

本文引用:李武平,李 婕,易 南,刘宗义,黄思琪,朱付平. 桃红四物汤对大鼠后肢缺血-再灌注损伤骨骼肌 CaMK II、PKC 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(5): 678-684.

桃红四物汤对大鼠后肢缺血-再灌注损伤骨骼肌 CaMK II、PKC 表达的影响

李武平¹,李 婕²,易 南¹,刘宗义¹,黄思琪¹,朱付平^{1*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

〔摘要〕目的 观察桃红四物汤对大鼠后肢缺血-再灌注损伤骨骼肌钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II(CaMK II)、蛋白激酶 C(PKC)表达的影响,从 Wnt/Ca²⁺信号通路角度探讨其作用机制。**方法** 取 2 月龄雄性 SD 大鼠 80 只,随机分成正常组、模型组、桃红四物汤组、阻滞剂组,每组 20 只。除正常组外,其他各组均阻断血流复制右后肢缺血-再灌注损伤模型,桃红四物汤组、阻滞剂组(FZR5、Wnt5a 阻滞剂)在造模前分别予以桃红四物汤灌胃、阻滞剂腹腔注射预处理。DAPI 法观察复灌后各组腓肠肌细胞凋亡变化;RT-qPCR 检测复灌后(0、2、4、8 h)腓肠肌 CaMK II、PKC mRNA 的表达;免疫组化(IHC)检测复灌后 8 h 腓肠肌中 CaMK II、PKC 蛋白的阳性表达。**结果** DAPI 荧光染色结果显示,与正常组比较,模型组、桃红四物汤组、阻滞剂组大鼠腓肠肌细胞凋亡率明显升高($P<0.05$);与模型组比较,桃红四物汤组和阻滞剂组大鼠腓肠肌细胞凋亡率明显降低($P<0.05$)。RT-qPCR 和 IHC 结果显示,与正常组比较,模型组、桃红四物汤组、阻滞剂组 CaMK II、PKC 蛋白和 mRNA 表达一致性上调($P<0.05$);与模型组相比,桃红四物汤组、阻滞剂组 CaMK II 蛋白和 mRNA 表达一致性下调($P<0.05$),PKC mRNA 表达下调($P<0.05$),但 PKC 蛋白表达下调不明显($P>0.05$),不同时间点显示相同倾向性。**结论** CaMK II、PKC 为大鼠肢体缺血-再灌注骨骼肌损伤中的关键蛋白,桃红四物汤可通过调控 Wnt5a/Ca²⁺信号通路下调 CaMK II 表达来减轻肢体缺血-再灌注损伤,PKC 不是 Wnt5a/Ca²⁺信号通路中桃红四物汤的主要作用靶点。

〔关键词〕 肢体缺血-再灌注损伤;Wnt5a/Ca²⁺信号通路;钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II;蛋白激酶 C;桃红四物汤

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.05.005

Effect of Taohong Siwu Decoction on Expression of CaMK II and PKC in Skeletal Muscle of Rats with Hindlimb Ischemia-reperfusion Injury

LI Wuping¹, LI Jie², YI Nan¹, LIU Zongyi¹, HUANG Siqu¹, ZHU Fuping^{1*}

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of Taohong Siwu Decoction on the expression of calmodulin dependent protein kinase II (CaMK II) and protein kinase C (PKC) in skeletal muscle of rats with hindlimb ischemia-reperfusion injury, and to explore its mechanism from the perspective of Wnt/Ca²⁺ signaling pathway. **Methods** 80 2-month-old male SD rats were randomly divided into normal group, model group, Taohong Siwu Decoction group and blocker group, with 20 rats in each group. In addition to the normal group, the right hindlimb ischemia-reperfusion injury model was established by blocking the blood flow in other groups. The Taohong Siwu Decoction group and the blocker group (FZR5, Wnt5a blocker) were treated by intragastric administration of Taohong Siwu Decoction and intraperitoneal injection of blocker respectively. DAPI method was used to observe the apoptosis of gastrocnemius muscle cells in each group after reperfusion. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of CaMKII and

〔收稿日期〕2021-01-25

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81674008);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4070);湖南省教育厅科学研究基金项目(20C1426)。

