

血管紧张素 II 诱导小鼠心肌肥大差异 表达蛋白的鉴定与分析

冯 梦, 朱欣然, 郑盈盈, 张 朝, 张 茵

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 采用蛋白质组学方法研究血管紧张素(Angiotensin II, Ang II)诱导小鼠心肌肥大模型中心脏蛋白差异表达的变化情况并探讨其病理生理学意义。构建 Ang II 诱导的小鼠心肌肥大模型, 提取小鼠的心脏蛋白, 采用双向电泳技术分离差异表达的蛋白, 凝胶考染后切取差异蛋白点进行质谱检测(MALDI-TOF)分析, 获取的数据采用 Mascot 软件在 NCBI 数据库内检索。结果发现 Ang II 模型组小鼠心脏蛋白图谱中有 34 个蛋白点表达量与对照组有显著差异, 质谱鉴定出 14 种差异表达的蛋白, 其中高表达的蛋白有 2 个, 低表达的蛋白有 12 个。Ang II 诱导小鼠心肌肥大模型中表达有差异的蛋白主要与能量代谢、氧化应激和细胞骨架有关。

[关键词] 心肌肥大, 蛋白质组学, 线粒体, 能量代谢

[中图分类号] R331.3+1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2018)03-0078-07

Identification and Analysis of Differentially Expressed Proteins in Angiotensin II Induced-Mouse Model of Cardiac Hypertrophy

Feng Meng, Zhu Xinran, Zheng Yingying, Zhang Zhao, Zhang Yin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: To identify the differential expression of proteins in Angiotensin II (Ang II) induced-mouse model of cardiac hypertrophy and explore the pathophysiological significance. A mouse model of cardiac hypertrophy was established by subcutaneous administration of Ang II with an osmotic pump-based controlled release system and then the cardiac proteins were extracted. The differentially expressed proteins were separated with two dimensional electrophoresis (2-DE) and analyzed by matrix assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and the original data were processed by Mascot then searched in NCBI database. There were significant differences in the expression levels of 34 proteins between Ang II and Control groups ($P < 0.05$), 14 differentially expressed proteins were identified according to the database, in which 12 were down-regulated and 2 were up-regulated. The differentially expressed proteins in Ang II induced-mouse model of cardiac hypertrophy were mainly related to energy metabolism, oxidative stress and cytoskeleton.

Key words: cardiac hypertrophy, proteomics, mitochondria, energy metabolism

心肌肥大是长期高血压、肥厚型心肌病等多种心脏疾病的共同病理过程。早期的心肌肥大是一种应激状态下的代偿反应^[1], 但是长期适应不良性心肌肥大往往导致心衰和猝死。据统计, 全球每 1 000 人中就有 9 名心衰患者, 约 60% 的患者在确诊 5 年内死亡。因此, 阐明心肌肥大的发生机制对于理解心力衰竭的病理过程极其重要。

压力负荷的应激和多种神经体液因子的刺激是心肌肥大的主要诱发因素, 其中血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(Renin-Angiotensin-Aldosterone System, RAAS)

收稿日期: 2018-05-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30570662, 30871228, 31171302)、江苏省教育厅自然科学研究计划重大项目(16KJA18000)、江苏省优势学科资助项目(1164320H106)。

通讯联系人: 张茵, 讲师, 研究方向: 心脏能量代谢. E-mail: zhangyin@njnu.edu.cn

中最重要的活性激素,也是目前最强的致心肌肥大的因素。Ang Ⅱ主要通过 AT₁ 受体结合,激活参与心肌肥大的多种信号分子^[2]。RAAS 的持续激活可以使心肌发生肥大、纤维化和坏死,导致心脏功能由代偿逐渐走向失代偿。因此,Ang Ⅱ缓释刺激诱导的动物心肌肥大或心衰是理想的研究模型。

蛋白质组是对基因组的补充,比较不同生理或病理条件下蛋白质表达的情况,从而揭示蛋白质对生命活动的影响。心脏肥大向心力衰竭的转变过程是病理性重塑的过程,在这个过程中,参与结构和代谢重塑的一些关键蛋白的表达也会发生变化^[3]。因此,鉴定出这些发生差异变化的蛋白并认识它们的功能,将有助于我们更好地了解心肌肥大的发生机制。在本研究中,我们借助蛋白质组学的方法,从整体上比较 Ang Ⅱ诱导的心肌肥大模型组和对照组小鼠心脏蛋白表达的差异并探讨其病理生理学意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57/BL6 小鼠,8~10 周龄,购于南京大学模式动物研究所。

