

# 间充质干细胞移植于缺血心脏后合成蛋白的特异性提取与分析

卢婉儿<sup>1,2</sup>, 代莹<sup>1,3</sup>, 汤穆洽<sup>4</sup>, 魏康<sup>1,3</sup>, 陈术佳<sup>1,3</sup>, 黄怀<sup>1,3</sup>, 林静<sup>1,3</sup>, 彭浩荣<sup>1,3</sup>, 周礼轩<sup>1,3</sup>, 韩敦正<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>广州医科大学附属第一医院心内科, 广东广州 510120; <sup>2</sup>广州医科大学南山学院, 广东广州 511436; <sup>3</sup>广州医科大学第一临床学院, 广东广州 511436; <sup>4</sup>广州市红十字会医院急诊科, 广东广州 510220

[中图分类号] R542.22 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0593.2025.0417

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 卢婉儿, 代莹, 汤穆洽, 等. 间充质干细胞移植于缺血心脏后合成蛋白的特异性提取与分析[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(8): 991-998.

[收稿日期] 2024-05-08

[录用日期] 2024-07-30

[上线日期] 2025-04-17

**[摘要]** **目的** 应用突变型的甲硫酰基-tRNA合成酶(MetRS<sup>L247G</sup>)标记新生蛋白技术特异性提取和分析骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植于缺血心脏后的新生蛋白质组, 以探究移植后 BMSCs 可能的作用机制。**方法** 通过慢病毒感染的方法使 BMSCs 的 MetRS 基因第 274 位进行点突变, 实现 BMSCs 新生蛋白的叠氮左亮氨酸(ANL)标记, 并采用荧光非标准氨基酸标记(FUNCAT)验证此技术对 BMSCs 新生蛋白的标记效果。将健康雌性 8~10 周龄 30 只 C57BL/6J 小鼠分为实验组(n=15)与对照组(n=15)。实验组以结扎冠状动脉前降支的方法构建急性心肌梗死小鼠模型, 对照组小鼠仅行开胸手术, 不进行左前降支冠状动脉结扎。造模后两组小鼠均注射 MetRS<sup>L247G</sup> 基因突变的 BMSCs(MetRS<sup>L247G</sup>-BMSCs), 并在梗死区旁缺血区域的 3 个不同部位进行心肌注射。两组小鼠分别在术后第 0、2、6 天(每个时间点 n=5)腹腔注射 ANL, 1 次/6 h, 共 4 次, 24 h 后实施安乐死, 并分离心脏组织。采用针对 ANL 标记蛋白的富集技术及液相色谱-串联质谱(LC-MS)分析, 收集移植于两组小鼠心肌后 BMSCs 所合成且被标记的新生蛋白。采用基因本体论(GO)分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析、蛋白质互作网络(PPI)分析及热图分析 3 个时间点的差异蛋白, 并筛选出关键通路及基因。**结果** 荧光显微镜下可见 MetRS<sup>L247G</sup> 慢病毒感染的 BMSCs 标记有 mCherry 信号, 证实 MetRS<sup>L247G</sup>-BMSCs 细胞系构建成功, 且只有同时加入 MetRS<sup>L247G</sup>-BMSCs 和 ANL 的培养基中的新生蛋白标记有绿色荧光信号, 验证了此标记方法的敏感性及其特异性。GO 分析显示, 差异蛋白主要集中在细胞外泌体、细胞外基质、黏着斑等基本细胞生物过程; KEGG 分析及 PPI 分析显示, 差异蛋白主要参与补体和凝血级联通路、肌动蛋白细胞骨架调节通路、细胞凋亡通路等过程; 热图分析显示, 与对照组比较, 实验组小鼠移植后第 1 天, 其心肌组织抗凋亡相关因子及细胞黏附相关因子表达均明显上调(P<0.05); 实验组移植后第 3 天, 抗凋亡相关因子、促凋亡相关因子及细胞黏附相关因子表达均明显上调(P<0.05); 实验组移植后第 7 天, 抗凋亡相关因子、细胞分化相关因子及细胞黏附相关因子表达均明显上调(P<0.05); 而实验组第 1、7 天凋亡诱导因子 1 的表达明显下调(P<0.05)。此外, 在第 3 天时大部分差异蛋白的表达均明显上调(P<0.05), 如抗凋亡相关因子 S100 钙结合蛋白 A11、簇集素、凝溶胶蛋白, 促凋亡相关因子组织蛋白酶 B, 细胞分化相关因子转胶蛋白-2, 细胞黏附相关因子丝切蛋白-1、骨膜蛋白、纤连蛋白等。**结论** MetRS<sup>L247G</sup> 突变可使 BMSCs 吸收 ANL, 使新合成的蛋白被标记, 证实了该新生蛋白标记技术的可行性。BMSCs 在缺血心肌组织中新生蛋白的作用主要在外泌体分泌及细胞外基质组织方面。BMSCs 可能通过影响补体和凝血级联反应、激活炎症因子、调整肌动蛋白细胞骨架结构及调控细胞凋亡等途径, 以适应及应对缺血缺氧的环境, 从而维持 BMSCs 的存活。

**[关键词]** 间充质干细胞; 间充质干细胞移植; 心肌梗死; 心力衰竭; 蛋白质组学

## Specific extraction and analysis of synthesized proteins from mesenchymal stem cells transplanted into the ischemic heart

[基金项目] 国家自然科学基金(82100263); 广州市基础研究计划市校(院)企联合资助专题“登峰医院”项目(2025A03J4401, 2024A03J0655)

[作者简介] 卢婉儿, 主要从事干细胞治疗缺血性心脏病的研究

[通信作者] 韩敦正, E-mail: hann1986@sina.com

Lu Wan-Er<sup>1,2</sup>, Dai Ying<sup>1,3</sup>, Tang Mu-Han<sup>4</sup>, Wei Kang<sup>1,3</sup>, Chen Shu-Jia<sup>1,3</sup>, Huang Huai<sup>1,3</sup>, Lin Jing<sup>1,3</sup>, Peng Hao-Rong<sup>1,3</sup>, Zhou Li-Xuan<sup>1,3</sup>, Han Dun-Zheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China

