

网络出版时间: 2023-09-19 17:38:14 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1410.007>

牡荆素调控 Epac1/CaMK II 通路减轻小鼠急性心肌缺血再灌注损伤的作用机制

甘琴^{1,2} 杨换花¹ 张玲玉¹ 刘小嘉¹ 董六一¹

摘要 目的 研究小鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)中 Epac1/CaMK II 信号通路的作用,并探明牡荆素(VT)对急性 MIRI 的保护作用。方法 取 C57/BL 小鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分别为假手术组(Sham 组),缺血再灌注组(I/R 组),缺血再灌注+VT 组(VT 设置 3、6、12 mg/kg 3 个剂量组)。小鼠左冠状动脉前降支(LAD)结扎,使部分心脏组织缺血 30 min,血液再灌注 120 min,构建小鼠 MIRI 模型。Sham 组小鼠只手术不结扎 LAD。检测小鼠血清中乳酸脱氢酶(LDH)水平;取小鼠左室心肌组织进行 HE 染色观察心肌病理组织学变化;免疫组织化学观察心肌组织中 Epac1 的表达水平;Western blot 法测定 Epac1、Rap1、CaMK II、ERK/p-ERK 蛋白表达的变化。结果 与 Sham 组比较,I/R 组小鼠血清中 LDH 百分比水平显著升高,心肌组织中 Epac1、Rap1、CaMK II 蛋白表达显著上调,ERK1/2 磷酸化水平升高。与 I/R 组比较,VT(3、6、12 mg/kg)预处理组可显著降低小鼠血清中 LDH 水平,抑制小鼠心肌组织中 Epac1、Rap1 与 CaMK II 蛋白表达,促进 ERK1/2 磷酸化。病理组织学结果显示,I/R 组小鼠心肌纤维排列紊乱、断裂,间隙增加,炎性细胞浸润明显;VT(3、6、12 mg/kg)预处理组小鼠心肌纤维排列较整齐,炎性细胞浸润较少。结论 VT 可能通过调节 Epac1/CaMK II 信号通路,下调 CaMK II 蛋白表达,促进 ERK 磷酸化,有效减轻 MIRI。

关键词 牡荆素; Epac1; CaMK II; 心肌缺血再灌注损伤

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1652-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.007

心肌梗死是最严重的冠心病之一,在世界范围内发病率和病死率居高不下^[1]。治疗心肌梗死最有效的方法是再灌注疗法,即通过血管重建及时恢复梗死心肌组织的供血,减小梗死面积,但心脏再灌注恢复血流后,会继发性加重心脏功能损伤并破坏

心肌组织结构,称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)^[2]。环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)是心肌细胞内的重要信使,可直接激活环腺苷酸结合蛋白(exchange proteins directly activated by cAMP, Epac),进而激活 Rap, 发挥其重要的信号分子作用^[3]。Epac 还可通过影响钙调节蛋白激酶 2(calmodulin kinase II, CaMK II)正向调控细胞钙离子增加,进而影响心脏功能^[4]。牡荆素(vitexin, VT),也称“牡荆苷”,化学名 5,7,4'-三羟基黄酮-8-C-β-D-葡萄糖苷^[5],课题组前期研究^[6]表明其具有增加冠脉流量、保护缺血心肌以及缺氧复氧损伤细胞等作用,但保护作用机制尚不明确。该研究旨在前期研究的基础上,通过构建小鼠 MIRI 模型,探讨 VT 是否通过调控 Epac1/CaMK II 通路减轻小鼠急性 MIRI,分析其抗心肌缺血作用的潜在机制,为其临床应用奠定理论与实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性小鼠,体质量 22~25 g,购自安徽医科大学省级实验动物中心,生产许可证号:SCXK(皖)2017-001。饲养在饲养室中,湿度 40%~70%、温度(22±3)℃。所有相关实验均获得安徽医科大学实验动物伦理委员会的批准。

