

复脉汤预处理对心肌缺血诱导心律失常大鼠心肌细胞蛋白激酶 C 与 Cx43 磷酸化信号通路的影响*

龚一萍¹, 程臻², 陈盈¹

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 东阳市中医院, 浙江 金华 322110)

摘要: **目的** 探讨复脉汤对心律失常大鼠心肌细胞蛋白激酶 C 与连接蛋白 43(Cx43)磷酸化信号通路的影响。**方法** 将实验大鼠分为假手术组、模型组、酒石酸美托洛尔组($104 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、炙甘草汤组($9.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、复脉汤低剂量组($9.38 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、复脉汤中剂量组($18.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、复脉汤高剂量组($37.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),共 7 组。采用结扎冠状动脉左前降支 1 h 建立心肌缺血模型,通过复脉汤预处理对其进行干预,运用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白激酶 C(PKC)和心肌细胞缝隙连接蛋白 43 总量(Total-Cx43)及其 Ser368 位点磷酸化(P-Cx43 S368)蛋白水平的表达情况。**结果** 与假手术组相比,模型组 PKC 与 Total-Cx43 以及 P-Cx43 S368 表达均显著降低($P<0.01$);与模型组相比,复脉汤中、高剂量组、酒石酸美托洛尔组 PKC 与 Total-Cx43 以及 P-Cx43 S368 表达上调,均表现出显著性差异($P<0.01$);炙甘草汤组与复脉汤低剂量组也能促进 PKC 与 Total-Cx43 以及 P-Cx43 S368 表达,与模型组相比具有统计学差异($P<0.05$)。**结论** 复脉汤通过上调心肌缺血大鼠心肌 PKC 与 Total-Cx43 以及 P-Cx43 S368 表达,增强缝隙连接(GJ)通道的传导性和通透性,减轻其心肌损伤程度,这可能是复脉汤对缺血损伤大鼠心律失常的保护效应机制之一。

关键词: 复脉汤; 心律失常; 信号通路; Total-Cx43; P-Cx43 S368

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)04-0015-04

心肌缺血导致的心律失常与缝隙连接(gap junction, GJ)的结构状态的改变密切相关。许多研究表明,缝隙连接(GJ)在缺血诱导的心肌缺血损伤中扮演着重要的角色^[1-2]。GJ 的结构和功能受细胞内外许多因素的影响,由蛋白激酶 C(PKC)介导的心肌室肌缝隙连接蛋白 43(Cx43)的磷酸化改变可能对 GJ 产生调节作用。活血益气法能够减轻心梗后的心肌缺血损伤^[3-7],推测可能与 PKC 介导的 Cx43 磷酸化,从而改变 GJ 的偶联功能有关。本实验通过采用以益气活血法制方的复脉汤(黄芪、生晒参、丹参、红景天、川芎、甘松等组成)对 Cx43 位点磷酸化及所依赖的蛋白激酶信号传导通路的研究,拟探讨复脉汤对缺血性心律失常的干预机制是否与调节心肌细胞蛋白激酶 C 与 Cx43 磷酸化信号通路水平有关。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

①实验所需的复脉汤药材由浙江中医药大学提供,加入 10 倍量水浸泡 60min,煎煮 2 次,将 2 次过滤所得药液混合并浓缩至 $4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$;将炙甘草汤浓缩为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,放入 4℃冰箱保存。②酒石酸美托洛尔:由阿斯利康制药有限公司(批号:1304076)提供。③兔抗 PKC 多克隆抗体(SANTA CRUZ 公司),兔抗总 Cx43(Total-Cx43)多克隆抗体(SANTA CRUZ 公司),兔抗 Ser368 位点磷酸化的 Cx43(P-Cx43 S368)单克隆抗体(SANTA CRUZ 公司),ECL 增强型化学发光显色试剂盒(Thermo 公司),PVDF 膜(Life Science 公司),内参 GAPDH 抗体(update 公司),辣根碱过氧化物酶标记的二抗(Novogene 公司)。

1.2 实验分组与给药

SD 雄性大鼠,体质量(295 ± 30)g,SPF 级,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,(合格证

* 基金项目:浙江省自然科学基金(LY12H27010)

收稿日期:2015-05-18

作者简介:龚一萍(1956-),女,浙江杭州人,教授、主任中医师、博士生导师,研究方向:中医药防治心血管疾病及辨治规律研究,舌诊临床应用研究。E-mail:temgong@126.com

