

缝隙连接蛋白 43 及其 S368 位点磷酸化水平与 甲基苯丙胺诱导的心肌毒性的关系

孙晓宇, 王玉, 李竹, 夏冰, 戴佳琳, 汪家文, 万昌武, 汪元河, 黄江, 王杰

(贵州医科大学法医学院, 贵州省贵阳市 550004)

[关键词] 甲基苯丙胺; 缝隙连接蛋白 43; 缝隙连接蛋白 43 磷酸化; S368 位点; 心肌毒性

[摘要] **目的** 通过构建 SD 大鼠的甲基苯丙胺(METH)中毒模型与心肌细胞中毒模型,检测缝隙连接蛋白 43 (Cx43)及其 S368 位点磷酸化(p-Cx43)表达水平;检测吸食 METH 的人心肌组织内 Cx43 及其 S368 位点 p-Cx43 的表达情况,分析其与 METH 诱导的心肌毒性的关系,探讨 Cx43 及 S368 位点 p-Cx43 水平在 METH 诱导的心肌毒性中的作用。**方法** 建立 SD 大鼠 METH 慢性中毒动物模型和新生 SD 大鼠心肌原代 METH 中毒细胞模型;提取蛋白,采用 Western blot 检测 Cx43、p-Cx43 蛋白的表达情况;分析 Cx43 及其 S368 位点 p-Cx43 水平与 METH 诱导的心肌毒性的关系。收集贵州医科大学法医司法鉴定中心中毒化检验确认吸食 METH 的人心肌组织为实验组,无吸食任何毒品者为对照组;常规石蜡切片,HE 染色观察 2 组心肌的结构改变;免疫组织化学染色法、Western blot 检测 Cx43 及其 S368 位点 p-Cx43 的表达水平。**结果** (1)在 METH 慢性中毒动物模型中 Cx43 及 S368 位点 p-Cx43 表达较对照组明显下降($P<0.05$);(2)在 METH 中毒细胞浓度、时间梯度模型中,Cx43 及其 S368 位点 p-Cx43 表达量较对照组显著下降($P<0.05$);(3)与对照组比较,实验组人心肌细胞呈现萎缩、坏死及局灶性出血等病理改变;(4)与对照组相比,实验组人心肌组织中 Cx43 及 S368 位点 p-Cx43 表达水平降低,主要表现为心肌细胞之间闰盘处的棕黄色着色减少,部分呈现侧膜化改变;(5)实验组人心肌组织 Cx43 及 S368 位点 p-Cx43 蛋白表达较对照组下降($P<0.05$)。**结论** METH 能通过减少心肌中 Cx43 及其 S368 位点 p-Cx43 的表达,从而破坏心肌的组织结构,影响心脏的正常功能。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Relationship between connexin 43 and phosphorylation of its S368 site and methamphetamine induced myocardial toxicity

SUN Xiaoyu, WANG Yu, LI Zhu, XIA Bing, DAI Jialin, WANG Jiawen, WAN Changwu, WANG Yuanhe, HUANG Jiang, WANG Jie

(Medical College of Forensic Science, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[KEY WORDS] methamphetamine; connexin 43; phosphorylated connexin 43; S368 site; myocardial toxicity

[ABSTRACT] **Aim** By establishing methamphetamine (METH) poisoning model and myocardial cell poisoning model in SD rats, to detect the expressions of gap junction protein connexin 43 (Cx43) and its phosphorylation (p-Cx43) at S368 site. By examining the expressions of Cx43 and its S368 site p-Cx43 in human myocardial tissues after taking METH, to analyze the relationship between the expressions of Cx43, p-Cx43 and METH-induced myocardial toxicity, and to investigate the role of Cx43 and its S368 site p-Cx43 in myocardial toxicity induced by METH. **Methods** METH chronic poisoning animal model in SD rats and primary METH poisoning cell model of cardiac muscle in neonatal SD rats were established. The proteins were extracted and the expressions of Cx43 and p-Cx43 proteins were detected by Western blot. The relationship between the levels of Cx43 and its S368 site p-Cx43 and METH-induced myocardial toxicity was analyzed. The myocardial tissues of METH users confirmed by toxicity test in Forensic Judicial Appraisal Center of Guizhou

[收稿日期] 2018-10-27

[修回日期] 2018-11-29

[基金项目] 国家自然科学基金(81341130);贵州省现代法医司法鉴定工程研究中心项目(黔发改高技[2016]1345号);贵州省科技计划项目(黔科合 NY 字[2010]3090号);贵州省卫生计生委科学技术基金项目(2018XMSB00013966)

