

## 加减枳实薤白桂枝汤通过 AC/cAMP 通路对缺血再灌注大鼠心肌组织水通道蛋白表达的影响

李楠楠<sup>1</sup>, 石月萍<sup>2</sup>

(1. 锦州医科大学中医科, 辽宁省锦州市 121000; 2. 锦州医科大学附属第一医院中医科, 辽宁省锦州市 121000)

[关键词] 加减枳实薤白桂枝汤; 腺苷酸环化酶/环磷酸腺苷通路; 心肌缺血再灌注损伤; 水通道蛋白

[摘要] **目的** 探讨加减枳实薤白桂枝汤(枳实、薤白、三七、人参等)对缺血再灌注大鼠心肌组织水通道蛋白(AQP)表达的影响及其可能的作用机制。**方法** 将 52 只 SD 大鼠随机分为 4 组:假手术组( $n=10$ )、模型组( $n=14$ )、枳实薤白桂枝汤组( $n=14$ )、加减枳实薤白桂枝汤组( $n=14$ )。大鼠灌胃给药 14 天后结扎心脏左冠状动脉前降支,按缺血 30 min 再灌注 120 min 的方法建立心肌缺血再灌注损伤模型。全自动生化分析仪检测血清乳酸脱氢酶(LDH)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)变化;HE 染色观察心脏组织病理形态学变化;酶联免疫吸附法检测血浆腺苷酸环化酶(AC)、环磷酸腺苷(cAMP)水平;免疫组织化学染色检测心肌组织 AQP1、AQP4 的定位表达;实时荧光定量 PCR 检测心肌组织 AQP1、AQP4 mRNA 表达;Western blot 检测心肌组织蛋白激酶 A(PKA)、磷酸化 PKA(P-PKA)、cAMP 反应原件结合蛋白(CREB)、磷酸化 CREB(P-CREB)及 AQP1、AQP4 的蛋白表达。**结果** 与假手术组比较,模型组血清 LDH、cTnI 及血浆 AC、cAMP 含量升高( $P<0.01$ ),心肌组织 P-PKA、P-CREB 和 AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达升高( $P<0.01$ );与模型组比较,枳实薤白桂枝汤组、加减枳实薤白桂枝汤组血清 LDH、cTnI 及血浆 AC、cAMP 含量降低( $P<0.01$ ),心肌组织 P-PKA、AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达降低( $P<0.01$ );与枳实薤白桂枝汤组比较,加减枳实薤白桂枝汤组血清 LDH、cTnI 及血浆 AC、cAMP 含量降低( $P<0.01$ ),心肌组织 P-PKA、AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达降低( $P<0.01$ )。**结论** 加减枳实薤白桂枝汤可以改善缺血再灌注后心肌细胞病理损伤,其作用机制可能与下调 AC/cAMP 通路,进而抑制 AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction on the expression of aquaporin in myocardial tissue of ischemia-reperfusion rats through AC/cAMP pathway

LI Nan-Nan<sup>1</sup>, SHI Yue-Ping<sup>2</sup>

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

[KEY WORDS] Modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction; AC/cAMP pathway; Myocardial ischemia reperfusion injury; Aquaporin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction (Zhishi, Xiebai, Sanqi, Renshen, etc.) on the expression of aquaporin (AQP) in myocardial tissue of ischemia-reperfusion rats and its possible mechanism. **Methods** 52 SD rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group ( $n=10$ ), model group ( $n=14$ ), Zhishi Xiebai Guizhi decoction group (ZXGD group,  $n=14$ ) and modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction group (mZXGD group,  $n=14$ ). Left anterior descending coronary artery was ligated after 14 days of intragastric administration, and the myocardial ischemia-reperfusion injury model was established according to the method of ischemia 30 minutes and reperfusion 120 minutes. Changes of serum lactate dehydrogenase (LDH) and cardiac troponin I (cTnI) were detected by automatic biochemical analyzer. Change of cardiac histopathology was observed by HE staining. The levels of plasma

[收稿日期] 2017-12-05

[修回日期] 2018-01-18

[基金项目] 辽宁省科学技术基金资助项目(201602307)

[作者简介] 李楠楠, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治心血管疾病的临床与研究, E-mail 为 352662022@qq.com。通讯作者石月萍, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为中医药防治心血管疾病的临床与研究, E-mail 为 lnjzsy@163.com。

adenylate cyclase (AC) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Immunohistochemical staining was used to detect the positioning expressions of AQP1 and AQP4 in myocardial tissue. AQP1 and AQP4 mRNA expressions in myocardial tissue was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Western blot was used to detect protein expressions of protein kinase A (PKA), phosphorylated PKA (P-PKA), cAMP-response element binding protein (CREB), phosphorylated CREB (P-CREB), AQP1 and AQP4 in myocardial tissue.

