

基于钙调磷酸酶-活化 T 细胞核因子 3 信号转导通路探究 四逆汤治疗心力衰竭的分子机制

党万太,苗维纳*,杨晓放,童妍

(成都中医药大学基础医学院,成都 610075)

[摘要] 目的:分析钙调磷酸酶-活化 T 细胞核因子 3(CaN-NFAT3)信号转导通路在四逆汤治疗心衰过程中的分子机制。方法:取 SPF 级 SD 大鼠 60 只,分 10 只作为空白对照组外,余 50 只采用连续 ip 盐酸阿霉素($0.0025 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,每周 1 次,连续 6 周)方法复制大鼠心力衰竭模型,待造模成功后将动物分为模型对照组与四逆汤高、中、低剂量($5.6, 2.8, 1.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)治疗组,用四逆汤水煎液治疗 8 d 后,分别检测 CaN 的活性、心肌钙含量、去磷酸化 NFATc 蛋白的相对表达。结果:四逆汤水煎液高、中剂量治疗组 CaN 活性均明显低于模型组($P < 0.01$)、钙含量明显升高($P < 0.01$)、大鼠心肌组织中去磷酸化 NFATc/ β -actin 吸光度比值较模型对照组显著降低($P < 0.01$)。结论:CaN-NFAT3 信号转导通路的抑制为四逆汤治疗心力衰竭的关键分子机制。

[关键词] 钙调磷酸酶-活化 T 细胞核因子 3;四逆汤;心衰;分子机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0201-04

[收稿日期] 20110324(020)

[第一作者] 党万太,硕士,Tel:15281087388,E-mail:dwt123-dwt@163.com

[通讯作者] *苗维纳,教授,Tel:13679042753,E-mail:miaoweina2004@yahoo.com.cn

如:病因、病机、症状等因素对方剂功效的影响,而在实际应用中上述因素会对方剂整体的功效产生很大影响。

4 结语

利用本文所提的基于属性距离矩阵的数据归约方法预测方剂功效的意义在于可以有效地补充古方中大量缺失的功效说明,为方剂功效研究提供了一种从药物属性归纳方剂功效的新方法。在具体实际应用中利用计算机处理大量的古方文献数据可以极大地提高中医文献研究的工作效率,减少人工操作可能产生的误差。

采用数据挖掘技术对方剂功效研究目前还处于起步阶段,存在诸多不足,我们将以中医理论为基础,计算机作为辅助手段,借鉴文献[5-7]中所提的中药数据挖掘方法对古方文献研究进行深层次探索。

[参考文献]

[1] 彭京,唐常杰,元昌安,等.一种基于概念相似度的

数据分类方法[J].软件学报,2007,18(2):311.

[2] 雍小嘉,彭京,韩佩玉,等.采用空间矢量方法判断方剂功效倾向新论[J].辽宁中医杂志,2005,32(7):660.

[3] 彭京.基于生物启发计算的知识发现关键技术研究与应用[D].成都:四川大学,2006.

[4] 邓中甲.方剂学[M].北京:中国中医药出版社,2003.

[5] 乔少杰,唐常杰,韩楠,等.基于模糊神经网络的方剂功效约简算法[J].四川大学学报:工程科学版,2008,40(2):107.

[6] 乔少杰,唐常杰,韩楠,等.基于依赖模式集挖掘组方药物多维配伍规律[J].四川大学学报:工程科学版,2007,39(4):134.

[7] 尚尔鑫,范欣生,段金殿,等.基于三维图形化数据挖掘方法的四物汤类方配伍规律研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):217.

[责任编辑 聂淑琴]

Based on CaN-NFAT3 Signalling Pathways to Explore the Molecular Mechanism of Sini Decoction in Treatments of Heart Failure

DANG Wan-tai, MIAO Wei-na*, YANG Xiao-fang, TONG Yan

(School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] Objective: To analysis the molecular mechacnism of the signal transduction Calcineurin-nuclear factor of activated T cells (CaN-NFAT3) in the treatment of heart failure with Sini decoction. **Method:** Sixty SPF grade SD rats were dividied into control group ($n = 10$) and model group ($n = 50$). Adriamycin was given intraperitoneally to fifty to copy the model of heart failure. The heart failure rats were divided into model group and Sini decoction treating group (high, middle and low dose group). Giving Sini decoction to the treatment groups for eight days, CaN activity kit and calcium content kit, NFATc protein relatively express kit, respectively, were used to detect the activity of CaN and calcium NFAT3 expression of the dephosphorylation protein. **Result:** Compared with model group, the activity of CaN in high dose group and middle dose group was obviously lower. The calcium content increased significantly. In the rats myocardial tissue, the light density ratio of dephosphorylation NFATc/ β -actin was lower than model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The CaN-NFAT3 signal transduction pathways may be suppressed, which can explain the key molecular mechanism of Sini decoction in treatmentof heart failure.