1.1.2 实验试剂 VT(冻干粉针剂,30 mg/瓶,批号:20161217,纯度 99.5%,合肥七星医药科技有限公司)。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(货号:A020-2,南京建成生物工程研究所有限公司);Ripa 蛋白裂解液、BCA 蛋白含量检测试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(×5)、PMSF(货号:032119190411、20181108、050819190508、120518190313,江苏碧云天生物技术有限公司);预染蛋白 Marker(货号:00737775,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);PVDF 膜(货号:ISEQ00010,美国 Millipore 公司);Epac1 抗体、Rap1 抗体、CaMK II 抗体、p-ERK(货号:ab109415、ab175329、ab134041、ab229912,美

2023-05-23 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2108085MH254);安徽省高等学校自然科学研究项目(编号:KJ2021A1387)

作者单位:¹安徽医科大学基础医学院药理学教研室,合肥 230032

²合肥职业技术学院基础医学教研室,合肥 230012

作者简介:甘琴,女,硕士研究生;

董六一,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: dongyi@ahmu.edu.cn

国 Abcam 公司); GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (货号: 19AF0404、137699、139931, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.1.3 实验仪器 生物机能实验系统(BL-420E, 成都泰盟科技有限公司); 荧光与化学发光成像系统(Bioshine ChemiQ4600, 上海欧翔科学仪器有限公司); 全波长酶标仪(SpectraMax190, 美国 Molecular Devices 公司); 石蜡切片机(德国 Lecia 公司); 制冰机(常熟雪科电器有限公司); 转移槽、电泳仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组与给药 将 C57/BL 小鼠随机分为 5 组: 假手术组(Sham 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、缺血再灌注 + VT 组(I/R + VT 组, VT 设置 3、6、12 mg/kg 3 个剂量组) 实验中 VT 剂量选择参考课题组前期发表文献^[7]。用药组在建立小鼠急性 MIRI 前, 每天给予小鼠 VT 灌胃(给药容积 0.1 ml/10 g) 连续 7 d, Sham 组给予等量的生理盐水, 每组有 8 只小鼠成功入组。

1.2.2 小鼠 MIRI 模型建立 在小鼠左胸上做长度约为 1.2 cm 的皮肤切口, 在左锁骨下中线的第四肋间隙开一个小孔, 用蚊钳打开胸膜和心包并微微打开夹子, 轻轻按压至小鼠心脏平稳而轻柔地从孔中弹出用 7-0 的外科缝合线结扎 C57/BL 小鼠左冠状动脉前降支(left anterior descending, LAD), 造成部分心脏组织缺血 30 min, 随后血液再灌注 120 min, 构建小鼠 MIRI 模型。Sham 组小鼠造模时只开胸腔, 轻柔挤出心脏, 不结扎小鼠 LAD。小鼠心肌再灌注 120 min 后用异氟烷麻醉小鼠, 眼球取血, 取 4 只将小鼠固定在鼠板上, 快速开胸, 用生理盐水冲洗后, 换 4% 多聚甲醛进行灌流, 待小鼠血液排除干净, 灌流结束。另外 4 只小鼠取血处死后取新鲜心脏 -80 °C 冰箱冻存储备, 进行 Western blot 实验。

1.2.3 小鼠血清中 LDH 水平检测 小鼠取血后, 室温凝固后取血清备用。用 LDH 试剂盒检测小鼠血清中 LDH 水平。

1.2.4 HE 染色观察小鼠心脏组织病理学变化 4 只经 4% 多聚甲醛灌流结束后的小鼠取其心脏, 用 4% 甲醛固定液固定, 制作心脏蜡块, 然后切片, 进行 HE 染色, BX-51 型正置显微镜观察并拍照记录, 观察小鼠心脏组织病理学变化。

