛋白

蛋白编号	蛋白描述	模型组 / 假手术组	趋势
A0A0G2K1U3	Protein RGD1307947 OS = Rattus norvegicus GN = RGD1307947 PE = 1 SV = 1 - [A0A0G2K1U3_RAT]	2.1402	上调
Q9JJ74	Receptor activity - modifying protein 1 OS = Rattus norvegicus GN = Ramp1 PE = 2 SV = 1 - [RAMP1_RAT]	2.1951	上调
F1LRZ7	Neurofilament heavy polypeptide OS = Rattus norvegicus GN = Nefh PE = 1 SV = 1 - [F1LRZ7_RAT]	2.4290	上调

3.1.2 西药组与模型组比较 显著差异表达的蛋白有 31 个 (见表 2), 其中高表达的蛋白 3 个, 低表达的蛋白 28 个。

表 2 西药组与模型组之间的差异蛋白

蛋白编号	蛋白描述	西药组 / 假手术组	趋势
A0A0H2UH5	Keratin, type II cytoskeletal 75 OS = Rattus norvegicus GN = Krt75 PE = 1 SV = 1 - [A0A0H2UHH5_RAT]	1.6222	上调
D3ZCF5	Protein Smurf1 OS = Rattus norvegicus GN = Smurf1 PE = 4 SV = 2 - [D3ZCF5_RAT]	1.5257	上调
P48675	Desmin OS = Rattus norvegicus GN = Des PE = 1 SV = 2 - [DESM_RAT]	2.4184	上调
E9PTN6	Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase OS = Rattus norvegicus PE = 3 SV = 1 - [E9PTN6_RAT]	0.6416	下调
P23928	Alpha - crystallin B chain OS = Rattus norvegicus GN = Cryab PE = 1 SV = 1 - [CRYAB_RAT]	0.5785	下调
A0A0G2JWU1	Triosephosphate isomerase OS = Rattus norvegicus GN = LOC500959 PE = 1 SV = 1 - [A0A0G2JWU1_RAT]	0.6542	下调
D3ZME3	Uncharacterized protein OS = Rattus norvegicus PE = 3 SV = 1 - [D3ZME3_RAT]	0.5598	下调
P97541	Heat shock protein beta - 6 OS = Rattus norvegicus GN = Hspb6 PE = 1 SV = 1 - [HSPB6_RAT]	0.6201	下调
Q63210	Guanine nucleotide - binding protein subunit alpha - 12 OS = Rattus norvegicus GN = Gna12 PE = 1 SV = 3 - [GNA12_RAT]	0.3509	下调

