

# 哇巴因对大鼠离体心功能作用的量-效关系

王海珍<sup>1</sup> 史娜<sup>1</sup> 王耀军<sup>2</sup> 王竹青<sup>2</sup> 李盼盼<sup>2</sup> 姜玉新<sup>1</sup> 王静<sup>1</sup> 周萍萍<sup>1</sup> 王海华<sup>1</sup>

( 皖南医学院 1. 生理教研室; 2. 临床学院, 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 观察不同浓度哇巴因( ouabain, OUA) 对大鼠离体心功能的影响。方法: SD 雄性大鼠随机分成 7 组(  $n = 6$  ): 正常组( NC 组), OUA  $10^{-9}$  mol/L 组, OUA  $10^{-8}$  mol/L 组, OUA  $10^{-7}$  mol/L 组, OUA  $10^{-6}$  mol/L 组, OUA  $10^{-5}$  mol/L 组, OUA  $10^{-4}$  mol/L 组。左心室插管检测各组大鼠离体心脏血流动力学指标: 左室峰压( LVSP)、心率( HR)、左室内压最大上升速率(  $+ dp/dt_{max}$ ); 观察各组大鼠的心律失常发生情况并进行心律失常评分; 检测各组相同时间点的冠脉流出液中乳酸脱氢酶( LDH) 的活性, 同时测定各组心肌组织中  $Na^+ - K^+ - ATP$  酶的活性, HE 染色观察各组大鼠心肌形态学变化。结果: 同 NC 组相比, OUA  $10^{-9}$  mol/L 组大鼠心脏 LVSP  $\times$  HR 和  $+ dp/dt_{max}$  无明显差异(  $P > 0.05$  ), OUA  $10^{-8}$  mol/L 和  $10^{-7}$  mol/L 组大鼠心脏 LVSP  $\times$  HR 和  $+ dp/dt_{max}$  呈剂量升高而增强(  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  ); OUA  $10^{-9}$  mol/L、OUA  $10^{-8}$  mol/L 组的  $Na^+ - K^+ - ATP$  酶的活性明显升高(  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  ); 同 NC 组相比, OUA 浓度在(  $10^{-6} \sim 10^{-4}$  ) mol/L 时, OUA 对各组大鼠的心功能呈剂量依赖性抑制作用(  $P < 0.01$  ); 各组大鼠的心律失常评分明显升高; 各时间点心脏灌流液中 LDH 的活性亦明显升高, 各组心肌组织  $Na^+ - K^+ - ATP$  酶活性均呈剂量依赖性降低(  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  )。结论: 低浓度哇巴因 [ (  $10^{-9} \sim 10^{-7}$  ) mol/L ] 对大鼠离体心脏有强心作用, 但随着哇巴因浓度的升高 [ (  $10^{-6} \sim 10^{-4}$  ) mol/L ] 转为对心脏呈剂量依赖性抑制作用。

**【关键词】**哇巴因; 离体心脏; 大鼠; 浓度依赖

**【中图分类号】**R 541.7 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2016. 02. 002

## Dose-effect relationship of quabain on the cardiac function of isolated rat heart

WANG Haizhen, SHI Na, WANG Yaojun, WANG Zhuqing, LI Panpan, JIANG Yuxin, WANG Jing, ZHOU Pingping, WANG Haihua