号:2008001632384)。随机分为 7 组,假手术组(A 组),模型对照组(B 组),酒石酸美托洛尔对照组(C 组)104 mg·kg⁻¹,炙甘草汤对照组(D 组)9.40 g·kg⁻¹,复脉汤低剂量组(E 组)9.38 g·kg⁻¹,复脉汤中剂量组(F 组)18.75 g·kg⁻¹,复脉汤高剂量组(G 组)37.50g·kg⁻¹,每组 8 只,灌胃给药,10 mL·kg⁻¹ 每天 1 次,A 组和 B 组给予相同体积的生理盐水,共计 2 周。

1.3 动物模型复制^[8]

动物造模前 2 周连续灌胃给药,每日 1 次。造模前 1 h 称重并给药后,以 3%戊巴比妥钠 40 mg·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉,固定于鼠台,接标准 II 导联监测心电图。气管插管后动物呼吸机(60 次/min,呼吸比值 2:1),于左前胸第 3、4 肋间打开胸腔,以心大静脉为标志,6-0 号缝合线穿过左心耳下缘 1~2 mm 处心肌表层,心电图稳定 30min 后,结扎冠脉左前降支,此时肉眼可见心脏左室前壁及心尖部颜色变暗,同时可见心电图 ST 段与 R 波振幅明显抬高,大鼠心率显著增快,术后记录心电图 1 h。假手术组只穿线不结扎。

1.4 监测指标

1.4.1 大鼠心肌梗死程度的测定

监测心电图 1h 后取下心脏,放入 -20℃ 冰箱 30min,取出后横切成 4 片,置于 37℃ 的 1% 红四氮唑(TTC)磷酸缓冲液中染色 15min。梗死区心肌呈灰白色,未梗死区则呈红色。分离两种组织后分别称重,分别计算梗死心肌占整个心脏重量及左心室重量的百分比。

1.4.2 免疫印迹杂交(western blot)检测 Cx43 磷酸化通路的表达

在正常心肌组织与梗死区之间取 100mg 缺血心肌组织,放入液氮中冷冻,用以检测 Cx43 磷酸化

的表达。①组织蛋白提取与制备:剪碎心肌组织,用 400μL 单去污剂裂解液裂(含 PMSF)离心(12 000r/min,4℃,30min),取上清液,紫外分光光度计测定提取蛋白的浓度。②聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳:取 50μg 制备好的总蛋白样品上样,进行 SDS-PAGE 电泳,4℃,80V 恒压转 PVDF 膜 2h,5% 脱脂奶粉 30mL 封闭 2h; 分别将膜放入 TBST 稀释的兔抗 PKC 多克隆抗体(1:200),兔抗总 Cx43 多克隆抗体(1:200),兔抗 Ser368 位点磷酸化的 Cx43(P-Cx43 S368)单克隆抗体(1:200)和 GAPDH 多克隆抗体(1:200),4℃过夜,加入二抗(1:1000)室温孵育 2h,与 ECL 显色剂(A 液:B 液=1:1)反应 3min,将 PVDF 膜置于薄膜上,曝光显影,统计分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD 法,计数资料采用 χ^2 分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 对大鼠心肌梗死程度的影响

与模型组比较,各给药组心脏及左心室重量无统计学意义($P > 0.05$);心肌染色后,假手术组未见梗死区,模型组梗死区占心脏及左心室重的百分比分别为(22.43±1.22)%与(28.39±0.52)%;酒石酸美托洛尔组梗死区重量显著减轻,与模型组比较,梗死区占心脏及左心室重的百分比有显著性差异($P < 0.01$);复脉汤高、中剂量组与酒石酸美托洛尔组作用相似,与模型组比较,心肌梗死程度显著减轻,梗死区占心脏及左心室重量百分比有显著性差异($P < 0.01$);与模型组比较,复脉汤低剂量组梗死程度减轻,梗死区占心脏及左心室重量百分比有统计学差

表 1 各组心肌梗死范围比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	心脏重量/g	左心室重量/g	梗死区/g	梗死区/心脏重量/%	梗死区/左心室重量/%
A	0.917±0.065	0.726±0.052	0±0	0±0	0±0
B	0.980±0.044	0.772±0.013	0.219±0.007**	22.43±1.22**	28.39±0.52**
C	0.952±0.085	0.712±0.006	0.179±0.007	18.73±0.76**△△	25.12±0.92**△△
D	0.953±0.006	0.770±0.012	0.209±0.0103	21.92±1.19**	27.10±1.17**△
E	0.971±0.013	0.753±0.018	0.203±0.003	20.93±0.52**△	27.00±0.84**△
F	0.960±0.021	0.731±0.007	0.193±0.009	20.17±1.36**△△	26.46±1.33**△△
G	0.951±0.023	0.708±0.007	0.180±0.008	18.93±1.20**△△	25.40±1.05**△△

