

高血压与心脏病

DOI: 10.11699/cyxb20131210

环磷酸鸟苷/蛋白激酶 G 信号通路的激活与再灌注损伤
挽救激酶信号通路的关系

潘国焰, 林 荣, 吴 兵, 洪美满, 陈乘波, 黄雪娥

(福建医科大学附属泉州市第一医院心内科, 福建 362000)

【摘要】目的:观察脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)激活环磷酸鸟苷/蛋白激酶 G(cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G, cGMP/PKG)信号通路的心肌保护作用是否与细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)、磷酸酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)蛋白激酶的激活有关。**方法:**将 84 只新西兰兔随机分为 7 组($n=12$):假手术组;对照组;BNP 组;BNP+LY294002 组(LY294002 为 PI3K 抑制剂);LY294002 组;BNP+PD98059 组(PD98059 为 ERK1/2 抑制剂);PD98059 组。除了假手术组只开胸不结扎冠状动脉外,其余 6 组均于结扎左回旋支 45 min 后恢复左回旋支血流,进行再灌注 180 min。全程观察血流动力学及心电变化;实验终末,各组随机抽取 6 只兔子心脏做左室梗死面积测定,采用伊文思蓝和氯化三苯基四氮唑双染色法测定心肌梗死面积;每组另外 6 只兔子心脏取梗死边缘区组织,Western blot 方法测定 P-Akt/Akt、P-ERK1/2/ERK1/2 的表达。**结果:**心率(heart rate, HR)和平均动脉压(mean arterial blood pressure, MABP)在基线水平上无明显差异($P>0.05$)。与基线水平相比,HR 和 MABP 在缺血以及再灌注时期有明显下降($P<0.05$),而在再灌注时期维持较稳定的水平。各组之间 HR、MABP 差异无统计学意义($P>0.05$);与对照组相比,BNP 组心律失常发生率明显减少($P<0.003\ 125$)。与 BNP 组比较,BNP+LY294002 组、LY294002 组、BNP+PD98059 组及 PD98059 组心律失常明显增加($P<0.003\ 125$),BNP+LY294002 组和 LY294002 组、BNP+PD98059 组和 PD98059 组差异无统计学意义($P>0.003\ 125$);假手术组无心肌梗死。与对照组比较,BNP 组心肌梗死范围明显减少($P<0.05$)。与 BNP 组比较,BNP+LY294002 组、LY294002 组、BNP+PD98059 组及 PD98059 组梗死面积明显增加($P<0.05$)。BNP+LY294002 组和 LY294002 组、BNP+PD98059 组和 PD98059 组差异无统计学意义($P>0.05$);与对照组比较,BNP 组 Akt、ERK1/2 的磷酸化水平明显增加($P<0.05$)。与 BNP 组相比,BNP+LY294002 组 Akt 的磷酸化水平及 BNP+PD98059 组 ERK1/2 的磷酸化水平分别明显降低($P<0.05$)。BNP+LY294002 组和 LY294002 组 Akt 的磷酸化水平、BNP+PD98059 组和 PD98059 组 ERK1/2 的磷酸化水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**BNP 激活 cGMP/PKG 信号通路,对心肌缺血再灌注损伤产生保护作用,且该通路的激活与再灌注损伤挽救激酶信号通路的激活有关。

【关键词】心肌缺血再灌注损伤;环磷酸鸟苷/蛋白激酶 G 信号通路;再灌注损伤挽救激酶信号通路;磷酸酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B;细胞外调节蛋白激酶 1/2

【中国图书分类法分类号】R541.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-14

Relationship between activation of cyclic guanosine monophosphate/protein
kinase G signaling pathway and reperfusion injury salvage kinase
signaling pathway

PAN Guoyan, LIN Rong, WU Bing, HONG Meiman, CHEN Chengbo, HUANG Xue

(Department of Cardiology, Affiliated the First Hospital in Quanzhou, Fujian Medical University)

【Abstract】Objective: To observe whether myocardial protective effect of brain natriuretic peptide (BNP) which activate cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G (cGMP/PKG) signaling pathway is associated with the activation of extracellular regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) and phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) protein kinase. **Methods:** Totally 84 New Zealand white rabbits were randomly divided into seven groups ($n=12$): sham group, control group, BNP group, BNP + LY294002 group (LY294002 is PI3K inhibitor), LY294002 group, BNP + PD98059 group (PD98059 is ERK1/2 inhibitor) and PD98059 group. Occlusion of the left circumflex artery for 45 min followed by 180 min reperfusion was performed on rabbits in all groups except those in sham group. Rabbits in sham group were underwent open thoracotomy without ligating the left circumflex artery. Hemodynamic, electrocardiograph monitor were obtained. At the end of experiment, 6 rabbit hearts were stained by Evan's blue/triphenyltetrazolium chloride methods to test the area of infarction. Expressions of P-Akt/Akt and P-ERK1/2/ERK1/2 proteins in the rest hearts were analyzed by Western