Department of Physiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To observe the effect of different dosage of ouabain( OUA) on the isolated cardiac function in rats. **Methods:** Forty-two SD rats were randomized into 7 groups (  $n = 6$  for each ), namely: normal control group ( NC group ), OUA  $10^{-9}$  mol/L group, OUA  $10^{-8}$  mol/L group, OUA  $10^{-7}$  mol/L group, OUA  $10^{-6}$  mol/L group, OUA  $10^{-5}$  mol/L group and OUA  $10^{-4}$  mol/L group. Cardiac function index were evaluated by left ventricular systolic pressure ( LVSP ), heart rate ( HR ), the maximum upstroke velocity of intraventricular pressure (  $+ dp/dt_{max}$  ). The incidence of ventricular arrhythmias and arrhythmia score were determined. Coronary effluent was collected for estimating the activity of lactate dehydrogenase ( LDH ). The  $Na^+ - K^+ - ATP$  content in myocardial tissues was determined and myocardial injury was evaluated by H&E staining. **Results:** As compared with the NC group, The LVSP  $\times$  HR and  $+ dp/dt_{max}$  on the OUA  $10^{-9}$  mol/L group had no significant difference (  $P > 0.05$  ), while the LVSP  $\times$  HR and  $+ dp/dt_{max}$  were increased on the OUA  $10^{-8}$  mol/L and  $10^{-7}$  mol/L groups (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ , respectively ); The activity of  $Na^+ - K^+ - ATP$ ase was significant higher in the OUA  $10^{-9}$  mol/L and  $10^{-8}$  mol/L groups (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ , respectively ). OUA showed dose-dependent inhibition on cardiac function for each group rats with OUA concentration changing from  $10^{-6}$  mol/L to  $10^{-4}$  mol/L (  $P < 0.01$  ). The arrhythmia score was also enhanced significantly (  $P < 0.01$  ), and the LDH level in coronary effluent was increased significantly. The activity of  $Na^+ - K^+ - ATP$ ase of myocardial tissues showed a dose-dependent reduction (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ , respectively ). **Conclusion:** Low concentration of OUA [ (  $10^{-9} \sim 10^{-7}$  mol/L ) ] can strengthen the cardiac function of the isolated heart, whereas excessive OUA [ (  $10^{-6} \sim 10^{-4}$  mol/L ) ] would inhibit the cardiac function in dose-dependent manner.

**【Key words】**ouabain; rats; isolated heart; dose-dependent

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目( KJ2013A251, KJ2016A729); 安徽省级大学生创新创业训练计划项目( AH201310368107); 皖南医学院大学生科研基金资助项目( WK2013S22); 国家级大学生创新创业训练计划项目( 201510368009)

收稿日期: 2015-09-04

作者简介: 王海珍( 1988- ), 女, 2013 级硕士研究生, ( 电话) 18375316283, ( 电子信箱) 410960208@qq.com;

王海华, 男, 副教授, 硕士生导师, ( 电子信箱) wanghaihua9972@sina.com, 通讯作者.

钠泵又称  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶(NKA), 是一种膜结合蛋白, 在维持细胞内外电化学梯度、细胞渗透压平衡和静息电位中起关键作用。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶<sup>[1]</sup>是由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基组成的异源二聚体。钠泵  $\alpha$  亚单位存在哇巴因的结合位点, 而  $\beta$  亚单位参与细胞间黏附作用。除了离子泵功能外, 钠泵还具有细胞受体的功能。配体通过与它结合, 激活细胞内多种信号转导通路, 从而调节细胞的增殖、肥大、分化和存活以及肿瘤细胞凋亡等多种生理病理过程<sup>[2-3]</sup>。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶是目前所知哇巴因的唯一细胞膜表面受体, 哇巴因可促进其内吞, 加速酶降解, 减少细胞内  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶的总量。关于哇巴因对心脏的影响多是经过心肌细胞分离或是细胞培养来探讨, 而在器官水平对大鼠心脏作用的研究较为少见。本实验拟通过离体心脏灌流标本, 观察不同浓度的哇巴因对大鼠离体心功能的量-效关系, 初步探讨其可能机制, 为下一步实验提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠(240 ± 20) g 购自合肥蜀山实验动物中心, 合格证号: SCXK(苏) 2009-0001。