续表 2

蛋白编号	蛋白描述	西药组 / 假手术组	趋势
P45592	Cofilin - 1 OS = Rattus norvegicus GN = Cfl1 PE = 1 SV = 3 - [COF1_RAT]	0.6127	下调
A0A0G2K1U3	Protein RGD1307947 OS = Rattus norvegicus GN = RGD1307947 PE = 1 SV = 1 - [A0A0G2K1U3_RAT]	0.2544	下调
P21670	Proteasome subunit alpha type - 4 OS = Rattus norvegicus GN = Psm4 PE = 1 SV = 1 - [PSA4_RAT]	0.5976	下调
Q6P6Q6	Transcription termination factor 3, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Mterf3 PE = 2 SV = 1 - [MTEF3_RAT]	0.4778	下调
F1M021	Protein B4galn3 OS = Rattus norvegicus GN = B4galn3 PE = 4 SV = 2 - [F1M021_RAT]	0.4459	下调
G3V913	Heat shock 27kDa protein 1 OS = Rattus norvegicus GN = Hspb1 PE = 1 SV = 1 - [G3V913_RAT]	0.6148	下调
P35284	Ras - related protein Rab - 12 OS = Rattus norvegicus GN = Rab12 PE = 1 SV = 2 - [RAB12_RAT]	0.4639	下调
Q6P7B4	Protein FAM198B OS = Rattus norvegicus GN = Fam198b PE = 2 SV = 1 - [F198B_RAT]	0.4960	下调
Q9JJ74	Receptor activity - modifying protein 1 OS = Rattus norvegicus GN = Ramp1 PE = 2 SV = 1 - [RAMP1_RAT]	0.2644	下调
F1LRZ7	Neurofilament heavy polypeptide OS = Rattus norvegicus GN = Nefh PE = 1 SV = 1 - [F1LRZ7_RAT]	0.2012	下调
F7EYQ2	Fasciculation and elongation protein zeta - 2 OS = Rattus norvegicus GN = Fez2 PE = 1 SV = 1 - [F7EYQ2_RAT]	0.5207	下调
Q7TP21	Cb1 - 727 OS = Rattus norvegicus GN = Rpa1 PE = 1 SV = 1 - [Q7TP21_RAT]	0.3983	下调
Q9Z2X5	Homer protein homolog 3 OS = Rattus norvegicus GN = Homer3 PE = 1 SV = 2 - [HOME3_RAT]	0.4907	下调
D3ZRP5	Poly [ADP - ribose] polymerase OS = Rattus norvegicus GN = Tnks2 PE = 4 SV = 1 - [D3ZRP5_RAT]	0.5613	下调
Q63486	Ras - related GTP - binding protein A OS = Rattus norvegicus GN = Rraga PE = 1 SV = 1 - [RRAGA_RAT]	0.5197	下调
Q9JKB7	Guanine deaminase OS = Rattus norvegicus GN = Gda PE = 1 SV = 1 - [Q9JKB7_RAT]	0.5652	下调
P83565	39S ribosomal protein L40, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Mrpl40 PE = 1 SV = 2 - [RM40_RAT]	0.5665	下调
Q6SKG1	Acyl - coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Acsm3 PE = 2 SV = 1 - [ACSM3_RAT]	0.5026	下调
A11L1M0	Protein kinase, cAMP - dependent, catalytic, alpha OS = Rattus norvegicus GN = Prkaca PE = 1 SV = 1 - [A11L1M0_RAT]	0.6228	下调
Q5XFX7	Protein Rad23a OS = Rattus norvegicus GN = Rad23a PE = 1 SV = 1 - [Q5XFX7_RAT]	0.5266	下调
F1M620	Protein Csm2 OS = Rattus norvegicus GN = Csm2 PE = 4 SV = 3 - [F1M620_RAT]	0.6098	下调
Q62639	GTP - binding protein Rheb OS = Rattus norvegicus GN = Rheb PE = 1 SV = 1 - [RHEB_RAT]	0.6469	下调

