

降钙素基因相关肽通过 PKC-mitoK_{ATP} 通路抑制缺氧 / 复氧诱导的 caspase-3 和 caspase-9 酶活性升高

程雪赟¹ 原大江²

¹山西医科大学麻醉学系,太原 030001;²山西医科大学第二附属医院重症医学科,太原 030001

通信作者:原大江,Email: yuandajiang@sina.com

【摘要】目的 研究降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)对缺氧/复氧(anoxia/reoxygenation, A/R)诱导大鼠心肌细胞凋亡的影响及其相关的信号转导通路。**方法** 选用 60 只健康 1~3 d 龄 SD 大鼠,建立心肌细胞体外原代培养模型,采用随机数字表法将心肌细胞分成 10 组,并进行分组实验(每组 6 孔):① 对照组;② A/R 组;③ CGRP 组(CGRP+A/R 组);④ 特异性 CGRP 受体阻滞剂组(CGRP₈₋₃₇+CGRP+A/R 组);⑤ 线粒体 ATP 敏感性钾通道(ATP sensitive potassium channel, K_{ATP})阻滞剂组(5-HD+CGRP+A/R 组);⑥ 线粒体 K_{ATP} 激动剂组(DZ+A/R 组);⑦ 蛋白激酶 A 阻滞剂组(H-89+CGRP+A/R 组);⑧ 蛋白激酶 C 阻滞剂组(chelerythine+CGRP+A/R 组);⑨ 非特异性 K_{ATP} 阻滞剂组(glibenclamide+CGRP+A/R 组);⑩ 细胞膜 K_{ATP} 阻滞剂组(HMR-1098+CGRP+A/R 组)。采用分光光度法分别检测各组心肌细胞 A/R 损伤后 caspase-3、caspase-9 酶活性。**结果** 与对照组比较,A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性均明显升高($P<0.05$)。与 A/R 组比较,CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性均明显降低($P<0.05$),使用 10⁻⁶ mol/L CGRP₈₋₃₇ 阻滞剂该作用可被逆转($P<0.05$)。此外,与 A/R 组比较,DZ+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性均明显降低($P<0.05$)。与 CGRP+A/R 组比较,glibenclamide+CGRP+A/R 组和 5-HD+CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性均明显升高($P<0.05$),而 HMR-1098+CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性并未明显升高($P>0.05$)。与 CGRP+A/R 组比较,chelerythine+CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性出现明显升高($P<0.05$),H-89+CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性有升高的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** CGRP 主要通过激活蛋白激酶 C-线粒体敏感性钾通道(protein kinase C-mitochondrial K_{ATP}, PKC-mitoK_{ATP}),降低凋亡蛋白酶 caspase-3、caspase-9 的表达,来减轻心肌细胞 A/R 损伤,发挥抗心肌细胞凋亡作用。

【关键词】 降钙素基因相关肽; 缺氧/复氧损伤; ATP 敏感性钾通道; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; 心肌细胞

基金项目: 山西省自然科学基金(2014011040-1)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.02.003

Calcitonin gene-related peptide inhibits anoxia/reoxygenation-induced increases in the enzymatic activity of caspase-3 and caspase-9 through the protein kinase C-mitochondrial ATP sensitive potassium channel pathway

