

· 技术与方法 ·

## 高效液相色谱法检测心肌细胞蛋白降解率

陈保林<sup>1</sup>, 马跃东<sup>2</sup>, 熊肇军<sup>3</sup>, 张成喜<sup>3</sup>, 刘晨<sup>2,4</sup>, 董吁钢<sup>2,4</sup>

(1. 贵州省人民医院心内科, 贵阳 550002; 2. 中山大学附属第一医院心血管医学部, 广州 510080;  
3. 中山大学附属第三医院心内科, 广州 510630; 4. 卫生部辅助循环重点实验室, 广州 510080)

**摘要:**目的 建立一种快速测定心肌细胞 3-甲基组氨酸(3-MH)释放量的方法。方法 分离培养新生大鼠心肌细胞。细胞培养液样品用乙腈沉淀蛋白, 离心后取上清液进样用于 3-MH 分析。3-MH 检测采用岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, 用 C18 色谱柱分离, 外标法定量, 检测波长为 338 nm。结果 色谱峰分离良好, 线性方程为:  $y = 731.241x + 896.86$ , 相关系数( $r$ ) = 0.999 8, 3-MH 线性检测范围为 1.6~107.0  $\mu\text{mol/L}$ 。结论 该实验为检测心肌细胞蛋白降解提供了一种精确、简单、可行的方法。

**关键词:** 肌细胞, 心脏; 色谱法, 高压液相; 甲基组氨酸类

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.019

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)22-2234-02

### Determination of protein degradation in cardiomyocytes by high performance liquid chromatography

Chen Baolin<sup>1</sup>, Ma Yuedong<sup>2</sup>, Xiong Zhaojun<sup>3</sup>, Zhang Chengxi<sup>3</sup>, Liu Chen<sup>2,4</sup>, Dong Yugang<sup>2,4</sup>

(1. Department of Cardiology, the People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China;  
4. Key Laboratory on Assisted Circulation of Ministry of Health, Guangzhou 510630, China)

**Abstract: Objective** To establish a fast method to determine the release of 3-methylhistidine(3-MH) in cardiomyocytes. **Methods** Neonatal SD rat cardiomyocytes were isolated and cultured. The analytes in culture medium were extracted by protein precipitation using acetonitrile. High performance liquid chromatographic detection was used to determine the 3-MH levels in medium by applying Shimadzu High-Performance Liquid Chromatograph. Chromatographic separation was performed on a C18 column. The monitor wave-length was 338 nm. **Results** The chromatography was well separative. Linear equation was:  $y = 731.241X + 896.86$ ,  $r = 0.9998$ . The calibration curve was linear in the range of 1.6-107.0  $\mu\text{mol/L}$  for 3-MH, with correlation coefficient above 0.99.

**Conclusion** The method is accurate, precise and reliable for the determination of protein degradation in cardiomyocytes.

**Key words:** myocytes, cardiac; chromatography, high pressure liquid; methylhistidines

3-甲基组氨酸(3-methylhistidine, 3-MH)是存在于肌细胞肌动蛋白和肌球蛋白中的一类转录后修饰的氨基酸,是组氨酸-tRNA 复合物发生甲基化的产物<sup>[1]</sup>。由于缺乏特异性的 tRNA,肌肉蛋白质分解代谢时释放的 3-MH 不能作为 tRNA 的底物再循环参与新肽链或蛋白质的合成,因此,3-MH 可以作为肌细胞蛋白质降解的生物指标<sup>[1-2]</sup>。在一定条件下,测定体外培养的心肌细胞培养液中的 3-MH 释放量能够间接反映心肌细胞肌纤维蛋白的降解率。为此,本研究首次建立了一种快速、灵敏的通过高效液相色谱法分离、测定心肌细胞培养液中 3-MH 含量的方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 选择出生 1~3 d 的 SD 大鼠,清洁级,由中山大学实验动物中心提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器** DMEM/F12 培养基(Hyclone)、I 型胶原酶(Gibco)、胰蛋白酶(Gibco)、胎牛血清(Hyclone)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU, Sigma)、3-甲基组氨酸标准品(Sigma 公司)、色谱纯甲醇(天地公司)、显微成像分析系统(Olympus)、LC-20A 高效液相色谱仪(岛津公司)、C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 日本 GL Sciences 公司)等。

#### 1.2 方法

**1.2.1 原代心肌细胞培养** 按照文献<sup>[3-4]</sup>培养方法,无菌条件下开胸取出新生大鼠完整心脏,浸于 D-Hank's 液中,冲去血污。在超净台内,去除心底结缔组织和心房,剪开心室,将心室心肌组织剪碎成约 1 mm<sup>3</sup> 大小,以 0.05% I 型胶原酶消化,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温槽轻轻振荡 2 h,之后再以 0.125% 胰酶消化 2~3 次,每次 5 min,直至不见细胞团块。收集细胞悬液至含 10%

