

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.08.001

基于荧光差异双向电泳的雷帕霉素损伤人冠状动脉内皮细胞的蛋白质组学研究*

刘少军¹, 胡坤华², 钟 贇^{1△}

(1. 广州医科大学附属第二医院心内科/广州心血管疾病研究所, 广州 510260;

2. 中山大学中山医学院, 广州 510089)

[摘要] 目的 利用蛋白质组学的方法系统探索洗脱支架药物雷帕霉素损伤人冠状动脉内皮细胞的蛋白质谱的变化。方法 雷帕霉素处理人冠状动脉内皮细胞 HCAECs, 进行荧光差异双向电泳(2D-DIGE)差异表达蛋白的研究分析, MALDI-ToF-ToF 质谱对蛋白质进行鉴定。结果 共发现差异蛋白斑点 85 个, 其中上调 49 个, 下调 36 个。MALDI-ToF-ToF 质谱鉴定出其中的 26 种, 包括内质网蛋白、线粒体蛋白、分子伴侣、结构蛋白和抗氧化蛋白等。结论 通过蛋白质组学方法的研究, 探索了雷帕霉素损伤人冠状动脉内皮细胞的一些特定蛋白质变化。

[关键词] 雷帕霉素; 支架洗脱药物; 人冠脉内皮细胞; 分子机制; 蛋白质组学研究

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)08-1009-03

Proteomics study of rapamycin-injured human coronary artery endothelial cells based on two dimension fluorescence differential gel electrophoresis*

LIU Shaojun¹, HU Kunhua², ZHONG Yun^{1△}

(1. Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University/Guangzhou

Institute of Cardiovascular Disease, Guangzhou, Guangdong 510260, China; 2. Zhongshan

Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510089, China)

[Abstract] **Objective** To explore the molecular mechanisms of the effect of eluting stent drug rapamycin for injuring human coronary artery endothelial cells (HCAECs) by using the proteomics method. **Methods** HCAECs were treated with rapamycin, and the differentially expressed proteins were analyzed by two dimension fluorescence differential gel electrophoresis (2D-DIGE). The changed proteins were identified by MALDI-ToF-ToF. **Results** At least 85 differential protein spots were found, including 49 up-regulated and 36 down-regulated protein spots. Twenty-six proteins were identified by MALDI-ToF-ToF, including the endoplasmic reticulum protein, mitochondrial protein, molecular chaperones, ubiquitin system related protein, structural protein and oxidative stress related proteins, etc. **Conclusion** The changes of specific proteins of HCAECs injury induced by rapamycin are investigated by the proteomic method.

[Key words] rapamycin; eluting-stent-drug; human coronary artery endothelial cells; molecular mechanisms; proteomic study

介入治疗正日益成为冠心病的首选治疗方式^[1], 安装药物洗脱支架是目前介入治疗的常规手段。临床上发现雷帕霉素在冠心病的治疗应用中具有双重性: 一方面抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移, 有效防止了介入术后的再狭窄; 另一方面雷帕霉素抑制内皮细胞增殖和迁移, 诱导内皮细胞损伤^[2-3]。雷帕霉素延缓支架被正常内皮细胞覆盖包裹, 增加血栓风险, 影响远期疗效。雷帕霉素洗脱支架植入相关的支架内血栓, 成为介入术后患者重要的致死、致残因素^[2-4]。明确雷帕霉素诱导内皮细胞受损的具体分子机制是克服其不良反应的关键。本研究采用蛋白质组学作为筛选手段, 系统探索雷帕霉素损伤血管内皮细胞作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 雷帕霉素、硫脲、赖氨酸、二甲基甲酰胺等购自美国 Sigma 公司; CHAPS、甘氨酸、尿素、低熔点琼脂糖、蛋白质纯化试剂盒 Clean-up Kit、定量试剂盒 Quant Kit、玻璃板硅烷化剂、固相 IPG 干胶条、IPG buffer、三氟乙酸、荧光标记试