Cheng Xueyun¹, Yuan Dajiang²

¹Department of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; ²Department of ICU, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Yuan Dajiang, Email: yuandajiang@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the apoptosis of rat cardiomyocytes induced by anoxia/reoxygenation (A/R) and its related signaling pathways. **Methods** A total of 60 male healthy SD rats aging 1 d to 3 d were selected to establish a primary model of cardiomyocytes in vitro. The animals were randomly divided ten groups before A/R experiments ($n=6$): ① a control group, ② an A/R group, ③ a CGRP+A/R group, ④ a CGRP₈₋₃₇+CGRP+A/R group, ⑤ an 5-HD+CGRP+A/R group, ⑥ a DZ+A/R group, ⑦ an H-89+CGRP+A/R group, ⑧ a chelerythine+CGRP+A/R group, ⑨ a glibenclamide+CGRP+A/R group and ⑩ an HMR-1098+CGRP+A/R group. The activities of caspase-3 and caspase-9 were measured by spectrophotometry. **Results** Compared with the control group, the A/R group showed significantly increased activities of caspase-3 and caspase-9 ($P<0.05$). Compared with the A/R group, the CGRP+A/R group demonstrated significantly decreased activities of caspase-3 and caspase-9 ($P<0.05$), which were reversed by the treatment of 10⁻⁶mol/L CGRP₈₋₃₇ ($P<0.05$). In addition, the activities of caspase-3 and caspase-9 in the DZ+A/R group was remarkably lower than those in the A/R group ($P<0.05$). Compared with the CGRP+A/R group, the glibenclamide+CGRP+A/R and 5-HD+CGRP+A/R groups demonstrated significantly increased activities of caspase-3 and caspase-9 ($P<0.05$), while not significant increases were found in the activities of caspase-3 and caspase-9

in the HMR-1098+CGRP+A/R group ($P>0.05$). Compared with the CGRP+A/R group, the chelerythine+CGRP+A/R group produced significantly increased activities of caspase-3 and caspase-9 ($P<0.05$), while the activities of caspase-3 and caspase-9 in the H-89+CGRP+A/R group were slightly increased without statistical differences ($P>0.05$). **Conclusions** CGRP relieves cardiomyocyte A/R injury and plays an important role in cardiomyocyte apoptosis by activating protein kinase C-mitochondrial ATP sensitive potassium channel and decreasing the expression of caspase-3 and caspase-9.

【Key words】 Calcitonin gene-related peptide; Anoxia-reoxygenation injury; ATP sensitive potassium channel; Caspases; Cardiomyocytes

Fund program: National Natural Science Foundation of Shanxi (2014011040-1)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.02.003

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 广泛分布于心血管系统中, 能够调节血管舒缩及局部血流, 被证实是一种很强的血管扩张剂^[1-3]。CGRP 可以使冠状动脉灌注压降低, 冠状动脉血流量增加, 具有明显的正性肌力和正性变时作用。因此, 通过对 CGRP 在心血管系统中作用机制的研究将对临床上治疗缺血/缺氧性心血管疾病提供帮助。目前有研究表明, CGRP 与其受体结合, 通过 G 蛋白参与一系列生化反应, 激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC), 并磷酸化下游靶蛋白, 发挥其生物学效应。此外, 在对心肌缺氧/复氧 (anoxia/reoxygenation, A/R) 损伤的研究中发现, 心肌细胞存在细胞膜 ATP 敏感性钾通道 (sarcolemmal ATP sensitive potassium channel, sarcK_{ATP}) 和线粒体 ATP 敏感性钾通道 (mitochondrial ATP sensitive potassium channel, mitoK_{ATP})^[4]。sarcK_{ATP} 的激活可以缩短心肌动作电位, 减少心肌缺血/再灌注后心律失常的发生, 同时可以减少 Ca²⁺ 内流, 降低心肌细胞耗氧量, 降低心肌细胞的凋亡, 起到保护心肌的作用^[5]。mitoK_{ATP} 可引起内向整流性 K⁺ 电流, 该电流有利于稳定线粒体的膜电位, 预防心肌细胞线粒体钙超载^[6]。有研究表明, 缺血预处理可能通过各种触发因子激活蛋白激酶, 使 ATP 敏感性钾通道 (ATP sensitive potassium channel, K_{ATP}) 开放介导的信号系统对心肌产生保护作用。但有关 CGRP 对 A/R 诱导大鼠心肌细胞凋亡的影响及其相关信号通路所知甚少, 是否与蛋白激酶和 K_{ATP} 有关, 本研究拟对此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

二氧化碳培养箱 (型号: 800WJ3423, Thermo Forma, 美国), 保温干燥箱 (型号: DHG-781, 湖北省

黄石市医疗器械厂), 奥林巴斯显微镜 (型号: BX-51, 株式会社 TKO 仪器厂, 日本), 奥林巴斯倒置显微镜 (型号: IX71, 株式会社 TKO 仪器厂, 日本), 恒温水浴锅 (型号: SSY-H, 上海三申医疗器械有限公司), 低温离心机 (型号: 2-16PK, Sigma-aldrich 公司, 美国), 酶标仪 (型号: Thermo Multiskan Ascent microplate spectrophotometer, Thermo Electron 公司, 美国)。