3.1.3 中药组与模型组比较 显著差异表达的蛋白有 42 个(见表 3),其中高表达的蛋白 6 个,低表达的蛋白 36 个。

表 3 中药组与模型组之间的差异蛋白

蛋白编号	蛋白描述	中药组/假手术组	趋势
P21571	ATP synthase - coupling factor 6, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Atp5j PE = 1 SV = 1 - [ATP5J_RAT]	1. 5752	上调
B5DEQ3	Probable Xaa - Pro aminopeptidase 3 OS = Rattus norvegicus GN = Xpnpep3 PE = 1 SV = 1 - [XPP3_RAT]	1. 5451	上调
A0A0H2UH H5	Keratin, type II cytoskeletal 75 OS = Rattus norvegicus GN = Krt75 PE = 1 SV = 1 - [A0A0H2UHH5_RAT]	1. 5639	上调
D3ZCF5	Protein Smurf1 OS = Rattus norvegicus GN = Smurf1 PE = 4 SV = 2 - [D3ZCF5_RAT]	1. 6990	上调
	Protein Tomm7 OS = Rattus norvegicus GN = Tomm7 PE = 1 SV = 1 - [D3ZMR1_RAT]	1. 5396	上调
M0RAE8	Protein Dock10 OS = Rattus norvegicus GN = Dock10 PE = 1 SV = 1 - [M0RAE8_RAT]	1. 7218	上调
Q9JJ74	Receptor activity - modifying protein 1 OS = Rattus norvegicus GN = Ramp1 PE = 2 SV = 1 - [RAMPI_RAT]	0. 1725	下调
F1LRZ7	Neurofilament heavy polypeptide OS = Rattus norvegicus GN = Nefh PE = 1 SV = 1 - [F1LRZ7_RAT]	0. 2029	下调
A0A0G2K1 U3	Protein RGD1307947 OS = Rattus norvegicus GN = RGD1307947 PE = 1 SV = 1 - [A0A0G2K1U3_RAT]	0. 2124	下调
Q63210	Guanine nucleotide - binding protein subunit alpha - 12 OS = Rattus norvegicus GN = Gna12 PE = 1 SV = 3 - [GNA12_RAT]	0. 3105	下调
Q7TP21	Cb1 - 727 OS = Rattus norvegicus GN = Rpa1 PE = 1 SV = 1 - [Q7TP21_RAT]	0. 3620	下调
F1M021	Protein B4galnt3 OS = Rattus norvegicus GN = B4galnt3 PE = 4 SV = 2 - [F1M021_RAT]	0. 4273	下调
D3ZME3	Uncharacterized protein OS = Rattus norvegicus PE = 3 SV = 1 - [D3ZME3_RAT]	0. 4453	下调
Q9Z2X5	Homer protein homolog 3 OS = Rattus norvegicus GN = Homer3 PE = 1 SV = 2 - [HOME3_RAT]	0. 4565	下调
P35284	Ras - related protein Rab - 12 OS = Rattus norvegicus GN = Rab12 PE = 1 SV = 2 - [RAB12_RAT]	0. 4708	下调
Q6P7B4	Protein FAM198B OS = Rattus norvegicus GN = Fam198b PE = 2 SV = 1 - [F198B_RAT]	0. 4725	下调
P45592	Cofilin - 1 OS = Rattus norvegicus GN = Cfl1 PE = 1 SV = 3 - [COF1_RAT]	0. 4858	下调
Q5XFX7	Protein Rad23a OS = Rattus norvegicus GN = Rad23a PE = 1 SV = 1 - [Q5XFX7_RAT]	0. 4945	下调
E9PTN6	Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase OS = Rattus norvegicus PE = 3 SV = 1 - [E9PTN6_RAT]	0. 5127	下调
Q6SKG1	Acyl - coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Acsm3 PE = 2 SV = 1 - [ACSM3_RAT]	0. 5324	下调
Q6P6Q6	Transcription termination factor 3, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Mterf3 PE = 2 SV = 1 - [MTEF3_RAT]	0. 5346	下调
D3ZRP5	Poly [ADP - ribose] polymerase OS = Rattus norvegicus GN = Tnks2 PE = 4 SV = 1 - [D3ZRP5_RAT]	0. 5363	下调

