

# 内源性孤啡肽通过 RKIP 影响大鼠缺血性心律失常的发生

王一迪<sup>1</sup> 李占峰<sup>1</sup> 韩毅<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山西医科大学麻醉学院,太原 030001; <sup>2</sup>山西医科大学第二医院麻醉科,太原 030001

通信作者:韩毅,Email:13753171979@163.com

**【摘要】目的** 探讨内源性孤啡肽(N/OFQ)是否通过 Raf 激酶抑制蛋白(RKIP)影响急性心肌缺血大鼠心律失常及心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -肾上腺素能受体( $\beta_1$ -AR)的表达。**方法** ①实验一:按随机数字表法将30只6周龄成年雄性SD大鼠分为假手术组(Sham组,只开胸不结扎冠状动脉(冠脉))、心肌缺血模型组(结扎冠脉左前降支)、内源性N/OFQ拮抗剂UFP-101预处理组(UFP-101组,术前10min经尾静脉注射1 mL/kg UFP-101),每组10只。记录各组大鼠术后15min内心律失常结果;术后15min取缺血心肌,采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测磷酸化RKIP(p-RKIP)表达。②实验二:按随机数字表法将30只4周龄雄性SD大鼠分为UFP-101对照组、RKIP过表达组、RKIP拮抗组,每组10只。UFP-101对照组每日腹腔注射玉米油,其余两组注射RKIP上调剂香蜂草苷(Didymine),3组大鼠饲养4周后均行冠脉结扎,并均于术前10min经尾静脉注射UFP-101。其中RKIP拮抗组术前2h腹腔注射RKIP特异性拮抗剂洛法他丁(locostatin)。记录各组大鼠术后15min内心律失常结果;Western Blot法检测术后15min时心肌组织p-RKIP表达及心肌细胞膜表面 $\beta_1$ -AR表达。**结果** ①实验一:与Sham组比较,模型组和UFP-101组室性期前收缩(VEB)、室性心动过速(VT)、心室纤颤(VF)发生明显增多,心律失常评分明显升高;此外,与Sham组相比,模型组心肌组织p-RKIP表达升高,UFP-101组心肌组织p-RKIP表达下降。与模型组比较,UFP-101预处理可显著减少心律失常发生[心律失常评分(分):1.5(0.3,5.0)比4.0(2.0,5.0), $P<0.05$ ],心肌组织p-RKIP表达明显下降(p-RKIP/总RKIP:0.20±0.11比0.43±0.11, $P<0.05$ )。说明拮抗N/OFQ能降低RKIP的磷酸化,减少心律失常发生。②实验二:与UFP-101对照组相比,RKIP过表达可显著增加心律失常事件发生,心肌细胞膜表面 $\beta_1$ -AR表达也明显增多;而拮抗RKIP过表达可使心律失常的发生有所缓解[心律失常评分(分):3.0(2.0,3.0)比4.0(2.0,5.0), $P<0.05$ ],并且明显减少心肌细胞膜表面 $\beta_1$ -AR的表达( $\beta_1$ -AR/Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶:0.88±0.09比1.02±0.08,均 $P<0.05$ ),而总RKIP表达差异无统计学意义(总RKIP/GAPDH:5.40±0.21比5.36±0.19, $P>0.05$ )。说明内源性N/OFQ通过RKIP影响大鼠缺血性心律失常和心肌细胞膜表面 $\beta_1$ -AR表达。**结论** 内源性N/OFQ可通过增加RKIP磷酸化表达来影响大鼠缺血性心律失常和心肌细胞膜表面 $\beta_1$ -AR的表达及心律失常。

**【关键词】** 心律失常; 心肌缺血; 孤啡肽; Raf 激酶抑制蛋白;  $\beta_1$ -肾上腺素能受体

**基金项目:** 国家自然科学基金(81400260); 山西省青年科技研究基金(201701D1211145)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.12.008

## Endogenous nociceptin/orphanin FQ affect ischemic arrhythmias in rats through Raf kinase inhibitor protein

Wang Yidi<sup>1</sup>, Li Zhanfeng<sup>1</sup>, Han Yi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China; <sup>2</sup>Department of Anesthesiology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