**Results** Compared with sham operation group, the contents of serum LDH, cTnI and plasma AC, cAMP were increased ( $P<0.01$ ), and the expressions of P-PKA, P-CREB, AQP1, AQP4 mRNAs and proteins in myocardial tissue were increased ( $P<0.01$ ), in model group. Compared with model group, the contents of serum LDH, cTnI and plasma AC, cAMP were decreased ( $P<0.01$ ), and the expressions of P-PKA, AQP1, AQP4 mRNAs and proteins in myocardial tissue were decreased ( $P<0.01$ ), in ZXGD group and mZXGD group. Compared with ZXGD group, the contents of serum LDH, cTnI and plasma AC, cAMP were decreased ( $P<0.01$ ), and the expressions of P-PKA, AQP1, AQP4 mRNAs and proteins in myocardial tissue were decreased ( $P<0.01$ ), in mZXGD group. **Conclusion** Modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction can improve the pathological damage of myocardial cells after ischemia-reperfusion, and its mechanism may be related to down-regulating the AC/cAMP pathway and inhibiting AQP1, AQP4 mRNAs and proteins expression.

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 通常是指由于缺血心肌再灌注治疗后, 反而加重组织、器官的功能障碍和结构损伤, 甚至发生不可逆性损伤的现象<sup>[1]</sup>。MIRI 的组织学特征主要是肌细胞肿胀, 肌纤维断裂。水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 是水转运的主要途径<sup>[2-3]</sup>, 实验研究证实, MIRI 过程中 AQP 水平迅速上升, 而且上升水平与心肌损伤程度呈正相关<sup>[4]</sup>, 其参与再灌注过程的复杂性已经成为近期研究的热点。本课题组前期研究<sup>[5]</sup>已经证实, 加减枳实薤白桂枝汤 (前期命名为温阳通脉方) 可以有效减少缺血再灌注后心肌的梗死面积, 且能明显降低大鼠血清肌酸激酶同工酶、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的活性和含量, 在临床上治疗冠心病、不稳定型心绞痛效果显著。本实验意在探讨加减枳实薤白桂枝汤是否通过下调腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC)/环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 通路, 抑制 AQP1、AQP4 的表达, 从而减少水的跨膜转运, 发挥保护心肌的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验药物

加减枳实薤白桂枝汤是在治疗胸痹名方枳实薤白桂枝汤的基础上加减, 药物组成如下: 枳实 12 g、薤白 12 g、厚朴 12 g、桂枝 6 g、瓜蒌 12 g、人参 12 g、三七 9 g。各单味中药采用全成分免煎颗粒, 购买于北京康仁堂药业有限公司。用 100℃ 蒸馏水充分溶解混合且按人体表面积 0.018 计算浓度, 枳实薤白桂枝汤 4.59 g/kg, 加减枳实薤白桂枝汤 6.48 g/kg。枳实颗粒剂, 批号 15015502; 薤白颗粒剂, 批号 15015981;

桂枝颗粒剂, 批号 15018593; 瓜蒌颗粒剂, 批号 15020191; 厚朴颗粒剂, 批号 15019241; 人参颗粒剂, 批号 15015102; 三七颗粒剂, 批号 15015021; 均符合国家规定的药物质量标准。

### 1.2 动物及分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 52 只, 7~11 周龄, 体重 170~210 g, 购买于北京华阜康生物科技有限公司 [许可证编号: SCXK(京)2014-0004; 实验动物质量合格证: NO.11401300033455], 符合锦州医科大学动物实验管理标准。将 52 只 SD 大鼠, 随机抽取 10 只大鼠作为假手术组 (对照组), 另外 3 组为: 模型组、枳实薤白桂枝汤组、加减枳实薤白桂枝汤组, 每组 14 只, 称重并且编号。

### 1.3 主要试剂及仪器

环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 抗体 (批号 WL101848)、AQP1 抗体 (批号 WL00730)、AQP4 抗体 (批号 WL02267), 均购买于沈阳万类生物科技有限公司; 蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)  $\alpha/\beta/\gamma$  cat 抗体 (批号 sc-98951)、磷酸化 PKA (phosphorylated PKA, P-PKA)  $\alpha/\beta/\gamma$  cat (批号 sc-32986sc), 均购于 Santa Cruz 公司; 山羊抗兔 LgG 抗体 (批号 bs-0295G)、P-CREB (批号 bs-0036R), 由北京博奥森生物科技有限公司提供; AC、cAMP 酶联免疫分析试剂盒, 由南京森贝珈生物科技有限公司提供。

3K15 台式高速冷冻离心机 (日本日立制作所); Infinite 200 PRO 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); 全自动生化检测仪 (日本日立 7170A); Bio-Rad 垂直电泳仪 (北京生物技术有限公司); Bio-Rad ChemiDoc XRS 化学发光成像系统 (美国伯乐公司); 实时 PCR 仪 (美国 BIO-RAO 公司)。

#### 1.4 缺血再灌注造模方法

假手术组与模型组大鼠按 8 mL/kg 剂量蒸馏水灌胃,加减枳实薤白桂枝汤组和枳实薤白桂枝汤组大鼠分别按 6.48、4.59 g/kg 剂量的中药免煎颗粒灌胃给药,每天 1 次,连续喂养 14 天后造模。大鼠 MIRI 模型制备:将实验大鼠消毒备皮后固定于动物操作台,用 10%乌拉坦按 5 mg/kg 腹腔注射,待大鼠完全麻醉后,气管切开并连接呼吸机,频率设置为 60 次/分,充分暴露胸腔后,假手术组开胸穿线不结扎,其余组结扎左冠状动脉前降支,30 min 后剪结扎线恢复血供,再灌注 120 min 后采血立即剪掉心脏,用蒸馏水将血液冲洗干净并用 10% 甲醛固定 24 h,石蜡包埋待检测。