1.1.2 实验试剂

Ang Ⅱ购于 Sigma 公司;Micro-osmotic Pump(model 1002)购于 Alzet 公司;IPG 胶条(24 cm,pH 3-10 NL)购于 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组

C57/BL6 小鼠随机分为两组,分别为模型组(Ang Ⅱ组)和对照组(Ctrl 组),每组 10 只,模型组:以 $1.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的速度缓释 Ang Ⅱ 14 d;对照组:缓释生理盐水。

1.2.2 Ang Ⅱ诱导小鼠心肌肥大模型制备

用生理盐水溶解 Ang Ⅱ,每只 Micro-osmotic Pump 中注入配制好的 Ang Ⅱ或生理盐水;腹腔注射三溴乙醇溶液,麻醉小鼠;小鼠背部皮肤脱毛后,用碘伏消毒,剪开背部皮肤,向皮下植入 Micro-osmotic Pump;缝合皮肤。14 d 后做后续检测。

1.2.3 心脏超声检测

超声心动实验于南京医科大学动物实验中心完成,采用 Vevo 2100 系统进行无创二维超声检测。

1.2.4 心脏组织 H&E 染色

分离模型组和对照组小鼠的心脏,并用 4%多聚甲醛固定,进行石蜡包埋和切片。将切好的石蜡切片放置二甲苯中脱蜡,二甲苯 I:5 min、二甲苯 II:5 min。通过梯度酒精进行复水,100%酒精:2 min;95%酒精:2 min;80%酒精:2 min;双蒸水:4 min。用苏木素染色 3 min,1%氨水溶液返蓝 5 s,双蒸水冲洗 3 次,伊红染色 1 min,无水乙醇脱水 3 次,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.2.5 心室蛋白提取

颈椎脱臼法处死小鼠后,迅速取出心脏,在预冷的 PBS 缓冲液中排出残留的血液,剪取心室组织称重,置于玻璃匀浆器中,按 1/15 加入蛋白裂解液(临用前加入蛋白酶抑制剂 Cocktail 和 PMSF)充分匀浆;冰上超声 10 min;加入 DNAase,补加 PMSF,4 ℃混匀 2 h;12 000 rpm,4 ℃离心 45 min,收集上清;Bradford 法进行蛋白定量。

1.2.6 双向凝胶电泳

取 800 μg 的蛋白样品,加入水化上样缓冲液,混合均匀,组成 500 μL 上样体系,缓慢均匀加入胶条槽中;剥去 IPG 胶条的保护膜,胶面朝下置于聚焦槽中的样品溶液上,每根 IPG 胶条上覆盖 2 mL 矿物油,盖上盖子,水化过夜(12 h~14 h);将 IPG 胶条从水化盘中取出,胶面朝上放入聚焦盘,设置 IPGphor 仪器运行参数,进行等点聚焦,200 V 1 h,500 V 1 h,500 V~10 000 V 1 h,10 000 V 2 h。等点聚焦结束后,迅速将 IPG 胶条取出,依次放入平衡缓冲液 A(含有碘乙酰胺)和 B(含有 DTT)中,各平衡 15 min;将 IPG 胶条轻轻润洗之后,放入第二向 SDS-PAGE 胶中,最后用琼脂糖封顶;进行电泳(电流 10 mA/gel,持续 30 min 后换用 30 mA/gel)直至溴酚蓝到达距凝胶下缘 1 cm 处终止电泳。电泳结束后,剥胶进行考马斯亮蓝染色:固定 2 h;染色 16 h~24 h;漂洗 2 次;最后放入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中稳定蛋白质-染料复合物。

1.2.7 凝胶扫描及图像分析

考染的凝胶通过 ImageScanner (GE Healthcare, USA) 扫描仪获取图像, ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, USA) 进行分析统计, 筛选出差异蛋白点。

1.2.8 蛋白质胶内酶解

将蛋白差异点挖取后, 加入 200 μL 脱色液 (100 mmol/L NH_4HCO_3 /30% ACN), 脱色至透明; 冻干后加入胰酶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 使胶块充分吸胀; 加入 20 μL ~ 30 μL 25 mmol/L NH_4HCO_3 缓冲液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 h 左右; 酶解后的胶粒用 100 μL 60% ACN/0.1% TFA 提取肽段, 冻干浓缩。

