

高山红景天苷对外周性疲劳大鼠骨骼肌细胞内 ATP、AMP 以及 Pi 含量的影响*

★ 于洪伟^{1,2,3**} 季宇彬^{1,2,3} 汲晨锋^{1,2,3} (1. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 哈尔滨 150076; 3. 哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站 哈尔滨 150076)

摘要:目的:测定运动大鼠体内 ATP、AMP 和 Pi 的含量变化,从而进一步验证红景天苷的抗疲劳作用。方法:在前期工作的基础上采用高山红景天苷灌胃大鼠并采用高效液相法测定大鼠肌细胞内三磷酸腺苷(ATP)和一磷酸腺苷(AMP)的含量,试剂盒方法测定 Pi 含量变化。高效液相测定结果表明,ATP 的质量浓度在 0.01~0.1 mg/mL 范围内,AMP 的质量浓度为 0.02~5 mg/mL 范围内,浓度与峰面积均有良好的线性关系,其线性回归方程和相关系数分别为: $y = 46\ 555x - 106.98, R^2 = 0.999\ 9$; $y = 20\ 583x + 1\ 845.6, R^2 = 0.999\ 1$ 。结果:ATP 的含量有上升趋势。AMP 含量在 6~24 小时内成现先升高后降低趋势并且在 12 小时出现最大值。各组肌细胞无机磷含量在力竭运动后 6 小时有最大值,然后含量降低。结论:高山红景天苷对于调节和维持细胞能量物质并且对减少疲劳和延缓疲劳具有一定的积极作用。

关键词:高山红景天苷; ATP; AMP; Pi

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

骨骼肌能量代谢与运动能力的关系密切,近年来对能量代谢的研究主要集中于对代谢途径与提高各代谢系统的供能效率,以满足各种不同运动对能量的需求,从而为提高运动成绩提供了可能^[1]。三磷酸腺苷(ATP)和磷酸肌酸组成了人体最快速的供能系统,即磷酸原供能系统^[2]。运动引起磷酸肌酸下降 60% 或高能磷酸化合物总量下降 40% 都将导致二磷酸腺苷(ADP),一磷酸腺苷(AMP),磷酸(Pi)等物质浓度上升^[3]。因此,短时间、大强度运动中肌细胞内 AMP 和 Pi 的堆积,可能是导致疲劳的原因之一。前期实验结果表明,灌胃红景天苷大鼠游泳时间明显延长,因此,高山红景天苷对外周性疲劳大鼠有一定抗疲劳作用^[4]。在此基础上本文就测定运动大鼠体内 ATP、AMP 和 Pi 的含量变化,从而进一步验证红景天苷的抗疲劳作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

大鼠,购自长春国家生物产业基地实验动物中心,批号 SCXK(吉)2004-0005,随机分成 6 组,每组 12 只,分别为正常组、阴性对照组(生理盐水);阳性对照组(人参皂苷 Rg1);高山红景天苷低剂量组、中剂量组和高剂量组。

1.2 动物模型建立

高山红景天苷高剂量组 200 mg/(kg·d),中剂量组 100 mg/(kg·d),低剂量组 50 mg/(kg·d),阴性对照组给同体积生理盐水,阳性对照组 50 mg/(kg·d)(人参皂苷 Rg1)。灌胃给药,每只大鼠 1 mL/次,连续给药 12 天。末次给予受试物 30 分钟后,在大鼠尾根部负重 5% 体重的铅皮,置游泳箱中游泳。水深不少于 50 cm,水温为 26℃。观察大鼠自游泳至力竭的时间,以头部不能露出水面 10 秒为准^[5,6]。

1.3 取材及样品制备

分别于运动后 6、12、24 小时后三个时间点将大鼠断颈处死,每个时间点三只大鼠。迅速在动物股四头肌中间部位取材,冰浴条件下去除脂肪和结缔组织,冷生理盐水洗净后称重,立即剪碎,加入生理盐水(1:9w/v),匀浆,在冰水浴中制成 10% 的组织匀浆,离心后吸取上清,即得待测定样品,放入 -20℃ 冰箱保存备用。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 肌细胞内 ATP 和 AMP 含量 采用高效液相色谱法测定 ATP、AMP 含量^[7]。色谱条件:Waters 高效液相色谱仪(W2695 泵、W2996DAD 检测器、自动进样器、Empower 化学工作站);液相色谱柱(SymmetryShield RP18 5 μl, 4.6 × 150 mm); KQ-

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D200402)

** 作者简介:于洪伟(1983-),男,硕士研究生。Tel:13946144108 E-mail: yhwlove_515@163.com.

250E型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。流动相为:0~7分钟:水相(0.15 mol/L 磷酸二氢钾,6 mmol 四丁基溴化铵,pH=6.00);甲醇=92:8;7~15分钟:水相(0.15 mol/L 磷酸二氢钾,6 mmol 四丁基溴化铵,pH=6.00)比例由92%梯度变化为80%;有机相甲醇比例由8%梯度变化为20%;15~20分钟:水相(0.15 mol/L 磷酸二氢钾,6 mmol 四丁基溴化铵,pH=6.00);甲醇=80:20;流速为1 mL/min。

