

基础医学

力竭运动大鼠心室肌蛋白质组表达特征*

史绍蓉, 刘田, 龚丽, 袁爱国, 刘建荣, 王娟

Characteristics of proteome expression of ventricular muscle from rats after exhausted exercise

Abstract

AIM: The differential proteome expression map of ventricular muscle between rest and exercise rats that had taken progressive increasing load volume exercise was established to screen significant target protein response to exercise stress by means of proteomics.

METHODS: The experiment was performed at the State Key Laboratory of Education Ministry on Protein Chemistry and Proteome and Provincial Laboratory of Sports and Human Science, College of Life Science, Hunan Normal University in March 2007. Totally 10 SD male rats were randomly divided into control group and exercise group with 5 in each group. Rats in the exercise group received 7-week high intensity progressive increasing load volume exercise (exhausted at last time), and then the total protein of ventricular muscle was determined by two dimensional gel electrophoresis separation in the two groups.

RESULTS: After analysis, the numbers of protein spots on the gels of control group and exercise group respectively was 352 ± 17 and 338 ± 17 . There were 99 protein spots differentially expressed after exercise. Nine differentially expressed protein spots were selected for identification and 7 proteins were identified. Stress-70 protein, NADH-ubiquinone oxidoreductase M_{75 000} subunit, Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, Tropomyosin-1 alpha chain lost after exercise. Expressions of Nitrilase family, member 2 up-regulated about over 5 times after exercise. Expression of an unknown protein with 21 000 relative molecular mass (RMM) down-regulated about over 5 times after exercise. Another two were Myosin-6 after determination, which had reverse expression after exercise. Those proteins included contract protein, energy metabolism enzyme, molecular chaperones and so on.

CONCLUSION: There is significant difference on the quantity and quality of proteome when the rats are exhausted. The "lost" and downgraded proteins have strong relationship with disequilibrium of myocardium contraction, the turn of energy metabolism style and cell stress. Six target proteins that are characterized by exercise and are not studied in sports medicine area are screened.

Department of Sports and Human Science, College of Physical Education, Hunan Normal University, Changsha 410012, Hunan Province, China

Shi Shao-rong, Professor, Department of Sports and Human Science, College of Physical Education, Hunan Normal University, Changsha 410012, Hunan Province, China shisrf@126.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 05JJ30182*

Received: 2007-04-23 Accepted: 2007-07-07

Shi SR, Liu T, Gong L, Yuan AG, Liu JR, Wang J.Characteristics of proteome expression of ventricular muscle from rats after exhausted exercise.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2007;11(43):8691-8696(China) [www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/07-43/43k-8691(ps).pdf]

摘要

目的: 采用蛋白质组学技术, 建立安静和递增运动负荷训练后力竭大鼠心室肌蛋白质组的差异性表达谱, 初步筛选出心室肌对力竭运动产生反应的目标蛋白质。

方法: 实验于 2007-03 在湖南师范大学生命科学院蛋白质化学与蛋白质组学国家重点实验室和省级运动人体科学实验室完成。实验分组: 10 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组和运动组, 每组 5 只。实验方法: 运动组经过 7 周的大强度递增运动负荷训练后(最后一次力竭), 对两组心室肌组织的全蛋白进行双向凝胶电泳分离。

结果: 经图像分析, 在运动组的电泳图谱上共展现蛋白质点(338 ± 17) 个, 对照组展现蛋白质点(352 ± 17) 个。运动后差异表达的蛋白质点共有 99 个。对其中差异表达的 9 个蛋白质点进行质谱鉴定, 共鉴定出 7 个蛋白质, Stress-70 protein, NADH-ubiquinone oxidoreductase M_{75 000} subunit, Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, Tropomyosin-1 alpha chain 在运动后“缺失”, Nitrilase family, member 2 在运动后表达上调在 5 倍以上, 一个相对分子质量为 21 000 的未知蛋白在运动后表达下调在 5 倍以上, 另外有两个点经鉴定均为 Myosin-6, 在运动后表达量相反。这些蛋白质属于收缩蛋白、能量代谢酶、分子伴侣等。

结论: 递增运动负荷训练后力竭时, 大鼠心室肌蛋白质组明显地发生了反应。运动后“缺失”和下调的蛋白质点与心肌收缩的调控和能量代谢的方式转变以及细胞的应激反应有关, 其中, 成功筛选出 6 种在运动医学领域尚未涉足的、具有运动应激特点的目标蛋白质。

关键词: 蛋白质组; 疲劳; 心室肌; 运动; 双向凝胶电泳; 质谱

史绍蓉, 刘田, 龚丽, 袁爱国, 刘建荣, 王娟. 力竭运动大鼠心室肌蛋白质组表达特征 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(43): 8691-8696 [www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/07-43/43k-8691(ps).pdf]

湖南师范大学体育学院运动人体科学教研室, 湖南省长沙市 410012

史绍蓉, 女, 1952 年生, 湖南省长沙市人, 汉族, 教授, 主要从事蛋白质组学方面的研究。shisrf@126.com

湖南省自然科学基金资助项目 (05JJ30182)*

本文为第二作者硕士论文

中图分类号: R542.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2007)43-08691-06