〔作者简介〕李武平,男,硕士,研究方向:中医药防治骨与关节损伤研究。

〔通讯作者〕*朱付平,男,硕士研究生导师,E-mail:zhufp120@163.com。

PKC in gastrocnemius muscle at 0, 2, 4 and 8 hours after reperfusion. Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the protein expression of CaMKII and PKC in gastrocnemius muscle at 8 hours after reperfusion. **Results** DAPI fluorescence staining results showed that, compared with the normal group, the apoptosis rate of gastrocnemius muscle cells in the model group, Taohong Siwu Decoction group and blocker group was significantly increased ($P<0.05$); compared with the model group, the apoptosis rate of gastrocnemius muscle cells in the Taohong Siwu Decoction group and the blocker group was significantly decreased ($P<0.05$). The results of RT-qPCR and IHC showed that, compared with the normal group, the protein and mRNA expression levels of CaMKII and PKC in model group, Taohong Siwu Decoction group and blocker group were up-regulated ($P<0.05$); compared with the model group, the protein and mRNA expression levels of CaMKII in Taohong Siwu Decoction group and blocker group were down-regulated ($P<0.05$), the expression of PKC mRNA was down-regulated ($P<0.05$), but the expression of PKC protein was not significantly down-regulated ($P>0.05$), and in different time points showed the same tendency. **Conclusion** CaMKII and PKC are key proteins in limb ischemia-reperfusion injury in rats, Taohong Siwu Decoction can reduce limb ischemia-reperfusion injury by regulating Wnt5a/Ca²⁺ signaling pathway and down regulating CaMKII expression, but PKC is not the main target of Taohong Siwu Decoction in Wnt5a/Ca²⁺ signaling pathway.

[**Keywords**] limb ischemia reperfusion injury; Wnt5a/Ca²⁺ signaling pathway; calmodulin dependent protein kinase II; protein kinase C; Taohong Siwu Decoction

肢体缺血-再灌注损伤(limb ischemia reperfusion injury, LIRI)是指肢体缺血一段时间后重新恢复血流灌注,组织器官的损伤程度不但没有减轻反而较缺血时不断加重,肢体功能进一步恶化的综合征,是一种临床上多发生于严重创伤后的复杂病理过程^[1];目前,医学界多认为其与脂质过氧化及氧自由基损伤、钙离子代谢紊乱、细胞凋亡、炎症反应损害等有关,在其分子病理机制研究层面,信号分子靶向调控逐渐成为研究热点^[2-3];不同于 Wnt/Ca²⁺信号通路在心、脑、肝、肾等脏器缺血-再灌注损伤方面的广泛深入研究,Wnt/Ca²⁺信号通路在 LIRI 的机制研究则鲜见报道,甚至于骨骼肌型钙调蛋白的研究也未见明显成果出现^[4],LIRI 骨骼肌损伤的具体分子机制目前也不完全清楚,中、西医均没有疗效稳定的防治方法^[5]。本课题组前期通过对不同剂量桃红四物汤预处理大鼠 LIRI 炎症反应和骨骼肌细胞凋亡的影响的研究发现:中剂量组(0.15 g/mL)为最佳剂量,可显著降低 TNF- α 和 IL-1 β 炎症因子水平,降低炎症反应和细胞凋亡,从而减轻 LIRI^[6-7]。此外,本课题组体外细胞实验研究发现:经缺氧再给氧诱导损伤的大鼠骨骼肌细胞中,钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calmodulin dependent protein kinase II, CaMK II)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的表达显著上调^[8]。作为同属于丝氨酸-苏氨酸激酶家族的 CaMK II、PKC,均是将上游病理应激信号与下游调节程序联系起来的重要信号转导介质,是细胞增殖、分化、凋亡、转换等过程中的关键调节因子^[9-10],CaMK II、PKC 在大鼠体内实验中的表达变化情况值得进一步深入研究,因此,本研究设计动物实验,制备大鼠 LIRI 骨

骼肌损伤模型,以 Wnt/Ca²⁺信号通路中上游信号分子 Wnt5a 的阻滞剂为阳性对照,通过桃红四物汤干预来观察 CaMK II、PKC 表达,从 Wnt/Ca²⁺信号通路角度进一步探讨大鼠 LIRI 骨骼肌损伤机制及桃红四物汤的干预作用,为丰富 LIRI 的病理机制和防治方法提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

取 80 只 2 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量(230 \pm 10) g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2016-0002,动物使用许可证号:SYXK(湘)2019-0002。大鼠在湖南中医药大学实验动物中心的无病原体设施中常规饲料饲养,自由饮水,饲养环境为温度 20~25 $^{\circ}$ C、相对湿度 50%~70%、光照 12 h。本实验已通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查通过[伦理审查编号:HN-LL-GZR-201609],动物福利按照国际相关实验动物法规实施。

1.2 主要药物及试剂

桃红四物汤方药:桃仁 15 g,红花 15 g,熟地黄 10 g,赤芍 10 g,当归 10 g,川芎 10 g,由湖南中医药大学第一附属医院制剂科结合现代工艺加工制成药液(规格为 250 mL/瓶,浓度为 0.15 g/mL 原料药,批号:20160408)。FZR5(20 μ g/mL,批号:20160206,美国 Sigma 公司)。

