

## 果糖二磷酸钠镁改善心肌缺血大鼠的能量代谢

朱深银<sup>1\*</sup>, 周远大<sup>1</sup>, 何海霞<sup>1</sup>, 王 驰<sup>2</sup>

(重庆医科大学 1. 附属一院临床药理学研究室, 2. 化学教研室, 重庆 400016)

**摘要:** 目的 探讨果糖二磷酸钠镁(FDPM)抗大鼠心肌缺血损伤的作用是否与改善能量代谢有关。方法 大鼠左冠状动脉结扎4 h制备急性心肌梗死模型,于结扎后5 min分别自股静脉iv FDPM(45, 90, 150 mg·kg<sup>-1</sup>),硫酸镁(10 mg·kg<sup>-1</sup>),1,6-二磷酸果糖钠(130 mg·kg<sup>-1</sup>),硝酸甘油(5 mg·kg<sup>-1</sup>)及等容量生理盐水,高效液相色谱法测定心肌缺血区能量物质含量,定磷法测定ATP酶活性。结果 FDPM(45, 90, 150 mg·kg<sup>-1</sup>)能增加缺血区心肌ATP,ADP,AMP及总腺苷酸含量和能荷;提高缺血区心肌Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATP酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP酶和Mg<sup>2+</sup>-ATP酶活性;其具有1,6-二磷酸果糖钠和硫酸镁的类似作用特点。结论 FDPM通过增加缺血区心肌能量物质含量及提高ATP酶活性而产生心肌缺血保护作用。

**关键词:** 果糖二磷酸钠镁; 1,6-二磷酸果糖; 硫酸镁; 心肌缺血; 能量代谢; 腺苷三磷酸酶

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)05-0339-04

能量代谢障碍被认为是心肌缺血再灌注损伤的始动环节,而心肌缺血损伤时,心肌细胞膜上ATP酶活性降低<sup>[1]</sup>。文献报道1,6-二磷酸果糖(fructose-1,6-diphosphate, FDP)和镁盐能有效保护缺血心肌损伤,改善缺血心肌的能量代谢<sup>[2]</sup>。果糖二磷酸钠镁(sodium magnesium fructose diphosphate, FDPM)是由1,6-二磷酸果糖钠(FDP-Na<sub>2</sub>)与硫酸镁衍生而形成<sup>[3]</sup>。彭盛得等<sup>[4]</sup>报道1,6-二磷酸果糖镁对异丙肾上腺素所致大鼠心肌损伤具有保护作用,与其抗氧化、提高血清无机磷含量和降低血清K<sup>+</sup>有关。本

文作者<sup>[5]</sup>曾研究了FDPM抗冠脉结扎所致大鼠心肌缺血损伤作用。本文采用冠脉结扎方法制备大鼠急性心肌梗死模型,研究FDPM对缺血心肌能量代谢和膜ATP酶活性影响,进一步探讨其抗心肌缺血损伤的作用机理。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品、试剂、仪器与动物

FDPM(C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>36</sub>P<sub>6</sub>Na<sub>8</sub>Mg·20H<sub>2</sub>O, M<sub>r</sub> 1578.78)由本室与重庆医科大学化学教研室提供, FDP:Mg:Na的分子比为3:1:8,百分含量为FDP 64.4%, Mg 1.52%, Na 11.65%; FDP-Na<sub>2</sub>(FDP含量75%)为意大利Foscama生物化学制药公司生产;硫酸镁注射液为无锡市第七制药厂生产;硝酸甘油(nitroglycerine)注射液为广州明兴制药厂生产;腺苷-5'-三磷酸二钠(Na<sub>2</sub>ATP)、腺苷-5'-二磷酸钠(NaADP)、腺苷-5'-单磷酸钠(NaAMP)均购自Sigma公司;氯化三苯基四氮唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)由上海生工生物公司提供;ATP酶及组织蛋白测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。大连依利特科学仪器有限公司生产P200 II高效液相色谱仪;上海光电医用电子仪器有限公司生产ECG-6511型心电图机;浙江医科大学仪器厂生产江湾 II型小动物呼吸机;日本岛津Uvmini-1240型紫外分光光度计。

