

丹参总酚酸对心肌缺血再灌注损伤保护作用的机制研究

陈雯¹, 郜凤香², 郭丽丽^{1*}, 王阶¹, 张辰浩²

- (1. 中国中医科学院广安门医院心血管病证结合实验室, 北京 100053;
2. 河南开封医药学校, 河南 开封 475001;
3. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

[摘要] **目的:** 研究丹参总酚酸(TSA)对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用, 阐明其作用机制。**方法:** 采用Langendorff离体心脏恒压灌流模型, 30只雄性Wistar大鼠随机分为空白对照组、模型组(I/R组)及丹参总酚酸组(TSA组)。空白对照组用Krebs-Henseleit(K-H)液持续灌注100 min; I/R组(K-H液灌流稳定20 min后, 停灌40 min, 复灌40 min); TSA组(复灌K-H液中含TSA 0.2 g·L⁻¹, 其他同I/R组)。动态检测心室内压, 测定冠脉流量(CF)及心脏再灌流出液肌酸激酶(CK)活性变化, 同时光镜下观察心肌细胞病理组织形态学变化, 蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测心肌匀浆、细胞胞浆及线粒体蛋白激酶C ϵ (PKC ϵ)的表达。**结果:** 与I/R组相比, TSA能明显改善缺血/再灌后的心功能, 增加冠脉流量, 减弱冠脉流出液中CK的活性($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 可使心肌细胞损伤程度减轻, 增加心肌细胞PKC ϵ 蛋白表达, 并促进PKC ϵ 由细胞质向线粒体的转位。**结论:** TSA对心肌I/R损伤具有明显保护作用, PKC ϵ 的激活及转位可能是TSA保护心肌细胞信号传导通路的组成部分。

[关键词] 心肌缺血; 心肌再灌注损伤; 丹参总酚酸; 肌酸激酶; 蛋白激酶C

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0242-04

[doi] 10.11653/syfj2013120242

Role of Protein Kinase C- ϵ (PKC ϵ) in Total Salvianolic Acid-induced Cardioprotection

CHEN Wen¹, GAO Feng-xiang², GUO Li-li^{1*}, WANG Jie¹, ZHANG Chen-hao³

- (1. Cardiovascular Disease-Syndrome Pattern Research Laboratory, Guang'anmen Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicinal Science, Beijing 100053, China;
2. Kaifeng School Medicine, Kaifeng 475001;
3. Wangjing Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective mechanism of total salvianolic acid (TSA) against myocardial I/R injury. **Method:** The models of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats were established by Langendorff method. 30 male wistar rats were divided into control group, ischemia-reperfusion group and TSA group. The left ventricular pressure (LVP), coronary flow (CF) were recorded. The creatine kinase (CK) activities in the flow were measured. The morphological changes of cardiocytes in rats were observed by light microscopy. The protein expression of protein kinase C (PKC) ϵ was analyzed by Western blotting. **Result:** TSA significantly improved postischemic contractile function [(the levels of left ventricular developed pressure (LVDP)], $\pm dp/dt_{max}$, CF and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). TSA distinctly reduced the activities of the CK in the flow ($P < 0.05$, $P < 0.01$). TSA could obviously ameliorate cell

[收稿日期] 20120918(002)

[基金项目] 国家科技部“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102201-006)

[第一作者] 陈雯, 硕士, 中药师, 中药新药研发, Tel:010-88001473, E-mail: gamwendy@163.com

[通讯作者] * 郭丽丽, 博士, 副研究员, 中药新药研发, Tel:010-88001473, E-mail: guolili0815@yahoo.com.cn

injury. And TSA could reinforce PKC ϵ translocate from cytosol to mitochondria. **Conclusion:** TSA protects the heart from I/R injury partially by activating and translocating PKC ϵ .