<sup>2</sup>Nanshan College, <sup>3</sup>the First Clinical College, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511436, China

<sup>4</sup>Department of Emergency, Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou, Guangdong 510220, China

\*Corresponding author, E-mail: hann1986@sina.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82100263), the Guangzhou Basic Research Program: City-University (Institute)-Enterprise Jointly Funded Special Topic on "Peak Hospital" Project (2025A03J4401, 2024A03J0655)

**[Abstract] Objective** To specifically extract and analyze nascent proteins synthesized by bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) after transplantation into ischemic hearts using a technique employing mutant methionyl-tRNA synthetase (MetRS<sup>L247G</sup>) for nascent protein labeling, in order to explore the potential mechanisms of action in BMSCs post-transplantation. **Methods** Point mutation at position 274 of the *MetRS* gene in BMSCs was induced *via* lentiviral infection to enable azidonorleucine (ANL)-mediated labeling of nascent proteins in BMSCs. The labeling efficiency was verified by means of fluorescent non-canonical amino-acid tagging (FUNCAT). Thirty healthy female C57BL/6J mice (8-10 weeks old) were divided into control and experimental groups, with 15 mice in each group. The acute myocardial infarction model was constructed by ligating the left anterior descending coronary artery in experimental group, while control mice underwent only thoracotomy without coronary ligation. After modeling, both groups received intramyocardial injections of MetRS<sup>L247G</sup>-modified BMSCs (MetRS<sup>L247G</sup>-BMSCs) at 3 different sites in the peri-infarct ischemic region. Mice were intraperitoneally injected with ANL every 6 hours for 4 times on postoperative days 0, 2, and 6 ( $n=5$  for each time point) respectively, euthanized 24 h after the last injection, and cardiac tissues were isolated. The newly synthesized and labeled proteins produced by BMSCs after transplantation into the myocardium of experimental and control groups were collected, using an enrichment technique for ANL-tagged proteins and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS) analysis. Gene ontology (GO) analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis, protein-protein interaction (PPI) analysis, and heatmap visualization analysis were performed to identify differentially expressed proteins at the 3 time points and screen key pathways and genes. **Results** Under fluorescence microscopy, the MetRS<sup>L247G</sup> lentivirus-infected BMSCs were observed to be labelled with *mCherry* signals, confirming the successful construction of the MetRS<sup>L247G</sup>-BMSCs cell line. Green fluorescent signals were detected only in nascent proteins in culture medium containing both MetRS<sup>L247G</sup>-BMSCs and ANL, validating the sensitivity and specificity of the labeling method. GO analysis revealed that differentially expressed proteins were primarily involved in basic cellular biological processes such as extracellular exosome formation, extracellular matrix organization, and focal adhesion. KEGG and PPI analyses indicated that the differential proteins were mainly involved in complement and coagulation cascade pathway, actin cytoskeleton regulation pathway, and apoptosis pathway. Heatmap analysis showed significantly upregulated expression of anti-apoptosis and cell adhesion-related factors in experimental group on day 1 ( $P<0.05$ ), upregulated anti-apoptotic factors, pro-apoptotic factors, and cell adhesion-related factors on day 3 ( $P<0.05$ ), and upregulated anti-apoptotic factors, cell differentiation-related factors, and cell adhesion-related factors on day 7 ( $P<0.05$ ) compared with control group. Expression of apoptosis-inducing factor 1 was significantly downregulated on days 1 and 7 ( $P<0.05$ ). On day 3, most differentially expressed proteins, including anti-apoptosis factors (Protein S100-A11, Clusterin, Gelsolin), pro-apoptosis factor (Cathepsin B), cell differentiation-related factor (Transgelin-2), and cell adhesion-related factors (Cofilin-1, Periostin, Fibronectin) were significantly upregulated ( $P<0.05$ ). **Conclusions** The MetRS<sup>L247G</sup> mutation enables BMSCs to incorporate ANL and synthesize labeled proteins, confirming the feasibility of this nascent protein labeling technique. Nascent proteins of BMSCs in ischemic myocardium primarily contribute to extracellular exosome secretion and extracellular matrix organization. BMSCs may adapt to and respond to ischemic and hypoxic environments by influencing complement and coagulation cascades, activating inflammatory factors, regulating actin cytoskeleton structure, and modulating apoptosis, thereby maintaining the survival of BMSCs.

**[Key words]** mesenchymal stem cells; mesenchymal stem cell transplantation; myocardial infarction; heart failure; proteomics

心肌梗死及梗死后的慢性心力衰竭发病率高、预后差,是世界范围内的主要健康负担,且心肌梗死后心力衰竭的发生率呈增高趋势<sup>[1-4]</sup>。目前对心肌梗死后心力衰竭的治疗效果并不理想,药物治疗旨在控制症状及神经-体液调节,但无法恢复心肌组织的功能。近年来,随着干细胞移植疗法的不断发展,许多实验及临床研究均证实了此疗法的可行性,例

如间充质干细胞具有分化多能性、免疫调节能力及旁分泌作用<sup>[5-6]</sup>,并具有减轻移植排斥反应的优势<sup>[7]</sup>。神经再生、肝肾再生及心脏再生等均为目前以骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)为基础的再生医学的研究热点。采用BMSCs移植治疗心肌梗死可减少梗死范围、改善左心室收缩力,是一种有效、可行、安全的治疗方式,有望