注:与 A 组比较,** $P < 0.01$;与 B 组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

异($P<0.05$)(见表1)。

2.2 对PKC表达的影响

与假手术组相比,各组PKC表达均有所下降,其中模型组下降最明显,具有显著性差异($P<0.01$);与模型组相比,酒石酸美托洛尔组、复脉汤中剂量组、复脉汤高剂量组PKC表达上调,均表现出显著性差异($P<0.01$);复脉汤低剂量组与炙甘草汤组也能促进PKC表达,与模型组相比,均表现出统计学差异($P<0.05$)(图1、图2)。

2.3 对Total-Cx43及P-Cx43 S368表达的影响

假手术组Total-Cx43和P-Cx43 S368蛋白均有表达;与假手术组相比,模型组Total-Cx43与P-Cx43 S368蛋白表达均有所下降,表现出显著性差异($P<0.01$);与模型组相比,酒石酸美托洛尔组、复脉汤中剂量组、复脉汤高剂量组Total-Cx43与P-Cx43 S368蛋白表达上调,均表现出显著性差异

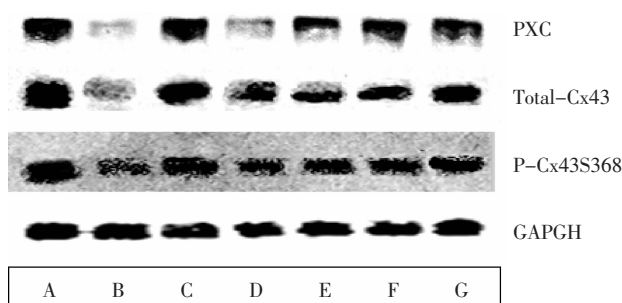
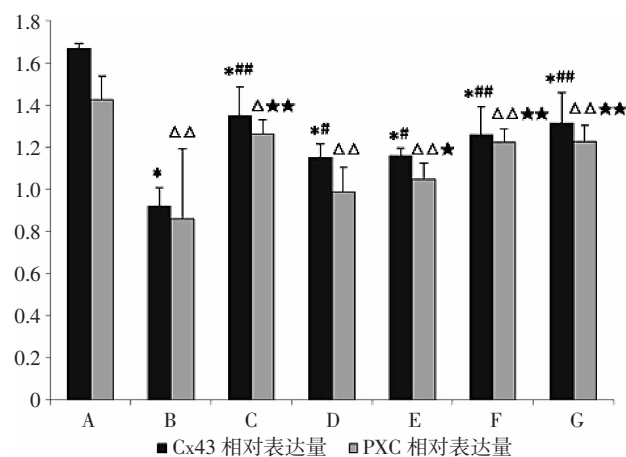


图1 各组心肌缺血大鼠PKC与Total-Cx43及P-Cx43蛋白水平表达(Western Blot)



注:Total-Cx43相对表达量结果中,与A组比较,* $P<0.01$;与B组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;PKC的相对表达量结果中,与A组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与B组比较,* $P<0.05$,* $P<0.01$

图2 各组心肌缺血大鼠Cx43与PKC的相对表达

($P<0.01$);复脉汤低剂量组与炙甘草汤组也能促进Total-Cx43与P-Cx43 S368蛋白表达,与模型组相比具有统计学意义($P<0.05$)(图1、图2)。

3 讨论

3.1 PKC与Cx43磷酸化信号通路异常引起心律失常的机制探讨

连接蛋白(connexin,Cx)43是动物体内重要的心肌电耦联蛋白,它的功能受磷酸化的调节而影响GJ的开放,进而调节细胞间电信号的传导,因此Cx43的磷酸化状态是反映GJ功能的指标之一。蛋白转录后的修饰主要是磷酸化,心肌组织中的连接蛋白大部分属于磷蛋白,其处于不同的磷酸化水平,可通过蛋白磷酸化酶与蛋白激酶的相互作用,操控许多细胞内过程。Cx43磷酸化的改变将引起缝隙连接通讯(gap junctional intercellular communication,GJIC)功能的失调,进而降低心肌组织传导速度,导致持久的传导阻滞,诱发折返性心律失常。有实验证实,持续心肌缺血能够增加非磷酸化Cx43的比例,增大心律失常的发生率,这提示了缺血心肌Cx43的非磷酸化与心律失常的发生相关。