作者介绍:潘国焰, Email: pgy519041@126.com,

研究方向:心肌缺血再灌注损伤基础与临床研究。

通信作者:林 荣, Email: qzlinrong@163.com。

基金项目:泉州市科技计划基金资助项目(编号:2011Z56)。

blot assay. **Results:** There was no significant difference in heart rate (HR) and mean arterial blood pressure (MABP) at baseline among seven groups ($P>0.05$). Compared with the baseline, HR and MABP were significantly decreased during ischemia and

reperfusion(I/R) period($P<0.05$),HR and MABP remained relatively stable during the reperfusion period. There was no significant difference in the HR and MABP among seven groups during I/R period($P>0.05$). Rate of arrhythmia was significantly reduced in BNP group than in control group($P<0.003\ 125$). Rate of arrhythmia was significantly increased in BNP + LY294002 group,LY294002 group, BNP + PD98059 group and PD98059 group than in BNP group($P<0.003\ 125$). Differences in arrhythmia between BNP + LY294002 group and LY294002 group as well as BNP + PD98059 group and PD98059 group were not statistically significant($P>0.003\ 125$). Myocardial infarction did not occur in sham group. Myocardial infarction size was significantly smaller in BNP group than in control group($P<0.05$). Myocardial infarction size was significantly increased in BNP + LY294002 group,LY294002 group, BNP + PD98059 group and PD98059 group than in BNP group($P<0.05$). Differences in myocardial infarction size between BNP + LY294002 group and LY294002 group as well as BNP + PD98059 group and PD98059 group were not statistically significant($P>0.05$). Level of Akt and ERK1/2 phosphorylation was increased significantly in BNP group than in control group($P<0.05$). Level of Akt phosphorylation in BNP + LY294002 group and level of ERK1/2 phosphorylation were significantly lower in BNP + PD98059 group than in BNP group($P<0.05$). Difference in Akt phosphorylation between BNP + LY294002 group and LY294002 group was not statistically significant($P>0.05$). There was also no difference in ERK1/2 phosphorylation between BNP + PD98059 group and PD98059 group($P>0.05$). **Conclusions**: Activation of cGMP/PKG signaling pathway by BNP exerts protective effect on myocardial I/R injury, which is associated with activation of reperfusion injury salvage kinase signaling pathway.

【Key words】myocardial ischemia-reperfusion injury;cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G signaling pathway;reperfusion injury salvage kinase signaling pathway;phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B;extracellular regulated protein kinase1/2

心肌缺血再灌注损伤是临床上常见的病理改变,是指缺血的心肌组织在恢复血流后,不但功能没有恢复,反而使结构损伤和功能障碍进一步加剧现象,常发生于心肌梗死血管再通后、冠脉痉挛解除后、心脏移植、心肺手术体外循环,以及心肺复苏之后^[1]。如何减轻再灌注损伤,就成为冠心病尤其是急性心肌梗死治疗亟待解决的问题之一。近年来研究发现,环磷酸鸟苷/蛋白激酶 G(cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G,cGMP/PKG)信号通路在心肌缺血再灌注损伤中发挥着重要的保护作用,但其作用机制尚未彻底阐明^[2]。不仅如此,再灌注损伤挽救激酶(reperfusion injury salvage kinase,RISK)信号通路包括磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B,PI3K/PKB)和细胞外信号蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinase1/2,ERK1/2)也具有强大的心肌保护作用^[3-5],PKB 又称 Akt。本研究建立在体兔子缺血再灌注模型,在缺血再灌注时应用钠肽受体 A 激动剂脑钠肽(brain natriuretic peptide,BNP)激活 cGMP/PKG 信号通路,并给予 ERK1/2、PI3K 蛋白激酶的抑制剂,观察激活 cGMP/PKG 信号通路的心肌保护作用是否与 ERK1/2、PI3K/Akt 的激活有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

84 只健康新西兰成年雄性大耳白兔体质量 2.5~3.0 kg,由福建泉州医学高等专科学校实验动物中心提供,BNP(西藏药业公司),氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium

chloride,TTC)染色剂、Evans Blue(上海圆创生物科技有限公司),LY294002、PD98059(美国 sigma 公司),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白检测试剂盒(厦门鹭隆生物科技发展有限公司),P-Akt、Akt、P-ERK1/2、ERK1/2 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 在体兔心肌缺血再灌注模型制备

参照文献[6]报道制作模型:兔子称体质量,20%乌拉坦溶液按 4 ml/kg 经耳缘静脉缓慢注射麻醉,待麻醉完全后将兔子仰卧位固定在手术台上,连接多导电生理记录仪,经右上肢、右下肢、左下肢插入针型电极,全程记录标准 II 导联心电图。常规消毒、铺巾。气管切开,连接呼吸机控制通气,潮气量 2 ml,呼吸频率 40~50 次/min,呼吸比为 2:1,压力为 5~15 cmH₂O 之间。左颈总动脉插入 24 号套管针连接压力换能器,持续监测平均动脉压。右侧耳缘静脉置管作为药物输液通道。胸骨正中纵形切口,分离各层肌肉,暴露第 3、4、5 肋间,血管钳夹断 4、5 肋骨后撑开胸廓,放置眼科撑开器,暴露心脏,剪破心包,在左心耳与心尖中下 1/3 左回旋支下方穿过 5-0 线,将一小段聚乙烯管(直径 1.5 mm)置于结扎线下,收紧结扎线以阻断左回旋支血流,阻断 45 min 后,松开结扎线,使冠状动脉再灌注 180 min。手术过程中注意保护切口,持续机械通气至再灌注结束。记录血流动力学和心电图。模型成功的判断:收紧结扎线可见兔左心室缺血区由红色逐渐变成紫色,局部阶段性运动不良,心电图可见明显抬高的 ST 段与 T 波融合成高耸而宽大的复合波,二者不易区分,以上表示心肌缺血模型制作成功。放松结扎线再灌注后可见缺血区变红,波动增强。抬高的 ST 段回落 50%以上为再灌注成功。