索来宝培养基(DMEM,批号:12100-500,北京索来宝科技有限公司);GIBCO 胎牛血清(FBS,批号:16000-044,北京智杰方远科技有限公司);0.25%胰蛋白酶-EDTA,(批号:T1350,北京索来宝

科技有限公司);1%青霉素+链霉素(批号:P1400,北京索来宝科技有限公司);抗 CaMK II、抗 PKC 抗体(批号:BS4773,ab19031,北京博奥森生物技术有限公司);Trizol[批号:15596-026,爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司];ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒(批号:FSQ101,东洋纺上海生物科技有限公司);SYBRPremix Ex Taq™(perfect real-time)试剂盒(批号:DRR420A,大连宝生物工程公司)。

1.3 主要仪器

酶标仪(上海培奥分析仪器有限公司);7500 实时 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司);GL16M 台式高速冷冻离心机(长沙科威实业有限公司);BD-180S 双门冷冻柜(青岛海尔冰箱通用有限公司);GL16M 台式高速冷冻离心机(长沙科威实业有限公司);BD-180S 双门冷冻柜(青岛海尔冰箱通用有限公司);NIS Elements F3.0 软件(日本东京尼康);image pro plus version 6.0(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.4 分组与模型制备

将 80 只 SD 大鼠按随机数字表分为正常组、模型组、桃红四物汤组、阻滞剂组,每组 20 只。除正常组外,其他 3 组均采用课题组前期造模方法^[6]用塑料套管和市售橡皮筋阻断 SD 大鼠右后肢血流 4 h,制造大鼠 LIRI 模型,正常组大鼠不阻断血流。

1.5 给药方法

桃红四物汤组于造模前 3 d 开始给予桃红四物汤灌胃,2 次/d,造模前 2 h 再给药 1 次,共计 7 次,具体给药剂量根据所测质量通过体表面积-剂量换算法计算得出,药物剂量浓度的选择依据课题组前期临床实验显示中剂量(0.15 g/mL 原料药)桃红四物汤为最佳药效浓度^[7],即每只大鼠每日给药剂量为 1 mL 桃红四物汤+3 mL 蒸馏水;阻滞剂组造模前 2 h 予以腹腔注射 1 mL FZR5;正常组和模型组动物在处死前不服用药物,同样的时间点给相同体积蒸馏水灌胃。

1.6 标本采集与指标检测

1.6.1 取材 在缺血再灌注 0、2、4、8 h 4 个时间点,各组随机选取 5 只大鼠,3%戊巴比妥钠(1.5 mL/kg)腹腔注射麻醉,麻醉成功后,仰卧位固定在自制大鼠手术台上,右侧后肢相应的区域剪发,复合碘消毒,沿右侧后肢长轴方向依次切开皮肤、皮下组织、深筋膜,充分显露腓肠肌肌腹组织,切取腓肠肌 100 mg,迅速用冰盐水洗净血液,滤纸吸干水份,剪刀切割剪碎后装入保存管,置于在低温冰箱(-70 ℃)保存。根据前期实验结果^[6-7],细胞凋亡情况和蛋白的表达选

择缺血再灌注损伤后腓肠肌损伤最严重的时间点(8 h)进行检测。

1.6.2 DAPI 荧光染色观察各组细胞凋亡情况 取复灌后 8 h 大鼠部分腓肠肌组织,利用 DAPI 荧光染色和激光共聚焦显微镜观察骨骼肌细胞凋亡并使用 Image-Pro Plus version 6.0 图像分析系统进行图像分析,每张图片取 5 个视野,凋亡指数=细胞核浓缩的细胞数/计算细胞总数×100%。

1.6.3 免疫组化(IHC)检测腓肠肌 CaMK II、PKC 蛋白的表达 提取复灌后 8 h 大鼠腓肠肌组织,多聚甲醛固定并切片,3%过氧化氢(H₂O₂)处理,并与 10%山羊血清预孵育,然后与抗 CaMK II、抗 PKC(1:100)抗体在 4 ℃孵育后,用 HRP 标记的 IgG 孵育样品,用二氨基联苯胺(DAB)进行显色反应,在显微镜下观察显色过程。使用 NIS Elements F3.0 软件在 200 倍放大的光学显微镜下采集图像。用 image pro plus version 6.0 单盲法测量 IHC 图像的积分光密度(IA)值以反映 CaMK II、PKC 蛋白相对表达水平。

