DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20220830.001
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20220830.1604.002.html

基于4D蛋白组学分析RhoE基因敲除对糖尿病大鼠心脏组织中蛋白质表达的影响及机制

赵 鋆[1],施凯佳[1],伍彩霞[2],邹 园[2],吴林栩[1],陈 旭[3],申志华[2],郭峻莉[1]✉,揭 伟[1]✉
(1.海南医学院第一附属医院海南省热带心血管病研究重点实验室,海南 海口 571199;2.广东医科大学基础医学院病理学系,广东 湛江 524023;3.海南医学院第一附属医院内分泌科,海南 海口 571199)

[**摘要**] **目的**:分析RhoE基因表达改变对糖尿病大鼠心脏组织中蛋白表达谱的影响及可能的调节机制。**方法**:6周龄雄性RhoE基因敲除(KO)与野生型(WT)SD大鼠以腹腔一次性注射链脲佐菌素(STZ,70 mg/kg)复制急性1型糖尿病模型(T1DM),以注射等量柠檬酸钠盐水为对照,1周后连续3 d测定大鼠空腹血糖,以血糖浓度≥16.7 mmol/L为造模成功。2周后取出各组大鼠心脏,采用四维非标定量蛋白质组学技术(4D-LFQ),检测心脏组织中蛋白质的表达,筛选差异表达蛋白(DEP),生物信息学分析DEP相关功能和涉及的信号通路与蛋白-蛋白互作网络。**结果**:成功建立T1DM大鼠模型。以表达倍数(FC)> 1.5倍且$P<0.05$为筛选标准,共鉴定到可定量的蛋白总数为2 931个。非糖尿病状态下,KO组与WT组相比,上调表达蛋白26个,下调蛋白45个;糖尿病状态下,与WT组相比,KO组显著上调的蛋白数量为19个,显著下调的蛋白数量为28个。GO注释结果显示大多数差异表达蛋白位于细胞外基质区,生物学功能主要集中在免疫反应、能量代谢等过程。KEGG分析提示RhoE敲除后心脏组织中DEP参与的信号通路主要为核糖体、脂肪消化吸收等。蛋白互作网络分析发现KO组心脏组织中上调蛋白中Col1α1和Col1α2相互作用的蛋白较多,下调蛋白中参与核糖体通路的相关蛋白在网络互作较多。**结论**:RhoE敲除后明显改变了糖尿病心脏组织中蛋白质表达谱,影响多条与糖尿病心肌病关系密切的信号通路,研究结果为糖尿病心肌病的发病机制和治疗标靶筛选提供了参考。

[**关键词**] 糖尿病;心肌组织;RhoE;蛋白质组学;生物信息学
[**中图分类号**] R587.1 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1007-1237(2022)23-1761-10

Effect and mechanism of knockout RhoE on the protein expression profiles in cardiac tissues of diabetic rats based on 4D proteomics

ZHAO Yun[1], SHI Kai-jia[1], WU Cai-xia[2], ZOU Yuan[2], WU Lin-xu[1], CHEN Xu[3], SHEN Zhi-hua[2], GUO Jun-li[1]✉, JIE Wei[1]✉
(1. *Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Cardiovascular Disease Research, the First Affiliate Hospital, Hainan Medical University, Haikou* 571199, *China*; 2. *Department of Pathology, School of Basic Medicine, Guangdong Medical University, Zhanjiang* 524023, *China*; 3. *Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Hainan Medical University, Haikou* 571199, *China*)
[*Foundation Project*]: *This work was financially supported by the National Natural Science Foundation of China* (82060053), *the Science and Technology Projects of Hainan Province* (*ZDYF*2020122)
[*Author*]: *ZHAO Yun*, *E-mail*: *yunzhaogd*@163.*com*.
[*Correspondence to*]: *GUO Jun-li*, *Ph.D. Professor*, *Doctoral Supervisor*, *E-mail*: *guojl@hainmc.edu.cn*; *JIE Wei*, *Ph.D. Professor*, *Doctoral Supervisor*, *E-mail*: *Wei_Jie@hainmc.edu.cn*.
Received: 2022-07-11 *Revised*: 2022-08-28 *JHMU*, 2022;28(23):1761-1770

[基金项目]国家自然科学基金项目(82060053);海南省重点研发社会发展专项(ZDYF2020122)
[作者简介]赵鋆,E-mail: yunzhaogd@163.com。
[通讯作者]郭峻莉,博士,教授,博士研究生导师,E-mail: guojl@hainmc.edu.cn;揭伟,博士,教授,博士研究生导师,E-mail: wei_jie@hainmc.edu.cn。
[收稿日期]2022-07-11 [修回日期]2022-08-28 网络出版时间:2022-08-31 09:30:53

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] Objective: To analyze the effect of *RhoE* gene expression change on protein expression profiles in the cardiac tissue of diabetic rats, and analyse the possible underlying regulatory mechanism. Methods: Six-week-old male *RhoE* gene knockout (KO) and wild-type (WT) Sprague Dawley rats were injected intraperitoneally with streptozotocin (70 mg/kg) to establish the type 1 diabetes model (T1DM), with injection of the same amount of sodium citrate saline as the control group. A week later, the fasting blood glucose of the rats was measured daily, and blood glucose concentration ≥ 16.7 mmol/L was regarded as a successful model. Two additional weeks later, the hearts of the rats in each group were removed and four-dimensional label-free quantitative proteomics technology (4D-LFQ) was used to analyze the changes of protein profiles in the heart tissue. The related functions, enrichment signals, and protein-protein interaction network (PPI) of the differentially expressed proteins were analyzed. Results: T1DM rat models were successfully established. Taking a fold change > 1.5 and $P < 0.05$ as the threshold, a total of 2 931 quantifiable proteins were identified. In the non-diabetic state, the KO group had 26 and 45 significantly up- and downregulated proteins, respectively, compared with the WT group; in the diabetic state, the KO group had 19 and 28 significantly up- and downregulated proteins, respectively, compared with the WT group. The GO annotation results showed that most of the differentially expressed proteins were located in the extracellular matrix, and their biological functions were mainly concentrated in the immune response and energy metabolism. KEGG analysis showed that the signaling pathways associated with the differentially expressed proteins in cardiac tissue after *RhoE* knockout were mainly related to ribosomes and fat digestion and absorption. Protein interaction network analysis showed that in the cardiac tissue of the KO group, there were more Col1α1- and Col1α2-interacting proteins among the upregulated proteins, and among the down-regulated proteins, related proteins involved in the ribosomal pathway interact more in the network. Conclusion: *RhoE* knockout significantly changes the protein expression profiles in diabetic cardiac tissue, affecting multiple signaling pathways closely related to diabetic cardiomyopathy. The results provide insights into the pathogenesis and therapeutic target screening of diabetic cardiomyopathy.