1.3 实验分组

将 84 只兔子随机均分至以下 7 组,每组 12 只:(1)假手术组:只开胸,不结扎左回旋支;(2)对照组(缺血再灌注组):再灌注前 5 min 静脉泵入生理盐水,按 0.1 ml/min,持续整个再灌注期;(3)BNP 组:再灌注前 5 min 经耳缘静脉泵入 BNP,浓度 0.01 μ g/(kg·min),按 0.1 ml/min 速度泵入,持续整个再

灌注期;(4)BNP+LY294002 组:再灌注前 5 min 经颈静脉注射 LY294002(0.3 mg/kg),并同时经耳缘静脉泵入 BNP,浓度 0.01 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$,按 0.1 ml/min 速度泵入,持续整个再灌注期;(5)LY294002 组:再灌注前 5 min 经颈静脉注射 LY294002(0.3 mg/kg);(6)BNP+PD98059 组:再灌注前 5 min 经颈静脉注射 PD98059(0.3 mg/kg),并同时经耳缘静脉泵入 BNP,浓度 0.01 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$,按 0.1 ml/min 速度泵入,持续整个再灌注期;(7)PD98059 组:再灌注前 5 min 经颈静脉注射 PD98059(0.3 mg/kg)。

1.4 观察指标

1.4.1 血流动力学监测 LEAD2000-32 多道生理记录仪系统连续监测血流动力学指标:心率(heart rate,HR)、平均动脉压(mean arterial blood pressure,MABP)。于缺血前、缺血 45 min、再灌注 60、120、180 min 记录 HR、MABP。

1.4.2 心电图 兔麻醉完全固定后,分别于右上肢、右下肢、左下肢远端皮下插入针型电极,连接 LEAD2000-32 多道生理记录仪系统进行连续心电图监测,待心电图波形稳定后依次常规描记结扎前、缺血 45 min、再灌注 60、120 min 肢体 II 导联心电图,观察并记录各组实验动物缺血 45 min 至再灌注 180 min 内发生的各种心律失常情况。

1.4.3 心肌缺血和梗死面积测定 再灌注 180 min 结束后,重新结扎阻断左回旋支,先于颈内静脉注入 1%伊文思蓝 2 ml,待 2~3 min 后兔子嘴舌均呈蓝色后,再静脉推注 10%氯化钾 3 ml,使心脏停于舒张期,开胸迅速取心脏,除去大血管、心房及右心室,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)液冲洗后,留左心室立即置于-20℃冰箱速冻 25 min。取出左心室,沿平行于房室沟的方向均匀横切成约 2 mm 厚的薄片,置于 1%TTC PBS 中,37℃避光恒温孵育 15 min;非缺血区为蓝色,缺血区内的非梗死区心肌组织含有的脱氢酶将无色氧化型染料 TTC 还原成砖红色,而梗死区心肌细胞由于细胞膜损伤,脱氢酶漏出,不能将 TTC 还原,因此为白色。孵育 15 min 结束后,取出心肌组织置于 4%多聚甲醛中固定 12 h,分离缺血区和梗死区,用天平称重,计算左心室、缺血区、梗死区重量比值,即梗死面积百分比。测定左室、缺血区

和梗死区心肌重量。计算缺血区范围%和梗死区范围%。即缺血区范围%=缺血区心肌重量/左心室心肌重量 $\times 100\%$,梗死区范围%=梗死区心肌重量/左心室心肌重量 $\times 100\%$ 。

1.4.4 Western blot 法检测各组缺血区组织 Akt、P-Akt、ERK1/2 及 P-ERK1/2 蛋白的表达 再灌注结束后,迅速剪下左心室缺血区,PBS 液洗涤干净后,称取 100 mg 心肌组织,加入 1 ml 细胞裂解液,机械匀浆,4℃裂解 30 min,4℃12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,分装后保存于-80℃备用。用 BCA 法进行心肌组织蛋白定量,按试剂盒说明操作,562 nm 测定吸光度。根据标准曲线计算心肌组织蛋白含量(mg/L)。心肌组织蛋白先进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PDVF)膜上,用含 10%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 40 min,与 1:1 000 稀释的 Akt、P-Akt、ERK1/2、P-ERK1/2 一抗(按 1 ml/cm²加入)4℃孵育过夜,1:2 500 稀释的二抗室温孵育 1 h,最后 ECL 显影。用 Leica 图像分析软件将图片上每个特异性条带进行灰度测定。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件包对数据进行处理。计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料描述采用率。血流动力学指标 HR、MABP 采用重复测量的方差分析;心肌缺血与梗死范围、P-Akt/Akt 比值及 P-ERK1/2/ERK1/2 比值采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha_1=0.05$ 。心律失常发生率比较采用卡方检验,检验水准 $\alpha_2=0.003\ 125$ 。