改善心功能,提高患者的生活质量<sup>[8-9]</sup>。但有Meta分析指出,细胞疗法对急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)及心力衰竭的疗效有限,虽然与对照组相比,间充质干细胞组的左心室射血分数增加4%,早期心血管病死率降低,AMI复发减少,但远期病死率及生活质量差异无统计学意义,强调了提高疗效的必要性<sup>[9-12]</sup>。其不理想的疗效可能与梗死心肌微环境中BMSCs的低存活率密切相关,也是目前临床上导致此疗法难以推广的重要问题之一<sup>[13]</sup>。此外,目前的观点认为BMSCs分化为具有成熟功能的心肌细胞十分困难,其旁分泌功能似乎是心肌修复的主要机制<sup>[14-15]</sup>,但BMSCs在移植后分泌了哪些蛋白质,以及蛋白质的表达丰度如何尚未明确<sup>[6]</sup>。因此,干细胞治疗心肌梗死的作用机制尚不明确,细胞疗法应用受限,亟待进一步研究。本研究利用MetRS<sup>L247G</sup>将ANL标记于BMSCs移植后的新生蛋白,并分析移植于心肌组织中BMSCs新合成蛋白之间的差异蛋白谱,旨在探究BMSCs移植对缺血心肌组织的影响及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 BMSCs的培养** C57BL/6J鼠源性BMSCs购自美国Cyagen Biosciences公司。将BMSCs培养在添加10%胎牛血清(FBS)的DMEM中,传代至第8—10代时用于后续实验。

**1.2 突变型甲硫酰基-tRNA合成酶(methionyl-tRNA synthetase, MetRS<sup>L247G</sup>)慢病毒载体的合成及BMSCs的感染** 编码MetRS<sup>L247G</sup>突变体及mCherry蛋白的pMarSC质粒(购自美国Addgene公司)用SpeI和EcoRI消化其扩增产物,再用凝胶提取试剂盒(购自美国Qiagen公司)进行纯化,并用T<sub>4</sub>DNA连接酶(购自美国Promega公司)连接到FUGW慢病毒载体骨架片段中<sup>[16]</sup>,通过与pMD2.G和psPAX2共转染而包装合成FUGW-MetRS<sup>L247G</sup>-mCherry慢病毒<sup>[17-19]</sup>。然后转染至80%融合度的BMSCs中,72 h后以mCherry的表达评估感染效率。再将BMSCs固定于含4%多聚甲醛的PBS中,并在室温下以0.1%Triton X-100作用10 min。mCherry的一级抗体(购自美国Invitrogen公司)与带Alexa fluor 568橙红色荧光信号的二级抗体(购自美国Life Technologies公司)用于检测mCherry。将不带MetRS<sup>L247G</sup>突变的FUGW慢病毒空载体转导的慢病毒感染BMSCs作为对照。荧光显微镜下观察是否有mCherry橙红色荧光信号表达。

**1.3 基于MetRS<sup>L247G</sup>突变的新生蛋白标记技术的验证** 采用荧光非标准氨基酸标记(fluorescent non-canonical amino-acid tagging, FUNCAT)法,先将BMSCs在1 mmol/L叠氮左亮氨酸(azidonorleucine,

ANL)(购自德国Jena Bioscience公司)中培养24 h,然后用PBS轻轻冲洗、3.7%甲醛固定,再用0.5%Triton X-100穿膜。根据Click-iT Alexa Fluor 488蛋白质合成高含量筛选测定试剂盒(购自美国Life Technologies公司)的实验流程,用含有Alexa Fluor 488炔烃的Click-iT反应蛋白酶抑制剂进行Click-iT反应。在成像前用Hoechst 33342对细胞进行染色。

### 1.4 实验动物造模及分组

**1.4.1 实验动物来源及分组** 30只健康雌性8~10周龄C57BL/6J小鼠均购自南方医科大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2021-0041]。实验方案经广州医科大学附属第一医院动物实验伦理委员会批准(021358),实验过程遵循国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》<sup>[20]</sup>及国家法规。实验动物的所有手术均在麻醉状态下进行,并最大限度地减少其疼痛及死亡。将C57BL/6J小鼠分为对照组与实验组,每组15只。

**1.4.2 实验动物造模及BMSCs注射** 实验组小鼠吸入异氟烷麻醉后,插管并通风,然后进行左胸廓切开术,以结扎冠状动脉前降支的方法构建急性心肌梗死小鼠模型<sup>[21]</sup>;对照组小鼠接受麻醉和左胸廓切开术,但不进行左前降支冠状动脉结扎。两组小鼠均接受 $5 \times 10^5$  MetRS<sup>L247G</sup>-BMSCs的注射,使用30号胰岛素针头在缺血区域3、9、12点方向的3个部位进行心肌注射。随后关闭胸腔,使小鼠在加热垫中恢复后返回动物饲养室。为控制疼痛,术后小鼠每12小时皮下注射丁丙诺啡(0.05~0.20 mg/kg),共2 d;每天注射美洛昔康(1 mg/kg),共3 d。

**1.5 MetRS<sup>L247G</sup>-BMSCs移植后ANL标记的新生蛋白的标记与富集** 两组小鼠分别在术后第0、2、6天腹腔注射ANL(15 mg/kg),每个时间点各5只小鼠,每6小时1次,共4次,持续24 h;在第1、3、7天,小鼠吸入CO<sub>2</sub>实施安乐死后,分离心脏左前壁,用Click-iT蛋白富集试剂盒(购自美国Waltham公司)进行Click-iT反应,根据试剂盒说明书在炔烃树脂上捕获ANL标记的蛋白质。将收集的肝脏组织样品在含有8 mol/L尿素、200 mol/L Tris pH 8、4% 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐、1 mol/L NaCl、1%蛋白酶抑制剂(购自美国Sigma公司)的裂解缓冲液中培养,然后进行冰上超声处理。在4℃下以10 000×g离心5 min后,收集上清液,并在室温下将上清液与反应溶液(含硫酸铜)和树脂浆料在端对端旋转器中混合18 h,在70℃下加热15 min,在室温下冷却15 min,将蛋白结合树脂造粒,并在10 mmol/L DTT/SDS缓冲液中还原。还原后将树脂进一步造粒,再悬浮于7.4 mg/ml碘乙酰胺(购自美国Sigma公司)/SDS缓冲液中,并在黑暗中孵育30 min以消除背