1.2.9 质谱分析与蛋白数据库检索

用 5 μL 0.1% TFA 溶解肽段干粉, 点样, 进行质谱分析 (MALDI-TOF)。质谱数据采用 Mascot 软件在 NCBI nr 数据库内进行检索。

1.2.10 mRNA 提取以及 RT-qPCR 分析

颈椎脱臼法处死小鼠后, 迅速取出心脏, 称重, 用预冷的 PBS 洗净残留的血液, 剪取合适大小的心室组织, 使用 Trizol 试剂提取组织中的 mRNA, 按照 Takara 反转录试剂盒反转录得到 cDNA, 并用 NanoDrop 分光光度计测定其浓度, 最后 RT-qPCR 检测肥大基因和差异蛋白的转录水平。

1.2.11 蛋白提取以及 Western blot 分析

颈椎脱臼法处死小鼠后, 迅速取出心脏, 称重, 用预冷的 PBS 洗净残留的血液, 剪取合适大小的心室组织, 按照每 1 mg 组织加 10 μL 裂解液的比例加入含有蛋白酶抑制剂 PMSF 和 Cocktail 的 RIPA 裂解液, 冰上匀浆, 用玻璃匀浆器匀浆至均匀、无可见组织块。12 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 转移上清至新的 EP 管中, 经 Bradford 法蛋白定量, 加入 5 \times Sample Buffer, 于 99 $^{\circ}\text{C}$ 煮样器中煮样 5 min, 冷却后开始上样。先 60 V 恒压电泳使蛋白样品通过浓缩胶, 进入分离胶后改用 100 V 电压继续电泳, 350 mA 恒流转膜 80 min。用 5% 的脱脂牛奶封闭膜 1 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 室温孵育二抗 1 h ~ 2 h, 利用 ECL 显色并用化学发光成像系统显色目的条带。

1.3 统计学处理

采用 Image J 软件对细胞面积进行统计以及对 Western blot 结果进行灰度分析, 用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, Origin 8.0 软件进行图表制作。数据均采用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 两样本数据之间的差异比较用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

