

## 紫草酸镁 B 抑制缺血/再灌注心肌细胞 c-Jun N 末端激酶 3 mRNA 的表达

杨丽敏<sup>1\*</sup>, 肖耀龙<sup>2</sup>, 欧阳家惠<sup>2</sup>

(1. 华中科技大学 同济医学院 病理学系, 湖北 武汉 430030; 2. 香港大学 药理学系, 香港)

**摘要:** 目的 探讨 c-Jun N 末端激酶 3 (c-Jun N terminal kinase 3, JNK3) 在缺血/再灌注心肌细胞损伤中的作用, 及紫草酸镁 B 对缺血/再灌注心脏具有保护作用的机制。方法 复制大鼠 Langendorff 心肌缺血/再灌注损伤模型, 用原位杂交技术检测心肌细胞 JNK3 mRNA 的表达, 并观察紫草酸镁 B 对 JNK3 表达的影响。结果 图像分析显示, 心肌缺血 30 min/再灌注 30 min 时, JNK3 表达明显高于非灌注组和对照组。0.1, 1 和 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫草酸镁 B 可以抑制缺血/再灌注时 JNK3 mRNA 的表达。结论 紫草酸镁 B 可通过抑制 JNK3 的表达以降低 JNK 的功能, 从而减少心肌细胞凋亡的发生, 对缺血/再灌注心脏产生保护作用。

**关键词:** c-Jun N 末端激酶 3; 心肌细胞; 缺血/再灌注; 紫草酸镁 B

中图分类号: R282.71; Q344.13 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)07 - 0487 - 05

## Inhibition of magnesium lithospermate B on the c-Jun N terminal kinase 3 mRNA expression in cardiomyocytes encountered ischemia/reperfusion injury

YANG Li-min<sup>1\*</sup>, XIAO Yaolong<sup>2</sup>, OU YANG Jia-hui<sup>2</sup>

(1. Department of Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

2. Department of Pharmacology, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

**Abstract:** **Aim** To study the function of c-Jun N terminal kinase 3 (JNK3) in the process of ischemic/reperfused heart injury and the mechanism underlying the protective action of magnesium lithospermate B (MTB), a bioactive compound isolated from Danshen. **Methods** By *in situ* hybridization, JNK3 mRNA was detected in the ventricular preparations of the Langendorff ischemic/reperfused rat heart. The inhibitory effect of MTB on the expression of JNK3 mRNA was also investigated. **Results** The purple and blue hybridization signals were located in the cytoplasm of the cardiomyocytes, which were weaker in the non-perfused hearts and stronger in the hearts encountered 30 min of ischemia and 30 min of reperfusion. Image analysis showed that the expression of JNK3 mRNA in the cardiomyocytes increased after 30 min of ischemia and 30 min of reperfusion, which showed significant difference compared with that in the cardiomyocytes of the non-perfused heart and the control heart ( $P < 0.05$ ). Treatment with 0.1, 1 and 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB abolished the elevation of JNK3 mRNA expression in the ischemic/reperfused heart ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** JNK3 may be another component in the signal transduction pathway of ischemia/reperfusion induced cardiomyocyte apoptosis. MTB may protect the heart from ischemia/reperfusion injury by reducing apoptosis through inhibition of the JNK3 activity.

**Key words:** c-Jun N terminal kinase 3; cardiomyocyte; ischemia/reperfusion; magnesium lithospermate B

c-Jun N 末端激酶 (c-Jun N terminal kinase, JNK) 是参与凋亡信号传导的一类重要蛋白激酶<sup>[1]</sup>。JNK

分 JNK1, JNK2 和 JNK3 3 种亚型。JNK1 和 JNK2 广泛存在于各种组织, 而 JNK3 主要存在于脑组织, 在心脏和睾丸组织中也有少量表达<sup>[1]</sup>。Hreniuk 等<sup>[2]</sup>发现, 阻断 JNK1 通路可部分抑制缺血/再灌注损伤诱导的心肌细胞凋亡的发生, 而关于 JNK3 在缺血/再灌注引发的心肌细胞凋亡过程中的作用目前尚无

收稿日期: 2002-07-14.