剂盒 [CyDye DIGE Flour (minimal Dye) Labelling Kit]、Deep purple 荧光染料购自美国 GE Healthcare 公司; 正丁醇购自德国 Merck 公司, 乙腈购自美国 Fisher 公司, 测序级胰酶购自美国 Promega 公司。

1.1.2 仪器 等电聚焦电泳仪 IPGphor III、垂直电泳仪 Ettan DALT Six System SDS、扫描仪 Typhoon Trio、切胶仪 Ettan Picker、酶解仪 Ettan Digester、分析软件 DeCyder V7.0 Software 均购自美国 GE Healthcare 公司; MALDI-ToF-ToF 质谱仪购自美国 Bruker Dalton 公司。

1.2 方法

1.2.1 人冠状动脉内皮细胞的培养和处理 参考已经报道的方法^[5-6]。人冠状动脉内皮细胞 HCAECs 购自美国 Cell Applications 公司, 培养按照说明书进行操作, 本研究所使用的 HCAECs 为第 4 代。药物处理细胞之前, 改为含 0.1% 胎牛血清且不含细胞因子的 EGM-2 基础培养基培养 24 h。实验组为 HCAECs 用 1 μmol/L 雷帕霉素处理 4 h。

1.2.2 样品处理 在 4 °C 预冷蔗糖缓冲液 (10 mmol/L Tris,

* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81300151); 广东省省级科技计划项目 (2016A020215163)。作者简介: 刘少军 (1980—), 讲师, 博士, 主要从事动脉粥样硬化的防治研究。△ 通信作者, E-mail: 3636036@qq.com。

250 mmol/L sucrose)中洗涤细胞 3 次,去除残余培养基;每个 100 mm 皿中加入裂解液(7 mol/L Urea,2 mol/L Thiourea,30 mmol/L Tris,4% CHAPS)250 μ L,刮下细胞并充分裂解;超声,4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 30 min,转移上清液,进行蛋白质纯化。蛋白质的纯化和定量严格按照 2D Clean-up Kit 或 2D Quant Kit 说明书进行。

1.2.3 荧光差异双向电泳(2D-DIGE) 参照报道过的方法^[7-8],采用 2D-DIGE 研究的标准设计,样品的荧光标记方法按照 CyDye DIGE Flour Labelling Kit 说明书操作。每个样品取 50 μ g,用 400 pmol Cy2、Cy3 或者 Cy5 在冰浴、避光条件下标记 30 min;然后用赖氨酸溶液终止反应。第一向电泳(等电聚焦)程序如下:30 V,12 h,step-n-hold;500 V,1 h,step-n-hold;1 000 V,1 h,step-n-hold;10 000 V,10 h,step-n-hold;Total 85 000 Vh。先后

用 DTT 和 IAA 溶液进行两步平衡,然后进行第二向 12.5%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

1.2.4 凝胶扫描和差异蛋白的获取 准备制备胶 2 张(每胶 500 μ g),用 Deep Purple stain kit 进行制备胶的荧光染色。Typhoon Trio 扫描仪对 2D-DIGE 分析胶和 Deep Purple 制备胶的图像进行采集。DeCyder7.0 软件进行差异蛋白分析,在 Ettan Picker 上切取差异蛋白质样品。

1.2.5 蛋白质鉴定 切取的目的蛋白斑点在 Ettan Digester 仪器上进行胰酶酶解,然后在 MALDI-ToF-ToF 质谱仪上进行蛋白质的鉴定,Mascot 进行数据检索。