Wistar大鼠,♂,体重210~270 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

#### 1.2 冠状动脉结扎模型及分组

参照文献<sup>[6]</sup>用10%氨基甲酸乙酯(0.7 g·kg<sup>-1</sup> ip)麻醉,仰卧固定,切开左胸部皮肤,于第四肋间隙钝性分离肌肉,轻压右胸,挤出心脏,于肺动脉圆锥与左心耳间距左冠脉起源2~3 mm处结扎冠状动脉,随后将心脏送回胸腔,排出胸腔内空气,缝合切口。整个开胸过程中行人工呼吸,闭胸后待自主呼吸恢复后撤除人工呼吸。通过观察左室表面局部发绀和心电图ST段抬高来证实模型成功<sup>[7]</sup>。假手术

收稿日期: 2002-02-07 接受日期: 2002-07-25

基金项目: 重庆市卫生局科学基金资助项目(97-4)

作者简介: 朱深银(1971-),男,陕西省商南人,硕士,助教。

\* 联系作者 Tel: (023)68898185,

E-mail: zhushenyin0486@sina.com

组的手术全过程相同,穿线不结扎。大鼠随机分为 8 组:假手术组;缺血对照组;FDPM 45, 90, 150 mg·kg<sup>-1</sup>组;硫酸镁 10 mg·kg<sup>-1</sup>组;FDP-Na<sub>2</sub> 130 mg·kg<sup>-1</sup>组和硝酸甘油 5 mg·kg<sup>-1</sup>组,每组 10 只。根据分子量折算 FDPM 150 mg 分别与 130 mg FDP-Na<sub>2</sub> 所含 FDP 及 10 mg 硫酸镁所含 Mg<sup>2+</sup> 相当。各组大鼠于结扎冠状动脉后 5 min 通过股静脉分别给予相应药物,容量为 5 mL·kg<sup>-1</sup>体重。

### 1.3 心肌 ATP 酶活性及蛋白质含量测定

冠脉结扎 4 h 后放血处死大鼠,取肿胀发绀的左心室缺血区心肌约 100 mg,准确称重,加生理盐水适量,在冰浴中用匀浆器制成 10% 匀浆(W/V),离心(1006 × g, 15 min),取上清液,定磷法测定 ATP 酶活性,考马斯亮蓝比色法测定组织蛋白质含量。

### 1.4 心肌 ATP, ADP 和 AMP 含量测定

结扎冠状动脉 4 h 后,取出大鼠心脏,置冰生理盐水中清洗残血,取肿胀发绀的左心室缺血心肌组织约 100 mg,准确称重,用冰 0.4 mol·L<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub> 制成 10% 匀浆,超声粉碎(振幅 16 ~ 20 μm, 30 s), 4℃ 离心(2795 × g, 20 min),精确吸取上清液 0.2 mL 置于 0.5 mL 离心管中,加入 3 mol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 mL 中和,旋涡振荡,25 155 × g 离心 3 min,取上清液 20 μL 进样,进行高效液相色谱分析<sup>[8]</sup>。

### 1.5 统计学处理

结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较用单因素方差

分析及 *q* 检验。

## 2 结果

### 2.1 对缺血区心肌腺苷酸含量及能荷的影响

表 1 结果表明,缺血对照组缺血心肌与假手术组比较,ATP, ADP, AMP, TAN(为 ATP + ADP + AMP) 含量及能荷 E<sup>[7]</sup> [为(ATP + 1/2 ADP)/TAN] 明显减少。而与缺血对照组比较,FDPM 能剂量依赖性增加缺血心肌组织的 ATP(*r* = 0.9631, *P* < 0.01), ADP(*r* = 0.9803, *P* < 0.01), AMP(*r* = 0.9938, *P* < 0.01), TAN(*r* = 0.9998, *P* < 0.01) 含量及能荷 E(*r* = 0.9966, *P* < 0.01)。FDPM 90 和 150 mg·kg<sup>-1</sup> 组的 ATP, ADP, AMP 和 TAN 含量明显高于 FDP-Na<sub>2</sub> 与 MgSO<sub>4</sub> 组,提示 FDPM 能减少缺血区心肌组织腺苷酸消耗,其作用具有 FDP 和硫酸镁类似特点。