收稿日期: 2007-04-23
修回日期: 2007-07-07
(07-50-4-2475/M·Q)

0 引言

心肌蛋白质是心脏结构和功能的基础。心室肌是心脏泵血的主要动力, 也是体力和运动能力的重要基础。过去对心室肌蛋白质的研究是针对已知的蛋白质的研究。运动性疲劳的发生是一个十分复杂的过程, 它涉及到全身各个组织、器官和系统^[1], 用单一的因素(如能源衰

竭学说、乳酸学说、代谢产物堆积学说) 不能够全面的解释运动性疲劳的发生。蛋白质组学是从整体的角度来研究一个细胞、一个组织或一种生物的基因组所表达的全部蛋白质的一门新兴学科。采用目前在生命科学领域中前沿的蛋白质组学理论与技术, 能解决这一研究难题, 并筛选出对运动应激具有重要意义的目标蛋白质。

目前, 以双向凝胶电泳和质谱鉴定技术联

课题背景: 文章为湖南省自然科学基金资助课题。课题主要的研究内容为应用差异蛋白质组学的理论和方法, 研究在运动性疲劳的状态下, 心肌蛋白质组表达的变化, 以探讨心肌疲劳的发生、发展规律, 寻找有效的心肌疲劳的生物标志物, 为进一步深入研究运动对心脏的影响提供新的思路。

用的蛋白质组学研究方法为这方面的探讨提供了可行的途径。例如, 有关运动应激对机体各个组织、器官的蛋白质组表达的影响, 有学者对此做了一些研究。Yuan 等^[2]用蛋白质组学的方法研究遗传性肥胖小鼠和野生型小鼠运动后血清蛋白质组的差异性表达, 发现遗传性肥胖小鼠运动后结合珠蛋白表达量下调, 而野生型小鼠运动后几种血管舒缓素的表达量上调。张松江等^[3]应用差异蛋白质组学的方法研究大强度力竭运动大鼠骨骼肌蛋白质表达特征, 发现运动后“新增”的蛋白有乙二醛酶; 运动后“缺失”的蛋白质有脂酰辅酶 A 脱氢酶、3 磷酸甘油醛脱氢酶、H- 转运 ATP 酶; 运动后表达上调的蛋白质是相对分子质量为 30 969 的未知蛋白; 运动后表达下调的蛋白质有肌球蛋白轻链 3 和磷酸变位酶 1。沙继斌等^[4]初步研究了急性力竭性运动对大鼠淋巴细胞蛋白质组的影响。Ban 等^[5]应用差异蛋白质组技术对 8 只安静状态和 8 只运动训练大鼠左心室肌蛋白进行了研究, 发现在候选斑点中, 安静组和运动训练组蛋白质组有显著性差异的是一组 M_r 20 000 的热休克蛋白和 3- 羟基类固醇脱氢酶。Boluyt 等^[6]发现, 与安静对照组相比, 经过 6 周的递增运动负荷的耐力运动后诱导的肥大心肌中, 有 26 个蛋白质点的表达量发生了改变, 有 12 个点属于新增的蛋白质。

为进一步筛选出对运动应激具有重要意义目标蛋白质, 本实验拟以 SD 大鼠为研究对象, 建立长时间递增运动负荷训练后疲劳大鼠模型。通过对静息对照组心肌和运动实验组心肌的蛋白质表达图谱进行比较分析, 观察差异表达的蛋白点, 并对这些差异表达点进行鉴定, 结果发现了一些新的参与反应的蛋白。

1 材料和方法

设计: 观察对比实验。

单位: 湖南师范大学体育学院运动人体科学教研室。

材料: 实验于 2007-03 在湖南师范大学生命科学学院蛋白质化学与蛋白质组学国家重点实验室和省级运动人体科学实验室完成。

动物: 10 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠购于湖南农业大学实验动物部 (许可证号为:

SCXX (湘)2006-0001), 3 个月龄, 体质量 (252 ± 11) g, 级试验动物。室温 20 ~ 24 °C, 光照时间 7:00 ~ 19:00, 分笼饲养, 每笼 5 只, 自由进食和饮水。适应性喂养 1 周后, 10 只大鼠按体质量和运动能力配对随机分为对照组和运动实验组, 每组 5 只。

仪器设备: EPS3500 电源, IPGphor 等电聚焦电泳系统购自 Amersham 公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳使用垂直平板电泳系统, 购自 bio-rad 公司; MDLTI-TOF-TOF 质谱仪购自 Bruker Daltonics 公司。其他仪器, 如冷冻离心机, 722 分光光度计, 电动跑台, 脱色小摇床, 真空自动吸引器均来自国产。