#### 1.5 血清 cTnI、LDH 检测

将部分大鼠左心室采血,3500 r/min 离心 10 min,分离血清于 EP 管内,标记分组置于 -80℃ 冰箱内。采用医院全自动生化分析仪测定血清心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 和 LDH 含量。

#### 1.6 心肌组织病理形态学观察

取厚度约为 0.5 cm 的心肌组织,置于固定液 (10% 福尔马林) 中 48 h,梯度酒精、二甲苯先后脱水透明并浸入石蜡凝固包埋。45℃ 恒温箱烘干切片,经二甲苯、梯度无水乙醇脱蜡脱水,苏木精-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色,滴入树胶,载入盖玻片,封片,于光学显微镜下观察组织及细胞结构的改变。

#### 1.7 酶联免疫法检测血浆 AC、cAMP 含量

试剂盒室温放置 15 min 后,从 -80℃ 冰箱中取出血浆,13000 r/min 离心 15 min,取上清,严格按照 96 孔板说明书操作。

#### 1.8 免疫组织化学法检测心肌组织 AQP1、AQP4 表达

将石蜡切片放于烘箱中 1 h,二甲苯、无水乙醇、梯度酒精脱蜡,抗原修复液浸泡 15 min,自然冷却后磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 冲洗 3 次,每次 5 min。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育消除内源性过氧化物酶活性,PBS 冲洗。山羊血清室温封闭 30 min,湿盒一抗 AQP1、AQP4 (1 : 200) 孵育过夜。次日 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加二抗 (1 : 2000) 37℃ 孵育 30 min。联苯二胺染色,镜下观察,自来水终止反应,苏木素复染,盐酸、酒精滴加数秒后由蓝变紫,待流水返蓝后镜下观察,梯度酒精、二甲苯脱水透明,滤纸擦净切片,树胶封片。

#### 1.9 实时荧光定量 PCR 检测心肌组织 AQP1、AQP4 mRNA 表达

(1) 提取 RNA: 称量心肌组织约 80 mg,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,测定吸光度 (absorbance, A),检测 RNA 浓度,计算 A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 比值,最终检测结果所有样品 RNA 比值均在 1.7~2.0 之间。(2) 逆转录合成 cDNA: 10 μL 反应体系,加入总 RNA 5 μg,70℃ 预变性 5 min,再加入 10 μL 反应体系,一共 20 μL,反应条件: 25℃ 5 min,42℃ 60 min,70℃ 15 min。反转录后的 cDNA 储存于 -20℃,待第 2 天检测。(3) 扩增及检测: 使用 ABI 7500 检测系统,基因引物设计及合成在北京博迈德生物公司完成,序列见表 1。扩增反应体系 20 μL,PCR 反应条件: 95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环;95℃ 15 s。检测得出对应 Ct 值,通过 Ct 比较法 (2<sup>-ΔΔCt</sup>) 计算目的基因与蛋白质内参磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的转录水平。

表 1. 基因引物序列

Table 1. Gene primer sequence

基因名称	上游引物	下游引物	引物长度(bp)
AQP1	TGGCTTGTCTGTGGCTCTTG	TGTTTTGAGAAGTTGCGGGTG	111
AQP4	TCAGCATCGCTAAGTCCGTCG	TCCATGAACCGTGCTGACTC	128
GAPDH	ATGACTCTACCCACGGCAAG	TACTCAGCACCAGCATCACC	136

#### 1.10 Western blot 测定心肌组织 PKA、P-PKA、CREB、P-CREB、AQP1、AQP4 蛋白表达

从 -80℃ 冰箱内取出冰冻的心肌组织约 90 mg,加入 1 mL 裂解液,快速剪碎组织并用匀浆机充分破碎,13000 r/min 4℃ 离心 30 min,取上清,BCA 法进行蛋白定量,将蛋白加热至 95℃,煮 5 min,依据蛋

白分子量取值范围配制对应的分离胶和浓缩胶,继而按照 110 V 凝胶电泳 90 min,将蛋白转印二氟化树脂膜,60 V 转膜 120 min。用 TBST 配制 5% 脱脂奶粉,比例为 100 : 5,室温封闭 1 h,加一抗 PKA (1 : 300)、CREB (1 : 1000)、AQP1 (1 : 1000)、AQP4 (1 : 1000)、P-PKA (1 : 500)、P-CREB

(1:1000), 4℃摇床孵育过夜;次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,并加入辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1:5000),室温摇床 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min, ECL 化学发光试剂盒显影, Gel-Pro 分析各目的蛋白的灰度值,计算 A 值,并分析与内参的比值。

### 1.11 统计学方法

所有实验数据用  $\bar{x}\pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 进行统计学分析,进行正态分布和方差齐性检验,多组间比较用单因素方差分析,方差齐用 LSD 检验,不齐用 Dunnett's T3 检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清 LDH、cTnl 含量比较