Corresponding author: Han Yi, Email: 13753171979@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate whether endogenous nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) can inhibit arrhythmia and expression of  $\beta_1$ -adrenergic receptor ( $\beta_1$ -AR) on the surface of myocardial cell membrane in acute myocardial ischemia rats by Raf kinase inhibitory protein (RKIP). **Methods** ① Experiment one: according to random number table method, 30 adult male Sprague-Dawley (SD) rats with only 6 weeks of age were divided into Sham group (open the chest but do not ligate the coronary artery), myocardial ischemia model group (coronary ligation of left anterior descending branch), and endogenous N/OFQ antagonists UFP-101 pretreatment group (UFP-101 group, preoperative 10 minutes after tail vein injection of 1 mL/kg UFP-101), with 10 rats in each group. Arrhythmia was recorded within 15 minutes after operation. The expression of phosphorylated RKIP (p-RKIP) was detected by Western Blot. ② Experiment two: according to the random number table method, 30 4-week-old male SD rats were divided into UFP-101 control group, RKIP over expression group and RKIP antagonism group, with 10 rats in each group. The UFP-101 control group was intraperitoneally injected with corn oil every day, while the other two groups were injected with up adjuster of RKIP (Didymine). The rats in the three groups were all ligated after 4 weeks of feeding, and UFP-101 was injected through the tail vein 10 minutes before the operation. The RKIP antagonist group received intraperitoneal injection of the RKIP-specific antagonist locostatin 2 hours before surgery. Arrhythmia results were recorded within 15 minutes after operation. Western Blot was used to detect the expression of p-RKIP in myocardial tissue and

expression of  $\beta_1$ -AR on the surface of myocardial cell membrane 15 minutes after surgery. **Results** ① Experiment one: compared with Sham group, ventricular ectopic beat (VEB), ventricular tachycardia (VT) and ventricular fibrillation (VF) increased significantly in the model group and UFP-101 group, and arrhythmia score increased significantly. In addition, compared with the Sham group, p-RKIP expression was increased in the model group and decreased in the UFP-101 group. Compared with the model group, preconditioning with UFP-101 significantly reduced the occurrence of arrhythmia [arrhythmia score: 1.5 (0.3, 5.0) vs. 4.0 (2.0, 5.0),  $P < 0.05$ ], and the expression of p-RKIP in myocardial tissue significantly decreased (p-RKIP/total RKIP:  $0.20 \pm 0.11$  vs.  $0.43 \pm 0.11$ ,  $P < 0.05$ ). This indicated that antagonistic N/OFQ could reduce the phosphorylation of RKIP and the occurrence of arrhythmia. ② Experiment two: compared with the UFP-101 control group, overexpression of RKIP significantly increased the occurrence of arrhythmia events, and the expression of  $\beta_1$ -AR on the surface of the myocardial cell membrane significantly increased. And antagonism RKIP overexpression could make the occurrence of arrhythmia eased [arrhythmia score: 3.0 (2.0, 3.0) vs. 4.0 (2.0, 5.0),  $P < 0.05$ ], and significantly reduce the expression of myocardial cell membrane surface  $\beta_1$ -AR ( $\beta_1$ -AR/ $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase:  $0.88 \pm 0.09$  vs.  $1.02 \pm 0.08$ ,  $P < 0.05$ ), while there was no significant difference in total RKIP expression (total RKIP/GAPDH:  $5.40 \pm 0.21$  vs.  $5.36 \pm 0.19$ ,  $P > 0.05$ ). This indicated that endogenous N/OFQ affected the expression of plasma  $\beta_1$ -AR on the surface of myocardial cell membrane and ischemic arrhythmia in rats through RKIP. **Conclusion** Endogenous N/OFQ can affect the expression of plasma  $\beta_1$ -AR on the membrane surface of ischemic myocardium and arrhythmia in rats via increased expression of RKIP phosphorylation.