II 型胶原酶 (Sigma-Aldrich 公司, 美国), 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-BrdU, Sigma-Aldrich 公司, 美国), 杜尔伯科极限必需培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, Gibco 公司, 美国), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), CGRP (生产批号: 066K4799, Sigma-Aldrich 公司, 美国), 特异性 CGRP 受体阻滞剂 (CGRP₈₋₃₇, 生产批号: 098K4812, Sigma-Aldrich 公司, 美国), 蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 阻滞剂 (H-89, 碧云天生物技术有限公司), PKC 阻滞剂 (chelerythine, 碧云天生物技术有限公司), mitoK_{ATP} 特异性阻滞剂 [5-羟基癸酸 (5-hydroxydecanoate, 5-HD), 武汉博士德生物公司], mitoK_{ATP} 激动剂 [二氮嗪 (diazoxide, DZ), 武汉博士德生物公司], K_{ATP} 非特异性阻滞剂格列本脲 (glibenclamide, 生产批号: SLBC7951V, Sigma-Aldrich 公司, 美国), sarcK_{ATP} 特异性阻滞剂 (HMR-1098, Axon Medchem 公司, 荷兰), caspase-3 活性检测试剂盒 (生产批号: 070616160928, 碧云天生物技术有限公司), caspase-9 活性检测试剂盒 (生产批号: 12161560223, 碧云天生物技术有限公司), Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (生产批号: 103015160303, 碧云天生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠心肌细胞培养

本实验经山西医科大学伦理委员会批准通过,

实验操作符合山西医科大学有关动物实验的相关规定。新生 1~3 d 的 SD 大鼠(由山西医科大学实验动物中心提供),于无菌环境下开胸取出心脏,修剪留取心室肌组织,用 II 型胶原酶进行消化,将心室肌细胞按 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 6 孔细胞培养板中,在含有 10%胎牛血清和 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 5-BrdU 的 DMEM 培养基中进行原代培养。