[作者简介] 孙晓宇,硕士研究生,研究方向为法医病理学、法医临床学,E-mail 为 741978259@qq.com。通信作者王杰,教授,硕士研究生导师,研究方向为法医病理学、法医临床学,E-mail 为 Wj6400@gmc.edu.cn。

Medical University were collected as experimental group and those without any drugs as control group. After routine paraffin section, HE staining was used to observe the structural changes of myocardium in two groups. Immunohistochemical staining and Western blot were used to detect the expressions of Cx43 and its S368 site p-Cx43. **Results** (1) Expressions of Cx43 and its S368 site p-Cx43 in METH chronic poisoning animal model was significantly lower than those in control group ($P < 0.05$). (2) Expressions of Cx43 and its S368 site p-Cx43 in METH poisoning cell concentration and time gradient model were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$). (3) Compared with the control group, the atrophy, necrosis and focal hemorrhage of human cardiac myocytes were observed in the experimental group. (4) Compared with the control group, the expression levels of Cx43 and S368 site p-Cx43 in human myocardium in the experimental group were lower than those in the control group, mainly expressed as the decrease of brown-yellow staining at intercalated disc between cardiac myocytes, and some of them showed lateral membrane changes. (5) Expressions of Cx43 and S368 site p-Cx43 proteins of human myocardium in experimental group were lower than those in control group ($P < 0.05$).

Conclusion METH can reduce the expressions of Cx43 and its S368 site p-Cx43 in myocardium, thus destroying the structure of myocardium and affecting the normal function of heart.

甲基苯丙胺 (methamphetamine, METH) 是苯丙胺类化学药物, 作为目前广泛滥用的一种毒品^[1], 已经引起了世界各国的广泛关注。目前很多研究证实, METH 不仅对神经系统具有严重的损伤, 对心血管系统同样具有致命的影响^[2-4]。缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 作为心肌细胞间隙连接的主要成分, 不仅在心肌细胞间的电耦联和代谢耦联过程中起着关键作用, 在维持心脏正常的电生理活动中也至关重要^[5-6]。研究表明, 心肌中 Cx43 含量和分布的改变可能导致心肌细胞间的化学及电信号传递障碍, 进而引发各种心律失常、心脏疾病等^[7-10]。同时也有文献报道, Cx43 的磷酸化状态发生改变也能够影响缝隙连接通道的开关, 从而阻碍心肌细胞间的正常电生理活动^[11]。其中 S368 作为 Cx43 磷酸化 (phosphorylated Cx43, p-Cx43) 的主要位点之一, 其磷酸化水平的改变也可能诱发心律失常等多种心脏疾病的发生^[12-13]。基于前期研究发现, 在动物实验中, 给予一定的应激压力可以增加 METH 的心脏毒性^[14]; 而我们之前的实验结果也表明, Cx43 的减少是造成应激性心肌病的主要原因之一^[6]; 那么 METH 是否能够通过减少 Cx43 的表达从而产生心脏毒性, 目前尚未明确。本研究运用蛋白免疫印迹法 (Western blot, WB) 检测动物和心肌细胞 METH 中毒模型中 Cx43 及磷酸化的表达, 并采用常规苏木精-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色、免疫组织化学染色 (immunohistochemical staining, IHC) 直接观察人体心肌结构的改变及检测心肌组织中 Cx43 及磷酸化的表达情况, 探讨 Cx43 表达水平及其 S368 位点磷酸化与 METH 诱导的心脏毒性的关系, 不仅为吸食 METH 的戒毒者揭示了一种保护心脏功能的可能性, 也为吸毒致死的法医鉴定案件提供了新的证据指标。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); 电泳仪 (北京百晶有限公司); 化学发光凝胶成像系统 (上海天能有限公司); 低温高速离心机 (德国 Sigma 公司)。METH (纯度 99.1%) 来自国家药物和生物制品控制研究所 (中国北京); 细胞培养试剂, 包括胎牛血清 (FBS), DMEM/F12 培养基和胰蛋白酶, 购自 Gibco 公司 (Carlsbad, 美国)。兔抗人 β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体 (北京 Bioss 公司); 兔抗人 Cx43 多克隆抗体、兔抗人 p-Cx43 S368 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司); PV-6000 兔超敏二步法免疫组织化学检测试剂 (中国中杉金桥公司); 羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (北京鼎国昌盛公司)。