[KEYWORDS] Proteomics; Bioinformatics; Diabetes; Myocardial tissue; RhoE

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy,DCM)是指不能用高血压性心脏病、冠状动脉粥样硬化性心脏病及其他已知病因的心脏病变来解释的糖尿病并发的心肌疾病[1,2],其发病机制复杂迄今尚未阐明。因此,寻找合适的生物标志物为DCM的预防及治疗具有极其重要的意义。近年来发展的转录组学[3]、蛋白组学[4]、代谢组学[5]、修饰组学[6]等研究都为此提供潜在的方案。

RhoE,也称Rnd3,为Rho家庭GTPase蛋白质超家族成员之一。RhoE功能多样,与细胞增殖、周期、凋亡、迁移及分化等生物学功能有关[7]。文献报道,RhoE表达异常与较多的心血管疾病有关[8-10]。前期基于CRISPR/Cas9技术构建了RhoE基因稳定敲除的H9C2心肌细胞系,通过芯片筛查差异表达基因并富集RhoE有关的信号途径,发现RhoE参与调控胆固醇生物合成途径、oncostatin-M信号、干扰素信号及TGF-β1信号等,凸显了RhoE在心脏疾病中的重要角色[11]。迄今,有关RhoE与DCM相关研究未见报道。

4D蛋白质组学作为一种高通量差异表达蛋白质筛选方法,近年来受到较多的关注[12,13]。本研究拟采用4D非标记定量蛋白质组学技术,检测RhoE表达改变在糖尿病大鼠心脏组织中蛋白质表达谱,表征其心脏组织中调控的差异表达蛋白质,结合生物信息学手段来挖掘在差异表达蛋白质涉及的功能、分布及参与的相关信号通路,为解析RhoE在DCM中的角色提供思路和方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂:链脲佐菌素(YEASEN,中国),二硫苏糖醇、三氟乙酸、三氯甲烷、尿素、四甲基乙二胺、Seppro® Rat Spin Columns(Sigma-Aldrich,美国),乙腈、甲醇、TMT标记试剂、蛋白标志物(ThermoFisher Scientific,美国),PAGE银染试剂盒、DNA提取酚试剂(北京Solarbio),Pierce Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns、硝酸纤维过滤膜、聚偏氟乙烯(Bio-Rad Laboratories,美国)。

主要仪器:NanoElute、高分辨质谱仪Bruker timsTOF Pro、超声仪(ThermoFisher Scientific,美国),电泳仪、电泳槽、转膜槽(Bio-Rad,美国)。

1.2 实验动物及分组

成年RhoE基因全身敲除的杂合子Sprague Dawley(SD)大鼠($RhoE^{+/-}$,雄性,体重200～250 g),野生型SD大鼠(雄性,6周龄,体重200～250 g)由江苏赛业生物科技有限公司提供,饲养于广东医科大学实验动物中心病进行繁育和基因型鉴定[14]。采用高脂饲料配合一次性链脲佐菌素(70 mg/kg)联合构建糖尿病大鼠模型,给予链脲佐菌素注射2周后,连续3次空腹血糖值≥16.7 mmol/L,取各组心脏组织用于蛋白组学研究。分组如下:正常对照大鼠(WT_NG),即WT大鼠予以腹腔注射等量柠檬酸钠盐水;糖尿病大鼠(WT_HG),即WT大鼠腹

腔注射链脲佐菌素诱导成1型糖尿病;RhoE敲除对照大鼠(KO_NG),即RhoE$^{+/-}$腹腔注射等量柠檬酸钠盐水;RhoE敲除糖尿病大鼠(KO_HG),即RhoE$^{+/-}$腹腔注射链脲佐菌素诱导成1型糖尿病。动物均饲养于SPF级环境,糖尿病组予以高脂饮食和常规饮水,对照组予以常规饮食和饮水。所有实验操作均符合广东医科大学实验动物伦理要求(伦理编号:GDY2016003)。每组大鼠均为3只(n=3)。

1.3 蛋白提取与酶解

参考文献所述方法进行[15,16]。研钵用液氮预冷后置入适量心肌组织样品,加入液氮后将组织块完全研磨成粉末状。每组样品加入4倍粉末体积的裂解缓冲液(含1%蛋白酶抑制剂,50 mmol/L烟酰胺3 μmol/L去乙酰化酶抑制剂,8 mol/L尿素),行超声裂解。离心(4 ℃,12 000 g,10 min)后将上清液转移到另一无菌离心管,使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。取等量各样品蛋白,用裂解液调整各组体积至一致。轻柔地加入20%三氯乙酸,涡旋后充分混匀,4 ℃沉淀2 h后离心,用冷丙酮洗涤沉淀3次。将沉淀置于超净台晾干,加入200 mmol/L的四乙基溴化铵后用超声打散,按蛋白酶∶蛋白=1∶50的比例加入胰酶,过夜酶解。加入二硫苏糖醇调节终浓度为5 mmol/L,56 ℃反应30 min,最后加入碘乙酰胺,调节终浓度至11 mmol/L,各样品避光孵育15 min后备用。

