

复方丹参对缺血预适应大鼠心肌蛋白激酶 C 表达的影响

高秀梅¹, 张伯礼¹, 商洪才¹, 王 怡¹, 郭利平¹, 张 萌¹, 史 红¹, 刘密新^{2*}

(1. 天津中医学院 中医药研究中心, 天津 300193; 2. 清华大学 化学系, 北京 100084)

摘要: 目的 探讨复方丹参加强缺血预适应 (IPC) 的机制, 是否通过促进蛋白激酶 C (PKC) 蛋白、mRNA 水平表达发挥作用。方法 采用冠脉结扎大鼠 5 min 缺血, 5 min 再灌反复循环 3 次的缺血预适应方案, 缺血 30 min, 再灌 2 h 的缺血再灌模型, 通过免疫组化、RT-PCR 的方法观察 PKC 蛋白、mRNA 表达以及复方丹参对其影响。结果 PKC 在正常对照组中主要存在胞浆, 但经过 IPC 和使用复方丹参后, 在胞膜和胞核也可见; 不论早期, 还是晚期 IPC 组 PKC 表达均高于假性预处理组, 以早期 IPC 组明显 ($P < 0.01$); 经复方丹参预处理后, PKC 的表达均高于再灌组、早期、晚期 IPC 组, 以药物预处理+缺血预处理组 (DIPC) 为优, 显著高于早期 IPC 组 ($P < 0.01$)。PKC mRNA 在正常心肌组织、再灌组、假性预处理组间无明显差异, 但 IPC 后不论早期, 还是晚期 PKC mRNA 表达均高于假性预处理组, 晚期 IPC 组表达更加明显; 经复方丹参预处理后, 可明显促进早、晚期 IPC 及再灌组 PKC mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。结论 复方丹参可激活 PKC, 使其发生转位, 促进其蛋白、mRNA 表达水平增高。这可能是此方加强 IPC 的主要机制之一。

关键词: 缺血预适应 (IPC); 复方丹参; 蛋白激酶 C (PKC)

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)10-0933-03

Effect of Compound *Salvia* Recipe on myocardial protein kinase C expression of ischemic preconditioning rat

GAO Xiu-mei¹, ZHANG Bo-li¹, SHANG Hong-cai¹, WANG Yi¹, GUO Li-ping¹,
ZHANG Meng¹, SHI Hong¹, LIU Mi-xin²

(1. TCM Research Center, Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China; 2. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Key words ischemic preconditioning (IPC); Compound *Salvia* Recipe; protein kinase C (PKC)

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一种在组织中广泛分布的磷酸化酶, 静息状态下定位于细胞胞浆中, 受到刺激后可以转位至细胞膜、细胞核, PKC 活化后在细胞分泌、增生、分化等功能中发挥着重要作用^[1]。PKC 的激活在缺血预适应 (IPC) 跨膜信号传递过程中具有举足轻重的地位, 是一类 Ca^{2+} 、磷脂依赖性的蛋白激酶, IPC 时机体内源性保护物质释放增加, 作用于相应的受体, 经受体和 G 蛋白偶联激活磷脂酶 C (PLC), 后者使膜上的磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 (PIP₂) 水解为三磷酸肌醇 (IP₃) 和二酰基甘油 (DG), DG 是 PKC 激活剂, PKC 通过移位, 将信息传递于细胞核和细胞的外周, 通过催化多种蛋白质磷酸化, 进而对细胞产生保护作用。复方丹参对缺血再灌心肌损伤具有保护作用, 可加强 IPC 的保护效应, 减轻缺血再灌心肌坏死区质量, 其是否可以激活 IPC 级联反应中的关键

物质 PKC, 促进其表达从而发挥对心肌缺血的保护作用, 本实验从蛋白及 mRNA 表达水平进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 动物: SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 (443.65 ± 36.13) g, 由北京维通利华动物实验技术有限公司提供。