景反应。随后,通过旋转柱用SDS缓冲液、8 mol/L 尿素、20% 乙腈洗涤树脂,以严格去除非特异性结合的蛋白质。用100 mmol/L Tris、2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、10% 乙腈消化树脂后,在37 °C下用0.1 μg/μl 质谱级胰蛋白酶(购自美国Waltham公司)进一步消化树脂结合蛋白过夜。然后将消化后的蛋白质在C-18 滤筒(购自美国Waters公司)上脱盐,在真空浓缩器中干燥,并在-20 °C下储存,用于液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)分析。

## 1.6 LC-MS样品制备、数据采集及分析

**1.6.1 LC-MS样品制备** 将上述真空浓缩器浓缩的蛋白产物置于16 μl的0.1% 甲酸(formic acid, FA)中重组。每个样品取8 μl注入1260 Infinity nHPLC液相分析仪器(购自美国Agilent Technologies公司),并用内径75 μm、长15 cm的尖端C-18柱(购自美国Phenomenex公司)分离。此系统与Thermo Orbitrap Velos Pro混合质谱仪串联运行,所有数据均以碰撞诱导解离模式收集。对数据依赖性扫描,启用电荷状态筛选和动态排除,重复计数为2,重复持续时间为30 s,排除持续时间为90 s。

**1.6.2 MS数据转换及搜索** XCalibur RAW文件以配置文件模式进行收集,并通过ReAdW v.3.5.1转换为MzXML。然后用MzXML2Search(包含在TPP 3.5版中)为所有扫描创建mgf文件。采用SEQUEST搜索数据,对UniRef100数据库的特定子集进行搜索,结果生成的肽类ID列表,用Scaffold(购自美国Protein Sciences公司)进行过滤。只有电荷态≥2<sup>+</sup>、最小肽长度为6个氨基酸、所有6个质量标签的非零量的肽类才可用于分析,且错误发现率设定为<1%的临界值,单个肽概率≥0.8,蛋白质概率≥0.99,每个蛋白质至少分配两个肽。通过光谱计数进行相对定量,并对样品之间的光谱计数丰度进行标准化。

**1.7 生物信息学分析及统计学处理** 基于完全连锁法对样本和蛋白质谱进行层次聚类。在每个时间点(即小鼠腹腔注射ANL后的第1、3、7天),通过Mann-Whitney U检验对两组差异蛋白的表达进行评估。设置P值<5%和折叠变化截止值>1.5标准以获得差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)列表,并通过热图实现可视化。对在一组中检测到≥60%,但在另一组中未检测到的蛋白质遵循Kojima等<sup>[22]</sup>的方法,而仅在一组中检测出>60%的更严格的临界值,并将其定义为“全或无”蛋白质命中,且包括在DEPs列表中。为确定显著强化的功能通路,使用WebGestalt平台(<http://www.WebGestalt.org/>)及多个数据库(KEGG、Reactome、Panther、Wikipathay)分析DEPs列表<sup>[23]</sup>。随后利用R平台绘制通路富集图。采用R Bioconductor软件包topGO进行基因本体

论(Gene Ontology, GO)分析,以识别GO生物过程和细胞成分。采用STRING软件进行蛋白质互作网络(PPI)分析(<https://string-db.org/>)<sup>[24]</sup>,然后用Cytoscape软件包进行可视化分析<sup>[25]</sup>。