[**Key words**] myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; total salvianolic acid; creatine kinase; protein kinase C epsilon

在心肌缺血/再灌注(I/R)中,信号转导级联反应对心功能有重要调节作用,其中蛋白激酶 C 家族参与细胞的多种信号传递。国内外文献表明蛋白激酶 C epsilon 亚型(PKC ϵ)的激活及转位对 I/R 导致的心肌损伤有保护作用^[1-3]。丹参总酚酸(TSA)是丹参水溶性有效成分,具有广泛的药理活性,可通过改善微循环、抑制血小板聚集、抗炎、抗氧化、调节心肌能量代谢等多途径发挥心血管保护作用^[4-5],对缺血再灌注损伤的细胞及在体心脏有一定的保护作用^[6-7],但作用机制未完全明了。本研究利用离体大鼠 I/R 模型,进一步观察 TSA 对大鼠心脏缺血/再灌注心功能和 PKC ϵ 表达的影响。

1 材料

1.1 动物 健康成年 Wistar 大鼠,雄性,30 只,体重 250 ~ 300 g,购于军事医学科学院动物中心,许可证号 SCXK-(军)2007-004。本院动物室适应性饲养 3 d 后用于实验。

1.2 试药、仪器与试剂 PowerLab 型生物机能检测系统(澳大利亚 AD Instruments 公司),离体工作心灌流装置(美国 Radnoti 公司),压力球囊(Kent 公司),TSA(本实验室药理学组提供,批号 20110428),肝素钠注射液(江苏常州千红生化制药股份有限公司,批号 110726),戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号 WS20051129),CK 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20111109),心肌线粒体/胞浆制备试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号 20120318),抗 PKC ϵ : goat anti-mouse IgG(SC-56944),抗 Actin:goat anti-rabbit IgG(SC-1616)(均购于 Santa Cruz 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 参考文献[8]方法,大鼠 ip 肝素 1 000 U·kg⁻¹ 抗凝,30 min 后 ip 戊巴比妥钠 50 mg·kg⁻¹ 麻醉。取出心脏置 0 ~ 4 °C 生理盐水中,轻轻挤出瘀血,经主动脉将其固定于体外灌流装置,逆行恒压灌注。灌注压 70 mmHg。灌流液组成:NaCl 118, NaHCO₃ 23.8, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, 葡萄糖 11.0(mmol·L⁻¹)。向上述灌流液中通入 95% O₂, 5% CO₂ 混合气体调 pH 7.4。灌注液及心脏周围温度用恒温循环水浴维持在(37 ± 0.5)

°C。平衡灌注 20 min,待心脏各项功能稳定,关闭灌流液停止灌流,造成全心缺血,40 min 后打开灌流液再复灌 40 min。

2.2 分组与灌流方案 将大鼠分为空白对照组、I/R 模型组、TSA 组,每组 10 只。临用前将 TSA 溶于灌流液中,使终质量浓度为 0.2 g·L⁻¹。空白对照组用 K-H 液持续灌注 100 min;模型组以 K-H 液灌流稳定 20 min 后,停止灌流 40 min,复灌 40 min;TSA 组复灌 K-H 液中含 TSA 0.2 g·L⁻¹,其他同 I/R 组。

2.3 监测指标

2.3.1 心功能参数 将心脏置于 Langendorff 灌流模式后,左心耳剪一小口,将压力球囊插入左心耳并通过房室瓣插入左心室,导管另一端连接压力换能器,输入至 PowerLab 生物信号采集与处理系统,实时记录左室内压力(LVP)变化,调节压力球囊内的充水量,使正常左室舒张末期压(LVEDP)稳定在 5 ~ 10 mmHg。分别于停灌前、复灌 40 min 时记录左室内收缩峰压值(LVSP)、左室舒张末压(LVDEP),通过系统数据处理软件计算并输出心率、左室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{\max}$),并计算左室发展压(LVDP = LVSP - LVDEP)作为评价心功能的参数。参数以 I/R 后恢复率表示。

$$\text{恢复率} = \frac{\text{再灌后某时点值}}{\text{缺血前值}} \times 100\%$$

2.3.2 冠脉流量 手工测定冠脉流量(CF),分别收集缺血前及再灌后 40 min 时 1 min 内的冠脉流出液,用量筒测量体积,单位以“mL·min⁻¹”表示。

2.3.3 心脏再灌流出液肌酸激酶(CK)测定 分别在心脏灌流稳定 20 min,再灌注 1, 2, 5, 10, 20, 40 min 收集心脏流出液,用紫外分光光度计在 660 nm 波长下测定 CK 活性(按试剂盒说明书操作)。