**【Key words】** Arrhythmias; Myocardial ischemia; Nociceptin/orphanin FQ; Raf kinase inhibitor protein;  $\beta_1$ -adrenergic receptor

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81400260); Natural Science Foundation for Young Scientists of Shanxi Province of China (201701D1211145)

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2019.12.008

室性心律失常是急性心肌梗死(心梗)患者早期的重要并发症,严重时发生的心室纤颤(VF)是心梗患者心源性猝死的重要原因之一<sup>[1]</sup>。在此过程中,内源性孤啡肽(N/OFQ)在心肌组织中大量释放并且直接作用于心血管引起心律失常<sup>[2]</sup>。本课题组前期研究显示,拮抗内源性N/OFQ能够减少缺血性心律失常的发生<sup>[3]</sup>,并且能够减少大鼠心肌缺血15 min时心肌细胞膜表面 $\beta_1$ -肾上腺素能受体( $\beta_1$ -AR)的表达<sup>[4]</sup>,提示内源性N/OFQ可能通过调节 $\beta_1$ -AR进而影响急性缺血期心律失常。Raf激酶抑制蛋白(RKIP)是 $\beta_1$ -AR内化过程的负向调节因子<sup>[5]</sup>,可能参与上述机制的形成。本实验旨在探讨内源性N/OFQ是否通过RKIP致大鼠缺血性心律失常以及抑制心肌细胞膜表面 $\beta_1$ -AR的内化。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及主要试剂:**6周龄成年雄性SD大鼠(体重约250 g)30只,4周龄雄性SD大鼠(体重约100 g)30只,均购自山西医科大学动物实验中心。N/OFQ拮抗剂UFP-101(英国Tocris Cookson公司);膜蛋白提取试剂盒(美国Invent公司);兔抗大鼠磷酸化RKIP(p-RKIP)、 $\beta_1$ -AR、 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)一抗及羊抗兔辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白G(HRP-IgG)二抗(英国Abcam公司);兔抗大鼠RKIP抗体(武汉ABclonal公司);RKIP上调剂香蜂草苷(Didymin,美国Enzo公司);RKIP特异性拮抗剂洛法他丁(locostatin,美国Sigma公司)。

**1.2 大鼠急性心肌缺血模型建立:**腹腔注射25%乌拉坦(1.2 g/kg)麻醉大鼠,仰卧位固定于操作台上,连接生物信号采集系统记录标准II导联心电图,气管切开插管并连接小动物呼吸机(潮气量8 mL/kg,呼吸频率70次/min),稳定后开胸,结扎冠状动脉(冠脉)左前降支。II导联心电图出现ST段逐渐抬高并与QRS波融合,心肌前壁组织泛白随之紫绀并且间歇性出现心律失常提示制模成功。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并经山西医科大学麻醉学系实验动物福利伦理审查(审批号:2018-11-13)。

**1.3 实验一:探讨内源性N/OFQ是否影响急性心肌缺血大鼠心肌组织RKIP磷酸化水平。**

**1.3.1 分组处理:**按随机数字表法将6周龄SD大鼠分为假手术组(Sham组)、心肌缺血模型组、UFP-101预处理组(UFP-101组),每组10只。UFP-101组和模型组制备心肌缺血模型;Sham组仅开胸不结扎冠脉。UFP组术前10 min经尾静脉注射1 mL/kg内源性N/OFQ拮抗剂UFP-101(1 nmol/L);模型组和Sham组注射等量生理盐水。术后15 min内记录各组大鼠心电图数据,并于术后15 min取缺血心肌,提取总蛋白,经BCA法蛋白定量后分装于-80℃冻存备检。

**1.3.2 心律失常评分:**本课题组前期研究发现,大鼠心肌缺血后发生的心律失常主要集中在15 min之内<sup>[4]</sup>,且参照文献[6],心律失常评分标准为:冠脉结扎后15 min内出现0~49个室性期前收缩(VEB;

包括单发 VEB、室性二联律、室性三联律)记 0 分,出现 ≥50 个 VEB 记 1 分;出现 1~5 次室性心动过速(VT)记 2 分,出现 ≥6 次 VT 记 3 分;出现 1 次 VF 记 4 分,出现 2~5 次 VF 记 5 分。

**1.3.3 心肌组织 p-RKIP 表达测定:**将分装蛋白进行电泳、转膜、封闭,加入 p-RKIP 一抗(1:2000)和内参 GAPDH(1:1000)4℃孵育过夜,二抗孵育 1 h 后用含吐温 20 的 Tris 缓冲液(TBST)清洗,用 Quantity One 图像分析软件测定各蛋白条带灰度值;用抗体洗脱液将 p-RKIP 一抗洗脱,重新封闭后加入 RKIP 一抗(1:1000)重复上述步骤后测量 RKIP 灰度值。以 p-RKIP 与总 RKIP 的灰度值比值代表心肌 p-RKIP 相对表达量;以总 RKIP 与 GAPDH 的灰度值比值代表总 RKIP 相对表达量。

