

## 常压缺氧下小鼠心肌 ATP 的耗竭及药物的保护作用

荣沛 戴德哉 张姣娥 邹振伟

(药理学研究室)

筛选抗心肌缺血药的经典方法是测定药物对小鼠耐缺氧死亡时间的影响。但是该法比较粗糙, 缺乏准确性<sup>[1]</sup>。目前, 国内外许多资料表明<sup>[2-4]</sup>, 大鼠或狗在缺血(或缺氧)情况下, 心肌中 ATP 含量明显降低。小鼠常压缺氧下心肌中 ATP 的变化情形未见报道。本文主要以小鼠耐缺氧实验测定小鼠缺氧不同时间后, 心肌中 ATP 变化, 及药物对缺氧 15, 47 min 小鼠心肌中 ATP 含量的影响, 观察药物的作用情况, 阐明小鼠耐缺氧试验作为全心性缺氧模型的合理性。

## 材 料 和 方 法

## 一、材料

小鼠, 体重  $20 \pm 2$  g, 雌雄不拘(本校动物房); 普萘洛尔 (propranolol, 无锡第四制药厂); 维拉帕米 (verapamil, 天津药物研究院); ATP、ADP 及 AMP (Sigma 产品)。高效液相色谱仪: Waters 510 型高压泵, Waters U6K 进样阀, NOVA PAK  $1^{\text{TM}}$  C<sub>18</sub> 反相柱, 柱长 15 cm, 颗粒 5  $\mu\text{m}$ , Waters 490 型可编程序多波长紫外检测器, Waters 数据处理仪。

## 二、方法

1. 小鼠全心肌缺氧模型 小鼠随机分组, 分别置于装有钠石灰 10 g 的广口磨口试剂瓶中, 盖紧瓶塞, 观察小鼠缺氧期间行为, 以呼吸停止作为小鼠死亡的指标。

2. HPLC 法测定心肌高能磷酸化合物<sup>[5]</sup> 取各组缺氧小鼠心肌 200 mg 左右, 放入 5 ml 冰冷的 0.4 mol/L HClO<sub>4</sub> 溶液中, 匀浆。高

速冷冻离心, 1500 r/min, 10 min, 0  $^{\circ}\text{C}$ 。加 1 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调 pH 至 8.0 左右, 取上清液 20  $\mu\text{l}$  进样。流动相: 甲醇与 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 5.92) 之比为 1:99, 紫外检测波长 254 nm。

## 结 果

1. 药物对耐缺氧小鼠生存时间的影响 常压下小鼠耐缺氧平均死亡时间为 17.2 min, 普萘洛尔、维拉帕米 (各 ip 8 mg/kg) 均能显著延长小鼠缺氧死亡时间 (见表 1)。

Tab 1. Prolongation of survival time of mice under anoxia by propranolol and verapamil. 8 mg/kg ip

Group	Mice	Survival time, $\bar{X} \pm \text{SD}$ , min	Prolongation, %
Control	10	17.2 $\pm$ 2.3	
Propranolol	8	27.0 $\pm$ 2.0***	68.1
Verapamil	10	28.0 $\pm$ 5.0***	54.0

\*\*\*p < 0.01 vs control

2. 小鼠全心缺氧时心肌中高能磷酸化化合物的变化时程 小鼠随机分成 6 组, 分别使其缺氧 0, 3, 5, 10, 15, 47 min。结果 (见表 2) 表明, 小鼠在全心缺氧 10 min 内, ATP 含量无

Tab 2. Time course of alterations in ATP levels depleted by global anoxia in mice.  $\bar{X} \pm \text{SD}$ , n = 10

Time of anoxia, min	ATP, $10^{-3}$ mol/g wet tissue
0	5.2 $\pm$ 1.3
3	7.0 $\pm$ 4.0*
5	5.5 $\pm$ 1.9*
10	3.9 $\pm$ 2.6*
15	1.9 $\pm$ 0.7***
47	1.8 $\pm$ 0.6***