### 2.2 对缺血区心肌 ATP 酶活性的影响

由表 2 结果看出,与假手术组比较,缺血对照组 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶、Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性显著降低,而 FDPM 能剂量依赖性提高心肌缺血区 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶(*r* = 0.9932, *P* < 0.05)、Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶(*r* = 0.9982, *P* < 0.01) 和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶(*r* = 0.9975, *P* < 0.01) 活性。FDPM 150 mg·kg<sup>-1</sup> 组提高 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性分别比 FDP-Na<sub>2</sub> 或 MgSO<sub>4</sub> 组明显。

**Tab 1. Effect of sodium magnesium fructose diphosphate (FDPM) on contents of adenylates and energy charge (E) in rat ischemic area of myocardium**

Drug /mg·kg <sup>-1</sup>	Content/μmol·g <sup>-1</sup> wet weight				
	ATP	ADP	AMP	TAN	E
Sham	4.03 ± 0.09 <sup>**</sup>	2.50 ± 0.08 <sup>**</sup>	2.18 ± 0.04 <sup>**</sup>	8.71 ± 0.21 <sup>**</sup>	0.61 ± 0.05 <sup>**</sup>
I	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.46 ± 0.11	0.71 ± 0.14	0.26 ± 0.03
I + FDPM 45	0.29 ± 0.10 <sup>**ΔΔ</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>**#</sup>	0.99 ± 0.32 <sup>**ΔΔ</sup>	1.70 ± 0.39 <sup>**ΔΔ</sup>	0.30 ± 0.06 <sup>**#</sup>
I + FDPM 90	0.47 ± 0.12 <sup>**##</sup>	0.28 ± 0.08 <sup>**#</sup>	1.20 ± 0.24 <sup>**##</sup>	1.95 ± 0.39 <sup>**##</sup>	0.31 ± 0.05 <sup>**#</sup>
I + FDPM 150	0.56 ± 0.09 <sup>**##</sup>	0.37 ± 0.10 <sup>**##</sup>	1.39 ± 0.24 <sup>**##</sup>	2.31 ± 0.39 <sup>**##</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>**#</sup>
I + FDP-Na <sub>2</sub> 130	0.24 ± 0.07 <sup>**</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>**</sup>	0.98 ± 0.21 <sup>**</sup>	1.41 ± 0.27 <sup>**</sup>	0.24 ± 0.04
I + MgSO <sub>4</sub> 10	0.19 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.28 ± 0.05 <sup>**</sup>	0.65 ± 0.20 <sup>**</sup>	1.12 ± 0.19 <sup>**</sup>	0.30 ± 0.07 <sup>**</sup>
I + NTG 5	0.17 ± 0.07 <sup>**</sup>	0.15 ± 0.03	0.71 ± 0.22 <sup>**</sup>	1.03 ± 0.25 <sup>**</sup>	0.24 ± 0.07

Sham: sham operation; I: ischemia induced by the ligation of descending arterial branch of left coronary artery for 4 h. FDPM, FDP-Na<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> and nitroglycerine (NTG) were given iv 5 min after ischemia, respectively. TAN = ATP + ADP + AMP, E = (ATP + 1/2 ADP)/TAN.  $\bar{x} \pm s$ , *n* = 10. <sup>\*\*</sup> *P* < 0.01, compared with group I; <sup>##</sup> *P* < 0.01, compared with I + FDP-Na<sub>2</sub>; <sup>ΔΔ</sup> *P* < 0.01, compared with I + MgSO<sub>4</sub>; <sup>++</sup> *P* < 0.01, compared with I + NTG.

**Tab 2. Effect of sodium magnesium fructose diphosphate on ATPase activities in rat ischemic area of myocardium**

Drug /mg·kg <sup>-1</sup>	ATPase activity/mmol Pi·h <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> protein		
	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	Mg <sup>2+</sup> -ATPase	Ca <sup>2+</sup> -ATPase
Sham	25.3 ± 3.1 <sup>**</sup>	48.2 ± 4.2 <sup>*</sup>	28.1 ± 3.6 <sup>**</sup>
I	11.0 ± 2.4	29.0 ± 4.5	14.4 ± 3.8
I + FDPM 45	18.1 ± 2.8 <sup>**+</sup>	34.3 ± 6.1 <sup>*</sup>	16.4 ± 3.3
I + FDPM 90	19.9 ± 3.5 <sup>**++</sup>	38.4 ± 4.7 <sup>*</sup>	18.9 ± 3.9 <sup>*</sup>
I + FDPM 150	21.5 ± 3.5 <sup>**Δ++</sup>	45.2 ± 5.3 <sup>**#Δ++</sup>	21.5 ± 3.1 <sup>**</sup>
I + FDP-Na <sub>2</sub> 130	18.5 ± 3.2 <sup>**</sup>	39.6 ± 5.4 <sup>**</sup>	17.6 ± 2.7
I + MgSO <sub>4</sub> 10	17.2 ± 3.6 <sup>**</sup>	40.1 ± 3.6 <sup>**</sup>	19.3 ± 4.0 <sup>*</sup>
I + NTG 5	14.4 ± 2.6 <sup>*</sup>	37.3 ± 5.3 <sup>**</sup>	20.6 ± 2.0 <sup>**</sup>