\* 通讯作者 Tel: 86 - 27 - 83692619,

E-mail: Liminyang35@hotmail.com

报道。紫草酸镁 B (magnesium lithospermate B, MTB) 是从丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 中提取的一种有效成分 (结构如图 1 所示), 可以抑制缺血/再灌注损伤后心肌细胞凋亡的发生<sup>[3]</sup>, 但其作用机制尚不清楚。研究证明, MTB 有清除羟自由基的功能<sup>[4]</sup>。氧应激可通过激活 JNK 诱导凋亡, 并介导心肌缺血/再灌注损伤<sup>[5]</sup>。据此, 本文探讨 JNK3 在缺血/再灌注心肌细胞凋亡中的作用, 及 MTB 能否通过抑制 JNK3 以减少凋亡的发生。

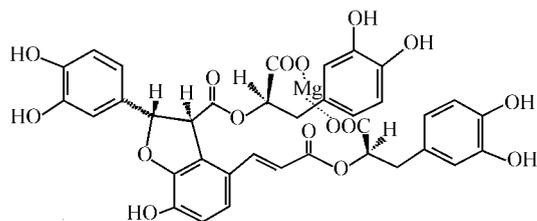


Figure 1 Structure of magnesium lithospermate B

## 材料和方法

**MTB 的提取和纯化** 用色谱法<sup>[6]</sup>从丹参中提取 MTB, 经高效液相色谱法测定纯度大于 98%。

**心肌缺血/再灌注损伤模型的复制** 据文献<sup>[7]</sup>所述, 选用 200 ~ 250 g,  $\delta$ , Sprague-Dawley (SD) 大鼠, ip 戊巴比妥钠 ( $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和肝素 ( $200 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。待动物麻醉后, 取出心脏, 将心脏以其主动脉断端悬挂于 Langendorff 装置上, 并灌注 Krebs-Henseleit 缓冲液 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ : NaCl 120,  $\text{NaHCO}_3$  25, 葡萄糖 55, KCl 4.76, 硫酸镁 1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  1.27), Krebs-Henseleit 缓冲液内通入 95%  $\text{O}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$ , 温度维持在  $37^\circ\text{C}$ 。10 min 后, 加入含或不含 MTB 的新鲜配置的 Krebs-Henseleit 缓冲液, 行心脏灌注 20 min。然后停止灌注 30 min, 温度仍保持在  $37^\circ\text{C}$ , 使整个心脏处于相当于整体条件下的缺血状态, 最后再灌注一定时间。

**心肌缺血/再灌注损伤诱导 JNK3 的表达实验** 共分为 5 组: 非灌注组 (仅用灌注液冲洗心脏), 缺血组 (缺血 30 min), 缺血/再灌注 15 min 组 (缺血 30 min + 再灌注 15 min), 缺血/再灌注 30 min 组 (缺血 30 min + 再灌注 30 min), 缺血/再灌注 60 min 组 (缺血 30 min + 再灌注 60 min)。

MTB 对 JNK3 表达的抑制作用共分 7 组: 非灌注组 (仅用灌注液冲洗心脏), 对照组 (与以下各组同步进行, 连续灌注 60 min), 缺血/再灌注组 (缺血 30 min + 再灌注 30 min),  $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB 组 (缺

血 30 min + 再灌注 30 min, 灌注液内含  $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB),  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB 组 (缺血 30 min + 再灌注 30 min, 灌注液内含  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB),  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB 组 (缺血 30 min + 再灌注 30 min, 灌注液内含  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB) 和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB 组 (缺血 30 min + 再灌注 30 min, 灌注液内含  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB)。每组用 2 ~ 15 只大鼠, 取每只大鼠心室的 1 ~ 2 张切片用于原位杂交检测。