续表 3

蛋白编号	蛋白描述	中药组/假手术组	趋势
P23928	Alpha - crystallin B chain OS = Rattus norvegicus GN = Cryab PE = 1 SV = 1 - [CRYAB_RAT]	0. 5439	下调
G3V913	Heat shock 27kDa protein 1 OS = Rattus norvegicus GN = Hspb1 PE = 1 SV = 1 - [G3V913_RAT]	0. 5547	下调
Q62639	GTP - binding protein Rheb OS = Rattus norvegicus GN = Rheb PE = 1 SV = 1 - [RHEB_RAT]	0. 5548	下调
G3V7B7	DNA - directed RNA polymerase subunit OS = Rattus norvegicus GN = Polr1a PE = 1 SV = 1 - [G3V7B7_RAT]	0. 5576	下调
A1L1M0	Protein kinase, cAMP - dependent, catalytic, alpha OS = Rattus norvegicus GN = Prkaca PE = 1 SV = 1 - [A1L1M0_RAT]	0. 5596	下调
A0A0H2UH Y6	Uncharacterized protein OS = Rattus norvegicus PE = 4 SV = 1 - [A0A0H2UHY6_RAT]	0. 5612	下调
F7EYQ2	Fasciculation and elongation protein zeta - 2 OS = Rattus norvegicus GN = Fez2 PE = 1 SV = 1 - [F7EYQ2_RAT]	0. 5637	下调
Q63486	Ras - related GTP - binding protein A OS = Rattus norvegicus GN = Rraga PE = 1 SV = 1 - [RRAGA_RAT]	0. 5689	下调
Q9EQX9	Ubiquitin - conjugating enzyme E2 N OS = Rattus norvegicus GN = Ube2n PE = 1 SV = 1 - [UBE2N_RAT]	0. 5794	下调
A0A0G2K7 93	Heat shock protein HSP 90 - beta OS = Rattus norvegicus GN = Hsp90ab1 PE = 1 SV = 1 - [A0A0G2K793_RAT]	0. 5795	下调
P97541	Heat shock protein beta - 6 OS = Rattus norvegicus GN = Hspb6 PE = 1 SV = 1 - [HSPB6_RAT]	0. 5797	下调
A0A0G2JW U1	Triosephosphate isomerase OS = Rattus norvegicus GN = LOC500959 PE = 1 SV = 1 - [A0A0G2JWU1_RAT]	0. 5839	下调
P83565	39S ribosomal protein L40, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Mrpl40 PE = 1 SV = 2 - [RM40_RAT]	0. 5917	下调
Q5EEY3	GTP - binding protein G - alpha - i2 splice variant b OS = Rattus norvegicus GN = Gnai2 PE = 1 SV = 1 - [Q5EEY3_RAT]	0. 6270	下调
Q9JKB7	Guanine deaminase OS = Rattus norvegicus GN = Gda PE = 1 SV = 1 - [Q9JKB7_RAT]	0. 6318	下调
P21670	Proteasome subunit alpha type - 4 OS = Rattus norvegicus GN = Psmab4 PE = 1 SV = 1 - [PSA4_RAT]	0. 6439	下调
Q7M0E3	Dextrin OS = Rattus norvegicus GN = Dstn PE = 1 SV = 3 - [DEST_RAT]	0. 6531	下调
Q7TP08	Alpha - methylacyl - CoA racemase OS = Rattus norvegicus GN = Amacr PE = 1 SV = 1 - [Q7TP08_RAT]	0. 6634	下调
Q7TP08	Alpha - methylacyl - CoA racemase OS = Rattus norvegicus GN = Amacr PE = 1 SV = 1 - [Q7TP08_RAT]	0. 6634	下调
D3Z946	Protein Tmem70 OS = Rattus norvegicus GN = Tmem70 PE = 1 SV = 1 - [D3Z946_RAT]	0. 6636	下调
Q5XIB3	[Protein ADP - ribosylarginine] hydrolase - like protein 1 OS = Rattus norvegicus GN = Adprhl1 PE = 2 SV = 1 - [ARHL1_RAT]	0. 6661	下调