**1.4 实验二:**探讨内源性 N/OFQ 是否会影响 RKIP 过表达大鼠缺血性心律失常以及心肌细胞膜表面 β<sub>1</sub>-AR 表达。

**1.4.1 分组处理:**将 4 周龄雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为 UFP-101 对照组、RKIP 过表达组和 RKIP 拮抗组,每组 10 只。RKIP 过表达组和 RKIP 拮抗组大鼠每日腹腔注射 0.5 mg/kg 负荷量的 RKIP 上调剂 Didymin(0.1%,玉米油溶剂)<sup>[7]</sup>,UFP-101 对照组则给予等体积玉米油,饲养 4 周后,RKIP 拮抗组术前 2 h 腹腔注射 1 mg/kg 负荷量的 locostatin。各组大鼠均制备心肌缺血模型并于术前 10 min 均经尾静脉注射 1 mL/kg 的 UFP-101(1 nmol/L)。术后 15 min 内记录各组大鼠心电图数据,并于术后 15 min 取左心室组织及缺血区组织,-80℃冻存备检。

**1.4.2 心律失常评分:**同实验一方法。

**1.4.3 心肌组织 p-RKIP 表达及缺血区心肌细胞膜表面 β<sub>1</sub>-AR 表达的检测:**取同一部位左心室肌,按实验一方法测定 p-RKIP、总 RKIP 和 GAPDH 的灰度值,以 p-RKIP、总 RKIP 与 GAPDH 的灰度值比值代

表相对表达量。提取缺血区心肌组织膜蛋白,BCA 法定量,用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定心肌细胞膜表面 β<sub>1</sub>-AR 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的灰度值并以二者灰度值比值代表 β<sub>1</sub>-AR 相对表达量。

**1.5 统计学方法:**使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。非正态分布计量资料以中位数(四分位数)[ $M(Q_L, Q_U)$ ]表示,采用 Kruskal-Wallis H 检验,组内两两比较采用 Mann-Whitney U 检验,并对检验水准  $\alpha'$ 按 Bonferroni 法进行校正。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验一

**2.1.1 3 组大鼠心律失常比较(表 1):**与 Sham 组比较,模型组和 UFP-101 组术后 15 min 内 VEB 发生次数和 VT+VF 的发生次数、持续时间以及心律失常评分均明显升高(均  $P < 0.05$ )。与模型组比较,UFP-101 组 VEB 发生次数、VT+VF 持续时间、心律失常评分明显下降(均  $P < 0.05$ ),而 VT+VF 发生次数减少差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.1.2 3 组大鼠心肌组织 p-RKIP 和总 RKIP 表达比较(表 1;图 1):**心肌缺血 15 min,3 组大鼠心肌组织总 RKIP 表达差异无统计学意义。与 Sham 组相比,模型组心肌组织 p-RKIP 表达明显升高,而 UFP-101 组 p-RKIP 表达明显下降(均  $P < 0.05$ )。

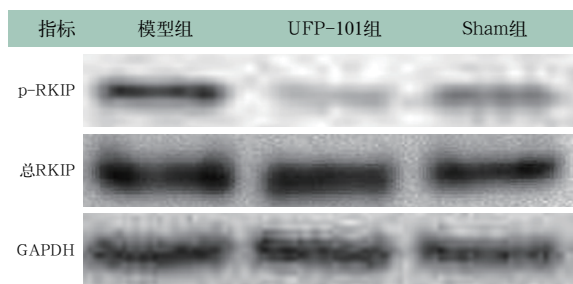
### 2.2 实验二

**2.2.1 3 组大鼠心律失常比较(表 2):**与 UFP-101 对照组相比,RKIP 过表达组和 RKIP 拮抗组 VEB 发生次数明显增多( $P < 0.05$ );而 RKIP 拮抗组 VEB 发生次数较 RKIP 过表达组明显减少( $P < 0.05$ )。与 UFP-101 对照组相比,RKIP 过表达组 VT+VF 发生次数明显增多,持续时间明显延长(均  $P < 0.05$ ),而