1.2 动物和组织处理

购买 SPF 级健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (150 ~ 180 g, 4 ~ 6 周龄) 和新生 SD 大鼠 (1 天龄), 实验动物护理和程序均通过动物护理和使用委员会批准。所有成年 SD 大鼠被单独饲养在塑料鼠笼中, 不限水和鼠食并保持昼夜循环交替, 适应环境 1 周, 室温控制在 18 ~ 26 °C。

依据文献中已有的建模方法^[15], 将成年 SD 大鼠随机分成 2 组, 每组 6 只。实验组给予大鼠 METH 药液腹腔注射 14 天: 第 1 天, 1 mg/kg 注射 1 次; 第 2 ~ 3 天, 1 mg/kg 注射 2 次, 间隔 6 h; 第 4 天, 1 mg/kg 注射 4 次, 每次间隔 2 h; 第 5 ~ 6 天, 1.5 mg/kg 注射 4 次; 第 7 ~ 8 天, 2.0 mg/kg 注射 4 次; 第 9 ~ 14 天, 按每天增加 0.5 mg/kg 剂量梯度分别注射 4 次; 每天第 1 次注射时间为早上 8 点。对照组给予与实验组相同剂量和次数的生理盐水腹腔

注射 14 天。在注射结束 24 h 后,立即处死大鼠,摘取心脏保存在 -80°C 冰箱供 WB 实验。

1.3 细胞培养

根据文献造模方法^[16],选择 1 日龄新生 SD 大鼠制备心肌细胞。将乳鼠的心脏取出并撕裂,加入含 0.25% 胰蛋白酶的乙二胺四乙酸, 4°C 过夜 14 h 消化心肌。弃胰酶,加入含 10% 胎牛血清与双抗的 DMEM/F12 完全培养基, 37°C 水浴以终止消化。再加入含 0.1% 胶原酶 II 与 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)消化液,于 37°C 水浴中消化 3 次后得到细胞悬液,室温下 $1\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min,沉降细胞。弃上清液,用上述完全培养基将细胞沉淀重悬均匀,在含有 5% CO_2 的潮湿空气中 37°C 孵育 100 min。吸取上清液,离心使细胞沉降。后加入含有 0.1 mmol/L 5-溴-2-脱氧尿苷的完全培养基将细胞沉淀重悬均匀,铺在 6 孔板中,在含有 5% CO_2 的潮湿空气中 37°C 孵育 24 h 后,更换培养基,继续培养至细胞状态稳定。最后将心肌细胞暴露于 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mmol/L METH 24 h,以及 1.2 mmol/L METH 0、6、12、24、36、48 h。处理结束后提取蛋白。

1.4 实验对象

根据中华人民共和国卫生部颁布的《解剖尸体规则》并获得贵州医科大学伦理委员会认可(批件号:2018-60-01),收集贵州医科大学法医司法鉴定中心 2014 年 5 月至 2017 年 12 月经尸体解剖检验提取的心脏组织样本,主要为左心室肌。实验组纳入标准:(1)死亡 2 日非冰冻或冰冻保存 5 日以内解剖的尸体;(2)毒物分析检测尸体尿液或血液中含有 METH,不含其他毒品、毒物成分。实验组排除标准:(1)组织自溶、结构不清的病例;(2)具有其他致死性疾病的病例。对照组纳入标准:(1)死亡 2 日非冰冻或冰冻保存 5 日以内解剖的尸体;(2)病理学检验确证无其他致死性损伤及疾病的病例;(3)死亡原因主要为高坠、机械性窒息的病例。对照组排除标准同实验组。

按上述标准收集实验组及对照组心脏组织样本各 10 例,采用 4% 中性甲醛液浸泡固定,用于 HE 及 IHC 染色;部分组织冰冻保存于 -80°C 供 WB 实验。

1.5 人心肌组织形态观察及 Cx43、p-Cx43 蛋白表达检测

将 4% 中性甲醛液固定的心肌组织,石蜡包埋 $4\ \mu\text{m}$ 切片,HE 染色后于光镜下观察其结构变化,并

采集图像。人体心肌组织 Cx43、p-Cx43 蛋白表达采用 IHC 染色 PV 两步法检测。石蜡包埋组织 $4\ \mu\text{m}$ 切片,脱蜡,水化后 3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶,高压热修复抗原 3 min,分别以 Cx43(1:1 000)、p-Cx43(1:50)为第一抗体,PBS 为阴性对照, 4°C 孵育过夜。抗兔 IgG-辣根过氧化物酶为第二抗体,室温孵育 40 min 后联苯二胺显色 2 min,苏木精复染 30 s,于流水下冲洗 15 min 充分返蓝,中性树脂胶封片。于光镜下观察 Cx43 及 p-Cx43 阳性表达分布,在 $40\times$ 物镜下选取 5 个视野拍照,测定平均光密度值(阳性表达光密度值/测量总面积)以反应蛋白表达水平。