3.1.4 中西医结合组与模型组比较 显著差异表达的蛋白有 30 个(见表 4),其中高表达的蛋白 3 个,低表达的蛋白 26 个。

表 4 中西医结合组与模型组之间的差异蛋白

蛋白编号	蛋白描述	中西医结合组/假手术组	趋势
G3V7Y3	ATP synthase subunit delta, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Atp5d PE = 1 SV = 1 - [G3V7Y3_RAT]	1.6970	上调
A0A0H2UH H5	Keratin, type II cytoskeletal 75 OS = Rattus norvegicus GN = Krt75 PE = 1 SV = 1 - [A0A0H2UHH5_RAT]	1.5554	上调
A0A140TA G4	Nephrin OS = Rattus norvegicus GN = Nphs1 PE = 4 SV = 1 - [A0A140TAG4_RAT]	1.7757	上调
A0A0G2K1 U3	Protein RGD1307947 OS = Rattus norvegicus GN = RGD1307947 PE = 1 SV = 1 - [A0A0G2K1U3_RAT]	0.2597	下调
F1LRZ7	Neurofilament heavy polypeptide OS = Rattus norvegicus GN = Nelh PE = 1 SV = 1 - [F1LRZ7_RAT]	0.2715	下调
Q63210	Guanine nucleotide - binding protein subunit alpha - 12 OS = Rattus norvegicus GN = Gna12 PE = 1 SV = 3 - [GNA12_RAT]	0.4233	下调
Q7TP21	Cb1 - 727 OS = Rattus norvegicus GN = Rpa1 PE = 1 SV = 1 - [Q7TP21_RAT]	0.4867	下调
Q9Z2X5	Homer protein homolog 3 OS = Rattus norvegicus GN = Homer3 PE = 1 SV = 2 - [HOME3_RAT]	0.5196	下调
Q5XFX7	Protein Rad23a OS = Rattus norvegicus GN = Rad23a PE = 1 SV = 1 - [Q5XFX7_RAT]	0.5212	下调
F1M021	Protein B4galnt3 OS = Rattus norvegicus GN = B4galnt3 PE = 4 SV = 2 - [F1M021_RAT]	0.5265	下调
Q9EQX9	Ubiquitin - conjugating enzyme E2 N OS = Rattus norvegicus GN = Ube2n PE = 1 SV = 1 - [UBE2N_RAT]	0.5442	下调
D3ZME3	Uncharacterized protein OS = Rattus norvegicus PE = 3 SV = 1 - [D3ZME3_RAT]	0.5562	下调
Q62639	GTP - binding protein Rheb OS = Rattus norvegicus GN = Rheb PE = 1 SV = 1 - [RHEB_RAT]	0.5697	下调
G3V913	Heat shock 27kDa protein 1 OS = Rattus norvegicus GN = Hspb1 PE = 1 SV = 1 - [G3V913_RAT]	0.5737	下调
P23928	Alpha - crystallin B chain OS = Rattus norvegicus GN = Cryab PE = 1 SV = 1 - [CRYAB_RA]	0.5771	下调
Q9JKB7	Guanine deaminase OS = Rattus norvegicus GN = Gda PE = 1 SV = 1 - [Q9JKB7_RAT]	0.5857	下调
P45592	Cofilin - 1 OS = Rattus norvegicus GN = Cfl1 PE = 1 SV = 3 - [COF1_RAT]	0.5881	下调
A0A0G2K7 93	Heat shock protein HSP 90 - beta OS = Rattus norvegicus GN = Hsp90ab1 PE = 1 SV = 1 - [A0A0G2K793_RAT]	0.5943	下调
P83565	39S ribosomal protein L40, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Mrpl40 PE = 1 SV = 2 - [RM40_RAT]	0.5945	下调
P21670	Proteasome subunit alpha type - 4 OS = Rattus norvegicus GN = PsmA4 PE = 1 SV = 1 - [PSA4_RAT]	0.5961	下调
P35284	Ras - related protein Rab - 12 OS = Rattus norvegicus GN = Rab12 PE = 1 SV = 2 - [RAB12_RAT]	0.6006	下调
Q6SKG1	Acyl - coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial OS = Rattus norvegicus GN = Acsm3PE = 2 SV = 1 - [ACSM3_RAT]	0.6078	下调

续表 4

蛋白编号	蛋白描述	中西医结合组/假手术组	趋势
Q63486	Ras - related GTP - binding protein A OS = Rattus norvegicus GN = Rraga PE = 1 SV = 1 - [RRAGA_RAT]	0.6113	下调
D3ZRP5	Poly [ADP - ribose] polymerase OS = Rattus norvegicus GN = Tnks2 PE = 4 SV = 1 - [D3ZRP5_RAT]	0.6120	下调
E9PTN6	Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase OS = Rattus norvegicus PE = 3 SV = 1 - [E9PTN6_RAT]	0.6178	下调
P97541	Heat shock protein beta - 6 OS = Rattus norvegicus GN = Hspb6 PE = 1 SV = 1 - [HSPB6_RAT]	0.6201	下调
A0A0H2UH Y6	Uncharacterized protein OS = Rattus norvegicus PE = 4 SV = 1 - [A0A0H2UHY6_RAT]	0.6284	下调
A1L1M0	Protein kinase, cAMP - dependent, catalytic, alpha OS = Rattus norvegicus GN = Prkaca PE = 1 SV = 1 - [A1L1M0_RAT]	0.6381	下调
A0A0G2JW U1	Triosephosphate isomerase OS = Rattus norvegicus GN = LOC500959 PE = 1 SV = 1 - [A0A0G2JWU1_RAT]	0.6390	下调