与假手术组比较,模型组血清 LDH、cTnl 含量增加 ( $P<0.01$ );与模型组比较,枳实薤白桂枝汤组、加减枳实薤白桂枝汤组 LDH、cTnl 含量降低 ( $P<0.01$ );与枳实薤白桂枝汤组比较,加减枳实薤白桂枝汤组 LDH、cTnl 含量显著降低 ( $P<0.01$ )。表明加减枳实薤白桂枝汤可以有效改善心肌损伤程度

(表 2)。

表 2. 血清 LDH、cTnl 含量比较 ( $n=6$ )

Table 2. Comparisons of serum LDH and cTnl contents ( $n=6$ )

分 组	LDH(U/L)	cTnl( $\mu\text{g/L}$ )
假手术组	511.6 $\pm$ 17.3	16.1 $\pm$ 0.6
模型组	1971.2 $\pm$ 39.9 <sup>a</sup>	71.0 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
枳实薤白桂枝汤组	1010.2 $\pm$ 30.9 <sup>b</sup>	43.4 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
加减枳实薤白桂枝汤组	914.7 $\pm$ 35.0 <sup>bc</sup>	29.9 $\pm$ 0.6 <sup>bc</sup>

a 为  $P<0.01$ ,与假手术组比较;b 为  $P<0.01$ ,与模型组比较;c 为  $P<0.01$ ,与枳实薤白桂枝汤组比较。

### 2.2 HE 染色结果

在 400 倍光学显微镜下观察各组心肌组织结构和细胞的改变。假手术组心肌纤维排列整齐,细胞结构完整,未见炎性细胞;模型组肌纤维排列呈波浪状,肌丝断裂,细胞结构破坏,呈空泡状,胞体增大且有炎性细胞浸润;枳实薤白桂枝汤组、加减枳实薤白桂枝汤组较模型组有明显改善,肌纤维结构稍有紊乱不齐,红细胞减少,细胞肿胀减轻,且加减枳实薤白桂枝汤组效果优于枳实薤白桂枝汤组(图 1)。

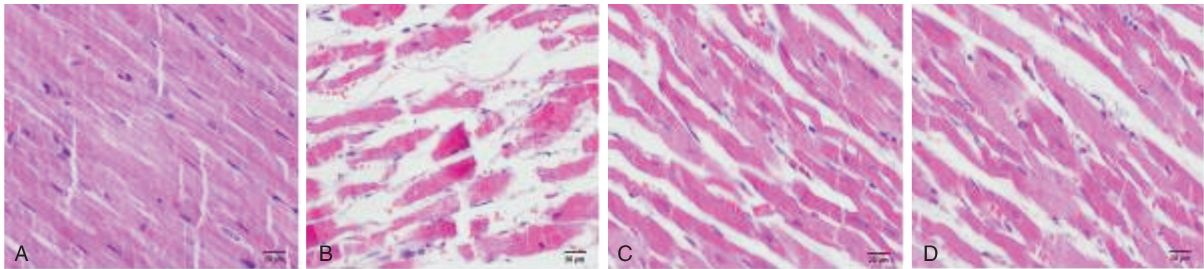


图 1. 光镜下观察各组心肌组织病理形态学改变(400 $\times$ ) A 为假手术组,B 为模型组,C 为枳实薤白桂枝汤组,D 为加减枳实薤白桂枝汤组。

Figure 1. Pathological changes of myocardial tissue under light microscope in each group(400 $\times$ )

### 2.3 血浆 AC、cAMP 含量比较

与假手术组比较,模型组血浆 AC、cAMP 含量降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,枳实薤白桂枝汤组、加减枳实薤白桂枝汤组 AC、cAMP 含量降低 ( $P<0.01$ );与枳实薤白桂枝汤组比较,加减枳实薤白桂枝汤组 AC、cAMP 含量降低 ( $P<0.01$ )(图 2)。

### 2.4 心肌组织 AQP1、AQP4 表达

每张切片随机选取 6 个视野,在 200 倍显微镜下观察,分析蛋白阳性表达结果。AQP1 分布于细胞膜,静脉壁内表达呈棕黄色颗粒状(箭头处);AQP4 分布于心肌细胞膜表面,棕黄色染色为其阳性表达。与假手术组比较,模型组 AQP1 棕黄色阳

性细胞及 AQP4 蛋白阳性表达增加;与模型组比较,枳实薤白桂枝汤组、加减枳实薤白桂枝汤组 AQP1、AQP4 阳性表达减少;与枳实薤白桂枝汤组比较,加减枳实薤白桂枝汤组 AQP1、AQP4 阳性表达明显减少(图 3、4)。

### 2.5 心肌组织 AQP1、AQP4 mRNA 表达

与假手术组比较,模型组 AQP1、AQP4 mRNA 表达均降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,枳实薤白桂枝汤组、加减枳实薤白桂枝汤组 AQP1、AQP4 mRNA 表达均降低 ( $P<0.01$ );与枳实薤白桂枝汤组比较,加减枳实薤白桂枝汤组 AQP1、AQP4 mRNA 表达下降 ( $P<0.01$ )(图 5)。