2 结果

2.1 血流动力学指标

心率和平均动脉压在基线水平上无明显差异($P>0.05$)。与基线水平相比,心率和平均动脉压在缺血以及再灌注时期有明显下降($P<0.05$),而在再灌注时期维持较稳定的水平。各组之间心率、平均动脉压差异无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

表 1 各组血流动力学情况($\bar{x}\pm s,n=12$)

Tab.1 Hemodynamics in different groups ($\bar{x}\pm s,n=12$)

指标	组别	基线	缺血 45 min	再灌注 60 min	再灌注 120 min	再灌注 180 min
HR (bpm)	假手术组	258 $\pm$ 10	—	—	—	—
	对照组	255 $\pm$ 11	231 $\pm$ 10 ^a	217 $\pm$ 10 ^{ab}	214 $\pm$ 9 ^{ab}	210 $\pm$ 8 ^{ab}
	BNP组	253 $\pm$ 11	227 $\pm$ 9 ^a	212 $\pm$ 8 ^{ab}	210 $\pm$ 10 ^{ab}	213 $\pm$ 8 ^{ab}
	BNP+LY294002组	251 $\pm$ 12	223 $\pm$ 12 ^a	207 $\pm$ 10 ^{ab}	206 $\pm$ 11 ^{ab}	209 $\pm$ 9 ^{ab}
	LY294002组	250 $\pm$ 12	222 $\pm$ 8 ^a	205 $\pm$ 9 ^{ab}	204 $\pm$ 10 ^{ab}	203 $\pm$ 12 ^{ab}
	BNP+PD98059组	252 $\pm$ 9	224 $\pm$ 10 ^a	208 $\pm$ 11 ^{ab}	207 $\pm$ 9 ^{ab}	211 $\pm$ 10 ^{ab}
	PD98059组	249 $\pm$ 10	221 $\pm$ 7 ^a	206 $\pm$ 9 ^{ab}	205 $\pm$ 10 ^{ab}	202 $\pm$ 10 ^{ab}
MABP (mmHg)	假手术组	105 $\pm$ 11	—	—	—	—
	对照组	106 $\pm$ 8	95 $\pm$ 7 ^a	83 $\pm$ 8 ^{ab}	82 $\pm$ 5 ^{ab}	79 $\pm$ 6 ^{ab}
	BNP组	111 $\pm$ 9	96 $\pm$ 5 ^a	80 $\pm$ 6 ^{ab}	78 $\pm$ 7 ^{ab}	76 $\pm$ 8 ^{ab}
	BNP+LY294002组	108 $\pm$ 9	94 $\pm$ 8 ^a	85 $\pm$ 9 ^{ab}	82 $\pm$ 8 ^{ab}	80 $\pm$ 6 ^{ab}
	LY294002组	104 $\pm$ 6	92 $\pm$ 7 ^a	81 $\pm$ 7 ^{ab}	83 $\pm$ 9 ^{ab}	84 $\pm$ 8 ^{ab}
	BNP+PD98059组	107 $\pm$ 9	94 $\pm$ 6 ^a	79 $\pm$ 6 ^{ab}	80 $\pm$ 7 ^{ab}	78 $\pm$ 5 ^{ab}
	PD98059组	105 $\pm$ 10	93 $\pm$ 7 ^a	82 $\pm$ 5 ^{ab}	84 $\pm$ 8 ^{ab}	81 $\pm$ 5 ^{ab}

注:a,与基线水平相比, $P<0.05$;b,与本组缺血 45 min 相比, $P<0.05$;—,未测

2.2 结扎左回旋支前至再灌注 120 min 心电图 ST 段变化

兔子再灌注前后(包括了缺血前,缺血 45 min,再灌注 60 min 及再灌注 120 min) II 导联心电图 ST 段变化见图 1。

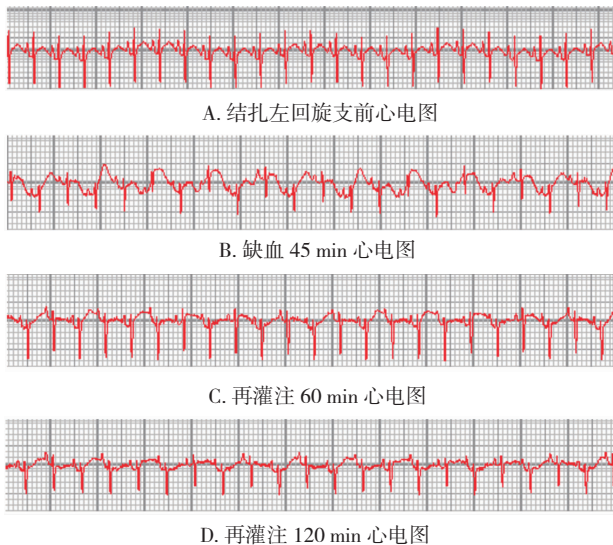


图 1 结扎大耳兔左回旋支前及再灌注后心电图 ST 段变化

Fig.1 Electrocardiogram ST segment changes before ligation of coronary left cyclotron branch and after reperfusion