PKC作为细胞内信息传递的主要物质和媒介^[9],是一类广泛分布于组织的磷酸化酶,它具有广泛的生理活性。PKC是一种重要的机体内源性保护中间环节^[10],它的激活可引发底物蛋白质磷酸化、细胞内钙稳态、离子通道、受体的信息传递等一系列变化。另外,PKC可通过磷酸化Cx43的丝氨酸残基368位点,调节心室GJ通道的开闭,进而影响GJ的通讯功能^[11]。

3.2 复脉汤对PKC与Cx43磷酸化信号通路的调节作用

本研究中复脉汤为临床自拟方,以益气活血化瘀立法。实验研究证实,益气活血中药可以促进心肌梗死区血管的新生,抑制心肌细胞凋亡和心室重构,改善心功能,具有良好的抗心肌缺血,治疗心梗后心律失常的作用,并能改善心梗大鼠心肌细胞Cx43的重构^[12]。益气活血药还能够增加心肌Cx43表达强度和部分好转Cx43弥散表达的重构现象,缩短心衰大鼠的QT离散度,增加心肌Cx43的表达,减少心肌纤维化面积^[13]。丹参的有效成分丹参酮可以在转录水平诱导Cx43mRNA表达上调,调控GJIC功能^[14]。川芎嗪联可以抑制组织PKC激活和PKC β 亚型的表达^[15]。由此可提示:益气活血药对缺

血性心律失常良好的干预作用,且此作用可能与调控心肌细胞 Cx43 有关。

本实验 Western Blot 检测结果显示,与假手术组相比,心肌缺血损伤各组 PKC 与 P-Cx43 S368 的表达均有所下降,复脉汤各剂量组则可不同程度的促进 PKC 与 P-Cx43 S368 的表达。而 TTC 法测定心肌梗死程度的结果显示,大鼠心肌梗死程度越大,PKC 与 P-Cx43 S368 的表达则越低,这表明心肌缺血损伤与 PKC 的表达下降,Cx43 S368 的磷酸化的减少密切相关。通过复脉汤干预后,提高 PKC 的表达,进而促进 Cx43 S368 的磷酸化,这表明在心肌病理损伤的条件下,复脉汤可通过激动 PKC 介导 P-Cx43 S368 的表达,促进 Cx43 磷酸化,改善心肌缺血引起的心律失常。与假手术组相比,心律失常各组 Total-Cx43 的表达也均有所下降。而 TTC 法测定心肌梗死程度的结果显示,大鼠心肌梗死程度越大,心律失常发生率越高,而 Total-Cx43 的表达则越低,复脉汤各剂量组则可不同程度的促进 Total-Cx43 的表达。这表明心肌缺血损伤与心律失常的发生呈正相关,Total-Cx43 的表达程度则正相关地反映了心肌损伤的程度。通过复脉汤干预后,可以提高缺血损伤心肌中 Total-Cx43 的表达程度,改善心肌缺血,抑制心律失常。从而,我们推测,复脉汤通过提高 PKC 的表达,促进 Cx43 S368 的磷酸化,进而上调 Total-Cx43 的表达,增强 GJ 通道的传导性和通透性,这可能是其对缺血性心律失常大鼠心肌细胞保护效应机制之一。

综上,我们推测复脉汤治疗缺血性心律失常的主要机制可能是通过影响 PKC 信号通路,逆转 Cx43 Ser368 位点的磷酸化,进而调控 GJIC 功能实现的。

参考文献:

- [1] Van Rijen HV, Van Veen TA, Gros D, et al. Connexins and cardiac arrhythmias[J]. Adv Cardiol, 2006, 42: 150-160.
- [2] Rysa J, Leskinen H, Ilves M, et al. Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure[J]. Hypertension, 2005, 45(5): 927-933.
- [3] 王振涛,王硕仁,赵明镜,等.活血和益气方药对心肌梗死

后左心衰大鼠左心室重构影响的比较研究[J].中国中西医结合杂志,2002,22(5):376-378.