1.2 主要药品试剂与仪器 哇巴因为白色粉末, 购自美国 Sigma 公司, 将其溶解于无水乙醇中配成  $10^{-3}$  mol/L 的母液,  $-20$  °C 避光保存以备用<sup>[4]</sup>; Medlab-U/8c 生物信号采集系统和 Langendorff 离体心脏灌流装置(南京美易科技有限公司); RM6240BD 型信号采集系统(成都仪器厂); UV-3200PCS 可见紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); D3024R 高速微量冷冻离心机; 美国赛默飞 Multiskan GO 全自动酶标仪; 乳酸脱氢酶(LDH)和  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 Langendorff 离体心脏灌流模型的制备 大鼠称重, 麻醉(25% 乌拉坦 4 mL/kg ip), 开胸取心脏, 迅速放入  $0 \sim 4$  °C 的 Krebs-Henseleit(K-H) 液中, 清洗残留血液, 经主动脉逆行插管, 悬挂于 Langendorff 灌注装置, 充以 95%  $\text{O}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$  饱和气体的 K-H 液恒温(37 °C)、恒压(8.33 kPa)逆行灌注。

1.3.1 实验分组 SD 雄性大鼠随机分为 7 组( $n = 6$ )。NC 组(正常 K-H 液灌流 120 min); OUA ( $10^{-9} \sim 10^{-4}$ ) mol/L 组[正常 K-H 液灌流 30 min 后给予含 ( $10^{-9} \sim 10^{-4}$ ) mol/L OUA 的 K-H 液灌流 30 min, 再给予正常 K-H 液灌流 60 min]。

1.3.2 血流动力学指标测定 将左心室中充满生理盐水的乳胶小囊连接于多道生理记录仪上(Med-

lab-U/8c 生物信号采集系统, 南京美易科技有限公司)连续观察 LVSP,  $+dp/dt_{\max}$ , 并记录 HR。

1.3.3 心律失常评分 待心脏复跳后, 用自制的接触电极沿心脏长轴方向垂直加压于心尖部, 参考电极置于主动脉根部, 引导出心肌细胞的动作电位, 连接于 RM6240 系统, 引导出心肌细胞的单相动作电位。在哇巴因灌流 15 min 期间, 取各种心律失常之和做出评分, 评分参考 Cuertis 和 Walker 等人的评分规则<sup>[5]</sup>。

1.3.4 生化指标检测 分别收集各组灌流后稳定点(0 min)、15 min、30 min、60 min、90 min 的冠脉流出液, 于  $-20$  °C 冻存; 各组心脏灌注结束点立即取出心脏, 于预冷的生理盐水中冲去血渍, 去除心房和心室。留取心尖部心肌组织, 称取质量约 0.2 g 心肌放入 5 mL 的小烧杯中, 与预冷的匀浆介质(Tris 1.21 g/L, EDTA 37.23 mg/L, 蔗糖 34.2 g/L, 再以 200 mmol/L 的 HCl 滴定至 pH 为 7.4) 1:9 配比。剪碎后倒入玻璃匀浆器中研磨成 10% 的混悬液, 于普通离心机中 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液放置  $-20$  °C 保存<sup>[6]</sup>, 以测定  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶的活性; 组织匀浆总蛋白含量测定采用 BCA 法, 按说明配置好各种试剂, 酶促反应后取上清液 200  $\mu\text{L}$  定磷, 最后在 660 nm 处, 1 cm 光径, 蒸馏水调零比色。冠脉流出液中 LDH 的活力采用微量酶标仪法, 按试剂盒要求依次加入各种试剂后, 在波长 450 nm 处, 酶标仪测定吸光度。

1.3.5 组织形态学检测 灌流结束后留取心肌, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 切片厚 5  $\mu\text{m}$ , 进行 HE 染色, 光学显微镜下进行组织形态学观察。