\*p > 0.05, \*\*\*p < 0.01 vs control

明显变化, 小鼠行为亦正常。15 min 时, ATP 耗竭明显, 小鼠已倒伏不能动弹。小鼠缺氧 47 min 时(即小鼠耐缺氧至平均死亡时间 17 min 后, 继续观察 30 min), 心肌中 ATP 含量与缺氧 15 min 时无明显差别。提示室温下小鼠心脏停搏 30 min 内, 心肌中 ATP 保持在临死前水平。

3. 药物对小鼠全心缺氧 15, 47 min 时心肌中 ATP 水平的影响 小鼠随机分成 3 组, 缺氧 30 min 前分别 ip 生理盐水 1.0 ml/kg, 普萘洛尔 8 mg/kg, 维拉帕米 8 mg/kg。缺氧 15 min 时, 普萘洛尔组及维拉帕米组小鼠心肌中 ATP 含量与正常组比仅耗竭了 6% 及 2%。从行为上看, 小鼠无异常, 显示明显的抗心肌缺氧作用(表 3)。另取小鼠分组、给药, 小鼠缺氧 47 min 时均已死亡, 三组 ATP 含量无显著差异(表 3)。

Tab 3. Influence of propranolol and verapamil (8 mg/kg ip) on the lethal depletion of myocardial ATP caused by anoxia in mice.  $n=10$ ,  $\bar{X} \pm SD$

Group	ATP, $10^{-7}$ mol/g wet tissue	
	At 15 min	At 47 min
Control	$5.2 \pm 1.3$	$5.2 \pm 1.3$
Non-treated	$1.9 \pm 0.7(n=9)$	$1.8 \pm 0.6$
Propranolol	$4.9 \pm 0.4^{***}$	$2.9 \pm 1.4^{**}$
Verapamil	$5.1 \pm 0.8^{***}$	$2.5 \pm 1.4^{*}$

\* $p>0.05$ , \*\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.01$  vs control

## 讨 论

缺氧使合成 ATP 的  $\beta$ -氧化过程终止<sup>[6]</sup>, 导致 ATP 耗竭。小鼠全心 ATP 的耗竭按其下降速率分为缓慢期及快速期。缓慢期相当长, 缺氧初期血氧饱和度逐渐下降, 同时磷酸肌酸分解以补充 ATP 不足<sup>[8]</sup>, 因而小鼠缺氧 10 min 时, 心肌 ATP 仅耗竭 25%。15 min 后, 上述代偿效应消失, 心肌 ATP 大量耗竭, 至某一临界水平(63%), 小鼠死亡, 此时心肌中 ATP 水平已不能维持正常的新陈代谢及心脏功能。

小鼠常压下缺氧 47 min, 心肌中 ATP 水平比缺氧 15 min 时仅下降了 5%, 提示耐缺氧死亡后 30 min 内, 心肌中 ATP 的自然分解率极低, 因而缺氧 47 min 时心肌中 ATP 水平可以代表缺氧致死时的水平。

普萘洛尔、维拉帕米明显抑制缺氧 15 min 小鼠心肌中 ATP 的耗竭, 提示两药能延缓心肌中高能磷酸化合物的分解, 这可能与两药降低心肌耗氧量有关<sup>[7]</sup>, 两药均不能明显改善缺氧 47 min 时小鼠心肌 ATP 的耗竭, 提示两药不能完全阻断缺氧所致的 ATP 耗竭, 均不能降低致死性 ATP 的阈值。

普萘洛尔及维拉帕米对小鼠耐缺氧生存时间的影响与减慢心肌 ATP 的耗竭一致。后者能更准确地反映药物作用的机制, 故而测定小鼠缺氧时全心 ATP 含量是一种简易而又较好的评价抗心肌缺血药物效应的方法。