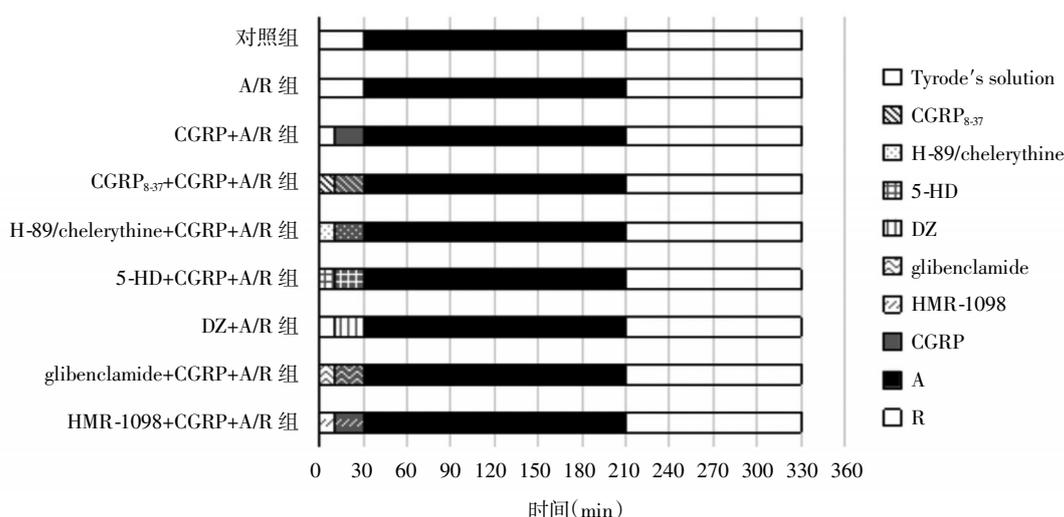
1.2.2 心肌细胞 A/R 模型建立

采用培养 72 h 生长接近融合状态且搏动良好的心肌细胞建立 A/R 模型。细胞培养板每孔都换入预先用高纯氮气饱和 2 h 的缺氧液 [NaH_2PO_4 0.9 mmol/L, NaHCO_3 6.0 mmol/L, CaCl_2 1.0 mmol/L, MgSO_4 1.2 mmol/L, 乳酸钠 40 mmol/L, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 20 mmol/L, NaCl 98.5 mmol/L, KCl 10.0 mmol/L, pH 6.8, 37°C],放入 37°C 孵箱孵育 3 h,进行缺氧;期间缺氧盒内持续通入高纯氮气(1 L/min),排气口接水封。缺氧结束后更换复氧液(NaH_2PO_4 0.9 mmol/L, NaHCO_3 20.0 mmol/L, CaCl_2 1.0 mmol/L, MgSO_4 1.2 mmol/L, 葡萄糖 5.5 mmol/L, HEPES 20 mmol/L, NaCl 129.5 mmol/L, KCl 5.0 mmol/L, pH 7.4, 37°C),放入 37°C 孵箱孵育 2 h,进行复氧。然后进行分离提取蛋白。

1.2.3 实验分组及处理

培养 72 h 的心肌细胞,选取搏动良好的 60 孔细胞进行实验,并采用随机数字表法分成 10 组(每

组 6 孔): ① 对照组,不进行 A/R 处理,正常情况下持续培养; ② A/R 组,进行 A/R 处理; ③ CGRP 组(CGRP+A/R 组),缺氧前 0.5 h 给予 CGRP(10^{-8} mol/L),之后开始进行 A/R 处理; ④ 特异性 CGRP 受体阻滞剂组(CGRP₈₋₃₇+CGRP+A/R 组),缺氧前 0.5 h 给予 CGRP₈₋₃₇(10^{-6} mol/L),10 min 后给予 CGRP,之后同 A/R 组; ⑤ mitoK_{ATP} 阻滞剂组(5-HD+CGRP+A/R 组),缺氧前 0.5 h 给予 5-HD($5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$),10 min 后给予 CGRP,之后同 A/R 组; ⑥ mitoK_{ATP} 激动剂组(DZ+A/R 组),缺氧前 20 min 给予 DZ(10^{-4} mol/L),之后同 A/R 组; ⑦ PKA 阻滞剂组(H-89+CGRP+A/R 组):缺氧前 0.5 h 给予 H-89($3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$),10 min 后给予 CGRP,之后同 A/R 组; ⑧ PKC 阻滞剂组(chelerythine+CGRP+A/R 组),缺氧前 0.5 h 给予 chelerythine ($2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$),10 min 后给予 CGRP,之后同 A/R 组; ⑨ 非特异性 K_{ATP} 阻滞剂组(glibenclamide+CGRP+A/R 组),缺氧前 0.5 h 给予 glibenclamide(10^{-5} mol/L),10 min 后给予 CGRP,之后同 A/R 组; ⑩ sarcK_{ATP} 阻滞剂组(HMR-1098+CGRP+A/R 组),缺氧前 0.5 h 时给予 HMR-1098(10^{-5} mol/L),10 min 后给予 CGRP,之后同 A/R 组。各组处理情况见图 1。复氧结束刮取心肌细胞分离提取蛋白后,采用分光光度法分别检测各组心肌细胞 A/R 损伤后 caspase-3、caspase-9 酶活性。