1.6.4 RT-qPCR 检测腓肠肌 CaMK II、PKC mRNA 表达 采用 Trizol 法提取腓肠肌总 RNA,取约 100 mg 腓肠肌组织加入 Trizol 溶液,加 Oligo dT 181 μL,5x M-MLV buffer 4 μL,总 RNA 2 μL,M-MLV 1 μL,补水到 20 μL 体系,按照逆转录酶的说明书进行逆转录以获得 cDNA。PCR 反应体系:SYBR® Premix Ex Taq™(perfect real-time)试剂盒的 mix 10 μL,cDNA 1 μL,上下游引物各 1 μL(引物序列见表 1),补水到 20 μL 体系。PCR 反应条件:按照 SYBR® Premix Ex Taq™(perfect real-time)试剂盒说明进行。以 GAPDH 的相对表达为对照,测定靶基因的相对表达量,并使用 2^{-ΔΔCt} 计算目标 mRNA 的相对表达变化。ΔCt=Ct 目的基因-Ct 内参基因,ΔΔCt=ΔCt 对照组-ΔCt 样品组。

表 1 CaMK II、PKC RT-qPCR 引物序列

基因名称	产物长度/bp	引物序列(5'-3')
CaMK II	179	正向引物:TCCGACAAGAAAACCTCCGCA
		反向引物:CCTAAATCCCAATGAGAAGCCC
PKC	139	正向引物:TCCACGGACTCCAAGAGAT
		反向引物:AGTTCATCGGATCCTCTGCG
GAPDH	125	正向引物:GTTCAACGGCACAGTCAAGG
		反向引物:GACGCCAGTAGACTCCACGAC

1.7 统计学分析

实验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,采用独立样本 *t* 检验对建模前后数据进行比较,单因素方差分析(ANOVA)用于多重比较,

然后进行 Fisher 最小显著性差异检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 DAPI 荧光染色结果比较

荧光显微镜下可见正常组细胞核呈圆形或椭圆形,核形完整,染色均匀;除正常组外,其余各组均可见凋亡小体,即核碎裂成大小不等的圆形小体,并被细胞膜所包绕,细胞核边缘不规则,细胞凋亡率明显高于正常组 ($P<0.05$);桃红四物汤组、阻滞剂组细胞着色较重,核出现浓缩、呈新月形聚集于核膜一边,但细胞凋亡率明显低于模型组 ($P<0.05$)。结果见图 1、图 2。

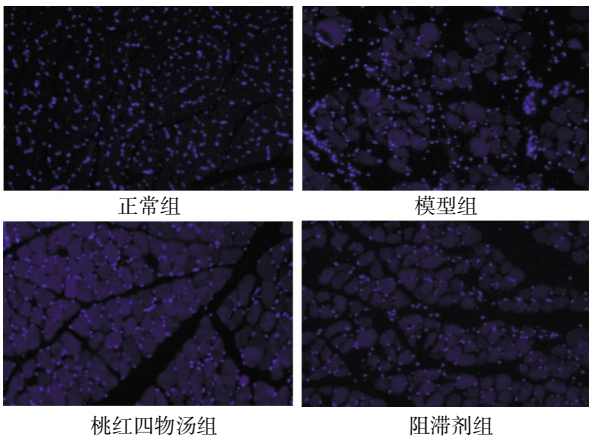
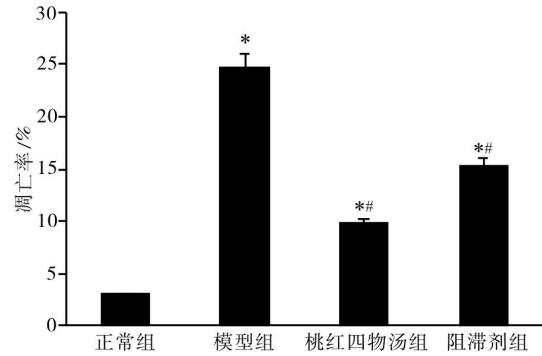


图 1 各组大鼠缺血-再灌注 8 h 后腓肠肌细胞核荧光染色图(DAPI 染色,×200)