表 1 3 组 6 周龄成年雄性 SD 大鼠心肌缺血 15 min 内心律失常情况及缺血 15 min 时心肌组织 RKIP、总 RKIP 表达比较

组别	动物数 (只)	VEB (次, $\bar{x} \pm s$ )	VT+VF [ $M(Q_L, Q_U)$ ]		心律失常评分 [分, $M(Q_L, Q_U)$ ]	p-RKIP/总 RKIP ( $\bar{x} \pm s$ )	总 RKIP/GAPDH ( $\bar{x} \pm s$ )
			发生次数(次)	持续时间(s)			
Sham 组	10	10.0 ± 4.7	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0.35 ± 0.14	3.1 ± 1.7
模型组	10	78.7 ± 9.9 <sup>a</sup>	3.0 (0, 5.7) <sup>a</sup>	13.0 (0, 15.0) <sup>a</sup>	4.0 (2.0, 5.0) <sup>a</sup>	0.43 ± 0.11 <sup>a</sup>	3.4 ± 1.8
UFP-101 组	10	32.2 ± 7.8 <sup>ab</sup>	1.0 (0, 3.2) <sup>a</sup>	3.5 (0, 6.0) <sup>ab</sup>	1.5 (0.3, 5.0) <sup>ab</sup>	0.20 ± 0.11 <sup>ab</sup>	3.8 ± 1.6
F/H 值		119.380	13.234	20.629	26.230	10.224	0.349
P 值		<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.708

注:Sham 组为假手术组,模型组为心肌缺血模型组,UFP-101 组为内源性孤啡肽拮抗剂 UFP-101 预处理组;VEB 为室性期前收缩,VT 为室性心动过速,VF 为心室纤颤,RKIP 为 Raf 激酶抑制蛋白,p-RKIP 为磷酸化 RKIP,GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与 Sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

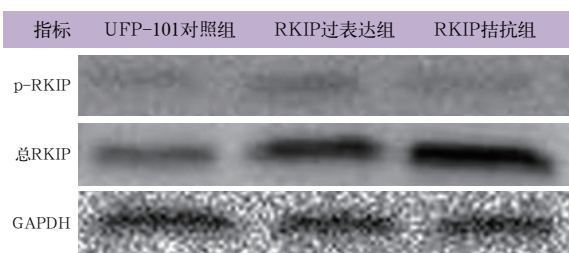


模型组为心肌缺血模型组, UFP-101 组为内源性孤啡肽拮抗剂 UFP-101 预处理组, Sham 组为假手术组; p-RKIP 为磷酸化 Raf 激酶抑制蛋白(RKIP), GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图1 3组6周龄成年雄性SD大鼠心肌缺血15min时心肌组织 p-RKIP 和总 RKIP 表达

RKIP 拮抗组差异无统计学意义。RKIP 拮抗组虽然 VT+VF 发生次数与 RKIP 过表达组差异无统计学意义,但持续时间明显缩短 ( $P < 0.05$ )。与 UFP-101 对照组相比, RKIP 过表达组心律失常评分明显升高 ( $P < 0.05$ ),而 RKIP 拮抗组差异无统计学意义; RKIP 拮抗组心律失常评分较 RKIP 过表达组明显下降 ( $P < 0.05$ )。

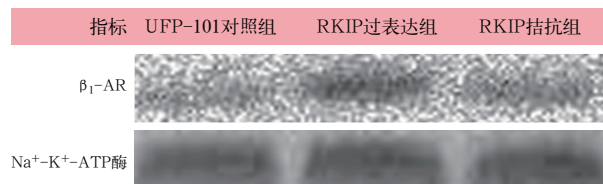
**2.2.2** 3组大鼠心肌组织 p-RKIP 表达(表2;图2): 与 UFP-101 对照组相比, RKIP 过表达组和 RKIP 拮抗组 p-RKIP、总 RKIP 表达均明显增高(均  $P < 0.05$ )。与 RKIP 过表达组相比, RKIP 拮抗组 p-RKIP 表达有所下降 ( $P < 0.05$ ),而总 RKIP 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