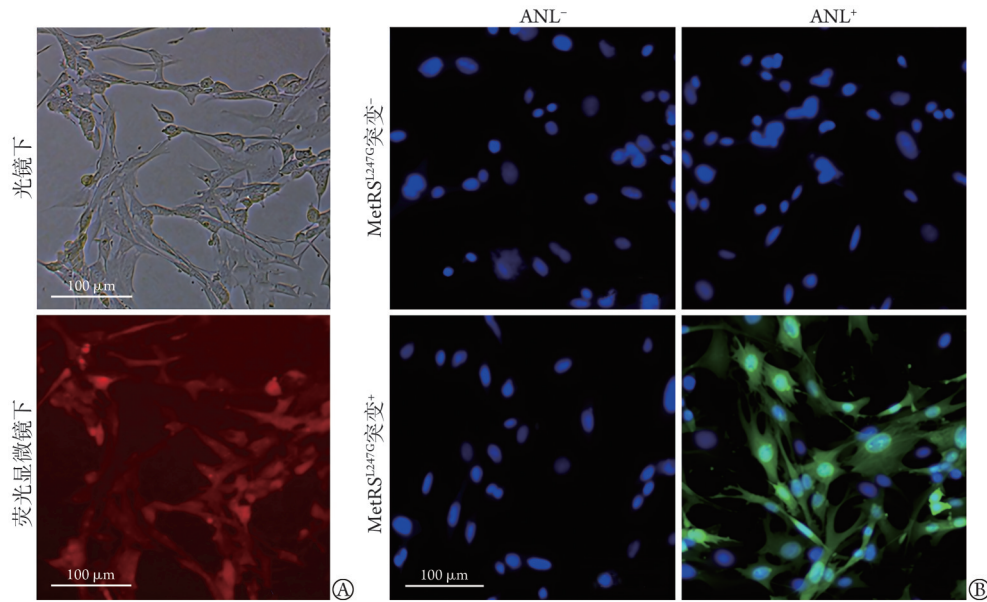
## 2 结 果

**2.1 基于MetRS<sup>L247G</sup>突变的BMSCs新生蛋白标记技术的鉴定** BMSCs经MetRS<sup>L247G</sup>慢病毒浓缩液感染后,光镜下显示BMSCs的形态呈长梭形,具有贴壁生长特性;荧光显微镜下观察,可见慢病毒感染后的BMSCs可表达mCherry红色荧光信号, MetRS<sup>L247G</sup>突变的BMSCs在经过冻存及传代后仍维持MetRS<sup>L247G</sup>表达情况(图1A)。成功转染MetRS<sup>L247G</sup>慢病毒的BMSCs可吸收ANL,从而使其新生蛋白被带有azide基团的ANL标记。FUNCAT技术通过化学共价结合的方式,将azide基团与alkyne-荧光素结合,从而显示出荧光信号。结果显示, MetRS<sup>L247G</sup>突变的BMSCs可摄取ANL,使其新生蛋白带有azide标记,并通过FUNCAT技术被检测出绿色荧光信号;未突变的BMSCs则不能吸收ANL,不能合成ANL标记的蛋白与alkyne-荧光素结合,因而没有绿色荧光信号的表达(图1B)。

## 2.2 BMSCs缺血缺氧培养后的新生蛋白质谱变化分析

**2.2.1 GO富集分析** GO分析显示,差异蛋白主要集中在细胞外泌体、细胞外基质、黏着斑等基本的细胞生物过程中,且大多数被识别的蛋白质亦在其中,其中细胞外泌体中富集的差异蛋白最多(附图1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0593.2025.0417FJ>)。

**2.2.2 KEGG分析** KEGG分析显示,移植后第1天两组间的差异蛋白主要在补体和凝血级联、肌动蛋白细胞骨架调节通路高度富集( $P<0.05$ ),如簇集素、补体C4、a-1抗胰蛋白酶及纤溶酶原(附图2A, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0593.2025.0417FJ>),且这些通路的蛋白质在第3天(如H因子)和第7天(如纤连蛋白)仍然丰富(附图2B、C, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0593.2025.0417FJ>)。移植后第3天两组间的差异蛋白主要集中在补体和凝血级联、吞噬体、溶酶体等通路高度富集( $P<0.05$ ),如补体C4、纤连蛋白、凝集素、凝血因子、冠蛋白、组织蛋白酶、网格蛋白等(附图2B, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0593.2025.0417FJ>)。移植后第7天两组间的差异蛋白主要集中在肌动蛋白细胞骨架调节、凋亡等通路高度富集( $P<0.05$ ),如纤连蛋白、组织蛋白酶、核纤层蛋白、凋亡诱导因子等(附图2C, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402>。



ANL. 叠氮左亮氨酸; MetRS<sup>L247G</sup>. 突变型甲硫酰基-tRNA合成酶; BMSCs. 骨髓间充质干细胞; A. 光镜下及荧光显微镜下观察MetRS突变的BMSCs细胞, 红色荧光为mCherry信号; B. FUNCAT技术观察MetRS突变的BMSCs细胞系的新生蛋白, 蓝色荧光为Hoechst 33342, 绿色荧光为Alexa Fluor 488

图1 基于MetRS<sup>L247G</sup>突变的BMSCs新生蛋白标记技术的鉴定

Fig.1 Identification of the novel protein labeling technique based on MetRS<sup>L247G</sup> mutation in BMSCs

0593.2025.0417FJ)。

**2.2.3 蛋白互作分析** 蛋白互作分析显示, 在缺血缺氧条件下BMSCs合成了大量蛋白: (1)补体和凝血级联途径相关蛋白, 如簇集素(Q06890)、纤溶酶原(P20918); (2)肌动蛋白细胞骨架调控相关蛋白, 如丝切蛋白-1(P18760)、纤连蛋白(P11276)、辅肌动蛋白4(A1BN54)、细丝蛋白A(Q8BTM8)等; (3)凋亡相关蛋白, 如核纤层蛋白(P48678)、组织蛋白酶B(P10605)等; (4)抗炎相关的蛋白质, 如热休克蛋白90β(P11499)、热休克蛋白B7(P35385)、S100钙结合蛋白A11(P50543)、膜联蛋白A1(P10107)等也有表达。其中, 凋亡诱导因子-1(M1(Q9Z0X1)蛋白表达明显下调(附图3, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0593.2025.0417FJ>)。

**2.2.4 热图分析** 热图分析显示, 与对照组比较, 实验组小鼠在移植后第1天, 抗凋亡相关因子及细胞黏附相关因子表达均明显上调( $P<0.05$ ); 实验组移植后第3天, 抗凋亡相关因子、促凋亡相关因子及细胞黏附相关因子表达均明显上调( $P<0.05$ ); 实验组移植后第7天, 抗凋亡相关因子、细胞分化相关因子及细胞黏附相关因子表达均明显上调( $P<0.05$ ); 而实验组第1、7天凋亡诱导因子1的表达明显下调( $P<0.05$ )(图2)。

### 3 讨论

已有研究显示, BMSCs同种异体移植可改善心

肌梗死患者的心功能, 但BMSCs移植后的低存活率严重影响其长期疗效, 进而限制了其临床应用<sup>[8,14]</sup>。BMSCs移植后的存活是其维持疗效的基础, 而提高BMSCs的抗缺血缺氧能力, 首先要了解其移植后发生的蛋白水平变化, 探索影响其存活的重要因子。然而, 从BMSCs移植区域中特异性提取其合成的蛋白质存在一定的困难, 也难以区分是移植前还是移植后合成的蛋白质。基于基因工程的新生蛋白标记技术这种强大的工具, 能够对体内BMSCs蛋白质组进行动态全面的分析, 从而可以实时了解BMSCs发生的功能及代谢水平的变化。本研究利用MetRS突变的新生蛋白标记技术可排除细胞本身固有蛋白及其他细胞合成蛋白的干扰, 可解决上述问题, 并定量分析BMSCs在移植至缺血心脏组织后新合成蛋白质谱的动态改变。

