

· 海外发表论文选读 ·

线粒体翻译延伸因子 Tu 对烧伤大鼠 心肌氧化损伤的影响

张东霞 颜洪 胡炯宇 张家平 滕苗 童大力 向飞 张琼

房亚东 梁光萍 黄跃生

严重烧伤后,心脏自身的肾素-血管紧张素系统迅即激活并引起心肌局部血流量下降,这一变化导致烧伤早期缺血缺氧性心肌损伤。前期研究显示,心肌局部血流量于烧伤后 10 min 开始下降,并在伤后 1、3 h 显著减少。烧伤后 1 h 起心肌力学参数即显著下降,提示心肌损害。由于心脏是循环动力器官,心肌损伤促进了严重烧伤后其他器官的缺血缺氧损伤。线粒体是心肌组织中的重要细胞器,执行细胞包括能量生成、代谢调控、离子稳定、活性氧簇(ROS)产生等在内的核心功能。正常情况下,线粒体内 0.2%~2.0% 的氧在代谢过程中会转变为过氧化物,ROS 的过量产生会导致线粒体氧化损伤和细胞死亡。因此,研究者在揭示心肌损伤的分子机制时常会聚焦在线粒体研究上。线粒体翻译延伸因子 Tu (EF-Tumt) 是一种核编码的线粒体蛋白,在线粒体内参与线粒体基因组编码的 13 个多肽的翻译,这 13 个多肽均为电子传递复合体中的成分。EF-Tumt 蛋白的第 336 位点由精氨酸突变为谷氨酰胺后可引起线粒体翻译缺陷,从而导致婴儿脑病。此外,在缺血性心肌中也观察到 EF-Tumt 磷酸化水平的增加。这些报道提示,EF-Tumt 的正常表达在维持心肌功能中发挥重要作用。

本文首先采用比较蛋白质组学的方法揭示烧伤后纯化心肌组织线粒体中的差异表达蛋白,以蛋白质印迹法验证蛋白表达后进一步采用小干扰 RNA (siRNA) 法下调差异蛋白表达以阐明其生物学意义。

1 材料与与方法

取 18 只无特殊病原体级成年健康雄性 SD 大鼠,体质量 280~350 g,按随机数字表法分为假伤组及烧伤后 1、3 h 组,每组 6 只。烧伤组大鼠采用常规方法制成部位 30% TBSA Ⅲ度烫伤模型,假伤组大鼠以 37℃ 水浴 18 s 假伤。以不连续密度梯度离心法提纯各组大鼠心肌组织线粒体,并以透射电镜、蛋白质印迹法验证其纯度与完整性。对各组纯化的心肌组织线粒体蛋白行双向凝胶电泳(2-DE)、考马斯亮蓝染色、凝胶扫描后获 2-DE 图谱,以 PDQuest 软件分析各组差异表达蛋白点,并将各蛋白点切下行胶内酶解、质谱分析后获差

异表达蛋白谱。蛋白质印迹法验证关键差异蛋白的表达趋势,比色分析法检测线粒体呼吸链复合体 I 活性与 ROS 含量,OxyBlot™ 蛋白质氧化检测试剂盒检测心肌组织蛋白羰基化水平,热稀释法测量各组大鼠的心排量。

体外以胰蛋白酶消化法分离 1~3 日龄大鼠乳鼠心肌细胞,采用差速贴壁与溴脱氧尿苷化学抑制法纯化。靶向干扰大鼠 EF-Tumt 的 siRNA 序列为 5'-CACTGTGGTGACAGGCAT-TGA-3',非特异性的对照序列为 5'-TTCTCCGAACGTGT-CACGT-3'。以每 50~100 个病毒颗粒感染 1 个细胞的感染复数标准,用包含靶向性与对照序列 siRNA 的重组腺病毒载体感染心肌细胞。72 h 后收集细胞,以蛋白质印迹法检测 siRNA 对 EF-Tumt 的干扰效果与呼吸链复合体 I 亚单位蛋白表达。Mito-SOX™ Red 探针法检测心肌细胞中 ROS 水平,OxyBlot™ 蛋白质氧化检测试剂盒检测细胞蛋白羰基化水平,CytoTox-ONE 均质膜完整性检测试剂盒检测细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放,采用比色分析法检测呼吸链复合体 I 活性。

