

· 论 著 ·

附子正丁醇、水提取物对虚寒证模型大鼠 ATP 酶活性及能荷的影响*

刘 珊[‡], 滕佳林, 韩冰冰, 刘一洋[‡], 杨富梅[‡]

(山东中医药大学基础医学院, 济南 250355)

摘要:目的 研究附子正丁醇、水提取物对虚寒证模型大鼠三磷酸腺苷(ATP)酶活性及能荷的影响。方法 将大鼠随机分为空白对照组、模型组、附子正丁醇组、附子水提取物组,模型组与治疗组大鼠均予灌含生药量 3.2 g/mL 的造模药 5 mL,每天 1 次,连续 14 d。空白对照组每天灌服等量的生理盐水,造模成功后,附子正丁醇和水提取物组分别灌服对应的治疗药,每日 1 次,连续 7 d,治疗结束后,分光光度法检测大鼠肝匀浆液中的 ATP 酶活性,高效液相法测试 ATP 含量及能荷的比例。结果 与空白对照组相比,模型组 Na^+-K^+ -ATP 酶、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性明显降低($P<0.01$);与模型组相比,附子正丁醇组 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性升高($P<0.05$),附子正丁醇组 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性高于附子水提取物组($P<0.05$);与空白组相比,模型组 ATP 含量及能荷比例均降低($P<0.05$);与模型组相比,附子正丁醇组能荷比例升高($P<0.05$)。结论 附子正丁醇和水提取物能提高虚寒证大鼠的 ATP 酶活性及能荷的比例,有利于虚寒证大鼠物质代谢的恢复,ATP 酶活性降低可能是造成虚寒模型的原因之一,但仍需后续的研究进一步确认。

关键词:腺苷三磷酸;虚寒证模型大鼠; Na^+-K^+ -ATP 酶; $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶;能荷

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)05-0417-03

Influence of aconite normal butanol and water extract on ATPase activity and energy charge in rat model of deficiency-cold syndrome*

Liu Shan[‡], Teng Jialin, Han Bingbing, Liu Yiyang[‡], Yang Fumei[‡]

(College of Basic Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of aconite normal butanol and water extract on the ATPase activity and the energy charge in the rat model of deficiency-cold syndrome. **Methods** Wistar rats were divided into four groups: blank control group(group 1), model control group(group 2), aconite normal butanol group(group 3) and aconite water extract group(group 4). The rats in the model control and treatment groups were gavaged with the molding medicine 5mL, containing the crude drug 3.2 g/mL, once daily for 14 d, while the rats in the blank control group with same amount of normal saline. The content of Na^+-K^+ ATPase, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ ATPase, ATP and energy charge from deficiency-cold syndrome rat's blood plasma and liver were detected by spectrophotometer. **Results** The activity of Na^+-K^+ ATPase and $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ ATPase in the group 2 was obviously lower than that in the group 1($P<0.01$); the activity of $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ ATPase in the group 3 was higher than that in the group 2 and 4($P<0.05$). The activity of ATPase and the percentage of energy charge in the group 2 was lower than that in the group 1($P<0.05$); the percentage of energy charge in the group 3 was higher than that in the group 2($P<0.05$). **Conclusion** Aconite normal butanol and water extract can increase the activity of ATPase and the percentage of energy charge, and benefit the restoration of material metabolism in the rat model of deficiency-cold syndrome. ATPase activity reducing may be one of causes inducing the deficiency-cold syndrome model, but which still needs subsequent research for further verification.

Key words: adenosine triphosphate; deficiency-cold syndrome model rat; Na^+-K^+ -ATPase; $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ -ATPase; energy charge

中医学认为虚寒证多由素体阳虚,或久居寒凉之处或气虚进一步发展,或过服寒凉之品,或房事太过,伤肾阳等,以致脏腑机能减退,机体失去阳气的温煦,寒从内生,于是形成病性属虚、属寒的证候。依据中医的治疗原则“热者寒之,寒者热之”,应选用温热药进行治疗,而附子是“回阳救逆第一品”,通过观察附子对虚寒模型大鼠三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)酶活性及能荷代谢指标的影响,分析其作用趋势、特点及规律,揭示其与寒热药物属性的内在联系,为更好地指导临床用药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 Wistar 大鼠,40 只,体质量(200 ± 20)g,雌雄各半,由鲁抗动物实验中心提供[许可证编号:SCXK(鲁)20080002]。动物室环境为 SPF 级,按昼夜节律自然照明,于独立送回风净化笼饲养,室温 22~26℃,相对湿度 40%~70%,予⁶⁰Co 辐照饲料和纯净水饲喂。