1.2 药物: 复方丹参浸膏根据复方丹参滴丸处方及提取工艺制备而成, 出膏率为 20.26%, 给药量 2.0 g/生药/kg, 经 HPLC 分析主要含丹参水溶性成分和三七总皂苷以及冰片。

1.3 试剂: PKC 小鼠抗大鼠单克隆抗体 (Santa Cruz), 生物素化山羊抗小鼠 IgG (二抗), 辣根酶标记链亲合素 (三抗), DAB 封闭用山羊血清 (博士德试剂公司), DEPC 琼脂糖 (Sigma), TRIZOL Reagent (LTI), 一步法反转录 PCR 试剂盒

* 收稿日期: 2002-08-18

基金项目: 国家重点基础研究规划项目 方剂关键科学问题研究 (G1999054403)

作者简介: 高秀梅 (1966-), 女, 内蒙古人, 副研究员, 博士, 现为中国中医研究院中西医结合博士后, 从事丹参与三七配伍关系研究。

Tel (022) 27386453 23051076 Fax (022) 27493265

(TakaRa BIOTECH公司),大鼠 PKC β -actin引物由北京赛百盛生物工程公司合成。PKC引物序列:上游 5'-CCGCCTCTACTTTGTGAT-3',下游 5'-CCTTGCGTTCGAGTTTCT-3',长度 563 bp β -actin的序列:上游 5'-CTATCGGCAATGAGCGG-TTC-3',下游 5'-CTTAGGAGTT-GGGGCTG-GCT-3',长度 762 bp

1.4 动物模型的复制

1.4.1 复制方法:用 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔麻醉大鼠,行气管插管连接小动物呼吸机,频率 80~90 次/min,潮气量 3~4 mL,持续记录心电图变化。开胸暴露心脏,用穿有缝合线的弯针钩绕左冠状动脉前降支主干,线两端共穿过一根聚乙烯小管以形成闭环。拉紧闭环并用止血钳固定即产生缺血,放松闭环即发生再灌注。缺血性适应 IPC 缺血 5 min,再灌 5 min,反复循环 3 次。间隔 10 min 后,再进行缺血 30 min,再灌 2 h

1.4.2 缺血及再灌标志:缺血的标志为 ST 段抬高和 R 波增高,左室发绀。再灌的标志为抬高的 ST 段和 R 波恢复,发绀区变红。

1.4.3 退出实验的标准:有下列情况之一的大鼠将退出实验:(1)当灌注染色后,缺血质量 (AAR) 不足心脏重的 15%;(2)结扎冠状动脉失败或未发现再灌注者;(3)过度出血并致血压下降者;(4)呼吸心跳停止超过 30 s 者。

1.5 实验分组:将 90 只大鼠随机分 9 组。其中 61 只大鼠完成了本实验。除给药组外,其余各组均 ig 等量生理盐水。① 对照组 (control):不做任何处理。

② 再灌组 (IR):缺血 30 min,再灌 2 h。③ 假性缺血预处理组 (SIPC):3 个 IPC (采用 5 min 缺血,5 min 再灌,反复循环 3 次)时只穿线,不结扎,10 min 后缺血 30 min,再灌 2 h。④ 缺血预处理组 (IPC):首先 3 个 IPC,10 min 后缺血 30 min,再灌 2 h。⑤ 药物预处理+缺血预处理组 (DIPC):ig 2 h 后,再进行 IPC 组过程。⑥ 药物预处理组 (DIP):ig 2 h 后,再进行再灌过程。⑦ 晚期假性缺血预处理组 (SIPC/swop):3 个 IPC 时只穿线,恢复 24 h 后再进行再灌过程。⑧ 晚期缺血预处理组 (IPC/swop):3 个 IPC 后,恢复 24 h 再进行再灌过程。⑨ 晚期药物预处理+缺血预处理组 (DIPC/swop):ig 2 h 后,进行 3 个 IPC,恢复 24 h 后进行再灌过程。

