

参附注射液对戊巴比妥钠致心衰模型心肌细胞膜 ATP 酶和相关离子的影响

徐菲飞, 彭成*, 王茁伉, 谢晓芳
(成都中医药大学药学院, 成都 610075)

[摘要] 目的:通过探讨参附注射液对新生大鼠心力衰竭心肌细胞 Ca^{2+} -ATP 酶, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性及细胞内 Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} 浓度的影响,揭示参附注射液强心作用的机制。方法:通过胰蛋白酶消化法和差速贴壁法获得心肌细胞,经 0.8% 戊巴比妥钠作用 5min 后,分别给予 1.5, 3, 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (5, 10, 20 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 个不同浓度的参附注射液,作用 1 h,检测心肌细胞 Ca^{2+} -ATP 酶, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶, Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的活性和细胞内 Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} 的浓度。结果:参附注射液能增加心衰模型心肌细胞的搏动强度,提高 Ca^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性,抑制 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的活性,降低细胞内 K^{+} , Ca^{2+} 的浓度,升高细胞内 Na^{+} , Mg^{2+} 的浓度。结论:参附注射液对戊巴比妥钠致心衰细胞有明显的保护作用,且作用的发挥与调节心肌细胞 Ca^{2+} -ATP 酶, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶, Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的活性和细胞内 Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} 的浓度有关。

[关键词] 心力衰竭; 参附注射液; Ca^{2+} -ATP 酶; Na^{+} - K^{+} -ATP 酶; Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶; 心肌细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0196-04

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070196

Effects of the Shenfu Injection on ATPase and Related Ion of Heart Failure Model Myocardial Cell

XU Fei-fei, PENG Cheng*, WANG Zhuo-kang, XIE Xiao-fang

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Shenfu injection on the Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP ase, Ca^{2+} -ATP ase, Na^{+} - K^{+} -ATP and Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} in the myocardial cell injured by nembutal. **Method:** The myocardial cell is gotten by trypsin digestion and purified by different velocity of adherence. After injured by 0.8% nembutal, the myocardial cell is administrated with 3 different concentrations of Shenfu Injection. Then mensurate the vitality of the Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP ase, Na^{+} - K^{+} -ATP ase and Ca^{2+} -ATP ase and Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} in the cell 1 h later. **Result:** The Shenfu injection can increase the strength of the myocardial cell beating injured by nembutal, and enhance the activity of Ca^{2+} -ATP ase and the Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP ase, inhibit the the activity of Na^{+} - K^{+} -ATP, enzyme increase the content of Na^{+} , Mg^{2+} and decrease the content of K^{+} , Ca^{2+} in the myocardial cell. **Conclusion:** The Shenfu injection can protect the myocardial cell injured by nembutal, and the function is relevant to the effects of Shenfu injection on the Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP ase, Na^{+} - K^{+} -ATP ase, Ca^{2+} -ATP ase and the content of Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} of myocardial cell.

[Key words] congestive heart failure; Shenfu injection; Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP ase; Ca^{2+} -ATP ase; Na^{+} - K^{+} -ATP ase; Myocardial cell

[收稿日期] 20121211(014)

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划(2011BA113B05); 国家科技重大专项——重大新药创制专项(2013ZX09201018)

[第一作者] 徐菲飞, 硕士研究生, 从事疾病动物模型与中药复方药理研究, E-mail: ficy213@163.com

[通讯作者] * 彭成, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事疾病动物模型与中药复方药理研究, E-mail: pengchengchengdu@126.com

心力衰竭(心衰)是一种多病因、多症状的慢性综合征。由于心室收缩功能下降,射血功能受损^[1],心排出量不能满足全身组织器官的需要,呈现一种病理状态。临床上以组织血液灌注不足及体循环和(或)肺循环淤血为主要特征。心衰是多数心血管疾病发展到后期出现的严重疾病,也是心血管病人死亡的主要原因^[2]。参附注射液是以红参、附片为主要成分的中成药注射剂,具有回阳救逆、益气固脱、改善心功能的作用^[3],主要用于阳气暴脱的厥脱症和阳虚所致的惊悸、怔忡、喘咳、泄泻、胃疼、痹症等,临床上常用于治疗各种休克、心律失常、心力衰竭等^[4]。

现代药理研究表明,参附注射液可经由多途径、多方面起到保护受损心肌细胞的作用。本课题通过研究参附注射液对戊巴比妥钠致心衰模型心肌细胞 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性及 Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} 各离子浓度的影响,探讨和揭示参附注射液的强心机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 出生 2~3 d 的 SD 大鼠乳鼠, SPF 级,雌雄不限,由成都中医药大学实验动物研究中心提供,动物质量合格证号 SCXK(川)2008-11。