2 结果

透射电镜与蛋白质印迹检测结果显示,在不影响线粒体完整性的情况下,不连续密度梯度离心后线粒体的纯度与富集程度较高。以假伤组与烧伤后 1、3 h 组大鼠的心肌组织线粒体蛋白行 2-DE,得到聚焦良好、显色清晰、相似性高的 2-DE 图谱,在各组胶上平均有 (395±6)、(391±14)、(385±13) 个蛋白点,各胶上至少有 89% 的蛋白点与 master 胶匹配。以 PDQuest 软件对各组图谱分析后得到 9 个烧伤后差异表达蛋白点,将各点行胶内酶解、质谱分析后获得差异表达蛋白谱;其中 8 个蛋白点在烧伤早期表达下降,分别为 TNF 受体相关蛋白 1 (TRAP1)、甲基丁烯酰辅酶 A 羧化酶 1 α 、电子转移黄素蛋白-泛醌氧化还原酶 (ETF-QO)、氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP) 依赖的苹果酸酶 3、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 脱氢酶 (泛醌) 黄素蛋白 1、EF-Tumt、长链乙酰辅酶 A 脱氢酶与短链乙酰辅酶 A 脱氢酶;1 个蛋白点表达增高,为 ATP 合酶 F1 复合体 α 亚单位。

3 个代表性蛋白 (EF-Tumt、短链乙酰辅酶 A 脱氢酶、TRAP1) 的蛋白质印迹检测结果与 2-DE 结果一致,证实了 2-DE 结果的准确性。与假伤组相比,烧伤后 1、3 h 组大鼠心肌组织线粒体呼吸链复合体 I 活性显著降低,线粒体内 ROS 生成与心肌组织蛋白羰基化水平显著升高。烧伤后 1、3 h 组大鼠的心排量分别下降到假伤组的 53% 与 36%。与对照序列相比,siRNA 干扰大鼠心肌细胞中 EF-Tumt 表达显著下

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.03.028

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信作者:黄跃生,Email:yshuang.tmmu@gmail.com,电话:023-65461696

降,细胞中 ROS 生成与蛋白羧基化水平显著升高,细胞 LDH 释放增多,呼吸链复合体 I 亚单位蛋白表达与活性均降低。

3 讨论

严重烧伤后,线粒体功能改变是引起烧伤后心肌功能障碍的重要原因。本研究观察到 9 个线粒体蛋白的表达在烧伤前后发生改变,根据其生理功能将这些蛋白分为 6 类:(1)分子伴侣蛋白,包括 TRAP1。TRAP1 是一种定位于线粒体,与热休克蛋白 90 同源,相对分子质量约为 75×10^3 的蛋白质,主要参与细胞凋亡调控。(2)氨基酸代谢相关酶,包括甲基丁烯酰辅酶 A 羧化酶 1α ,在亮氨酸代谢中催化代谢产物 3-甲基巴豆酰辅酶 A 转化成 3-甲基戊烯二酸单酰辅酶 A。(3)脂肪酸代谢相关酶,包括电子 ETF-QO、长链与短链乙酰辅酶 A 脱氢酶。ETF-QO 的主要作用是接受线粒体基质中电子传递链的电子并将它们传递到线粒体内膜的泛醌上,即将还原型黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH₂)的电子传递到辅酶 Q 形成氧化型黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和还原型辅酶 Q。当 ETF-QO 缺陷时,不能将 FADH₂ 还原为 FAD,因此使得以 FAD 为氢受体的脱氢酶不能正常发挥作用,这些脱氢酶包括脂肪酸 β 氧化的所有乙酰辅酶 A 脱氢酶与一些氨基酸分解代谢酶。在脂肪酸 β 氧化的第 1 步脱氢反应中,超长链、长链、中间链与短链乙酰辅酶 A 脱氢酶 4 个同工酶共同参与,乙酰辅酶 A 脱氢酶的缺陷会限制三羧酸循环的底物供应并引起游离脂肪酸聚集。(4)三羧酸循环相关酶,包括 NADP