本研究利用MetRS<sup>L247G</sup>将ANL标记于BMSCs移植后的新生蛋白。MetRS是催化起始tRNA<sup>Met</sup>与甲硫氨酸(methionine, Met)产生化学反应的关键酶, 两者结合后形成的甲硫氨酰-tRNA可与核糖体P位点结合, 使Met成为蛋白质的第一个氨基酸。而利用MetRS基因第274位的点突变(由赖氨酸突变成甘氨酸), 则可使起始tRNA<sup>Met</sup>与ANL结合。当加入足够量ANL的情况下, ANL能竞争性抑制Met与起始tRNA<sup>Met</sup>的结合, 从而使ANL代替Met成为该突变细胞合成蛋白的第一个氨基酸。由于ANL末端带有重氮基, 因而以ANL作为起始氨基酸的新合成蛋白

	对照组			实验组		
	Day 1	Day 3	Day 7	Day 1	Day 3	Day 7
<b>抗凋亡相关因子</b>						
α-晶状体蛋白B链	3.5	1.0	4.2	7.0	1.0	2.9
S100钙结合蛋白A11	0.9	3.2	1.3	4.4	4.4	3.1
簇集素	1.6	0.7	0.0	5.5	4.4	1.8
凝溶胶蛋白	0.0	0.0	0.5	7.3	4.2	2.4
含硫氧还蛋白结构域蛋白5	1.0	6.3	4.0	2.0	12.2	8.5
14-3-3蛋白ζ/δ	2.6	1.3	1.4	1.3	3.9	2.4
热休克蛋白HSP90β	8.7	1.3	1.4	4.0	6.9	1.6
60 kD热休克蛋白(线粒体)	10.6	12.3	20.4	12.6	10.3	11.1
<b>促凋亡相关因子</b>						
精氨酸-谷氨酸二肽重复序列蛋白	0.3	0.6	0.7	0.0	2.0	1.3
组织蛋白酶D	2.3	3.6	2.4	0.9	5.5	5.9
组织蛋白酶B	2.6	7.0	3.0	4.1	14.1	4.4
凋亡诱导因子1(线粒体)	5.6	0.5	5.2	3.6	0.6	1.5
<b>细胞分化相关因子</b>						
兰尼碱受体2	8.3	0.1	0.5	8.8	0.0	0.2
转胶蛋白-2	1.0	3.5	3.0	1.2	6.4	7.3
胶调蛋白1	0.0	0.3	0.0	0.0	0.6	1.9
胶联蛋白-2	0.0	0.4	0.0	0.3	1.3	1.1
胶联素-2	2.0	2.2	0.9	0.9	2.2	0.2
Telethonin蛋白	0.5	3.0	2.8	1.3	2.4	2.8
肌钙蛋白 I (心肌)	12.6	13.5	15.3	13.5	9.2	13.8
<b>细胞黏附相关因子</b>						
Plectin蛋白	2.6	0.5	0.5	3.5	1.7	1.0
连环蛋白α-1	0.3	0.7	1.0	2.0	1.8	1.3
骨膜蛋白	0.4	1.0	1.9	1.0	9.1	16.0
纤连蛋白	15.6	18.2	8.8	55.5	68.5	63.2
Tes蛋白	0.0	0.2	0.0	0.3	4.5	0.7
含PDZ和LIM结构域蛋白1	0.6	4.6	3.2	1.6	6.3	3.5
含PDZ和LIM结构域蛋白5	0.0	3.4	0.9	0.0	16.0	6.2
含PDZ和LIM结构域蛋白7	0.3	0.2	1.7	1.9	9.4	4.5
纤溶酶原激活物抑制因子1 RNA结合蛋白	0.4	3.3	1.7	1.4	4.0	2.6
踝蛋白-1	1.2	2.9	0.6	8.3	12.3	10.3
含LIM和SH3结构域蛋白1	8.8	15.4	24.0	16.1	20.4	26.9
丝切蛋白-1	0.1	1.6	0.2	2.0	4.5	3.2
丝氨酸蛋白酶抑制剂H1	0.1	2.1	0.8	1.5	9.5	4.8
延伸因子-α1	3.2	7.8	4.6	4.3	14.4	7.3
围脂滴蛋白-3	0.3	1.7	2.4	0.3	0.3	1.1

图2 间充质干细胞移植于缺血心脏后的差异蛋白的热图分析

Fig.2 Heatmap analysis of differentially expressed proteins from mesenchymal stem cells transplanted to ischemic heart

质均可被重氮基特异性标记。MetRS<sup>L247G</sup>的表达允许Met替代物ANL负载到tRNAMet上，随后ANL掺入新合成的蛋白质中。ANL标记的蛋白质被结合到含炔烃的染料或树脂上，通过FUNCAT技术可检测ANL标记是否成功，通过ANL标记蛋白的富集技术提取BMSCs的新生蛋白可用于进一步的LC-MS分析。此技术可特异性鉴定移植后BMSCs新合成的蛋白质组，通过分析实验组与对照组之间的差异蛋白，对移植后BMSCs如何发挥治疗作用，以及提高BMSCs在梗死心肌环境中的存活率可能有所启发。本研究结果显示，BMSCs移植至梗死心肌后，新合成的蛋白可参与细胞外基质组织、外泌体分泌、对应激的反应和凋亡过程的调节，并可通过调节肌动

蛋白细胞骨架以应对受体体内的缺血缺氧环境，并调节补体激活及细胞凋亡以影响BMSCs移植后的存活。基于GO分析发现，两组BMSCs的差异蛋白主要集中在细胞外泌体、细胞外基质、黏着斑等基本细胞生物过程，这些通路代表了细胞生命的基本过程。其中细胞外泌体通路中有大量蛋白富集，这一细胞因子分泌方式可能为BMSCs向缺血组织递送生物活性物质，发挥改善缺氧的治疗作用。