2.3.4 心肌组织 HE 染色 实验结束,取心尖以上 3 mm 心肌组织甲醛固定,石蜡包埋,切片,从各组取 5 张石蜡切片,二甲苯脱蜡,HE 染色,梯度乙醇脱水,封片,于光学显微镜下观察。

2.3.5 心肌线粒体/胞浆分离 按心肌线粒体/胞浆制备试剂盒说明操作,将心肌组织剪成碎块,加入冰预冷的 Mito-Cyto Buffer,制备心肌组织匀浆,将匀浆物 800 × g 离心 5 min 4 °C,细胞核、大的膜碎片、

未裂解细胞等在管底。收集上清液到新的离心管再次 $800 \times g$ 离心 5 min 4°C , 弃沉淀。上清液转移到新的离心管, $12\ 000 \times g$ 离心 10 min 4°C , 离心后的上清为胞浆成分, 线粒体沉淀在管底。

2.3.6 Western blot 检测心肌组织中蛋白激酶 C 含量及转位 各组样品按 BCA 蛋白定量试剂盒说明操作, 测定蛋白浓度后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳结束后将蛋白样品转移至硝酸纤维素膜 (NC) 膜上。NC 膜用 5% 脱脂奶粉封闭后与适当稀释的一抗室温孵育, 4°C 过夜, 再与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2~3 h, 进行 ECL 曝光。将显色后的膜照相, 用 Lab Works 软件对图像进行灰度分析, 检测细胞各部分 PKC ϵ 含量。

2.4 统计学分析 运用 SPSS 16.0 软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, independent-sample *t* 检验比较两组变量间的差异; 两组以上变量之间用单因素方差分析后的 LSD 分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 I/R 过程中心功能参数的影响 空白对照组正常灌注 100 min, 离体心脏搏动平稳, 各心功能参数下降 $< 10\%$ 。各组心脏缺血前各指标数值无明显差异。全心缺血 40 min, 复灌后模型组心功能参数 LVDP, $\pm dp/dt_{\max}$ 明显低于对照组和缺血前,

LVEDP 明显高于对照组和缺血前, 二者差异皆具有显著统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明再灌注后左心室收缩及舒张功能皆受损。TSA 组再灌 40 min LVEDP 的升高值显著低于模型组 ($P < 0.05$); LVDP, $+ dp/dt_{\max}, - dp/dt_{\max}$ 恢复率均显著高于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 甚至高于缺血前, 说明 TSA 对 I/R 后心功能的恢复有明显促进作用, 可有效对抗 I/R 造成的心功能损伤。见表 1。

3.2 对复灌后冠脉流量的影响 各组在停灌前冠脉流量无显著差异; 空白对照组心脏持续灌注 100 min, 冠脉流量无显著下降; 模型组复灌 40 min 时冠脉流量显著低于对照组和缺血前 ($P < 0.01$), 说明缺血再灌已造成冠脉损伤; 而复灌给予 TSA, 再灌 40 min 时冠脉流量恢复率显著高于模型组 ($P < 0.01$)。说明 TSA 可扩张冠状动脉、增加心脏血氧供应、改善心脏微循环, 起到保护心肌的作用。见表 1。

3.3 对大鼠 I/R 心肌酶的影响 I/R 后各时点心脏流出液 CK 明显高于对照组和缺血前 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明成功建立心肌 I/R 模型; 与 I/R 组比较, TSA 组在复灌后 1, 5, 10 min 心肌 CK 释放显著低于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明 TSA 可抑制心肌 I/R 引起的心肌酶释放, 保护心肌。见表 2。