UFP-101 为内源性孤啡肽受体拮抗剂, RKIP 为 Raf 激酶抑制蛋白, p-RKIP 为磷酸化 RKIP, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图2 3组4周龄雄性SD大鼠心肌缺血15min时心肌组织 p-RKIP 和总 RKIP 表达

**2.2.3** 3组大鼠心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 表达(表2;图3): 与 UFP-101 对照组相比, RKIP 过表达组和 RKIP 拮抗组心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 相对表达量明显增多(均  $P < 0.05$ )。与 RKIP 过表达组相比, RKIP 拮抗组心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 相对表达量明显减少 ( $P < 0.05$ )。



UFP-101 为内源性孤啡肽受体拮抗剂, RKIP 为 Raf 激酶抑制蛋白,  $\beta_1$ -AR 为  $\beta_1$ -肾上腺素能受体

图3 3组4周龄雄性SD大鼠心肌缺血15min时心肌组织细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 表达

### 3 讨论

在急性心肌缺血过程中,心脏交感神经过度激活,交感神经末梢大量释放去甲肾上腺素<sup>[8]</sup>。用磷酸二酯酶抑制剂减少  $\beta_1$ -AR 受体下游的环磷酸腺苷(cAMP)降解也会对心肌缺血/再灌注损伤后心肌组织有保护作用,同时减少心律失常事件的发生<sup>[9]</sup>。提示肾上腺素能受体与急性心肌缺血相关性心律失常有关。而 Strasser 等<sup>[10]</sup>证明,在大鼠发生急性心肌缺血 15~20 min,心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 呈过表达状态,并且提出在此过程中  $\beta_1$ -AR 的内化作用受损,与本课题组前期研究结果相似<sup>[4]</sup>。

内源性 N/OFQ 作为一种感觉神经肽,广泛作用于全身 N/OFQ 受体,它不仅调节神经系统和免疫系统,并且对心血管系统也有调节作用<sup>[11]</sup>。本课题组前期研究显示,用 1 nmol/L 的 UFP-101 拮抗 N/OFQ 可明显减少大鼠急性心肌缺血后心律失常的发生<sup>[3]</sup>,并且经内源性 N/OFQ 拮抗剂 UFP-101 预处理的大鼠心肌缺血 15 min 时心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 表达较未预处理的大鼠明显减少<sup>[4]</sup>,本研究针对此

表2 3组4周龄雄性SD大鼠心肌缺血15min内心律失常情况以及缺血15min时心肌组织 p-RKIP、总 RKIP 表达和心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 表达比较

组别	动物数 (只)	VEB (次, $\bar{x} \pm s$ )	VT+VF [ $M(Q_L, Q_U)$ ]		心律失常评分 [分, $M(Q_L, Q_U)$ ]	p-RKIP/ GAPDH ( $\bar{x} \pm s$ )	总 RKIP/ GAPDH ( $\bar{x} \pm s$ )	$\beta_1$ -AR/Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP 酶 ( $\bar{x} \pm s$ )
			次数(次)	持续时间(s)				
UFP-101 对照组	10	35.7 ± 12.0	2.0(0, 3.0)	5.0(0, 8.0)	2.5(1.0, 3.0)	1.07 ± 0.09	3.09 ± 0.17	0.72 ± 0.07
RKIP 过表达组	10	89.7 ± 11.7 <sup>a</sup>	5.0(0, 10.0) <sup>a</sup>	9.5(0, 19.2) <sup>a</sup>	4.0(2.0, 5.0) <sup>a</sup>	1.84 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.36 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.08 <sup>a</sup>
RKIP 拮抗组	10	65.8 ± 11.0 <sup>ab</sup>	2.0(1.3, 5.0)	6.0(4.2, 7.8) <sup>b</sup>	3.0(2.0, 3.0) <sup>b</sup>	1.63 ± 0.11 <sup>ab</sup>	5.40 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.09 <sup>ab</sup>
F/H 值		50.307	8.853	12.457	13.385	121.171	485.212	35.162
P 值		<0.001	0.012	0.002	0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:UFP-101 为内源性孤啡肽受体拮抗剂, RKIP 为 Raf 激酶抑制蛋白, VEB 为室性期前收缩, VT 为室性心动过速, VF 为心室纤颤, p-RKIP 为磷酸化 RKIP, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶,  $\beta_1$ -AR 为  $\beta_1$ -肾上腺素能受体;与 UFP-101 对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 RKIP 过表达组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