**原位杂交** 根据文献<sup>[8]</sup>报道, 选用含 45 个碱基的脱氧寡核苷酸探针 (Gibco BRL 公司合成), 以德国 Boehringer Mannheim 公司的寡核苷酸 3'-末端地高辛加尾试剂盒 (DIG Oligonucleotide Tailing Kit, Cat. No. 1417231) 进行标记, 探针的标记效率为大于 80%。将心脏于心室处横切成 4 mm 厚的薄片, 以 4% 多聚甲醛固定, 行冰冻切片 (切片厚度为  $15 \mu\text{m}$ )。切片经酸水解、蛋白酶 K 消化后, 于  $37^\circ\text{C}$  进行预杂交 2 h (预杂交液: 40% 去离子甲酰胺,  $4 \times \text{SSC}$ ,  $5 \times \text{Denhardt's}$  溶液,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  变性鲑精 DNA,  $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酵母 tRNA,  $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Poly A, 10% 硫酸葡聚糖)。然后滴加杂交液 (预杂交液以 1:40 稀释标记探针, 即为杂交液), 于  $37^\circ\text{C}$  杂交过夜。再分别以  $2 \times \text{SSC}$  (室温, 15 min  $\times 2$ ),  $1 \times \text{SSC}$  (室温, 15 min  $\times 2$ ) 和  $0.5 \times \text{SSC}$  (室温, 15 min  $\times 2$ ) 洗涤后用于显色。用 Boehringer Mannheim 公司的地高辛检测试剂盒, 以 BCIP/NBT 显色液于  $37^\circ\text{C}$  显色 2 ~ 4 h。为确保杂交信号的特异性, 分别设探针阴性对照 (杂交液内不含标记探针)、抗体阴性对照 (显色时不加抗地高辛抗体)、RNA 酶消化对照 (在预杂交前将一部分切片以  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  RNA 酶于  $37^\circ\text{C}$  消化 1 h)、未标记探针竞争性对照 (在杂交液内加入 20 倍于标记探针的未标记探针) 和阳性对照 (根据文献<sup>[8]</sup>报道, 以脑组织冰冻切片作阳性对照)。

**结果分析** 对于每次实验的染色切片, 用记号笔沿左心室周围均匀标记 10 个点, 沿右心室周围标记 5 个点。Q5001W 型图像分析系统 (Leica, Cambridge) 分析每个点下视野内心肌细胞的显色情况。选择合适的分析标准, 包括阳性信号的色调、饱和度和强度范围, 以排除背景的影响。在相同分析标准下, 测定每个视野阳性信号面积占总视野面积的百分比, 即为每个视野的信号强度。每张切片左、右心室共 15 个视野, 可得到 15 个数据, 取其平均值, 即为每张切片的信号强度。每次实验均设有非灌注组, 计算其他各组信号强度相对于非灌注组信号强度的百分数, 对所得数据以单因素 ANOVA