2.3 心律失常发生率

缺血再灌注导致出现多种类型的心律失常,以室早、室速多见。再灌注期间,兔子可出现心律失常,但多可自行恢复。假手术组无心律失常发生。与对照组相比,BNP 组心律失常发生率明显减少($P<0.003\ 125$)。与 BNP 组比较,BNP+LY294002 组、LY294002 组、BNP+PD98059 组及 PD98059 组心律失常明显增加($P<0.003\ 125$),BNP+LY294002 组和 LY294002 组,BNP+PD98059 组和 PD98059 组差异无统计学意义($P>0.003\ 125$)(表 2)。

表 2 各组心律失常情况 ($n=12$)

Tab.2 Arrhythmia in different groups ($n=12$)

组别	例数 (n)	室早	室速	室扑与 室颤	发生率 (%)
对照组	12	4	4	2	83.3
BNP 组	12	1	0	0	8.3 ^a
BNP+LY294002 组	12	5	3	1	75.0 ^b
LY294002 组	12	2	6	2	83.3 ^b
BNP+PD98059 组	12	6	2	1	75.0 ^b
PD98059 组	12	4	4	2	83.3 ^b

注:a,与对照组相比, $P<0.003\ 125$;b,与 BNP 组相比, $P<0.003\ 125$

2.4 左室心肌缺血和梗死面积的大小

心肌梗死后伊文思蓝和 TTC 双染色见图 2,可见非缺血区心肌为蓝色,缺血危险区为砖红色,梗死区为灰白色,各组心肌缺血区和梗死区范围见表 3。假手术组无心肌缺血及梗死。结果表明各组之间缺血区范围差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,BNP 组心肌梗死范围明显减少($P<0.05$)。与 BNP 组比较,BNP+LY294002 组、LY294002 组,

BNP+PD98059 组及 PD98059 组梗死面积明显增加($P<0.05$)。BNP+LY294002 组和 LY294002 组,BNP+PD98059 组和 PD98059 组差异无统计学意义($P>0.05$)。

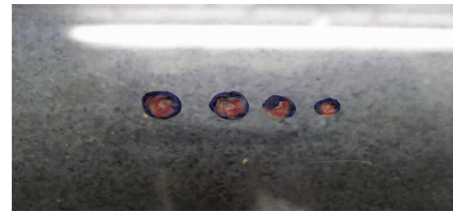


图 2 左室心肌伊文思蓝和 TTC 双染色图

Fig.2 Double staining figure of left ventricular myocardium by Evans blue and TTC methods

表 3 各组心肌缺血区范围和梗死区范围 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.3 Range of myocardial ischemia and infarction in different groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	缺血区范围 (%)	梗死区范围 (%)
对照组	33.74 $\pm$ 1.75	42.32 $\pm$ 1.50
BNP 组	33.59 $\pm$ 1.88	27.13 $\pm$ 2.26 ^a
BNP+LY294002 组	32.53 $\pm$ 1.41	40.11 $\pm$ 1.69 ^b
LY294002 组	31.66 $\pm$ 2.86	43.48 $\pm$ 4.51 ^b
BNP+PD98059 组	33.44 $\pm$ 3.38	39.26 $\pm$ 2.13 ^b
PD98059 组	34.22 $\pm$ 4.01	41.32 $\pm$ 4.59 ^b

注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b,与 BNP 组相比, $P<0.05$

2.5 P-Akt/Akt、P-ERK1/2/ERK1/2 表达

与假手术组相比,对照组 Akt、ERK1/2 的磷酸化水平明显增加($P<0.05$)。与对照组比较,BNP 组 Akt、ERK1/2 的磷酸化水平显著增加($P<0.05$)。与 BNP 组相比,BNP+LY294002 组 Akt 的磷酸化水平及 BNP+PD98059 组 ERK1/2 的磷酸化水平分别明显降低($P<0.05$)。BNP+LY294002 组和 LY294002 组 Akt 的磷酸化水平,BNP+PD98059 组和 PD98059 组 ERK1/2 的磷酸化水平差异无统计学意义($P>0.05$)(图 3、图 4、表 4)。

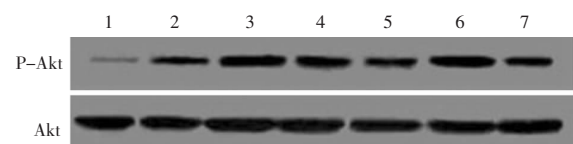
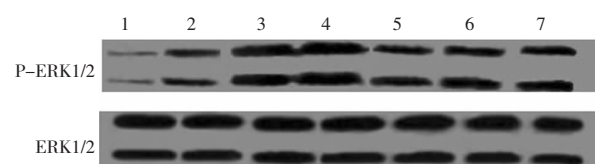


图 3 Western blot 检测 P-Akt、Akt 蛋白表达

Fig.3 Expressions of P-Akt and Akt proteins analyzed by Western blot



1. 假手术组;2. 对照组;3. BNP 组;4. BNP+LY294002 组;