胎牛血清的培养基中,以 200 目筛网过滤后接种至培养瓶,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内 60 min,用差时贴壁法去除成纤维细胞。心肌细胞以 5×10<sup>5</sup>/mL 的密度接种于 6 孔板,加 0.1 mmol/L BrdU 抑制成纤维细胞生长,加入青霉素及链霉素各 100 U/mL 防止细菌污染。

**1.2.2 心肌细胞免疫化学染色** 制作心肌细胞爬片后,以 4% 多聚甲醛固定 25 min;再以 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温下孵育 10 min;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;取出含细胞的玻片,滴加非免疫动物血清,室温下孵育 10 min;去除血清,滴加  $\alpha$ -actinin 一抗(1:200),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日再用 PBS 冲洗后加生物素标记的二抗,室温下孵育 20 min 后用 PBS 冲洗。滴加链霉素抗生素-过氧化氢酶,室温下孵育 10 min,用 PBS 冲洗后 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色 10 min,流水冲洗;苏木素染色,脱水,中性树脂封片,镜下观察。

**1.2.3 高效液相色谱仪检测心肌细胞 3-MH** (1)衍生试剂的配制。称取邻苯二甲醛(O-phthalaldehyde, OPA)52 mg,加甲醇 4.5 mL,溶解后加 2-巯基乙醇 500  $\mu\text{L}$ ,用 0.4 mol/L 的硼酸缓冲液定容至 10 mL,冰箱内保存。(2)3-MH 标准液的配制。精密称取 4.53 mg 的 3-MH 标准品,溶解于 0.1 mol/L 的盐酸中,配成浓度为 2.86 mmol/L 的标准液,放在冰箱内备用。(3)色谱条件。250 mm×4.6 mm 不锈钢 C18 色谱柱,柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ 。流动相 A 为四氢呋喃:甲醇:0.1 mol/L 乙酸钠溶液=5:95:900(V/V/V),流动相 B 为甲醇,梯度洗脱,流速为 0.8 mL/min。检测波长为 338 nm。(4)样品处理方法。收集心肌细胞培养液至 1.5 mL 离心管中,取 0.5 mL 样品加入 100  $\mu\text{L}$  乙腈萃取,以离心半径 8 cm,1 300 r/min,15  $^{\circ}\text{C}$ ,旋涡混合 30 s。(5)衍生化反应。将上述处理后的样品离心后取上清液 100  $\mu\text{L}$  加入衍生化试剂 100  $\mu\text{L}$  和 0.4 mol/L 的硼酸缓

冲液 1 mL,旋涡混合 20 s 用直径 0.22  $\mu\text{m}$  的针头过滤器过滤后立即进样 20  $\mu\text{L}$  分析。(6)定量方法。外标法定量,用 3-MH 标准品准确配成一定浓度标准液,进 5 个梯度体积的标准液,用峰面积作标准曲线。将样品中 3-MH 的峰面积带入,计算其含量。

## 2 结果

**2.1 心肌细胞的鉴定及纯度** 倒置显微镜下观察,培养 48 h 的心肌细胞已展开,80% 融合成片,搏动呈同步性。 $\alpha$ -actinin 免疫细胞化学染色显示,阳性率大于 99%,培养 4 h 后的心肌细胞已达到实验要求,见封 4 图 1。

**2.2 色谱分离** 细胞培养液中除了含有 3-MH 外,还含有其他氨基酸以及其他有机化合物。这些物质都可以与 OPA 反应对 3-MH 的检测产生干扰。本实验色谱条件经过反复优化,3-MH 标准液及细胞培养液标本柱前衍生、洗脱后,使 3-MH 与其他杂质在 30 min 内得到很好分离而无干扰(图 2)。

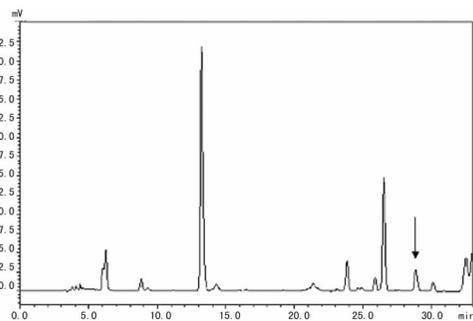


图 2 色谱图(箭头所指处为 3-MH)

**2.3 标准曲线** 配置 3-MH 标准液的浓度分别为 107.2、53.5、26.8、13.4、6.7、3.3、1.6  $\mu\text{mol/L}$ 。以 3-MH 的色谱峰面积(y)为纵坐标,浓度(x)为横坐标,利用 3-MH 标准品的不同浓度与各自对应的面积建立回归方程: $Y = 731.241X + 896.86$ ,相关系数  $r = 0.9998$ 。结果显示,3-MH 在浓度 1.6~107.0  $\mu\text{mol/L}$  范围内与峰面积线性关系良好(图 3)。