[Key words] CaN-NFAT3; Sini decoction; congestive heart failure; molecular mechanism

钙调磷酸酶 (calcineurin, CaN) 是 1 种钙/钙调素依赖的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶, 由 1 个催化亚单位 (CnA) 和调节亚单位 (CnB) 组成。其结构为异源二聚体, 由相对分子质量约为 61×10^3 的催化亚单位 (CaNA) 和相对分子质量约为 19×10^3 的调节亚单位 (CaNB) 按照 1:1 比例组成, 其中 CaNA 亚单位存在 4 个区域: 磷酸酶区域、CaNB 结合区域、钙调蛋白结合区域和自身抑制区域^[1]。Ca²⁺ 结合部位存在于 CaNB, 但是 Ca²⁺ 介导的信号传导需要 Ca²⁺/钙调蛋白结合到 CaNA 的调节区域。在 Ca²⁺ 和钙调蛋白刺激下, CaN 使细胞浆中的 T 细胞活化核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFATs) 去 (脱) 磷酸化, 引起 NFATs 向核内转位以及后续的转录活动。其主要生理底物为活化 T 细胞核因子 3 (nuclear factor of activated T cells, NFAT3)、IP3 受体和抑制剂等, 在机体的免疫、神经和心血管系统的功能调节中具有重要作用^[2]。其在心血管系统当中其作用与 Ca²⁺ 升高与降低关系极为密切。而 CaN 作为细胞内 Ca²⁺ 敏感的信号物质, 在心衰的发展中起重要作用。其实验揭示心肌细胞内存在一条新的致心功能恢复的信号转导通路, 即 CaN-NFAT3 信号转导通路^[3]。而四逆汤被公认为

是温补心肾阳虚的代表方剂, 现代研究其治疗心力衰竭具有较好的疗效^[4]。本实验主要通过对心阳虚 (心力衰竭) 大鼠模型进行四逆汤灌服治疗后分析 CaN-NFAT3 信号转导通路在温补心阳法治疗心力衰竭过程中的分子机制。

1 材料

1.1 药物

1.1.1 四逆汤水煎液的制备 四逆汤采用《伤寒论》方, 即: 附子 10 g, 干姜 9 g, 甘草 6 g, 所有药材均经成都中医药大学药实验室鉴定为正品。四逆汤水煎液以现制现用为原则 (煎法: 附子先煎 1 h, 再加余药同煎, 取汁备用)。

1.1.2 造模药物 注射用盐酸阿霉素, 由深圳万乐药业有限公司提供, 国药准字 H44024476。

1.2 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 (195 ± 10) g, 由成都中医药大学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK(川)2008-24。

1.3 试剂 大鼠钙调磷酸酶 (CaN) 活性测定试剂盒 (批号 090312)、钙含量测定试剂盒 (批号 080906), 南京建成生物工程研究所提供, NFATc 蛋白相对表达试剂盒 (批号 20091126), 北京普利莱基因技术有限公司提供, 生理盐水

(批号 B080619W)由四川科伦药业股份有限公司提供,辣根过氧化物酶标记二抗及硝酸纤维素膜由 Santa 公司提供,化学发光剂, Gene 公司提供。

1.4 仪器 Bio-Rad 3550UV 酶标仪,美国 Bio-Rad 公司生产;BL-410 四道生理记录仪,由成都泰盟科技有限公司提供;电子天平,沈阳龙腾电子称量仪器有限公司提供;TGL-16G 高速台式冷冻离心机:由上海安亭科学仪器厂提供;尾动脉测压器:由成都仪器厂提供。

2 方法

2.1 造模 取大鼠 60 只,雌雄各半,除空白对照组 ($n = 10$)外,其余 50 只采用连续 ip 盐酸阿霉素的方法复制大鼠心衰模型,每次 $0.0025 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,每周 1 次,连续 6 周^[5-7],造模结束时肉眼发现动物安静状态下出现呼吸困难,精神萎靡,腹水等症状。测尾动脉收缩血压比造模前明显降低,说明心力衰竭造模成功,造模过程中常规死亡 10 只,尸解均发现不同程度的浆膜腔积液,脏器肉眼观色泽较深,提示脏器充血。