心肌缺血诱导心肌不同成分包括心肌细胞、内皮细胞、成纤维细胞等损伤甚至死亡，引起补体级联激活、产生活性氧及损伤相关模式分子(damage-associated molecular pattern, DAMP)等过程的协同作用，启动促炎反应<sup>[26]</sup>。本研究KEGG分析显示，在

移植后第1、3天,移植到梗死心肌组织的BMSCs蛋白质组中DAMP明显上调,包括HSP90 $\beta$ 、HSPB7、ANXA1、S100-A11等炎症调节相关蛋白,可能发挥了保护细胞、避免组织过度损伤的关键作用。此外,补体系统被认为是炎症的重要介质<sup>[27]</sup>,相关研究也发现心肌梗死后补体的表达增加<sup>[27-28]</sup>。本研究KEGG分析显示,通过比较3个时间点的ANL标记的新生蛋白,发现在补体和凝血级联通路上存在着较多的差异蛋白富集,该通路的相关蛋白如簇集素、H因子、纤溶酶原等均与炎症<sup>[29-30]</sup>和心肌再生<sup>[28,31]</sup>有关。补体通路相关的簇集素可通过多种细胞存活途径发挥其活性,并在心肌梗死后心肌组织保护及细胞功能恢复方面发挥重要作用<sup>[32-33]</sup>。有研究发现,H因子在心肌梗死中对心肌和心功能的保护及促进组织愈合方面是必要的<sup>[34]</sup>。纤连蛋白的聚合是心脏损伤后心肌成纤维细胞丰度增加的关键因素,减少纤连蛋白及胶原在细胞外基质的沉积,有利于减轻病理性心脏重塑及纤维化<sup>[35]</sup>。根据聚焦于两组之间的差异蛋白,可推测在BMSCs移植后对心肌梗死潜在的修复价值。这也验证了BMSCs通过以上途径参与梗死后心肌组织的功能调节。但补体系统的过度激活可能导致组织进一步损伤,因此,补体系统激活及抑制的调节是减少AMI后心肌坏死及改善预后的关键<sup>[36-37]</sup>。

丰富的肌动蛋白细胞骨架调节及细胞凋亡相关的差异蛋白,在很大程度上反映了BMSCs在机体内缺血环境下的特征。本研究KEGG通路分析结果显示,在移植后第1、3天肌动蛋白细胞骨架调节通路及凋亡相关通路已经出现蛋白的高度聚集,并在第7天成为差异蛋白富集较丰富的两条通路。通过蛋白互作分析确定移植至缺血心肌的BMSCs在肌动蛋白细胞骨架调节(丝切蛋白-1、纤连蛋白、辅肌动蛋白4、细丝蛋白A)和细胞凋亡(核纤层蛋白、组织蛋白酶B、凋亡诱导因子-M1)两条通路出现了明显的蛋白富集,提示BMSCs可能通过调整细胞结构及凋亡途径以应对移植后的梗死环境,且这些蛋白与其他通路的蛋白联系密切,可能参与多种细胞生命活动。肌动蛋白细胞骨架调节对细胞迁移、归巢和滞留、存活和增殖均至关重要,通过调节该通路可提高BMSCs在缺血缺氧环境下存活的可能性。而血管内皮细胞向血管生成状态的转换也依赖于肌动蛋白细胞骨架的重塑<sup>[38]</sup>。此外,本研究结果显示,小鼠AMI缺血后的7d内凋亡及抗凋亡相关差异蛋白的表达明显增多,而在随后的3~7d细胞分化及黏附相关蛋白的表达水平也逐渐升高,反映出BMSCs在移植后的适应性变化,即BMSCs可能通过改变自身细胞的分化及黏附状态以提升在缺血环境下的生存能力,

且通过调节凋亡及抗凋亡通路以决定其在受体内存活时间,进而影响移植疗效。

综上所述,BMSCs移植至梗死心肌后,新合成的蛋白主要参与外泌体分泌、细胞外基质组织的调节,可通过改变补体和凝血级联、调动炎症因子、调节肌动蛋白细胞骨架、细胞凋亡等通路以应对受体内存缺血缺氧环境。本研究存在以下局限性:(1)仅选择了移植后第1、3、7天作为观察时间点,不足以全面反映BMSCs在移植后的长期动态变化;(2)结果仅显示BMSCs在梗死心肌组织中新蛋白的变化及其可能的机制,但尚未在临床试验中得到验证。未来应进一步优化实验设计,进行更长时间和更全面的观察,并在临床环境中验证,以提高研究的可靠性和临床应用的潜力。

#### 【参考文献】

- [1] Savarese G, Becher PM, Lund LH, *et al.* Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology[J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 118(17): 3272-3287.
- [2] 于海波,韩雅玲.《2023年欧洲心脏病学会急性和慢性心力衰竭诊断和治疗指南》更新解读[J]. *临床军医杂志*, 2023, 51(10): 991-994, 986.
- [3] 中国医师协会心血管内科医师分会,中国心血管健康联盟,心肌梗死后心力衰竭防治专家共识工作组. 2020心肌梗死后心力衰竭防治专家共识[J]. *中国循环杂志*, 2020, 35(12): 1166-1180.
- [4] Akhtar KH, Khan MS, Baron SJ, *et al.* The spectrum of post-myocardial infarction care: From acute ischemia to heart failure[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2024, 82: 15-25.
- [5] Ansari AS, Yazid MD, Sainik NQAV, *et al.* Osteogenic induction of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cell for bone regeneration: a systematic review[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 2406462.
- [6] White SJ, Chong JJH. Mesenchymal stem cells in cardiac repair: effects on myocytes, vasculature, and fibroblasts[J]. *Clin Ther*, 2020, 42(10): 1880-1891.
- [7] Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, *et al.* Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow - derived mesenchymal stem cells delivered by transcatheter injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial[J]. *JAMA*, 2012, 308(22):2369-2379.
- [8] Margiana R, Markov A, Zekiy AO, *et al.* Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):366.
- [9] Lee H, Cho HJ, Han Y, *et al.* Mid- to long-term efficacy and safety of stem cell therapy for acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 290.
- [10] Gyöngyösi M, Haller PM, Blake DJ, *et al.* Meta-analysis of cell therapy studies in heart failure and acute myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2018, 123(2): 301-308.
- [11] Katarzyna R. Adult stem cell therapy for cardiac repair in patients after acute myocardial infarction leading to ischemic heart failure: an overview of evidence from the recent clinical trials[J]. *Curr*