1.1.2 实验药物

1.1.2.1 中药材 生石膏、龙胆草、黄柏和知母,经山东中医药大学中药学院李峰教授鉴定符合《中华人民共和国药典》2010 版标准。

1.1.2.2 造模药的制备 造模复方生石膏、龙胆草、黄柏和知

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助课题(2007CB512601)。‡:山东中医药大学 2009 级硕士研究生。

母按比例(2.0:1.2:1.0:1.5)混合后加蒸馏水煎煮 2 次,分别过滤,合并 2 次滤液,65 ℃ 水浴浓缩至含生药量生药 3.2 g/mL,4 ℃ 储存备用。

1.1.2.3 治疗药 附子正丁醇提取物 0.398 0 g、附子水提取物 34.355 8 g(山东中医药大学中药学院提供),均相当于附子生药量 28.35 g,分别溶于水和吐温 80 的混合液制成混悬液,制成每毫升含有附子正丁醇 0.001 9 g 的溶液,附子水提取物 0.163 6 g,均相当于每毫升溶液含有 0.135 g 生药。

1.1.3 试剂 ATP 标准品(adenosine 5'-triphosphate disodium salt, Grade 1, minimum 99%)为 Sigma 公司产品,批号:028K7009;ADP 标准品(adenosine 5'-diphosphate sodium salt, from bacterial source)为 Sigma 公司产品,批号:107K7030;AMP 标准品(adenosine 5'-monophosphate sodium salt, minimum 99%)为 Sigma 公司产品,批号:107K7003。乙腈(批号:20090522),娃哈哈纯净水(批号:201009252113WF),生理盐水(批号:100907E05),四汀基溴化铵(批号:2009 年 3 月 15 日),磷酸二氢钠(批号:2009 年 5 月 15 日),磷酸三钠(批号:2009 年 9 月 18 日),磷酸(批号:20100331)。ATP 酶测试盒(批号:20100824)为南京建成生物工程研究所生产。

1.1.4 主要仪器 独立送回风净化笼(型号:15,苏州市苏杭科技器材有限公司),电子天平(型号:JA5003,上海精科天平厂),电子天平(型号:WT11001R,江苏省常州市万得天平仪器厂),恒温水浴锅(型号:HH 系列,江苏金坛中大仪器厂),紫外可见分光光度计(型号:WFZ800-D3B),全自动高速冷冻离心机(型号:GL-20A,湖南离心机厂),高效液相色谱仪(二元泵、自动进样器、柱温箱、FLD 检测器,型号:Agilent1100,安捷伦公司),电子体温计(型号:欧姆龙 MC-142L 型,欧姆龙大连有限公司),四通道自主活动测定仪(型号:H-ZYC-1)。

1.2 方法

1.2.1 分组 将实验动物随机分为:空白对照组(10 只),模型组(10 只),附子正丁醇组(10 只),附子水提取物组(10 只)。

1.2.2 模型复制 实验动物适应性喂养 3 d 后开始造模,除空白对照组均给灌含生药量 3.2 g/mL 的造模药 5 mL,每天 1 次,连续 14 d,空白对照组每天灌服等量的生理盐水。空白对照组和附子提取物组在造模过程中各意外死亡 1 只,故这两组分别为 9 只。

1.2.3 外观观察及体质量、肛温自主活动的测定 造模过程中观察并记录各组大鼠的毛发色泽、行为状态、饮食、大便等外观方面的变化。18:00 开始测量肛温,使用欧姆龙电子体温计检测大鼠肛温,将涂有凡士林的测温探头插入直肠约 3 cm,测温计显示数字稳定蜂鸣音提示后读取数字。自主活动使用 H-ZYC-1 型四通道自主活动测定仪记录各组大鼠 5 min 自主活动次数,各组动物平行交替进行测试。

1.2.4 治疗 按大鼠体质量给附子正丁醇、附子水提取物组大鼠灌服附子正丁醇、水提取物(每毫升含有 0.135 g 生药),给药剂量每千克为 1.35 g 生药,每天 1 次,连续 7 d。

1.2.5 肝组织匀浆液的制备 取出肝脏,用生理盐水洗净,称取 0.5 g 左右置于匀浆器中,按 1:9 的比例将蒸馏水和 0.9% 的生理盐水混匀用来研磨肝组织,之后将组织匀浆液转入离心管,置冷冻离心机,4 ℃ 以 3 000 r/min 离心 15 min。

1.2.6 检测方法

1.2.6.1 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶检测方法 取肝组织匀浆液上清,检测方法按 ATP 酶试剂盒说明操作。

1.2.6.2 ATP 及能荷检测方法 取肝组织匀浆液 0.5 mL 加入预冷的 2.4 mmol/L 的高氯酸(ClO₄) 100 μL,3 500 r/min,离心 10 min,取上清液加入与上清液等体积的 1 mol/L 的磷酸氢二钾(K₂HPO₄),调 pH 至 6.5~7.0,再次 3 500 r/min,离心 10 min,取上清液用 0.45 μm 滤过膜滤过即成色谱分析样品,以上操作在 4 ℃ 下完成。

