

## 正常与脑缺血大鼠的脑皮质蛋白质差异分析鉴定

# Comparative Proteomic Analysis of Cerebral Cortex Between Middle Cerebral Artery Occlusion Rats and Normal Controls

赵晓峰\* 温景荣 王 舒 石学敏

ZHAO Xiao-Feng\*, WEN Jing-Rong, WANG Shu and SHI Xue-Min

天津中医学院第一附属医院, 天津 300193

First Teaching Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**摘 要** Wistar 大鼠随机分为正常组和模型组, 采用改进的线栓法制备模型, 在规定的时点快速断头取脑, 分离脑皮质组织, 提取蛋白质后双向电泳展示, 以 ImageMaster 2D Elite v3.01 软件对 2-DE 图谱进行差异表达分析, 目标蛋白点用基质辅助激光解析电离质谱测定肽质量指纹图进行鉴定。线粒体应激 70 蛋白前体、血小板活化因子乙酰基水解酶 IB $\beta$  亚单位、ADP 核糖基化因子蛋白 3、电压依赖性阴离子选择通道蛋白 1、泛素 C 末端水解酶同工酶 L1、突触结合蛋白等 11 个蛋白在模型 6h 组表达上调, 谷胱甘肽 S-转移酶 omega 1、谷胱甘肽 S-转移酶 P、Cu-Zn 超氧化物歧化酶、ATP 合酶 D 链、G 蛋白  $\beta$  亚单位 1、微管蛋白  $\beta$  链 15、苹果酸脱氢酶等 15 个蛋白在模型 6h 组表达上调。胆绿素还原酶 B、细胞因子 A4 前体为模型组新出现点, 腺苷酸激酶同工酶 1 在模型组消失, Thioredoxin peroxidase 1 在模型组分为 2 个点。以双向电泳技术得到分辨率较好的电泳图谱, 并初步鉴定脑缺血后差异表达蛋白, 为深入研究缺血性脑损伤病理机制奠定了基础。

**关键词** 比较蛋白质组学, 双向电泳, 基质辅助激光解析电离质谱, 脑缺血

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)06-0934-08

**Abstract** In order to provide a complete picture of pathogenesis in cerebral ischemia, cerebral cortex in MCAO rats were analysed for alteration in their proteomes. Comparative proteome analysis was used to compare signal corresponding to individual cerebral cortex proteins on a two-dimensional gel between MCAO rats and the normal control (NC) group. After sample preparation, two-dimensional electrophoresis separated proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue. The image data were analyzed on a Dell computer using Image Master v 3.01 software. In cerebral cortex, 30 proteins were differentially expressed in MCAO rats compared with NC. There were 11 spots significantly increased, 15 spots significantly decreased and Adenylate kinase isoenzyme 1 was detected only in NC group, biliverdin reductase B, small inducible cytokine A4 [Precursor] only in MCAO group. Peroxiredoxin 2 divided into two points in MCAO6h group. In the end, this approach may lay a foundation for the further investigation of pathogenic mechanisms in cerebral ischemic injury.

**Key words** comparative proteomics, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), cerebral ischemia

Received: May 28, 2005; Accepted: August 27, 2005.

This work was supported by a grant from Science and Technology Development Foundation of Tianjin Higher Education (No. 20030110).

\* Corresponding author. Tel: 86-22-27432210; E-mail: zhxf67@sohu.com

天津市高等学校科技发展基金资助项目 (No. 20030110)

脑血管病是导致人类死亡的三大疾病之一,也是中老年人致残的主要原因,其中缺血性脑血管病占75%~80%,且随着世界人口老龄化进程的加快,其威胁及危害将会越来越严重,因此,对本病病理机制和防治措施的研究受到了高度重视。

多年来,研究者们广泛研究了导致脑缺血性损伤的病理生理机制,包括能量代谢障碍、兴奋性氨基酸的神经毒性、钙超载、磷脂膜降解和脂类介导的毒性作用、缺血性脑水肿。近年来随着分子生物学技术的飞速发展和向神经学科的渗透,大量学者深入到基因水平对脑缺血性损伤进行了深入的机理探讨,认识到缺血后脑内多种基因表达异常,并影响相关蛋白的合成,如脑缺血早期蛋白合成普遍受到抑制,而即早基因和热休克蛋白表达增加。由于蛋白质是生物细胞赖以生存的各种代谢和调控途径的主要执行者,因此蛋白质不仅是多种致病因子对机体作用最重要的靶分子,而且也成为大多数疾病干预措施的靶标,乃至直接的药物,故随着人类基因组计划的完成,蛋白质组学成为新世纪生命科学研究的前沿<sup>[1]</sup>。双向电泳结合质谱分析作为蛋白质组研究的基础性技术平台,得到生物学界的充分关注<sup>[2]</sup>。

蛋白质组学可以比较不同样品之间蛋白质整体表达水平,是揭示疾病分子机制、发现疾病标志蛋白、寻找新的药物靶标的理想工具,也是生命科学进入后基因组时代的标志之一。大脑中动脉是人类卒中的多发部位,大脑皮质是脑缺血易损伤主要部位之一,但迄今为止尚没有发现针对缺血脑皮质组织进行蛋白质组研究的报道。