2.2 模型治疗用药 待造模成功后,将造模成功的大鼠随机分为模型对照组、四逆汤高、中、低剂量组(各组 $n = 10$)。均采用 ig 给药,四逆汤高剂量治疗组 14 倍于人体用量(人体体重以 60 kg 为标准),即每日 $5.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,中剂量治疗组每日 $2.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,低剂量治疗组每日给药 $1.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,并将中剂量组与低剂量组分别稀释 2 倍与 4 倍,使高、中、低剂量组同体积。模型对照组给予同体积生理盐水 ig,四逆汤治疗组与模型对照组均于早上 ig 1 次,连续治疗 8 d。

2.3 心功能各项指标检测 连续治疗 8 d 后,将大鼠用 2.4% 水合氯醛 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉后于颈部腹侧偏右纵向切开皮肤,暴露并钝性分离左颈总动脉,用肝素 ($1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 静脉注射后,将自制导管经

左颈总动脉插入左心室,导管另一端连接压力传感器,通过 BL-410 四道生理记录仪同步记录左室收缩压,左室舒张末压及左室最大压力上升及下降速度。用同样的方法测量股动脉收缩压、舒张压。并记录心率的变化。

2.4 钙含量测定 比色法测定心肌组织中钙含量,具体操作按钙含量测定试剂盒说明书进行。

2.5 CaN 活性测定 无机磷法测定心肌组织中 CaN 活性,按 CaN 活性测定试剂盒说明书进行操作,考马斯亮蓝法测定组织蛋白含量,结果以比活力表示。

2.6 去磷酸化 NFATc 蛋白的相对表达 Western blotting 检测去磷酸化 NFATc 蛋白的相对表达,进行心肌组织细胞核蛋白的提取,蛋白定量。将各样品加入 $2 \times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,置沸水浴中加热 5 min,按每孔 50 μg 蛋白量加样:电泳,转膜,封闭。加兔抗 NFATc1 多克隆一抗(稀释度 1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。加辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(稀释度 1:10 000)室温孵育 6 h,洗膜,暗室中加入 ECL 化学发光剂,室温作用 1 min,迅速封膜, BioRad 图像分析仪扫描, SigmaScan 图像分析软件进行吸光度积分值分析。实验重复 12 次。

2.7 统计学方法 数据使用 SPSS 11.0 进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,成组 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察 四逆汤高、中剂量治疗组大鼠精神情况明显好于模型对照组。低剂量治疗组大鼠精神较差,改善不明显。

3.2 心功能指标比较 与模型对照相比较,四逆汤高、中剂量治疗组股动脉收缩压、舒张压、左室收缩压均显著升高,左室舒张末压下降,左室最大压力上升速度显著升高, $P < 0.05$ (表 1)。

表 1 各组心功能血流动力学指标对比 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	心率 $/\text{次} \cdot \text{min}^{-1}$	左室收缩压 $/\text{mmHg}$	左室舒张末压 $/\text{mmHg}$	动脉收缩压 $/\text{mmHg}$	动脉舒张压 $/\text{mmHg}$	左室最大压力 上升速率 $/\text{mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$
空白	-	383 ± 10	141.3 ± 7.3	4.25 ± 3.71	67.3 ± 3.7	111.0 ± 2.4	$8\ 744 \pm 311$
模型对照	-	211 ± 10	92.1 ± 2.3	11.36 ± 11.1	93.3 ± 2.3	86.0 ± 4.5	$4\ 185 \pm 114$
四逆汤	5.6	$361 \pm 10^{2)}$	$127.2 \pm 10.5^{2)}$	$5.81 \pm 10.1^{2)}$	$156.7 \pm 10.3^{2)}$	$104.2 \pm 9.1^{1)}$	$7\ 826 \pm 40^{2)}$
	2.8	$347 \pm 10^{2)}$	$132.2 \pm 11.1^{2)}$	$5.4 \pm 13.4^{2)}$	$142.5 \pm 2.5^{1)}$	$94.3 \pm 9.1^{2)}$	$8\ 019 \pm 119^{2)}$
	1.4	$290 \pm 10^{1)}$	$97.8 \pm 3.5^{1)}$	$5.6 \pm 12.3^{1)}$	$127.2 \pm 10.1^{1)}$	$92.1 \pm 4.1^{1)}$	$5\ 005 \pm 324$

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 各组 CaN 活性测定比较 四逆汤高、中剂量治疗组 CaN 含量与模型对照比较显著降低, $P < 0.01$, 差异有显著性(表 2)。

3.4 各组心肌组织钙含量、去磷酸化 NFATc 相对表达量检测比较 四逆汤高、中剂量治疗组 Ca^{2+} 含量与模型对照比较显著升高, $P < 0.01$, 差异有显著性。四逆汤高、中剂量治疗组大鼠心肌组织中去磷酸化 NFATc/ β -actin 吸光度比值较模型对照比显著降低, $P < 0.01$, 差异有显著性(表 2)。