1.2.5 免疫组织化学检测心脏组织中 Epac1 表达变化 将上述蜡块进行切片, 进行 Epac1 免疫组织

化学染色, 用 BX-51 型正置显微镜拍照, 观察小鼠心脏组织中 Epac1 表达变化。

1.2.6 Western blot 法检测蛋白表达水平 Western blot 法分别检测小鼠心脏中 Epac1、Rap1、CaMK II、ERK/p-ERK 蛋白表达变化。荧光及化学发光成像系统显影, Image J 图像分析软件对蛋白条带的灰度值进行计算。

1.3 统计学处理 实验所得数据用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析和 *t* 检验来评估数据的显著性差异, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VT 对 MIRI 小鼠血清中 LDH 水平的影响 与 Sham 组比较, I/R 组小鼠血清中 LDH 百分比水平明显升高($P < 0.01$), 提示 I/R 组小鼠心肌受伤, 心肌细胞释放 LDH 增多; 与 I/R 组比较, VT 预处理组小鼠血清中 LDH 百分比水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示 VT 对 I/R 小鼠心肌有保护作用。见图 1。

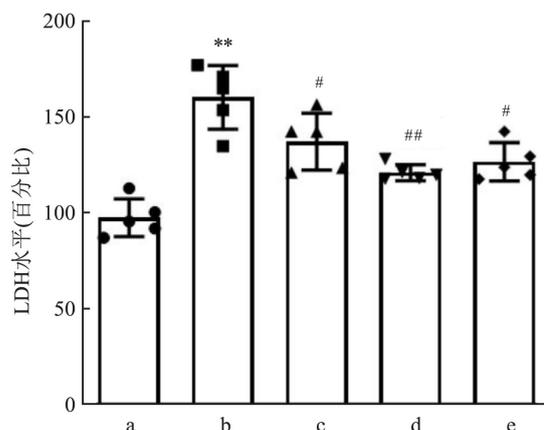


图 1 VT 对 MIRI 小鼠血清中 LDH 水平的影响($n=8$)

a: Sham 组; b: I/R 组; c: I/R + 3 mg/kg VT 组; d: I/R + 6 mg/kg VT 组; e: I/R + 12 mg/kg VT 组; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.2 VT 对 MIRI 小鼠心肌组织病理变化的影响 Sham 组小鼠心肌组织染色均匀, 排列紧密有序, 而 I/R 组小鼠心肌纤维排列紊乱, 间隙增加, 无层次感, 心肌细胞间有大量的炎性细胞浸润; VT 治疗组小鼠心肌纤维排列较整齐, 炎性细胞浸润减少; HE 染色结果见图 2。

2.3 VT 对小鼠心肌组织中 Epac1 表达变化的影响 与 Sham 组比较, I/R 组小鼠心肌组织中的 Epac1 蛋白表达显著上调($P < 0.01$); 与 I/R 组比较,

VT 预处理组小鼠心肌组织中 Epac1 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ; 免疫组织化学检测结果见图 3。

2.4 VT 对小鼠心肌组织中 Epac1 和 Rap1 蛋白表达的影响 与 Sham 组比较 ,I/R 组 Epac1 与 Rap1 蛋白表达显著上调 (均 $P < 0.01$) ; 与 I/R 组比较 ,VT (6、12 mg/kg) 预处理组 Epac1 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) ,且 VT (6、12 mg/kg) 预处理组 Rap1 蛋白表达也显著降低 (均 $P < 0.01$) 。见图 4。

2.5 VT 对小鼠心肌组织中 CaMK II 和磷酸化 ERK(p-ERK) 表达的影响 与 Sham 组比较 ,I/R

组 CaMK II 和 p-ERK 表达显著增加 (均 $P < 0.01$) ; 与 I/R 组比较 ,VT (6、12 mg/kg) 预处理组 CaMK II 蛋白表达降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) ,且 VT (3、6 mg/kg) 预处理组促进 ERK 的磷酸化 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 。见图 5。