试剂: 尿素、NP-40、载体两性电解质 (Parmalyte 3-10)、PMSF、CHAPS、SDS、丙烯酰胺、BIS、TMMED、胰蛋白酶、IAA、DTT、硫脲均购为 Amersham Pharmacia 公司; 硫代硫酸钠购自 Fluka 公司; AP、标准蛋白混合物 (兔磷酸化酶 B97400, 牛血清白蛋白 66700, 兔肌动蛋白 43000, 牛碳酸酐酶 31000, 胰蛋白酶抑制剂 20300, 鸡蛋清溶菌酶 14400) 购自 Bio-rad 公司; β- 巯基乙醇、甘氨酸、乙腈、碳酸氢氨、铁氰化钾、甲醇、硫酸铵、磷酸、乙酸来自国产。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一作者; 资料收集为第二作者及课题组其他成员。

方法:

实验动物建模方式: 大鼠购入后进行适应性跑台训练, 跑台坡度为 0°; 速度 10 m/min, 持续时间为 10 min, 共训练 3 d。运动实验组采用递增运动负荷跑台训练 7 周, 坡度为 0°; 从训练第 1 周起, 逐周递增运动速度和运动时间, 具体训练方案见表 1^[7]。

表 1 动物训练方案

[(m/min) × min]

时间	周一	周二	周三	周四	周五
第 1 周	15 × 15	15 × 15	15 × 20	15 × 20	15 × 20
第 2 周	15 × 20	18.5 × 20	22 × 20	22 × 20	22 × 20
第 3 周	22 × 20	25 × 20	28 × 20	28 × 20	28 × 20
第 4 周	28 × 20	30 × 20	32 × 20	32 × 20	32 × 20
第 5 周	32 × 20	33.5 × 20	35 × 20	35 × 20	35 × 20
第 6 周	35 × 20	38 × 20	38 × 20	38 × 20	38 × 20
第 7 周	强化训练, 连续训练 7 d, 重复第 6 周方案, 周六、周日坚持 38 × 85, 最后一次训练至力竭 (力竭标准: 动物未能坚持原跑速, 先后滞跑道后 1/3 处达 3 次以上, 刺激驱赶无效)				

取材: 大鼠最后一次运动至力竭, 6 h 后与对照组均做麻醉处理后, 固定于手术板上, 打开胸腔, 暴露心脏, 在主动脉升部进行插管, 用

生理盐水对心脏进行灌流,待心脏颜色变淡后,迅速摘取心脏放入4℃生理盐水中进行冲洗,小心地剔除心包和心外膜,用滤纸小心的吸干水分,剪取心尖部心室肌组织,置液氮中贮存备用。

蛋白提取:从液氮中取出心室肌组织,剪碎后放入碾钵中用液氮碾成粉末状。准确称重后按1:4(mg:μL)加入组织裂解液[8 mol/L urea, 4%CHAP, 2 mol/L thiourea, 1%NP-40, 65 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 0.5(V/m) Pharmalate(pH 3~10)], 4℃振荡30 min使组织充分裂解。组织悬液离心30 min(12 000 r/min, 4℃),取出样品,避开上层漂浮的脂质层,吸取上清液后,组内合并上清。用Bradford法对样品进行蛋白定量,测得对照组蛋白质含量为29.79 g/L,运动组蛋白含量为30.27 g/L。样品每管分装后,-70℃冰箱保存待用。

固相pH梯度-SDS双向凝胶电泳方法:参考Gorg等^[8]方法,将电泳参数做适当调整后,进行蛋白质固相-pH梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)。具体操作步骤如下:

一维电泳:对照组和运动组样品蛋白各1 mg,分别加入水化溶液(700 μL水化液中含2 mg DTT, 8 mol/L Urea, 0.2 g CHAPS, IPG Buffer (pH 3~10.0), 3.5 μL痕量溴酚蓝) 340 μL,把在室温中平衡10 min的固相pH梯度干胶条放入加有上述样品液的样品槽中。电压时间积为44 550 Vh,其中,50 V低电压水化12 h,200 V 1 h,500 V 1 h,1 000 V 1 h,电压梯度上升至8 000 V 0.5 h最后稳定在8 000 V 5 h等电聚焦,温度设置为20℃。等电聚焦结束后进行两次平衡各15 min。

二维电泳:平衡结束后将胶条转入第二向SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,先进行4.8%的浓缩胶电泳,电流为25 mA,时间约1 h,接着进行10%分离胶电泳,电流为50 mA,时间约5 h。

凝胶染色、图像扫描和软件分析:凝胶染色采用改良的考马斯亮蓝染色。图像扫描采用中晶公司的Microtek扫描仪进行扫描,所得图谱采用图像分析软件PDQuest进行分析,比较蛋白质的表达差异。蛋白质分子的等电点和分子质量根据IPG胶条pH标识范围和低分子质量蛋白标准测算;每个蛋白质的相对含量以其吸光度值表示。图像分析包括蛋白质点的检测、背景扣除和点的匹配,蛋白匹配以对照组的凝胶图像作为参考胶。

质谱样品制备:用双蒸水冲洗考染以后的胶板,每次10 min,共2次胶板平铺于玻璃板上,用取点器将目标蛋白质切下后置于EP管中。考染胶内原位酶解方法进行蛋白点的酶解。