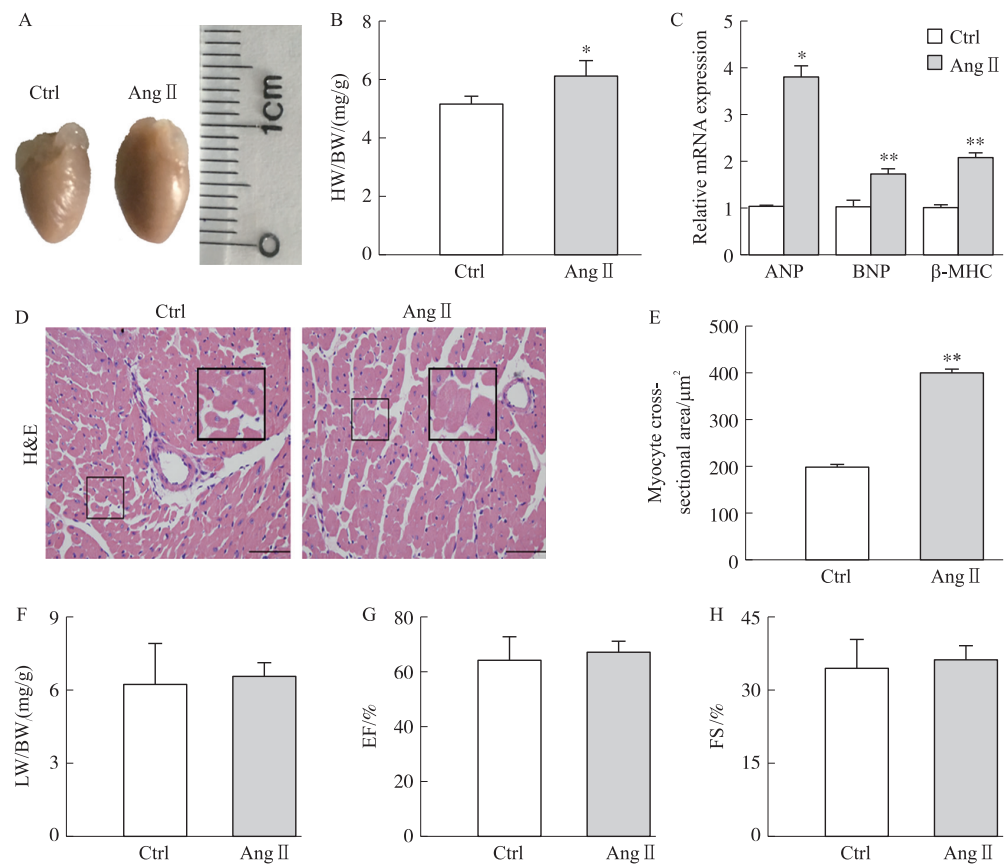
2 实验结果

2.1 Ang II 诱导小鼠心脏发生肥大反应

心肌肥大的基本特征包括心肌细胞体积增大、胶原纤维密度增加以及胚胎期基因的重新表达等。为了检测 Ang II 对心肌细胞的影响, 我们用 Ang II 持续给药 14 d 后, 对小鼠进行多重肥大指标的检测。如图 1 所示, Ang II 组小鼠的心脏体积和心重体重比明显大于对照组。同时心肌细胞肥大的标志分子 ANP、BNP 和 β -MHC 的 mRNA 表达显著升高。H&E 染色显示 Ang II 组小鼠心肌细胞的横截面积明显大于对照组。而 Ang II 组小鼠的肺重体重比没有变化, 说明模型组小鼠没有出现肺水肿现象。另外 Ang II 组与对照组小鼠的左室射血分数和短轴缩短率基本处于同一水平, 说明模型组小鼠的心脏收缩能力是正常的, 处于肥大的代偿阶段。以上检测结果说明 Ang II 诱导小鼠的心脏出现肥大现象。

2.2 心脏差异蛋白的表达与鉴定

我们提取 Ang II 组和对照组小鼠的心室蛋白进行双向电泳检测和质谱分析。用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件对 Ang II 组和对照组小鼠的心脏蛋白图谱进行分析比较, 发现 Ang II 组小鼠心脏蛋白图谱中有 34 个蛋白点表达量与对照组有显著差异 ($P < 0.05$)。在凝胶上切取上述差异蛋白点进 MALDI-TOF 质谱检测, 对获取的数据采用 Mascot 软件在 NCBI nr 数据库内检索。结果共鉴定出 14 个差异表达的蛋白, 见表 1, 这 14 个蛋白在双向电泳图谱中的位置如图 2 所示, 其中有 9 个蛋白定位于线粒体, 3 个位于细胞骨架, 1 个位于细胞质中, 还有 1 个是胞外分泌蛋白。与对照组相比, Ang II 组表达上调的蛋白有 2 个, 表达下调的蛋白有 12 个。



A:生理盐水对照和 Ang II 处理组中小鼠心脏的体积大小. B:小鼠的心重体重比. C:ANP, BNP 和 β -MHC 的 mRNA 表达. D:H&E 染色检测小鼠心肌细胞的横截面积(标尺:100 μ m). E:对 D 图细胞面积的统计. F:小鼠的肺重体重比. G:左室射血分数. H:左室短轴缩短率. *:与对照组相比 $P<0.05$; **:与对照组相比 $P<0.01$.