3 讨论

MIRI 是心脏手术和心肌梗死后血流恢复后再灌注引起的加重性损伤 ,可导致心力衰竭、恶性心律失常、猝死等多种潜在恶化情况^[8]。MIRI 的发病机制涉及多因素的相互作用 ,其中氧化应激、细胞凋亡、炎症反应、线粒体损伤和钙超载可能在 MIRI 病

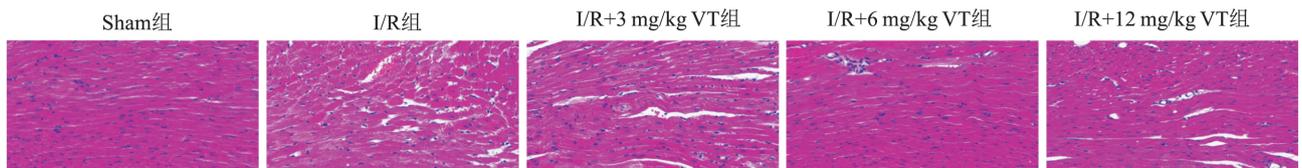


图 2 VT 对 MIRI 小鼠心肌组织病理变化的影响 (×20 $n = 4$)

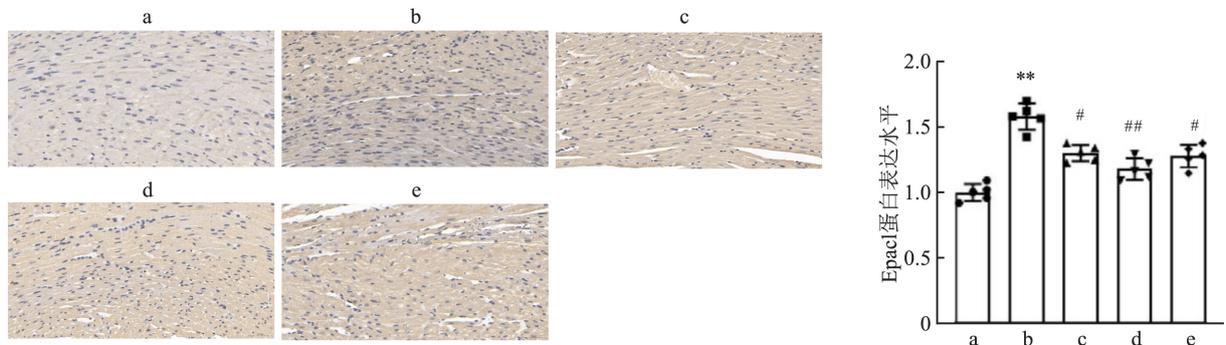


图 3 VT 对小鼠心肌组织中 Epac1 表达变化的影响 (×20 $n = 4$)

a: Sham 组; b: I/R 组; c: I/R + 3 mg/kg VT 组; d: I/R + 6 mg/kg VT 组; e: I/R + 12 mg/kg VT 组; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