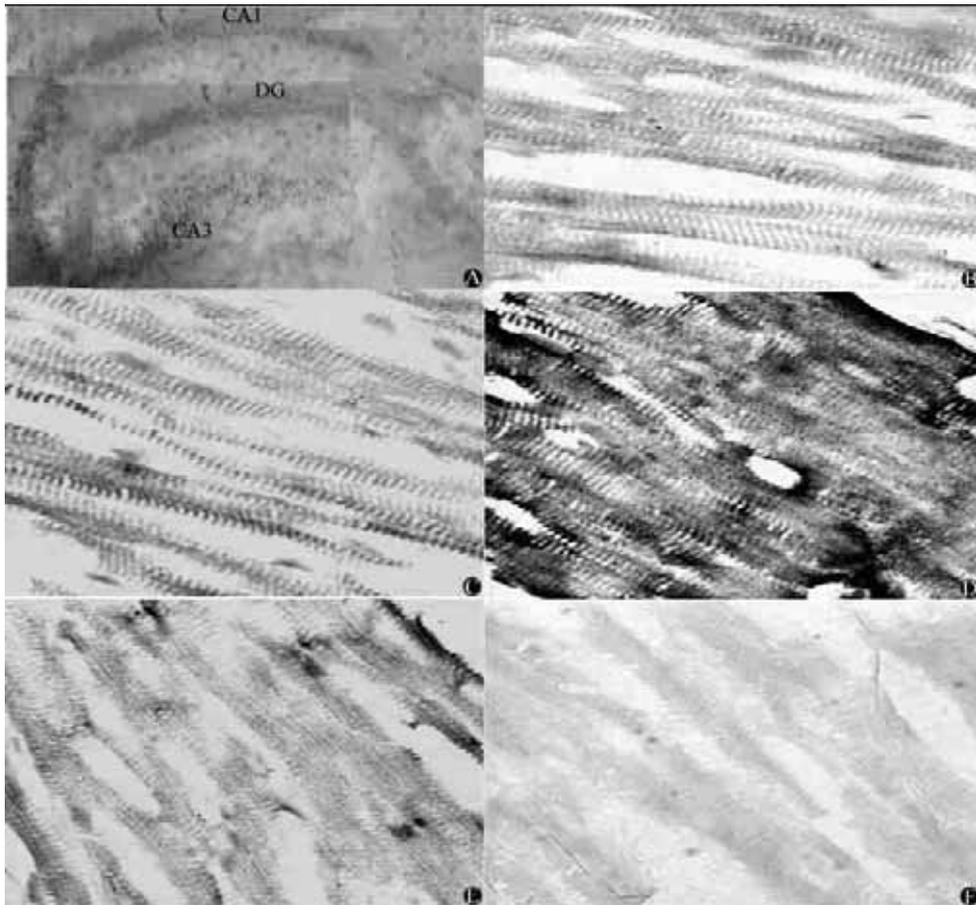
和 SNK 进行统计学处理,以  $P < 0.05$  作为差异有显著性的标准。

## 结果

### 1 缺血/再灌注心肌细胞 JNK3 mRNA 的表达

经原位杂交显色后, JNK3 mRNA 为分布于心肌细胞胞浆的紫蓝色颗粒,且在心肌细胞横纹处分布较密集。不同心肌细胞的染色强度不一致。阳性对照采用大鼠脑海马组织冠状切面所得切片, JNK3 mRNA 在海马 CA1 区和 CA3 区的锥体细胞以及齿状回的颗粒细胞均有表达,与文献<sup>[8]</sup>报道相符合。心

肌组织切片在预杂交前经 RNA 酶消化后,杂交信号消失(图 2)。在杂交液内加入过量的未标记 JNK3 探针后,杂交信号明显减弱。探针阴性对照和抗体阴性对照的杂交信号消失。从而证明原位杂交实验的特异性。图像分析结果表明,非灌注组心肌细胞有少量 JNK3 mRNA 表达。心脏缺血/再灌注 30 min 时,心肌细胞胞浆内 JNK3 mRNA 表达明显增加,与非灌注组和对照组相比有显著性差异( $P < 0.05$ )。单纯缺血组、缺血/再灌注 15 min 组和缺血/再灌注 60 min 组 JNK3 mRNA 的表达与非灌注组相比,均无显著性差异( $P > 0.05$ )(表 1)。



A: Hippocampus in a coronal section of adult rat brain was used as a positive control. Pyramidal cells in CA1 and CA3 fields and the granule cells in the dentate gyrus showed a high hybridization signal. B - E: Sections of heart from the groups of control 1 (non-perfused control), control 2 (perfused control), IS/RE (30-min ischemia followed by 30-min reperfusion) and IS/RE + MTB (the perfusion buffer contained  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB). JNK3 mRNA was located in the cardiac muscle fibers. The intensity of staining varies from myocyte to myocyte. Signal intensity was stronger in IS/RE group than that in the group of IS/RE + MTB. F: Negative control

Figure 2 *In situ* hybridization of DIG-labeled c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) oligonucleotide probes to heart tissue sections. Sheep anti-DIG antibodies with alkaline phosphatase conjugation were used as second antibodies. BCIP/NBT was used as the chromogen (purple and blue). The heart section was treated with RNase before pre-hybridization. No specific signal is seen. Magnifications: A  $\times 30$ ; B - F,  $\times 200$