肽质指纹图谱分析及数据库查询:采用BrukerDaltonics公司生产的MALDI-TOF-TOF质谱仪对目标蛋白质点进行肽质量指纹分析:将经过酶解纯化的样品溶液依次点样于样品板上,待其自然干燥后置于质谱仪上进行分析,采用反射模式、正离子谱测定,离子源加速电压1为25.00 kV,加速电压2为21.00 kV,N₂激光波长为337 nm,脉冲宽度为3 ns,质谱信号单次扫描累加100次,用Bruker肽混合物作外标记,获得肽质量指纹图。数据库查询:通过Mascot查询NCBI蛋白质数据库,查询条件为肽质量指纹图中的肽片段质量控制在900~4 000,肽片段分子质量最大允许误差控制在100 ppm,离子选择单同位素分子量[M+H]⁺,半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸(Carbamidomethyl-Cys)。再根据一级质谱的肽指纹图谱中峰值较高的肽段进行二级质谱鉴定,对鉴定的蛋白质做进一步的确认。

主要观察指标:双向凝胶电泳图谱分析结果。质谱鉴定结果。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 10只大鼠全部进入结果分析。

2.2 双向凝胶电泳图谱分析结果 以对照组心室肌的蛋白质2-DE代表图谱作为参考胶进行软件分析,对照组平均检测到蛋白质点(352±17)个,运动实验组平均检测到蛋白质点(338±22)个。对照组和实验组各重复电泳3次,都选取第一张胶为参考胶进行匹配,对照组平均匹配率为(79.00±0.46)%,运动组的平均匹配率为(77.10±8.23)%。平均相关系数为0.73,获得了较好的重复性。对照组和运动组的代表胶见图1。通过PDquest软件分析,与对照组相比,在运动组中发现99个蛋白质点发生了变化。5个点在运动后消失了。运动后表达量上调2倍以上的点有52个,下调2倍以上的有42个,其中上调量和下调量在5倍以上的各有12个。

相关链接:差异蛋白质组学是由中国科学工作者针对中国的国情提出的,它着重于寻找和筛选由任何有意义的因素引起的2个样本之间的差异蛋白质图谱,揭示细胞生理和病理状态的进程和本质,对外界环境刺激反应的途径,以及细胞调控机制,同时获得对某些关键蛋白质的定性和功能分析。而运动医学的一般研究策略是比较在实施了运动干预的条件下,2个或2个以上样本之间在组织形态学、生理学或生化学上的改变,来探讨运动对机体的影响。这一研究策略与差异蛋白质组学的研究策略相符,因此应用差异蛋白质组学的方法能很好的促进运动医学的发展。

应用要点:本实验成功筛选出心肌特异性长链脂肪酰辅酶A脱氢酶、原肌球蛋白1等在运动医学领域尚未涉足的,具有运动应激特点的目标蛋白质,为深入研究运动性心肌疲劳提供了新的思路,奠定了前期基础。在后续的研究中,可以针对这些蛋白质做进一步确认,以观察在运动应激条件下,这些蛋白质的变化特征,筛选出和运动应激密切相关的,对研究运动性心肌疲劳有重要意义的蛋白质,进一步应用到临床中,作为判断运动性心肌疲劳的生物标志物,这无疑具有十分重要的理论和现实意义。