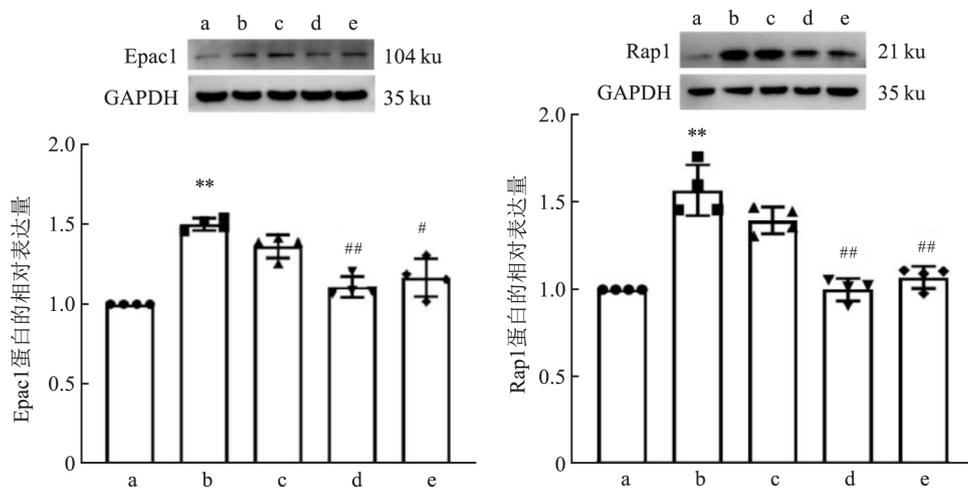


图 4 VT 对小鼠心肌组织中 Epac1 和 Rap1 蛋白表达的影响 ($n = 4$)

a: Sham 组; b: I/R 组; c: I/R + 3 mg/kg VT 组; d: I/R + 6 mg/kg VT 组; e: I/R + 12 mg/kg VT 组; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

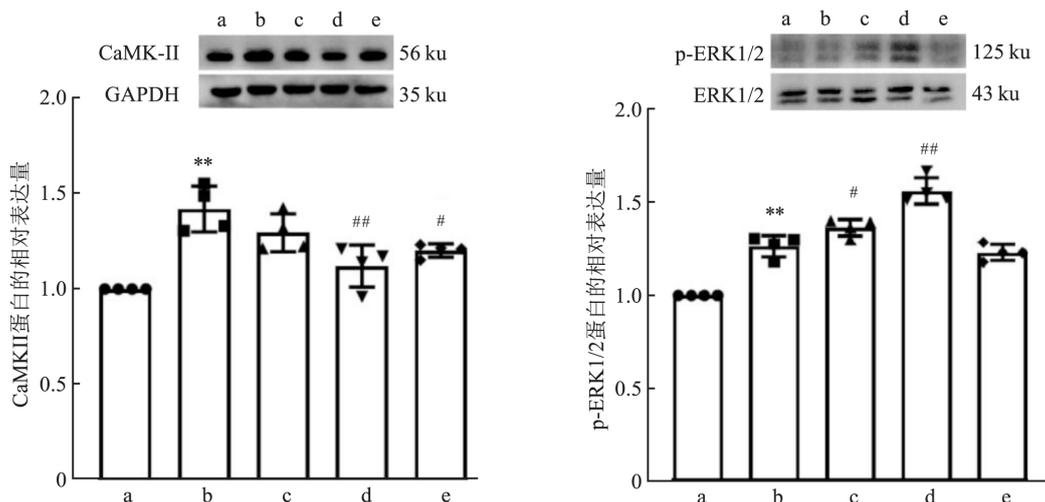


图5 VT对小鼠心肌组织中CaMK II和p-ERK蛋白表达的影响($n=4$)

a: Sham组; b: I/R组; c: I/R + 3 mg/kg VT组; d: I/R + 6 mg/kg VT组; e: I/R + 12 mg/kg VT组; 与Sham组比较: ** $P < 0.01$; 与I/R组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

