黄芪皂苷Ⅳ通过 PKA 途径减轻缺氧/复氧心肌损伤的机制研究

张大伟[1,2],徐晋妩[1],卞智萍[1],刘　静[3],吴恒芳[1],顾春荣[1],陈相健[1*],杨　笛[2*]

([1]南京医科大学第一附属医院分子心脏病实验室,[2]心内科,[3]老年科,江苏　南京　210029)

[摘　要]　**目的**:研究黄芪皂苷 IV(astragaloside IV,As-IV)减轻缺氧/复氧所致心肌细胞损伤的机制。**方法**:胰酶多次消化法培养新生 SD 大鼠原代心肌细胞,建立缺氧/复氧模型,测定培养心肌细胞上清心肌损伤标志物肌酸激酶同工酶(creatine kinase,CK-MB)含量,检测心肌细胞肌浆网钙 ATP 酶(sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase,SERCA2a)活性、Real-Time PCR 法测定 PKA 催化亚单位 α(PKA C subunit α,PKA- Cα)基因的表达水平以及 Western blot 检测第 16 位丝氨酸磷酸化受磷蛋白(Ser16 phosphorylated phospholamban,Ser^{16}-PLN)的表达水平,同时以 As-IV(30 μmol/L)干预,观察其作用。**结果**:与正常组相比,缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation,H/R) 引起心肌细胞 CK-MB 释放增加,SERCA2a 活性降低约 35%、PKA- Cα 基因表达下调 28%以及 Ser^{16}-PLN 表达下调 51%,P 值均 < 0.05,As-IV 干预则可逆转上述变化,基本恢复至正常水平。**结论**:黄芪皂苷Ⅳ抑制缺氧/复氧所致心肌细胞损伤的机制可能是通过上调 PKA-Cα 基因表达,提高受磷蛋白(phosphorylated phospholamban,PLN)16 位丝氨酸的磷酸化水平,解除 PLN 对 SERCA2a 的抑制,从而增强 SERCA2a 的功能。

[关键词]　黄芪皂苷Ⅳ; 心肌保护; 肌浆网钙 ATP 酶; PKA; 受磷蛋白

[中图分类号]　R393　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2012)01-030-05

The mechanism of astragaloside IV alleviation of hypoxia/reoxygenation induced cultured cardiomyocyte injury via PKA pathway

ZHANG Da-wei[1,2], XU Jin-dan[1], BIAN Zhi-ping[1], LIU Jing[3], WU Heng-fang[1], GU Chun-rong[1], CHEN Xiang-jian[1*], YANG Di[2*]

(*[1]Laboratory of Molecular Cardiology, [2]Department of Cardiology, [3]Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To investigate the mechanism of astragaloside IV (As-IV) on alleviation of hypoxia/reoxygenation induced myocardial injury. **Methods**: Cultured cardiomyocytes from neonatal SD rats were exposed to 6 h of hypoxia followed by 3 h of reoxygenation(H/R). Meanwhile, As-IV (30 μmol/L) was treated in H/R cardiomyocytes. Myocytes injury was determined by the release of creatine kinase (CK-MB) in supernatant. Myocardial SERCA2a activity was measured, PKA C subunit α (PKA-Cα) gene expression and Ser16 phosphorylated phospholamban(Ser^{16}-PLN) protein expression level were detected by real-time PCR and Western blot respectively. **Results**: Cultured cardiomyocytes exposed to hypoxia/reoxygenation presented statistically higher CK-MB in supernatant, decreased myocardial SERCA2a activity, reduced PKA-Cα gene and Ser^{16}-PLN protein expressions($P < 0.05$). But As-IV treatment significantly prevented the alterations in H/R cardiomyocytes mentioned above. **Conclusion**: These results suggest that the cardioprotective effects of As-IV may be associated with upregulation of PKA-Cα gene and Ser^{16}-PLN protein expressions, thus restoring the SERCA2a function in hypoxia/reoxygenation injury.