注:正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$

图 2 各组大鼠腓肠肌缺血-再灌注 8 h 后细胞凋亡率比较

2.2 各组大鼠腓肠肌 CaMK II、PKC mRNA 表达比较

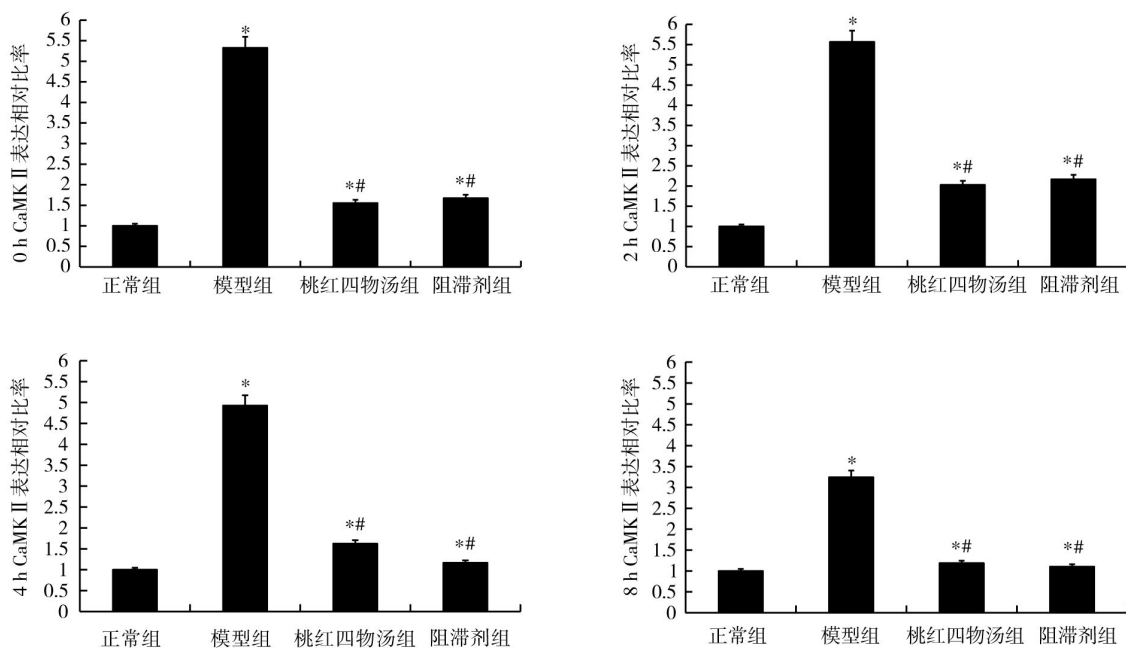
与同一时间点正常组比较,模型组、桃红四物汤组、阻滞剂组中 CaMK II、PKC mRNA 表达上调 ($P<0.05$);与同一时间点模型组比较,桃红四物汤组、阻滞剂组 CaMK II、PKC mRNA 表达下调 ($P<0.05$)。结果见图 3-4。

2.3 各组间大鼠腓肠肌 CaMK II、PKC 蛋白表达比较

与正常组比较,模型组、桃红四物汤组、阻滞剂组中 CaMK II、PKC 蛋白表达显著上调 ($P<0.05$);与模型组比较,桃红四物汤组、阻滞剂组 CaMK II 表达下调 ($P<0.05$)、PKC 表达无显著差异 ($P>0.05$)。见图 5-7。