2 结 果

2.1 2D-DIGE 蛋白质组学研究 雷帕霉素处理后,HCAECs 差异表达蛋白有 85 个,其中上调 49 个,下调 36 个,见图 1。

表 1 2D-DIGE 结合 MALDI-ToF-ToF 发现的差异蛋白表达

蛋白编码	变化倍数	T 值	蛋白简称及全名	Uniprot 编号	蛋白评分	覆盖率 (%)	匹配的肽段数	功能
195	-1.63	9.80E-07	HYOU1_HUMAN,Hypoxia up-regulated protein 1	Q9Y4L1	96	12	17	ER chaperone
489	-1.53	0.000 22	ODO1_HUMAN,2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	Q02218	132	8	8	Mitochondrion protein
564	-2.01	2.70E-06	PLOD2_HUMAN,Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	O00469	63	4	3	Enzyme in fibrosis
651	1.75	6.40E-05	UBP5_HUMAN,Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	P45974	146	5	5	Ubiquitin system related
675	-2.04	0.006 4	P3H1_HUMAN,Prolyl 3-hydroxylase 1	Q32P28	191	8	6	Growth suppressor
741	-1.74	1.30E-05	ZYX_HUMAN,Zyxin	Q15942	102	9	4	Actinin regulator
742	1.59	4.40E-06	TRFL_HUMAN,Lactotransferrin	P02788	59	3	3	Growth promoter
810	1.54	0.004 4	TGM2_HUMAN,Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	P21980	95	7	5	Catalyzes the cross-linking of proteins
878	1.90	0.000 2	HSP7C_HUMAN,Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	76	7	4	Heat shock protein
879	-1.91	3.80E-06	NDUS1_HUMAN,NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit,mitochondrial	P28331	140	8	6	Mitochondrial membrane respiratory chain
1206	1.60	0.004 2	CH60_HUMAN,60 kDa heat shock protein,mitochondrial	P10809	221	14	9	Heat shock protein
1252	1.63	0.000 53	PDIA3_HUMAN,Protein disulfide-isomerase A3	P30101	155	16	9	Endoplasmic reticulum protein 57
1255	2.78	1.20E-05	PDIA3_HUMAN,Protein disulfide-isomerase A3	P30101	92	7	4	Endoplasmic reticulum protein 57
1279	1.78	0.000 38	VIME_HUMAN,Vimentin	P08670	389	52	24	class-III intermediate filament
1372	-1.86	3.00E-06	CNDP2_HUMAN,Cytosolic non-specific dipeptidase	Q96KP4	101	5	3	Suppressor in cell growth
1437	1.62	0.003 1	ATPB_HUMAN,ATP synthase subunit beta,mitochondrial	P06576	181	20	7	ATP synthase
1499	1.52	0.000 22	ENOA_HUMAN,Alpha-enolase	P06733	88	7	5	Multifunctional enzyme , growth control
1510	1.69	0.004	TXND5_HUMAN,Thioredoxin domain-containing protein 5	Q8NBS9	236	21	10	Endoplasmic reticulum protein 46
1529	1.76	6.60E-06	VIME_HUMAN,Vimentin	P08670	156	10	6	class-III intermediate filament
1541	-1.95	7.30E-08	TXND5_HUMAN,Thioredoxin domain-containing protein 5	Q8NBS9	191	18	9	Endoplasmic reticulum protein 46
1629	-2.11	3.20E-05	ERP44_HUMAN,Endoplasmic reticulum resident protein 44	Q9BS26	177	17	8	Endoplasmic reticulum protein 44
1685	-1.60	9.90E-05	ACTB_HUMAN,Actin,cytoplasmic 1	P60709	321	20	9	Actin
2062	4.15	7.30E-06	K1C10_HUMAN,Keratin,type I cytoskeletal 10	P13645	98	13	8	Keratin