1.3 统计学处理 实验数据采用统计软件 SPSS17.0 进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外观指标 模型组大鼠,造模当日或第 2 天开始出现软便,继而出现便溏、肛门周围有污物、泄泻、食欲减少、活动减少、畏寒蜷缩、闭目无神;造模第 5 天出现体质量增长逐日下降、懒动、肛温温度略降、喜聚堆、皮毛疏松无光泽。空白对照组大鼠饮食、大便正常,毛发有色泽,行为状态正常。

2.2 附子提取物对虚寒证模型大鼠体质量、肛温及自主活动的影响 由表 1 可见,与空白对照组相比,模型组大鼠的体质量、肛温、自主活动都有下降的趋势,且模型组的肛温较空白对照组下降明显($P < 0.01$)。

表 1 附子提取物对虚寒证模型大鼠体质量、肛温、自主活动的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量(g)	肛温(℃)	自主活动(次)
空白对照组	9	256.93±21.59	36.84±0.55	200.22±134.18
模型对照组	10	239.36±21.80	35.98±0.70 [△]	139.60±83.16
附子正丁醇	10	249.19±27.10	36.24±0.70	155.60±90.27
附子水提取物	9	251.87±18.39	36.15±0.38	162.56±63.53

[△]: $P < 0.01$,与空白对照组比较。

2.3 附子提取物对虚寒证模型大鼠 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶含量的影响 由见表 2 可见,与空白对照组相比,模型组大鼠 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性明显降低($P < 0.01$);附子水提取物组比附子正丁醇组有增强的趋势,差异不明显。与空白对照组相比,模型组 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性明显减弱($P < 0.01$);与模型组相比,附子正丁醇组 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性增强($P < 0.05$);附子正丁醇组比附子水提取物组 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 活性增强($P < 0.05$)。

表 2 附子提取物对虚寒证模型大鼠 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶含量的测定($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶 (μmolpi · mgprot ⁻¹ · h ⁻¹)	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶 (μmolpi · mgprot ⁻¹ · h ⁻¹)
空白对照组	9	0.917 8±0.247 0	1.207 2±0.391 8
模型对照组	10	0.405 0±0.222 5 [△]	0.462 8±0.168 2 [△]
附子正丁醇	10	0.504 3±0.103 7	0.885 7±0.441 3*
附子水提取物	9	0.648 3±0.220 9	0.490 0±0.418 5 [▲]

[△]: $P < 0.01$,与空白对照组比较;*: $P < 0.05$,与模型组比较;[▲]: $P < 0.05$,与附子正丁醇组比较。

2.4 附子提取物对虚寒证模型大鼠 ATP 含量及能荷的影响

由表 3 可见,与空白对照组相比,模型组 ATP 含量及能荷均降低($P<0.05$);与模型组相比,附子正丁醇组能荷比例升高($P<0.05$),其他治疗组均有上升的趋势;这两项指标中,附子水提物组比附子正丁醇组有增强的趋势。

表 3 附子提取物对虚寒证模型大鼠 ATP 含量及能荷的测定($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ATP($\mu\text{g/g}$)	能荷
空白对照组	9	0.217 3 \pm 0.086 2	0.864 2 \pm 0.063 5
模型对照组	10	0.052 8 \pm 0.066 1 \blacktriangle	0.655 3 \pm 0.151 4 \blacktriangle
附子正丁醇	10	0.057 2 \pm 0.032 3	0.708 4 \pm 0.101 7*
附子水提物	9	0.093 6 \pm 0.094 5	0.804 9 \pm 0.077 9

\blacktriangle : $P<0.05$,与空白对照组相比较;*: $P<0.05$,与模型对照组相比较。

3 讨 论

虚寒证是阳气不足引起的寒证,虚寒证动物模型是中医证候动物模型中研究较多的一种,以北京医科大学研制者较为典型^[1]。由于是间接地以寒凉因素致虚,所以在寒证病理存在的同时,虚证本身是否存在这一问题还需要解决。本实验采用的造模方药(包括比例)是北京医科大学较为成熟的虚寒证造模方药,无直接泻下药味,而动物出现明显腹泻,说明是因寒凉过度所致,也说明本造模量损伤机体元气较甚。外观指标以逐渐出现毛脏、毛枯,精神萎靡,蜷缩,倦怠乏力,便溏腹泻,受激排便增多,舌偏淡嫩、淡白,苔少为特征,体质量增长减缓,肛温较低,食量减少,饮水量较实验前减少,以上表现基本符合虚寒证表现。从体质量、肛温、自主活动来看,模型组各指标数值均小于空白对照组,特别是模型组的体温较空白组明显下降($P<0.01$),而经过治疗后各项指标又有所恢复。现代药理研究亦证实,附子能加强心血管循环、扩张血管、增强心肌收缩力、加快心率、增加心排出量和冠状动脉血流量等^[2],也具有抗炎、提高免疫力、抗肿瘤等药理活性,其中二萜生物碱类成分被认为是其特征性的活性成分^[3-6],能上助心阳,中温脾阳,下补肾阳,用于治疗虚寒证非常适合。