由于临床研究的局限性,动物实验成为研究脑血管疾病的重要途径。在众多动物中,啮齿类动物脑血管解剖和生理接近于人类,且来源充足、品系纯化,在生态学和伦理学方面易为公众所接受而最适合卒中研究。大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)是人类卒中的多发部位,大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型被认为是局灶性脑缺血的标准动物模型,目前,线栓法 MCAO模型是研究缺血性脑血管病的常用模型,在科研中广泛应用。

本实验利用双向电泳技术对正常和 MCAO 大鼠病灶侧脑皮质蛋白质进行比较蛋白质组学研究,获得了较满意的双向电泳图谱,并用专业分析软件包对 2-DE 图谱进行了分析,差异蛋白质点经 MALDI-TOF-MS 测定肽质量指纹图谱进行鉴定,为进一步研究其病理机制提供了实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 设备:** Universal 16R 低温高速离心机(德国 Hettich 公司), Beckman L7-80 低温超速离心机(德国 Beckman 公司), UV-2501PC 紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司), IPGphor 电泳单元(瑞典 Pharmacia Biotech 公司), PROTEIN- II<sup>®</sup> XI CelK(Bio-Rad 公司), Image scanner(瑞典 Pharmacia Biotech 公司), ImageMaster 2D. v 3.01 分析软件(瑞典 Pharmacia Biotech 公司), MALDI-TOF-MS 质谱仪(德国 Bruker 公司)。

**1.1.2 试剂和材料:** pH3-10 非线性(NL)18cm IPG 预制胶条、IPG Buffer、低分子量蛋白质标准均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司,丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、过硫酸铵(APS)、甘氨酸、苯甲基磺酸氟(PMSF)由 Sigma 公司分装,尿素、3-[ (3-胆酰胺丙基)-二乙胺 ]丙磺酸(CHAPS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)为 AMRESCO 公司分装,乙二氨四乙酸(EDTA)Bebeo 公司分装,Commassie Brilliant Blue R-250、Tris-base 为 USB 公司分装,碘乙酰胺购自 Fluka 公司,硫脲及其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.1.3 溶液配制:

(1) 样品裂解液:7mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、4% CHAPS、10mmol/L DTT、1mmol/L EDTA、1mmol/L PMSF、40mmol/L Tris-base, -20℃保存。

(2) IPG 干胶条再水化液:8mol/L 尿素、2%(W/V) CHAPS、少量溴酚蓝、2% IPG Buffer、20mmol/L DTT(用前加)。

(3) SDS 平衡缓冲液:50 mmol/L Tris-HCl (pH8.8) 6mol/L 尿素、30% 甘油、2% SDS、少量溴酚蓝, -20℃保存。平衡液工作液 a:使用前 10 mL 平衡缓冲液加 100mg DTT。平衡液工作液 b:使用前 10 mL 平衡缓冲液加 250mg 碘乙酰胺。

(4) 13% SDS-PAGE 配制:参照文献 [3]。

(5) 凝胶脱色液:100mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液:乙腈(1:1)。

(6) 酶解缓冲液:10mmol/L CaCl<sub>2</sub>: 50mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1)。

(7) 胰蛋白酶酶解液:4μL 胰蛋白酶加 96μL 酶解缓冲液。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组:健康成年雄性 Wistar 大鼠

(II级),体重 250~300g,购自中国医学科学院实验动物研究中心,随机分为正常组、模型 6h 组,每组各 8 只。参照 Longa<sup>[4]</sup>等报道的方法,采用颈内动脉插入线栓法建立 MCAO 模型,大鼠术后清醒后参照 Kuluz<sup>[5]</sup>神经缺陷评分标准进行神经功能缺陷评分,其评分达 3 分者视为造模成功,正常组和模型组分别在预定时间快速断头处死,冰上剥离缺血侧大脑皮质,切去额极,预冷生理盐水冲洗脑组织中的血液,每组各取 1 只大鼠缺血侧脑组织,10% 福尔马林固定,常规脱水,浸蜡,包埋,切片,HE 染色,光镜下观察皮质形态学改变,其余称重后液氮速冻,-80℃ 保存备用。

**1.2.2 蛋白质样品准备** 标本混合液氮用研钵研磨成白色粉末,加入预冷的玻璃匀浆器中,按 1:3.5 比例加入样品裂解液在冰浴中匀浆,匀浆液于 4℃,12 000g 离心 10min,吸取上清液 4℃,150 000g 离心 60min,避开上层漂浮的脂质层,吸取上清液 4℃,40 000g 再次离心 45min,取离心上清,-80℃ 保存备用。蛋白质定量采用 Bradford 法<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 蛋白质双向电泳分离** 第一向等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF)采用固相化 18cm IPG 预制干胶条(pH3~10 非线性,NL),再水化同时上样,上样量 1.5mg。主要参考 IPGhor<sup>TM</sup> 等电聚焦系统操作指南进行。

剥开 IPG 胶条保护膜后,将 IPG 胶条胶面朝下放置于预先加好样品液的聚焦槽凹槽中,小心赶走 IPG 胶条下面的气泡,Immobiline DryStrip 覆盖油覆盖后放于等电聚焦仪上,30V 低电压泡胀 12h 后进行等电聚焦电泳<sup>[7]</sup>。参数设置如表 1。

表 1 等电聚焦电泳参数设置

Table 1 IEF parameters

Steps	Voltage/V	Voltage/V	t/h	Temperature/℃
1	200	500	1	20
2	500	1000	1	20
3	1000	5000	1	20
4	5000	8000	8	20