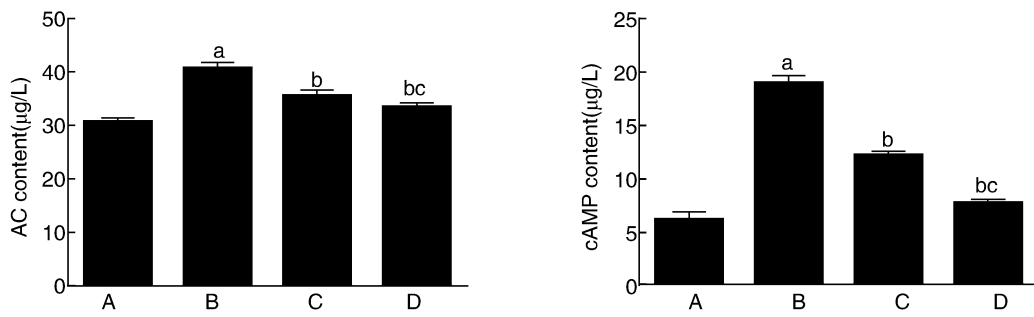


图 2. 各组大鼠血浆 AC、cAMP 含量比较 (n=6) A 为假手术组, B 为模型组, C 为枳实薤白桂枝汤组, D 为加减枳实薤白桂枝汤组。a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与枳实薤白桂枝汤组比较。

Figure 2. Comparisons of plasma AC and cAMP contents in each group (n=6)

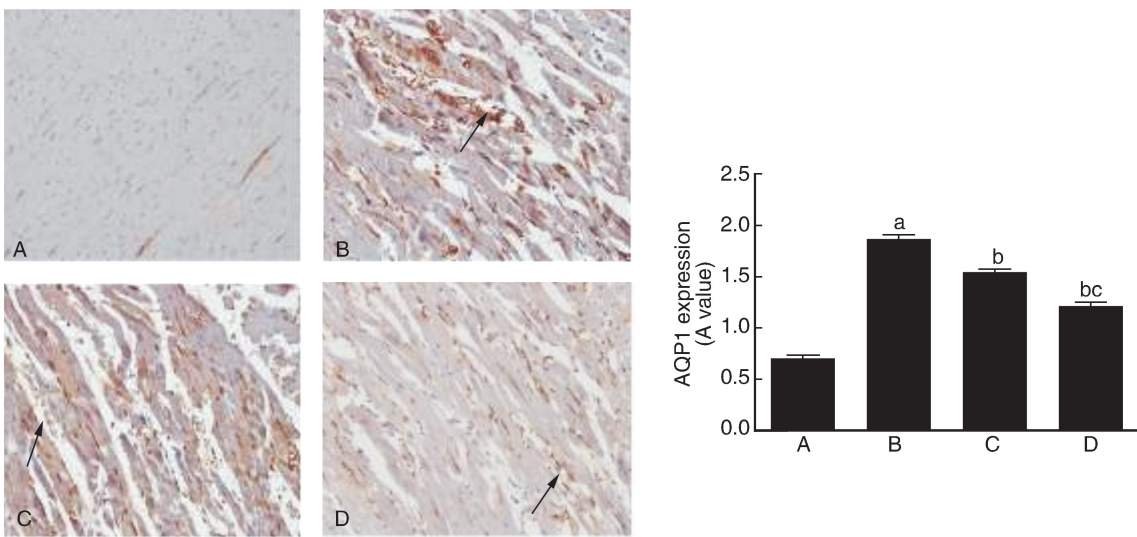


图 3. 免疫组织化学染色检测心肌组织 AQP1 表达 (200×, n=6) A 为假手术组, B 为模型组, C 为枳实薤白桂枝汤组, D 为加减枳实薤白桂枝汤组。a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与枳实薤白桂枝汤组比较。

Figure 3. AQP1 expression in myocardial tissue detected by immunohistochemical staining (200×, n=6)

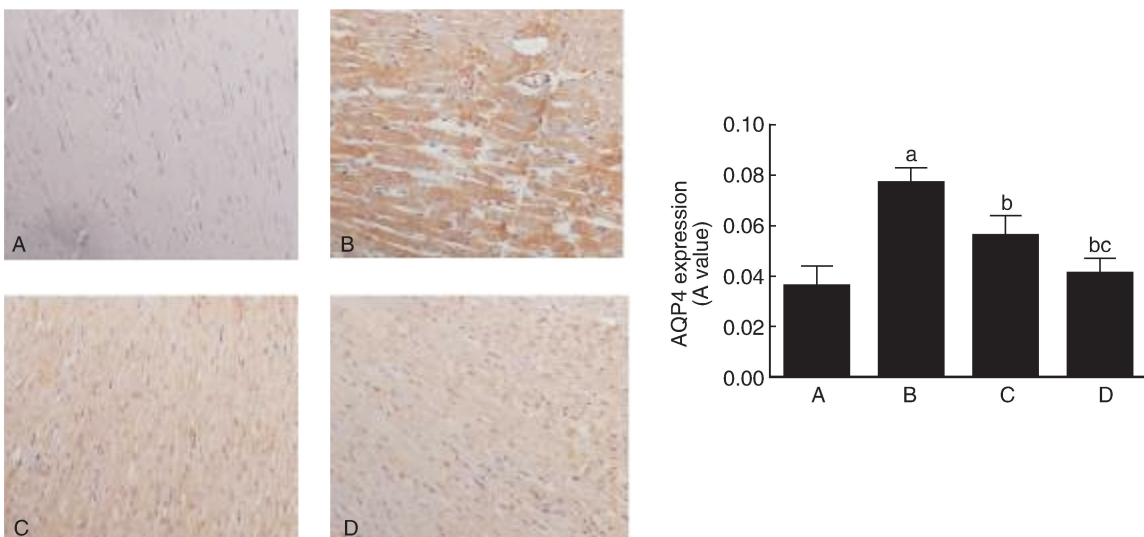


图 4. 免疫组织化学染色检测心肌组织 AQP4 表达 (200×, n=6) A 为假手术组, B 为模型组, C 为枳实薤白桂枝汤组, D 为加减枳实薤白桂枝汤组。a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与枳实薤白桂枝汤组比较。