现象进行进一步相关机制研究。

RKIP 是磷脂酰乙醇胺蛋白家族(PEBP)的一员, 不仅与 Raf-1 结合, 抑制 Raf-1/ 丝裂素活化蛋白激酶激酶 / 细胞外信号调节激酶(Raf-1/MEK/ERK) 通路信号转导, 并且可以参与 G 蛋白耦联受体与核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) 信号通路的转导<sup>[12]</sup>。RKIP 被蛋白激酶 C(PKC) 磷酸化的状态下与 Raf-1 分离进而与 G 蛋白耦联受体激酶 2(GRK2) 结合, 抑制其与  $\beta_1$ -AR 等 G 蛋白耦联受体结合的功能, 使之不能形成内化复合体, 进而抑制其内化作用<sup>[13]</sup>。如果 RKIP 的功能增强或者过表达(急性心肌缺血、梗死等情况下), 在 PKC 激活的情况下会表现为  $\beta_1$ -AR 外化(质膜表面表达增多)。

本实验首先验证了各组大鼠急性心肌缺血 15 min 时 RKIP 的磷酸化程度, 结果显示, 心肌缺血模型大鼠 RKIP 磷酸化水平高于 Sham 大鼠, 而经过 UFP-101 预处理的大鼠 RKIP 磷酸化水平降低, 甚至低于 Sham 大鼠(考虑 Sham 大鼠在开胸过程中也被激活交感神经系统), 说明在此病理过程中拮抗 N/OFQ 能够降低 RKIP 的磷酸化及其功能。其次, 我们为了验证内源性 N/OFQ 是否通过 RKIP 来影响大鼠缺血性心律失常与心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 表达, 实验中给大鼠连续 4 周每日腹腔注射 Didymin 造成体内 RKIP 过表达。Didymin 被证明是一种能够非特异性上调 RKIP 表达的黄酮糖苷<sup>[14-15]</sup>。结果显示, RKIP 过表达组和 RKIP 拮抗组大鼠心肌组织 p-RKIP、总 RKIP 表达均较 UFP-101 对照组明显升高。而术前 2 h 给予 RKIP 特异性拮抗剂 locostatin 的大鼠 p-RKIP 表达低于 RKIP 过表达大鼠, 说明 locostatin 抑制了 RKIP 的磷酸化。在同样 UFP-101 预给药并且结扎冠脉的条件下, RKIP 过表达大鼠比对照大鼠更容易发生心律失常, 且心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 表达明显外化; 术前给予 RKIP 特异性拮抗剂降低 RKIP 磷酸化程度后, 心律失常情况明显得到缓解且心肌细胞膜表面  $\beta_1$ -AR 表达有所降低。表明 RKIP 很可能参与了内源性 N/OFQ 对大鼠急性心肌缺血过程中心律失常及交感神经系统下游  $\beta_1$ -AR 的调控。拮抗 N/OFQ 所产生的抗心律失常及促  $\beta_1$ -AR 内化效应机制众多。推测急性心肌缺血状态下大量内源性 N/OFQ 与其受体结合后过度激活下游 PKC<sup>[16-17]</sup>, 进而促进 RKIP 的磷酸化及其与 GRK2 结合, 抑制  $\beta_1$ -AR 的内化, 促进室性心律失常的发生。