IEF 后,IPG 胶条从电泳槽中取出,分别在 SDS 平衡液 a 和 SDS 平衡液 b 中平衡 15min,然后用滤纸吸掉胶条上多余的平衡液,转入预先灌制好的 SDS-PAGE 胶上,在 BIO-RAD PROTEIN-CELL 上进行第二向电泳,参数设置为:恒流 20mA,40min;30mA,4h,待溴酚蓝前沿至阳极约 5mm 时停止电泳。参照文献<sup>[8]</sup>进行考马斯亮蓝染色。

**1.2.4 凝胶图像分析** 用 Image Scanner 将染色后的 2-DE 凝胶投射扫描至 DELL 商用电脑工作站中,光学分辨率为 400dpi,存贮为 tif 文件,以 Image Master 2D Elite v3.01 software 进行图像分析。使用点检测向导,通过调节灵敏度、算子(operator)、背景因子等参数大小,确定最佳检测结果,自动检测完成后,仍有一些点未被识别出,还有一些点是假点,还有因距离过近而将多个点误认为一个点的情况,需要进行手工编辑,如增加斑点、删除斑点、提高峰值、边缘增长、分割斑点等。为消除误差,将同组的三张 2-DE 凝胶拟合成一张平均胶,然后进行组间比较。以正常组 2-DE 凝胶为参考胶,模型组与之匹配,寻找差异蛋白点。参照文献<sup>[9]</sup>,蛋白质表达水平上升或下降 200% 的点选择为目标点,进行鉴定。

**1.2.5 蛋白质的胶内酶解** 蛋白质的胶内酶解参照 Fernandez J 等<sup>[10]</sup>的方法并加以改进,将差异显示蛋白质斑点,分别从凝胶上切割下来,切成微小碎块,置于 EP 管中,加入 50 $\mu$ L 新鲜配制的凝胶脱色液,振荡脱色至凝胶粒无色,小心吸出脱色液,然后胶粒置于低温真空干燥泵中抽干,加入 5~10 $\mu$ L 胰蛋白酶酶解液,混匀后加入 10 $\mu$ L 不含酶的酶解缓冲液,4℃ 放置 30min,37℃ 水浴 12h,再加入 5% 三氟乙酸(TFA)5 $\mu$ L,37℃ 水浴 1h,离心,吸取上清液至新管中。再分别加 5 $\mu$ L 5% TFA、乙腈(1:1)混合液和 5 $\mu$ L 乙腈,吸取上清液至一新管中,真空干燥后用 MALDI-TOF-MS 测定肽质量指纹图谱。

**1.2.6 MALDI-TOF-MS:**

样品制备与脱盐:使用 ZIP TIP<sup>TM</sup> C18 移液器吸嘴脱盐同时进行样品制备,操作如下:首先用 50% 的乙腈湿润吸嘴,然后用 0.1% 的 TFA 水溶液平衡 2 次,将萃取后冻干的样品用 20 $\mu$ L 0.1% TFA 水溶液溶解,用吸嘴反复在样品液中吸进压出,进行多次循环操作,然后用 0.1% TFA 水溶液洗涤 2 次,另取一干净的小 EP 管吸入 5 $\mu$ L CHCA 饱和基质溶液,再将带有样品的吸嘴在其中反复洗脱,取 2 $\mu$ L 点于点样板上,置空气中自然风干。肽段样品用 MALDI-TOF-MS 检测,质谱检测是在正离子反射模式中进行的, N<sub>2</sub> 激光源,波长 337nm,飞行管长 3m,加速电压 20kV,反射电压 23kV,基质为 CHCA,质谱使用基质峰和胰酶自动降解离子峰作为内部标准校正。获得的混合物肽片段质量指纹图谱通过 Internet(<http://www.matrix-science.com>) 在 Swiss-prot 数据库搜索进行蛋白鉴定,使用的检索软件为 Mascot 公司提供的免费肽质量指纹图谱检索软件。  
http://journals.im.ac.cn

## 2 结果

### 2.1 光镜下形态学改变

本试验中应用 MCAO 鼠进行研究,造模后进行

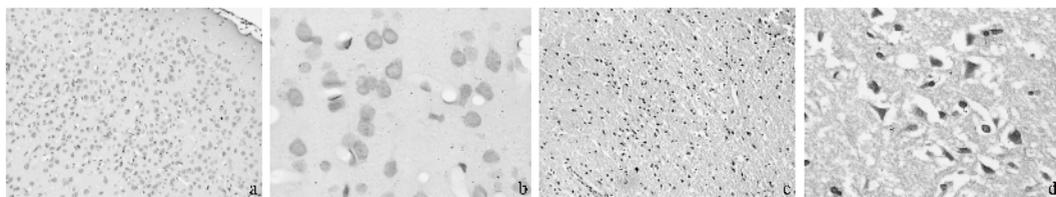


图 1 正常组和模型组大鼠脑皮质组织 HE 染色图

Fig. 1 HE-stained image of rat cerebral cortex in normal control and MCAO group

a: HE  $\times 100$  (NC); b: HE  $\times 400$  (NC); c: HE  $\times 100$  (MCAO); d: HE  $\times 400$  (MCAO).