关键词 耐缺氧; ATP; 普萘洛尔; 维拉帕米

## 参 考 文 献

- 徐叔云, 卞如濂, 陈 修主编. 药理学实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 711
- Reimer KJ, Jennings RB, Hill ML. Total ischemia in dog heart, *in vitro*. *Circ Res* 1981; 49: 901
- Gubd JS, Puri PS, Matthes P. Biochemical changes in noninfarcted heart muscle following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1971; 2: 253
- Hugenholtz PG, Verdouw PD, de Jong JW, et al. Nifedipine for angina and myocardial ischemia. In Opie LH, ed. *Calcium Antagonists and Cardiovascular Disease*. NY: Raven Press, 1984: 237-255
- 顾建国, 荣 沛, 王义民等. 反相高效液相测定心肌中 ATP、ADP 和 AMP. *中国药科大学学报* 1989; 2: 103
- Rovetto MJ, Lamberton WF, Neely JR. Mechanism of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ Res* 1975; 37: 742
- Lubsen J. Evidence for myocardial salvage in human clinical ischemia. In: Paton W, Mitchell J, Turner P, eds. *Iuphar 9th International Congress of Pharmacology*. London: 1984; Proceedings Vol 3. 257-68
- Bing RJ, Castellanos A, Cradell E, et al. Experimental myocardial infarction: Circulatory, biochemical and pathologic changes. *Am J Med Sci* 1956; 232: 537

## Depletion of Myocardial ATP in Mice Under Anoxia and Protection by Drugs

Rong Pei, Dai Dezai, Zhang Jiaoc, Zou Zhenwei

Research Division of Pharmacology

The normal level of ATP in mouse myocardium determined by HPLC was  $5.2 \pm 1.3 \times 10^{-7} \text{ mol/g wet tissue}$ . The depletion of ATP occurred when mice experienced to anoxia. We found that there were two different stages for depletion—The slow and fast stage. We also observed a critical level of ATP necessary for mouse survival. Propranolol and verapamil showed beneficial effects on the ATP depletion when mice were short of oxygen for 15 min, but they had no effects on mouse survival and the preservation of ATP depletion when mice were short of oxygen for 47 min.

**Key words** Anoxia; ATP; Propranolol; Verapamil

### 药 学 书 刊 联 合 征 订

中国药科大学期刊编辑部办理下列书刊联合征订。如需订阅，请按定价（均含邮挂费）汇款（邮汇、信汇均可），并注明所购书刊名称和册（份）数，写清收书人姓名、地址和邮政编码。本部地址：南京童家巷 24 号，邮政编码 210009，银行账号：中国银行南京城北办 830517014000

**中国药学年鉴** 连续出版的综合性、资料性工具书，每年一卷，已出五卷，精装本，人民卫生出版社出版。83—84 卷 9.40 元，85 卷 7.80 元，86 卷 7.60 元，87 卷 20 元，88 卷可以预定。

**中国药科大学学报** 综合性学术刊物，双月刊，公开发行，邮发，漏订者可补订。1990 年全年 6 元。

**药 学 进 展** 中国药科大学主办，综合性药学情报刊物，以新药研究与开发为重点，季刊、公开发行，邮发，漏订者可补订。1990 年全年 4.5 元。

**老药新用 110 种** 苏开仲编，福建科技出版社出版，介绍 110 种常用老药的新用途，可供医护人员及药学工作者参考。每本 3.85 元。

**药 学 情 报 通 讯** 二军医大和上海药学会合办，公开发行，综合性季刊，资料新颖而实用。1990 年全年 7 元。另有该刊的《新药专辑》，每本 1 元；《美国药典 21 版注射液微粒检查专辑》，每本 0.6 元。

**药 学 英 语 阅 读 资 料 译 注** 张紫洞编著，人民军医出版社出版，可作医药院校新生辅助教材和药学工作者自学专业英语之用。每本 2.2 元。

**药 品 生 产 管 理 规 范 与 质 量 保 证** 华瑞公司程景才编，南京大学出版社出版，全面介绍药品生产管理规范的由来，现状与发展，根据国际标准和通行做法，结合我国国情提出了切合实际的实施办法，并附丰富的软件图表和数据。全书 30 多万字。精装本 10.8 元，平装本 8.8 元。

**药 学 教 育** 全国高等药学教育研究协作组主办的综合季刊，1990 年全年 3.2 元。