从虚寒证大鼠的表现来看,精神萎靡,蜷缩,倦怠乏力,体质量增长减缓,体温较低,食量减少,饮水量较实验前减少均显示虚寒证大鼠的能量代谢降低,因 ATP 酶是反映机体能量代谢的可靠指标,故对虚寒证大鼠 ATP 酶的研究具有重要意义。ATP 酶是存在于组织细胞及细胞器生物膜上的一种蛋白酶,其在物质运送、能量转换、信息传递以及维持细胞膜的完整、组织代谢等方面具有重要的意义,可作为代谢紊乱及损伤组织恢复能力的可靠指标^[7]。ATP 酶是逆离子梯度进行细胞膜内、外转运的离子泵,其中重要的为 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶^[10]。由于 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶主要与 ATP 的分解和利用有关,维持细胞正常内外离子浓度和膜电位,故其活性是反映机体能量代谢水平和生理功能状态的重要指标^[11]。而在消耗 ATP 的同时也释放出大量的热能,所以 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性越高,体内能量消耗和产热过程也越强。另有实验研究表明,甲状腺激素的产热作用也与 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的关系十分密切。 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶是细胞膜上另一种重要的酶,是一种疏水的膜结合蛋白。此酶转运 Ca^{2+} 和水解 ATP 都需要 Mg^{2+} 存在,故称 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶,其在维持细胞内

Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度稳定,对心肌及其他肌肉的收缩、神经细胞动作电位的传导、细胞的分泌和繁殖均有重要影响^[8]。该酶的主要作用涉及 ATP 的分解利用和细胞内外 Ca^{2+} 浓度的维持,其活性受 ATP 含量、 Ca^{2+} 浓度等多种因素的影响。当 ATP 含量下降,胞内 Ca^{2+} 浓度增高或膜脂质过氧化时,该酶的活性降低^[9]。所以, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶是衡量线粒体功能和能量代谢水平的一个重要的指标。对于虚寒证大鼠来说,模型组大鼠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性都比空白对照组弱,用药各组均比模型组活性强;同时从 ATP 含量来看,模型组比空白对照组明显较低,治疗后又升高,能荷的趋势也是一样。

由此可见 ATP 酶活性降低可能是造成虚寒模型的原因之一。附子正丁醇和附子水提物能提高虚寒证大鼠的 ATP 酶活性及能荷的比例,有利于虚寒证大鼠的物质代谢的恢复,提高 ATP 酶活性有利于虚寒症的治疗,具体情况仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈小野,周永生,樊雅莉.大鼠虚寒证模型的研制[J].中国实验动物学报,2002,9(3):155-159.
- [2] 邓家刚,范丽丽,郝二伟,等.附子回阳救逆量效关系的实验研究[J].时珍国医国药,2010,21(3):656-658.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草精选本上册[M].上海:上海科学技术出版社,1999:483-493.
- [4] Murayama M, Mori T, Bando H, et al. Studies on the constituents of Aconitum species. IX. The pharmacological properties of pyro-type aconitine alkaloids, components of processed aconite powder "Kako-bushi-matsu", analgesic, anti-inflammatory and acute toxic activities[J]. J Ethnopharmacol, 1991, 35(2): 159-164.
- [5] 徐敬海,赵洪峰,徐雅娟,等.四川江油生附子强心成分的研究[J].中草药,2004,35(9):964-966.
- [6] Zhao C, Li M, Luo YF, et al. Isolation and structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from fuzi, Aconitum carmichaeli[J]. Carbohydr Res, 2006, 341(4):485-491.
- [7] 樊凯芳,唐迎雪,曹淑霞.三化汤对脑缺血-再灌注老龄大鼠胃肠组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性及 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性的影响[J].时珍国医国药,2009,20(6):1367-1368.
- [8] 刘秉文,陈俊杰.医学分子生物学[M].北京:中国协和医科大学出版,2000:139-140.
- [9] 刘景生.细胞信息与调控[M].2版.北京:中国协和医科大学出版社,2004:663.
- [10] 农文田,颜小若,蓝贤俊.maFGF对慢性衰老大鼠肝组织中ATP酶活力的影响[J].临床和实验医学杂志,2011,10(8):561-563.
- [11] 马清翠.附子、干姜、黄连、大黄对正常大鼠寒热表征和能量代谢的影响[D].山东:山东中医药大学,2010.