### 2.2 模型组和正常组大鼠脑皮质蛋白质组双向电泳(2-D)图谱

我们采用相同上样量的正常与局灶性脑缺血模型大鼠(6h)缺血侧脑皮质蛋白质进行双向电泳,第一向采用固相化 pH 梯度胶(pH3~10NL,18cm)进行等电聚焦,第二向采用 13% SDS-PAGE 进行电泳,胶条再水化同时上样,取得了较满意的电泳图谱, Coomassie Brilliant Blue 染色, Image Scanner 扫描后,用 Image Master 2D Elite v3.01 分析软件可以检测到 700 个左右蛋白质斑点,且重复性较好,见图 2、3。由于脑组织中富含脂类,对蛋白质的提取、溶解及 2DE 都会有极大的影响,我们采用低温超速离心方法,取得了良好去脂效果。而不同实验对样品制备

神经功能缺损评分,评分达 3 分者视为模型成功,进入下一阶段,HE 染色,光镜下观察缺血侧大脑皮质组织形态学。模型 6h 组可见神经水肿,血管周围炎性细胞浸润,胶质细胞增生,嗜神经现象,见图 1。

方法有不同要求,本实验采用组织混合液氮研磨成粉末,加入样品裂解液匀浆,样品裂解液中加入硫脲,明显提高了蛋白质的溶解度,在 IPG Dry Strip 泡胀时加 30V 低电压泡胀 12h,有效提高了 2DE 图谱质量。但是在碱性端仍有部分蛋白质没有得到很好的分离,可能是脑组织含有较多的碱性蛋白质所致。

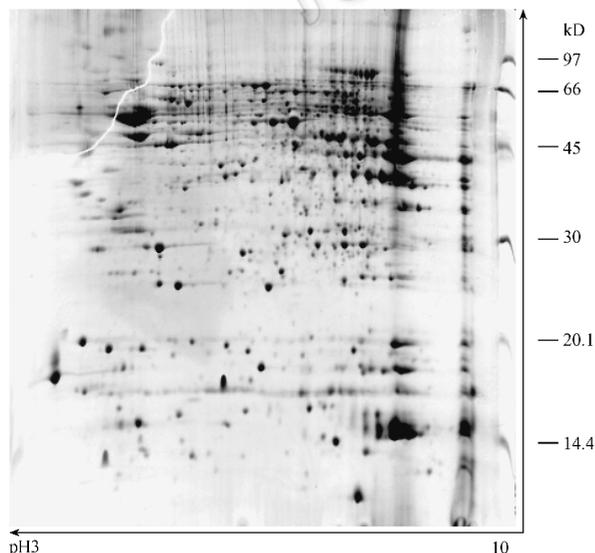


图 2 正常组大鼠脑皮质蛋白质 2-DE 图谱,考马斯亮蓝染色, pH3-10, NL, 18cmIPG 胶条

Fig. 2 Typical Coomassie brilliant blue R-250 stained 2-DE image of rat cerebral cortex proteins in Normal Control group (pH3-10, NL, 18cmIPG gel)

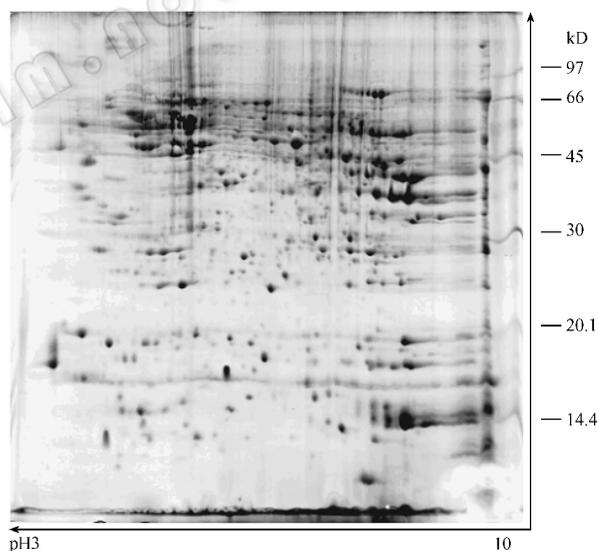


图 3 MCAO 模型组大鼠脑皮质蛋白质 2-DE 图谱(考马斯亮蓝染色, pH3~10, NL, 18cmIPG 胶条)

Fig. 3 Typical Coomassie brilliant blue R-250 stained 2-DE image of rat cerebral cortex proteins in MCAO group (pH3~10, NL, 18cmIPG gel)

### 2.3 差异表达蛋白

应用双向电泳图谱专业分析软件 ImageMaster 2D Elite v 3.01 software 对两组大鼠脑皮质蛋白质双向电泳图谱进行了比较分析,和正常组比较, MCAO 模型组有 49 个蛋白质斑点有表达量上的差异,并有 3 个蛋白质斑点消失,新出现 5 个蛋白质斑点,差异点广泛分布于 2DE 图谱上,局部显示图见图 4。

