

益气活血药对心肌梗死大鼠心脏蛋白激酶 C 表达的影响

吴爱明 娄利霞 张冬梅 聂波 赵久丽 赵明镜

【摘要】 目的 探讨益气活血中药(生脉注射液联合血塞通注射液)对心肌梗死大鼠心脏蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)表达的影响。**方法** SD 大鼠随机分为模型组、假手术组、卡托普利组和益气活血组。结扎大鼠心脏左冠状动脉前降支建立心肌梗死模型(假手术组只穿线,不结扎)。模型组和假手术组给予生理盐水;卡托普利组给予卡托普利片 4.39 mg/(kg·d)溶解灌胃;益气活血组给予生脉注射液 3.51 mL/(kg·d)联合血塞通注射液 17.54 mg/(kg·d)腹腔注射。治疗 4 周后取材,称重计算心脏质量指数;RT-PCR 法检测左心室心肌组织 PKC mRNA 的表达;Western blot 法检测 PKC 蛋白的表达。**结果** 与假手术组比较,模型组心脏质量指数显著增加($P<0.01$),PKC 的 mRNA 和蛋白表达亦显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,益气活血组和卡托普利组心脏质量指数显著降低($P<0.05$),同时 PKC 的 mRNA 和蛋白表达也显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 益气活血药(生脉注射液联合血塞通注射液)可以改善心脏重构,其机制与抑制心肌梗死后心肌组织 PKC 的高表达有关。

【关键词】 心肌梗死; 心脏重构; 蛋白激酶 C; 益气活血

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.09.011

Effects of Yiqi Huoxue drugs on expression of protein kinase C in rats with myocardial infarction

WU Ai-ming, LOU Li-xia, ZHANG Dong-mei, et al. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education and Beijing, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: ZHAO Ming-jing, E-mail: mjgx2004@163.com

【Abstract】 Objective To study effects of Yiqi Huoxue drugs (combine Shengmai injection with Xuesaitong injection) on expression of protein kinase C (PKC) in rats with myocardial infarction. **Methods** SD rats were randomly divided into model group, sham operation group, captopril group and Yiqi Huoxue group. Model rats of myocardial infarction were established by occlusion of the left anterior descending coronary artery (the sham operation group without occlusion of the left anterior descending coronary artery). Captopril 4.39 mg/(kg·d) and distilled water (for the sham operation and model groups) were administered orally. Yiqi Huoxue drugs (combine Shengmai injection 3.51 mL/(kg·d) with Xuesaitong injection 17.54 mg/(kg·d) were administered intraperitoneally. The cardiac mass index was recorded after 4 weeks of treatment. The expressions of PKC mRNA of myocardium in left ventricular were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. And the expressions of PKC protein were observed by Western blot. **Results** Compared to the sham operation group, the cardiac mass and the ex-

基金项目: 国家自然科学基金(81202685);北京市教委科研基地项目(BUCM2012)

作者单位: 100700 北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部和北京市重点实验室[吴爱明(博士研究生)、娄利霞、张冬梅、聂波、赵久丽、赵明镜]

作者简介: 吴爱明(1979-), 2014 级在读博士研究生, 副研究员。研究方向: 中西医结合心脑血管病应用基础研究。E-mail: wam688@163.com

通讯作者: 赵明镜(1964-), 硕士, 研究员, 博士生导师。研究方向: 中西医结合应用基础研究。E-mail: mjgx2004@163.com

pressions of PKC mRNA and protein index in the model group increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the model group, the cardiac mass index and expressions of Cx43 mRNA and protein decreased significantly in *Yiqi Huoxue* group and captopril group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion *Yiqi Huoxue* drugs (combine Shengmai injection with Xuesaitong injection) can improve cardiac remodeling after myocardial infarction, which may through the mechanism of its suppression effects of the high expression of PKC in myocardial tissue after myocardial infarction.

【Key words】 Myocardial infarction; Cardiac remodeling; Protein kinase C; *Yiqi Huoxue*

益气活血法是中医治疗缺血性心脏病的常用有效治法。特别在心肌梗死的治疗上,益气活血药应用广泛,对缓解症状和改善患者预后有益。本研究在益气活血法指导下,采用生脉注射液联合血塞通注射液对心肌梗死大鼠进行实验性干预,观察其对心脏质量指数和心肌组织蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 基因和蛋白表达的影响,旨在探讨益气活血中药治疗心肌梗死的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠,雄性,体质量(200 ± 240) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2006-0009。