The treatments were the same as described in Tab 1.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , compared with group I; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared with I + FDP-Na<sub>2</sub>; <sup>Δ</sup>  $P < 0.05$ , compared with I + MgSO<sub>4</sub>; <sup>+</sup>  $P < 0.01$ , compared with I + NTG.

### 3 讨论

心肌梗死范围缩小是心肌缺血损伤保护最主要的结果,前文报道 FDPM 与 FDP-Na<sub>2</sub> 及 MgSO<sub>4</sub> 一样均可减轻冠脉结扎所致心肌损伤,且呈剂量依赖性<sup>[6]</sup>。心肌缺血时糖酵解过程受抑制,同时 ATP 耗竭,细胞内与 ATP 结合的 Mg<sup>2+</sup> 丢失到细胞外,导致细胞内低镁,使得依赖 Mg<sup>2+</sup> 能量代谢酶活性降低和线粒体内 Ca<sup>2+</sup> 聚积,能量代谢发生障碍<sup>[8]</sup>。外源性 FDP 作为高能底物,直接参与糖酵解代谢;还可作为代谢调节剂,解除糖酵解的抑制,促进糖利用和缺血心肌生成 ATP<sup>[2]</sup>。FDPM 为 FDP-Na<sub>2</sub> 与镁的衍生物,预测其具有 FDP 和 Mg<sup>2+</sup> 作用,可以促进心肌磷酸腺苷酸和磷酸肌酸生成。本研究发现,FDPM 能提高缺血区心肌中 ATP, ADP, AMP, TAN, E 含量,作用类似 FDP 和硫酸镁,说明 FDPM 具有 FDP 和 Mg<sup>2+</sup> 二者作用特点。另外镁能舒张冠脉血管而改善缺血区心肌血流量<sup>[9]</sup>,增加氧和营养底物由非缺血区向边缘区和缺血区直接弥散,并且减弱心肌收缩降低心脏负荷;加上 FDPM 减少缺血心肌细胞损伤,这样防止 ATP 的分解产物腺苷透过细胞膜丢失,保存了再磷酸化的底物。

心肌缺血时大量氧自由基产生,其攻击生物膜,造成膜脂质过氧化反应而损伤生物膜。文献报道 FDP 和 Mg<sup>2+</sup> 减少氧自由基生成和其造成的损伤<sup>[10]</sup>。本研究结果显示 FDPM 能改善缺血心肌的 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶、Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性。

分析其原因可能为:FDPM 改善能量代谢,增加细胞内 ATP 含量而直接改善酶活性;抑制氧自由基生成及提高超氧化物歧化酶活性而增加氧自由基清除能力,防止膜发生脂质过氧化反应,从而保护膜上 ATP 酶活性;镁是 ATP 酶的辅因子,给 FDPM 后,由于补充镁,纠正了细胞内缺镁状况,保护了膜上 ATP 酶活性。FDPM 调节 ATP 酶活性作用可能有多种方式,确切机理有待进一步研究,但 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶、Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性的提高,使得细胞内外 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 尽可能维持正常梯度分布,从而维持正常极化状态和防止细胞水肿和胞浆 Ca<sup>2+</sup> 超载及镁丢失。从以上研究结果可以看出,FDPM 通过增加缺血心肌能量物质含量及提高心肌 ATP 酶活性,从而有效地保护缺血心肌损伤。