1.4 液相色谱-质谱联用分析和数据分析

利用杭州景杰公司的技术平台完成有关色谱-质谱分析,实验步骤参考相关报道[15-17]。将含0.1%甲酸和2%乙腈的水溶液混合,配制成流动相A;含0.1%甲酸和100%乙腈溶液混合,配制成流动相B。用液相色谱流动相A相溶解各样本的肽段,Nano Elute超高效液相系统分离。设置液相梯度为0~70 min,6%~24% B;70~84 min,24%~32% B;84~87 min,32%~80% B;87~90 min,80% B,维持流速为450 nL/min。超高效液相系统分离肽段后加入Capillary离子源中电离,随后timsTOF Pro质谱分析电离后的肽段,设置离子源电压为1.7 kV,使用timsTOF Pro质谱检测和分析肽段母离子及其二级碎片。设置二级质谱扫描区间为100~1 700。设置数据采集模式为平行累积串行碎裂(PASEF)模式。使用Maxquant(v1.6.15.0)对二级质谱数据进行检索,搜索到Rattus_norvegicus_10116_PR_20201214.fasta共2 9940条序列。添加反库后计算随机匹配造成的假阳性率(FDR),调整蛋白质和多肽的错误发现率为1%。在搜库完成后,需要进行一系列质控,保证结果质量符合标准。将差异表达量变化(FC)>1.5同时P<0.05设置为表达显著上调,FC<1.5且P<0.05设置为表达显著下调。

1.5 生物信息学分析

对各比较组中差异表达蛋白质分别进行GO分类和KEGG通路富集分析,通过Fisher精确检验,评价差异表达蛋白质富集的功能分类和通路的显著水平。应用分层聚类方法绘制聚类热图。将不同比较组中差异表达蛋白质数据库编号或蛋白序列比对STRING(v.11.0)蛋白网络互作数据库,按照confidence score >0.7提取得到差异蛋白互作关系。

2 结果

2.1 蛋白质鉴定与解析

各组大鼠心脏酶解后的蛋白经BCA定量分析后符合质谱分析要求。通过液相色谱-质谱联用分析及数据库检索,共得到二级质谱谱图总数2 067 933个,与理论二级谱图匹配的谱图数308 807个,肽段总数29 739个,唯一肽段总数26 946个,鉴定蛋白质总数3 597个,定量蛋白数2 931个。总体鉴定到肽段长度主要分布7~20个氨基酸,大部分蛋白对应两个以上肽段,大部分蛋白的覆盖度在20%以下,蛋白分子量主要分布10~120 kD。所有样本两两之间计算Person相关系数而绘制的热图。相应肽段、蛋白质分布情况及样本之间的相关性见图1。

2.2 RhoE敲除前后心脏组织差异蛋白筛选

以FC>1.5、P<0.05作为显著上调的变化阈值,FC<1.5、P<0.05为明显下调的变化标准,发现与WT_NG组相比,WT_HG组上调差异表达蛋白198个,下调331个(图2A);KO_NG组上调差异表达蛋白26个,下调45个(图2B)。与KO_NG相比,KO_HG上调蛋白173个,下调255个(图2C)。与WT_HG相比,KO_HG显著上调差异表达蛋白质19个,明显下调差异表达蛋白质28个(图2D)。相应表达最明显的前10个蛋白质见表1。

2.3 RhoE敲除前后心脏组织差异蛋白亚细胞定位注释

WT_NG组相比,KO_NG组心脏组织中上调蛋白主要位于线粒体、细胞外基质、细胞核,下调蛋白主要分布于细胞质、细胞外基质、细胞核;WT_HG组心脏组织中上调蛋白主要位于细胞质、线粒体、细胞外基质,下调蛋白主要分布于细胞质、细胞核、细胞外基质。与WT_HG组相比,KO_HG组的心脏组织中上调蛋白主要位于细胞外基质、细

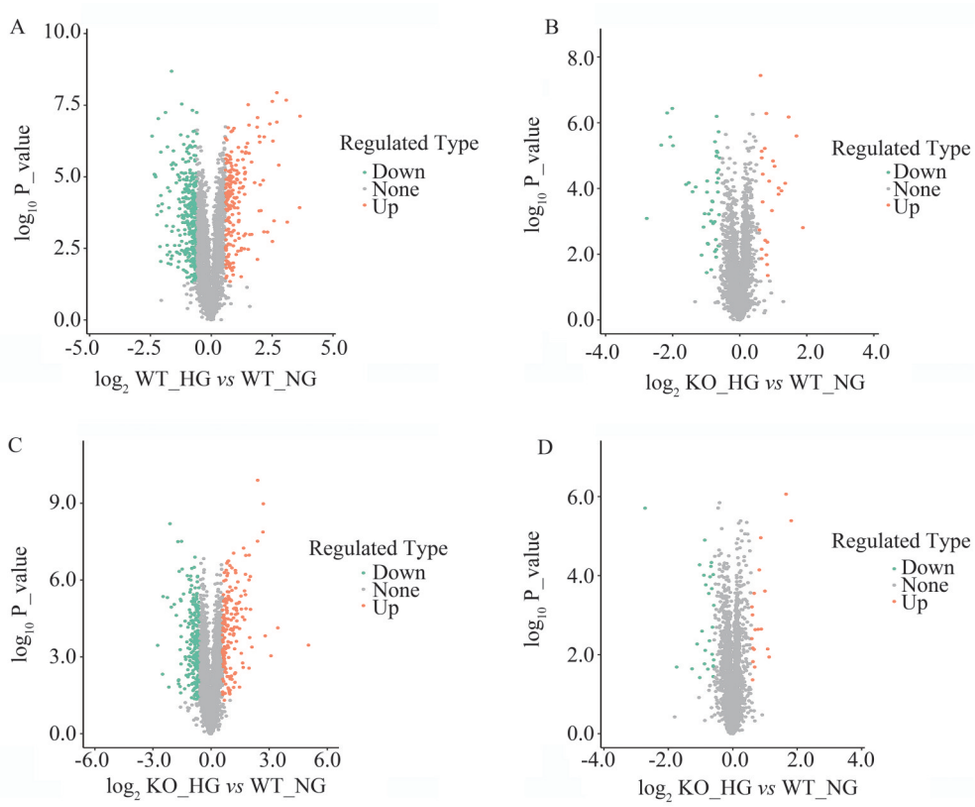


A：肽段长度分布；B：肽段数量分布；C：蛋白覆盖分布；D：蛋白分子量分布；E：样本之间Pearson相关系数热图

图1 蛋白质鉴定与解析

Fig 1 Protein identification and analysis

胞质、线粒体，下调蛋白主要分布于细胞质、细胞核、细胞外基质。与KO_NG组相比，KO_HG组心脏组织中上调蛋白主要位于细胞质、细胞外基质、线粒体，下调蛋白主要分布于细胞质、线粒体、细胞核。各组间比较差异蛋白亚细胞定位注释分类图见图3。