Figure 4. AQP4 expression in myocardial tissue detected by immunohistochemical staining (200×, n=6)

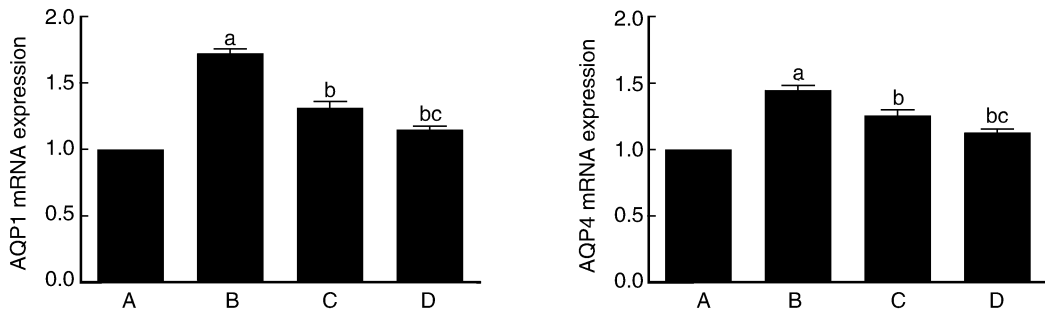


图 5. 实时荧光定量 PCR 检测心肌组织 AQP1、AQP4 mRNA 表达( $n=8$ ) A 为假手术组, B 为模型组, C 为枳实薤白桂枝汤组, D 为加减枳实薤白桂枝汤组。a 为  $P<0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P<0.01$ , 与模型组比较; c 为  $P<0.01$ , 与枳实薤白桂枝汤组比较。

Figure 5. AQP1 and AQP4 mRNA expressions in myocardial tissue detected by real-time fluorescence quantitative PCR( $n=8$ )

2.6 心肌组织 PKA、P-PKA、CREB、P-CREB、AQP1、AQP4 蛋白表达

各组总 PKA、CREB 蛋白含量差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与假手术组比较, 模型组 AQP1、AQP4、P-PKA、P-CREB 蛋白表达增加 ( $P<0.01$ ), 说明 AQP1、AQP4 的表达与 PKA 和 CREB 的磷酸化有关; 与模型

组比较, 枳实薤白桂枝汤组和加减枳实薤白桂枝汤组 P-PKA、AQP1、AQP4 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ), P-CREB 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与枳实薤白桂枝汤组比较, 加减枳实薤白桂枝汤组 P-PKA、AQP1、AQP4 蛋白表达减少 ( $P<0.01$ ), P-CREB 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ) (图 6)。