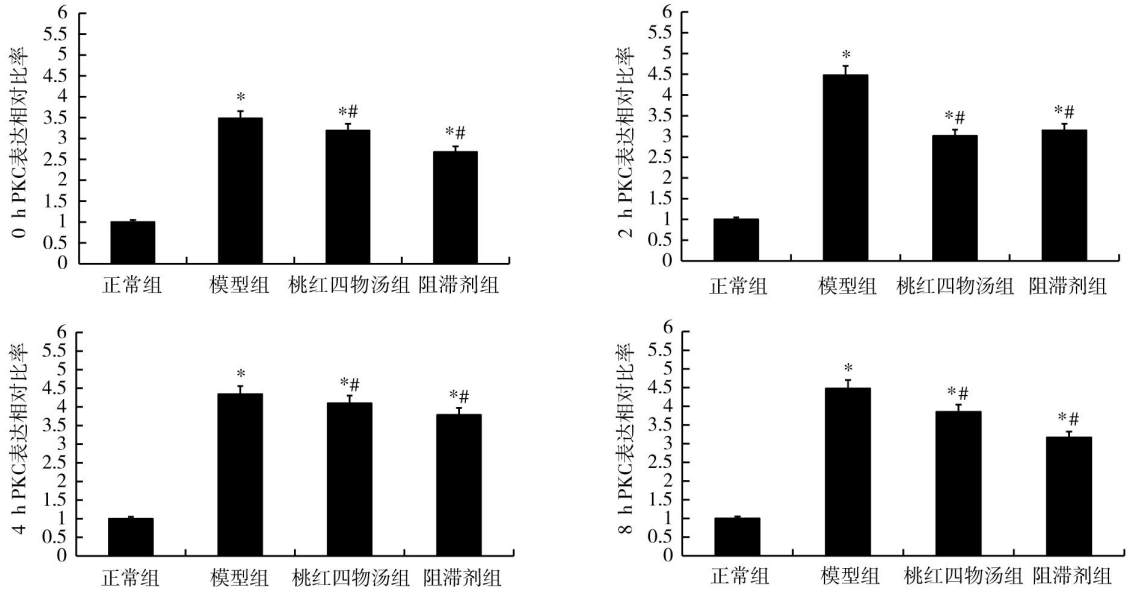
3 讨论

对于缺血-再灌注损伤的前沿研究,目前主要



注:与对照组比较,* $P<0.05$,与模型组比较,** $P<0.05$

图 3 各组间大鼠不同时间段腓肠肌 CaMK II mRNA 表达情况



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,与模型组比较,** $P < 0.05$

图 4 各组间大鼠不同时间段(0、2、4、8 h)腓肠肌 PKC II mRNA 表达比较

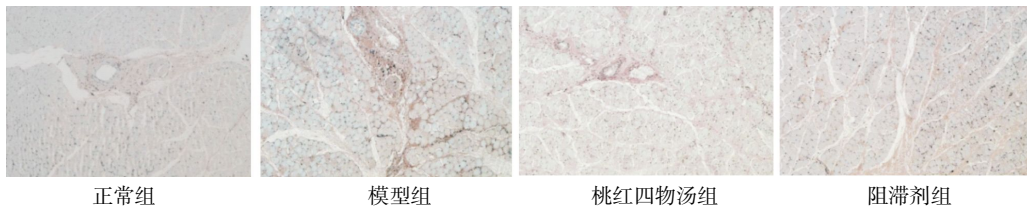


图 5 各组间大鼠腓肠肌 CaMK II 蛋白阳性表达(免疫组化,×100)

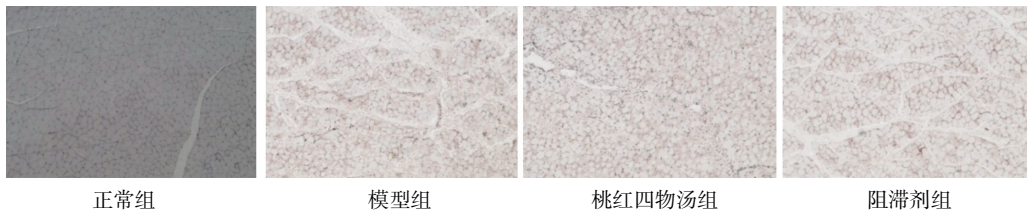
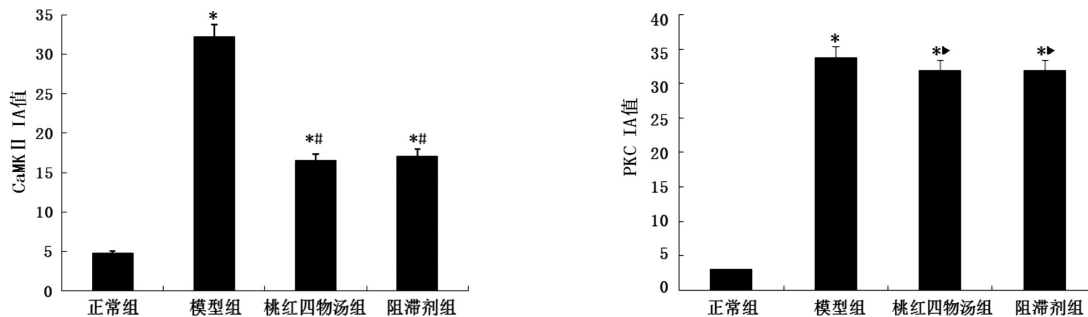


图 6 各组间大鼠腓肠肌 PKC 蛋白阳性表达(免疫组化,×100)



注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$,># $P > 0.05$

图 7 各组大鼠腓肠肌组织 CaMK II、PKC 蛋白阳性表达的积分光密度值比较($\bar{x} \pm s, IA$)

集中在心、肝、脑、肾等重要内脏器官方面,研究的热点大多集中在 Wnt/Ca²⁺通路中关键蛋白介导的细胞内钙超载以及炎症因子释放两个方面^[11-12],团队前期研究^[13]也发现 Wnt/Ca²⁺信号通路在 LIRI 钙离子代

谢及炎症反应中起着至关重要的作用;CaMK II、PKC 是 Wnt/Ca²⁺信号通路里起重要作用的两个关键蛋白,是一组可依赖于 Ca²⁺和肌醇磷脂信号激活的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在体内广泛存在,是细胞

增殖、分化、凋亡、转换等过程中的关键调节因子^[9-10], 多项研究^[14-17]发现, CaMK II、PKC 通过介导细胞内钙超载参与神经、心肌、血管平滑肌等细胞的凋亡, 而且证实降低CaMK II、PKC 的活性, 抑制钙超载发生机制可起到对受损细胞的保护作用, 降低细胞凋亡的发生率。

