

• 药理 •

# 益心康胶囊含药血清对氧应激所致大鼠心肌线粒体 $H^+$ - ATP 酶活性损伤的保护作用

韩玲<sup>1</sup>, 陈可冀<sup>2</sup>

(1. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850; 2. 中国中医研究院西苑医院, 北京 100091)

**摘要:** 目的: 研究中药复方—益心康胶囊(H303)及其各组份含药血清对氧应激所致大鼠心肌线粒体  $H^+$  - ATP 酶活性损伤的保护作用。方法: 利用氧应激损伤体系( $Fe^{2+}$ /VitC)与大鼠心肌线粒体共同孵育 30min, 观察对线粒体  $H^+$  - ATP 酶的影响。结果: 大鼠心肌线粒体氧应激后, 可致酶活性明显降低。单一组份研究表明, 丹参和山楂(600mg/kg 制备含药血清)对酶活性具有明显保护作用, 低于各组份给药量的 H303 含药血清(100-200mg/kg)即可产生相似的保护作用。结论: H303 含药血清对氧应激造成的线粒体呼吸链关键酶活性的降低具有保护作用, 其中丹参和山楂可能是发挥作用的主要成份。

**关键词:** 氧应激; 益心康胶囊; 含药血清; 线粒体;  $H^+$  - ATP 酶

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9903(2001)04-0017-04

## The Protective Effect of Yi-Xin-Kang Capsule-containing Serum on the Activity of $H^+$ - ATPase in Myocardial Mitochondria Injured by Oxygen Stress in Rats

HAN Ling, CHEN Keji\*

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850; \*Xi-Yuan hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091)

**Abstract:** Objective The protective effects of drug-containing serum of Yi-Xin-Kang capsule, a traditional Chinese medicinal prescription, and the individual drugs of the prescription, Danshen and Shanzha, on  $H^+$  - ATPase activity of rat myocardial mitochondria injured by oxygen stress were studied. Method Myocardial mitochondria were incubated with oxygen stress injury system( $Fe^{2+}$ /VitC) for 30 min, and then the activity of  $H^+$  - ATPase was determined. Results Oxygen stress significantly decreased the activity of  $H^+$  - ATPase of myocardial mitochondria. Treatment with the drug-containing serum of H303 or the individual drugs of Danshen and Shanzha significantly protected the activities of the enzyme. The significant protective effects were observed in lower doses(100 and 200mg/kg) of H303-treated groups and large doses(600mg/kg) of Danshen or Shanzha-treated groups. Conclusion H303-containing serum protects the activity of  $H^+$  - ATPase, a key-enzyme of myocardial mitochondria respiratory chain, injured by oxygen stress, in which Danshen and Shanzha may contribute to the effect of H303.

**Key words:** oxygen stress; Yi-Xin-Kang capsule; drug-containing serum; myocardial mitochondria;  $H^+$  - ATPase

益心康胶囊是由丹参、川芎、黄芪等组成的中药复方制剂, 临床用于冠心病、心绞痛等缺血性心脏病的防治, 具有明显疗效<sup>[1]</sup>。药理学实验也证实具有显著的抗心肌缺血及再灌注损伤作用。为探讨其作用机制, 本研究利用血清药理学的方法, 在体外从亚细胞水平观察了益心康胶囊含药血清对氧应激致大鼠心肌线粒体损伤后线粒体  $H^+$  - ATPase 活性的保护作用。

## 1 材料和方法

**1.1 动物** Wistar 大鼠, 雄性, 体重 250~280g。由军事医学科学院动物中心提供。

**1.2 药物及试剂** 益心康胶囊(简称 H303), 上海药物研究所制药厂生产, 批号 9506303, 制剂为棕色粉末状物, 制剂标示量 0.4 克/粒。实验时用水溶解配成 50mg/ml 浓度。三磷酸腺苷为 Sigma 产品; 其余试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器** GF-1 型控时调速式高速分散器(江苏), CR21 型高速冷冻离心机(日立), TLL-C 型台式高速

冷冻离心机(北京), Beckman DV640型核蛋白分析仪(美国)。

**1.4 含药血清的制备<sup>[2]</sup>** H303分别为50、100、200、400、800mg/kg,丹参、山楂、黄芪、川芎分别为600mg/kg给大鼠灌胃(每组4只),灌胃后60min股动脉取血,4℃冰箱过夜,2000转/min离心,留血清,56℃灭活补体,即为含药血清,-20℃保存备用。同时设立对照血清组(灌胃相同体积的水),同样方法取血清分离血清,置4℃冰箱或-20℃保存备用。