注:CGRP:降钙素基因相关肽; PKA:蛋白激酶 A; PKC:蛋白激酶 C; mitoK_{ATP}:线粒体 ATP 敏感性钾通道; sarcK_{ATP}:细胞膜 ATP 敏感性钾通道; CGRP₈₋₃₇: 特异性 CGRP 受体阻滞剂; H-89:PKA 阻滞剂; chelerythine:PKC 阻滞剂; 5-HD:5-羟基羧酸, mitoK_{ATP} 特异性阻滞剂; DZ: 二氮嗪, mitoK_{ATP} 特异性激动剂; glibenclamide:K_{ATP} 非特异性阻滞剂; HMR-1098:sarcK_{ATP} 特异性阻滞剂; A/R: 缺氧/复氧; A/R 组: 缺氧/复氧组; CGRP+A/R 组: 降钙素基因相关肽组; CGRP₈₋₃₇+CGRP+A/R 组: 特异性 CGRP 受体阻滞剂组; H-89+CGRP+A/R 组:PKA 阻滞剂组; chelerythine+CGRP+A/R 组:PKC 阻滞剂组; 5-HD+CGRP+A/R 组: mitoK_{ATP} 阻滞剂组; DZ+A/R 组: mitoK_{ATP} 激动剂组; glibenclamide+CGRP+A/R 组: 非特异性 K_{ATP} 阻滞剂组; HMR-1098+CGRP+A/R 组: sarcK_{ATP} 阻滞剂组

图 1 实验分组及处理方法

1.3 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 18.0 进行数据分析,正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CGRP 对心肌细胞 A/R 损伤的影响

与对照组比较,A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性均明显升高($P<0.05$)。与 A/R 组比较,CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性均明显降低($P<0.05$),而使用 10^{-6} mol/L CGRP 受体阻滞剂 CGRP_{8,37} 该作用可被逆转($P<0.05$,表 1)。

表 1 各组心肌细胞 caspase-3、caspase-9 酶活性比较(mg/g, $\bar{x}\pm s$)

组别	细胞孔数 (孔)	caspase-3 酶活性	caspase-9 酶活性
对照组	6	5.50±0.42	5.65±0.55
A/R 组	6	15.17±1.00 ^a	15.73±1.15 ^a
CGRP+A/R 组	6	6.52±0.41 ^b	6.39±0.91 ^b
CGRP _{8,37} +CGRP+A/R 组	6	10.34±1.35 ^c	7.92±0.85 ^c
H-89+CGRP+A/R 组	6	7.20±0.86	7.01±0.27
chelerythine+CGRP+A/R 组	6	8.48±0.83 ^c	8.47±1.15 ^c
5-HD+CGRP+A/R 组	6	14.85±1.06 ^c	16.32±0.77 ^c
DZ+A/R 组	6	9.66±0.83 ^b	8.92±0.84 ^b
glibenclamide+CGRP+A/R 组	6	15.92±1.36 ^c	16.60±1.18 ^c
HMR-1098+CGRP+A/R 组	6	7.11±0.33	7.10±0.54

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 A/R 组比较,^b $P<0.05$;与 CGRP+A/R 组比较,^c $P<0.05$;CGRP:降钙素基因相关肽;PKA:蛋白激酶 A;PKC:蛋白激酶 C;mitoK_{ATP}:线粒体 ATP 敏感性钾通道;sarcK_{ATP}:细胞膜 ATP 敏感性钾通道;CGRP_{8,37}:特异性 CGRP 受体阻滞剂;H-89:PKA 阻滞剂;chelerythine:PKC 阻滞剂;5-HD:5-羟基羧酸,mitoK_{ATP} 特异性阻滞剂;DZ:二氮嗪,mitoK_{ATP} 特异性激动剂;glibenclamide;K_{ATP} 非特异性阻滞剂;HMR-1098:sarcK_{ATP} 特异性阻滞剂;A/R:缺氧/复氧;A/R 组:缺氧/复氧组;CGRP+A/R 组:降钙素基因相关肽组;CGRP_{8,37}+CGRP+A/R 组:特异性 CGRP 受体阻滞剂组;H-89+CGRP+A/R 组:PKA 阻滞剂组;chelerythine+CGRP+A/R 组:PKC 阻滞剂组;5-HD+CGRP+A/R 组:mitoK_{ATP} 阻滞剂组;DZ+A/R 组:mitoK_{ATP} 激动剂组;glibenclamide+CGRP+A/R 组:非特异性 K_{ATP} 阻滞剂组;HMR-1098+CGRP+A/R 组:sarcK_{ATP} 阻滞剂组

2.2 mitoK_{ATP} 在心肌细胞 A/R 损伤中的作用

与 A/R 组比较,DZ+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性均明显降低($P<0.05$,表 1)。