图 1 心脏肥大的表型特征

Fig. 1 Phenotype characteristics of cardiac hypertrophy

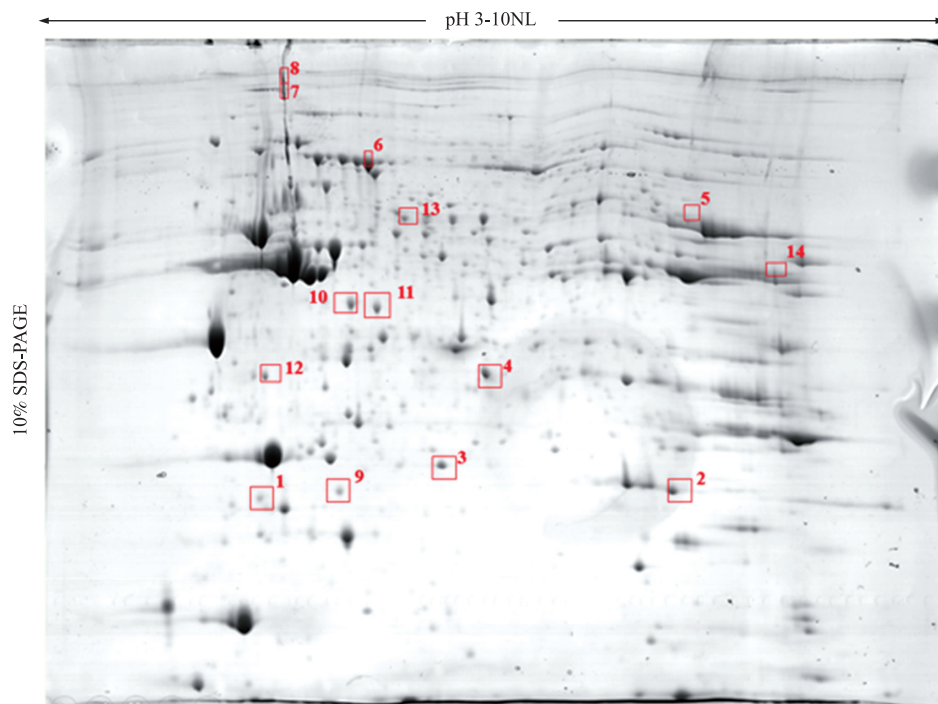


图 2 Ang II 组小鼠心脏差异蛋白点表达的双向电泳图谱

Fig. 2 2D gel map of protein spots identified to be differentially expressed in the hearts of Ang II-treated mice

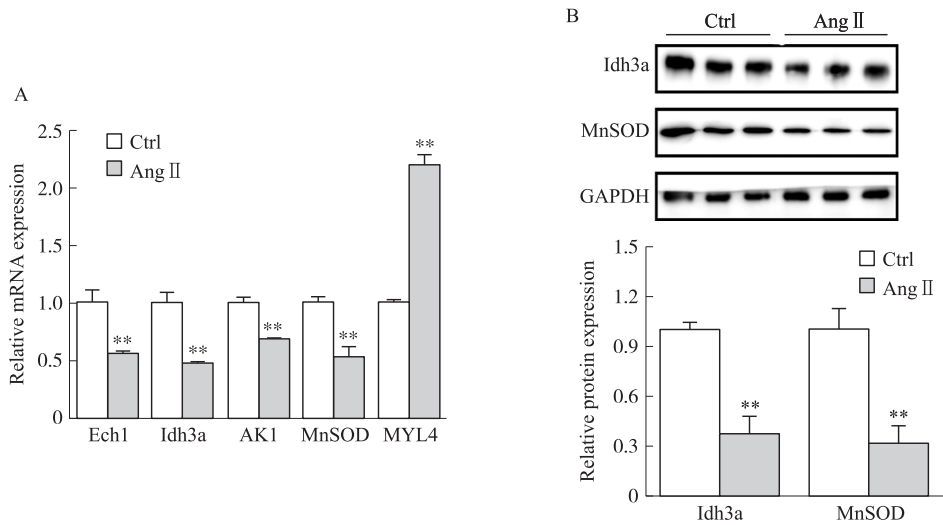
表 1 Ang II 组小鼠心脏差异表达的蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins in the hearts of Ang II-treated mice