1.2 实验仪器

小动物呼吸机、BL-420F 生物机能实验系统、实时荧光定量 PCR 仪、电泳仪、垂直电泳槽和转膜仪。

1.3 实验试剂

SYBR Green PCR Master Mix 为美国 ABI 公司产品;PKC 一抗(生产批号:sc-10800,美国 Santa cruz 公司产品);二抗为辣根酶标记山羊抗兔 IgG (生产批号:ZB-2301,北京中杉金桥公司);三磷酸脱氧核糖核苷混合物(deoxy-ribonucleoside triphosphate Mix, dNTP Mix)、多聚胸腺嘧啶寡核苷酸引物[Oligo(dT)₁₅ Primer]、莫洛尼鼠白血病毒反转录酶(M-MLV Reverse Transcriptase)均为美国 Promega 公司产品。

1.4 心肌梗死大鼠模型造模方法

麻醉大鼠,仰卧位固定,气管插管,机械辅助呼吸,手术区消毒备皮后,在第三、四肋间开胸,暴露心脏,结扎左冠状动脉前降支(假手术组只穿线,不结扎),复位心脏,逐层缝合,心电图示 ST 段抬高为造模成功。术后给予青霉素抗感染。

1.5 分组给药方法

大鼠术后随机分为模型组、假手术组、卡托普利组和益气活血组。益气活血组给予生脉注

射液(雅安三九药业有限公司,生产批号:100301)3.51 mL/(kg·d)联合血塞通注射液(昆明制药集团股份有限公司,生产批号:10DL04)17.54 mg/(kg·d)腹腔注射;卡托普利组给予卡托普利片(中美上海施贵宝制药有限公司,生产批号:0810031)4.39 mg/(kg·d)溶解灌胃;模型组和假手术组给予生理盐水。疗程 4 周。

1.6 心脏质量指数测量方法

治疗 4 周后,称量体质量,然后麻醉,开胸取心脏,剪去非心组织,滤纸蘸干水分,称量心脏质量,计算心脏质量/体质量(mg/g),即为心脏质量指数。

1.7 心肌组织 PKC mRNA 检测方法

采用 real time PCR 法检测心肌组织 PKC mRNA 相对表达量。PKC:133bp forward:5'-GCTTCAA-CATCGACATGCCTCACC-3'; reverse:5'-ACAT-TCATGCCCGAGTCTTCACACT-3'。β-Actin:198bp forward:5'-AGATCCTGACCGAGCGTGGC-3'; reverse:5'-CCAGGGAGGAAGAGGATGCG-3'。扩增条件为:95℃10分钟预变性,95℃变性30秒,55℃退火30秒,72℃延伸20秒,40次循环。PKC mRNA 的相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.8 心肌组织 PKC 蛋白检测方法

采用 Western blot 法检测心肌组织 PKC 蛋白相对表达量。心肌组织低温研磨破碎,裂解,提取总蛋白,二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,依次与一抗、二抗孵育,化学发光法获取条带,扫描胶片后用 IPP 6.0 软件进行目的条带的灰度分析,计算 PKC 蛋白的相对表达量。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计处理。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,先进行正态性和方差齐性检验,符合正态分布和方差齐性的数据采用单因素方差分析,多组之间的两两比较采用 LSD 法;不符合正态分布的采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量、心脏质量与心脏质量指数的比较

体质量、心脏质量与心脏质量指数均呈正态分布且方差齐,故采用单因素方差分析进行统计学比较。与假手术组比较,模型组心脏质量和心脏质量指数均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,卡托普利组心脏质量下降($P<0.05$);卡托普利组和益气活血组的的心脏质量指数都显著降低($P<0.05$)。各组的体质量之间没有统计学差异。见表 1。

表 1 体质量、心脏质量与心脏质量指数的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	体质量 (g)	心脏质量 (mg)	心脏质量 指数(mg/g)
模型组	5	369.20±33.24	1557.20±155.22 ^a	4.25±0.60 ^b
假手术组	5	390.60±15.47	1280.80±96.65 ^c	3.28±0.26 ^d
卡托普利组	5	365.00±39.38	1298.80±152.73 ^c	3.56±0.27 ^c
益气活血组	5	384.00±38.54	1433.60±204.41	3.72±0.21 ^c

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

2.2 心肌组织 PKC mRNA、PKC 蛋白表达的比较

PKC mRNA 检测数据呈正态分布且方差齐,故采用单因素方差分析进行统计学比较。与假手术组比较,模型组心肌组织 PKC mRNA、PKC 蛋白的表达显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,卡托普利组和益气活血组的 PKC mRNA、PKC 蛋白表达显著降低($P<0.05$),见表 2、图 1。

