

冬虫夏草对缺血再灌注肢体能量代谢和线粒体酶活性的影响

蓝旭¹ 刘雪梅¹ 葛宝丰¹ 许建中²

(1. 兰州军区总医院骨科研究所, 兰州 730050; 2. 第三军医大学西南医院骨科, 重庆)

【摘要】 目的 观察冬虫夏草醇提取液对肢体缺血再灌注损伤的影响。方法 制作兔肢体缺血再灌注损伤动物模型, 实验分对照组、再灌注组和治疗组。取骨骼肌测定三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、一磷酸腺苷、磷酸肌酸含量和线粒体 ATP 酶活性。结果 再灌注组与对照组比较, 骨骼肌能量代谢障碍及其线粒体 ATP 酶活性降低。使用冬虫夏草后, 骨骼肌各项测定指标较再灌注组相比明显改善。结论 冬虫夏草对缺血再灌注损伤骨骼肌有保护作用。

【关键词】 冬虫夏草; 骨骼肌; 再灌注损伤

Effect of ethanol extraction of Cordyceps sinensis on energy metabolism and activity of mitochondrial enzyme of the limb during ischemia reperfusion injury Lan Xu, Liu Xue-mei, Ge Baofeng, et al. Institute of Orthopaedics, The General Hospital of PLA (Lanzhou 730050)

【Abstract】 Objective To observe the effect of ethanol extract Cordyceps sinensis on ischemia reperfusion injury of the Limb. **Methods** The experimental model of ischemia reperfusion injury of limb was produced in the rabbits which were divided into control group, reperfusion group and treatment group. The levels of ATP, ADP, AMP and activity of mitochondrial enzyme of skeletal muscles were measured respectively. **Results** The indexes of energy metabolism were disturbed and activity of mitochondrial enzyme decreased in reperfusion group as compared with those seen in the control group. The measured indexes of skeletal muscles improved when Cordyceps sinensis was used. **Conclusion** Chinese cster pillar fungus might have the protective effect on the muscle cells during ischemia reperfusion injury of the limb.

【Key words】 Cordyceps sinensis; Skeletal muscles; Reperfusion injury

肢体缺血再灌注损伤是骨科临床上常见的病理损伤, 如断肢再植、四肢大血管损伤、骨筋膜室综合征等, 骨骼肌可发生缺血或坏死。目前认为缺血再灌注损伤与能量代谢有重要关系^[1]。为了有效改善再灌注损伤过程中的能量代谢障碍, 我们观察了冬虫夏草醇提取液对骨骼肌缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 试剂: 三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、一磷酸腺苷(AMP)、磷酸肌酸(PCr)为美国 Sigma 产品; 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、ATP-Na₂、乌苯甘为上海生化研究所产品; 冬虫夏草醇提取液由兰州生物制品研究所提供。

1.1.2 色谱仪器和条件: 日本岛津 LC-6A 高效液相色谱分析仪, 配置美国 SP8810 型泵和 SP4600 型积分仪, 岛津 SPD-AM 型紫外检测器; SpherisC₁₈ 分析柱和保护柱为中科院大连化物所产品; 色谱条件为 215mmol/L KH₂PO₄, 2.3mmol/L TBAHS 和 3.5% 乙腈组成 pH6.25 的流动相, 经过滤和脱气后使用。流速为 0.7ml/min, 紫外检测波长为 210nm, 灵敏度

0.32。

1.2 动物模型和测定项目

1.2.1 动物模型制作: 健康成年家兔 36 只, 体重 2.5~3.5kg。3% 戊巴比妥钠(25mg/kg) 静脉注射麻醉。无菌手术显露左大腿股血管鞘并游离股动静脉, 于腹股沟韧带处用微血管夹阻断股动静脉, 在阻断处以下用橡皮带弹性环扎以阻断侧支循环。6h 后取下橡皮带及血管夹, 恢复肢体血供。动物随机分 3 组, 每组 12 只。对照组: 解剖出股动静脉, 不做其它处理。再灌注组: 缺血 6h, 恢复血流再灌注 1h。治疗组: 缺血 6h, 恢复血流前 10min 静脉注射冬虫夏草醇提取液, 10mg/kg, 再灌注 1h。