续表 1 2D-DIGE 结合 MALDI-ToF-ToF 发现的差异蛋白表达

蛋白编码	变化倍数	T 值	蛋白简称及全名	Uniprot 编号	蛋白评分	覆盖率 (%)	匹配的肽段数	功能
2491	-2.36	7.80E-08	PRDX6_HUMAN, Peroxiredoxin-6	P30041	232	26	5	Against oxidative stress and cell death
2496	2.14	5.10E-07	HSPB1_HUMAN, Heat shock protein beta-1	P04792	213	28	6	Heat shock protein
2507	-1.76	0.000 69	UCHL3_HUMAN, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	P15374	85	9	2	Ubiquitin system related
2512	-1.54	7.60E-05	PRDX4_HUMAN, Peroxiredoxin-4	Q13162	195	24	6	Against oxidative stress
2591	-2.15	3.10E-07	PARK7_HUMAN, Protein DJ-1	Q99497	75	12	2	Against oxidative stress and cell death
2689	-9.90	2.30E-06	PRDX2_HUMAN, Peroxiredoxin-2	P32119	195	20	5	Against oxidative stress
2694	11.71	4.20E-07	PRDX2_HUMAN, Peroxiredoxin-2	P32119	103	17	4	Against oxidative stress

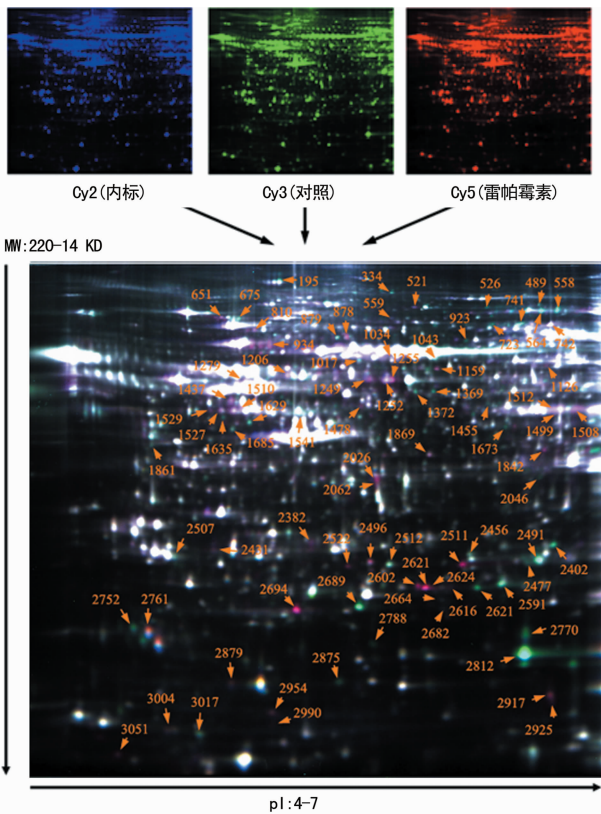


图 1 雷帕霉素诱导 HCAECs 损伤的 2D-DIGE 研究

2.2 差异表达蛋白及其功能分类 挑选 2D-DIGE 发现的差异蛋白斑点 50 个,进行 MALDI-ToF-ToF 质谱鉴定,共鉴定出雷帕霉素诱导的 HCAECs 差异表达蛋白 26 种(不含重复的 4 个),见表 1。主要有以下几类:内质网蛋白、线粒体蛋白、分子伴侣、结构蛋白和抗氧化蛋白等,符合细胞损伤的特征,见图 2、3。