中医对于 LIRI 病机的认识多集中在瘀血内阻, 气血运行不畅等方面, 证属“气滞血瘀”, 而治疗则以“通行血脉”“化瘀消肿”为法, 团队前期研究^[18]发现活血化瘀类中药可以改变钙调蛋白表达的强弱从而达到减轻 LIRI 骨骼肌细胞凋亡; 桃红四物汤是中医传统活血化瘀经典方剂之一, 近期研究^[19-20]表明: 桃红四物汤及其组成中药(桃仁、红花、当归、川芎、地黄、赤芍)在临床应用以及动物实验中, 均表现出对缺血-再灌注损伤性疾病有明显干预效果。有学者^[21-22]从基因传导通路方面证实桃红四物汤对脑缺血-再灌注损伤具有保护作用。本课题组体外细胞实验研究^[8]也发现: 经缺氧再给氧诱导损伤的大鼠骨骼肌细胞中, Wnt/Ca²⁺信号通路中钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II)、蛋白激酶 C(PKC) 的表达显著上调, 而桃红四物汤预处理后可通过调控 Wnt/Ca²⁺信号通路中 Wnt5a/IP3R/CaMK II 途径来减轻 LIRI。

本研究显示: 桃红四物汤组、阻滞剂组细胞凋亡率低于模型组, 说明阻滞剂、桃红四物汤预处理可减少细胞凋亡, 从而达到减轻 LIRI 作用。RT-qPCR 和 IHC 结果显示, 与正常组相比, 各组大鼠 CaMK II、PKC 蛋白和其 mRNA 表达一致性上调($P<0.05$), 这说明 CaMK II、PKC 是 LIRI 中的关键蛋白; 与模型组相比, 桃红四物汤组、阻滞剂组 CaMK II 蛋白及其 mRNA 表达一致性下调($P<0.05$), 提示 CaMK II 是 Wnt5a/Ca²⁺信号途径的关键蛋白, 通过桃红四物汤干预可起到类似 Wnt5a/Ca²⁺信号通路阻滞剂效应下调 CaMK II 的表达从而减轻肢体缺血-再灌注损伤。与模型组比较, 桃红四物汤组、阻滞剂组 PKC mRNA 表达下调($P<0.05$), 但缺血再灌注损伤 8 h 后, 桃红四物汤组、阻滞剂组 PKC 蛋白表达和模型组比较差异无统计学意义, PKC 蛋白和其 mRNA 表达变化不一致, 这提示 PKC 不是 LIRI 过程 Wnt5a/Ca²⁺信号通路中的主要作用靶点。这一方面可能跟 PKC 调节结构域有关, 研究^[23]发现 PKC 包含

12种以上的亚型, 按照调节结构域的不同将 PKC 分为 3 类: 依赖于磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine, PS)、Ca²⁺和单酰甘油的传统型 PKC (conventional PKC, cPKC), 由 α 、 β I、 β II、 γ 等亚型组成; 仅受 DAG 调控的新型 PKC (novel PKC, nPKC), 包括 δ 、 ϵ 、 θ 、 η 等亚型; 无需 Ca²⁺和 DAG 仅能被 PS 激活的非典型型 PKC (atypical PKC, aPKC), 共有 ι 、 λ 、 ζ 、 μ 等亚型; 另一方面, 鉴于缺血-再灌注损伤复杂的病理生理机制、G 蛋白偶联受体信号转导系统的复杂性以及 Wnt/Ca²⁺通路炎症信号途径组成了繁杂的网络系统等原因, 因此, PKC 可能不是 LIRI 过程中 Wnt5a/Ca²⁺信号途径桃红四物汤的主要靶点, 与课题组前期研究的体外实验研究结果一致^[8]。此外, 本课题组主要探讨研究“基于 Wnt/Ca²⁺信号通路研究 LIRI 骨骼肌细胞凋亡机制及桃红四物汤的干预作用”, 因此, 本研究从 Wnt/Ca²⁺信号通路角度来探讨 LIRI 的分子病理机制, 在 CaMK II、PKC 基因表达水平方面设计了 0、2、4、8 h 4 个时间点进行检测, 研究显示, 各组 CaMK II、PKC mRNA 在不同再灌注时间(0、2、4、8 h)的表达显示相同的倾向性, 而本研究在设计检测分析 CaMK II、PKC 蛋白表达时, 主要以复灌后 8 h 为主要研究时间点, 同时也与本课题体外细胞实验设计保持一致。

综上所述, CaMK II、PKC 为大鼠肢体缺血-再灌注骨骼肌损伤中的关键蛋白, 桃红四物汤可通过调控 Wnt5a/Ca²⁺信号通路下调 CaMK II 表达来减轻肢体缺血-再灌注损伤, PKC 不是 Wnt5a/Ca²⁺信号通路中桃红四物汤的主要作用靶点, 这为 LIRI 骨骼肌细胞损伤的分子机制和桃红四物汤的防治作用提供实验证据。

参考文献

- [1] KLCY, ZERA, TATART, et al. Effect of picoside II on hind limb ischemia reperfusion injury in rats[J]. Drug Des Devel Ther, 2017, 11: 1917-25.
- [2] GAO X, BI Y, CHI K, et al. Glycine-nitronyl nitroxide conjugate protects human umbilical vein endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury via multiple mechanisms and ameliorates hind limb ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 488 (1): 239-246.
- [3] OZTURK L, DOGAN H T, KILICARSLAN A, et al. Effect of