Spot no.	Accession no.	Protein name	Biological process	Mr(Da)	pI	Mascot score	Fold	Subcellular location
1	NP_001342683.1	Myosin light chain 4	Actomyosin synthesis, muscle contraction, cell structure and motility, modulate actin-activated ATPase activity	21 260	4.96	65	4.614 9	Cytoskeleton
2	NP_038699.2	Superoxide dismutase[Mn]	Removal of superoxide radicals, glutathione metabolic process,	24 816	8.80	74	-2.395 71	Mitochondrion
3	NP_444349.1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-di-enoyl-CoA isomerase	Fatty acid beta-oxidation, lipid metabolism	36 437	7.60	79	-2.523 26	Mitochondrion, Peroxisome
4	NP_444349.1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-di-enoyl-CoA isomerase	Fatty acid beta-oxidation, lipid metabolism	36 437	7.60	79	-2.583 46	Mitochondrion, Peroxisome
5	NP_031531.1	ATP synthase subunit alpha	Mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport, lipid metabolic process	59 830	9.22	63	2.997 21	Mitochondrion
6	NP_033784.2	Serum albumin	Cellular protein metabolic and transport, high-density lipoproteinparticle remodeling	70 700	5.75	80	-2.622 39	Extracellular region or secreted
7	NP_033740.2	Actin, gamma-enteric smooth muscle	Muscle contraction, mesenchyme migration	42 249	5.31	89	-17.608 2	Cytoskeleton
8	NP_031418.1	Actin, aortic smooth muscle	Vascular smooth muscle contraction	42 381	5.23	64	-34.280 6	Cytoskeleton
9	NP_001185720.1	Adenylate kinase isoenzyme 1	ATP metabolic process, adenine nucleotide metabolism	21 640	5.67	60	-14.745 6	Cytoplasm
10	NP_083849.1	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	Carbohydrate metabolic process, tricarboxylic acid cycle	40 069	6.27	75	-5.8228 1	Mitochondrion
11	NP_083849.1	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	Isocitrate metabolic process, tricarboxylic acid cycle	40 069	6.27	55	-5.5421 9	Mitochondrion
12	NP_080728.1	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9	mitochondrial electron transport, ubiquinone biosynthetic process	35 232	5.60	65	-3.697 45	Mitochondrion
13	NP_080175.1	Cytochrome b - c1 complex subunit 2	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c, oxidative phosphorylation, aerobic respiration	48 262	9.26	62	-8.305 9	Mitochondrion
14	NP_080175.1	Cytochrome b - c1 complex subunit 2	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c, oxidative phosphorylation, aerobic respiration	48 262	9.26	63	-8.961 58	Mitochondrion

2.3 心脏差异蛋白的 mRNA 和蛋白水平表达变化

为了验证双向电泳的分析结果,我们分别检测了差异蛋白基因 Ech1, Idh3a, AK1, MnSOD 和 MYL4 的 mRNA 表达变化以及 Idh3a 和 MnSOD 的蛋白表达变化. 如图 3A 所示, Ang II 组的 spot3 二烯酰-辅酶 A 异构酶(Ech1)、spot10 异柠檬酸脱氢酶(Idh3a)、spot9 腺苷酸激酶(AK1) 和 spot2 线粒体超氧化物歧化酶



A: 差异蛋白基因的 mRNA 表达; B: Western blot 分析 Idh3a 和 MnSOD 的蛋白表达及其相对表达量分析.

** : 与对照组相比 $P < 0.01$.

图 3 心脏差异蛋白的 mRNA 和蛋白水平表达变化

Fig. 3 The expression of mRNA and proteins in the hearts

(MnSOD)的 mRNA 表达明显低于对照组,spot1 肌球蛋白轻链 4(MYL4)的 mRNA 表达明显高于对照组.而 Ang Ⅱ组的 Idh3a 和 MnSOD 的蛋白表达水平明显低于对照组(图 3B),与双向电泳检测的蛋白的表达变化一致.

3 讨论

我们采用蛋白质组学的方法从整体上比较了 Ang Ⅱ诱导的心肌肥大模型组和对照组小鼠的心脏蛋白的表达变化.我们的研究发现,与对照组相比,模型组中表达有差异变化的蛋白主要与能量代谢、氧化应激和细胞骨架有关.在这里我们着重探讨上述蛋白的表达变化对心脏功能的影响及其病理生理学意义.

心脏是对能量需求最高的器官,而 ATP 是心肌活动最直接的能量来源.正常情况下,心脏维持收缩功能和基础代谢所需要的 ATP 主要由脂肪酸和葡萄糖氧化代谢提供,其中脂肪酸是心脏优先选择的能量来源^[4].我们的研究发现,参与脂肪酸 β -氧化的辅酶二烯酰-辅酶 A 异构酶和三羧酸循环中的关键酶异柠檬酸脱氢酶在模型组中表达下调,这提示我们当心脏发生肥大时,心脏对底物的利用发生了变化,能量代谢发生紊乱.

腺苷酸激酶(AK1)通过催化核苷酸的磷酸基团交换和下游的 AMP 信号通路构成了一个完整的能量代谢监控系统,通过调节糖酵解和糖原分解的酶的活性,对能量需求做出快速应答^[5].AMP 水平的高低通常和糖尿病、肥胖、肥大型心肌病等代谢性疾病联系在一起^[6].模型组中 AK1 表达的降低反映了核苷酸比率(ATP/ADP)和能量代谢的异常.