4 讨论

现代医学认为心肌细胞能量代谢障碍是 CHF 的重要病理基础,而线粒体是心肌细胞能量合成的主要细胞器,益气法作为心衰中医治疗的主要法则^[5,6],被认为可改善心衰心肌细胞能量代谢障碍状态^[7],本实验利用双向电泳技术测定益气法对心力衰竭时心肌线粒体蛋白质表达谱的影响,尝试从整体到功能蛋白的层次探索益气法对心衰能量代谢障碍的干预作用。

在心肌梗死致心衰模型失代偿期,模型组与假手术组比较,显著差异表达的蛋白有 3 个,均为高表达蛋白。其中生物意义重要的有 1 种。研究表明^[8],"Receptor activity - modifying protein 1"可能通过抗心肌细胞凋亡作用,改善心肌梗死后心室重构。另有研究发现^[9],该蛋白的过表达可诱导心血管自主调节的保护性改变。模型组在未采取有效干预措施的情况下出现该蛋白的过表达可能与心血管的自主调节有关。

西药组与模型组比较,显著差异表达的蛋白有 31 个,其中高表达的蛋白 3 个,低表达的蛋白 28 个。其中生物意义重要的有 8 种。高表达蛋白"E3 ubiquitin - protein ligase"通过调控调节蛋白的泛素化过程参与细胞内的多种生理过程,研究表明^[10]该蛋白可调节相应的信号通路,保护缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡和心脏功能障碍。其中下调蛋白共 7 种,分述如下。"Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase (G3PD)"、"Triosephosphate isomerase(TIR)"是糖代谢的中心环节相关蛋白,在能量代谢过程中起重要作用。Lazarev VF 等发现^[11],"G3PD"可以结合许多生理上重要的蛋白质,控制其功能并相应地影响细胞的凋亡。早在 30 多年前 Sun AQ^[12]发现"TIR"通过参与脱酰胺的过程可影响天冬氨酸的表达,但其是否直接影响心脏受损目前尚未见到相关报道。"Heat shock protein beta - 6"在调节肌肉功能如平滑肌血管舒张和心肌收缩力方面发挥作用,其过度表达在心肌损伤后可调节心脏保护和血管生成功能。研究表明^[13],"Heat shock 27kDa protein 1"可通过抑制 caspase 蛋白的激活和活性来抑制细胞的凋亡。但"Heat shock protein beta - 6"、"Heat shock 27kDa protein 1"在西药组结果中为下调蛋白,可能与本研究样本量较少或与卡托普利相关,其机理值得进一步探索。"Replication protein A subunit"被认为在细胞 DNA 损伤应激反应中起着重要作用,但在心衰的相关性研究尚未展开,可能具备进一步的研究潜力。"Poly [ADP - ribose] polymerase (PARP)"是一类存在多数真核生物细胞中的 DNA 修复酶,调控着细胞的存活和凋亡。

它能够识别损伤的 DNA 并与之结合,进而参与 DNA 损伤的修复,其过度激活会引发细胞内 NAD⁺ 和 ATP 的快速消耗,并最终导致细胞因能量耗竭而出现功能障碍和坏死。有研究显示^[14],“PARP”可对端粒维持负调控功能,该蛋白下调可能对心肌细胞保护起到一定作用。“Protein kinase, cAMP - dependent”可影响收缩期细胞内的钙离子浓度,其水平升高,可导致心肌细胞内用于心肌兴奋收缩偶联所需的钙离子减少,心肌收缩力下降,发生心功能减退。故该蛋白水平下降可能可起到保护心功能的作用。