1.2 药品和试剂 参附注射液(雅安三九药业有限公司提供,生药浓度为 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号 120204);戊巴比妥钠;PBS 磷酸盐缓冲液(北京中杉金桥生物技术有限公司);MTT (BIOSHARP);DMSO(分析纯,成都市科龙化工试剂公司);超微量 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶测定试剂盒、超微量 Ca^{2+} -ATP 酶测定试剂盒、超微量 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶测定试剂盒、考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20120408, 210120711, 20120616, 20120616);DMEM 高糖培养基(Hyclone 公司);胎牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司)等。

1.3 仪器 SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司);Integral 3 型超纯水仪(MILLI-Q);FA1104 型分析电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);相差倒置显微镜(Leica);Model550 型酶联免疫检测仪(BIO-RAD,);MCO-15A 型二氧化碳培养箱(SANYO)。

2 方法

2.1 新生大鼠心肌细胞原代培养 取 2~3 d 龄的 SD 大鼠乳鼠,将其用针头固定在蜡板上,以碘伏棉棒消毒胸腹部皮肤,拉去皮肤,撕开乳鼠的胸腔,并

用镊子取出心脏,置于含有 PBS 的培养皿中,挤出心脏内的血后,放到另一装有 PBS 的培养皿中,用两把眼科直镊撕去心包膜,剪取心尖部分。将心尖部分放入玻璃小瓶中,经 PBS 清洗 2 次之后,用眼科弯剪剪成糊状,经 0.1% 的胰蛋白酶分次消化 5 次,去除第 1 次的消化液,后几次消化后马上收集消化液并用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,制成消化悬液。过 200 目细胞筛网,将滤液转移到离心管中,以 $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃去上清,用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞,采用差速贴壁法纯化细胞。将纯化后的细胞悬液重新调整细胞密度为 1×10^6 个/mL 后,按每孔 200 μL 接种至 96 孔培养板或每孔 500 μL 接种至 24 孔培养板上,于 CO_2 孵箱中孵育 24 h 后换液,孵育 72 h 后再次换液,细胞生长至第 5 天,进行实验。

2.2 戊巴比妥钠诱导乳鼠心肌细胞心衰模型建立

将戊巴比妥钠粉末溶于不含血清 DMEM 培养基中,使其终浓度为 0.8% (每次实验前新鲜配制),在造模之前,先用 PBS 将心肌细胞清洗一遍,防止残留的血清影响造模效果。再将戊巴比妥钠溶液加入到培养有心肌细胞的培养板中,96 孔培养板则每孔加入 100 μL ,24 孔培养板则每孔加入 300 μL ,在孵箱中作用 5 min。显微镜下观察,造模成功的心肌细胞搏动停止。

2.3 对心衰模型细胞的影响 在前期对参附注射液用药剂量筛选的基础上,选取参附注射液 1.5, 3, 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (5, 10, 20 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 个剂量组,即每 1 mL DMEM 高糖培养基中分别含有 5, 10, 20 μL 的参附注射液,进行细胞活力, Ca^{2+} -ATP 酶, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶, Na^{+} - K^{+} -ATP 酶及 Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} 的测定^[5]。具体方法如下:取在 96 孔培养板中培养至第 5 天的原代心肌细胞,设 6 组,每组 8 孔,分别为正常组、模型组及不同浓度给药组。模型组及给药组需用戊巴比妥钠造模,造模成功后,给药组给予不同浓度的参附注射液,每孔 100 μL 。药物作用 1 h 后,用 PBS 液清洗一遍细胞,加入含 9% 胎牛血清的 DMEM 培养基,每孔 200 μL ,立即再加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液,每孔 20 μL 。孵箱中继续孵育 4 h,吸尽培养基,每孔加入 150 μL DMSO 溶液,置于脱色摇床上震荡数分钟,至结晶完全溶解为止。然后用酶标仪测定吸光度(A),采用双波长,分别为 570, 655 nm,进行细胞活力的测定。

对 24 孔培养板中培养至第 5 d 的心肌细胞进行给药,造模及给药方法同上。每孔加不同浓度参

附注射液 300 μL , 给药 1 h 后, 用 0.25% EDTA 胰酶将细胞消化下来, 含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中和, 适量生理盐水稀释后, 以 3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 弃去上清液, 加适量蒸馏水, 细胞破碎仪破碎细胞。严格按照试剂盒说明书所述方法进行操作, 测定 Ca^{2+} -ATP 酶, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶, Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性及细胞内 Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} 的浓度。