1.2.2 骨骼肌能量代谢指标测定^[2]: 取左小腿骨骼肌 50mg, 立即用在液氮中已预冷的金属夹板将其夹成冰冻薄片。用 0.42mol/L HClO₄ 制成匀浆, 加 1mol/L KOH 溶液中和, 以超声波细胞粉碎机将线粒体膜打碎, 使能量物质释放于溶液中, 3000r/min 离心 15min, 上清液用 0.2μm 微孔膜过滤, 取 10μl 滤液上柱分析 ATP、ADP、AMP 和 PCr 的含量。

1.2.3 骨骼肌线粒体 ATP 酶活性检测^[3]: 取骨骼肌 50mg,

加 0.32mol/L 蔗糖, 5mmol/L HEPES, 行密度梯度超速离心, 分离提取线粒体膜 ATP 酶。总酶活性测定: 0.6mmol/L EGTA, 150mmol/L Tris, 9mmol/L MgCl₂, 30mmol/L KCl, 300mmol/L NaCl 反应体系中加入样品 100μl 和 ATP-Na₂ 标准液 50μl, 比色法测定无机磷含量。Mg²⁺ ATP 酶和 Ca²⁺ ATP 酶测定: 反应体系加 0.3mmol/L 乌苯甘或 0.56mmol/L CaCl₂, 余同总酶测定。Na⁺-K⁺ ATP 酶 = 总 ATP 酶 - Mg²⁺ ATP 酶 - Ca²⁺ ATP 酶。

1.3 统计学方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料比较用 Excel 97 软件行 *t* 检验。

2 结果

2.1 骨骼肌能量代谢指标的变化 再灌注组与对照组比较, ATP、ADP 和 PCr 含量显著降低 ($P < 0.01$), AMP 含量明显降低 ($P < 0.05$)。使用冬虫夏草后, 治疗组与再灌注组比较, ATP、ADP 和 PCr 含量显著升高 ($P < 0.01$), AMP 含量明显升高 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 实验各组动物骨骼肌能量代谢的变化 (μ mol / mg)

组别	ATP	ADP	AMP	PCr
对照组	3.36 ± 0.12	3.98 ± 0.21	1.59 ± 0.21	5.49 ± 0.22
再灌注组	0.69 ± 0.03 ^a	1.65 ± 0.19 ^a	0.92 ± 0.09 ^b	1.38 ± 0.13 ^a
治疗组	2.15 ± 0.07 ^c	3.31 ± 0.15 ^d	1.25 ± 0.16 ^c	3.97 ± 0.23 ^c

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与再灌注组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$

2.2 骨骼肌线粒体 ATP 酶活性变化 再灌注组与对照组比较, Na⁺-K⁺ ATP 酶、Ca²⁺ ATP 酶和 Mg²⁺ ATP 酶活性显著降低 ($P < 0.01$)。使用冬虫夏草后, Na⁺-K⁺ ATP 酶和 Mg²⁺ ATP 酶活性与再灌注组比较显著升高 ($P < 0.01$), Ca²⁺ ATP 酶活性明显升高 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 实验各组动物骨骼肌线粒体 ATP 酶活性的变化 (μ mol / min · mg)

组别	Na ⁺ -K ⁺ ATP 酶	Mg ²⁺ ATP 酶	Ca ²⁺ ATP 酶
对照组	18.62 ± 0.53	10.62 ± 0.39	10.78 ± 1.08
再灌注组	10.05 ± 0.65 ^a	4.95 ± 0.47 ^a	5.63 ± 0.92 ^a
治疗组	15.16 ± 0.38 ^b	8.51 ± 0.26 ^b	7.09 ± 0.65 ^c

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与再灌注组比较, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$