**Table 1** Semi-quantitative analysis of *in situ* hybridization signals of JNK3 mRNA in ischemic/reperfused rat heart

Group	Signal intensity/ % (in control 1)	n
Control 1	100 ± 51	10
IS	125 ± 10*	2
IS/ RE a	133 ± 102*	3
IS/ RE b	376 ± 114 <sup>△</sup>	4
IS/ RE c	96 ± 56*	6

Control 1: Non-perfused control; IS: 30 min ischemia; RE: Reperfusion; a, b, c: Reperfusion time was 15, 30 and 60 min respectively.  $\bar{x} \pm s$ . <sup>△</sup>  $P < 0.05$  vs control 1; \*  $P < 0.05$  vs IS/ RE b

**2 不同浓度 MTB 对心肌细胞 JNK3 mRNA 表达的抑制作用**

如表 2 所示, 心脏缺血/再灌注 30 min 时, 心肌细胞 JNK3 mRNA 表达明显增加, 与对照组相比, 具差异显著性 ( $P < 0.05$ )。加入  $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB 后, 对缺血/再灌注 30 min 心肌细胞 JNK3 的表达无明显影响。而加入  $0.1, 1$  和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB 后, 缺血/再灌注 30 min 心肌细胞 JNK3 的表达均受到明显抑制, 与不加 MTB 的单纯缺血/再灌注 30 min 组相比, 具显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 与对照组相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。从而说明, 一定浓度的 MTB 可以抑制缺血/再灌注损伤诱导的心肌细胞 JNK3 mRNA 的表达。

**Table 2** Semi-quantitative analysis of *in situ* hybridization signals of JNK3 mRNA in MTB treated ischemic/reperfused heart

Group	Signal intensity/ % (in control 2)	n
Control 2	100 ± 39	15
IS/ RE	376 ± 140*	6
IS/ RE + MTB a	356 ± 126*	4
IS/ RE + MTB b	134 ± 29 <sup>△</sup>	6
IS/ RE + MTB c	87 ± 29 <sup>△</sup>	6
IS/ RE + MTB d	116 ± 42 <sup>△</sup>	5

Control 2: Perfused control; IS: 30 min ischemia; RE: 30 min reperfusion; a, b, c, d: The perfusion buffer contained  $0.01, 0.1, 1$  and  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB respectively.  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$  vs control 2; <sup>△</sup>  $P < 0.05$  vs IS/ RE

**讨论**

用本文的心肌缺血/再灌注模型复制方法, 离体大鼠心脏在连续灌注下可持续平稳跳动 170 min 以上, 缺血/再灌注后心肌受损的表现为中心率减慢, 心率失常和心室纤维颤动<sup>[7]</sup>。心肌受损的机制是什

么? 近年来, 人们已经认识到凋亡在心血管系统疾病过程中的重要作用<sup>[9]</sup>。凋亡是大鼠和兔心肌缺血/再灌注损伤模型中心肌细胞数量减少的重要原因之一<sup>[2,9]</sup>。本实验室也通过检测 TUNEL 阳性细胞和 PARP 裂解程度两种方法, 在离体大鼠缺血/再灌注模型中验证了这一点<sup>[3]</sup>。由于凋亡是由基因控制的程序性过程, 通过药物对凋亡的信号传导通路进行调节, 就可能达到治疗疾病的目的<sup>[10]</sup>。已发现, 药物可以抑制心肌缺血/再灌注损伤动物模型中心肌细胞的凋亡<sup>[11]</sup>, 丹参的提取成分 MTB 具有这种作用<sup>[3]</sup>。