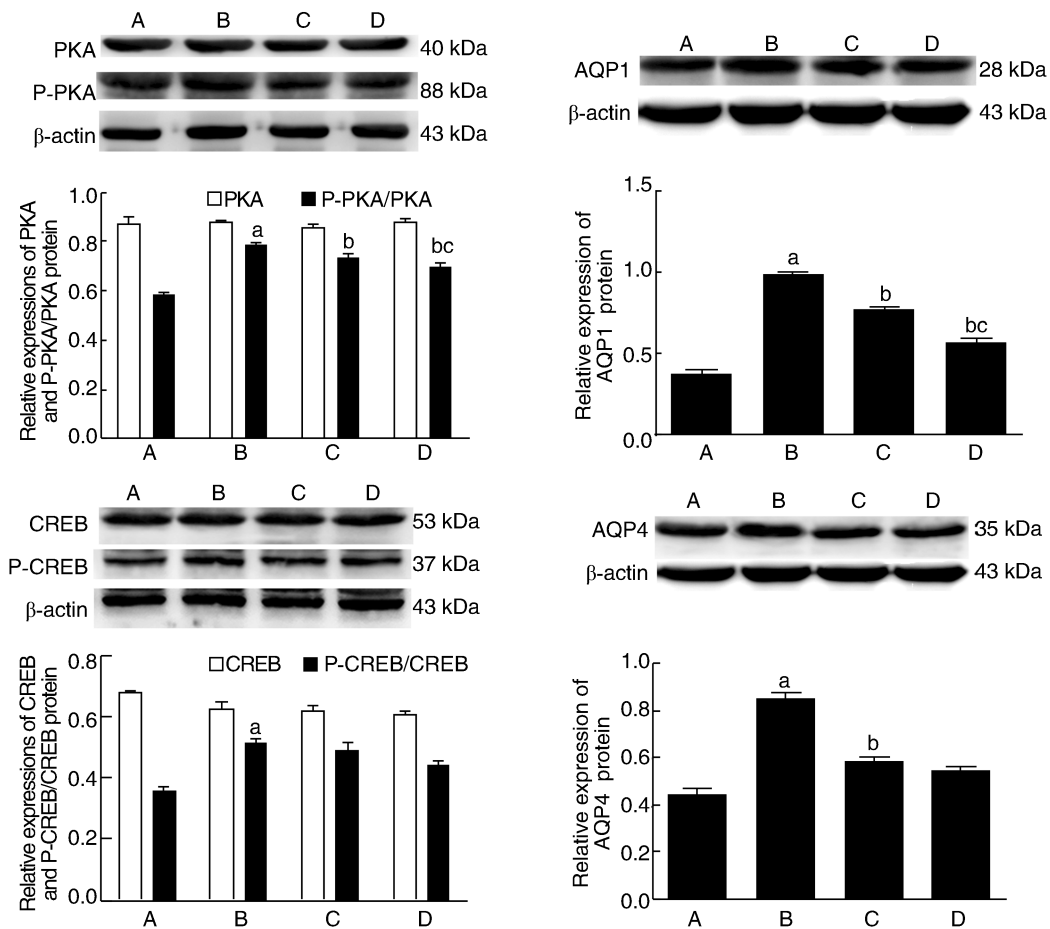


图 6. Western blot 检测心肌组织 PKA、P-PKA、CREB、P-CREB、AQP1、AQP4 蛋白表达( $n=9$ ) A 为假手术组, B 为模型组, C 为枳实薤白桂枝汤组, D 为加减枳实薤白桂枝汤组。a 为  $P<0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P<0.01$ , 与模型组比较; c 为  $P<0.01$ , 与枳实薤白桂枝汤组比较。

Figure 6. Protein expressions of PKA, P-PKA, CREB, P-CREB, AQP1 and AQP4 in myocardial tissue detected by Western blot( $n=9$ )

### 3 讨论

冠心病和心绞痛是由于冠状动脉供血不足造成心肌组织缺血缺氧而导致的心脏病,缺血再灌注损伤是其常见的临床表现;古代中医将其归属为“胸痹”、“心悸”的范畴。出自《金匱要略》的枳实薤白桂枝汤,有通阳散结、祛痰下气之功效,是主治胸阳不振、痰浊中阻、气结于胸所致胸痹之常用著名经典方。有实验研究证实,枳实薤白桂枝汤具有抗急性心肌缺血和缺氧的作用<sup>[6]</sup>。石月萍等<sup>[7]</sup>根据中医辨证分型,结合四诊信息以及临床病人胸闷、苔腻色暗的症状,总结得出除痰浊之外,血瘀、气虚也是主要的证候表现,故在枳实薤白桂枝汤的基础上加入益气生津的人参和活血通脉的三七,诸药配伍,使胸阳振、痰浊降、淤血除,在临床中治疗慢性充血性心力衰竭有很好的疗效。现代研究证实,三七的有效活性成分三七总皂苷能显著改善机体缺血表现,缩小心肌梗死范围<sup>[8]</sup>。人参的主要成分人参皂 Rg1,可以促进大鼠缺血区血管再生,进而发挥对梗死心肌的保护作用<sup>[9-10]</sup>。西医对冠心病治疗以增加冠状动脉血供和耗氧量为主,与中医补气、活血的治疗理念一致。本实验通过对枳实薤白桂枝汤的加减,进一步探讨加减方对缺血再灌注的保护作用。

水通道蛋白是广泛存在于心、肾、脑等器官的跨膜水转运蛋白,多分布于内皮细胞及上皮细胞,参与维持细胞内外水平衡及心肌、组织水代谢的多种生理和病理过程<sup>[11-12]</sup>。心脏中分布较多的为 AQP1、AQP4, AQP1 在心肌细胞中主要定位于细胞质膜及细胞器内, AQP4 主要分布于心肌细胞膜。国内外研究表明,心肌缺血再灌注过程中可以激活 AQP1、AQP4 磷脂酶<sup>[13]</sup>,对其细胞骨架支架造成损伤从而增加肌纤维膜脆性<sup>[14-15]</sup>,导致心肌细胞膜通透性增加,致使水分子通过 AQP 螺旋形孔道跨膜进入细胞内,造成心肌细胞肿胀,进一步加重心肌损伤。加减枳实薤白桂枝汤与枳实薤白桂枝汤可显著下调 AQP1 和 AQP4 的表达,有效抑制水的跨膜转运。

研究发现, AQP 的水通透性受低氧、渗透压、糖皮质激素等因素调节,而 AC/cAMP 信号转导通路介导机体水液代谢、神经递质、激素等多方面均发挥生物学效应<sup>[16]</sup>。AC/cAMP 的传导途径如下:在缺血再灌注过程中,会产生一些应激物质如去甲肾上腺素,激活细胞膜上 G 蛋白偶联受体,刺激受体结构改变并与膜外配体结合,从而作用于非活性