1.6 心肌组织 Cx43、p-Cx43 蛋白表达测定

用 WB 法检测人、动物心肌组织及心肌原代细胞中 Cx43、p-Cx43 蛋白的表达。将冰冻保存的人心肌组织和经 METH 处理过后的 SD 大鼠的心肌组织和原代心肌细胞充分裂解,离心取上清,加入十二烷基硫酸钠上样缓冲液,于 100°C 水浴加热,得到组织及细胞蛋白。以 β -actin 为内参,通过 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)恒压电泳分离蛋白质样品,恒流转移蛋白质到聚偏氟乙烯膜。使用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 2~3 h 后,在 4°C 冰箱摇床上过夜孵育一抗: β -actin(1:2 000)、Cx43 抗体(1:8 000)和 p-Cx43(1:500)。充分漂洗后,与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:10 000)二抗在室温下反应 1 h,经过化学发光检测试剂对聚偏氟乙烯膜显色并进行曝光成像、图像采集。采用 Image J 分析软件扫描内参及目的条带的灰度值并分析,每种蛋白质的 WB 实验均重复 3 次。

1.7 统计学分析

本实验所得数据为至少 3 次独立重复的结果,正态计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行方差齐性检验,方差齐性采用 LSD 法,方差不齐用 Games-Howell 法,多组间均数比较采用 ANOVA 检验,两组间均数比较采用 t 检验;计数资料组间比较采用卡方检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,均用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 METH 对鼠心肌组织 Cx43 及 S368 位点磷酸化表达水平的影响

WB 结果显示:与对照组相比,动物模型中实验组 Cx43、p-Cx43 蛋白的表达量下降,差异具有统计学意义($P<0.05$;图 1)。

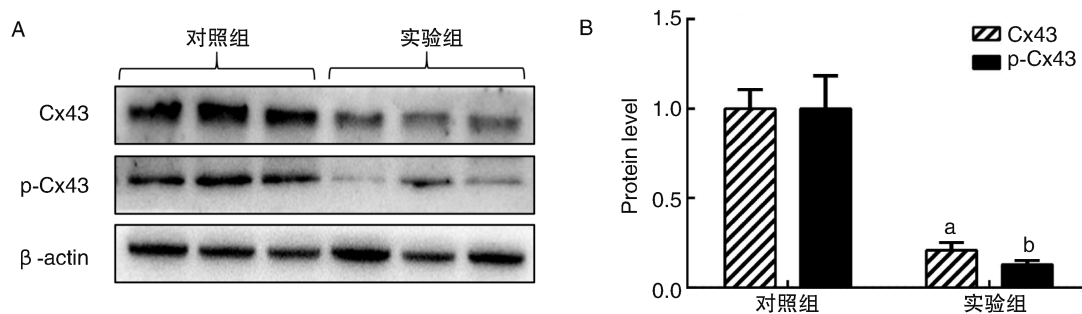


图 1. METH 动物模型心肌组织 Cx43、p-Cx43 表达 A 为目的及内参蛋白条带;B 为条带灰度值。a 为 $P < 0.05$, 与对照组 Cx43 相比; b 为 $P < 0.05$, 与对照组 p-Cx43 相比。

Figure 1. Expressions of Cx43 and p-Cx43 in myocardial tissue of METH animal model

2.2 METH 对心肌原代细胞 Cx43 及其 S368 位点磷酸化表达水平的影响

WB 结果表明, 在 METH 浓度梯度和时间梯度处理的心肌原代细胞中, Cx43、p-Cx43 蛋白的表达量下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 2)。

2.3 病例基本情况

比较两组间基线资料, 组间性别差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 年龄、心脏重量差异具有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 1)。