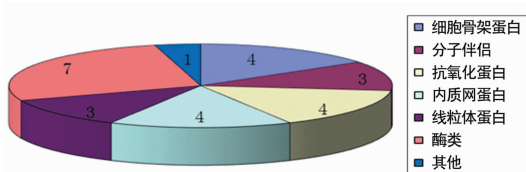


图 2 雷帕霉素诱导的 HCAECs 差异表达蛋白的功能分类

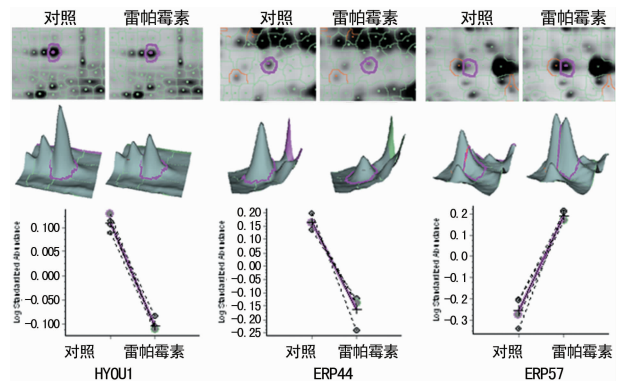


图 3 雷帕霉素诱导蛋白 HYOU1、ERP44 和 ERP57 的表达变化

3 讨论

内皮细胞功能紊乱不仅是动脉粥样硬化的关键因素之一,也是支架后血栓形成的重要原因。雷帕霉素是洗脱支架最常用的药物之一,其药理作用主要是诱导细胞周期停滞、抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移,从而抑制内膜增生^[2-3]。雷帕霉素直接靶向并抑制丝/苏氨酸激酶 mTOR,激活自噬。因此,从分子机制上来说,雷帕霉素具有阻滞细胞周期、抑制细胞的增殖和迁移,以及诱导细胞损伤的作用。

为了系统研究雷帕霉素对人冠状动脉内皮细胞作用的分子机制,笔者采用了蛋白质组学的策略,利用 2D-DIGE 结合 MALDI-ToF-ToF 的方法。本研究共发现差异蛋白斑点 85 个,质谱鉴定出其中的 26 种蛋白质。包括内质网蛋白、线粒体蛋白、分子伴侣、泛素系统相关蛋白等,符合细胞损伤的特征。本研究发现的内质网蛋白包括 HYOU1(即 ORP-150)、PDIA3(即 ERP57)、TXND5(即 ERP46)、ERP44,这几类蛋白与内质网应激相关,提示雷帕霉素损伤内皮细胞的机制之一可能是通过内质网应激。HYOU1 在血管细胞中通过抑制内质网应激损伤发挥作用^[9]。雷帕霉素诱导了 HYOU1 下调 1.63 倍,促使其保护效应减弱。笔者发现雷帕霉素下调了 ERP44 表达 2.11 倍,报道称干扰 ERP44 的表达会促发内质网应激损伤^[10],而 ERP57 表达上调可能是一种应激性反应。已经报道雷帕霉素的靶点 mTOR 与内质网应激之间的关系较为复杂,存在多种形式的互相影响^[11-12]。众所周知,雷帕霉素是自噬研究最常用的诱导剂。雷帕霉素诱导内质网自噬的机制之一就是 mTORC1 与 ATG1/ULK 复合物分离,(下转第 1015 页)

可考虑删除因子载荷小于 0.5 的 4 个条目,以进一步提高量表的结构效度。虽然使用亚健康评定量表评价广州市大学生的亚健康状况存在少许的不足之处,但总体上仍然可以认为该量表具有较好的结构效度,可以较为准确地衡量广州市大学生的亚健康状况,能够为进一步研究该人群的健康影响因素和针对性干预措施奠定基础。

参考文献

- [1] LEE J C, KIM S H, LEE Y, et al. The concept of Mibyeong (sub-health) in Korea; a Delphi study[J]. *Eur J Integr Med*, 2013, 5(6): 514-518.
- [2] 赵可莉, 马蕊, 陈学婷. 江苏某高校大学生亚健康状况调查及影响因素研究[J]. *中国卫生产业*, 2015(16): 139-142.
- [3] 张远妮, 姜虹, 许军. 亚健康评定量表评价广州市城镇居民的亚健康状况的信效度[J]. *中国健康心理学杂志*, 2016(10): 1505-1508.
- [4] 吴伟旋, 许军, 吴志华, 等. 自测健康评定量表应用于交通警察的验证性因子分析[J]. *中国卫生统计*, 2016, 33(3): 445-447.
- [5] 张超, 徐燕, 陈平雁. 探索性因子分析与验证性因子分析在量表研究中的比较与应用[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(11): 1699-1700, 1705.