1.6 PKC 蛋白表达

1.6.1 PKC 蛋白的表达:采用免疫组化方法检测于实验结束时各组大鼠在结扎线以下取 2 cm 厚的

全心组织,放入福尔马林磷酸盐缓冲液中固定 48 h,石蜡包埋,切片,PKC 一抗稀释倍数 (1:100),染色步骤:切片脱腊入水,3% H_2O_2 室温孵育 10 min,以灭活内源性酶。最后蒸馏水洗 3 次。将切片浸入 TAB (0.05 mol/L, pH 7.4) 中,电炉加热至 100℃,持续 30 min。冷却后进行下一步。滴加抗原修复液,室温孵育 10 min,蒸馏水洗 3 次。滴加正常 5% 兔血清封闭液,室温孵育 10 min,甩去多余液体。滴加稀释的一抗,4℃ 湿盒内过夜。TAB 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加二抗室温孵育 30 min。TAB 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加三抗 (HIGH-SABC) 室温孵育 30 min。TAB 洗涤 3 次,每次 5 min, DAB 显色。自来水冲洗,苏木复染,封片。

1.6.2 观察方法及判断标准:心肌组织中出现黄染为阳性。每张切片由 2 位观察者独立计数,随机取染色区域 4 个高倍视野 ($\times 400$) 阳性细胞平均数,用半定量计分,染色强度用 0~3 级计分:0 无染色;1 轻度阳性染色;2 中度阳性染色;3 强阳性染色;染色范围根据细胞阳性染色的百分数而分为 0~4 级:0 无染色;1<25% 细胞染色;2-25%~50% 细胞染色;3-50%~75% 细胞染色;4>75% 细胞染色。染色总评分为染色强度+染色范围。

1.7 PKC mRNA 表达检测:采用 RT-PCR 方法观察 PKC mRNA 表达。于实验结束时各组取心尖组织 100 mg,立刻放入液氮中保存。

1.7.1 总 RNA 的提取:使用 TRIZOL Reagent (LT) 提取心脏总 RNA,核酸分析仪定量,检测纯度和含量,琼脂糖凝胶电泳分析其完整性。取 1 μ g RNA 用于 RT-PCR。

1.7.2 一步法 RT-PCR:使用 TakaRa BIOTECH 公司的一步法试剂盒测定。反应体系为 25 μ L,每一反应体系中含总 RNA 1 μ g,上游引物和下游引物终浓度为 0.4 μ mol/L,PKC RT-PCR 扩增的循环次数 28 cycles,逆转录 50℃,30 min;变性 94℃,30 s;退火温度 55℃,30 s;延伸 72℃,6 min。 β -actin 退火温度为 64℃,其他条件同上。

1.7.3 PKC mRNA 表达分析:各组取 0.5 μ L 扩增产物,进行琼脂糖凝胶电泳,结果拍照,采用 Image Master^(R) VDS 进行吸光度扫描 (IOD),以各组 PKC 条带 IOD 和相应的 β -actin 条带的 IOD 比值表示 PKC mRNA 表达的强弱。

1.8 统计学处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用随机设计的方差分析和 q 检验。采用 Stata 4.0 软件进行。

2 结果

2.1 复方丹参对 IPC 大鼠心脏组织 PKC 蛋白表达的影响: PKC 在对照组中主要存在于胞浆,但经过 IPC 和用药后,在胞膜和胞核也可见,这说明上述两种情况激活了 PKC,发生转位,再灌和假性预处理组较对照组表达增强,但无显著差异,早期 IPC 组和晚期 IPC 组表达均高于假性预处理组,以早期 IPC 组明显 ($P < 0.01$);经复方丹参预处理后,PKC 的表达均高于相应组,以 DIPC 组为优,显著高于 IPC 组 ($P < 0.01$)。上述结果提示复方丹参可激活 PKC,促进 PKC 蛋白表达,见表 1

表 1 各组缺血预适应大鼠的 PKC 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects on PKC protein expression

of ischemic preconditioning rats ($\bar{x} \pm s$)