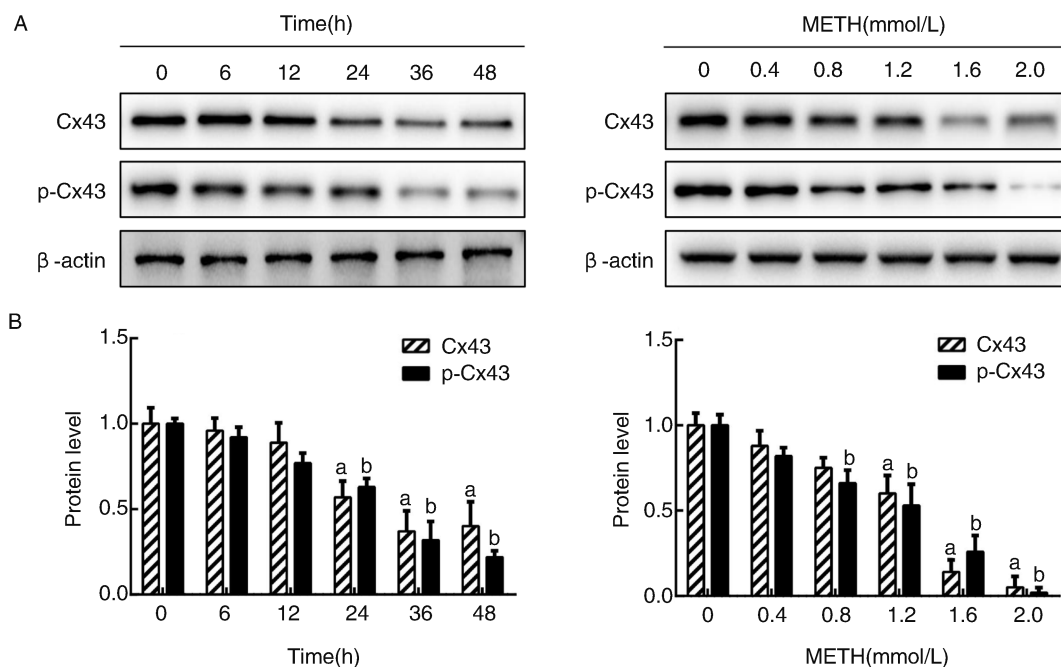


图 2. METH 细胞模型心肌细胞 Cx43、p-Cx43 表达 A 为目的及内参蛋白条带;B 为条带灰度值。a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组(左图)或 0 mmol/L METH 组(右图)Cx43 相比; b 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组(左图)或 0 mmol/L METH 组(右图)p-Cx43 相比。

Figure 2. Expressions of Cx43 and p-Cx43 in myocardial cells of METH cell model

表 1. 2 组基线资料比较

Table 1. Comparison of baseline data between two groups

分组	男/女(例)	年龄(岁)	心脏重量(g)
对照组	5/5	33.90±3.18	273.45±10.39
实验组	3/7	27.60±3.44 ^a	298.73±14.29 ^a
χ^2 或 t 值	0.83	6.49	-6.41

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。

2.4 人心肌病理变化

HE 切片光镜下观察, 对照组见心肌细胞横纹结构清晰, 核呈椭圆形, 染色均匀, 心肌纤维形态规则, 心肌间质间未见炎性细胞浸润、出血以及收缩带坏死等病理改变。实验组可见心肌部分散在横纹消失, 心肌细胞呈灶性嗜酸性染色增强, 部分细胞核大深染, 结构不清楚, 心肌纤维萎缩, 心肌间

质间见不同程度的脂肪组织浸润;部分心室内可见局灶性心肌纤维断裂,呈波浪样改变,收缩带出

现坏死;部分心肌细胞间可见局灶性出血和散在的单核细胞、淋巴细胞浸润等炎性反应(图3)。

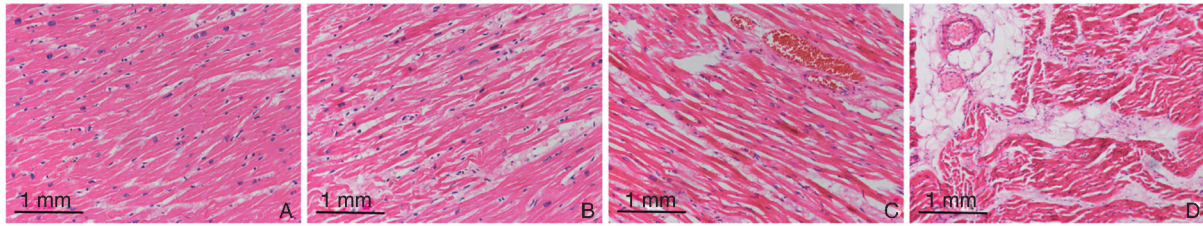


图3. 人心肌镜下病理变化(HE染色) A为对照组;B、C、D为实验组,见心肌细胞嗜酸性染色增强,心肌纤维断裂,心肌萎缩,心肌脂肪浸润。

Figure 3. Microscopic change in human myocardial tissue (HE staining)