5. LY294002 组;6. BNP+PD98059 组;7. PD98059 组

图 4 Western blot 检测 P-ERK1/2、ERK1/2 蛋白表达

Fig.4 Expressions of P-ERK1/2 and ERK1/2 proteins analyzed by Western blot

表 4 各组 P-Akt/Akt 和 P-ERK1/2/ERK1/2 比值 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Tab.4 Ratio of P-Akt/Akt and P-ERK1/2/ERK1/2 in different groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	P-Akt/Akt	P-ERK1/2/ERK1/2
假手术组	0.025 5 $\pm$ 0.003 6	0.031 8 $\pm$ 0.004 2
对照组	0.300 2 $\pm$ 0.021 5 ^a	0.350 5 $\pm$ 0.039 2 ^a
BNP组	0.601 0 $\pm$ 0.036 2 ^b	0.801 7 $\pm$ 0.052 7 ^b
BNP+LY294002组	0.324 2 $\pm$ 0.064 7 ^c	0.822 5 $\pm$ 0.050 3
LY294002组	0.281 5 $\pm$ 0.032 9 ^c	0.359 0 $\pm$ 0.069 2
BNP+PD98059组	0.622 8 $\pm$ 0.038 7	0.374 5 $\pm$ 0.043 1 ^c
PD98059组	0.315 5 $\pm$ 0.034 2	0.332 2 $\pm$ 0.048 8 ^c

注:a,与假手术组相比, $P<0.05$;b,与对照组相比, $P<0.05$;c,与BNP组相比, $P<0.05$

3 讨论

缺血再灌注损伤是指缺血心肌在恢复血流后由于钙超载、自由基大量生成、能量代谢障碍等多因素导致心肌超微结构、功能、代谢及电生理方面的进一步损害。缺血再灌注损伤出现炎性细胞聚集,血管内皮功能受损,代谢功能障碍,心律失常及心肌细胞顿抑和凋亡。近年来国内外学者研究发现,缺血再灌注损伤与一些心肌细胞的信号转导通路密切相关,许多药物及机械处理的心肌保护作用都是通过这信号转导通路来实现的。其中 cGMP/PKG、PI3K/Akt 和 ERK1/2 这 3 条信号通路是最近的研究热点,在心肌缺血再灌注损伤中发挥着重要的保护作用。

cGMP 是一种细胞内普遍存在的第 2 信使,由鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase,GC)作用于三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate,GTP)而生成。细胞中存在 2 种类型的鸟苷酸环化酶:可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanosine cyclase,sGC)和颗粒状鸟苷酸环化酶(particulate guanosine cyclase,pGC)。一氧化氮(nitric oxide,NO)和一氧化碳(carbon monoxide,CO)激活 sGC^[7],而心房利钠肽(atrial natriuretic peptide,ANP)、BNP、利尿素、鸟苷、肠毒素则激活 pGC^[8]。作为一种重要的细胞内信使,cGMP 有 3 个主要作用靶点:cGMP-依赖的蛋白激酶或蛋白激酶 G(Protein kinase G,PKG),cGMP-调节的磷酸二酯酶以及环磷酸鸟苷门控离子通道^[9]。PKG 被认为是最重要的 cGMP 下游靶点^[10-11]。在哺乳动物,PKG 主要以 2 种形式存在,即 PKG-I 和 PKG-II,PKG-I 由于 N-末端的不同剪接,以 α 和 β 2 种亚型存在,且 2 种亚型经常一起表达^[12]。PKG-I 主要在心血管系统中起作

用,而 PKG-II 则主要存在于小肠、肾、脑。在病理生理条件下,活化的 PKG-I 作用于其下游底物,调节心肌细胞中的受磷蛋白、三磷酸肌醇受体、兰尼碱受体、肌钙蛋白、血小板中血栓素 A₂ 受体、L 型 Ca²⁺ 通道、Ca²⁺ 激活的钾通道、肌球蛋白轻链磷酸酶及 ATP 敏感 K⁺ 通道^[2],从而引起血管舒张、抑制内皮细胞通透性、抑制血小板活化、减少细胞凋亡以及对心肌细胞的负性肌力作用而保护心血管系统^[13]。目前有证据表明 cGMP/PKG 信号途径在预处理和后处理的心脏保护机制中发挥重要作用。Lochner 等^[14]发现预处理诱导心肌保护而防止缺血再灌注损伤与心肌 cGMP 含量升高有关。Penna 等^[15]研究报道,在受到后处理的大鼠离体心脏中,cGMP 的释放也增加,梗死面积明显减少。Bolli^[16]研究发现 NO 具有心脏保护作用,内源性 NO 合酶活性基因操纵的抑制加剧心肌缺血再灌注损伤,而 NO 显著降低这种损伤。Abdallal 等^[17]对心肌细胞缺氧/复氧研究发现,增加 ANP 可选择性激活 PKG 和内质网 ATP 酶,抑制 Ca²⁺ 诱导的细胞强直收缩。Burley 和 Baxter^[18]在大鼠离体心脏灌注模型中发现,无论是在冠状动脉结扎前和结扎时给予 BNP,都可以显著减少梗死面积,并且作用效果与 BNP 的浓度相关。Wu 等^[19]研究报道,再灌注即刻,给予外源性的 BNP 有利于抑制细胞凋亡。对 ST 段抬高心肌梗死患者行经皮冠状动脉介入治疗,同时给予 ANP 也被证明发挥强大的减轻再灌注损伤的作用^[19]。已知心肌梗死面积测定是目前评价心肌缺血再灌注损伤保护效应的金标准,抑制再灌注心律失常的发生,也是对再灌注损伤心肌的一种保护作用。本研究结果显示,BNP 组的心肌梗死面积、心律失常发生率明显小于对照组,提示 BNP 激活 cGMP/PKG 信号通路可产生心肌保护作用,与文献报告一致。