[**Key words**]　astragaloside IV; cardioprotection; sarcoplasmic reticulum calcium ATPase; PKA; phosphorylated phospholamban

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 030-034]

心肌肌浆网钙 ATP 酶 (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase,SERCA2a)是肌浆网上的一种钙调节蛋白,其作用是 ATP 依赖性地逆浓度梯度将心肌细胞胞浆游离 Ca^{2+}回摄入肌浆网储存, 既有效降低舒张期 Ca^{2+}浓度,又为收缩期肌浆网 Ca^{2+}释放做准备,是

[基金项目]　国家自然科学基金项目(30772781,30770894)

*通讯作者,E-mail:chenxiangjian@njmu.edu.cn;diyang@njmu.edu.cn

维持正常心肌收缩和舒张功能所必需的蛋白质。研究发现衰竭心脏中 SERCA2a 表达下调,SERCA2a 活性及表达降低也可导致心功能降低, 反之,SERCA2a 活性及表达增强有利于改善心功能[1,2]。SERCA2a 的功能主要由受磷蛋白(phospholamban,PLN)调控,PLN 是一种内源性 SERCA2a 抑制物,去磷酸化状态时抑制 SERCA2a 功能, 磷酸化状态时解除抑制,增强 SERCA2a 的钙转运能力[3]。PLN 磷酸化分别通过蛋白激酶(protein kinase A,PKA)/钙–钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ/(Ca^{2+}/calmodulin dependent protein hinaseⅡ,CaMKⅡ)/蛋白激酶 C (protein kinase C,PKC)途径介导,其中前二种途径被认为占主要作用,各途径磷酸化位点不同。蛋白激酶 A(protein kinase A,PKA)是一种 cAMP 依赖性蛋白激酶,当 β 肾上腺能神经兴奋引起 cAMP 含量增加时,PKA 被激活并从第 16 位丝氨酸(Ser^{16})磷酸化 PLN,从而解除对 SERCA2a 的抑制,增强 SERCA2a 的活性,在心脏生理及病理过程中发挥重要作用[4-6]。

黄芪是我国传统中药,大量文献报道其具有心肌保护作用,机制可能与维持胞内钙稳态、调节能量代谢、抗氧化等有关[7-9]。黄芪皂苷 IV(astragaloside IV,As-IV) 是黄芪主要的具有心血管药理活性的有效成分之一,已有研究证实 As-IV 可上调 SERCA2a 的活性及表达,减轻缺氧/复氧引起的心肌细胞损伤[10]。本研究旨在探索 As-IV 是否通过 PKA 途径提高 PLN 磷酸化水平,改善 SERCA2a 功能,进而实现心肌保护作用。

1　材料和方法

1.1　材料

新出生 1-3 d SD 乳鼠购自南京医科大学实验动物中心。胰酶及 DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司, 新生牛血清购自杭州四季青公司, 青/链霉素、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(Brdu)、4-硝基酚(p-NP)及 4-硝基酚磷酸二钠 (p-NPP) 购自美国 Sigma 公司,As-IV 购自南京春秋生物工程有限公司,TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录及实时荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,引物由上海生工生物技术有限公司合成,RIPA 裂解液购自碧云天生物技术研究所,16 位丝氨酸磷酸化受磷蛋白 (Ser^{16} phosphorylated phospholamban,Ser^{16}-PLN)一抗(ab15000)及其过氧化物酶标记的抗兔二抗 (ab6721) 购自英国 Abcam 公司,GAPDH 一抗 (G8795) 及其过氧化物酶标记的抗小鼠二抗 (A8786)购自美国 Sigma 公司。

1.2　方法

1.2.1　原代乳鼠心肌细胞培养

无菌条件下取出新生 1~3 d SD 乳鼠心脏,留取心室,充分剪碎,多次 0.06%胰酶消化完全后,差速贴壁法去除大部分成纤维细胞,随后用含 15%新生牛血清及 100 U/ml 青/链霉素的 DMEM 培养液将心肌细胞悬浮, 以 1×10^6 个/cm^2 接种于六孔板,37℃,5% CO_2 培养箱中培养, 并加用 0.1 mmol/L Brdu 抑制成纤维细胞生长,48~72 h 达到单层同步搏动后,建立缺氧/复氧模型并行药物干预[11]。