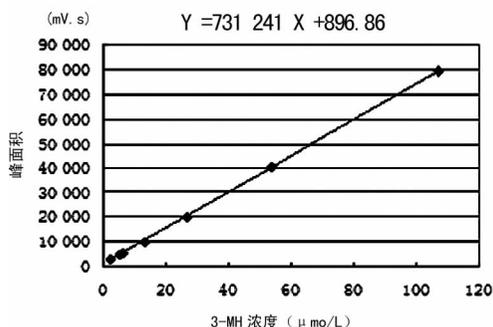


图 3 3-MH 标准曲线

**2.4 样品检测** 将收集的心肌细胞培养液按样品处理方法进行提取,得提取液,进样 20  $\mu\text{L}$  检测,每个样本重复测 3 次。所检测的培养液中 3-MH 浓度为 4.8~68.3  $\mu\text{mol/L}$ 。

## 3 讨论

与其他器官一样,心肌细胞蛋白质转换也是蛋白质合成与降解之间有序、受调控的动态平衡<sup>[5]</sup>。蛋白转换同时存在于心肌细胞肥大和萎缩这两种不同的病理过程中,只是相对比例不同<sup>[6]</sup>。从细胞水平看心肌肥大和萎缩的根本原因是肌纤维蛋白的增多和减少,即只有细胞体积改变而没有细胞数量变化<sup>[7]</sup>。对心肌细胞蛋白降解的检测将有助于评价抗肥大及抗萎缩药物的治疗效果,以及客观地寻找有效逆转心肌肥大和心肌萎缩的药物。因此,有必要建立一种快速、简单、可靠的检测心肌细胞蛋白降解率的方法。

以往的研究表明,通过测定尿内或骨骼肌组织中的 3-MH

含量可用于研究骨骼肌蛋白分解代谢<sup>[8-10]</sup>,但是心肌细胞蛋白降解的检测方法未见相关报道。本研究首次建立了高效液相色谱法检测体外培养心肌细胞中 3-MH 含量的方法,并将此应用于心肌细胞蛋白降解的测定。本实验采用四氢呋喃-甲醇作为流动相,获得 3-MH 的色谱图,3-MH 在 338 nm 处有最大吸收,并用标准品制备标准曲线,建立回归方程。收集的细胞培养液加入乙腈后分离出 3-MH。采用梯度洗脱的方法使 3-MH 衍生物的峰与其他衍生物的峰分离,并选用 OPA 进行衍生化,过滤后立即进样,测定 OPA 衍生反应后的 3-MH 氨基酸衍生物。此方法衍生后 3-MH 的稳定性强,而且 3-MH 的分离时间短,谱峰干扰少,变异系数小,检测灵敏度、精密度均较高,适用于低含量 3-MH 标本的检测,为开展心肌纤维蛋白分解代谢研究提供了可靠的方法。经过一系列的优化实验,本研究得出了该简单、快速、准确测定心肌细胞培养液中 3-MH 含量的方法,并作为判断心肌细胞蛋白降解的一种特异性指标。所得结果重复性较好,适用于基础和临床研究。

## 参考文献:

- [1] Wassner SJ, Schlitzer JL, Li JB. A rapid, sensitive method for the determination of 3-methylhistidine levels in urine and plasma using high-pressure liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1980, 104(2): 284-289.
- [2] Thompson MG, Thom A, Partridge K, et al. Stimulation of myofibrillar protein degradation and expression of mRNA encoding the ubiquitin-proteasome system in C(2)C(12) myotubes by dexamethasone: effect of the proteasome inhibitor MG-132 [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(3): 455-461.
- [3] Meng RS, Pei ZH, Yin R, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibits cardiac hypertrophy through reactivating peroxisome proliferator-activated receptor-alpha signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 620(1-3): 63-70.
- [4] Chen BL, Ma YD, Meng RS, et al. Activation of AMPK inhibits cardiomyocyte hypertrophy by modulating of the FOXO1/MuRF1 signaling pathway in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(7): 798-804.
- [5] Nelson MT, Herrera GM. Molecular physiology: protecting the heart [J]. *Nature*, 2002, 416: 273-274.
- [6] Razeghi P, Taegtmeyer H. Cardiac remodeling: UPS lost in transit [J]. *Circ Res*, 2005, 97(10): 964-966.
- [7] Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly [J]. *Annu Rev Physiol*, 2003, 65: 45-79.
- [8] 袁倚盛, 沈敏, 黎介寿. 高效液相色谱-荧光检测法测定人尿中 3-甲基组氨酸 [J]. *色谱*, 1996, 14(4): 274-276.
- [9] 申传安, 柴家科, 廖杰, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定大鼠骨骼肌组织内微量 3-甲基组氨酸 [J]. *感染、炎症、修复*, 2003, 4(1): 32-35.
- [10] Nakashima K, Yakabe Y. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(7): 1650-1656.