状态的 G 蛋白,把信号从胞外传递到胞内,激活中下游 AC 产生级联反应。AC 催化 ATP 水解生成 cAMP,使得 cAMP 浓度升高, cAMP 浓度升高后,与细胞浆内无活性的 PKA 调节亚基结合,使 PKA 活化并解离出催化亚基。活化的 PKA 直接作用于 AQP 氨基酸序列中的磷酸化位点,使 PKA 磷酸化, AQP 可直接受磷酸化作用的调节<sup>[17]</sup>。另一方面,活化的 PKA 释放的催化亚基进入细胞核内磷酸化 PKA 在核内的主要靶标蛋白 CREB<sup>[18]</sup>,催化 CREB 磷酸化位点 Ser133 调控 AQP 的转录而调节 AQP 的表达<sup>[19]</sup>。因此推测,在缺血再灌注过程中, AC/cAMP 通路被激活,使 AQP 表达增加,促进了水分子的跨膜转运,进一步加重心肌损伤。本实验的研究结果发现,加减枳实薤白桂枝汤与枳实薤白桂枝汤均可显著减轻心肌组织形态学改变及缺血再灌注后心肌细胞肿胀,通过下调 AC/cAMP 通路抑制 AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达,但对 P-CREB 的蛋白表达影响不大。由此推断,加减枳实薤白桂枝汤与枳实薤白桂枝汤减轻缺血再灌注后心肌细胞肿胀与下调 AC/cAMP 通路、抑制心肌细胞 AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达有关,而加减枳实薤白桂枝汤与枳实薤白桂枝汤对 P-CREB 的表达没有影响,分析可能有其他的蛋白分子参与 PKA 下游 P-CREB 的调节,这需要进行进一步的研究。

本实验通过与枳实薤白桂枝汤的对比,进一步证实了在枳实薤白桂枝汤的基础上,加入益气活血药人参、三七组成的加减枳实薤白桂枝汤,能够明显降低血清 LDH、cTnl 的含量,改善心肌损伤程度;通过抑制 AC/cAMP 通路的表达,导致心肌细胞 AQP1、AQP4 mRNA 及蛋白表达下调,降低细胞膜对水的通透性,发挥保护心肌的作用。而关于 PKA 下游其他蛋白分子对 P-CREB 的调节,还有待于进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial re-perfusion injury [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1 121-135.
- [2] Ogura, Imanishi S, Shibamoto T. Osmometric and water-transporting properties of guinea pig cardiac myocytes [J]. *Jpn J Physiol*, 2002, 52(4): 333-342.
- [3] Ogura H, Matsuda, Imanishi ST, et al. Sarcolemmal hydraulic conductivity of guinea-pig and rat ventricular myocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 54(3): 590-600.
- [4] Lin PT, Chen WH, Zeng H, et al. Involvement of AQP1 in the cardio-protective effect of remifentanyl post conditioning in ischemia/reperfusion rats [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015,

- 8(8): 12 736-745.
- [5] 石月萍, 马骏, 唐艺超. 温阳通脉方预处理对心肌再灌注大鼠 CK-MB、LDH 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(10): 2 245-246.
- [6] 李向钰, 温玉霞, 袁金玲. 栝蒌薤白类方治疗胸痹心痛的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(26): 5 604-606.
- [7] 石月萍, 马骏. 温阳通脉方治疗慢性充血性心力衰竭的临床疗效观察[J]. 中国药房, 2011, 22(27): 2 573-574.
- [8] 刘旭, 李明春, 徐霞, 等. 中药三七对大鼠心肌缺血保护作用的光谱学研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(8): 819-823.
- [9] 杨敏, 陈广玲, 陈畅, 等. 人参皂甙 Rg1 对大鼠急性心肌梗死的治疗作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(11): 1 075-077.
- [10] 张庆勇, 陈燕萍, 刘芬, 等. 人参皂苷 Rg1 对大鼠急性缺血性心肌血管再生的促进作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(1): 42-45.
- [11] Musa AR, Chen LM, Pelletier MF, et al. Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(13): 5 406-411.
- [12] Herrera M, Garvin JL. Novel role of AQP1 in NO-dependent vaso-relaxation [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 92(5): 1 443-451.
- [13] Nakamura H, Nemenoff RA, Gronich JH, et al. Subcellular characteristics of phospholipase A2 activity in the rat kidney: Enhanced cytosolic, mitochondrial, and microsomal phospholipase A2 enzymatic activity after renal ischemia and reperfusion[J]. J Clin Invest, 1991, 87(5): 1 810-816.
- [14] Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro: Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity [J]. Circ Res, 1985, 57(6): 864-875.
- [15] Ruiz-Meana M, García-Dorado D, González MA, et al. Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated inhibition[J]. Cardiovasc Res, 1995, 30(1): 64-69.
- [16] 张冰, 刘小青, 刘欣, 等. 基于 cAMP-PKA 信号通路的虚寒状态大鼠中枢神经递质变化机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(4): 289-294.
- [17] 安宇, 张剑钊, 李学军. 水通道蛋白的表达及其调节[J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(5): 355-359.
- [18] Jadam SR, Harootunian AT, Buechler YJ, et al. Fluorescence ratio imaging of cyclic-AMP in single cells[J]. Nature, 1991, 349(6311): 694-697.
- [19] 冷雪, 杨关林, 贾连群, 等. 脾虚痰浊证大鼠主动脉 cAMP/PKA 信号通路变化的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(9): 1 789-791.
- (此文编辑 曾学清)