表 1 TSA 对离体心脏 I/R 心功能参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·L ⁻¹	CF/mL·min ⁻¹ [恢复率/%]		LVDP/mmHg [恢复率/%]		$+ dp/dt_{\max}/\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$ (恢复率/%)		$- dp/dt_{\max}/\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$ (恢复率/%)		LVEDP/mmHg	
		缺血前	再灌 40 min	缺血前	再灌 40 min	缺血前	再灌 40 min	缺血前	再灌 40 min	缺血前	再灌 40 min
		对照	-	17.9 ± 1.37	17.1 ± 1.62 ²⁾ (95.5 ± 7.5)	116.0 ± 8.1	110.0 ± 9.0 ²⁾ (94.8 ± 5.1)	4 490.9 ± 679.3	4 309.0 ± 633.1 ¹⁾ (95.9 ± 4.5)	-2 441.6 ± 129.2	-2 316.8 ± 144.1 ¹⁾ (94.8 ± 6.2)
模型	-	16.7 ± 2.46	9.7 ± 1.45 ⁴⁾ (58.0 ± 8.9)	121.6 ± 13.3	74.4 ± 11.3 ⁴⁾ (61.1 ± 7.2)	4 976.0 ± 773.3	3 116.6 ± 419.4 ⁴⁾ (62.6 ± 4.3)	-2 538.2 ± 123.7	-1 321.8 ± 198.4 ⁴⁾ (52.4 ± 8.1)	8.62 ± 0.87	31.23 ± 5.84 ⁴⁾
TSA	0.2	19.0 ± 1.04	14.1 ± 0.95 ²⁾ (74.2 ± 8.2)	113.0 ± 10.4	119.4 ± 12.4 ²⁾ (105.3 ± 8.0)	4 357.4 ± 850.3	4 729.5 ± 804.5 ²⁾ (10 8.5 ± 9.39)	-2 345.2 ± 317.3	-2 349.3 ± 233.6 ¹⁾ (100.1 ± 13.7)	8.86 ± 0.74	17.23 ± 9.45 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与缺血前比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与对照组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

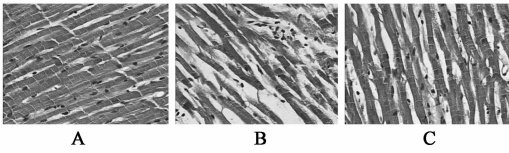
表 2 TSA 对离体心脏 I/R 过程中 CK 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·L ⁻¹	缺血前	复灌 1 min	复灌 2 min	复灌 5 min	复灌 10 min	复灌 20 min	复灌 40 min
对照	-	0.036 ± 0.02	0.037 ± 0.01 ²⁾	0.036 ± 0.01 ¹⁾	0.035 ± 0.01 ²⁾	0.043 ± 0.02 ²⁾	0.029 ± 0.01 ²⁾	0.033 ± 0.02 ²⁾
模型	-	0.036 ± 0.01	0.733 ± 0.23 ⁴⁾	0.256 ± 0.03 ⁴⁾	0.603 ± 0.19 ⁴⁾	0.263 ± 0.06 ⁴⁾	0.223 ± 0.08 ⁴⁾	0.147 ± 0.04 ³⁾
TSA	0.2	0.030 ± 0.02	0.210 ± 0.06 ²⁾	0.150 ± 0.12	0.185 ± 0.11 ²⁾	0.160 ± 0.05 ¹⁾	0.152 ± 0.06	0.112 ± 0.02

3.4 对心肌形态学的影响 空白对照组心肌纤维排列整齐, 横纹清晰, 细胞大小、形态一致, 细胞核清晰, 心肌组织结构正常。模型组心肌横纹不清, 排列紊乱, 组织间水肿, 有部分局灶性空泡变性出现。给

药组心肌细胞轻度肿胀, 排列基本整齐, 横纹尚清晰, 心肌损伤明显轻于模型组。见图 1。

3.5 对 I/R 心肌内 PKC ϵ 含量及转位的影响 I/R 组中 PKC ϵ 含量较对照组增多, 但差异无显著性, 表



A. 空白对照组; B. 模型组; C. TSA 0.2 g·L⁻¹组

图1 TSA对心肌形态学的影响(HE染色, ×200)

明 I/R 可引发 PKCε 的少量表达,此现象可能是细胞的自我保护作用;TSA 组心肌组织内 PKCε 较对照组明显增加($P < 0.05$),与 I/R 组比较,TSA 组线粒体部分 PKCε 含量明显增加($P < 0.05$),以线粒体 PKCε/胞浆 PKCε 为间接参数定量 PKCε 的转位,可见 TSA 组比值明显高于 I/R 组($P < 0.05$),这表明 TSA 可以激活 PKCε,并促进 PKCε 从细胞质转位到线粒体。见图 2,3 和表 3。