依赖的苹果酸酶 3。该酶是三羧酸循环中的一个氧化脱羧酶,催化 L-苹果酸转变为丙酮酸和二氧化碳,并将 NADP 还原为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。(5)蛋白合成相关蛋白,包括 EF-Tumt。(6)呼吸链蛋白,包括 NADH 脱氢酶(泛醌)黄素蛋白 1 和 ATP 合酶 F1 复合体 α 亚单位。它们是核基因编码的呼吸链复合体 I 和 V 的亚单位。上述前 8 种蛋白表达降低引起呼吸功能损伤、ROS 生成增加、抗氧化能力损伤等生物效应。ATP 合酶 F1 复合体 α 亚单位表达的增高可能为抵抗上述各种损伤的内源性保护机制。

综上,本研究首次揭示了烧伤后心肌线粒体蛋白的表达改变。伴随线粒体蛋白的差异表达,笔者观察到烧伤后心肌线粒体中呼吸链复合体 I 活性下降,ROS 产生和蛋白羧基化水平增高并伴随心排量下降。结合分析差异表达线粒体蛋白的相关功能,笔者假设烧伤后 EF-Tumt 表达降低在介导上述损害中发挥重要作用。进一步体外培养心肌细胞,并以 siRNA 干扰 EF-Tumt 表达证实了该假设。该研究为防治烧伤后早期心肌损害提供了新线索。

[本文已以英文发表,全文见于“Zhang DX, Yan H, Hu JY, et al. Identification of mitochondria translation elongation factor Tu as a contributor to oxidative damage of postburn myocardium. J Proteomics, 2012, 77:469-479”]

(收稿日期:2013-01-31)

(本文编辑:谢秋红)

· 科技快讯 ·

严重烧伤后大鼠心肌自噬的研究

自噬是细胞内大分子降解的重要途径。正常情况下,细胞内基础水平的自噬对于维持其自身稳态具有重要意义,缺血缺氧等刺激可显著激活自噬,但其生物学意义尚具争议,因此成为目前缺氧损伤相关研究的热点。本研究探讨了自噬在严重烧伤大鼠心肌功能不全中的作用。研究采用 30% TBSA Ⅲ度烧伤的 SD 大鼠模型,分别检测自噬标志物 LC3 和 Beclin-1 在伤后 0、1、3、6 和 12 h 的蛋白表达。采用免疫荧光法检测伤后各时相点心脏内自噬性、凋亡性和肿胀性细胞死亡。在离体心脏 Langendorff 模型中检测伤后 6 h 的心功能变化,以西罗莫司激活自噬和 3-甲基腺嘌呤抑制自噬后检测自噬改变。在离体心脏 Langendorff 模型中,应用血管紧张素转换酶抑制剂依那普利拉、血管紧张素受体 I 阻断剂氯沙坦和活性氧簇抑制剂二亚苯基碘灌注,检测其对烧伤后心脏功能的影响。结果显示,伤后 3 h 起在心肌中检测到自噬性细胞死亡,其发生率约为总心肌细胞的 $(0.008 \pm 0.001)\%$,并于伤后 12 h 持续增加到 $(0.022 \pm 0.005)\%$ 水平。在对照组心脏中未见自噬性细胞死亡。与细胞凋亡相比,自噬性细胞死亡出现的时间早、数量多。在伤后 6 h 离体心脏实验中,西罗莫司能够增强细胞自噬并降低心功能,而 3-甲基腺嘌呤则发挥相反的作用。依那普利拉、氯沙坦和二亚苯基碘都具有抑制自噬、增强心功能的作用。研究者认为,严重烧伤使心肌自噬增多,自噬性死亡最早出现在伤后 3 h,这可能会导致烧伤后心功能不全。血管紧张素 II 和活性氧簇可能通过调节细胞信号转导,在这个过程中发挥重要作用。

朱明华,编译自《PLoS One》,2012,7(6):e39488;黄跃生,审校