我们对差异显示蛋白质斑点用 trypsin 进行胶内酶切, MALDI-TOF-MS 测定肽质量指纹谱, www.matrixscience.com 网站上, 利用 MASCOT 软件检索 Swissprot 蛋白质数据库进行了鉴定, 共鉴定出 30 个蛋白质, 其中模型组消失的 3 个斑点鉴定出 1 个, 新出现的 5 个斑点鉴定出 2 个, 鉴定蛋白的序列覆盖率为 19% ~ 63%, 和文献报道的基本一致<sup>[11]</sup>。鉴定蛋白亚细胞定位包括线粒体、细胞质、细胞核、细胞膜、突触等, 涉及多种蛋白种类, 如代谢酶类、信号蛋白、抗氧化蛋白、热休克蛋白及分子伴侣、泛素及蛋白酶体蛋白、胶质相关蛋白、神经元特异蛋白、神经再生修复相关蛋白等。其中线粒体应激 70 蛋白前体、血小板活化因子乙酰基水解酶 IB $\beta$  亚单位、ADP 核糖基化因子蛋白 3、电压依赖性阴离子选择通道蛋白 1、泛素 C 末端水解酶同工酶 L1、突触结合蛋白等 11 个蛋白在模型组表达上调, 谷胱甘肽 S-转移酶 omega 1、谷胱甘肽 S-转移酶 P、Cu-Zn 超氧化物歧化酶、ATP 合酶 D 链、G 蛋白  $\beta$  亚单位 1、微管蛋白  $\beta$  链 15、苹果酸脱氢酶等 15 个蛋白在模型组表达上调。鉴定蛋白相关信息见表 2。

图 A1 中点 Q9R0P9 为泛素 C 末端水解酶 L1, 在正常组表达量较低, 模型组明显升高, 点 P19234 为线粒体 NADH-泛醌氧化还原酶 24kD 亚单位, 在模型组表达上调, P02600 为阻凝蛋白轻链, 在模型组表达上调, P35704 为硫氧还蛋白过氧化物酶, 在模型组分为 2 个点, 图 B1 中 N 代表模型组新出现点, 未鉴定出。图 B2 中箭头所指点为模型组新出现点, 正常组不表达, 未成功鉴定, 图 A3 中所圈定 2 个点只在正常组表达, 模型组未表达, 未成功鉴定, 图 A4 中 Q923D2 为胆绿素还原酶 B, 只在正常组表达。

图 B4 中三角箭头所指点在模型组表达上调, 也未成功鉴定出。

参与糖酵解和三羧酸循环中的关键酶 3 磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 腺苷酸激酶同工酶 (adenylate kinase isozyme 1), 磷酸丙糖异构酶, 苹果酸脱氢酶等表达改变, 表明脑缺血后能量代谢发生障碍。

脑缺血缺氧可导致不同程度的脑功能障碍, 其发生机理与脂质过氧化损伤有关<sup>[12]</sup>。脑缺血性损伤后, 脂质过氧化损伤, 大量自由基产生, 氧化损伤蛋白、脂质、DNA、RNA, 导致细胞坏死, 还可间接导致细胞凋亡的发生<sup>[13]</sup>。本研究中观察到 Cu-Zn SOD 在 MCAO 组表达下调, 和 Nobuo Noshita 的观察一致。谷胱甘肽 S 转移酶 P、谷胱甘肽 S 转移酶 omega 1 在 MCAO 组表达下调, 提示脑缺血后清除氧自由基能力发生改变, 硫氧还蛋白过氧化物酶 1 (Thioredoxin peroxidase 1) 和细胞氧化还原反应的调节有关, 通过硫氧还蛋白系统产生的能量还原过氧化物、超氧化物, 除了在清除自由基方面有重要作用外, 还通过调节细胞间  $H_2O_2$  浓度参与生长因子和肿瘤坏死因子 alpha 的信号调节机制, 本研究发现硫氧还蛋白过氧化物酶在模型组分为 2 个点, 其生物学意义值得进一步研究。

HSP70 是体内很好的人们已经认识到的内源性抗氧化物, 它对抗自由基, 具有某些外源性抗氧化物所不具有的进入氧化应激发生部位的优点, 因而在抗损伤方面更有效<sup>[14]</sup>。线粒体应激 70 蛋白前体属热休克蛋白 70 家族, 模型组表达上调, 提示缺血后氧化应激反应增强。

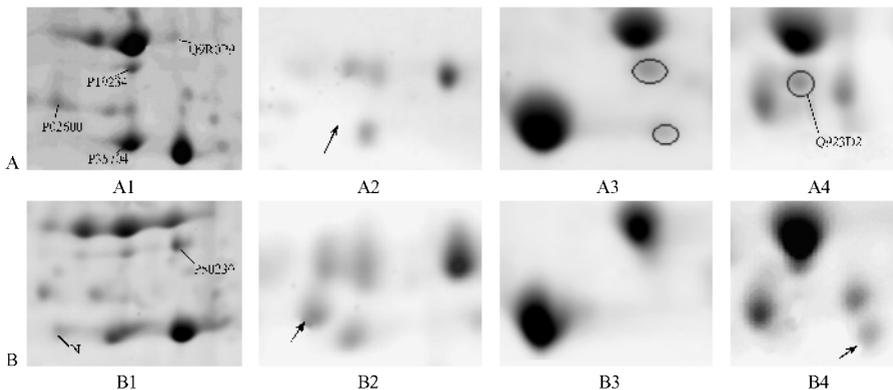


图 4 差异表达蛋白局部显示图

Fig. 4 Partial 2-DE images of rat cerebral cortex proteins in MCAO and NC group, showing differences in the protein expression level among them

Figure A and B represent the NC group and the MCAO group respectively.