**1.5 氧应激损伤大鼠心肌线粒体模型**

**1.5.1 大鼠心肌线粒体(Mitochondria, Mit)的分离制备<sup>[3]</sup>** 取心室肌组织加4倍体积冷分离介质,电动匀浆器匀浆(3000转/分,5sec×2),玻璃匀浆器匀浆1min,离心600g×10min,取上清再离心10000g×10min;沉淀加分离介质(mol/L:蔗糖0.25,EDTA0.001,HEPES0.02,pH7.4),离心10000g×10min;沉淀加分散介质悬浮(mol/L:蔗糖0.25,KCL0.02,HEPES0.02,pH7.4)。以上操作过程均在4℃进行,Lowry法测Mit悬液的蛋白含量。部分线粒体制备标本(3%戊二醛及1%锇酸固定,常规冲洗、脱水、EPON872树脂包埋并聚合,常规制备线粒体标本,利用Philips400T透射电镜观察)。

**1.5.2 Fe<sup>2+</sup>/抗坏血酸损伤体系<sup>[4]</sup>** 用Tris-HCL缓冲液配制不同浓度的FeSO<sub>4</sub>/抗坏血酸,取0.1ml(终浓度分别为0.025/0.025,0.05/0.05,0.1/0.1,0.5/0.5,2.5/2.5,12.5/12.5,25/25mM),分别加入0.2ml新鲜分离出的线粒体中(线粒体蛋白含量1mg/ml),37℃反应30min,加入20mM EDTA 15μl终止反应,10000g离心10min,用线粒体悬浮介质洗1次,4℃保存待测有关指标。

**1.5.3 含药血清对损伤体系的作用** 取0.2ml线粒体悬液(蛋白5mg/ml)加入0.1ml不同浓度(50,100,200,400,800mg/kg)的含药血清,37℃孵育10min后,加入Fe<sup>2+</sup>/抗坏血酸(Fe<sup>2+</sup>/Vc)0.1ml(终浓度0.05/0.05mM),再继续孵育30min,其余均同上述实验。*n* = 7。

实验I分组:(1)正常对照组(CON)(2)Fe<sup>2+</sup>/Vc损伤组(加对照血清)(3)Fe<sup>2+</sup>/Vc-H303含药血清组(50,100,200,400,600,800mg/kg)。

实验II分组:(1)正常对照组(CON)(2)Fe<sup>2+</sup>/Vc损伤组(加对照血清)(3)Fe<sup>2+</sup>/Vc-H303含药血清组(100,200mg/kg)(4)Fe<sup>2+</sup>/Vc-丹参、川芎、黄芪、山楂各组份组(600mg/kg)。

**1.6 线粒体H<sup>+</sup>-ATP酶活性测定<sup>[5]</sup>** 用定磷法测定氧应激损伤后的线粒体质子-ATP酶(H<sup>+</sup>-ATPase)。向测定管加入底物0.45ml(用50mM Tris缓冲液,5mM MgCl<sub>2</sub>,pH7.95溶液配制的5mM ATP)。空白管加10%三氯醋酸0.5ml,25℃温育2min。每管加入线粒体蛋白50μg,25℃温育2min。测定管加10%三氯醋酸0.5ml终止反应。3000rpm离心2min,取上清。加入2.5%FeSO<sub>4</sub>和2%钼酸铵各1ml,振荡均匀。于可见分光光度计690nm处比色,测定其吸光度。H<sup>+</sup>-ATPase活性单位:μmol.Pi/min·mg.pro。

**1.7 统计学方法** 实验数据统计采用*t*检验,表示为均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )。

**2 实验结果**

**2.1 Fe<sup>2+</sup>/Vc对大鼠心肌线粒体H<sup>+</sup>-ATP酶活性的影响** 由表1可见不同浓度的Fe<sup>2+</sup>/Vc可使线粒体H<sup>+</sup>-ATP酶活性明显降低,其活性的抑制率具有明显的浓度依赖关系,即随着Fe<sup>2+</sup>/Vc剂量的增加,该酶活性进行性降低。(见表1)