2.5 人心肌组织 Cx43 及其 S368 位点磷酸化水平

免疫组织化学染色显示,对照组见人心肌组织中 Cx43 蛋白成簇分布于心肌细胞之间的闰盘处,即两心肌细胞的端-端连接处,阳性表达呈线条状棕黄色着色;实验组人心肌 Cx43 表达明显减弱,阳性染色呈点片状分布,部分心肌可见大片缺染及淡染的情况;2组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$;图4)。

对照组心肌中 p-Cx43 阳性反应较 Cx43 总蛋白表达减弱,主要在心肌细胞闰盘处有棕黄色着色;而实验组心肌中 p-Cx43 水平显著降低,阳性表达呈不规则散在分布于心肌细胞沿长轴方向细胞膜的两侧,呈现从闰盘至侧膜化的改变,部分棕黄色染色呈点状弥散于细胞浆内;2组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$;图4)。

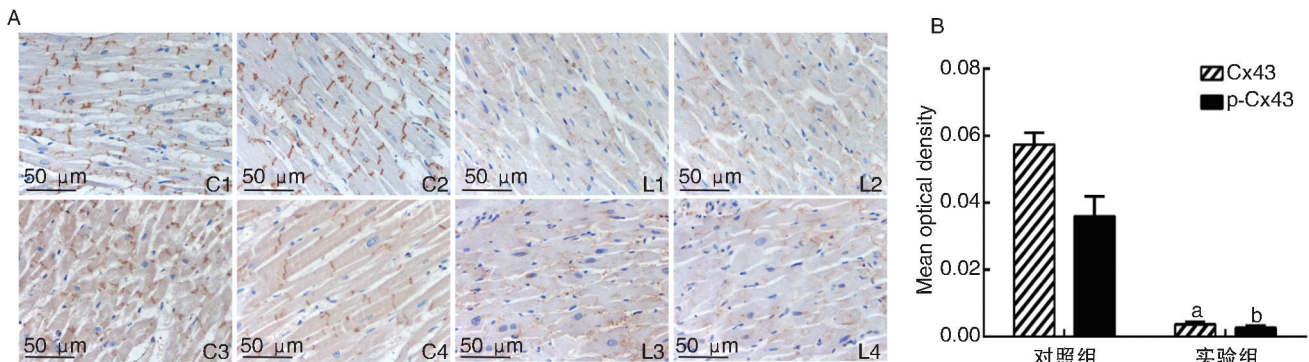


图4. 人心肌组织 Cx43 和 p-Cx43 蛋白表达水平(免疫组织化学染色) A为免疫组织化学染色图;其中 C1、C2 为对照组 Cx43, L1、L2 为实验组 Cx43, C3、C4 为对照组 p-Cx43, L3、L4 为实验组 p-Cx43。B 为 Cx43 及 p-Cx43 蛋白平均光密度值;a 为 $P < 0.05$,与对照组 Cx43 相比;b 为 $P < 0.05$,与对照组 p-Cx43 相比。

Figure 4. Expressions of Cx43 and p-Cx43 proteins in human myocardial tissue (IHC staining)

2.6 人心肌组织 Cx43 蛋白及其 S368 位点磷酸化表达

WB 结果表明,与对照组相比,实验组的人心肌组织中 Cx43 及 p-Cx43 蛋白表达量显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$;图5)。

3 讨论

甲基苯丙胺,俗称“冰毒”,是目前广泛滥用的

毒品之一^[1];根据联合国毒品和犯罪问题办公室发布的 2017 年世界毒品报告,全球吸毒者数量和吸毒者患病率正逐年升高^[17]。METH 具有极强的致幻作用,不仅对神经系统损伤严重,对心血管系统的破坏也逐渐受到关注^[2-3]。一项针对 100 例人体 METH 中毒相关死亡病例的研究发现,68% 的案例具有心血管病理改变,最常见的组织病理学特征是心肌细胞肥大、局灶性变性、坏死及不同程度动脉粥样硬化^[4]。