JNK 是位于凋亡信号传导通路上游的一个重要的蛋白激酶<sup>[1]</sup>, 参与心肌缺血/再灌注损伤<sup>[12]</sup>。本文的前期实验发现,  $0.1, 1$  和  $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB 均可抑制缺血/再灌注心肌细胞内 JNK 对核转录因子 c-Jun 的磷酸化作用, MTB 对 JNK 酶活性的抑制作用具有浓度依赖性, 且这种抑制作用与心肌细胞凋亡数目呈负相关, 由此认为 MTB 通过影响 JNK 的功能来阻断凋亡的信号传导通路。由于 JNK 分为 JNK1, JNK2 和 JNK3 3 种亚型, 虽然它们都可以将 c-Jun 磷酸化, 但不同亚型 JNK 的激活具有细胞特异性, 且不同类型的刺激可激活不同类型的 JNK<sup>[13]</sup>。例如电刺激心肌细胞可以激活 JNK2 和 JNK3, 但不能激活 JNK1<sup>[14]</sup>, 而心肌缺血/再灌注损伤可以激活 JNK1 而不是 JNK2<sup>[2]</sup>。本研究发现, 心肌缺血/再灌注损伤也可以诱导心肌细胞内 JNK3 mRNA 表达增加,  $0.1, 1$  和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MTB 均可以对此产生抑制作用。结合前期实验, 得出结论: JNK3 可能参与缺血/再灌注损伤诱导的心肌细胞凋亡过程。MTB 可能通过抑制 JNK3 的表达来降低 JNK 的功能, 从而减少心肌细胞凋亡, 对缺血/再灌注心脏产生保护作用。

**References:**

[1] Xie X, Gu Y, Fox T, *et al.* Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis [J]. *Structure*, 1998, **6**(8): 983 - 991.

[2] Hreniuk D, Garay M, Gaarde W, *et al.* Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, **59**(4): 867 - 874.

[3] Au-Yeung KK, Zhu DY, O K, *et al.* Inhibition of stress-activated protein kinase in the ischemic/reperfused heart: role of magnesium tanshinoate B in preventing apoptosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, **62**(4): 483 - 493.

[4] Chen CP, Yokozawa T, Chung HY. Inhibitory effect of

- cafeic acid analogues isolated from *Salvia miltiorrhiza* Radix against 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical [ J ]. *Exp Toxicol Pathol*, 1999, **51**(1) :59 - 63 .
- [ 5 ] Clerk A, Fuller SJ, Michael A, *et al.* Stimulation of “stress-regulated” mitogen-activated protein kinases ( stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and P38- mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses [ J ]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(13) :7228 - 7234 .
- [ 6 ] Fung KP, Zeng LH, Wu J, *et al.* Demonstration of the myocardial salvage effect of lithospermic acid B isolated from the aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* [ J ]. *Life Sci*, 1993, **52**(22) :239 - 244 .
- [ 7 ] Siow YL, Choy PC, Leung WMK, *et al.* Effect of *flos carthami* on stress-activated protein kinase activity in the isolated reperfused rat heart [ J ]. *Mol Cell Biochem*, 2000, **207**(1 - 2) :41 - 47 .
- [ 8 ] Carboni L, Carletti R, Tacconi S, *et al.* Differential expression of SAPK isoforms in the rat brain. An *in situ* hybridization study in the adult rat brain and during post-natal development [ J ]. *Mol Brain Res*, 1998, **60**(1) :57 - 68 .
- [ 9 ] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease [ J ]. *Circ Res*, 1998, **82**(11) :1111 - 1129 .
- [ 10 ] Yue TL, Ohlstein EH, Ruffolo RR. Apoptosis: a potential target for discovering novel therapies for cardiovascular diseases [ J ]. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, **3**(4) :474 - 480 .
- [ 11 ] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, *et al.* Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor [ J ]. *Circulation*, 1998, **97**(3) :276 - 281 .
- [ 12 ] Yue TL, Ma XL, Gu JL, *et al.* Carvedilol inhibits activation of stress-activated protein kinase and reduces reperfusion injury in perfused rabbit heart [ J ]. *Eur J Pharmacol*, 1998, **345**(1) :61 - 65 .
- [ 13 ] Butterfield L, Zentrich E, Beekman A, *et al.* Stress- and cell type-dependent regulation of transfected c-Jun N-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase isoforms [ J ]. *Biochem J*, 1999, **338**( Pt 3) :681-686 .
- [ 14 ] Strait JB, Samarel AM. Isoenzyme-specific protein kinase C and c-Jun N-terminal kinase activation by electrically stimulated contraction of neonatal rat ventricular myocytes [ J ]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, **32**(8) :1553 - 1566 .