不仅如此,RISK 信号通路包括 PI3K/Akt 和 ERK1/2,也具有强大的心肌保护作用,在再灌注初期以酶联反应的形式被激活,通过下游效应器,参与维持细胞的存活^[3-5]。PI3K/Akt 是细胞内重要的信号转导通路,在细胞的营养代谢、凋亡、存活,以及生长等活动中发挥重要的生物学功能。PI3K 是一种脂类第 2 信使,由催化亚基 p110 和调节亚基 p85 构成的异源性二聚体,它能磷酸化丝氨酸/苏氨酸主要的下游信号激酶 Akt。多种生长因子、细胞因子、激素等胞外信号可引起受体酪氨酸激酶或 G 蛋白偶联受体磷酸化,激活 PI3K 产生磷酸化肌醇磷脂产物,进

而激活 Akt, 而 Akt 被激活并脱离质膜, 进入细胞质和细胞核, 调节 p70S6 蛋白激酶、糖原合酶激酶-3 β 和抗凋亡因子 Bcl-2 等的表达^[20]。ERK1/2 是丝裂素活化蛋白激酶家族中成员之一。ERK1/2 信号通路可传递许多细胞外信号以调节细胞增殖、分化及细胞周期。活化的 ERK1/2 移位到细胞核, 磷酸化一系列转录因子包括 Elk-1、SAP-1a 和 NF- κ B 等, 调控基因表达, 也可能停留在胞浆, 激活其它蛋白激酶或使细胞骨架成分磷酸化。ERK1/2 可能有抗细胞凋亡作用, 激活的 ERK1/2 可能通过磷酸化促凋亡因子 Bcl-2 关联死亡启动因子(Bcl-2 associated death promoter, BAD), 改变 BAD 和抑凋亡因子 Bcl-XL 比例, 抑制交感神经 PC-12 细胞凋亡; 而肿瘤坏死因子体外诱导的 L929 细胞凋亡同样被激活的 ERK1/2 阻断^[21]。目前研究认为, 在再灌注的早期, 无论采取机械的方式(缺血预处理或缺血后处理), 还是应用药物, 对这两条信号通路的激活均有利于抑制再灌注损伤。Hausenloy 和 Yellon^[22]研究发现, 缺血预处理大鼠心肌再灌注时 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化水平升高, 抑制 PI3K/Akt 和 ERK1/2 磷酸化则抵消缺血预处理早期缩小心肌梗死面积的作用。Tsang 等^[23]证实, 缺血后处理诱导磷酸化 Akt/PKB 的表达增加, 参与心脏保护作用, 而 PI3K 的阻断剂减弱下游靶酶磷酸化, 并取消心肌保护作用。Fujita 等^[24]研究也发现, 缺血后适应激活 ERK1/2, 给予 ERK1/2 的抑制剂, 可以取消后适应的心肌保护作用。一些研究表明, 在缺血前或再灌注时应用药物, 如他汀、胰岛素、促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、内源性阿片肽等药物也可通过激活 RISK 信号通路成分产生与缺血预处理或缺血后处理类似的心脏保护作用^[25-26]。在本研究中, 通过 Western blot 法测定 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化水平来反映 PI3K/Akt、ERK1/2 信号途径的激活。结果显示, 对照组 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化水平明显高于假手术组, 这表明着再灌注自身会导致促生存激酶的活化。

本实验成功建立了兔子心肌缺血再灌注模型, 结扎左冠状动脉回旋支后心电图 II 导联出现 ST 段抬高, 同时肉眼观察结扎区域变苍白等心肌缺血表现, 再灌注时心电图示 ST 段明显下降。为证明心肌梗死不是由于开胸等手术操作所引起的, 本研究设立假手术组。在本实验中采用 PI3K 抑制剂 LY294002 和 ERK1/2 抑制剂 PD98059 分别干预 BNP 组, 看其能否抵消或减弱 BNP 的心肌保护作用, 从而判断激

活 cGMP/PKG 信号通路的心肌保护作用是否与激活 PI3K/Akt 和 ERK1/2 通路有关, 并进一步运用抗 Akt、抗 ERK1/2 的抗体分别检测各组兔子心肌缺血区组织 Akt、ERK1/2 的磷酸化状态加以验证。本研究结果发现, 与对照组比较, BNP 组的心肌梗死面积、心律失常发生率明显减少, Akt、ERK1/2 的磷酸化水平明显增加; 在分别给予 LY294002 (BNP+LY294002)、PD98059 (BNP+PD98059) 后, 与 BNP 组相比, 心肌梗死面积明显增大, 心律失常发生率明显增加, 同时这两组 Akt、ERK1/2 的磷酸化水平分别明显降低; 而 BNP+LY294002 组和 LY294002 组心肌梗死面积、心律失常发生率及 Akt 的磷酸化水平, BNP+PD98059 组和 PD98059 组心肌梗死面积、心律失常发生率及 ERK1/2 的磷酸化水平差异无统计学意义; LY294002、PD98059 单独使用对心肌梗死面积、心律失常、Akt、ERK1/2 的磷酸化水平无明显影响, 但可以抵消 BNP 减少心梗面积、心律失常发生率及提高 Akt、ERK1/2 的磷酸化水平的效果, 表明 BNP 激活 cGMP/PKG 信号通路的心肌保护作用与 PI3K/Akt、ERK1/2 的激活有关。