表 2 模型组和正常组差异表达蛋白

Table 2 Differentially expressed proteins between MCAO group and the NC

Spot Num.	Access number	Abbr. name	Gene name	Protein name	Mr	pI	MALDI-TOF-MS peptide		
							Matching	Total	Sequence coverage
Up-regulated in MCAO rats									
H1	P48721	GR75-RAT	Hspa9	Stress-70 protein , mitochondrial [ Precursor ]	73843	6.2	9	19	25
H2	Q63228	GLMB-RAT	Gmfb	Glia maturation factor $\beta$	16765	5.2	6	19	37
H3	Q61206	PA1B-MOUSE	Pafah1b2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB beta subunit	25647	6.2	5	18	20
H4	P9R0P9	UCL1-RAT	Uchl1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	24822	5.14	8	20	60
H5	P02600	MLE1-RAT	Myl1	Myosin light chain 1 , skeletal muscle isoform	14071	11.75	9	24	53
H6	P60711	ACTB-RAT	Actb	Beta-actin	41710	5.29	8	21	26
H7	Q8R5L7	FGFE-RAT	Fgf14	Fibroblast growth factor-14	27702	10.06	5	13	34
H8	P37996	ARL3-RAT	ARD3	ADP-ribosylation factor-like protein 3	20614	7.3	6	18	45
H9	Q9Z2L0	POR1-RAT	Vdac1	Voltage-dependent anion -selective channel protein 1	30606	8.6	8	21	29
H10	P21707	SYT1-RAT	Syt1	Synaptotagmin-1	47764	8.4	7	18	19
H11	P19637	TPA-RAT	Plat	Tissue-type plasminogen activator [ Precursor ]	62862	8.55	6	13	20
Down-regulated in MCAO rats									
D1	P04691	TBB1-RAT	None	Tubulin beta chain	49931	4.79	13	35	27
D2	P34067	PSB4-RAT	Psmb4	Proteasome subunit beta type 4 [ Precursor ]	25891	6.8	5	18	28
D3	P31399	ATPQ-RAT	Atp5h	ATP synthase D chain , mitochondrial	18677	6.6	5	18	31
D4	P14152	MDHC-MOUSE	Mdh1	Malate dehydrogenase , cytoplasmic	36494	6.5	8	16	26
D5	Q9Z339	GTO1-RAT	Gsto1	Glutathione S-transferase omega 1	27651	6.25	11	33	45
D6	P25113	PMG1-RAT	Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	28497	6.21	8	40	48
D7	P63018	HS7C-RAT	Hsc70	Heat shock cognate 71 kDa protein	70827	5.37	11	22	22
D8	P04906	GTP-RAT	Gstp1	Glutathione S-transferase P	23293	7.30	6	21	43
D9	P02688	MBP-RAT	Mbp	Myelin basic protein S	14184	11.75	8	38	51
D10	P07632	SODC-RAT	Sod1	Superoxide dismutase [ Cu-Zn ]	15771	5.89	9	32	47
D11	P60901	PSA6-RAT	Pmsa6	Proteasome subunit alpha type 6	27382	6.34	11	27	33
D12	P48500	TPIS-RAT	Tpi1	Triosephosphate isomerase	27285	6.8	7	15	37
D13	P49432	ODPB-RAT	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit , mitochondrial precursor	38823	5.94	14	31	45
D14	P19234	NUHM-RAT	Ndufv2	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit , mitochondrial precursor	26511	6.00	5	17	29
D15	P54311	GBB1-RAT	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein $\alpha 1(\gamma S) \gamma (T)$ beta subunit 1	37353	5.60	12	32	44
Expressed only in NC rats									
O1	P39069	KAD1-RAT	Ak1	Adenylate kinase isoenzyme 1	21588	7.71	5	8	24
Expressed only in MCAO rats									
N1	Q923D2	Q923D2	Blvrb	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	22080	6.29	9	26	63
N2	P50230	SY04-RAT	Ccl4	Small inducible cytokine A4 [ Precursor ]	10234				
Divided into 2 points in MCAO rats									
X1	P35704	PDX2-RAT	Prdx2	Peroxioredoxin 2	21941	5.30	5	18	35

大量证据表明,缺血后急性炎症反应促进了继发性脑损害的进展<sup>[15]</sup>。Small inducible cytokine A4为巨噬细胞炎症蛋白 1-beta,仅在模型组表达,说明炎症反应是脑缺血性损伤机制之一。胆绿素还原酶 B 催化血红素降解过程中产生的胆绿素还原成胆红素,在血红素降解的全过程中具有重要作用,其在脑

缺血性损伤中的作用有待于进一步研究。

在急性缺血性脑血管病的发病过程中,血小板功能亢进是一极其重要的因素<sup>[16]</sup>。血小板活化的分子基础是胞内骨架蛋白的变化,其中肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 磷酸化肌球蛋白轻链,促使肌球蛋白与肌动蛋白结合在血小板活化过程中起重要作用。