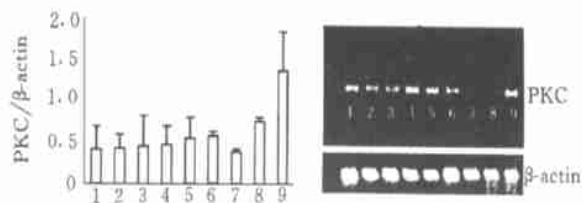
组别	动物只	评分值
对照	6	0.88±0.21
IR	7	1.79±0.86
SIPC	7	2.43±1.00
IPC	7	3.36±1.17 *
DIPC	7	5.20±1.30 *△△
DIP	7	2.7±1.31
SIPC/swop	7	1.25±0.63
IPC/swop	6	1.83±1.48
DIPC/swop	7	2.7±1.12

与 IR, SIPC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 IPC 组比较: △△ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs IR, SIPC groups; △△ $P < 0.01$ vs IPC group

2.2 复方丹参对 IPC 大鼠心脏组织 PKC mRNA 表达的影响: 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1,经分析发现,PKC mRNA 在正常心肌组织中也表达,再灌和假性预处理组与对照组没有明显差异,早期 IPC 组和晚期 IPC 组表达均高于假性预处理组,晚期 IPC 组表现更加明显,复方丹参预处理后,可明显促进早、晚期 IPC 及再灌组 PKC mRNA 的表达

3 讨论



1-对照组 2缺血再灌组 3假性缺血预处理组 4缺血预处理组 5药物预处理+缺血预处理组 6药物预处理组 7晚期假性缺血预处理组 8晚期缺血预处理组 9晚期药物预处理+缺血预处理组

1-control 2-IR 3-SIPC 4-IPC 5-DIPC 6-DIP
7-SIPC/swop 8-IPC/swop 9-DIPC/swop

图 1 各组缺血预适应大鼠的 PKC mRNA 表达

Fig. 1 Effect on PKC mRNA expression of ischemic preconditioning rats

IPC 的保护主要是由 PKC 的激活、蛋白质的磷酸化及其保护蛋白的积累。当短暂缺血和药物刺激后 PKC 迅速转位,使多种保护蛋白发生磷酸化,这是长时间缺血保护的基础。

本实验观察到,IPC 和用药后 PKC 有转位的现象,IPC 组 PKC mRNA 和蛋白表达明显增强,另外还发现不论是再灌前给予复方丹参,还是早、晚期 IPC 前给予复方丹参,均可明显促进 PKC mRNA 和蛋白的表达水平。说明复方丹参对心脏缺血的保护可能是通过激活 PKC 途径而起作用。但 PKC 激活后能使哪些蛋白质发生磷酸化,并参与了心肌细胞的保护作用,以及复方丹参激活了 PKC 的何种亚型是今后值得研究的问题

References

- [1] Nishizuka Y. Protein kinase C, protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses [J]. *FASEB J*, 1995, 9(5): 484-494.

消红散对实验性肾小球肾炎小鼠红细胞免疫功能作用机制的研究

张翠,刘琳*

(哈尔滨商业大学 制药工程系,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 目的 研究具有益气健脾摄血功效的消红散对肾小球肾炎 (GN) 小鼠红细胞免疫功能的影响。方法 复制免疫性 GN 小鼠模型,检测小鼠血中 C3b 受体花环率及免疫复合物 (CIC) 红细胞免疫黏附促进因子 (RFER)、红细胞免疫黏附抑制因子 (RFIR) 的变化。结果 消红散能增加 GN 小鼠的红细胞免疫功能,使 C3b 受体的数目增加,促使红细胞清除免疫复合物,减少 CIC 在肾小球基底膜沉积,缓解炎症或 CIC 介导的病理过程,且能使 RFER 活性升高,RFIR 活性下降。结论 消红散对红细胞免疫功能具有双向调节作用。

* 收稿日期: 2003-01-10

基金项目: 黑龙江省教育厅基金项目 (9551130)

作者简介: 张翠 (1958-),女,副教授,博士,主要从事方剂的配伍规律及中药复方治疗肾病的研究。Tel (0451) 84838207