表 2 各组心肌钙含量测定与 CaN 活性及 NFATc 相对表达测定对比 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	钙含量 / $\mu mol \cdot g^{-1}$	CaN 活性 / $U \cdot mg^{-1}$	NFATc / β -actin
空白	-	138.30 \pm 20.1	41.11 \pm 10.1	0.74 \pm 0.02
模型对照	-	85.43 \pm 22.3	62.41 \pm 15.2	0.98 \pm 0.14
四逆汤	5.6	112.32 \pm 31.2 ²⁾	49.22 \pm 13.5 ²⁾	0.79 \pm 0.07 ²⁾
	2.8	117.13 \pm 50.3 ²⁾	48.03 \pm 20.3 ²⁾	0.77 \pm 0.16 ²⁾
	1.4	98.18 \pm 21.1 ¹⁾	58.29 \pm 26.1	0.82 \pm 0.03

3.5 病理学改变 将空白对照、模型对照组、四逆汤治疗组各组心肌组织做 HE 染色后显示:空白对照组心肌纤维呈平行排列,胞膜及胞核清晰,高倍镜下可见清晰横纹,未见胞体水肿,组织间隙无瘀血及炎性渗出。模型对照组心肌组织呈部分水肿和空泡变性,部分心肌细胞脂肪变性,呈片状坏死,部分肌原纤维溶解,心肌纤维断裂,心肌纤维排列紊乱,细胞间隙明显增宽,并有炎细胞浸润。用药高、中剂量组心肌组织水肿和脂肪变性明显减轻,有少量的炎性细胞渗出,细胞形状完整,坏死较少。

4 讨论

自古以来,四逆汤被公认为是温补心肾阳虚的代表方剂。现代研究四逆汤及其各单味成分所具有的效应表明单味附子虽有一定的强心升压效应,但其作用不如四逆汤,且可致异位性心律失常;单味甘草不能增加心脏收缩幅度,但有升压效应;单味干姜未能显示任何有意义的生理效应,由三药合方的四逆汤,其强心升压效果优于各单味药物组,且能减慢窦性心率,避免单味附子所产生的异位心律失常,提示该复方组方的合理性,表明四逆汤具有升压、强心、抗休克作用^[8]。然其升压、强心、抗休克的分子学机制尚不清楚,本实验以近几年最新发现的 CaN-NFAT3 信号转导通路为切入点进行其分子机制的研究。CaN 作为细胞内 Ca^{2+} 敏感的信号物质,在心衰

的发展中起重要作用。而细胞内 Ca^{2+} 升高是启动这条信号通路的起始信号^[9]。当胞内 Ca^{2+} 增高时, CaN 可使核转录因子 NFAT3 脱磷酸,使之转位入核,再与另一转录因子 GATA4 相互作用,最终引起心功能衰竭^[10]。本实验通过对大鼠心衰模型进行四逆汤治疗后发现其心肌组织内钙含量升高,而 CaN 活性降低, NFATc/ β -actin 吸光度比值显著降低,表明通过四逆汤治疗后有效抑制了该通路的活性而使该通路抑制,最终使心功能得到有效改善,使心力衰竭得到恢复。因此, CaN-NFAT3 信号转导通路的发现,对于在分子水平研究急慢性心功能不全的发病机制提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Guerini D. Calcineurin not just a simple protein phosphatase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 235(2):271.
- [2] Hefti M A, Harder B A, Eppenberger H M, et al. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(9):2873.
- [3] Sugden P H. Signaling in myocardial hypertrophy life after calcineurin[J]. Circ Res, 1999, 84(2):633
- [4] 郭建极, 巫国勇, 钟佛添, 等. 四逆汤对供心冷保存保护作用的实验研究[J]. 广西医学, 2005, 27(6):800.
- [5] 毕晓明, 王逸平. 三七组分(Rx)对心脏功能及血流动力学的作用[J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(2):152.
- [6] 胡元会, 车维新. 心复康口服液对亚急性阿霉素心肌损伤大鼠心功能及自由基代谢的影响[J]. 中药药研究, 1999, 15(5):38.
- [7] 白民刚, 刘玉华, 谷刚. 康心力胶囊治疗充血性心力衰竭临床与实验研究[J]. 中医杂志, 2001, 42(3):156.
- [8] 金明华, 裘鉴, 吴伟康. 四逆汤对冠心病患者左心室肥厚逆转作用的临床研究[J]. 中国中医药科技, 2003, 10(1):6.
- [9] Booz G W. Putting the brakes on cardiac hypertrophy; exploiting the NO-cGMP counter-regulatory system[J]. Hypertension, 2005, 45(5):341.
- [10] See F, Thomas W, Way K, et al. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44(7):1679.

[责任编辑 聂淑琴]