用<sup>[17]</sup>。本研究发现肌球蛋白轻链 1 和肌动蛋白  $\beta$  在 MCAO 组表达上调,推测可能和血小板的早期活化有关。

突触结合蛋白 1 在模型组表达上调,有可能影响囊泡膜与质膜的融合和泡裂外排,从而影响递质释放,在信号转导方面出现功能异常,影响进一步的神经功能。G 蛋白及其相关的受体和效应蛋白对维持正常的中枢神经系统功能有显著作用。本试验中发现 G 蛋白  $\beta 1$  在 MCAO 组表达下调。而生长因子作为内源性信号蛋白对细胞的增殖、分化及功能具有强烈的调节作用。它们与细胞表面高亲和性受体结合后,启动了多种信号转导过程,最终诱发新基因表达和蛋白质合成。无论在体外还是在体内,生长因子都被证实有神经保护作用。成纤维细胞生长因子 14、神经胶质成熟因子  $\beta$  在 MCAO 组表达上调,可能在脑缺血后发挥了保护作用。

缺血性损伤时神经微丝和微管破坏,引起细胞骨架崩解,引发细胞坏死或凋亡样损害。Kondo Y 等<sup>[18]</sup>以原位杂交和 Northern blotting 观察自发性高血压大鼠短暂性局部缺血 3h 后细胞骨架蛋白  $\alpha$ -tubulin 和  $\beta$ -actin mRNA 的变化,结果发现 2 周后  $\alpha$ -Tubulin mRNA 在皮层减少, $\beta$ -actin mRNA 在顶叶皮层表达增加,推测缺血诱导的  $\beta$ -actin mRNA 表达增加可能反应了缺血区微丝合成,是缺血区突触联系受损的代偿。我们观察到, $\beta$ -actin 在 MCAO 组表达上调,微管蛋白  $\beta 15$  在 MCAO 组表达下调,可能反应了缺血区神经微丝和微管合成障碍,细胞结构遭到破坏。磷脂碱性蛋白 S 在 MCAO 组表达下调,提示当脑组织缺血性损害时,不仅累及大脑灰质使神经元损害,同时,脑白质髓鞘脱失可能也较为严重。

泛素通路又称为泛素系统或泛素蛋白酶体通路,除泛素外,还包括 4 种酶家族:泛素活化酶、泛素结合酶、泛素蛋白连接酶及去泛素酶,它们均以多种异构体形式存在,是新发现的另一蛋白质降解通路<sup>[19]</sup>,也是体内重要的细胞调控体系<sup>[20]</sup>。Hu 等人的研究表明在短暂性脑缺血后 4 h,泛素化修饰蛋白质在海马神经元中持续增加,并且可能导致了神经元的缺血性坏死<sup>[21]</sup>。而 UCH-L1 是去泛素酶中的泛素 C 末端水解酶,是一种硫基蛋白酶,识别和水解结合在泛素 C 末端甘氨酸残基的短肽及聚泛素链,使泛素游离或成为可重复利用的泛素。本研究发现在 UCH-L1 在 MCAO 组表达高于正常对照组,其调控机制有待于进一步研究。

蛋白酶体是细胞内主要的非溶酶体性质的苏氨酸蛋白酶,涉及到许多细胞过程,如清除异常蛋白质,包括错误折叠蛋白、变性蛋白、受损蛋白及部分正常蛋白。Chondrogianni N 等<sup>[22]</sup>最近发现,蛋白酶体  $\beta 5$  亚单位过表达可以增加蛋白酶体的组装,改善氧化应激反应。本研究发现在蛋白酶体  $\beta 4$  亚单位前体和蛋白酶体  $\alpha$  亚单位 6 在 MCAO 组下调。

线粒体渗透性转运小孔(permeability transition pore,PTP)在细胞坏死和细胞凋亡中发挥作用,它是由电压依赖性阴离子通道复合体构成的,氧化应激条件下,细胞内  $Ca^{2+}$  浓度升高,细胞能量负荷减少,孔道开放,允许低分子量的溶质跨膜进入膜内。线粒体渗透性转运小孔开放可能是细胞缺血性坏死或凋亡病理机制中的重要因素之一,和凋亡诱导因子、细胞色素 C、及 BAX 的释放有关,可能启动了细胞凋亡<sup>[23]</sup>。PTP 抑制剂可以减轻谷氨酸盐介导的线粒体膜去激化和细胞死亡<sup>[24]</sup>,在缺血性脑损伤中具有保护作用<sup>[25]</sup>。电压依赖性阴离子通道蛋白 1 (Voltage-dependent Anion Channel 1)是 PTP 的组成成分,也是 PTP 抑制剂的靶蛋白之一<sup>[26]</sup>。本研究发现在电压依赖性阴离子通道蛋白 1 在 MCAO 组表达上调,可能和缺血后细胞凋亡的启动有关。组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)在纤溶系统活化中起启动作用。关于 t-PA 在神经系统中所起的作用与它的蛋白酶活性之间的关系,有许多不同的看法,有学者认为 t-PA 可导致神经细胞死亡,但直接向脑内灌注 t-PA 并不会引起神经元的死亡<sup>[27]</sup>,有的学者甚至认为体内和体外无蛋白酶水解活性的 t-PA 对锌离子引起的神经元损伤有保护作用<sup>[28]</sup>。t-PA 对神经元作用的确切机制,有许多未明之处。本研究中发现 MCAO 组组织型纤溶酶原激活物前体表达上调,可能是脑缺血后纤溶活性降低,内源性纤溶酶原消耗过多引起的应激反应。