A：WT_HG *vs* WT_NG；B：KO_NG *vs* WT_NG；C：KO_HG *vs* KO_NG；D：KO_HG *vs* WT_HG

图 2　RhoE敲除前后心脏组织的差异表达蛋白火山图

Fig 2　Volcano plot of differentially expressed proteins in cardiac tissue before and after *RhoE* knockout

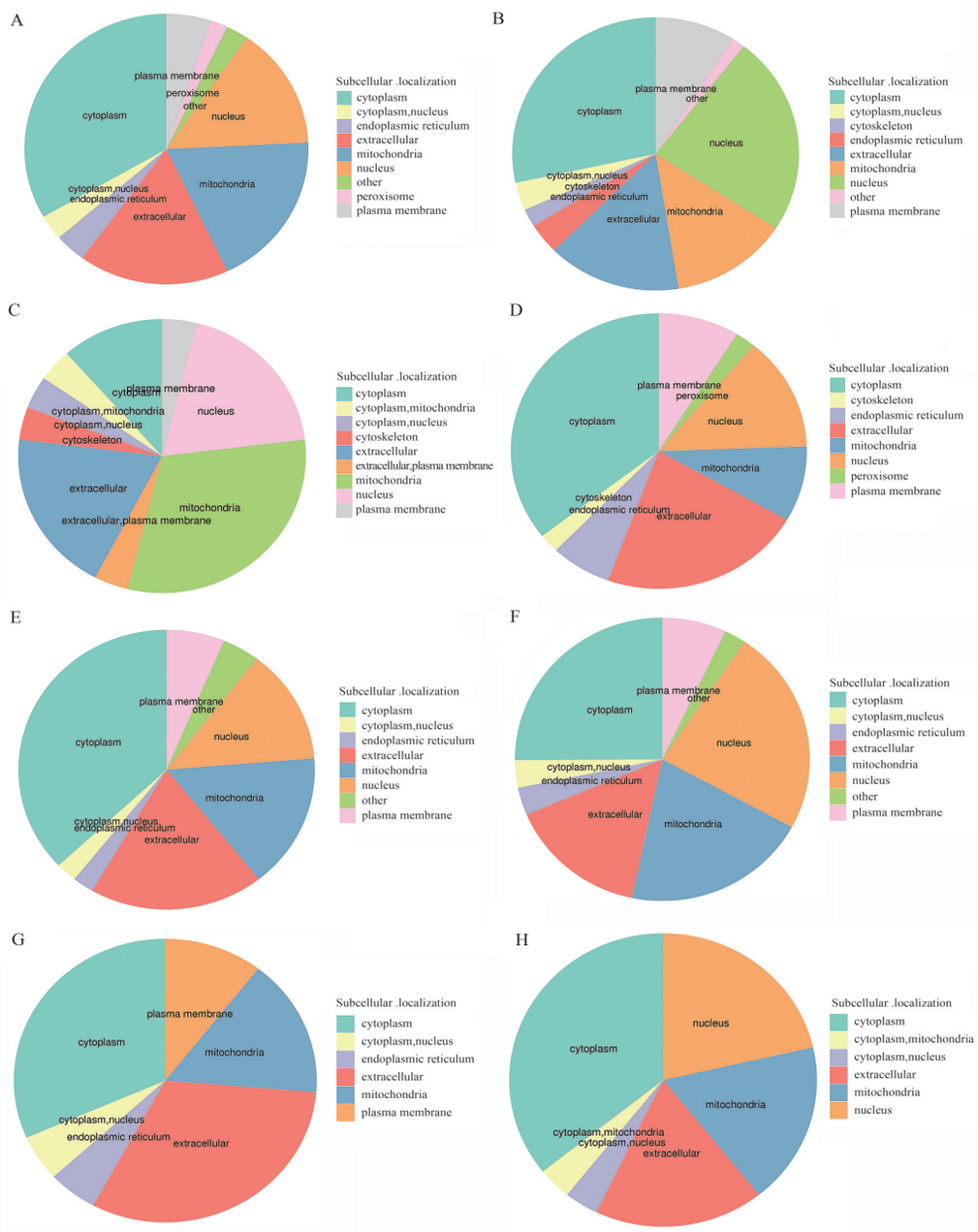
表 1　排名前10的差异表达蛋白质列表

Tab 1 Top ten differentially expressed proteins

Groups	Upregulated proteins	Downregulated proteins
WT_HG *vs* WT_NG	Cat, Ftl1, Ighm, Acot2, Pdk4, Acox1, Maoa, Fth1, Slc27a1, Slmap	Myh6, Tuba8, Coq5, Itih2, Serpinh1, A1i3, Cfl1, C3,rCG_34378, Lamb1
KO_NG *vs* WT_NG	Nit2, Gstz1, Ighm, Igg-2a, S100a8, Igh-1a, C4a, Sqor, Pdk4, Ndufaf6	Myl4, Pam, Dpysl3, Tagln, Nppa, Myh11, Mybphl, Myl7, Pdlim3, Map1b
KO_HG *vs* KO_NG	Cat, Maoa, Ftl1, Pdk4, Myl4, Acot2, Hsd17b4, Map1, Pygb, Csrp3	A1i3, Fgg, Myh6, A1m, Rps9, Fn1, Serpinh1, Gpd2, Atp1a2, Hpx
KO_HG *vs* WT_HG	Postn, Cacna2d2, RGD1566085, Ndufaf1, Acox3, Agps, Np- pa, Col1a1, Mcpt1, NEWGENE_621351,	Ighm, Lgals3bp, Plin2, Abhd16a, Apoa4, Rps8, Gbp1, Cryz, Rpl7, Acad11