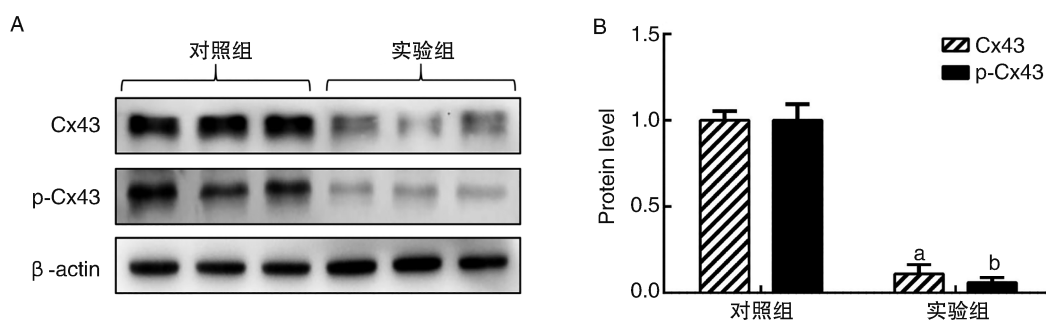


图 5. 人心肌组织 Cx43 及 p-Cx43 蛋白表达 A 为目的及内参蛋白条带;B 为条带灰度值。a 为 $P < 0.05$, 与对照组 Cx43 相比; b 为 $P < 0.05$, 与对照组 p-Cx43 相比。

Figure 5. Expressions of Cx43 and p-Cx43 proteins in human myocardial tissue

Cx43 在哺乳动物心室肌中含量最为丰富^[18], 其作为心肌细胞缝隙连接的蛋白, 在维持心肌正常节律性的收缩和保证心室肌细胞正常电生理活动方面起到了关键性作用^[19]。研究表明, Cx43 基因突变与先天性心脏发育不良密切相关^[20]。在自发性高血压大鼠模型中发现 Cx43 及磷酸化表达水平较对照组降低^[21]。发生心肌梗死的患者中也检测到 Cx43 含量显著减少^[22]。说明 Cx43 蛋白表达的降低可能与诸多心脏疾病的发生有关。而 Cx43 属于磷蛋白, 在细胞的生命周期中发生着不同的磷酸化。大量研究证实, 心律失常、心血管疾病的发生与 Cx43 的表达、分布以及磷酸化状态异常有关^[12-13, 23]。S368 作为 Cx43 蛋白主要的磷酸化位点之一, 可以调节心室肌细胞缝隙连接通道的开闭状态, 进而影响心肌细胞间的信号耦联。早期研究表明, 心肌缺血损伤与 Cx43 的 S368 位点磷酸化减少有关^[12-13]。Cx43 S368 位点的磷酸化改变可能导致心律失常的发生^[13]。以上这些研究均提示了心肌收缩不良、心律失常、高血压等原因均能引起心肌内 Cx43 的含量、分布及磷酸化状态发生改变。

我们观察了人体心肌在 METH 暴露下的结构改变, 发现心肌组织出现细胞肥大、嗜酸性染色加深、局灶性出血、坏死以及心肌间质动脉硬化等病理学现象, 这表明长期暴露在 METH 下, 心肌的结构、功能将会遭到严重的破坏。本实验成功构建了 METH 慢性中毒动物及细胞模型, 并检测了小鼠心肌组织及细胞中 Cx43 及其 S368 位点磷酸化的表达情况, 其含量明显下降, 提示 METH 降低了心肌中 Cx43 的表达, 引起心脏功能障碍, 从而造成一系列心血管疾病的发生, 甚至心源性猝死。

基于诸多实验局限于动物、细胞模型方面^[6, 13, 24], 我们直接检测了人体心肌组织中 Cx43 的

表达, 结果显示吸食 METH 的人心肌组织中 Cx43 含量显著减少, 主要表现在心肌细胞闰盘侧有少量棕黄色, 呈不规则分布; 这与我们的动物及细胞实验结果吻合。而 S368 位点磷酸化的表达也显著下降, 与 Cx43 的表达情况一致。研究也证实, 心肌细胞在缺血、缺氧或药物作用等条件下, Cx43 将出现从心肌闰盘转移至细胞侧膜的现象, 而机制之一则是其位点的磷酸化^[25]。本实验中 S368 位点磷酸化后, 阳性反应也呈现侧膜化的趋势。这说明 METH 能引起 Cx43 磷酸化状态改变, 减少其磷酸化表达而影响 Cx43 蛋白的结构、功能, 导致心脏正常的功能活动发生变化。