表 2 心肌组织 PKC mRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	PKC mRNA(<i>n</i> =5)	PKC 蛋白表达量(<i>n</i> =3)
模型组	1.45±0.19 ^b	1.72±0.23 ^a
假手术组	1.04±0.19 ^d	1.00±0.06 ^c
卡托普利组	1.14±0.14 ^c	0.97±0.43 ^c
益气活血组	1.05±0.30 ^c	0.84±0.38 ^d

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

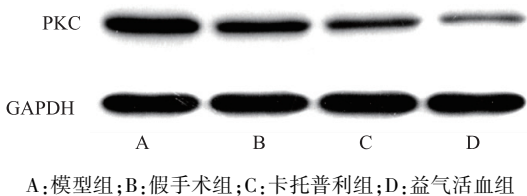


图 1 心肌组织 PKC 蛋白表达的比较

3 讨论

心肌梗死是危害人类健康的急危重症^[1]。随

着生活节奏的加快,饮食习惯的改变,以及中国社会日益凸显的老龄化等问题,心肌梗死的发病率居高不下^[2]。据一项基于北京市疾病预防控制中心的全人群死亡监测研究显示^[3];2003~2007 年北京市居民急性心肌梗死的粗死亡率为 45.81/100 000;5 年间,因急性心肌梗死死亡的人数占总死亡人数的 9.49%,占因心脏病死亡人数的 40.24%;并且死亡率呈逐年增高趋势,从 2003 年 43.64/100 000 上升到 2007 年 58.81/100 000,上升了 34.76%。在如此严峻的形势下,进一步研究心肌梗死的病理机制,并开展中医药干预的实验研究具有重要的现实意义。

随着溶栓、介入技术的普及,心肌梗死的早期病死率显著降低^[4],但是患者仍然面临心脏重构、心功能恶化和最终发展为心力衰竭而死亡的潜在风险^[5]。心肌梗死向心衰进展的基本病理机制是心脏重构^[6],心脏重构是一种复杂的病理过程。心肌梗死发生后,心肌组织缺血缺氧,一方面会造成血流动力学障碍,另一方面会导致一系列神经体液因子的激活和基因表达的变化。这些共同促使心脏发生重构,表现为心脏的大小、形态的改变,心肌损伤的加重,以及心功能的持续恶化。因此,延缓和抑制心脏重构是预防心肌梗死向心衰进展,降低死亡率的重点干预途径。

中医早在《灵书·厥病》篇就有“真心痛,手足青至节,心痛甚,旦发夕死,夕发旦死”的记载。心肌梗死属于中医“胸痹”“真心痛”等范畴,为本虚标实之证,虽然证型复杂,但是气虚血瘀是心肌梗死发病的共同病机。中医认为“气血相关、气为血之帅、血为气之母、气行则血行”,益气活血法是心肌梗死的基本治法^[7],益气活血方药已被广泛用在心肌梗死的治疗上。研究证明益气活血中药具有改善心肌缺血、缩小梗死面积、抑制心脏重构、降低炎症因子表达、促进血管新生、抗血小板聚集等药理作用^[8-12],并且在改善心肌梗死患者心功能,提高生活质量,降低患者死亡率上发挥了有益的治疗作用^[13-14]。

本研究在益气活血法指导下,采用生脉注射液联合血管通注射液对心肌梗死大鼠进行实验性干预,结果显示,心肌梗死模型大鼠造模术后四周,心脏重构明显,表现为心脏质量指数显著增加;与模型组比较,益气活血组和卡托普利组,心脏质量指数显著降低,表明生脉注射液联合血管