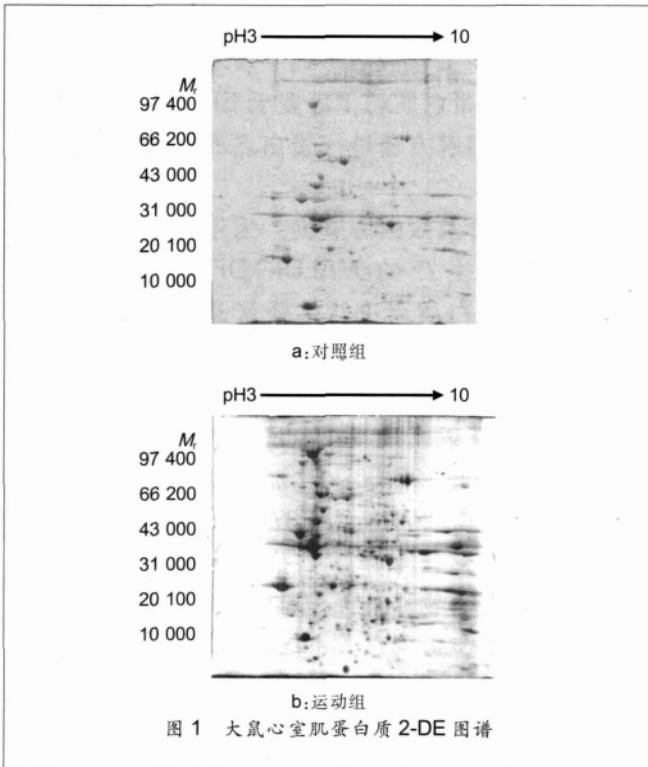


图1 大鼠心室肌蛋白质 2-DE 图谱

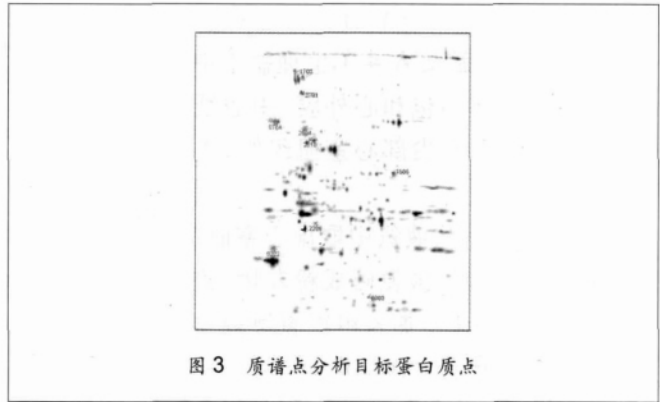


图3 质谱点分析目标蛋白质点

2.3 质谱鉴定结果 比较运动和对照组大鼠心室肌蛋白质 2-DE 图谱的差异表达, 选择运动后消失和运动后表达上调和下调 5 倍以上的 9 个蛋白点, 见表 3。用 MALDITOF-TOF-MS 对这些蛋白质斑点进行检测, 获得的肽谱和肽段氨基酸结果在 NCBI 数据库检索, 最终鉴定出 7 个蛋白质 (1702 和 2710 号点经鉴定为同一蛋白质, 0202 和 0704 号点经鉴定也为同一蛋白质)。在鉴定的 7 个蛋白质中, Stress-70 protein (2610), NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit (2604), Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase (2206), Tropomyosin-1 alpha chain (0202, 0704) 在运动后“缺失”, Nitrilase family, member 2 (6003) 在运动后表达上调在 5 倍以上, 一个相对分子质量为 21 000 的未知蛋白在运动后表达下调在 5 倍以上。1702 和 2710 号点经鉴定均为 Myosin-6, 在运动后表达量相反。图 4 为 2604 号点的一级质谱图, 图 5 为 2604 号点的二级质谱图。

做质谱分析的蛋白质点吸光度值见表 2。从表中可以看出, 2610, 2604, 2206, 0704, 0202 号点在运动后消失, 2701, 6003 号点在运动后上调分别上调 16.4, 18.2 倍, 1702, 7505 号点在运动后分别下调 5.7, 59.6 倍。图 2 是 PDquest 软件所显示的质谱分析目标蛋白质点的柱状图。图 3 为质谱点分析目标蛋白质点。

表 2 做质谱分析目标蛋白质点

蛋白质编号(SSP)	变异倍数		蛋白质吸光度值	
	上调	下调	安静	运动
0202			7 817.53 ± 086.95	
0704			5 399.36 ± 094.79	
2206			541.73 ± 22.67	
2604			2 635.93 ± 117.17	
2610			2 663.76 ± 761.80	
2701	16.4		790.80 ± 93.21	12 995.4 ± 2 035
6003	18.2		54.8 ± 5.0	996.3 ± 870.0
1702		5.7	1 367.4 ± 368.5	273.5 ± 643.9
7505		59.6	2 996.3 ± 838.6	50.3 ± 87.1

表 3 差异表达蛋白点质谱鉴定结果

蛋白质编号	蛋白质名称	score	M _r	pI	variation
2610	Stress-70 protein	249	74 100	5.97	disa
2604	NADH-ubiquinone Oxidoreductase 75 kDa subunit	337	80 300	5.28	disa
2206	Long-chain specific acyl-CoA Dehydrogenase	110	48 200	6.26	disa
0704	Tropomyosin-1 alpha chain	77	32 700	4.96	disa
0202	Tropomyosin-1 alpha chain	81	32 700	4.96	disa
2701	心肌型 - 肌球蛋白重链	113	224 000	5.59	up
6003	Nitrilase family, member 2	121	31 000	6.90	up
1702	Myosin-6	155	224 000	5.59	down
7505	21 kDa protein	53	21 100	8.13	down