综上所述, BNP 激活 cGMP/PKG 信号通路, 对心肌缺血再灌注损伤产生保护作用, 且该通路的激活与 RISK 通路的激活有关。

参 考 文 献

- [1] Gottlieb R A. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011, 16(3-4): 233-238.
- [2] Burley D S, Ferdinandy P, Baxter G F. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling[J]. Br J Pharmacol, 2007, 152(6): 855-869.
- [3] Hausenloy D J, Tsang A, Mocanu M M, et al. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(2): H971-H976.
- [4] Fang F, Li D, Pan H, et al. Luteolin inhibits apoptosis and improves cardiomyocyte contractile function through the PI3K/Akt pathway in simulated ischemia/reperfusion[J]. Pharmacology, 2011, 88(3-4): 149-158.
- [5] Fan Q, Yang X C, Liu Y, et al. Postconditioning attenuates myocardial injury by reducing nitro-oxidative stress in vivo in rats and in humans[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 120(6): 251-261.
- [6] Wu B, Jiang H, Lin R, et al. Pretreatment with B-type natriuretic peptide protects the heart from ischemia-reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis[J]. Tohoku J Exp Med, 2009, 219(2): 107-114.
- [7] Murad F, Mittal C K, Arnold W P, et al. Guanylate cyclase: activa-

tion by azide,nitro compounds,nitric oxide,and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin[J].Adv Cyclic Nucleotide Res, 1978,9:145-158.

[8] Kuno A,Solenkova N V,Solodushko V,et al.Infarct limitation by a protein kinase G activator at reperfusion in rabbit hearts is dependent on sensitizing the heart to A2b agonists by protein kinase C[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2008,295(3):H1288-H1295.

[9] Wollert K C,Fiedler B,Gambaryan S,et al.Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytesHypertension[J].Hypertension,2002,39(1):87-92.

[10] Fiscus R R.Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in the regulation of apoptosis and survival in neural cells[J].Neurosignals,2002,11(4):175-190.

[11] Hofmann F,Ammendola A,Schlossmann J.Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases[J].J Cell Sci,2000,113(Pt10):1671-1676.

[12] Wernet W,Flockerzi V,Hofmann F.The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase[J].FEBS Lett,1989,251(1-2):191-196.

[13] Vaandrager A B,de Jonge H R.Signalling by cGMP-dependent protein kinases[J].Mol Cell Biochem,1996,157(1-2):23-30.

[14] Lochner A,Genade S,Tromp E,et al.Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in ischemic preconditioning[J].Mol Cell Biochem,1998,186(1-2):169-175.

[15] Penna C,Cappello S,Mancardi D,et al.Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart;role of coronary flow and pressure and the nitric oxide/cGMP pathway[J].Basic Res Cardiol,2006,101(2):168-179.

[16] Bolli R.Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning;an overview of a decade of research[J].J Mol Cell Cardiol,2001,33(11):1897-1918.

[17] Abdallah Y,Gkatzoflia A,Pieper H,et al.Mechanism of cGMP-

mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury[J].Cardiovasc Res,2005,66(1):123-131.

[18] Burley D S,Baxter G F.B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart[J].Basic Res Cardiol,2007,102(6):529-541.

[19] Kitakaze M,Asakura M,Kim J,et al.Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction(J-WIND):two randomised trials[J].Lancet,2007,370(9597):1483-1493.

[20] Hausenloy D J,Yellon D M.Reperfusion injury salvage kinase signalling:taking a RISK for cardioprotection[J].Heart Fail Rev,2007,12(3-4):217-234.

[21] Yoon S,Seeger R.The extracellular signal-regulated kinase:multiple substrates regulate diverse cellular functions[J].Growth Factors,2006,24(1):21-44.

[22] Hausenloy D J,Yellon D M.New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury:targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway[J].Cardiovasc Res,2004,61(3):448-460.

[23] Tsang A,Hausenloy D J,Mocanu M M,et al.Postconditioning:a form of 'modified reperfusion' protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway[J].Circ Res,2004,95(3):230-232.

[24] Fujita M,Asanuma H,Hirata A,et al.Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2007,292(4):H2004-H2008.

[25] Bell R M,Clark J E,Hearse D J,et al.Reperfusion kinase phosphorylation is essential but not sufficient in the mediation of pharmacological preconditioning;characterisation in the bi-phasic profile of early and late protection[J].Cardiovasc Res,2007,73(1):153-163.

[26] Burley D S,Baxter G F.Pharmacological targets revealed by myocardial postconditioning[J].Curr Opin Pharmacol,2009,9(2):177-188.

(责任编辑:关蕴良)

《重庆医科大学学报》

欢迎赐稿、订阅

网址:cyxb.alljournals.ac.cn

邮发代号:78-132