2.4　差异表达蛋白GO注释

将筛选的差异蛋白从细胞组成，分子功能和生物过程3个层面进行GO注释，结果显示，与WT_NG相比，WT_HG组的心脏组织中上调蛋白主要分布于过氧化物酶体(peroxisome)，下调蛋白主要分布于核糖体亚单位(ribosomal subunit)；上调蛋白的分子功能主要集中于共因子结合(cofactor binding)，下调蛋白的分子功能主要集中于核糖体的结构成分(structural constituent of ribosome)；上调蛋白主要参与细胞脂质代谢生物过程(peroxisome organization)，下调蛋白主要参与肽段生物合成过程(peptide biosynthetic process)(图4A、B)。与WT_NG相比，KO_NG组的心脏组织中上调蛋白主要分布于免疫球蛋白复合体(immunoglobulin complex)，下调蛋白主要分布于细胞外区域(extracellular region)；上调蛋白的分子功能主要集中于免



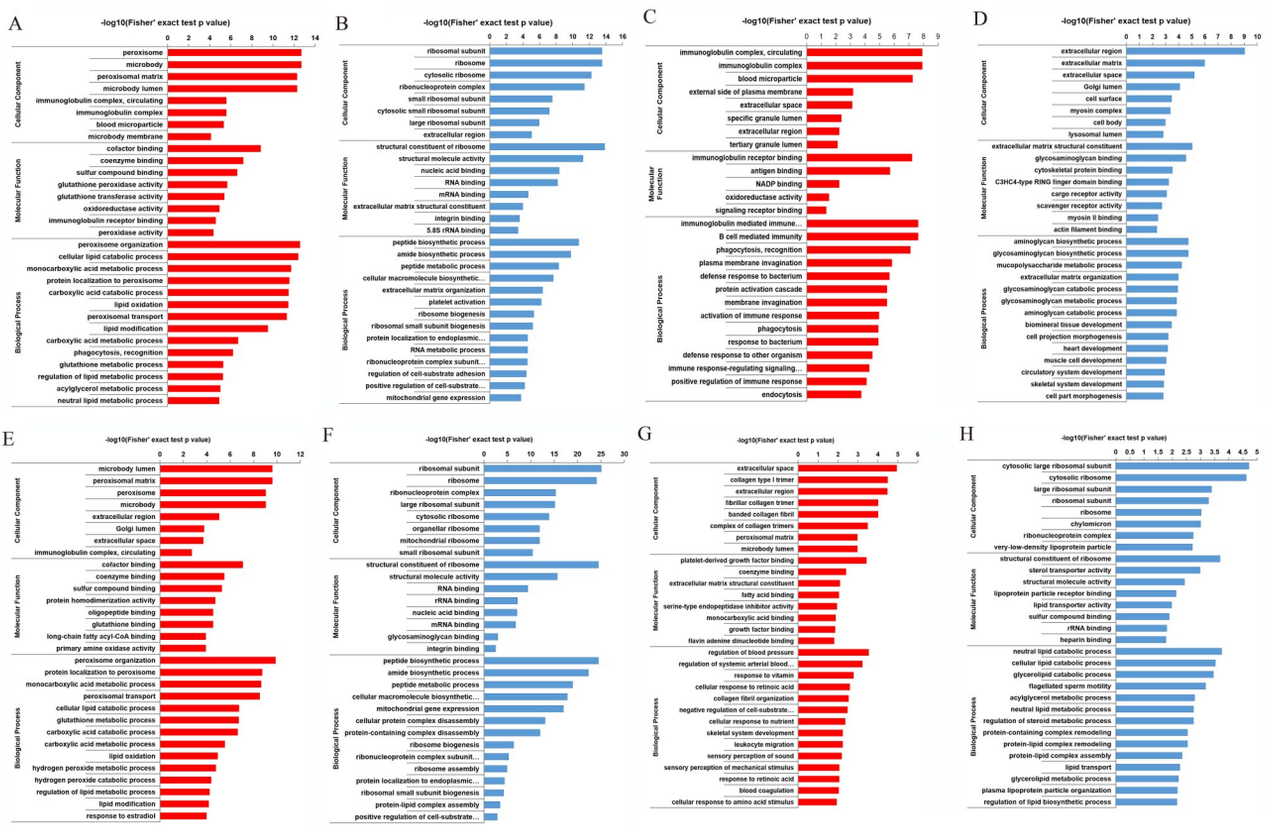
A：WT_HG *vs* WT_NG中上调蛋白；B：WT_HG *vs* WT_NG中上调蛋白；C：KO_NG *vs* WT_NG中上调蛋白；D：KO_NG *vs* WT_NG中下调蛋白；E：KO_HG *vs* KO_NG中上调蛋白；F：KO_HG *vs* KO_NG中下调蛋白；G：KO_HG *vs* WT_HG中上调蛋白；H：KO_HG *vs* WT_HG中上调蛋白

图3 RhoE敲除前后心脏组织差异蛋白亚细胞定位注释

Fig 3 Annotation of subcellular localization of differential proteins in cardiac tissues before and after *RhoE* knockout

疫球蛋白受体结合(immunoglobulin receptor binding)，下调蛋白的分子功能主要集中于细胞外基质结构成分(extracellular matrix structure constituent)；上调蛋白主要参与免疫球蛋白介导的免疫反应生物过程(immunoglobulin mediated immune response)，下调蛋白主要参与氨基聚糖生物合成过程(aminoglycan biosynthetic process)(图4C、D)。与KO_NG相比，KO_HG组的心脏组织中上调蛋白主要分布于过氧化物酶基质(peroxisomal matrix)，下调蛋白主要分布于核糖体亚单位(ribosomal subunit)；上调蛋白的分子功能主要集中于共因子结合(cofactor binding)，下调蛋白的分子功能主要集中于核糖体结构成分(structural constituent of ribsome)；上调蛋白主要参与过氧化物酶组成生物过程(peroxisome organization)，下调蛋白主要参与肽段生物合成过程(peptide biosynthetic process)(图

4E、F)。与WT_HG相比,KO_HG组的心脏组织中上调蛋白主要分布于细胞外空间(extracellular region),下调蛋白主要分布于胞质大核糖体亚基(cytosolic large ribosomal subunit);上调蛋白的分子功能主要集中于血小板衍生生长因子结合(platelet-derived growth factor binding),下调蛋白的分子功能主要集中于核糖体的结构组成部分(structural constituent of ribosome);上调蛋白主要参与血压调节生物过程(regulation of blood pressure),下调蛋白主要参与中性脂质分解生物过程(neutral lipid catabolic process)(图4G、H)。