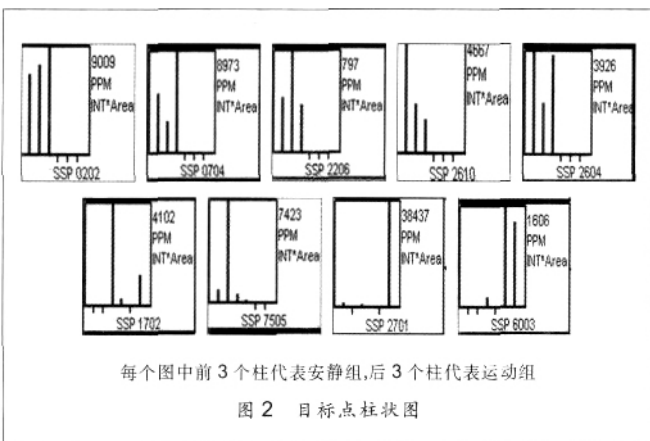


图2 目标点柱状图

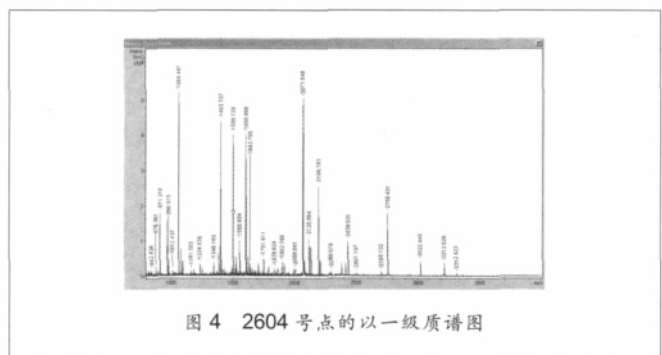


图4 2604号点的以一级质谱图

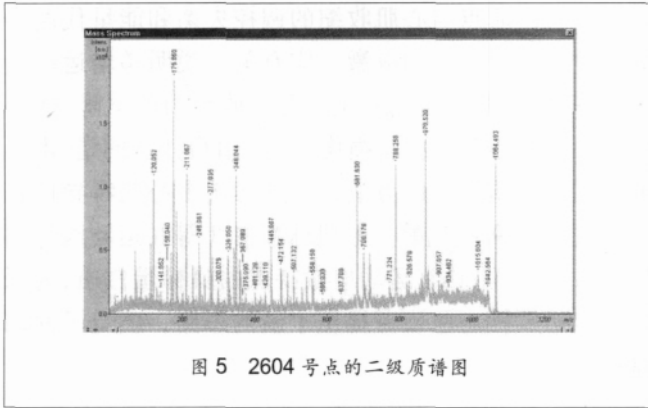


图 5 2604 号点的二级质谱图

3 讨论

全面了解心肌蛋白质组在运动应激状态下的表达情况,寻找在运动疲劳状态下有意义的心室肌的差异表达的蛋白质,对阐明运动对心脏的影响,预防心肌疲劳的发生都有十分重要的意义。本文通过对运动实验组和安静对照组大鼠心肌蛋白质组双向电泳图谱的分析发现,在运动应激条件下,运动实验组大鼠心室肌组织中的蛋白质组发生了显著的质变和量变。对运动后表达消失和表达上调和下调 5 倍以上的 9 个蛋白质点进行质谱鉴定,共鉴定出 7 个蛋白质。这些鉴定的蛋白质有收缩蛋白、能量代谢酶、分子伴侣蛋白和一个未知的 M_r21 000 的蛋白质。这些蛋白质可能与长期大强度的递增运动应激条件下心肌超微结构受损、能量代谢方式转变和细胞应激有关。

3.1 收缩蛋白 心肌 β -肌球蛋白重链(myosin-6)和原肌球蛋白 1(Tropomyosin-1)均为心肌的收缩蛋白质,在心肌收缩舒展的过程中起着十分重要的作用。

在心肌组织中可表达两种肌球蛋白重链基因: β -肌球蛋白重链和 γ -肌球蛋白重链。 β -肌球蛋白重链 ATPase 活性高,收缩速度快,但能量消耗大,相反 γ -肌球蛋白重链 ATPase 活性低,收缩速度缓慢而持久,且耗能小。研究表明,运动引起心肌肥大的发生时心肌细胞 β -肌球蛋白重链增加,而 γ -肌球蛋白重链减少,属“生理性心脏重塑”。而多数“病理性心脏重塑”导致肌球蛋白重链异形体从含 ATPase 活性高的 β -肌球蛋白重链向含 ATPase 活性低的 γ -MHC 转变,最大收缩速率下降,心肌从功率高、耗能多的做功方式转变为功率低、耗能少的做功方式^[8]。在心功能不足的情况下,使肥大心肌消耗较少的能量或氧,产生同样大小的主动张力,具有代偿意义,但心肌的这种变化预后不良,常发展成心衰,因此被许多学者认为是心衰的前期表现^[9]。

研究发现耐力运动和抗阻运动可以明显逆转高血压心肌肥大和心肌血管阻塞时 MHC 异型变化,表

现为肌 β -肌球蛋白重链基因表达增强, β -肌球蛋白重链基因表达降低, β/γ -肌球蛋白重链基因表达比值提高^[10,11]。Rafalski 等的研究表明,经过长期的耐力运动后,心肌 β -肌球蛋白重链蛋白和 β -MHC mRNA 表达明显增加,而 γ -肌球蛋白重链及其基因表达未见明显改变^[12]。李晓东等^[13]的研究表明,缺血缺氧培养时 β -MHC mRNA 向 γ -MHC mRNA 的转换明显, β -MHC mRNA 持续下降, γ -MHC mRNA 缓慢升高后下降。长期超负荷和慢性缺氧刺激可诱导左心室 β -MHC mRNA 表达。在 10% 牵张刺激时, β -MHC mRNA 均增加,但以 β 型增加为主,提示随刺激时间延长心肌细胞向病理性肥大方向发展^[14]。