理机制中可能起着关键性作用^[9]。本课题组前期研究^[6,10]表明VT可以改善MIRI对MIRI后心脏起到保护作用。

Epac现今已鉴定得到2类亚型蛋白,即Epac1和Epac2。cAMP通过Epac1作用于鸟嘌呤核苷酸交换因子,致Epac1与Rap1结合,并通过将绑定的GDP交换为GTP,Rap1转化为激活形式,使其作为信号分子而发挥重要作用^[11]。Epac1及其下游分子Rap1被cAMP激活后可介导心肌细胞交感神经兴奋、cAMP代谢、肌浆网钙释放增加并通过激活ERK1/2,由此影响相关病理活动,诸如心力衰竭、缺血再灌注损伤、心肌肥厚、心肌梗死等^[12]。本课题组前期研究^[13]表明,大鼠心脏缺血再灌注后的心肌组织内Epac1和Rap1表达明显增加且与心肌损伤程度成正相关。CaMK II是一种多效性信号,可调节心肌细胞收缩力、炎症、代谢、基因表达和细胞存活,在多种细胞通路中起着关键的调节中介作用^[8]。研究^[9]表明,在心室肌细胞核周围,Epac1通过激活CaMK II,诱发 Ca^{2+} 信号引起钙触发钙释放,调节 Ca^{2+} 在心肌的表达水平。在心肌缺血发生时,心肌受损,激发心肌内Epac1的水平增加,诱导下游的Rap1增加,大量 Ca^{2+} 内流进入心肌细胞,导致钙超载,加重心肌的损伤,加速心肌细胞凋亡。本研究结果显示在MIRI过程中心肌中Epac1、Rap1和CaMK II的水平表达显著上调,损伤心肌细胞。丝裂原活化蛋白激酶级联作为一类信号途径,对于细胞分化、增殖、凋亡以及应激活动发挥着重要的调控作用,胞外信号调节激酶属于丝裂原活化蛋白激

酶家族,其扮演着重要信号分子角色,可将细胞外信号传递到细胞内靶点,胞外信号调节激酶的磷酸化作用也可以抑制心肌细胞的凋亡^[14]。

VT是从一些山楂属植物中提取的生物黄酮糖苷,生物活性广泛,是许多传统中药中发现的活性成分,目前临床上使用的常为冻干制剂^[15]。前期研究虽然证实了VT对体内MIRI和体外缺氧/复氧诱导心肌细胞损伤均有保护作用,但具体机制需进一步的深入研究。本实验研究结果显示,在小鼠MIRI后,VT可降低小鼠血清中LDH的水平,减轻小鼠心脏病理性损伤,同时抑制心肌组织中Epac1、Rap1和CaMK II的蛋白表达,增加ERK的磷酸化,从而保护缺血再灌注损伤后的心脏,且实验结果显示6 mg/kg VT组优于12 mg/kg VT组,提示VT在抗小鼠MIRI中剂量依赖性不明显。

参考文献

- [1] Xue W, Wang X, Tang H, et al. Vitexin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by regulating mitochondrial dysfunction induced by mitochondrial dynamics imbalance [J]. Biomed Pharmacother 2020, 124: 109849.
- [2] Severino P, D'Amato A, Pucci M, et al. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction [J]. Int J Mol Sci 2020, 21(21): 8118.
- [3] Fujita T, Umemura M, Yokoyama U, et al. The role of Epac in the heart [J]. Cell Mol Life Sci 2017, 74(4): 591-606.
- [4] Choi E J, Ren Y, Chen Y, et al. Exchange proteins directly activated by cAMP and their roles in respiratory syncytial virus infection [J]. J Virol 2018, 92(22): e01200-18.
- [5] Ashokkumar R, Jamuna S, Sakeena Sadullah M S, et al. Vitexin protects isoproterenol induced post myocardial injury by modulating