综上所述, METH 能通过减少心肌中 Cx43 及其 S368 位点磷酸化的表达, 从而破坏心肌的组织结构, 影响心脏的正常功能。本研究主要探讨了 METH 诱导心脏毒性的可能原因, 对其具体的毒性作用机制还有待我们以后进一步深入研究探讨。

[参考文献]

- [1] Courtney KE, Ray LA. Methamphetamine: An update on epidemiology, pharmacology, clinical phenomenology, and treatment literature[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2014, 143(1): 11-21.
- [2] Qiao D, Xu J, Le C, et al. Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) mediates methamphetamine-induced dopaminergic neuron apoptosis[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 230(3): 444-453.
- [3] Giv MJ. Exposure to amphetamines leads to development of amphetamine type stimulants associated cardiomyopathy (ATSAC)[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2017, 17(1): 13-24.
- [4] Akhgari M, Mobaraki H, Etemadi-Aleagha A. Histopathological study of cardiac lesions in methamphetamine poisoning-related deaths[J]. *Daru*, 2017, 25(1): 5.
- [5] 王杰, 戴佳琳, 胡旭初, 等. 人类 Cx43 基因的生物信

- 息学分析及其法医学研究意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(3): 667-669.
- [6] 夏冰, 刘奇, 徐东宝, 等. 应激对小鼠心肌Cx43表达及磷酸化水平影响[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(12): 1626-1629.
- [7] 程灵犀, 罗斌, 林俊莲, 等. 连接蛋白43与心性猝死的相关性研究进展[J]. 中国法医学杂志, 2009, 24(3): 179-181.
- [8] Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2): 228-232.
- [9] Kirchhoff S, Kim JS, Hagendorff A, et al. Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin 40 and connexin 43 double-deficient mice[J]. *Circ Res*, 2000, 87(5): 399-405.
- [10] Bybee KA, Prasad A, Barsness GW, et al. Clinical characteristics and thrombolysis in myocardial infarction frame counts in women with transient left ventricular apical ballooning syndrome[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 94(3): 343-346.
- [11] 王光宇, 祝俊英, 张庆勇. 缝隙连接蛋白43在心血管疾病中的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(1): 6-9.
- [12] Ekvitorin JF, King TJ, Heyman NS, et al. Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation[J]. *Circ Res*, 2006, 98(12): 1498-1505.
- [13] 龚一萍, 程臻, 陈盈. 复脉汤预处理对心肌缺血诱导心律失常大鼠心肌细胞蛋白激酶C与Cx43磷酸化信号通路的影响[J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(4): 15-18.
- [14] Tomita M, Okuyama T, Katsuyama H, et al. Cardiotoxicity of methamphetamine under stress conditions: comparison of single dose and long-term use[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(6): 1786-1790.
- [15] Chen R, Wang B, Chen L, et al. DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) mediates methamphetamine-induced autophagy and apoptosis through mTOR signaling pathway in cardiomyocytes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 295: 1-11.
- [16] Li X, He X, Wang H, et al. Loss of long non-coding RNA ROCR facilitates endogenous cardiac regeneration[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(12): 1642-1655.
- [17] Niaz K, Pietchman T, Davis P, et al. World Drug Report 2017[M]. the United States; United Nations, 2017: 10-14.
- [18] Dhein S. Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1998, 19(6): 229-241.
- [19] Sáez JC, Berthoud VM, Brañes MC, et al. Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1359.
- [20] Salameh A, Haunschild J, Bräuchle P, et al. On the role of the gap junction protein Cx43 (GJA1) in human cardiac malformations with fallot-pathology: A study on paediatric cardiac specimen[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95344.
- [21] Benova T, Vicenczova C, Radosinska J, et al. Melatonin attenuates hypertension-related proarrhythmic myocardial maladaptation of connexin-43 and propensity of the heart to lethal arrhythmias[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013, 91(8): 633-639.
- [22] Greener ID, Sasano T, Wan X, et al. Connexin 43 gene transfer reduces ventricular tachycardia susceptibility after myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(12): 1103-1110.
- [23] Delmar M, Makita N. Cardiac connexins, mutations and arrhythmias[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2012, 27(3): 236-241.
- [24] 徐东宝, 王杰, 于燕妮, 等. 联合应激法建立单纯心理应激动物实验模型的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2016, 40(8): 227-229.
- [25] Nassal MM, Werdich AA, Wan X, et al. Phosphorylation at connexin43 serine-368 is necessary for myocardial conduction during metabolic stress[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2016, 27(1): 110-119.

(此文编辑 曾学清)