- different doses of pregabalin on skeletal muscle ischaemia-reperfusion injury in rats[J]. Bratislavské Lekárske Listy, 2017, 118(7): 417-422.
- [4] 朱付平,冯先,刘金龙,等.复灌I号注射液对大鼠肢体缺血-再灌注损伤骨骼肌钙调蛋白表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志, 2012,20(4):8-10.
- [5] 朱付平,熊光仲,袁锋,等.大鼠肢体缺血-再灌注损伤早期骨骼肌钙调蛋白表达的研究[J].中国中医骨伤科杂志,2010,18(8):6-8.
- [6] 申震,朱付平,刘天举,等.桃红四物液对肢体缺血-再灌注损伤大鼠骨骼肌细胞凋亡的影响研究[J].辽宁中医杂志,2018,45(3):631-633,672-673.
- [7] 申震,朱付平,刘天举,等.桃红四物液对大鼠肢体缺血-再灌注损伤炎症因子表达的影响研究[J].中华中医药学刊,2018,36(2): 374-377.
- [8] ZHU F P, LI W P, WANG L H, et al. Tao-Hong-Si-Wu decoction reduces ischemia reperfusion rat myoblast cells calcium overloading and inflammation through the Wnt/IP3R/CAMKII pathway[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(8): 13095-13106.
- [9] ANDERSON ME, BROWN JH, BERS D M. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2011, 51(4): 468-473.
- [10] TALMAN V, PROVENZANI R, BOIJE AF GENN?S G, et al. CI domain-targeted isophthalates as protein kinase C modulators: Structure-based design, structure-activity relationships and biological activities[J]. Biochemical Society Transactions, 2014, 42(6): 1543-1549.
- [11] HUELSKEN J, BEHRENS J. The Wnt signaling pathway[J]. The Journal of Cell Science,2002,115:3977-3978.
- [12] KÜHL M, SHELDAHL L C, PARK M, et al. The Wnt/Ca²⁺ pathway: A new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape[J]. Trends in Genetics: TIG, 2000, 16(7): 279-283.
- [13] 申震,朱付平,黄勇,等.Wnt/Ca²⁺信号通路在肢体缺血/再灌注损伤机制中的研究进展[J].中国药理学通报,2018,34:1344-1347.
- [14] ROE N D, REN J. Oxidative activation of Ca²⁺/calmodulin-activated kinase II mediates ER stress-induced cardiac dysfunction and apoptosis[J]. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, 2013, 304(6): H828-H839.
- [15] ASHPOLE N M, CHAWLA A R, MARTIN M P, et al. Loss of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in cortical astrocytes decreases glutamate uptake and induces neurotoxic release of ATP[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(20): 14599-14611.
- [16] DI PIETRO N, DI TOMO P, DI SILVESTRE S, et al. Increased iNOS activity in vascular smooth muscle cells from diabetic rats: Potential role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKIIδ(2))[J]. Atherosclerosis, 2013, 226(1): 88-94.
- [17] PARK H, PARKS, JEONH, et al. Alpha B-crystallin prevents the arrhythmogenic effects of particulate matter isolated from ambient air by attenuating oxidative stress[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2013, 266(2): 267-275.
- [18] 朱付平,董克芳,范志英,等.复灌I号注射液对大鼠肢体缺血-再灌注损伤骨骼肌细胞凋亡的影响研究[J].中国中医骨伤科杂志, 2010,18(5):8-12.
- [19] 范瑞娟,罗亚非,陈永顺,等.桃红四物汤对大鼠脑缺血再灌注损伤后大脑皮质神经元 Caspase-3 与 p53 表达的影响[J].神经解剖学杂志,2015,31(6):739-745.
- [20] 孙玉凤,罗亚非,范瑞娟.桃红四物汤对雄性 SD 大鼠脑缺血再灌注损伤海马 CA1 区神经元的作用研究[J].中国民族民间医药,2015, 24(3):9-10,12.
- [21] LI L, YANG N, NIN L, et al. Chinese herbal medicine formula Tao Hong siwudecoction protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via PI3K/Akt and the Nrf2 signaling pathway[J]. Journal of Natural Medicines, 2015, 69(1): 76-85.
- [22] QI H Y, LI L, YU J, et al. Proteomic identification of Nrf2-mediated phase II enzymes critical for protection of Tao Hong Si wudecoction against oxygen glucose deprivation injury in PC12 cells[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM, 2014, 2014: 945814.
- [23] PEREZ-PINZON M A, RAVAL A P, DAVE K R. Protein kinase C and synaptic dysfunction after cardiac arrest[J]. Pathophysiology, 2005, 12(1): 29-34.

(本文编辑 苏维)