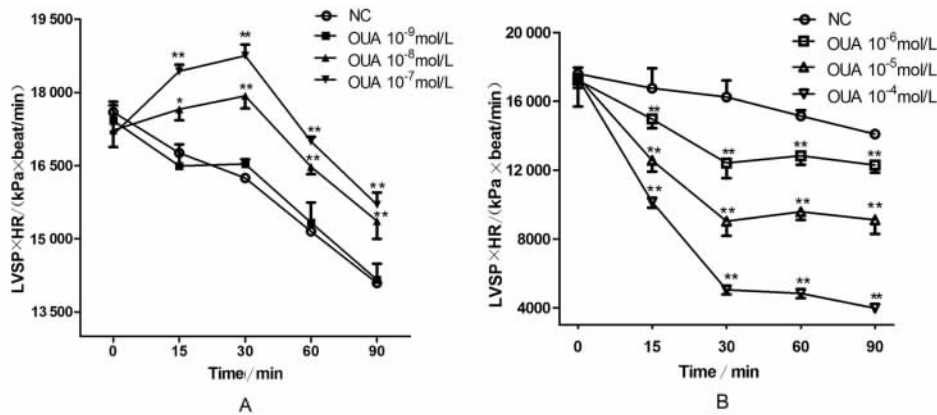
1.4 统计学处理 数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件。数据用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组之间均数比较用单因素方差分析, 两两比较用 S-N-K 法, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。采用 Graph Pad prism 5 软件作图。

## 2 结果

2.1 大鼠心功能指标 与 NC 组相比, 低浓度的哇巴因强心作用主要表现为, OUA  $10^{-9}$  mol/L 组 LVSP × HR 无明显差异, OUA  $10^{-8}$  mol/L、 $10^{-7}$  mol/L 组在哇巴因灌流期间及灌流结束后 LVSP × HR 明显升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且呈现出时间与浓度依赖性(图 1A); 在给予哇巴因灌流前, 各组大鼠的  $+dp/dt_{\max}$  无明显差异( $P > 0.05$ ), 哇巴因灌流期间及灌流结束后,  $+dp/dt_{\max}$  明显升高( $P < 0.05$  或

$P < 0.01$  ,表 1) ;高浓度则表现为抑制作用 ,同 NC 组相比 ,OUA( $10^{-6} \sim 10^{-4}$ ) mol/L 组在灌流期间及灌流结束后 LVSP  $\times$  HR 明显下降( $P < 0.01$ ) ,且呈现出时间与浓度依赖性(图 1B) ;在给予哇巴因灌流

前 ,各组大鼠的 + dp/dt<sub>max</sub> 无明显差异( $P > 0.05$ ) ,哇巴因灌注之后 ,随着时间的延长 ,表现为 + dp/dt<sub>max</sub> 明显降低 ,与 NC 组相比 ,具有显著差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (表 1) 。



A. NC 组 ,OUA  $10^{-9}$  mol/L 组 ,OUA  $10^{-8}$  mol/L 组 ,OUA  $10^{-7}$  mol/L 组; B. NC 组 ,OUA  $10^{-6}$  mol/L 组 ,OUA  $10^{-5}$  mol/L 组 ,OUA  $10^{-4}$  mol/L 组; \*  $P < 0.05$  ,\* \*  $P < 0.01$  vs. NC group.

图 1 OUA 对各组大鼠离体心脏 LVSP  $\times$  HR 的影响( $\bar{x} \pm s$   $n = 6$ )

表 1 不同浓度 OUA 灌流前后各组大鼠 + dp/dt<sub>max</sub> 的组间变化( $\bar{x} \pm s$   $n = 6$ )