1.2.2　缺氧/复氧模型建立及 As-IV 干预

预先用混合氮气 (95%N_2 及 5%CO_2) 对无糖 Hank's 溶液充气 20 min, 后用该溶液替换 DMEM 培养液, 并置于含 95%N_2 及 5%CO_2 的培养箱中以模拟缺氧条件。待缺氧处理 6 h 后,用含 15%新生牛血清的 DMEM 培养液替换无糖 Hank's 液以模拟复氧条件 3 h,设为缺氧/复氧(H/R)组。缺氧/复氧+As-IV(H/R+As-IV)组在相同缺氧/复氧条件下加入 As-IV,终浓度为 30 μmol/L。正常对照组(Control)用含 15%新生牛血清的 DMEM 培养液在 5% CO_2 培养箱中培养,6 h 后换液 1 次[10]。

1.2.3　CK-MB 测定

CK-MB 是心肌损伤标志物,培养心肌细胞受损后亦可释放至培养上清。分别收集各组缺氧 6 h 及复氧 3 h 后培养的心肌细胞上清,2 000 r/min 离心 20 min 后取上清, 生化分析仪免疫抑制法检测 CK-MB,以各组两个时间点含量之和为测定结果。

1.2.4　SERCA2a 活性检测

SERCA2a 活性的检测按照 Larsen 的 4-硝基酚磷酸二钠(p-NPP)法改进后进行[12]。收集培养心肌细胞, 用 4℃的匀浆缓冲液 (20 mmol/L Hepes,2 mmol/L EDTA,250 mmol/L 蔗糖)匀浆,12 000 r/min 离心20 min 后收集上清进行蛋白定量及 SERCA2a 活性检测。10 μl 上清加入 80 μl 反应体系(1.25 mmol/L $MgCl_2$,0.00125% TritonX-100,0.125 mol/L KCl,1.25 mmol/L EGTA,10 mmol/L Hepes,含或不含 1 mmol/L $CaCl_2$) 中,37℃孵育 10 min 后加入 100 mmol/L p-NPP 10 μl, 再孵育 30 min 后加入 100 μl 反应终止液 (500 mmol/L Tris,55 mmol/L EDTA), 用分光光度计在波长 405 nm 处阅读反应产生的 4-硝基酚(p-NP)光密度值,并通过 p-NP 标准曲线进行换算。SERCA2a 活性用每分钟每克蛋白产生的 p-NP 的微摩尔数[μmol/(g.min)]表示。

1.2.5　Real-Time PCR 半定量检测 PKA-Cα mRNA 表达

用 TRIzol 试剂盒提取各组培养细胞总 RNA。逆转录：RNA 1 μg，37℃ 15 min，85℃ 5 s。扩增条件：95℃ 30 s；95℃ 5 s，60℃ 30 s 40 个循环。目的基因是 PKA-Cα，GAPDH 作为内参基因，它们的上下游引物分别为：PKA-Cα 上游引物 5′-GGATTGGGAG-GTTCAGTG-3′，下游引物 5′-GCTTT-GTTGTAGC-CTTTGC-3′，GAPDH 上游引物 5′-GCA-AGTTCAATGGCACAG-3′，下游引物 5′-CATTTGA-TGTTAGCGGGAT-3′。以 $2^{-\Delta ct}$ 法分析结果。

1.2.6　Western blot 半定量检测 Ser^{16}-PLN 蛋白表达

用细胞裂解液（含 1 mmol/L PMSF）提取细胞总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。5%~12% SDS-PAGE 电泳：上样量 50 μg，PVDF 膜转移，5%脱脂牛奶 TBST 溶液封闭 2 h。一抗 4℃孵育过夜，二抗室温 1 h，ECL 发光液进行反应，并用化学发光成像系统成像。利用 Gel-pro.analyzer 软件扫描条带，以目的条带对同一标本的 GAPDH 条带灰度比值作为此标本半定量结果。抗体分别是 Ser^{16}-PLN 一抗（0.5 μg/ml）、抗兔二抗（1∶5 000）、GAPDH 一抗（1∶3 000）、抗小鼠二抗（1∶2 000）[13]。

1.3　统计学方法

计量数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，用 SPSS 软件对计量资料进行单因素方差分析（one-way ANOVA），并用 post hoc tests 进行两两比较，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　As-IV 降低缺氧/复氧引起的培养心肌细胞损伤标志物 CK-MB 的释放