2.3 CGRP 对 mitoK_{ATP} 的影响

与 CGRP+A/R 组比较,glibenclamide+CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性均明显

升高($P<0.05$);但 HMR-1098+CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性并未明显升高,差异无统计学意义($P>0.05$)。此外,5-HD+CGRP+A/R 组与 CGRP+A/R 组比较,心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性则明显升高($P<0.05$,表 1)。

2.4 H-89 和 chelerythine 对 CGRP 激活 mitoK_{ATP} 的影响

与 CGRP+A/R 组比较,H-89+CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性均有升高的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$),chelerythine+CGRP+A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性出现明显升高($P<0.05$,表 1)。

3 讨论

大量前期研究显示,在离体大鼠心脏缺血/再灌注的模型中,CGRP 可明显降低心律失常的发生率,减少心肌梗死面积,起到心肌保护作用^[7-8]。

细胞凋亡的过程是多基因严格控制的,一般来说诱发凋亡的信号转导途径可以分为外部死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径^[9]。大量研究认为,caspase-3 是哺乳动物中介导凋亡的中心环节,又被称为“死亡蛋白酶”,反映线粒体途径和非线粒体途径中细胞凋亡情况的关键蛋白酶^[10]。通过检测 caspase-3 酶活性的变化可反映 CGRP 对经过 A/R 损伤的大鼠心肌细胞的作用及其与 sarcK_{ATP}/mitoK_{ATP} 的相关性。caspase-9 是主要介导线粒体凋亡途径的效应蛋白酶,因此检测 caspase-9 酶活性的变化可以排除非线粒体凋亡途径的干扰,单独反映 CGRP 对 A/R 心肌细胞的作用与 mitoK_{ATP} 的相关性。

本研究结果表明,在 A/R 损伤的心肌细胞中,凋亡蛋白酶 caspase-3、caspase-9 的表达明显增强;而在缺氧前给予 CGRP 干预的心肌细胞中,caspase-3、caspase-9 表达明显减弱;CGRP_{8,37} 受体阻滞剂可逆转 CGRP 的这种抑制凋亡蛋白酶的作用。这表明 CGRP 可通过与其特异性受体结合抑制 A/R 损伤的大鼠心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的活性,提示 CGRP 对心肌细胞 A/R 损伤具有保护作用。

本研究显示,预处理给予心肌细胞 mitoK_{ATP} 特异性激动剂(DZ),单纯激活 mitoK_{ATP} 可降低 A/R 损伤后的心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的活性,这说明激活 mitoK_{ATP} 可以减轻心肌细胞 A/R 的损伤,从而发挥其保护作用。在 A/R 损伤的过程中,诱导开启 mitoK_{ATP} 可以引起内向整流性 K⁺ 电流,引起线

粒体膜除极,降低线粒体的膜电位,抑制线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 开放,进而抑制细胞色素 C 等细胞凋亡诱导因子通过 mPTP 从线粒体的释放,发挥抗细胞凋亡的作用。

通过 glibenclamide +CGRP +A/R 组、5-HD +CGRP +A/R 组、HMR-1098 +CGRP +A/R 组分别与 CGRP +A/R 组比较发现,使用非特异性 K_{ATP} 阻滞剂,将 $sarcK_{ATP}/mitoK_{ATP}$ 两通道均阻断后,glibenclamide +CGRP +A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 酶活性均明显升高,但 HMR-1098 +CGRP +A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性并未明显升高,说明 $sarcK_{ATP}$ 在细胞凋亡中并未发挥主要作用。此外,5-HD +CGRP +A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性也明显升高,提示细胞凋亡增高。因此表明 CGRP 通过 K_{ATP} 来发挥其对心肌细胞 A/R 损伤的保护作用,其中 $mitoK_{ATP}$ 发挥更为关键的作用。