原肌球蛋白 1 是原肌球蛋白家族中相对分子质量高的一员,是肌肉收缩过程中重要的调节蛋白质,其最重要的特性是能与肌动蛋白肌丝相结合,使肌动蛋白稳定于聚合状态,在调节细胞能动性,细胞质移动和诱导内皮细胞凋亡等方面均有重要作用。

递增运动负荷训练后,大鼠心室肌 β -肌球蛋白重链基因和原肌球蛋白 1 的表达下调和“缺失”表明心肌发生了损伤,心肌的收缩力下降。这可能是由于心室肌长时间受到牵拉刺激以及长时间在缺血缺氧的环境下工作所导致的。如张勇等^[15]的研究表明,大鼠经过一次递增运动负荷的跑台运动后,力竭运动组大鼠的心肌组织呈一定程度的缺血性超微结构的损伤。心肌细胞结构的破坏,使细胞内蛋白水解酶的外溢,导致心肌收缩蛋白的水解。这可能是本研究中大鼠心室肌 β -肌球蛋白重链基因和原肌球蛋白 1 的表达下调和“缺失”的重要原因。

3.2 能量代谢酶 成年心肌细胞的能量主要来自脂肪酸的氧化。这一代谢模式的虽然耗氧量很大,但可为心肌提供大量的 ATP。正常心肌能量的 70% 来源于脂肪酸的氧化。因此,线粒体脂肪酸的氧化对维持心肌能量代谢及泵功能具有重要意义。

脂肪酸的氧化涉及各种相关的酶。脂酰辅酶 A 脱氢酶是脂肪酸氧化关键酶,它催化脂酰辅酶 A 的羧基邻位(α -位)脱下两个氢原子转化为反式-2-烯酰-CoA,同时产生 FADH₂,是氧化的第一个限速步骤^[16]。根据线粒体基质中脂酰辅酶 A 碳链的不同长度,短、中等和长链,而有各自的特异酶。

已经证实病理性肥厚心肌的一个重要代谢变化是脂肪酸的氧化利用减少,而葡萄糖的利用增加。胡琴等的研究证实,编码线粒体脂肪酸氧化酶的核基因表达与肥厚心肌能量底物的利用改变相平行^[17]。以往的研究也发现,扩张型心肌病与缺血型心肌病引起的严重心力衰竭患者左室脂肪酸氧化酶的基因表达下调^[18]。本实验中,心肌长链特异性脂酰辅酶 A 脱氢

酶的表达“缺失”,主要减低了氧耗,并使产能速度加快,适应心肌细胞对能量的需求。这种供能模式的转变在短时间内对心脏是有益的,但随着时间的延长将会对心脏产生不利的影响。这是因为一方面脂肪酸产能的效率较葡萄糖高。另一方面脂肪酸利用障碍不利于心肌细胞脂质的稳定,导致心肌组织脂质的沉积,再者,脂肪酸氧化酶的表达下降,能够引起长链脂肪酸中间产物(如酰基肉碱)的积累,后者常引起心律失常,包括室颤。

线粒体电子传递链复合体 是一个大的蛋白分子。该酶是电子传递链中3个质子泵中的第一个质子泵。其作用是先将NADH结合并将NADH上的两个高势能电子转移到FMN辅基上,是NADH氧化,并使FMN还原^[16]。

线粒体电子传递链复合体 的缺失会阻碍心肌细胞线粒体能量的产生,导致心肌细胞能量供给功能,影响心肌细胞的正常功能,导致心肌细胞疲劳。

3.3 分子伴侣蛋白 葡萄糖调节蛋白75,是一种主要存在于细胞线粒体中的分子伴侣^[19]。葡萄糖调节蛋白75属于热休克蛋白70家族,与热休克蛋白70有很高的同源性,被认为是一类线粒体热休克蛋白。在细胞遭受缺糖应激损伤时,葡萄糖调节蛋白75能增加线粒体内相关酶分子的数量和活性,减少受损蛋白质的毒性,从而维护线粒体的结构和功能,增强细胞对损伤的抵御能力。目前,葡萄糖调节蛋白75对抗缺糖损伤及缺糖后再灌注损伤的机制目前尚不十分明了。据文献报道,热休克蛋白70能防止DNA链断裂,稳定线粒体结构和功能,抑制细胞凋亡^[20]。因此,作为与热休克蛋白70有很大同源性的线粒体热休克蛋白葡萄糖调节蛋白75很可能是通过改善线粒体功能而发挥其抗损伤作用的。

目前,对葡萄糖调节蛋白75在运动应激条件下的报道尚很少见。Kinnunen等^[21]研究表明,大鼠经过14周的中等强度运动训练后,对心脏进行缺血后再灌注后,心肌葡萄糖调节蛋白75表达减少。对热休克蛋白家族的研究显示,热休克蛋白的表达和运动强度和运动时间成正相关^[22]。但是如果运动负荷过大,热休克蛋白的表达会减少,不能对受损组织进行保护。张学林最新的研究报道发现,长期大运动负荷训练后比目鱼肌、腓肠肌中热休克蛋白72表达异常,与过度训练症状同步发生^[23]。而在短期大运动负荷训练后,热休克蛋白的合成还是增加的^[24]。因此,本实验中葡萄糖调节蛋白75在运动后表现为“缺失”,可能是由于运动强度过大和持续时间过长所致。