线粒体产生的活性氧能诱导心肌内活性酸的形成并损伤心肌线粒体和心肌功能,MnSOD(SOD2)是线粒体超氧化物歧化酶,可以中和超氧阴离子.MnSOD 对于健康的有氧代谢是至关重要的,MnSOD 敲除鼠中琥珀酸脱氢酶和顺乌头酸酶的活性明显降低^[7].当 MnSOD 活性下降 50%时,会导致细胞核和线粒体 DNA 出现氧化性损伤^[7].我们的研究发现,与对照组相比,模型组 MnSOD 的表达下调,这提示我们 Ang Ⅱ诱导心肌肥大后,心脏有可能会出现氧化应激.

肌球蛋白轻链 4(MYL4,ELCa)与横纹肌的收缩功能有关,胚胎期时在心房和心室中都有表达,成年后只表达在心房中^[8].最近的研究发现 MYL4 是维持心房电生理、功能以及结构完整性所必需的^[9],MYL4 敲除后会出现家族性肥大型心肌病的表型,心房电生理活动和收缩功能异常.在心衰或肥大的心脏中,MYL3 表达下调,而 MYL4 重新表达,是典型的心室病理性重塑.ELCa 取代了由 MYL3 编码的 ELCv 后,与钙离子相关的肌球蛋白横桥动力学增加,导致心脏收缩功能增加,因此心衰病人的心脏中 ELCa 的累积被认为是一种补偿性的应答^[8].在 Ang Ⅱ诱导的小鼠心肌肥大模型组中发现 MYL4 表达上调,这可能也是一种代偿性应答.

此外,很多研究表明心脏中的一些关键蛋白发生修饰后会影响心脏的功能.缺血-再灌注损伤的病人心中,由于活性氧(ROS)产生过多,会使一些蛋白发生亚硝基化等氧化翻译后修饰^[10].在心脏病的发展变化过程中翻译后修饰发挥着重要的作用,尤其是在初期的时候,蛋白的变化主要源于翻译后修饰^[3].本实验观察到二烯酰-辅酶 A 异构酶、异柠檬酸脱氢酶和细胞色素 b-c1 复合体这三种蛋白在双向电泳图谱上分别有两个点,说明这些蛋白在体内可能是有不同的修饰或剪切存在,但是究竟发生了哪种修饰及其对心肌肥大的影响还有待于进一步的研究.

[参考文献]

- [1] RUWHOF C, van der LAARSE A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways[J]. Cardiovasc Res, 2000, 47(1): 23-37.
- [2] PIRATELLO A C, MORAES S I, PAULINI J, et al. Renin angiotensin system and cardiac hypertrophy after sinoaortic denervation in rats[J]. Clinics(Sao Paulo), 2010, 65(12): 1345-1350.
- [3] FABER M J, AGNETTI G, BEZSTAROSTIK, et al. Recent developments in proteomics: implications for the study of cardiac hypertrophy and failure[J]. Cell Biochem Biophys, 2006, 44(1): 11-29.
- [4] PELLIEUX C, MONTESSUIT C, PAPAGEORGIOU I, et al. Differential effects of high-fat diet on myocardial lipid metabolism

- in failing and nonfailing hearts with angiotensin II-mediated cardiac remodeling in mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(9): H1795–805.
- [5] DZEJA P, TERZIC A. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing[J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(4): 1729–1772.
- [6] GE L, ZHU M M, YANG J Y, et al. Differential proteomic analysis of the anti-depressive effects of oleamide in a rat chronic mild stress model of depression[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 131: 77–86.
- [7] MIRIYALA S, HOLLEY A K, ST C D. Mitochondrial superoxide dismutase—signals of distinction[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11(2): 181–190.
- [8] HERNANDEZ O M, JONES M, GUZMAN G, et al. Myosin essential light chain in health and disease[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(4): H1643–54.
- [9] PENG W, LI M, TANG K, et al. Dysfunction of Myosin Light-Chain 4 (MYL4) leads to heritable atrial cardiomyopathy with electrical, contractile, and structural components: evidence from genetically-engineered rats[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(11): 1–14.
- [10] SHI Q, FENG J, QU H, et al. A proteomic study of S-nitrosylation in the rat cardiac proteins *in vitro*[J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(8): 1536–1540.

[责任编辑:黄 敏]