组别	+ dp/dt <sub>max</sub> / ( mmHg/s)				
	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min
NC 组	1912.93 $\pm$ 34.91	1898.46 $\pm$ 50.23	1879.01 $\pm$ 65.05	1741.63 $\pm$ 48.25	1662.85 $\pm$ 34.86
OUA $10^{-9}$ mol/L 组	1893.65 $\pm$ 19.22	1975.32 $\pm$ 76.79*	1963.38 $\pm$ 98.60*	1777.85 $\pm$ 39.30	1701.75 $\pm$ 29.95
OUA $10^{-8}$ mol/L 组	1896.38 $\pm$ 29.39	1979.07 $\pm$ 57.85*	2062.75 $\pm$ 68.52**	1829.95 $\pm$ 43.03**	1747.83 $\pm$ 38.40**
OUA $10^{-7}$ mol/L 组	1873.77 $\pm$ 45.29	2013.53 $\pm$ 55.70**	2105.57 $\pm$ 55.32**	1869.85 $\pm$ 44.57**	1802.67 $\pm$ 20.45**
OUA $10^{-6}$ mol/L 组	1932.81 $\pm$ 39.60	1640.13 $\pm$ 72.67**	1282.81 $\pm$ 45.50**	1357.13 $\pm$ 36.08**	1295.83 $\pm$ 41.67**
OUA $10^{-5}$ mol/L 组	1895.65 $\pm$ 22.70	1285.50 $\pm$ 19.89**	1072.34 $\pm$ 44.46**	1157.65 $\pm$ 39.67**	1094.75 $\pm$ 45.37**
OUA $10^{-4}$ mol/L 组	1911.15 $\pm$ 30.87	1103.86 $\pm$ 43.60**	801.96 $\pm$ 62.68**	721.66 $\pm$ 32.06**	654.05 $\pm$ 39.65**
F	1.94	256.38	399.87	677.73	821.72
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

\*  $P < 0.05$  ,\* \*  $P < 0.01$  vs NC group.

2.2 哇巴因灌流期间心律失常评分 在哇巴因灌注 15 min 期间 ,NC 组心律失常评分为  $1.10 \pm 0.08$  , OUA( $10^{-9} \sim 10^{-7}$ ) mol/L 组的心律失常评分分别为  $1.05 \pm 0.13$ 、 $1.00 \pm 0.14$ 、 $1.03 \pm 0.13$  ,同正常组相比 ,无明显差异( $P > 0.05$ ) ; OUA( $10^{-6} \sim 10^{-4}$ ) mol/L 组的心律失常评分分别为  $2.95 \pm 0.13$ 、 $3.68 \pm 0.15$ 、 $4.33 \pm 0.13$  ,与正常组相比 ,差异显著( $P < 0.01$ ) 。

2.3 OUA 对冠脉流出液中 LDH 活性的影响 如表 2 所示 ,在稳定点时各组大鼠灌流液中 LDH 的活性无明显差异( $P > 0.05$ ) ,经过哇巴因灌流 30 min 后 ,OUA( $10^{-9} \sim 10^{-7}$ ) mol/L 组 LDH 活性无明显改变( $P > 0.05$ ) ,而 OUA( $10^{-6} \sim 10^{-4}$ ) mol/L 组 LDH

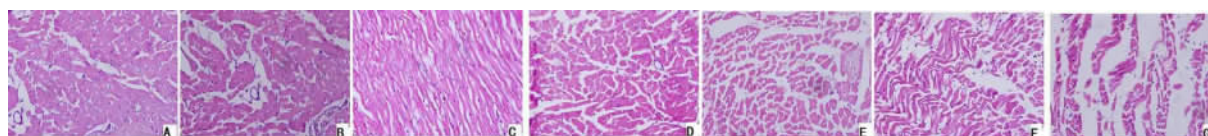
活性均明显升高 ,与 NC 组相比 ,具有显著差异( $P < 0.01$ ) 。经过 60 min 的正常 K-H 液灌流后 ,与正常组相比 ,OUA( $10^{-6} \sim 10^{-4}$ ) mol/L 组 LDH 活性仍明显升高( $P < 0.01$ ) 。

2.4 形态学变化 HE 染色显示 NC 组与 OUA( $10^{-9} \sim 10^{-7}$ ) mol/L 组均表现为肌纤维排列整齐、结构完整 ,心肌细胞形态正常 ,排列有序 ,未见明显肿胀和坏死 ,肌原纤维结构完整(图 2A ~ D) ;同 NC 组相比 OUA( $10^{-6} \sim 10^{-4}$ ) mol/L 组出现肌纤维断裂 ,心肌细胞间隙增宽 ,心肌细胞肥大、肿胀甚至坏死 ,且随着浓度的增高 ,病理改变更为显著(图 2E ~ G) 。