中药组与模型组比较,显著差异表达的蛋白有 42 个,其中高表达的蛋白 6 个,低表达的蛋白 36 个。其中生物意义重要的有 8 种。高表达的“ATP synthase - coupling factor 6 (CF6)”是 ATP 合成酶的关键组成成分,其水平升高可改善心肌能量代谢功能。袁爱国^[15]在一项研究中发现,CF6 表达下调可能与机体长期训练运动有关,但其作用机制尚未明确。以下为 7 种下调蛋白。“Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase”、“Triosephosphate isomerase (TIR)”在西药组中同样为下调蛋白。提示益气类中药也可能通过抑制细胞凋亡延缓心衰发展。“Heat shock protein beta - 6”在调节肌肉功能如平滑肌血管舒张和心肌收缩力方面发挥作用,可通过调节血管内皮生长因子受体 II (KDR) 对心肌血管生成发生影响,有研究表明^[16,17],该蛋白过度表达可在诱导损伤后调节心脏保护。该蛋白在中药组中为下调蛋白,与上述研究存在差异,差异可归因于本研究样本量过小。“Transcription termination factor 3”可通过调节 39S 核糖体亚基的生物水平,维持 16S rRNA 水平和线粒体核糖体的功能。既往研究表明^[18],高表达的 Hsp27 在大鼠心肌肥厚发展中起着重要作用,提示 Hsp27 可以作为心肌病患者治疗的潜在靶点。“Receptor activity - modifying protein 1”该蛋白在模型组中为上调蛋白,在中药组呈下调趋势,其相关机制尚未明确。“GTP - binding protein Rheb” (Rheb1) 在细胞凋亡调控中发挥中重要作用,据研究显示^[19],基因抑制 Rheb1 表达对 MI 和 TAC 术后小鼠的病理性心室重构具有保护作用。中药组可上调改善心肌能量代谢的蛋白,并抑制促心肌细胞凋亡蛋白的表达。

中西医结合组与模型组比较,显著差异表达的蛋白有 30 个,其中高表达的蛋白 3 个,低表达的蛋白 27 个。其中生物意义重要的有 6 个。高表达的“ATP synthase subunit delta (ATP 5D)”参与 ATP 合成、跨膜转运及氧化磷酸化。可见在心衰过程中能量代谢被激活,这种能量激活有利于改善心肌细胞能量供给失衡,但对患者的长期预后的意义尚不明确,值得进一步研究。下调蛋白共 5 个,分别为:“GTP - binding protein Rheb” (Rheb1)、“Heat shock protein beta - 6”、“Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase”、“TIR”、“PARP”。其中“GTP - binding protein Rheb” (Rheb1)、“Heat shock protein beta - 6”、“Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase”、“TIR”4 种蛋白在中药组与模型组比较中同样为下调蛋白,中西医结合组下调比例较明显。“PARP”、“Heat shock protein beta - 6”、“Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase”、“TIR”在西药组与模型组比较中同样下调,其中“PARP”、“Heat shock protein beta - 6”在中西医结合组中下调较明显,提示黄芪党参浓缩煎剂联合卡托普利较单纯益气中药或卡托普利可更好的保护心肌细胞,中西医结合治疗心力衰竭的机制值得进一步探索。

本研究通过测定心肌细胞线粒体蛋白质谱,探讨益气法对心衰心肌细胞能量代谢的调控作用。心衰模型组的抗心肌细胞凋亡相关蛋白水平明显上调,可能与心血管的自主调节相关。卡托普利可使心功能保护相关蛋白表达上调并抑制细胞凋亡相关蛋白上调。而黄芪党参浓缩煎剂则上调改善心肌能量代谢的蛋白并下调促心肌细胞凋亡蛋白,中西医结合组则可更好地抑制心肌细胞凋亡相关蛋白的表达,并涉及了中药组及西药组均未涉及的