本实验结果显示,与 CGRP +A/R 组比较,H-89 +CGRP +A/R 组心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的酶活性只有微弱升高的趋势,而在 chelerythine +CGRP +A/R 组中,caspase-3、caspase-9 的酶活性则明显升高,说明 PKC 通路在此过程中可能发挥更为重要的作用,CGRP 在激活 $mitoK_{ATP}$ 的过程可以被 chelerythine 部分阻断。有研究发现,心肌缺血耐受与 PKC 的活化相关,在缺氧前调节 PKC 的磷酸化,可影响 $mitoK_{ATP}$ 的开放,有效隔离心脏中的 $mitoK_{ATP}$,使 $mitoK_{ATP}$ 对心肌 A/R 损伤的保护作用发生延迟^[11]。此外, $mitoK_{ATP}$ 的开放也可以反向激活 PKC,从而形成正反馈系统,使心脏的保护信号放大,以增强对心脏的保护作用,并且可以抑制活性氧的产生^[12-13];但此过程仍存在争议。

综上所述,当心肌细胞受到 A/R 损伤时,CGRP 可能通过与受体结合,激活 PKC,开启 $mitoK_{ATP}$,从而抑制了 caspase-3、caspase-9 的表达。其抗细胞凋亡的作用及详细机制过程、反馈调节系统还需进一步探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Chai W, Mehrotra S, Jan Danser AH, et al. The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in ischemic preconditioning in

isolated rat hearts[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 531(1-3): 246-253. DOI:10.1016/j.ejphar.2005.12.039.

- [2] Zhang RL, Guo Z, Wang LL, et al. Degeneration of capsaicin sensitive sensory nerves enhances myocardial injury in acute myocardial infarction in rats [J]. Int J Cardiol, 2012, 160 (1): 41-47. DOI:10.1016/j.ijcard.2011.03.025.
- [3] Tullio F, Penna C, Cabiale K, et al. Cardioprotective effects of calcitonin gene-related peptide in isolated rat heart and in H9c2 cells via redox signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 194-202. DOI:10.1016/j.biopha.2017.03.043.
- [4] Laskowski M, Kulawiak B. Topology of the mitochondrial potassium ion channels[J]. Postepy Biochem, 2016, 62(2): 199-205.
- [5] González G, Zaldívar D, Carrillo ED, et al. Pharmacological preconditioning by diazoxide downregulates cardiac L-type Ca^{2+} channels[J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(5): 1172-1185. DOI:10.1111/j.1476-5381.2010.00960.x.
- [6] Niwano S, Hirasawa S, Niwano H, et al. Cardioprotective effects of sarcolemmal and mitochondrial K-ATP channel openers in an experimental model of autoimmune myocarditis. Role of the reduction in calcium overload during acute heart failure [J]. Int Heart J, 2012, 53(2): 139-145. DOI:10.1536/ihj.53.139.
- [7] Singh A, Randhawa PK, Bali A, et al. Exploring the role of TRPV and CGRP in adenosine preconditioning and remote hind limb preconditioning-induced cardioprotection in rats [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2017, 31(2): 133-143. DOI:10.1007/s10557-017-6716-3.
- [8] 李兔平, 刘超杰, 郭政. 糖尿病大鼠心肌降钙素基因相关肽下调与心肌缺血/再灌注损伤加剧相关性研究 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2015, 36(9): 790-794. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2015.09.005.
- [9] Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(1): 58-73. DOI:10.1038/cdd.2014.137.
- [10] Visconti R, D'Adamio L. Functional cloning of genes regulating apoptosis in neuronal cells [J]. Methods Mol Biol, 2007, 399: 125-131. DOI:10.1007/978-1-59745-504-6_9.
- [11] Korge P, Honda HM, Weiss JN. Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(5): 3312-3317. DOI:10.1073/pnas.052713199.
- [12] Wu H, Wang P, Li Y, et al. Diazoxide attenuates postresuscitation brain injury in a rat model of asphyxial cardiac arrest by opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channels [J/OL]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 1253842. DOI:10.1155/2016/1253842.
- [13] Li H, Yang T, Long Z, et al. Effect of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opening on the translocation of protein kinase C epsilon in adult rat ventricular myocytes [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(2): 4516-4522. DOI:10.4238/2014.June.17.3.

(本文编辑: 华云)