与正常对照组比，缺氧 3 h 及复氧 6 h 均可引起培养心肌细胞 CK-MB 释放增加，缺氧/复氧 CK-MB 释放总量具统计学差异［H/R 组（16.18 ± 2.90）IU/L vs Control 组（8.40 ± 0.62）IU/L，$P < 0.01$］，而在缺氧/复氧条件下，As-IV 干预组培养心肌细胞 CK-MB 释放较缺氧/复氧组减少［H/R+As-IV 组（10.70 ± 2.10）IU/L，$P < 0.01$，表 1］。

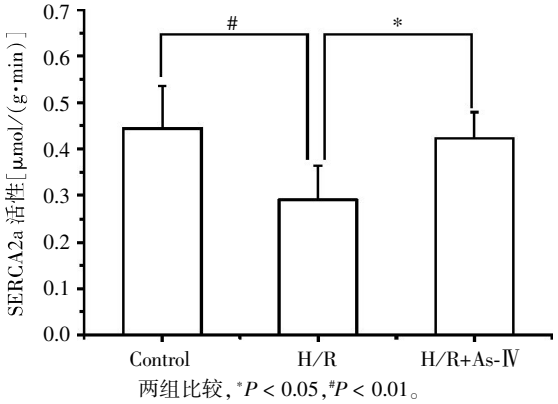
2.2　As-IV 增高缺氧/复氧引起的培养心肌细胞 SERCA2a 活性降低

与正常对照组比，缺氧/复氧损伤引起培养心肌细胞 SERCA2a 活性降低约 35%，差异有统计学意义（$P < 0.01$）；而与 H/R 组相比，加用 As-IV 干预可抑制 SERCA2a 活性降低（$P < 0.05$），SERCA2a 活性基本恢复正常水平（图 1）。

表 1　培养心肌细胞上清 CK-MB 测定

Table 1　Determination of CK-MB in cultured cardiomyocytes supernatant　（IU/L）

组别	CK-MB		
	缺氧 6 h	复氧 3 h	总和
Control 组	4.50 ± 0.50	3.90 ± 0.26	8.40 ± 0.62
H/R 组	10.83 ± 3.45	5.35 ± 0.67	16.18 ± 2.90
H/R+As-IV 组	6.18 ± 2.11	4.53 ± 0.38	10.70 ± 2.10



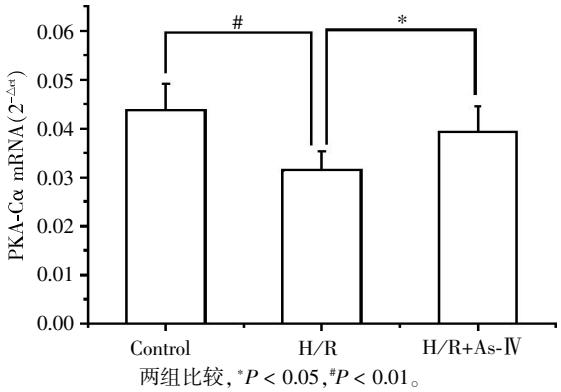
两组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{\#}P < 0.01$。

图 1　培养心肌细胞 SERCA2a 活性检测（n=5）

Figure 1　Measurement of cultured cardiomyocytes SERCA2a activities（n=5）

2.3　As-Ⅳ对 PKA-Cα 基因表达的作用

与正常对照组比，缺氧/复氧损伤可引起培养心肌细胞 PKA-Cα 基因表达下调约 28%（$P < 0.01$），而与 H/R 组相比，加用 As-Ⅳ干预可上调 PKA-Cα 基因表达约 25%（$P < 0.05$，图 2）。