- hipposignaling and ER stress responses [J]. *Biochem Bioph Res Co* 2018 496(2): 731–7.
- [6] Yang H ,Xue W ,Ding C ,et al. Vitexin mitigates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats byregulating mitochondrial dysfunction via Epac1-Rap1 signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev* 2021 , 2021: 1–17.
- [7] 王亚男 ,彭成凤 ,甄毅岚 ,等. 注射用牡荆素与葛根素注射液抗大鼠心肌缺血/再灌注损伤量效关系的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2015 50(3): 314–8.
- [8] Jiang H ,Xing J ,Fang J ,et al. Tiliarin protects against ischemia/reperfusion-induced myocardial injury through the inhibition of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II-dependent apoptotic and inflammatory signaling pathways [J]. *Biomed Res Int* 2020 , 2020: 5939715.
- [9] Kim Y A ,Latif A ,Kong C ,et al. Antimalarial diterpenoids from *Vitex rotundifolia*: Isolation ,structure elucidation ,and *in vitro* antiplasmodial activity [J]. *Bioorg Chem* 2020 ,100: 103925.
- [10] Tong J ,Liu X ,Vickstrom C ,et al. The Epac-phospholipase cepsilon pathway regulates endocannabinoid signaling and cocaine-induced disinhibition of ventral tegmental area dopamine neurons [J]. *J Neurosci* 2017 37(11): 3030–44.
- [11] Wang X ,Zhang Y ,Yang Y ,et al. Curcumin pretreatment protects against hypoxia/reoxygenation injury *via* improvement of mitochondrial function ,destabilization of HIF-1 α and activation of Epac1-Akt pathway in rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Biomed Pharmacother* 2019 ,109: 1268-75.
- [12] Khan I ,Ali A ,Akhter M A ,et al. Epac-Rap1-activated mesenchymal stem cells improve cardiac function in rat model of myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Ther* 2017 35(2): e12248.
- [13] Che X ,Wang X ,Zhang J ,et al. Vitexin exerts cardioprotective effect on chronic myocardial ischemia/reperfusion injury in rats *via* inhibiting myocardial apoptosis and lipid peroxidation [J]. *Am J Transl Res* 2016 8(8): 3319–28.
- [14] 彭成凤 ,车 侠 ,董六一 ,等. Epac1-Rap1 通路介导牡荆素对大鼠慢性心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床* 2017 33(3): 23–7.
- [15] 姜红红 ,王红霞 ,连运河 ,等. 山楂叶提取物分离纯化工艺的优化 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化* 2020 22(8): 2883–92.

Protective effect and mechanism of vitexin regulating Epac1/CaMK II pathway on acute myocardial ischemia reperfusion injury in mice

Gan Qin^{1,2} ,Yang Huanhua¹ ,Zhang Lingyu¹ ,Liu Xiaojia¹ ,Dong Liuyi¹

(¹Dept of Pharmacology School of Basic Medicine Anhui Medical University Hefei 230032;

²Dept of Basic Medicine Hefei Technology College Hefei 230012)

Abstract Objective To investigate the role of Epac1/CaMK II signaling pathway in myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) in mice and to investigate the protective effect of vitexin (VT) on acute MIRI. **Methods** C57/BL mice were randomly divided into 5 groups: Sham surgery group (Sham), ischemia reperfusion group (I/R) and ischemia reperfusion + vitexin group (function 3, 6, 12 mg/kg groups). Ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD coronary artery) in mice resulted in ischemia of part of the heart tissue for 30min and reperfusion of the blood for 120min. Mouse myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) model was established. In the sham operation group, only the LAD was not ligated. Serum LDH levels of mice were detected. Hematoxylin-eosin (H&E) staining was performed on the left ventricular myocardium of mice to observe the histopathological changes. The expression level of Epac1 in myocardial tissue was observed by immunohistochemistry. The protein expressions of Epac1, Rap1, CaMK II and ERK/p-ERK were determined by Western Blot. **Results** Compared with Sham group, serum LDH level of mice in I/R group was significantly increased, protein expressions of Epac1, Rap1 and CaMK II in myocardial tissue were significantly up-regulated, and ERK1/2 phosphorylation level was decreased. Compared with I/R group, vitexin (3, 6, 12 mg/kg) pretreatment group decreased serum LDH level, inhibited Epac1, Rap1 and CaMK II protein expression in mouse myocardial tissue, and promoted ERK1/2 phosphorylation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The histopathological results showed that the myocardial fibers in the I/R group were disordered and broken, with increased gaps and obvious inflammatory cell infiltration. In the vitexin treatment group, the myocardial fibers were arranged more neatly and inflammatory cells were infiltrated less. **Conclusion** Vitexin may regulate Epac1/CaMK II signaling pathway, down-regulate CaMK II protein expression, increase ERK phosphorylation, and effectively reduce MIRI.

Key words vitexin; Epac1; CaMK II; myocardial ischemia reperfusion injury