表1 Fe<sup>2+</sup>/Vc对大鼠心肌线粒体H<sup>+</sup>-ATPase活性的影响

组别	损伤终浓度 (mM/mM)	H <sup>+</sup> -ATPase活性抑制率 (%)
CON	-	100.00
Fe <sup>2+</sup> /Vc	0.025/0.025	23.01
Fe <sup>2+</sup> /Vc	0.05/0.05	36.03
Fe <sup>2+</sup> /Vc	0.1/0.1	36.89
Fe <sup>2+</sup> /Vc	0.5/0.5	52.97
Fe <sup>2+</sup> /Vc	2.5/2.5	63.41
Fe <sup>2+</sup> /Vc	12.5/12.5	75.79
Fe <sup>2+</sup> /Vc	25/25	85.00

**2.2 H303对H<sup>+</sup>-ATP酶活性的保护作用** 选择Fe<sup>2+</sup>/Vc(终浓度0.05/0.05mM)损伤体系,观察了预先给予H303含药血清对线粒体H<sup>+</sup>-ATP酶的保护作用。结果表明:100、200、400、600、800mg/kg H303含药血清加入到50μl线粒体(蛋白含量5mg/ml)组,对酶的保护作用较强,可抑制H<sup>+</sup>-ATP酶活性的下降,与损伤无药血清组比较均有显著性差异(*P* < 0.01),可使酶活性升高11~23%,50mg/kg组无明显保护作用。将上述含药血清加入到100μl线粒体(蛋白含量5mg/ml)中,仅有800mg/ml组H303含药血清对酶活性有显著的保护作用,可使酶活性增加15%。(见表2)

**2.3 H303组方中不同组份含药血清对H<sup>+</sup>-ATP酶活性的影响** 将Fe<sup>2+</sup>/Vc(终浓度0.05/0.05mM)加

入有 100 200mg/kg H303 含药血清和 600mg/kg 丹参、川芎、黄芪、山楂含药血清的线粒体悬液中, 观察 H303 复方及各组份含药血清对酶活性的影响。结果表明, 损伤对照组和各药物保护组的 H<sup>+</sup> - ATP 酶活性均比对照组明显降低 (P < 0.01)。丹参、山楂含药血清组 H<sup>+</sup> - ATP 酶活性具有明显的保护作用 (P < 0.01); 川芎和黄芪组无明显作用; 低于各组份给药量的 H303 复方含药血清 (100, 200mg/kg) 也可产生明显的保护作用。(见表 3)

表 2 H303 含药血清对 Fe<sup>2+</sup> /VitC

所致大鼠心肌线粒体 H<sup>+</sup> - ATPase 损伤的影响( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	给药剂量 (mg/kg)	H <sup>+</sup> - ATPase(μmol/mg. pro*min)	
		A(mit 100μl)	B(mit 50μl)
CON		124.552 ±6.997	124.552 ±6.997
Fe <sup>2+</sup> /Vc(0.05/0.05mM)		91.710 ±12.688**	88.369 ±5.269**
Fe <sup>2+</sup> /Vc-H303	50	94.048 ±10.672	92.454 ±4.302**
Fe <sup>2+</sup> /Vc-H303	100	95.322 ±12.343	97.003 ±7.687**#
Fe <sup>2+</sup> /Vc-H303	200	106.550 ±19.377	98.936 ±8.721**#
Fe <sup>2+</sup> /Vc-H303	400	99.092 ±8.226	101.598 ±7.927**##
Fe <sup>2+</sup> /Vc-H303	600	105.295 ±12.809	115.133 ±9.007**#
Fe <sup>2+</sup> /Vc-H303	800	108.442 ±13.963#	113.780 ±7.488##

注: A 和 B, 为分别向反应体系中为加入线粒体(mit, 5mg/ml) 100μl 和 50μl。与 CON 组比较\* P < 0.01; 与 Fe<sup>2+</sup> /Vc 组比较# P < 0.05, ## P < 0.01(下同)。

表 3 H303 各组份含药血清对 Fe<sup>2+</sup> /VitC 损伤大鼠的心肌线粒体 H<sup>+</sup> - ATPase 的影响( $\bar{x} \pm s; n = 7$ )

组别	给药剂量 (mg/kg)	H <sup>+</sup> - ATPase (μmol/mg. pro*min)
CON	-	72.086 ±0.733
Fe <sup>2+</sup> /Vc(0.05/0.05mM)	-	57.019 ±1.467**
Fe <sup>2+</sup> /Vc-H303	100	60.082 ±2.065#
Fe <sup>2+</sup> /Vc-H303	200	65.350 ±2.448##
Fe <sup>2+</sup> /Vc-丹参	600	63.417 ±2.770##
Fe <sup>2+</sup> /Vc-川芎	600	58.703 ±2.427
Fe <sup>2+</sup> /Vc-黄芪	600	56.705 ±1.217
Fe <sup>2+</sup> /Vc-山楂	600	60.689 ±2.337##