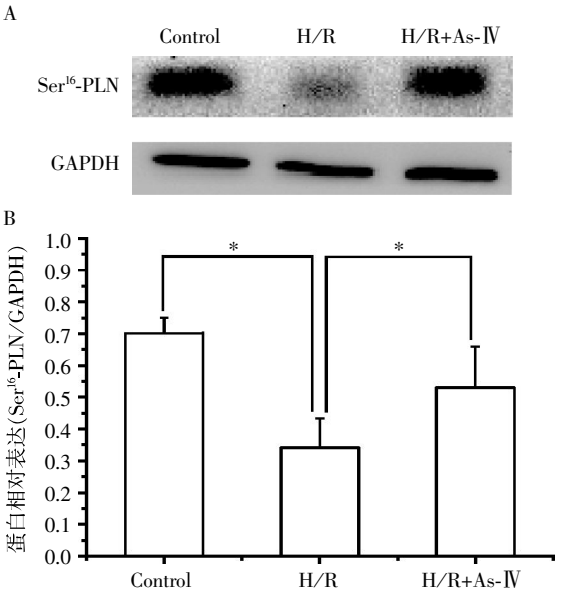
两组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{\#}P < 0.01$。

图 2　培养心肌细胞 PKA-Cα 基因表达变化（n=6）

Figure 2　Changes of cultured cardiomyocytes PKA-Cα gene expression（n=6）

2.4　As-Ⅳ对 Ser^{16}-PLN 蛋白表达的作用

与正常对照组比，缺氧/复氧损伤可引起培养心肌细胞 Ser^{16}-PLN 蛋白表达降低约 51%（$P < 0.01$），而与 H/R 组相比，加用 As-IV 干预可增高 Ser^{16}-PLN 蛋白表达水平（$P < 0.01$，图 3）。



A:Ser^{16}-PLN 及 GAPDH 蛋白 Western blot 检测条带;B:Ser^{16}-PLN 蛋白半定量结果(n=5),两组比较,$^*P < 0.01$。

图 3　培养心肌细胞 Ser^{16}-PLN 蛋白表达变化

Figure 3　Changes of cultured cardiomyocytes Ser^{16}-PLN protein expression

3　讨　论

As-IV 是黄芪具有心血管药理活性的主要有效成分之一,文献报道其具有心肌保护作用,且机制可能与上调 SERCA2a 的活性及表达有关,但尚无关于 SERCA2a 上游调控机制的研究[10,14,15]。因 PKA 可以通过 Ser^{16} 磷酸化 PLN,进而增强 SERCA2a 的功能,故本研究欲证实 As-IV 是否可通过 PKA 途径调控 SERCA2a,从而减轻心肌损伤。

本研究利用原代培养乳鼠心肌细胞,建立缺氧/复氧模型,检测培养心肌细胞上清心肌损伤标志物 CK-MB 含量[16],缺氧/复氧引起 CK-MB 增高,而 As-IV 干预可降低 CK-MB 增高的程度,提示模型建立成功,并证实 As-IV 具有心肌保护作用。同时,本研究结果提示 As-IV 可逆转缺氧/复氧损伤所致的心肌细胞 SERCA2a 活性降低,结果与文献报道一致[10]。进一步检测结果提示 H/R 可引起 PKA-Cα 基因表达下调,其对应的 Ser^{16}-PLN 蛋白表达下调,而 As-IV 干预可明显上调 PKA-Cα 基因及 Ser^{16}-PLN 蛋白表达。由此,我们可以初步得出结论:As-IV 保护缺氧/复氧所致心肌细胞损伤的机制可通过上调 PKA-Cα 基因表达,提高 Ser^{16} PLN 磷酸化水平,解除对 SERCA2a 的抑制,增强 SERCA2a 功能。

本研究只检测 PKA-Cα 基因的表达,PKA-Cα 是 PKA 催化亚单位(C)编码基因之一。其他 C 单位编码基因 PKA-Cβ、PKA-Cγ 以及 PKA 调控亚单位(PKA-R)相关基因的表达尚不清楚,需深入研究。此外,除 PKA 可以磷酸化 PLN 外,CaMKⅡ可以从第 17 位苏氨酸(Thr17)磷酸化 PLN,并在心脏的生理及病理过程中也发挥重要作用[17],As-IV 是否还通过 CaMKⅡ通路实现心肌保护作用还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Gupta D,Palma J,Molina E,et al. Improved exercise capacity and reduced systemic inflammation after adenoviral-mediated SERCA-2a gene transfer [J]. J Surg Res,2008,145(2):257-265