1.4.2 肌细胞内 Pi 含量 采用试剂盒测定 Pi 含量,方法按试剂盒操作。

2 实验结果

2.1 高山红景天苷对肌细胞中三磷酸腺苷(ATP)含量的影响

标准曲线及线性关系 ATP 的质量浓度为 0.01~0.1 mg/mL 范围内,浓度与峰面积均有良好的线性关系,其回归方程和相关系数分别为: $y = 46\ 555x - 106.98$, $R^2 = 0.999\ 9$ 。力竭性游泳大鼠肌细胞 ATP 含量测定,结果见表 1。与阴性对照组相比,各时间点内高山红景天苷组肌细胞内 ATP 含量升高。高山红景天苷能抑制力竭性游泳大鼠在恢复期肌细胞内 ATP 的含量的下降并增加其含量,这种作用随剂量的增加有上升趋势。

表 1 各组力竭性游泳大鼠在恢复期肌细胞内 ATP 的含量比较 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

组别	6 小时	12 小时	24 小时
正常组		224.96 ± 13.99 **	
对照组	63.89 ± 5.73	170.41 ± 7.19	216.82 ± 10.38
阴性对照组	83.69 ± 7.83	225.99 ± 13.70 **	246.86 ± 13.98
低剂量组	76.19 ± 11.22	198.39 ± 16.92	225.07 ± 13.82
中剂量组	79.38 ± 14.33	216.64 ± 10.21 *	220.99 ± 14.98
高剂量组	95.98 ± 12.77 *	220.01 ± 6.12 **	230.05 ± 13.32

注:与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 高山红景天苷对肌细胞中一磷酸腺苷(AMP)含量的影响

标准曲线及线性关系 AMP 的质量浓度为 0.02~5 mg/mL 范围内,浓度与峰面积均有良好的线性关系,其回归方程和相关系数分别为: $y = 20\ 583x + 1\ 845.6$, $R^2 = 0.999\ 1$ 。

力竭性游泳大鼠肌细胞 AMP 含量测定 结果见表 2。各组 AMP 含量在 6~24 小时内成现先升高后降低趋势并且在 12 小时出现最大值。说明在 12 小时,ATP 分解成 AMP 最多,在 24 小时 AMP 含量降低说明 AMP 又转化为了 ATP,因此,红景天苷具有可增加胞浆内 ATP 的特性,从而起到抗疲劳作用。

表 2 各组力竭性游泳大鼠肌细胞 AMP 含量测定比较 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

组成	6 小时	12 小时	24 小时
正常组		150.06 ± 13.40 **	
对照组	545.81 ± 8.77	622.39 ± 17.06	589.50 ± 27.79
阴性对照组	493.87 ± 10.78 *	1044.34 ± 16.69 **	504.53 ± 11.89 **
低剂量组	545.63 ± 19.11 **	1074.38 ± 21.11 **	601.92 ± 19.11
中剂量组	469.40 ± 23.65 **	1018.20 ± 12.42 **	585.85 ± 8.93
高剂量组	495.38 ± 21.99 *	811.52 ± 20.73 **	499.37 ± 14.79 **

注:与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.3 高山红景天苷对运动疲劳大鼠肌细胞无机磷 Pi 的影响

结果见表 3。各组肌细胞无机磷含量在力竭运动后 6 小时有最大值,说明此时胞浆内 ATP 消耗并分解为 Pi 达到最大值,除阴性对照组,其他各组在 12 小时 Pi 含量达到最小值,说明红景天苷抑制了 ATP 分解,并且 Pi 又作为原料合成了 ATP,在 12 小时到 24 小时内说胞浆内 ATP 又消耗并分解为 Pi。所以红景天苷可以减缓 ATP 消耗并分解为 Pi,产生抗疲劳作用。

表 3 各组高山红景天苷对运动疲劳大鼠肌细胞无机磷 Pi 影响的比较 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	6 小时	12 小时	24 小时
正常组		2.44 ± 0.03 **	
对照组	5.16 ± 0.33	4.06 ± 0.07	3.69 ± 0.05
阴性对照组	4.64 ± 0.03 *	3.23 ± 0.05 **	3.31 ± 0.02
低剂量组	4.13 ± 0.04 **	3.98 ± 0.04	3.50 ± 0.19
中剂量组	4.67 ± 0.25	2.85 ± 0.28 **	3.86 ± 0.43
高剂量组	4.24 ± 0.08 **	3.71 ± 0.06	4.37 ± 0.08 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

ATP 是肌肉收缩的惟一直接能量来源,肌肉中 ATP 含量不足不仅会使肌凝蛋白横桥摆动的能量供应不足,兴奋—收缩脱耦联,或肌浆网摄 Ca^{2+} 障碍,骨骼肌挛缩,降低肌肉工作能力,而且会引起各种代谢紊乱,破坏肌细胞的正常结构和功能^[8-11]。对疲劳的产生具有重要的作用。磷是磷酸肌酸和 ATP 分解的产物,它可能是影响长时间运动能力的一个主要因素^[12-13]。

实验结果表明:高山红景天苷对肌细胞三磷酸腺苷含量的影响实验结果可观察到:在力竭性游泳大鼠的恢复期 24 小时内,各组大鼠肌细胞 ATP 含量逐渐上升,这一作用随剂量的增加而增强但不明显;其中阴性组在 24 小时恢复正常(与正常对照组相比无显著差异即 $P < 0.01$),其他各给药组均在 12 小时恢复正常。说明高山红景天苷能抑制力竭性游泳大鼠在恢复期的 6~4 小时肌细胞内 ATP 的含量的下降并增加其含量,这种作用随剂量的增加有上升趋势。各组肌细胞无机磷(下转第 56 页)