- Cardiol Rev, 2017, 13(3): 223-231.
- [12] Lalu MM, Mazzarello S, Zlepniĵ J, *et al.* Safety and efficacy of adult stem cell therapy for acute myocardial infarction and ischemic heart failure (SafeCell Heart): a systematic review and Meta-analysis[J]. Stem Cells Transl Med, 2018, 7(12): 857-866.
- [13] Karpov AA, Udalova DV, Pliss MG, *et al.* Can the outcomes of mesenchymal stem cell-based therapy for myocardial infarction be improved? Providing weapons and armour to cells[J]. Cell Prolif, 2017, 50(2): e12316.
- [14] Yan W, Xia Y, Zhao H, *et al.* Stem cell-based therapy in cardiac repair after myocardial infarction: Promise, challenges, and future directions[J]. J Mol Cell Cardiol, 2024, 188: 1-14.
- [15] Mabotuwana NS, Rech L, Lim J, *et al.* Paracrine factors released by stem cells of mesenchymal origin and their effects in cardiovascular disease: a systematic review of pre-clinical studies[J]. Stem Cell Rev Rep, 2022, 18(8):2606-2628.
- [16] Lois C, Hong EJ, Pease S, *et al.* Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors[J]. Science, 2002, 295(5556): 868-872.
- [17] Cheng M, Zhou J, Wu M, *et al.* CXCR4-mediated bone marrow progenitor cell maintenance and mobilization are modulated by C-kit activity[J]. Circ Res, 2010, 107(9): 1083-1093.
- [18] Tang YL, Zhu W, Cheng M, *et al.* Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression[J]. Circ Res, 2009, 104(10): 1209-1216.
- [19] Xu S, Tao J, Yang L, *et al.* E2F1 suppresses oxidative metabolism and endothelial differentiation of bone marrow progenitor cells[J]. Circ Res, 2018, 122(5): 701-711.
- [20] National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Guide for the care and use of laboratory animals: eighth edition[EB/OL]. (2011). <https://doi.org/10.17226/12910>.
- [21] Qin G, Li M, Silver M, *et al.* Functional disruption of alpha4 integrin mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitors and augments ischemic neovascularization[J]. J Exp Med, 2006, 203(1): 153-163.
- [22] Kojima K, Bowersock GJ, Kojima C, *et al.* Validation of a robust proteomic analysis carried out on formalin-fixed paraffin-embedded tissues of the pancreas obtained from mouse and human[J]. Proteomics, 2012, 12(22): 3393-3402.
- [23] Liao Y, Wang J, Jaehniĵ EJ, *et al.* WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W199-W205.
- [24] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [25] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [26] Hilgendorf I, Frantz S, Frangogiannis NG. Repair of the infarcted heart: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Circ Res, 2024, 134(12): 1718-1751.
- [27] Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, *et al.* The innate immune response in reperfused myocardium[J]. Cardiovasc Res, 2012, 94(2): 276-283.
- [28] Francisco J, Del Re DP. Inflammation in myocardial ischemia/reperfusion injury: underlying mechanisms and therapeutic potential[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(11): 1944.
- [29] Natarajan N, Abbas Y, Bryant DM, *et al.* Complement receptor C5aR1 plays an evolutionarily conserved role in successful cardiac regeneration[J]. Circulation, 2018, 137(20): 2152-2165.
- [30] Wysoczynski M, Solanki M, Borkowska S, *et al.* Complement component 3 is necessary to preserve myocardium and myocardial function in chronic myocardial infarction[J]. Stem Cells, 2014, 32(9): 2502-2515.
- [31] Regmi S, Pathak S, Kim JO, *et al.* Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: challenges, opportunities, and future perspectives[J]. Eur J Cell Biol, 2019, 98(5-8): 151041.
- [32] Pereira RM, Mekary RA, da Cruz Rodrigues KC, *et al.* Protective molecular mechanisms of clusterin against apoptosis in cardiomyocytes[J]. Heart Fail Rev, 2018, 23(1):123-129.
- [33] Pavo N, Lukovic D, Zlabinger K, *et al.* Intrinsic remote conditioning of the myocardium as a comprehensive cardiac response to ischemia and reperfusion[J]. Oncotarget, 2017, 8(40): 67227-67240.
- [34] Tu Z, Li Q, Bu H, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H[J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(11): 1803-1809.
- [35] Valiente-Alandi I, Potter SJ, Salvador AM, *et al.* Inhibiting fibronectin attenuates fibrosis and improves cardiac function in a model of heart failure[J]. Circulation, 2018, 138(12):1236-1252.
- [36] Syryga M, Mavroidis M. Complement system activation in cardiac and skeletal muscle pathology: friend or foe?[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 735: 207-218.
- [37] Hilgendorf I, Frantz S, Frangogiannis NG. Repair of the infarcted heart: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Circ Res, 2024, 134(12): 1718-1751.
- [38] Yadunandanan Nair N, Samuel V, Ramesh L, *et al.* Actin cytoskeleton in angiogenesis[J]. Biol Open, 2022, 11(12): bio058899.

(责任编辑: 张小利)