2.4 统计学处理 以上数据均采用 SPSS17.0 统计软件包建立实验结果数据库并进行分析, 以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示各定量指标的平均值和分散程度。多样本均数的比较采用 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对戊巴比妥钠致心衰模型心肌细胞搏动的影响 正常心肌细胞经戊巴比妥钠造模后, 在显微镜下观察发现细胞搏动停止, 且细胞内颗粒状物质增多。给予不同浓度参附注射液作用 1 h 后, 各剂量组细胞搏动均恢复, 与空白对照组相比, 搏动频率降低, 但搏动强度增强; 与模型组比较, 给药组细胞搏动频率变化不太, 但搏动强度大大增强。

3.2 对戊巴比妥钠致心衰模型心肌细胞活力的影响 心肌细胞模型组与空白组比较, 明显减小, 细胞活力降低; 参附注射液各剂量组与模型组比较, A 明

显增大, 细胞活力提高, 且具有统计学意义。见表 1。

表 1 参附注射液对细胞活力的影响 $(\bar{x} \pm s, n = 8)$

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_{570.655}$
空白	-	0.683 ± 0.155
模型	-	$0.443 \pm 0.146^{1)}$
参附注射液	1.5	$0.590 \pm 0.043^{4)}$
	3	$0.600 \pm 0.051^{4)}$
	6	$0.508 \pm 0.050^{3)}$

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 对戊巴比妥钠致心衰模型心肌细胞内离子的影响 经戊巴比妥钠造模后, 心肌细胞内 Na^{+} , Mg^{2+} 的含量较正常组下降, 且有统计学意义; 给药后, 各剂量组的离子浓度有所升高, 参附注射液 1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 Na^{+} 浓度升高, 参附注射液 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 Mg^{2+} 的升高, 与模型组相比具有统计学意义; 而心肌细胞内 K^{+} , Ca^{2+} 的浓度模型组较正常组上升, 给予参附注射液后, 各剂量组均能降低 K^{+} , Ca^{2+} 的浓度, 且参附注射液 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 K^{+} 浓度的升高及参附注射液 1.5, 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组时 Ca^{2+} 的升高与模型组相比, 具有统计学意义。见表 2。

表 2 参附注射液对戊巴比妥钠致损心肌细胞内各离子的影响 $(\bar{x} \pm s, n = 8)$

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Na^{+}	K^{+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}
空白	-	21.320 ± 1.842	0.925 ± 0.024	2.195 ± 0.584	$0.878 \pm 0.007^{3)}$
模型	-	$20.997 \pm 2.335^{1)}$	$1.000 \pm 0.142^{1)}$	$2.383 \pm 0.546^{2)}$	$0.855 \pm 0.003^{2)}$
参附注射液	1.5	$29.076 \pm 3.589^{2,4)}$	0.928 ± 0.070	$1.731 \pm 0.480^{2,4)}$	$0.859 \pm 0.005^{2)}$
	3	22.413 ± 2.171	$0.919 \pm 0.053^{1)}$	$1.965 \pm 0.286^{3)}$	$0.863 \pm 0.007^{2,3)}$
	6	20.503 ± 1.284	$0.889 \pm 0.034^{2,3)}$	2.308 ± 0.292	$0.860 \pm 0.006^{2)}$

3.4 对戊巴比妥钠心衰模型心肌细胞 ATP 酶活性的影响 经戊巴比妥钠造模后, 心肌细胞 Ca^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性较正常组降低, 差异具有统计学意义, 给予参附注射液后, 酶的活性均有所提高, 且各剂量组的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性与模型组相比, 均具统计学差异。而模型组 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的活性较正常组提高, 用药后, 各剂量组均能明显抑制其活性, 各剂量组均有统计学意义, 此作用与强心苷类药物相似。详见表 3。

4 讨论

心力衰竭的发病机制十分复杂, 目前尚无明确的说法, 还需进一步研究探讨。但从现有的研究看,

心力衰竭主要与细胞内 Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} 等离子的浓度和细胞膜 ATP 酶的活性有关^[6]。离子浓度异常, 将导致心脏舒张和收缩功能紊乱; 而相关 ATP 酶活性的异常, 也会导致细胞内各离子浓度的异常, 继而发生心力衰竭。

细胞内外存在多种离子, 如 Na^{+} , Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} , Cl^{-} 等, 内外离子浓度的稳定和动态平衡, 是维持细胞内外 pH 和渗透压正常的重要保证, 也是细胞进行正常生理活动和能量代谢的基础^[7]。

Na^{+} - K^{+} -ATP 酶, Ca^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶是维持细胞内外离子浓度的重要酶。 Ca^{2+} -ATP 酶是心肌肌浆网的主要蛋白成分, 是调节细胞

表3 参附注射液对戊巴比妥钠致损模型心肌细胞 ATP 酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)U·mg⁻¹