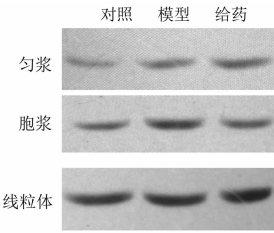
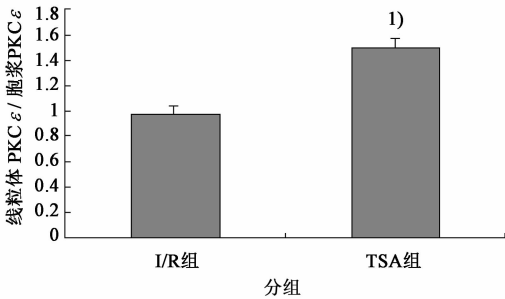


图2 TSA对I/R大鼠心肌细胞PKCε蛋白表达的影响



与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

图3 TSA对I/R大鼠心肌细胞PKCε蛋白转位的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表3 TSA对I/R大鼠心肌细胞PKCε蛋白表达(相对灰度)及转位的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 /g·L ⁻¹	PKCε/Actin		
		匀浆	胞浆	线粒体
对照	-	0.187 0 ± 0.008	0.528 8 ± 0.013	0.676 8 ± 0.020
模型	-	0.244 0 ± 0.012	0.745 7 ± 0.021 ¹⁾	0.720 4 ± 0.028
TSA	0.2	0.299 7 ± 0.017 ¹⁾	0.639 1 ± 0.037 ¹⁾	0.953 2 ± 0.024 ^{1,2)}

4 讨论

蛋白激酶 C(PKC)是缺血预处理和心肌保护的一个关键的“中介子”,研究发现,PKC 活化后其亚型 PKCε 可由细胞质向线粒体转位,导致线粒体 ATP 依赖的钾通道(Mito K_{ATP})开放,并最终通过抑

制线粒体通透性转换孔(MPT)的开放,发挥心肌保护作用^[1,9]。

本实验采用 Langendorff 装置制备离体心脏 I/R 模型,排除神经、体液的影响,结果表明:TSA 可明显改善 I/R 后心肌纤维形态变化,促进冠脉流量、心功能恢复,抑制心肌酶释放。应用 Western blot 方法对各组心肌组织 PKCε 进行定量检测发现 I/R 组中 PKCε 含量较对照组增多,但无统计学差异,表明 I/R 可引发 PKCε 的少量表达,此现象可能是细胞的自我保护作用,TSA 组心肌组织 PKCε 明显增加,并且 TSA 促进 PKCε 由细胞质向线粒体的转位。因此,推测丹参总酚酸(TSA)对 I/R 损伤的保护作用机制与 PKCε 的激活及转位有关,其确切的下游作用位点尚待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Keith D Garlid, Alexandre D T. Costa, Casey L, et al. Cardioprotective signaling to mitochondria[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009,46(6): 858.
- [2] Tatsuhiko Ooie M D, Naohiko Takahashi M D, Tomoko Nawata M D. Ischemia-induced translocation of protein kinase C-ε mediates cardioprotection in the streptozotocin-induced diabetic rat [J]. Circulation Journal, 2003,67(11):955.
- [3] Po Yee Chiu, Sze Man Wong, Hoi Yan Leung. Long-term treatment with danshen-gegen decoction protects the myocardium against ischemia/reperfusion injury via the redox-sensitive protein kinase C-ε/mKATP Pathway in Rats[J]. Rejuvenation Research. 2011,14(2):173.
- [4] 曹媛,曹婉雯,陈渊成,等. 丹参水溶性成分抗心肌缺血的作用机制[J]. 药学进展,2010,34(6):248.
- [5] 杨志霞,林谦,马利. 丹参对心血管疾病药理作用的文献研究[J]. 世界中西医结合杂志,2012,7(2):93.
- [6] 陈雯,郭丽丽,周婷婷,等. 丹参总酚酸对离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(9):173.
- [7] 潘蓉,李玲. 丹参水提取物对心肌缺血/再灌注损伤大鼠心率及心肌酶谱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(4):232.
- [8] Raja B Singh, Vijayan Elimban, Naranjan S, et al. Differences in ischemia-reperfusion-induced endothelial changes in hearts perfused at constant flow and constant pressure [J]. J Appl Physio, 2008,105(6):1779.
- [9] Juhaszova M, Zorov D B, Kim S H. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore [J]. J Clin Invest, 2004, 113(11): 1535.

[责任编辑 李玉洁]