通注射液与卡托普利都可以改善心肌梗死后的心脏重构。本研究还发现心肌梗死大鼠心脏 PKC 基因和蛋白表达均显著上调,而在给予益气活血药或卡托普利治疗后可以明显抑制心肌梗死后 PKC 基因和蛋白表达的上调。PKC 是 1977 年日本学者在鼠脑细胞质成分中首次发现的一种蛋白激酶,依赖于 Ca^{2+} 、二酰基甘油 (diacylglycerol, DAG) 及磷脂酰丝氨酸刺激而激活、催化细胞内丝氨酸/苏氨酸残基的磷酸化,是细胞磷脂酰肌醇信号传递通路的关键环节,广泛参与细胞的增殖、分化,肿瘤的生长以及细胞内钙稳态的维持等诸多生物学过程。心肌梗死后心脏局部肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin-System, RAS) 激活,血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 水平增加,Ang II 与血管紧张素受体 1 (angiotensin receptor 1, AT1) 受体结合,激活磷酸酯酶 C_β (phosphatase C_β , PLC_β), 使磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2) 水解生成三磷酸肌醇 (inositol trisphosphate, IP3) 和 DAG, IP3 促进细胞内 Ca^{2+} 的释放, Ca^{2+} 与 DAG 协同活化 PKC。PKC 在心脏重构中发挥了重要作用。一方面 PKC 可以促进心肌细胞的增殖, PKC 的激活与心肌肥厚的进展密切相关^[15-16], 另一方面, PKC 还可以促进心肌成纤维细胞的增殖^[17], 介导了心肌胶原重塑过程, PKC 的活化及表达的增加, 导致了心肌组织胶原含量的增高, I、III 型胶原表达的增加以及 I/III 胶原比例的升高^[18]。因此, 心肌梗死后 PKC 表达上调所导致的心肌细胞和心肌成纤维细胞增殖是引起心脏质量指数增加的直接原因。PKC 作为心脏重构的关键调控分子, 正在成为延缓心肌梗死向心衰进展的潜在干预靶点^[19]。本研究提示, 益气活血中药生脉注射液联合血栓通注射液对心肌梗死大鼠心脏 PKC 表达的抑制作用, 是其改善心脏重构的重要分子机制之一, 值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] McManus DD, Piacentini SM, Lessard D, et al. Thirty-year (1975 to 2005) trends in the incidence rates, clinical features, treatment practices, and short-term outcomes of patients <55 years of age hospitalized with an initial acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 2011, 108(4):477-482.
- [2] 苏懿, 王磊, 张敏州. 急性心肌梗死的流行病学研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(4):467-469.
- [3] 韦再华, 高燕琳, 苏健婷, 等. 2003-2007 年北京市户籍居民急性心肌梗死死亡人群分布特征[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(7):651-652.
- [4] Falsini G, Liistro F, Ducci K, et al. Shifting from pharmacological to systematic mechanical reperfusion therapy for acute myocardial infarction via a cooperating network: impact on reperfusion rate and in-hospital mortality[J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2008, 9(3):245-250.
- [5] Fan Y, Bai X, Chen Y, et al. Late percutaneous coronary intervention prevents left ventricular remodeling and improves clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. Clin Cardiol, 2015, 38(2):82-91.
- [6] Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35(3):569-582.
- [7] 刘艳萍, 郭小刚, 何开明, 等. 益气活血法治疗急性心肌梗死的相关研究进展[J]. 四川中医, 2013, 31(9):172-174.
- [8] 胡国恒, 胡哲, 盛望, 等. 益气活血方对大鼠缺血心肌血管新生及 HGF 影响的研究[J]. 中国中医急症, 2013, 22(9):1478-1479, 1484.
- [9] 章燕, 戴小华. 益气活血中药改善急性心肌梗死后左心室重构实验研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(2):74-76.
- [10] 刘宁. 益气活血方对心肌缺血大鼠血清细胞因子的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(8):889-891, 894.
- [11] 吴成哲, 黄朝忠, 纪凯, 等. 益气活血方对实验性心肌梗死大鼠促血管新生机制研究[J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35(9):83-85.
- [12] 王宝君, 张庆翔, 张蕾, 等. 益气活血中药配合双联抗血小板治疗对急性心肌梗死大鼠血栓形成的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(14):1225-1229.
- [13] 齐延伟, 吴中荣, 冯志英. 参麦注射液治疗急性心肌梗死 60 例临床观察[J]. 中医药导报, 2015, 21(6):93-95.
- [14] 轩静静, 高彩霞, 关怀敏, 等. 参麦注射液治疗急性心肌梗死后心力衰竭患者的远期临床疗效[J]. 中成药, 2015, 37(2):465-467.
- [15] 何华, 高玖鸣, 王文. PKC ϵ 在心肌肥厚中的作用地位[J]. 高血压杂志, 2006, 14(7):514-516.
- [16] 刘韬, 秦牧, 黄从新. 蛋白激酶 C 与心肌肥厚及室性心律失常间的关系[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(3):172-174.
- [17] 王立英, 杨世杰. 蛋白激酶 C 在心肌纤维化中的作用[J]. 药学报, 2010, 42(12):1467-1471.
- [18] 郭锐, 路明, 武怡, 等. 福辛普利干预对阿霉素大鼠蛋白激酶 C 及心肌重塑的影响[J]. 中国医药导报, 2013, 10(5):27-29.
- [19] Belmonte SL, Blaxall BC. PKC- η is believing: targeting protein kinase C in heart failure [J]. Circ Res, 2011, 109(12):1320-1322.

(收稿日期: 2013-05-28)

(本文编辑: 董历华)