- [6] 许军, 张远妮, 姜虹, 等. 珠江三角洲新生代农民工亚健康健康评定量表常模研究[J]. *中国全科医学*, 2016, 19(23): 2817-2823.
- [7] XU J, ZHANG J H, FENG L Y, et al. Self-rated health of population in southern China: association with socio-demographic characteristics measured with multiple-item self-rated health measurement scale [J]. *BMC Public Health*, 2010, 10(1): 393.
- [8] 杨茗, 蒋皎皎, 郝秋奎, 等. 老年失能评估量表的二阶验证性因子分析[J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29(7): 624-627, 632.
- [9] 陆艳, 徐华丽, 魏骞, 等. 亚健康评定量表应用于城镇居民的验证性因子分析[J]. *中国全科医学*, 2013, 16(10): 1108-1109.
- [10] ALIAS R, ISMAIL M H, Sahiddan N. A measurement model for leadership skills using confirmatory factor analysis(CFA)[J]. *Pro Soc Behav Sci*, 2015, 172: 717-724.
- [11] 郭英, 张梦柔, 谢雨菲. 社会支持量表(服刑人员版)的修订及信效度研究[J]. *现代预防医学*, 2016(18): 3374-3378.

(收稿日期: 2017-09-15 修回日期: 2017-11-24)

(上接第 1011 页)

促使内质网自噬的成核和延伸^[1]。内质网自噬已经成为当前研究的一个热点。雷帕霉素诱导内皮细胞内质网自噬是通过怎样的机制,也是以后值得关注和深入研究的一个方向。

参考文献

- [1] 何薇, 石元龙. 急性冠状动脉综合征患者经皮冠状动脉介入治疗前后左心功能对比研究 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(25): 3579-3580.
- [2] ADELMAN S J. Sirolimus and its analogs and its effects on vascular diseases[J]. *Curr Pharm*, 2010, 16(36): 4002-4011.
- [3] KHAN W, FARAH S, DOMB A J. Drug eluting stents: developments and current status[J]. *J Control Release*, 2012, 161(2): 703-712.
- [4] 龙向淑, 吴强, 张萍, 等. 症状不典型的冠状动脉药物支架内急性血栓形成 2 例 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(17): 2447-2448.
- [5] LIU S J, LIU W H, ZHONG Y, et al. Glycogen synthase kinase-3 β is involved in C-reactive protein-induced endothelial cell activation[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2013, 78(8): 915-919.
- [6] LIU S J, ZHONG Y, YOU X Y, et al. Insulin-like growth factor 1 opposes the effects of C-reactive protein on endothelial cell activation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 385(1/

2): 199-205.

- [7] LIU W, ZHOU X W, LIU S, et al. Calpain-truncated CRMP-3 and -4 contribute to potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons[J]. *Proteomics*, 2009, 9(14): 3712-3728.
- [8] JIN S, SHEN J N, GUO Q C, et al. 2-D DIGE and MALDI-TOF-MS analysis of the serum proteome in human osteosarcoma[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2007, 1(3): 272-285.
- [9] SANSON M, AUGÉ N, VINDIS C, et al. Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression[J]. *Circ Res*, 2009, 104(3): 328-336.
- [10] CHANG Y, WU Y, LIU W, et al. Knockdown of ERp44 leads to apoptosis via activation of ER stress in HeLa cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4): 606-611.
- [11] KAPUY O, VINOD P K, BNHEGYI G. mTOR inhibition increases cell viability via autophagy induction during endoplasmic reticulum stress - An experimental and modeling study[J]. *FEBS Open Bio*, 2014, 4: 704-713.
- [12] RABINOWITZ J D, WHITE E. Autophagy and metabolism[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1344-1348.

(收稿日期: 2017-09-18 修回日期: 2017-11-26)