### 3 讨论

众所周知, 线粒体内膜是细胞呼吸和产能的主要部位。其基本功能是通过氧化磷酸化合成 ATP。H<sup>+</sup> - ATP 酶水解活性的变化直接影响线粒体 ATP 的生成与降解<sup>[6,7]</sup>, 关系到整个细胞的命运。本文采用能造成线粒体氧化应激损伤, H<sup>+</sup> - ATPase 活性抑制的 Fe<sup>2+</sup> /抗坏血酸损伤体系, 观察了 H303 含药血清的影响。研究已表明 H303 具有明显的抗脂质过

氧化、清除自由基及显著的抗心肌缺血和再灌注损伤作用<sup>[8-11]</sup>, 临床应用也显示出了良好的疗效<sup>[1]</sup>。本文通过应用其药效学有效剂量制备成的含药血清, 在体外线粒体氧应激损伤实验中进一步发现具有显著的保护 H<sup>+</sup> - ATPase 活性作用, 有一定的量效关系; 发现损伤体系中线粒体的加入量的变化也是影响药效的一个因素, 在同样损伤条件和含药血清浓度下, 对加入 50μl 线粒体的作用比加 100μl 线粒体的保护作用效果更好。此外, 在 H303 拆方研究中, 还发现 600mg/kg 丹参和山楂含药血清对该酶有明显的保护作用, 而 H303 复方在较低浓度的含药血清浓度下, 就可达到相似的保护作用。说明 H303 组方合理, 降低剂量即可达到相同的作用。

我们认为, 中药血清药理学是目前体外研究中中药复方作用机制的一个较好的方法, 但仍处于刚刚起步阶段, 还存在许多问题。另外, 在体外处理过程中, 线粒体酶的活性会受到影响, 造成了每次实验之间的一定差异。因此, 还需要今后在方法学上进一步研究和探索。

### 参考文献:

- [1] 杨学义, 牛玉宏, 王敏华, 等. 复方丹参黄芪胶囊与复方丹参片治疗冠心病的疗效比较[J]. 新药与临床, 1995, 14(6): 332-335.
- [2] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药复方血清药理研究方法的探讨- II[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(3): 45-46.
- [3] Zydowo MM, Swierczynski J, Nagel G, et al. The respiration and calcium content of heart mitochondria from rats with vitamin D<sub>3</sub> induced cardionecrosis[J]. Biochem J, 1985, 226: 155-161.
- [4] Zhao BL, Li XJ, He R, et al. Scavenging effect of extracts of greentea and natural antioxidants on active oxygen radicals [J]. Cell Biophysics, 1989, 14: 175-185.
- [5] Shimahara Y, Ozywa F, Ida T, et al. Role of mitochondria enhancement in maintain hepatic energy change level in endotoxin shock[J]. J Surg Res, 1982, 33(3): 314-323.
- [6] Borutaite V, Morkuniene R, Budriunaite A, et al. Kinetic analysis of changes in activity of heart mitochondrial oxidative phosphorylation system induced by ischemia[J]. J Mol Cell Cardiol, 1996, 28: 2195-2201.
- [7] William Rouslin, Richard B. Long III and Charles W. Broge. Why are ATP depletion rates in situ in ischemic myocardium so much lower than one might predict from the activity of the mitochondrial ATPase in sonicated heart mitochondria? [J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29: 1505-1510.

- [8] 韩玲,任建平,杨素娟,等. 益心康胶囊和复方丹参片对心肌代谢及其耗氧量的影响[J]. 中药药理与临床, 2000, 16(2): 3-5.
- [9] 韩玲,陈可冀. 氧应激对线粒体的损伤及抗心肌缺血中药复方一益心康胶囊含药血清的保护作用[J]. 中国心血管药理通讯, 2000, (23): 30.

- [10] 韩玲,陈可冀. 再灌注致大鼠心肌生物膜损伤及益心康胶囊的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2000, 16(增刊): 142.
- [11] 韩玲,陈可冀. 异丙肾上腺素对大鼠心肌生物膜的影响及益心康胶囊的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2000, 16(增刊): 123.