A: WT-HG *vs* WT-NG中上调蛋白;B: WT-HG *vs* WT-NG中下调蛋白;C: KO-NG *vs* WT-NG中上调蛋白;D: KO-NG *vs* WT-NG中下调蛋白;E: KO-HG *vs* KO-NG中上调蛋白;F: KO-HG *vs* KO-NG中下调蛋白;G: KO-HG *vs* WT-HG中上调蛋白;H: KO-HG *vs* WT-HG中下调蛋白

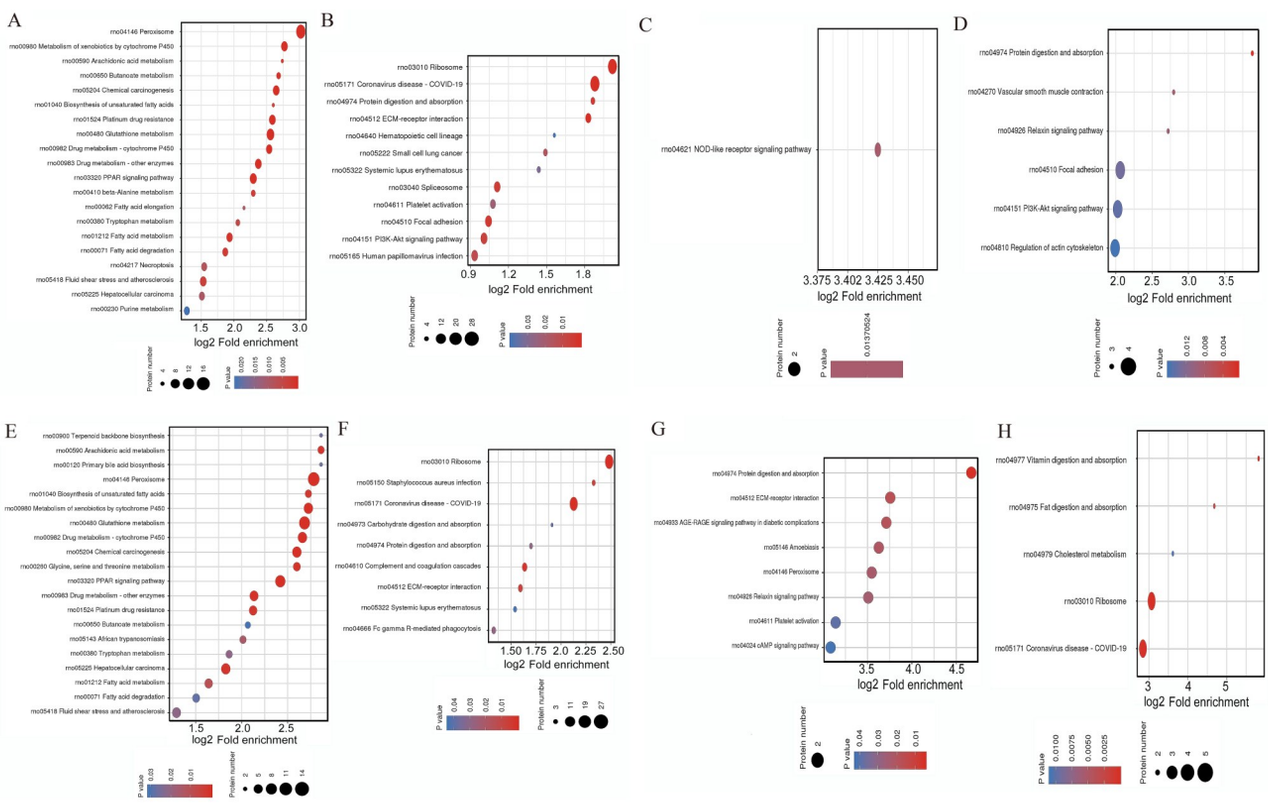
图4 差异表达蛋白GO注释

Fig 4 GO annotation of differentially expressed proteins

2.5 差异表达蛋白KEGG通路富集分析

将差异表达蛋白与KEGG数据库比对后进行差异信号分析发现,与WT_NG组相比,WT_HG组的心脏组织中上调的信号通路主要为过氧化物酶体(rno04146 peroxisome)、细胞色素P450对外源生物代谢的影响(rno00980 metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)、花生四烯酸代谢(rno00590 arachidonic acid metabolism)等(图5A);下调的信号通路主要有核糖体(rno03010 ribosome)、冠状病毒病- COVID-19(rno05171 coronavirus disease COVID-19)、蛋白质消化吸收(rno04974 protein digestion and absorption)等(图5B)。与WT_NG组相比,KO_NG组的心脏组织中上调的信号通路为rno04621 nod样受体信号通路(rno04621 NOD-like receptor signaling pathway)(图5C);下调的信号通路主要为蛋白质消化吸收(rno04974 protein digestion and absorption)、血管平滑肌收缩(rono04270 vascular smooth muscle contraction)、松弛素信号通路(rno04926 relaxin signal pathway)(图5D)等。与KO_NG相比,KO_HG组的心脏组织中上调的信号通路主要为萜类主链生物合成(rno00900 terpenoid backbone biosynthesis)、花生四烯酸代谢(rno00590 arachidonic acid metabolism)、过氧物酶体(peroxisome)等(图5E),下调的信号通路主要为核糖体(ribosome)、金黄色葡萄球菌感染(staphylococcus aureus infection)、冠状病毒病- COVID-19(rno05171

coronavirus disease COVID-19)(图 5F)。与WT_HG组相比,KO_HG组的心脏组织中差异表达蛋白参与的上调信号通路主要为蛋白质消化吸收(rno04974 protein digestion and absorption),细胞外基质受体相互作用(rno04512 ECM receptor interaction),糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号(rno04933 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complication),下调信号通路主要为维生素消化吸收(rno04977 Vitamin digestion and absorption),脂肪消化吸收(fat digestion and absorption),胆固醇代谢(cholesterol metabolism)(图5G)。