表2 OUA 对大鼠离体心脏冠脉流出液中 LDH 活性的变化( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	LDH/( U/L)				
	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min
NC 组	18.54 ± 0.76	19.63 ± 0.45	20.36 ± 1.06	21.33 ± 0.97	22.28 ± 0.69
OUA10 <sup>-9</sup> mol/L 组	17.94 ± 0.92	19.40 ± 0.63	20.27 ± 0.74	21.25 ± 1.16	22.79 ± 0.53
OUA10 <sup>-8</sup> mol/L 组	17.88 ± 0.78	19.02 ± 0.38	19.97 ± 0.79	20.65 ± 1.17	22.58 ± 0.50
OUA10 <sup>-7</sup> mol/L 组	18.35 ± 0.87	19.04 ± 0.39	21.01 ± 0.54	20.58 ± 0.96	23.01 ± 0.74
OUA 10 <sup>-6</sup> mol/L 组	18.23 ± 0.97	24.60 ± 0.65**	38.30 ± 1.05**	33.07 ± 0.99**	31.88 ± 0.93**
OUA 10 <sup>-5</sup> mol/L 组	19.31 ± 0.89	31.58 ± 0.75**	50.11 ± 1.32**	45.06 ± 1.71**	43.71 ± 1.86**
OUA 10 <sup>-4</sup> mol/L 组	17.84 ± 0.66	39.26 ± 0.58**	67.49 ± 1.10**	71.64 ± 1.55**	80.27 ± 1.25**
F	2.25	1190.74	2261.81	1430.83	2587.24
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

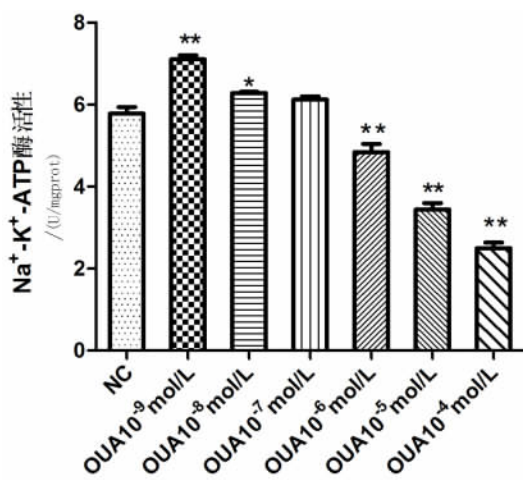
\* P < 0.05 , \*\* P < 0.01 vs NC group.



A. NC 组 B. OU A10<sup>-9</sup> mol/L 组 C. OUA 10<sup>-8</sup> mol/L 组 D. OUA 10<sup>-7</sup> mol/L 组 E. OUA 10<sup>-6</sup> mol/L 组 F. OUA 10<sup>-5</sup> mol/L 组 G. OUA 10<sup>-4</sup> mol/L 组。

图2 各组大鼠心肌 HE 染色结果( ×400)

2.5 哇巴因对大鼠心肌组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响 与 NC 组相比,OUA 10<sup>-9</sup> mol/L 和 OUA10<sup>-8</sup> mol/L 组的 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性明显升高 ( P < 0.05 或 P < 0.01 ), OUA 10<sup>-7</sup> mol/L 组心肌细胞膜内 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性无明显差异 ( P > 0.05 ) , 而 OUA 10<sup>-6</sup> mol/L 组、OUA 10<sup>-5</sup> mol/L 组及 OUA 10<sup>-4</sup> mol/L 组的 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性明显下降, 差异具有统计学意义 ( F = 154.71 , P < 0.01 ) 。见图 3。



\* P < 0.05 , \* \* P < 0.01 vs. NC group.