- [4] 赵明镜,王硕仁,李敏,等.早期应用活血和益气中药抑制心衰大鼠左室重构和凋亡的对比研究[J].中国中药杂志,2007,32(8):710-714.
- [5] 李敏,王硕仁,赵明镜,等.活血益气方药对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2005,3(1):33-35.
- [6] 吴爱明,王硕仁,张冬梅,等.扶正化瘀胶囊对心肌梗死大鼠心肌缝隙连接蛋白 43 表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2007,5(11):1078-1080.
- [7] 熊杰,李琳,杨硕.步长稳心颗粒治疗急性心肌梗死后心律失常临床疗效观察[J].中国实用医药,2008,3(29):90-91.
- [8] Kuniyasu A, Kaneko K, Kawahara K, et al. Molecular assembly and subcellular distribution of ATP-sensitive potassium channel proteins in rat hearts[J]. FEBS Lett, 2003, 552(2-3):259-263.
- [9] Hu K, Duan D, Li GR, et al. Protein kinase C activates ATP-sensitive K⁺ current in human and rabbit ventricular myocytes[J]. Circ Res, 1996, 78(3):492-498.
- [10] Rybin VO, Steinberg SF. Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart [J]. Circ Res, 1994, 74(2):299-309.
- [11] Ek-Vitton JF, King TJ, Heyman NS, et al. Selectivity of connexin 43 channels on serine368 by through protein kinase C-dependent phosphorylation [J]. Circ Res, 2006, 98(12):1498-1505.
- [12] 王明伟,张殿福,唐建金,等.丹参多酚酸盐对猪急性心肌梗死后心肌细胞凋亡和心功能的影响[J].中西医结合学报,2009,7(2):140-144.
- [13] 杨军,周先令.参松养心胶囊改善心力衰竭大鼠 QT 离散度及缝隙连接蛋白 43 的表达 [J].中国动脉硬化杂志,2011,19(3):197-201.
- [14] 黄光琦,宋毅,张洁,等.丹参酮 II A 增强 HSV-tk/GCV 旁观者效应及其与 Cx43 mRNA 表达的关系 [J].中华肿瘤杂志,2004,26(3):146-149.
- [15] 殷丽平,杜联,王大鹏,等.蛋白激酶 C 在肾组织的表达及川芎嗪联合贝那普利对肾脏的保护作用[J].时珍国医国药,2011,22(4):781-783.

(编辑:杨阳)

(英文摘要见第 22 页)

two new fibrinolytic saponins from the seed of *Luffa cylindrica* Roem. [J]. Chem. Pharm. Bull., 1991, 39 (5): 1185–1187.

[15] 刘潇潇, 王磊, 王强, 等. 金铁锁根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 921–923.

(编辑: 陈柏君)

Study on Triterpenoid Saponins from *Psammosilene tunicoides*

LI Xuhong, JIANG Huayi, XU Ming, FENG Liping, MEI Shuangxi[△]

(Yunnan Institute of Materia Medica/ Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center/Yunnan Province

Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the saponins of *Psammosilene tunicoides*. **Methods** The chemical constituents were extracted by 70% ethanol, then isolated by methods of macroporous resin, Sephadex LH-20 column chromatography, RP-18 column chromatography and silica gel column chromatography. The structures were established on the basis of modern spectroscopic analysis. **Results** Four triterpenoid saponins were isolated and characterized. **Conclusion** Compound 1 is obtained from the nature for the first time.

KEY WORDS: *Psammosilene tunicoides* W.C.Wu et C.Y.Wu; triterpenoid saponins; isolation and identification

(原文见第 15 页)

Study the Effect of Fumai Decoction Pretreatment on PKC and P-Cx43 S368 in Myocardial Ischemia Induced Arrhythmia Rat

GONG Yiping¹, CHENG Zhen², CHEN Ying¹

(1. Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China;

2. Dongyang Chinese Medicine Hospital, Jinhua 322100, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect of Fumai decoction on PKC and P-Cx43 S368 in arrhythmia rat. **Methods** Divided the rats into sham operation group, model group, metoprolol group (104mg·kg⁻¹), group of Zhigancao decoction, low dose, middle dose and high dose groups of Fumai decoction. Rats of myocardial ischemia model were induced by left anterior descending ligation for one hour. After the treatment of Fumai decoction, the PKC, Total-Cx43 and P-Cx43 S368 expression was characterized by Western blot. **Results** Compared with sham operation group, all the PKC, Total-Cx43 and P-Cx43 S368 expression of model group were significant reduced ($P < 0.01$). Compared with model group, all the PKC, Total-Cx43 and P-Cx43 S368 expression of middle dose and high dose groups of Fumai decoction and metoprolol group were significant increased ($P < 0.01$). PKC, Total-Cx43 and P-Cx43 S368 of group of Zhigancao decoction and low dose group of Fumai decoction also expressed higher than model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Fumai decoction can increase the PKC, Total-Cx43 and P-Cx43 S368 expression in myocardial ischemia rats, increase the gap junction channel permeability and conductance, and decrease the level of myocardial injury. This may be one of the mechanism of Fumai decoction to treat arrhythmia in myocardial ischemia rats.

KEY WORDS: Fumai decoction; arrhythmia; signaling pathways; total-Cx43; P-Cx43 S368