结论:递增运动负荷训练后,大鼠的心室肌蛋白质组在质和表达量上都存在明显差异。运动后“缺失”和

下调的蛋白质与心肌收缩的调控失衡和能量代谢的方式转变以及细胞的应激反应有关,说明递增运动负荷训练后,心肌疲劳的发生与心肌收缩力的下降、能量供给困难和心肌细胞的损伤有关。值得注意的是,本研究采用蛋白质组学的方法,成功筛选出心肌特异性长链脂酰辅酶A脱氢酶、原肌球蛋白1等在运动医学领域尚未涉足的,具有运动应激特点的目标蛋白质,为深入研究运动性心肌疲劳提供了新的思路,奠定了前期基础。

4 参考文献

- 冯伟权.运动疲劳及过度训练的生化诊断[J].北京体育大学学报,2000,23(4):498-502
- Yuan Q, Fontenele-Neto JD, Fricker LD. Effect of voluntary exercise on genetically obese Cpefat/fat mice: quantitative proteomics of serum. *Obes Res* 2004;12(7):1179-1188
- 张松江,史绍蓉.急性大强度力竭运动大鼠骨骼肌比较蛋白质组学研究[J].体育科学,2006,26(5):59-63
- 沙继斌,刘明海.急性力竭性运动对大鼠淋巴细胞蛋白质组影响的初步研究[J].山东体育学院学报,2005,21(3):62-64
- Ban Y, Tomer Y. The contribution of immune regulatory and thyroid specific genes to the etiology of Graves' and Hashimoto's diseases. *Autoimmunity* 2003;36(6-7):367-379
- Boluyt MO, Brevick JL, Rogers DS, et al. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics* 2006;6(10):3154-3169
- 王启荣,周未艾,吕丹云.理气、扶正类中药“体复康”改善运动性疲劳的大鼠心肌形态计量学研究[J].体育科学,1999,19(1):70-74
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21(6):1037-1053
- Komuro I, Yazaki Y. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and failure. *Clin Sci (Lond)* 1994;87(2):115-116
- 李昭波,高云秋,唐朝枢.运动对高血压性肥大大鼠心脏肌球蛋白重链基因表达的影响[J].中国应用生理学杂志,1999,15(4):323-326
- Hashimoto T, Kambara N, Nohara R, et al. Expression of MHC-beta and MCT1 in cardiac muscle after exercise training in myocardial-infarcted rats. *J Appl Physiol* 2004;97(3):843-851
- Rafalski K, Abdourahman A, Edwards JG. Early adaptations to training: upregulation of alpha-myosin heavy chain gene expression. *Med Sci Sports Exerc* 2007;39(1):75-82
- 李晓东,黄跃生,张家平.机械牵张对缺血缺氧心肌细胞肌球蛋白重链mRNA表达的影响[J].中华烧伤杂志,2004,20(3):138-141
- Bharadwaj S, Prasad GL. Tropomyosin-1, a novel suppressor of cellular transformation is downregulated by promoter methylation in cancer cells. *Cancer Lett* 2002;183(2):205-213
- 张勇,张薇,时庆德,等.急性运动心肌缺氧对大鼠心肌纤维和线粒体膜结构及功能的影响[J].天津体育学院学报,1997,12(1):18-22
- 王镜岩,朱圣庚,许长法,等.生物化学[M].北京:高等教育出版社,2005
- 胡琴,李隆贵,耿昭华.探讨压力超负荷对大鼠左室心肌脂脂肪酸氧化的影响[J].心肺血管病杂志,2003,22(1):42-45
- Kantor PF, Dyck JR, Lopaschuk GD. Fatty acid oxidation in the reperfused ischemic heart. *Am J Med Sci* 1999;318(1):3-14
- Massa SM, Longo FM, Zuo J, et al. Cloning of rat grp75, an hsp70-family member, and its expression in normal and ischemic brain. *J Neurosci Res* 1995;40(6):807-819
- 李东至,林其德.热休克蛋白与生殖[J].国外医学:计划生育分册,2001,20(3):130-133
- Kinnunen S, Hyyppä S, Lappalainen J, et al. Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. *Eur J Appl Physiol* 2005;93(4):496-501
- Demirel HA, Powers SK, Naito H, et al. The effects of exercise duration on adrenal HSP72/73 induction in rats. *Acta Physiol Scand* 1999;167(3):227-231
- 张学林,刘建敏,霍行琪,等.长期大负荷训练大鼠不同类型骨骼肌HSP72表达[J].中国运动医学杂志,2005,24(4):404-410
- Whitham M, Halson SL, Lancaster GI, et al. Leukocyte heat shock protein expression before and after intensified training. *Int J Sports Med* 2004;25(7):522-527