### 4 参考文献:

- [1] Wan FS, Lei L, Zhao XM, Gong WH. Effect of taurine on adenosinetriphosphatase activity in the ischemic myocardium of rats[J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1998, **149**(3):226-228.
- [2] Hassinen IE, Nuutinen EM, Ito K, Nioka S, Lazzarino G, Giardina B, et al. Mechanism of the effect of exogenous fructose 1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism[J]. *Circulation*, 1991, **83**(2):584-593.
- [3] Wang C, Xu CX, Zhou YD, Yu HY, Shen PJ. Preparation and use of D-fructose-1,6-diphosphate sodium magnesium[J]. The State Knowledge Property Administration of

- the People's Republic of China. Invention Patent Bulletin (中华人民共和国国家知识产权局. 发明专利公报), 1999, **15**(12):20.
- [4] Peng SD, Gong PL, zeng FD. Effects of magnesium fructose-1,6-diphosphate on myocardial lesion by isoproterenol in rats[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2000, **14**(4):300-304.
- [5] Zhu SY, Zhou YD, He HX. Protective effects of sodium magnesium fructose diphosphate on myocardial infarction in rats[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2002, **37**(3):181-183.
- [6] Chen X. Methodology of drug experiments against myocardial ischemia/reperfusion injury[A]. In: Xu SY, Bian RL, Chen X, ed. *Methodology of Pharmacological Experiments* (药理实验方法学)[M]. 2nd ed. Beijing: Peoples' s Medical Publishing House, 1991. 921-940.
- [7] Li XQ, Ma LY, Wang XM, Zhu SJ, Xu CQ, Jiang XS, *et al.* The changes in high energy phosphates in different phases of ischemia/reperfusion in rat heart and the protective effect of salvianic acid A[J]. *Chin J Pathophysiol*(中国病理生理杂志), 1996, **12**(3):270-272.
- [8] Celerier E, Laulin J, Larcher A, Le-Moal M, Simonnet G. Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats[J]. *Brain Res*, 1999, **847**(1):18-25.
- [9] Kemp PA, Gardiner SM, March JE, Rubin PC, Bennett T. Assessment of the effects of endothelin-1 and magnesium sulphate on regional blood flows in conscious rats, by the coloured microsphere reference technique[J]. *Br J Pharmacol*, 1999, **126**(3):621-626.
- [10] Garcia LA, Dejong SC, Martin SM, Smith RS, Buettner GR, Kerber RE. Magnesium reduces free radicals in an *in vivo* coronary occlusion-reperfusion model[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **32**(2):536-539.

## Improvement of sodium magnesium fructose diphosphate on energy metabolism of ischemic myocardium in rats

ZHU Shen-Yin<sup>1</sup>, ZHOU Yuan-Da<sup>1</sup>, HE Hai-Xia<sup>1</sup>, WANG Chi<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacology, the First Affiliated Hospital, 2. Department of Chemistry, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** **AIM** To explore whether the effect of sodium magnesium fructose diphosphate (FDPM) against ischemic myocardium injury in rats is related to improve energy metabolism. **METHODS** The acute myocardial infarction was induced by ligation of the left coronary artery for 4 h. FDPM (45, 90, 150 mg·kg<sup>-1</sup>), magnesium sulfate (10 mg·kg<sup>-1</sup>), fructose-1,6-diphosphate (130 mg·kg<sup>-1</sup>), nitroglycerine (5 mg·kg<sup>-1</sup>) or normal saline was intravenously infused 5 min after the left coronary artery ligation. High energy phosphates (ATP, ADP, AMP) in the ischemic myocardium were assayed by high performance liquid chromatography and ATPase activity was assayed by colorimetric assay. **RESULTS** FDPM at the dose of 45, 90 and 150 mg·kg<sup>-1</sup> iv increased the

contents of ATP, ADP, AMP and total adenine nucleotide and energy charge, enhanced the activities of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase in ischemic zone of myocardium, suggesting that FDPM have similar characteristics of both fructose-1,6-diphosphate and magnesium sulfate. **CONCLUSION** FDPM exerts myocardial protection against ischemic injury by improving energy metabolism and ATPase activities.

**Key words:** sodium magnesium fructose diphosphate; fructose-1,6-diphosphate; magnesium sulfate; myocardial ischemia; energy metabolism; adenosinetriphosphatase

**Foundation item:** The project supported by Science Foundation of Public Health Bureau of Chongqing municipality(97-4)

(本文编辑 董立春)