A: WT_HG *vs* WT_NG中上调蛋白; B: WT_HG *vs* WT_NG中下调蛋白;C: KO_NG *vs* WT_NG中上调蛋白;D: KO_NG *vs* WT_NG中下调蛋白;E: KO_HG *vs* KO_NG中上调蛋白; F: KO_HG *vs* KO_NG中下调蛋白;G: KO_HG *vs* WT_HG中上调蛋白;H: KO_HG *vs* WT_HG中下调蛋白

图5　差异表达蛋白KEGG通路富集分析气泡图

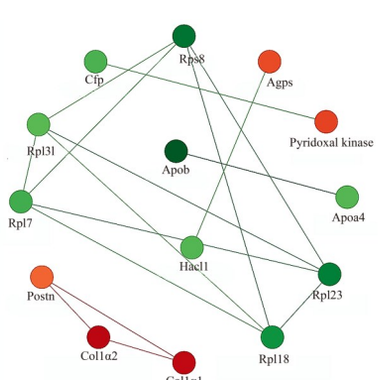
Fig 5　Bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed protein

2.6　蛋白互作网络分析

将KO_HG vs WT_HG中显著差异表达的蛋白数据库编号或蛋白序列与STRING蛋白网络互作数据库(V.11.0)对比分析,发现KO_HG组与WT_HG组相比的心脏组织上调蛋白中Col 1α1、Col 1α2相互作用的蛋白较多,下调蛋白中参与核糖体通路的相关蛋白(Rps8、Rpl7、Rpl18、Rpl23、Rpl31)在网络中的相互作用蛋白较多(图6)。

3　讨论

DCM发病机制复杂。为了解RhoE在DCM中的作用,本研究利用RhoE基因编辑模式动物复制了糖尿病模型,并利用当前最新的4D蛋白组学进



红色代表上调表达的蛋白质,绿色代表下调表达的蛋白质,颜色深浅代表*P*值的大小。

图6　蛋白互作网络分析

Fig 6　Analysis of protein interaction network

行研究,以期为从全局角度剖析RhoE与DCM的关系。

以往利用RhoE基因编辑细胞和动物模型揭示了许多RhoE的在心血管系统疾病的新功能[8-11],本研究首先委托苏州赛业公司基于CRISPR/Cas9基因组编辑技术构建RhoE基因敲除杂合子SD大鼠,进一步繁育和鉴定获得了实验所需的实验动物,再应用经典的腹腔注射链脲佐菌素诱导成急性1型糖尿病,该模型的成功复制为后续研究奠定了基础。随后分离各组大鼠心脏,采用传统的酶解法获得了满足蛋白组学所需的蛋白裂解物。通过液相色谱-质谱联用技术,分离到总的二级质谱谱图总数2 067 933个,肽段总数29 739个,定蛋白质总数3 597个,可定量蛋白数2 931个。通过严格的质控,本组中肽段长度、蛋白覆盖度、蛋白分子量均符合质控要求。相关性分析表明组内样本Person相关系数大于0.99,组间样本Person相关系数为0.95~0.97,提示本研究所用动物组内差异很小重复性好,但组间存在显著性区别,提示送检样本符合实验要求。

在鉴定的3 597个蛋白中,发现与WT_NG组相比,WT_HG组上调差异表达蛋白198个,下调331个,代表性的蛋白质有Cat、Ftl1、Ighm、Acot2、Pdk4、Myh6、Tuba8、Coq5、Itih2、Serpinh1等;KO_NG组上调差异表达蛋白26个,下调45个,代表性蛋白质包括Nit2、Gstz1、Ighm、Igg-2a、S100a8、Myl4、Tagln、Myh11、Mybphl、Myl7等;与KO_NG相比,KO-HG上调蛋白173个,下调255个,代表性蛋白质包括Cat、Maoa、Ftl1、Pdk4、Myl4、A1i3、Fgg、Myh6、A1m、Rps9等;与WT_HG相比,KO_HG明显上调差异表达蛋白质19个,明显下调差异表达蛋白质28个,代表性蛋白质包括Postn、Cacna2d2、Ndufaf1、Col1a1、Col1a2、Ighm、Lgals3bp、Plin2、Abhd16a和Apoa4等。亚细胞结构定位分析显示,非糖尿病状态下,RhoE基因敲除前后蛋白分布改变最明显的是细胞骨架(cytoskeleton)、过氧化物酶体(peroxisome)和细胞核(nucleus);早期的研究提示RhoE有调节细胞骨架的功能[7],本研究结果也提示RhoE敲除后显著改变了细胞骨架蛋白的表达。此外,RhoE敲除前后过氧化物酶体的改变也提示,其与RhoE与氧化应激有关,这与早期的一篇报道是一致的[18]。核蛋白分布的改变提示RhoE参与了基因表达调控。有趣的是,糖尿病态下改变最显著的分布是质膜(plasma membrane)和胞外区域(extracellular)。研究显示RhoE表达下调促进糖尿病大鼠分泌胶原蛋白Col1a1和Col1a2,这与胞外区域的分布改变密切相关。

差异表达蛋白GO注释分析提示RhoE敲除后的糖尿病大鼠主要的细胞外空间成分、相关血小板衍生生长因子结合功能、血压上调的生物过程均明显上调,而有关胞质大核糖亚基成分、核糖体结构组成功能以及中性脂质的分解的生物过程明显下调。这与先前报道的RhoE与心血管相关研究是一致的[10]。通过KEGG分析,本研究发现KO_NG组与WT_NG组相比的心脏组织中差异表达蛋白参与的信号通路主要为松弛素信号通路、黏着斑与PI3K-Akt信号通路等。而KO_HG组与WT_HG组相比心脏组织中差异表达蛋白参与的信号通路主要为核糖体、冠状病毒病-COVID-19与脂肪消化吸收等。上述均提示RhoE可能通过这些信号通路参与DCM的病理生理过程。其中PI3K-Akt信号通路在DCM中至关重要,抑制PI3K/Akt通路的自噬来改善胰岛素抵抗[19],上调microRNA-203可以通过PI3K/Akt信号通路的失活靶向PIK3CA,从而为DCM治疗提供可能[20]。另外,H2和H3松弛素抑制高糖诱导的新生大鼠心室肌细胞凋亡[21],内皮细胞中高表达的核糖体蛋白(RPS4Y1)可能通过调节p38 MAPK信号通路导致高糖诱导的功能障碍[22]。此外,脂质代谢紊乱在DCM的发展中也起非常关键的作用,纠正脂质代谢紊乱可减轻糖尿病小鼠的心功能不全[23]。而RhoE的缺失都会进一步导致上述信号通路的激活改变,从而对DCM的发生发展产生影响。这为后期的进一步挖掘DCM发病的分子机制提供了可能的方向。另一方面,最新研究表明住院的SARS-CoV-2感染的2型糖尿病患者会出现急性心血管综合征,而出现的急性心脏损伤相关的潜在机制仍不明确[24]。在本研究中,RhoE缺乏的糖尿病大鼠的心脏组织中有关冠状病毒病-COVID-19通路被富集,这似乎为COVID-19感染糖尿病患者出现急性心脏损伤的相关机制研究提供新思路。