综上, 本研究表明, RKIP 参与了内源性 N/OFQ

对急性心肌缺血大鼠心律失常及交感神经下游  $\beta_1$ -AR 在心肌细胞膜表面表达的调控过程, 并且可能成为急性心肌梗死过程中治疗的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 王晓明, 石红玲, 崔吉君. 急性心肌梗死并发心律失常[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2011, 3 (4): 249-251, 254. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2011.04.001.  
Wang XM, Shi HL, Cui JJ. Acute myocardial infarction complicated with arrhythmia [J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2011, 3 (4): 249-251, 254. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2011.04.001.
- [2] Doggrel SA. Cardiovascular and renal effects of nociceptin/orphanin FQ: a new mediator to target? [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2007, 8 (9): 742-749.
- [3] Han Y, Guo Z, Wang LL, et al. Antagonism of endogenous nociceptin/orphanin FQ inhibits infarction-associated ventricular arrhythmias via PKC-dependent mechanism in rats [J]. Br J Pharmacol, 2013, 170 (3): 614-623. DOI: 10.1111/bph.12310.
- [4] 熊畅, 韩毅, 郭政. 内源性孤啡肽通过调节  $\beta_1$  肾上腺素能受体对大鼠缺血性心律失常的影响 [J]. 天津医药, 2019, 47 (3): 245-249. DOI: 10.11958/20182162.  
Xiong C, Han Y, Guo Z. The influence of endogenous nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) in ischemic arrhythmia by regulating  $\beta_1$ -adrenergic receptor in rats [J]. Tianjin Med J, 2019, 47 (3): 245-249. DOI: 10.11958/20182162.
- [5] Lorenz K, Rosner MR, Brand T, et al. Raf kinase inhibitor protein: lessons of a better way for  $\beta$ -adrenergic receptor activation in the heart [J]. J Physiol, 2017, 595 (12): 4073-4087. DOI: 10.1113/JP274064.
- [6] Miller LE, Hosick PA, Wrieden J, et al. Evaluation of arrhythmia scoring systems and exercise-induced cardioprotection [J]. Med Sci Sports Exerc, 2012, 44 (3): 435-441. DOI: 10.1249/MSS.0b013e3182323f8b.
- [7] Lin X, Bai F, Nie J, et al. Didymin alleviates hepatic fibrosis through inhibiting ERK and PI3K/Akt pathways via regulation of Raf kinase inhibitor protein [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40 (6): 1422-1432. DOI: 10.1159/000453194.
- [8] Fu LW, Longhurst JC. A new function for ATP: activating cardiac sympathetic afferents during myocardial ischemia [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 299 (6): H1762-1771. DOI: 10.1152/ajpheart.00822.2010.
- [9] 许晓文, 张国兴, 陆士奇. 奥普力农在心血管疾病中的研究现状 [J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30 (12): 1209-1212. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.12.022.  
Xu XW, Zhang GX, Lu SQ. Research status of olprinone in cardiovascular diseases [J]. Chin Crit Care Med, 2018, 30 (12): 1209-1212. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.12.022.
- [10] Strasser RH, Marquetant R, Kübler W. Adrenergic receptors and sensitization of adenylyl cyclase in acute myocardial ischemia [J]. Circulation, 1990, 82 (3 Suppl): II23-29.
- [11] Toll L, Bruchas MR, Calo' G, et al. Nociceptin/orphanin FQ receptor structure, signaling, ligands, functions, and interactions with opioid systems [J]. Pharmacol Rev, 2016, 68 (2): 419-457. DOI: 10.1124/pr.114.009209.
- [12] 胡新宙, 王旭, 张伟. Raf 激酶抑制蛋白(RKIP)的生物学功能研究 [J]. 生命科学, 2007, 19 (1): 31-36. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0374.2007.01.008.  
Hu XZ, Wang X, Zhang W. Studies on the biological function of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) [J]. Chin Bull Life Sci, 2007, 19 (1): 31-36. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0374.2007.01.008.
- [13] Lorenz K, Lohse MJ, Quitterer U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2 [J]. Nature, 2003, 426 (6966): 574-579. DOI: 10.1038/nature02158.
- [14] Wei J, Huang Q, Bai F, et al. Didymin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and up-regulation of RKIP in human hepatoma cells [J]. Chem Biol Interact, 2017, 261: 118-126. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.11.026.
- [15] Singhal SS, Singhal S, Singhal P, et al. Didymin: an orally active citrus flavonoid for targeting neuroblastoma [J]. Oncotarget, 2017, 8 (17): 29428-29441. DOI: 10.18632/oncotarget.15204.
- [16] Lou LG, Ma L, Pei G. Nociceptin/orphanin FQ activates protein kinase C, and this effect is mediated through phospholipase C/Ca<sup>2+</sup> pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 240 (2): 304-308. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7654.
- [17] Parsons MP, Burt J, Cranford A, et al. Nociceptin induces hypophagia in the perifornical and lateral hypothalamic area [J]. PLoS One, 2012, 7 (9): e45350. DOI: 10.1371/journal.pone.0045350. (收稿日期: 2019-11-11)