“ATP 5D”高表达,有利于改善心肌细胞能量供给失衡。提示益气法联合卡托普利,较单纯中药或西药治疗,可更好地优化心衰能量代谢障碍,并且还可通过保护心肌细胞等途径改善心衰患者预后。本研究结果为益气法防治心衰提供科学依据,也可为中西医结合提供新的切入点。但本研究样本量偏小,故仍需扩大样本量,同时可在今后进行相关临床实验及观察研究进一步探索。

参考文献:

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要[J]. 中国循环杂志,2020,35(9):833.
- [2] Eirin A, Ebrahimi B, Zhang X, et al. Mitochondrial protection restores renal function in swine atherosclerotic renovascular disease[J]. Cardiovasc Res,2014,103(4):461.
- [3] 孙 锴,王克强,葛均波,等. 线粒体是防治心力衰竭的重要靶点[J]. 中华心血管病杂志,2008,36(9):854.
- [4] 中国中西医结合学会心血管病专业委员会,中国医师协会中西医结合医师分会心血管病专业委员会. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 心脑血管病防治,2016,16(5):340.
- [5] 周 勇. 黄芪注射液治疗老年慢性充血性心力衰竭的疗效研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(11):2915.
- [6] 徐慧聰,曹爱琴,刘淑娟,等. 黄芪注射液治疗慢性心力衰竭急性失代偿患者随机对照试验[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(1):101.
- [7] 林 谦,农一兵,黄启福. 从心肌能量代谢探讨慢性心力衰竭心气虚证的实质[J]. 北京中医药大学学报,2007,7(7):445,474.
- [8] 赵然尊,龙仙萍,刘志江,等. 人受体活性修饰蛋白 1 基因修饰间充质干细胞对兔心肌梗死后心室重构的作用[J]. 中华高血压杂志,2012,20(7):648.
- [9] Sabharwal R, Zhang Z, Lu Y, et al. Receptor activity - modifying protein 1 increases baroreflex sensitivity and attenuates Angiotensin - induced hypertension[J]. Hypertension,2010,55(3):627.
- [10] Toth A, Nickson P, Qin LL, et al. Differential regulation of cardiomyocyte survival and hypertrophy by MDM2, an E3 ubiquitin ligase[J]. J Biol Chem,2006,281(6):3679.
- [11] Lazarev VF, Guzhova IV, Margulis BA. Glyceraldehyde - 3 - phosphate Dehydrogenase is a Multifaceted Therapeutic Target[J]. Pharmaceuticals,2020,12(5):416.
- [12] Sun AQ, Yüksel KU, Gracy RW. Relationship between the catalytic center and the primary degradation site of triosephosphate isomerase: effects of active site modification and deamidation[J]. Arch Biochem Biophys,1992,293(2):382.
- [13] Jing H, Zou G, Hao F, et al. Hsp27 reduces cold ischemia - reperfusion injury in heart transplantation through regulation of NF - κ B and PUMA signaling[J]. Int J Clin Exp Pathol,2018,11(1):281.
- [14] Cook BD, Dynek JN, Chang W, et al. Role for the related poly(ADP - Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres[J]. Mol Cell Biol,2002,22(1):332.
- [15] 袁爱国,史绍蓉. 中等强度运动大鼠左室肌蛋白质组差异表达[J]. 北京体育大学学报,2013,36(1):64.
- [16] Zhou YC, Liu B, Li YJ, et al. Effects of buyang huanwu decoction on ventricular remodeling and differential protein profile in a rat model of myocardial infarction [J]. Evid Based Complement Alternat Med,2012,2012:385247.
- [17] Fan GC, Chu G, Mitton B, et al. Small heat - shock protein Hsp20 phosphorylation inhibits beta - agonist - induced cardiac apoptosis[J]. Circ Res,2004,94(11):1474.
- [18] Boivin B, Khairallah M, Cartier R, et al. Characterization of hsp27 kinases activated by elevated aortic pressure in heart[J]. Mol Cell Biochem,2012,371(1-2):31.
- [19] 吴向起. 基因与药物抑制 Rheb1/mTORC1/S6K 信号通路对小鼠病理性心室重构具有保护作用[D]. 南京医科大学博士学位论文,2013.