在蛋白互作网络分析中,发现KO_HG组与WT_HG组相比的心脏组织上调蛋白中Col 1α1和Col 1α2相互作用的蛋白较多,下调蛋白中,参与核糖体通路的相关蛋白,在网络中的相互作用的蛋白较多,同样在KO_NG组与WT_NG组相比的心脏

组织中，得到了互作的蛋白（未发表资料）。这些信息为阐明DCM的发病机制提供更直观的实验依据。

本研究存在一定局限性。首先，本实验研究对象为RhoE全身敲除的大鼠，并非心脏特异性敲除，因此可能对结果产生一定的影响。其次，此样本为大鼠心脏并非人类，所得结论应用人体研究尚需进一步验证。最后，富集到的相关蛋白及KEGG信号还在验证中。

总之，本研究应用最新的4D-LQF蛋白质组学技术，首次揭示了RhoE表达缺失后在糖尿病心脏组织中蛋白质表达谱的变化特征，初步解析了差异表达蛋白质相关的生物学功能，富集了差异表达蛋白质参与的主要信号通路，研究结果从宏观角度上为临床上DCM的诊断和治疗提供了一定的实验参考。

作者贡献度说明：

揭伟，郭峻莉：论文设计；伍彩霞，邹园：动物实验及样本准备；赵鋆，施凯佳，吴林栩，陈旭：数据统计、图表制作和文献检索；赵鋆，施凯佳，申志华，郭峻莉，揭伟：文稿撰写、基金获取。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Lorenzo-Almorós A, Cepeda-Rodrigo JM, Lorenzo Ó. Diabetic cardiomyopathy [J]. Rev Clin Esp (Barc), 2022, 222(2):100-111.

2 Longo M, Scappaticcio L, Cirillo P, et al. Glycemic control and the heart: The tale of diabetic cardiomyopathy continues[J]. Biomolecules, 2022, 12(2):272.

3 Xi Y, Chen D, Dong Z, et al. RNA sequencing of cardiac in a rat model uncovers potential target LncRNA of diabetic cardiomyopathy [J]. Front Genet, 2022, 13: 848364.

4 Gomes KP, Jadli AS, de Almeida LGN, et al. Proteomic analysis suggests altered mitochondrial metabolic profile associated with diabetic cardiomyopathy [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9:791700.

5 Tayanloo-Beik A, Roudsari PP, Rezaei-Tavirani M, et al. Diabetes and heart failure: Multi-omics approaches [J]. Front Physiol, 2021, 12:705424.

6 刘婷，马铖杰，袁必锋，等. 修饰组学：解析修饰生物分子功能[J]. 中国科学：化学，2018，48(5)：477-490.

7 Jie W, Andrade KC, Lin X, et al. Pathophysiological functions of Rnd3/RhoE[J]. Compr Physiol, 2016, 6(1):169-186.

8 Dai Y, Song J, Li W, et al. RhoE fine-tunes inflammatory response in myocardial infarction[J]. Circulation, 2019, 139(9):1185-1198.

9 Yang X, Wang T, Lin X, et al. Genetic deletion of Rnd3/RhoE results in mouse heart calcium leakage through upregulation of protein kinase A signaling[J]. Circ Res, 2015, 116(1):e1-e10.

10 Yue X, Lin X, Yang T, et al. Rnd3/RhoE modulates hypoxia-inducible factor 1α/vascular endothelial growth factor signaling by stabilizing hypoxia-inducible factor 1α and regulates responsive cardiac angiogenesis[J]. Hypertension, 2016, 67(3):597-605.

11 Shao Z, Wang K, Zhang S, et al. Ingenuity pathway analysis of differentially expressed genes involved in signaling pathways and molecular networks in RhoE gene-edited cardiomyocytes[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(3):1225-1238.

12 王萌萌，王宝珠，迪拉热·阿迪，等. 急性主动脉夹层患者组织相关生物标志物的探讨[J]. 中华心血管病杂志，2021，49(11)：1108-1116.

13 Sun X, Wang D, Ding L, et al. Activation of autophagy through the NLRP3/mTOR pathway: A potential mechanism for alleviation of pneumonia by QingFei Yin[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:763160.

14 张书娅，邵钟铭，伍彩霞，等. Rnd3表达改变对糖尿病大鼠内皮祖细胞生物学特性的影响[J]. 中国病理生理杂志，2021，37(5)：834-840.

15 钱红运. 野百合碱与缺氧诱导的肺动脉高压蛋白质组学分析[D]. 福建医科大学，2021.

16 陈浩东. 1α，25(OH)_2VD_3对头胎母猪妊娠期乳腺发育及初乳乳成分的影响[D]. 华中农业大学，2020.

17 史非凡. 栓菌酸调节HSP90s诱导肿瘤细胞自噬作用机制及利用研究[D]. 三峡大学，2021.

18 Wu N, Zheng F, Li N, et al. RND3 attenuates oxidative stress and vascular remodeling in spontaneously hypertensive rat *via* inhibiting ROCK1 signaling[J]. Redox Biol, 2021, 48: 102204.

19 Song R, Zhao X, Cao R, et al. Irisin improves insulin resistance by inhibiting autophagy through the PI3K/Akt pathway in H9c2 cells[J]. Gene, 2021, 769:145209.

（下转第1778页）