图3 各组心肌细胞膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力比较

### 3 讨论

哇巴因是强心苷类药物,作用于心肌细胞膜上的钠泵,导致细胞内 Na<sup>+</sup> 浓度升高,继而 Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交换增强,胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加,心肌收缩力增加<sup>[7]</sup>。

哇巴因还常用来复制心律失常动物模型,传统认为其可能是通过抑制 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶,使胞内的 Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加,引起心肌细胞钙超载,触发心肌电兴奋的后除极,从而诱发快速型心律失常<sup>[8]</sup>。龚冬梅等人亦发现给予 5 μmol/L 哇巴因 10 min 后可明显缩短大鼠心室肌细胞动作电位时程,增加心肌细胞自律性,使除极和复极步调不能协调一致,易于产生异常冲动<sup>[9]</sup>。

我们的实验结果显示:较低浓度的 OUA 对离体心脏表现为强心作用,在 OUA ( 10<sup>-9</sup> ~ 10<sup>-7</sup> ) mol/L 组呈现出时间和浓度依赖性的强心作用,但 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的活力升高或没有影响,提示低浓度的 OUA 的强心作用可能不是通过抑制钠泵途径升高 Ca<sup>2+</sup> 浓度,使心肌收缩力增强,而可能是通过配体-受体信号转导通路实现的;Xie 等<sup>[10-11]</sup> 发现 OUA 可通过 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的信号转导通路调节基因转录和细胞生长,同时也使心肌细胞钙水平升高,进一步印证了我们的实验现象,与 NC 组相比,OUA ( 10<sup>-9</sup> ~ 10<sup>-7</sup> ) mol/L 组均未诱发心律失常,心肌冠脉流出液中 LDH 活性与心肌形态学均无明显改变,这说明低浓度 OUA 除了增强离体心肌收缩力,还具有稳定心脏正常节律的作用;并且低浓度 OUA 与钠泵结合后能调节心肌细胞的分化、增殖,而不会诱导凋亡。亦有文献报道<sup>[12-13]</sup> OUA 可抑制肿瘤细胞的增殖,有抗肿瘤的作用,但 OUA 低浓度范围内对正常细胞无毒副作用。Tian J 等<sup>[14]</sup> 人用低浓度哇巴因作用于猪肾近曲小管上皮细胞,发现 OUA 激活了猪肾近曲

小管上皮细胞内的磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白通路,从而促进猪肾上皮细胞的增殖。

当钠泵与哇巴因结合后,通过与周围膜蛋白相互作用引发一系列复杂的信号级联反应,其中包括 Src( sarcoma gene) 的活化、上皮生长因子受体( epithelial growth factor receptor, EGFR) 的活化、Ras 与 p42/44 丝裂原活化蛋白激酶( mitogen activated protein kinase, MAPKs) 的活化、阻滞细胞周期以及活化 ERK1/2( extracellular regulated protein kinases) ,导致细胞周期抑制因子 p21Cip1 表达升高和肿瘤抑制蛋白 p53 表达降低介导细胞凋亡<sup>[15-16]</sup>。本研究发现, OUA(  $10^{-6} \sim 10^{-4}$ ) mol/L 组在最初给药时 + dp/dt<sub>max</sub> 明显升高( 灌流 1 min 以内),短时间升高后继而出现一系列的毒害作用,收缩力下降,同时心律失常出现频率增加,心率下降,最终表现为心脏做功明显下降。同时灌流液中 LDH 的含量也明显增多,心肌形态学改变明显,心肌细胞间隙增宽,细胞水肿,碎裂等症状明显,并且呈现出浓度依赖性及时间依赖性,心肌中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性明显下降,熊晨通过急性分离心室细胞发现,  $10^{-6}$  mol/L 的哇巴因可使心肌细胞出现不规则收缩,线粒体肿胀等毒害作用<sup>[17]</sup>。本实验结果表明,高浓度的哇巴因不仅能够抑制 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性,还能诱发心律失常,诱导心肌细胞的损伤、凋亡,从而对心脏呈现出剂量依赖性的抑制作用。