[2] Xin W,Li X,Lu X,et al. Improved cardiac function after sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase gene transfer in a heart failure model induced by chronic myocardial ischaemia[J]. Acta Cardiol,2011,66(1):57-64

[3] Periasamy M,Bhupathy P,Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology[J]. Cardiovasc Res,2008,77(2):265-273

[4] Simmerman H,Collins J,Theibert J,et al. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains [J]. J Biol Chem,1986,261(28):13333-13341

[5] Wegener A,Simmerman H,Lindemann J,et al. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation [J]. J Biol Chem,1989,264(19):11468-11474

[6] Sande JB,Sjaastad I,Hoen IB,et al. Reduced level of serine16 phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium:a major contributor to reduced SERCA2 activity[J]. Cardiovasc Res,2002,53(2):382-391

[7] Chen X,Meng D,Feng L,et al. Protective effect of astragalosides on myocardial injury by isoproterenol in SD rats [J]. Am J Chin Med,2006,34(6):1015-1025

[8] Zhang W,Chen H,Zhang C,et al. Astragaloside IV from Astragalus membranaceus shows cardioprotection during myocardial ischemia in vivo and *in vitro*[J]. Planta Med,2006,72(1):4-8

[9] 石海莲,马春来,刘　燕,等.黄芪皂苷甲抑制压力过载型心肌肥厚大鼠肾素-血管紧张素的过度激活[J].中国中药杂志,2009,34(24):3242-3245

[10] Xu X,Chen X,Ji H,et al. Astragaloside IV improved intracellular calcium handling in hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes via the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase [J]. Pharmacology,2008,81(4):325-332

[11] Zheng X,HU S. Effects of simvastatin on cardiac performance and expression of sarcoplasmic reticular calcium regulatory proteins in rat heart [J]. Acta Pharmacologica Sinica,2005,26(6):696-704

[12] Larsen J,Kjeldsen K. Quantification in crude homogenates of rat myocardial Na^+,K^+ and Ca^{2+} -ATPase by K^+ and Ca^{2+}-dependent pNPPase. Age-dependent changes [J]. Basic Res Cardiol,1995,90(4):323-331

[13] Kohr MJ,Wang H,Wheeler DG,et al. Targeting of phospholamban by peroxynitrite decreases β-adrenergic stimulation in cardiomyocytes [J]. Cardiovasc Res,2008,77(2):353-361

[14] Xu X,Ji H,Gu S,et al. Cardioprotective effects of Astragali Radix against isoproterenol-induced myocardial injury in rats and its possible mechanism [J]. Phytother Res,2008,22(3):389-394

[15] 周红敏,晋玉章,谢文利,等. 黄芪苷 IV 对血管紧张素 II 诱导新生大鼠心肌细胞肥大的保护作用[J]. 中国药理学通报,2009,25(10):1330-1334

[16] Ajmani P,Yadav H,Singh M,et al. Possible involvement of coveolin in attenuation of cardioprotective effect of ischemic preconditioning in diabetic rat heart [J]. BMC Cardiovascular Disorders,2011,11(1):43-52

[17] Mattiazzi A,Mundina-Weilenmann C,Vittone L,et al. The importance of the Thr17 residue of phospholamban as a phosphorylation site under physiological and pathological conditions[J]. Braz J Med Biol Res,2006,39(5):563-572

[收稿日期] 2011-09-28

Journal of Biomedical Research (生物医学研究杂志)简介

Journal of Biomedical Research (生物医学研究杂志), 是一本生物医学专业的英语杂志,全球发行,目前已经被 Scopus, 哥白尼和荷兰文摘等数据库收录, 在中国南京和美国加州戴维斯市设有办事处。本刊是一本综合性期刊,欢迎多学科尤其是交叉学科的来稿。本刊接受综述(以约稿为主), 论著和病例报道,无版面费,欢迎广大作者来稿。

地　　址: 江苏省南京市汉中路 140 号 2 号楼 352 室
电　　话: 025-86862036
邮　　箱: jbr@njmu.edu.cn
主　　页: http://www.jbr-pub.org
投稿网址: http://mc03.manuscriptcentral.com/jbrint.