3 讨论

肢体经历一段时期的缺血, 在血供完全恢复后, 可出现比缺血时更为严重的损伤。目前认为主要是再灌注时氧自由基过量生成导致脂质过氧化、膜通透性增高和细胞内钙超载等原因导致肢体损伤进一步加重^[4]。本实验结果进一步证明,

肢体缺血再灌注早期出现的骨骼肌能量代谢障碍和线粒体 ATP 酶活性降低是再灌注损伤的重要机制之一。

能量不足直至耗竭是启动氧自由基产生的关键因素。骨骼肌缺血期末主要通过糖原酵解产生 ATP, ATP 分解产生 ADP, 部分 ADP 形成 AMP, AMP 可分解为黄嘌呤、次黄嘌呤和腺嘌呤^[5]。后几种代谢物可逸出细胞膜, 通过黄嘌呤氧化系统在缺血再灌注组织产生大量自由基, 进一步加重骨骼肌损伤。缺血再灌注后 ATP 的产生主要来自 PCr 向 ATP 转化的嘌呤核苷酸补救途径, PCr 向 ATP 转化速度很大程度上影响 ATP 水平^[6]。线粒体是细胞能量代谢中心, 线粒体内合成 ATP 为细胞活动提供能量。线粒体膜上有 Na⁺-K⁺ ATP 酶、Ca²⁺ ATP 酶和 Mg²⁺ ATP 酶, 调节膜内外离子平衡并维持膜正常功能, 保证能量代谢的顺利进行。细胞缺血再灌注时, 线粒体 ATP 酶在氧自由基等损伤因素作用下受到损害, 线粒体内外离子浓度失衡, 加重能量代谢障碍。

冬虫夏草是一种名贵中药, 研究表明其提取液含有丰富的氨基酸、核苷酸、虫草酸、虫草素、虫草多糖和多种微量元素等代谢底物^[7]。冬虫夏草醇提取液能够减轻脂质过氧化物损伤并稳定细胞膜, 改善细胞能量代谢和 ATP 酶活性^[8]。冬虫夏草使缺血再灌注骨骼肌 ATP、ADP 和 PCr 升高的原因之一, 可能是由于虫草中含有一些 ATP 合成的前体物质, 使 ATP 合成通过补救途径迅速提高, 并且通过改善线粒体功能的综合效应增强对骨骼肌的保护作用。

参考文献

- Illing B, Horn M, Han H, et al. Protective effect of the specific endothelin-1 antagonist BQ610 on mechanical function and energy metabolism during ischemia/reperfusion injury in isolated perfused rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996, 27(4): 487.
- 李向青, 马丽英, 朱世军, 等. 离体大鼠心肌缺血再灌注损伤中高能磷酸化化合物的时相变化及丹参素的保护作用. *中国病理生理杂志*, 1996, 12(3): 270.
- Hawcroft DM, Ball MT. A new chelation method for determining ATPase activity in skeletal muscle. *Biotech Histochem*, 1996, 71(2): 88.
- Korompilias AV, Chen LE, Seaber AV, et al. Studies of ischemiareperfusion injury in skeletal muscle: efficacy of 21-minosteroids on microcirculation and muscle contraction after an extended period of warm ischemia. *J Orthop Res*, 1997, 15(4): 512.
- Saiki S, Yamaguchi K, Chijiwa K. Phosphoenolpyruvate prevents the decline in hepatic ATP and energy charge after ischemia and reperfusion injury in rats. *J Surg Res*, 1997, 73(1): 59.
- Nakagohri T, Asano T, Uematsu T. The effects of prostaglandin E1 and tyrosine kinase inhibitors on energy status and protein synthetic ability in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Surg Today*, 1998, 28(5): 517.
- 蒋冬花. 冬虫夏草. *生物学杂志*, 1996, 18(5): 25.
- 刘凤芝, 李延平, 赵雅君. 冬虫夏草注射液等对大鼠缺血-再灌注心肌保护作用研究. *中国药理学报*, 1997, 11(5): 46.

(收稿: 2000-11-20 修回: 2001-01-20 编辑: 李为农)