综合不同浓度哇巴因对离体心脏的作用,我们可以看出,哇巴因对心功能的影响是一个复杂的过程,涉及到钠泵的抑制与否,以及多条信号通路的激活,心律失常的发生等,关于具体通路与机制的研究有待于后续实验的进一步探讨。

【参考文献】

[1] MORTH JP, PEDERSEN BP, BUCH-PEDERSEN MJ, et al. A structural overview of the plasma membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase ion pumps[J]. Nat Rev Mol Cell Biol 2011, 12( 1): 60-70.  
 [2] SCHONER W, SCHEINER-BOBIS G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth[J]. Am J Physiol Cell Physiol 2007, 293: 509-536.

[3] XU ZW, WANG FM, GAO MJ, et al. Targeting the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha1 subunit of hepatoma HepG2 cell line to induce apoptosis and cell cycle arresting[J]. Biol Pharm Bull 2010, 33( 5): 743-751.  
 [4] 高默杰, 徐忠伟, 王凤梅, 等. 钠钾泵抑制剂通过调节细胞周期相关蛋白的生成介导肝癌 HepG2 细胞周期 S 期阻滞与凋亡[J]. 中国药理学通报 2010, 26( 4): 452-456.  
 [5] CURTIS M J, WALKER MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an vivo model of regional ischemia[J]. Cardiovasc Res, 1988, 22( 9): 656-665.  
 [6] 储岳峰, 柯永胜, 俞国华, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤对心肌细胞膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶亚基因表达的影响与意义[J]. 中国动脉硬化杂志 2007, 3: 173-177.  
 [7] 周丽娟, 陈奇, 毕明. 炙甘草汤对哇巴因所致心肌细胞触发活动及 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响[J]. 中国天然药物, 2006, 4( 6): 460-463.  
 [8] 刘艳, 戚汉平, 解晶, 等. 胆碱对乌头碱和哇巴因所诱发的心律失常的保护作用[J]. 中国药理学通报 2012, 28( 10): 1447-1451.  
 [9] 龚冬梅, 单宏丽, 董德利, 等. 哇巴因诱发大鼠心律失常作用靶点的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报 2002, 36( 2): 87-90.  
 [10] TIAN J, GONG X, XIE Z. Signal-transducing function of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase is essential for ouabain's effect on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat cardiac myocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001, 281( 5): 1899-1907.  
 [11] XIE Z. Ouabain interaction with cardiac Na/K-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer[J]. Cell Mol Biol 2001, 47( 2): 383-390.  
 [12] 高默杰, 徐忠伟, 徐瑞成, 等. 钠钾泵抑制剂通过调节细胞周期相关蛋白的生成介导肝癌 HepG2 细胞周期 S 期阻滞与凋亡[J]. 中国药理学通报 2010, 26( 4): 452-456.  
 [13] XU Z W, WANG F M, XU R C, et al. Effect of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha1 siRNA and ouabain upon cell cycle in human hepatoma HepG2 cell and its mechanism[J]. Nat Med J China, 2010, 90( 12): 813-817.  
 [14] TIAN J, LI X, LIANG M, et al. Changes in sodium pump expression dictate the effects of ouabain on cell growth[J]. J Biol Chem, 2009, 284( 22): 14921-14929.  
 [15] SCHEINER-BOBIS G. The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: more than just a sodium pump[J]. Cardiovasc Res 2011, 89( 1): 6-8.  
 [16] SCHONER W, SCHEINER-BOBIS G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. Am J Physiol Cell Physiol 2007, 293( 2): C509-C536.  
 [17] 熊晨. Na/K 泵 α<sub>1</sub> 亚基的 H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> 结构域介导哇巴因心肌毒性[D]. 石家庄: 河北医科大学 2012.