ADP-核糖基化,属蛋白质翻译后修饰。Katayama T 等<sup>[29]</sup>报道沙土鼠短暂性前脑缺血后诱导了 ADP 核糖基化因子样基因 ARF4L 的表达,ADP 核糖基化因子样基因生理作用尚不清楚,可能参与了内质网和高尔基体间的囊泡转运,属小 GTPase 超家族。我们发现 ADP-核糖基化因子样蛋白 3 在 MCAO 组表达上调,其在脑缺血性损伤中的作用及机制值得进一步研究。

致谢 本试验得到了国家生物医学分析中心蛋白质组实验室全体同志的大力支持,在此表示感谢。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000 **405**: 837 - 846
- [ 2 ] Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Biotechnol*, 1999, **17**(3): 121 - 127
- [ 3 ] Guo YJ (郭尧君). Experiment Technique in Protein Electrophoresis. Beijing: Science Press, 1999 pp. 140 - 141
- [ 4 ] Zea Longa EL, Weinstein RP, Carlson S *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, **20**(1): 84 - 91
- [ 5 ] Kuluz JW, Prado RJ, Dietrich D *et al.* The effect of nitric oxide synthase inhibition on infarct volume after reversible focal ischemia in conscious rats. *Stroke*, 1993, **24**: 2023 - 2031
- [ 6 ] Bollag DM, Edelman SS. Protein Methods. 2nd. New York; Wiley Liss, Inc. 1999 pp. 141 - 142
- [ 7 ] Gorg A, Bough G, Obermaier C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoreses immobilized pH gradients in the first dimensional state of the art and the controversy of vertical and horizontal systems. *Electrophoresis*, 1995, **16**(7): 1079 - 1086
- [ 8 ] Kurt K, Michael F, Gert L. A rat brain protein expression map including cytosolic and enriched mitochondrial and microsomal fractions. *Electrophoresis*, 2003 **24**: 1847 - 1870
- [ 9 ] Linda Paulson, Peter Martin, Anders Persson *et al.* Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801 treated rats. *Neurosci Res*, 2003 **71**: 526 - 533
- [ 10 ] Fernandez J, Gharahdaghi F, Mische SM. Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels or polyvinylidene difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Electrophoresis*, 1998, **19**: 1036 - 1045
- [ 11 ] Willy VB, Catherine D, Carla P *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins. *Proteomics*, 2002 **2**: 868 - 876
- [ 12 ] Weiss ST. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand*, 1986 **548**: 9 - 14
- [ 13 ] Toyoda T, Kassell NF, Lee KS. Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *Neuroreport*, 1997, **8**(4): 847 - 851
- [ 14 ] Shego N, Waro T, Yoshihiko U *et al.* Ischemic tolerance due to the induction of FLSF70 in a rat ischemic recirculation model. *Brain Res*, 1993 **615**: 281 - 288
- [ 15 ] Siow RI, Sato H, Vhnn GE. Heme oxygenase-carbon monoxide signaling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide. *Cardiovascular Res*, 1999, **41**: 385 - 394
- [ 16 ] Uan-Beek J, Chen P, Bernaudin M *et al.* Glial responses clusterin, and complement in permanent focal cerebral ischemia in the mouse. *Glia*, 2000 **31**: 3950 - 3964
- [ 17 ] Joseph R, Andrea GD, Oster SB *et al.* Whole blood platelet functions in acute ischemic stroke. *Stroke*, 1989 **20**: 38 - 43
- [ 18 ] Ondo Y, Ogawa N, Asanuma M *et al.* Regional changes in alpha-tubulin and beta-actin mRNA accumulations after transient ischemia in spontaneously hypertensive rat brains. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1994 **86**(2): 139 - 153
- [ 19 ] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998 **67**: 425 - 479
- [ 20 ] DeSalle LM, Pagano M. Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett*, 2001 **4909**: 189
- [ 21 ] Hu BR, Martone ME, Jones YZ *et al.* Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *Neurosci*, 2000 **20**(9): 3191 - 3199
- [ 22 ] Chondrogianni N, Tzavelas C, Pemberton AJ *et al.* Overexpression of proteasome beta 5 subunit increases amount of assembled proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *Biol Chem*, 2005, **280**(12): 11840 - 11850
- [ 23 ] Aolo Bernardi. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological Reviews*, 1999, **79**(4): 1127 - 1155
- [ 24 ] Vergun O, Keelan J, Khodorov BI *et al.* Glutamate-induced mitochondrial depolarisation and perturbation of calcium homeostasis in cultured rat hippocampal neurones. *Physiol*, 1999 **519**: 451 - 466
- [ 25 ] Yoshimoto T, Siesjo BK. Posttreatment with the immunosuppressant cyclosporin A in transient focal ischemia. *Brain Res*, 1999, **839**: 283 - 291
- [ 26 ] Andrea M, Cesura, Emmanuel Pinard, Robert Schubel *et al.* The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. *Biol Chem*, 2003, **278**(50): 49812 - 49818
- [ 27 ] Tsirka SE, Rogove AD, Strickland S. Neuronal cell death and t-PA. *Nature*, 1996, **384**(6605): 123 - 124
- [ 28 ] Kim YH, Park JH, Hong SH *et al.* Nonproteolytic neuroprotection by human recombinant tissue plasminogen activator. *Science*, 1999, **284**(5414): 647 - 650
- [ 29 ] Katayama T, Imaizumi K, Tsuda M *et al.* Expression of an ADP-ribosylation factor like gene, ARF4L, is induced after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Brain Res*, 1998, **56**(1-2): 66 - 75