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATPase	Ca ²⁺ -ATPase
空白	-	17.63 ± 2.46	19.86 ± 4.56 [#]	11.60 ± 4.77
模型	-	18.61 ± 3.62	14.91 ± 2.06 ¹⁾	8.07 ± 1.30 ¹⁾
参附注射液	1.5	13.05 ± 4.80 ³⁾	18.50 ± 2.41 ³⁾	9.20 ± 1.21
	3	12.54 ± 5.46 ^{1,3)}	21.25 ± 1.85 ⁴⁾	9.17 ± 2.52
	6	12.84 ± 2.88 ³⁾	24.17 ± 4.53 ^{1,4)}	9.13 ± 2.35

内 Ca²⁺ 平衡的主要酶之一,可将胞浆内游离的 Ca²⁺ 主动转出细胞外或转入细胞内肌浆网 Ca²⁺ 贮库,防止细胞 Ca²⁺ 超载^[8]。Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶是将钙离子主动泵出细胞外的主要途径,心肌缺血引起细胞膜及细胞内亚细胞结构对 Ca²⁺ 运转失常,导致细胞浆游离 Ca²⁺ 浓度提高,其活力下降将导致细胞内高钙^[7]。Na⁺-K⁺-ATP 酶是一种位于细胞膜上、在人体内广泛存在的重要酶,主要负责将细胞内的 Na⁺ 排出细胞外,将细胞外的 K⁺ 转入细胞内,维持细胞膜内外 Na⁺、K⁺ 浓度的平衡^[9]。本研究中心戊巴比妥钠刺激后,原代培养心肌细胞搏动逐渐减弱,甚至消失,细胞膜上 Ca²⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性下降,而 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性增高,使得细胞内 Ca²⁺ 和 K⁺ 升高,Na⁺ 和 Mg²⁺ 浓度下降,从而导致心肌细胞正常生理活动和能量代谢受阻^[10],是心力衰竭的病理机制之一,因此,本模型可作为心力衰竭细胞模型。

参附注射液 1.5,3,6 mg·L⁻¹ 作用心力衰竭细胞 1 h 后,在显微镜下可发现心肌细胞搏动有所恢复,其中以 3 mg·L⁻¹ 组效果最好。经细胞膜上离子交换相关酶活性检测显示,参附注射液 1,5,3,6 mg·L⁻¹ 均可一定程度升高心力衰竭细胞膜上 Ca²⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性而降低 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性,降低心衰模型细胞内 Ca²⁺ 和 K⁺ 的浓度,升高 Na⁺ 和 Mg²⁺ 的含量,从而可以缓解细胞内钙超载现象,使细胞内外离子浓度达到平衡,恢复心肌细胞的自律性和收缩性,表现为心肌细胞搏动。以上结果说明参附注射液强心作用的发挥与其影响 Ca²⁺-ATP 酶, Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶及 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性和细胞内 Na⁺, Mg²⁺, K⁺, Ca²⁺ 的含量有关。

[参考文献]

- [1] 董梅,杨帆,戴小华,等.参附注射液对慢性心力衰竭者心功能及血浆 BNP 的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(8):899.
- [2] 王玉敏,马琰岩,高俊虹,等.黄芪总提取物及其有效成分改善阿霉素致心衰的研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):208.
- [3] 王慧智,谭松,金学明.参附注射液治疗慢性充血性心力衰竭的疗效观察[J].实用中西医结合杂志,1998,11(6):506.
- [4] 瞿波,于永群,侯望平,等.参附注射液对下肢缺血再灌注诱发心肌损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):201.
- [5] 罗明凤,张三印,黄秀深,等.参附注射液和生脉注射液对心肌细胞 Ca²⁺-ATP 酶影响的对比研究[J].天津中医药,2008,25(6):487.
- [6] 史文静,周华,戎靖枫,等.中药补肾方对心力衰竭大鼠 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和琥珀酸脱氢酶的作用研究[J].中国康复理论与实践,2012,18(6):544.
- [7] 马鲁波,刘剑刚,史大卓,等.益气养阴活血对中国小型猪心肌梗死后早起心肌组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性及抗氧化作用[J].中西医结合心脑血管病杂志,2009,7(4):422.
- [8] 胡元会,车维新,曹雪滨,等.心复康口服液对大鼠实验心衰模型心肌细胞 Ca²⁺-ATPase 及琥珀酸脱氢酶活性的影响[J].中国医药学报,2000,15(2):31.
- [9] 沈放,杨黎江,路斌,等.海风藤提取物对 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响[J].时珍国医国药,2008,19(8):1959.
- [10] 钱睿哲,杨诗春,张国平,等.高龄大鼠心肌 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶与心电图变化的关系[J].中国微循环,1999,3(1):24.

[责任编辑 聂淑琴]