

· 基础研究 ·

气虚血瘀模型大鼠脾代谢酶活性变化的实验研究

李 苹¹ 李 洁² 邓时贵^{1,3} 赵瑞芝^{1,3}

摘要 目的 观察气虚血瘀模型大鼠脾脏中主要的 I、II 相药物代谢酶活性的变化。**方法** 取 24 只健康 SD 大鼠,随机分为空白对照组和模型组,每组 12 只。采用连续两周冰水游泳至力竭同时节食的方法制作气虚血瘀大鼠模型,空白对照组自由饮食且不强制游泳。观察两组大鼠的一般状态和体重变化,检测其全血黏度和血浆比黏度,并观察脾脏的胞浆液和线粒体中主要的 6 种 I 相代谢酶(CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及 CYP3A4)和 2 种 II 相代谢酶[尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1(UGT1)、雌激酶硫酸转移酶(SULT1E1)]的活性改变。**结果** 模型组大鼠毛发枯槁、精神萎靡、有便溏现象;与空白对照比较,模型组大鼠体重降低($P < 0.01$),全血黏度升高($P < 0.01$),脾脏胞浆液中 CYP2C8、CYP2C19、CYP2D6 活性均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);线粒体中 CYP1A2、CYP2D6、CYP3A4 活性均降低,UGT1 活性升高($P < 0.01$)。**结论** 气虚血瘀模型大鼠脾脏中的药物代谢酶特别是 I 相代谢酶的活性发生改变,该改变可能与脾功能下降相关。

关键词 气虚血瘀证;大鼠;血液流变学;脾脏;代谢酶活性

Spleen Metabolic Enzyme Activities Study on Qi Deficiency and Blood Stasis Model Rats LI Ping¹, LI Jie², DENG Shi-gui^{1,3}, and ZHAO Rui-zhi^{1,3} 1 The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou(510006); 2 School of Pharmaceutical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou(510006); 3 Public Laboratory of the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou(510006)

ABSTRACT Objective To observe the changes of the main phase I and II drug metabolic enzyme activities in the spleen of rats with qi deficiency and blood stasis. **Methods** Twenty-four healthy SD rats were randomly divided into two groups: blank control group and model group, 12 in each group. The model was established by ice-water swimming and diet for two weeks, while the rats in blank control group ate freely and swimming. The general state and body weight of rats were observed, and the whole blood viscosity and plasma specific viscosity was used as the index. The activities of the six major phase I metabolites (CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4) and two phase II metabolites [uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1 (UGT1), estrogen sulfate transferase (SULT1E1)] in the spleen cytoplasm and mitochondria were determined by kits. **Results** Model group rats had dry and dull hair, lacking of energy and diarrhea. Compared with the blank control group, the model rats lost weight ($P < 0.01$). The whole blood viscosity in the model group rats increased significantly ($P < 0.01$); the activities of CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6 in the spleen cytoplasm, CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 in mitochondria decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) while the activity of UGT1 in mitochondria was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** A significant metabolism enzyme activity change especially phase I enzymes was found in the spleen of qi deficiency and blood stasis model rats, it might be related with an impaired spleen function.

KEYWORDS qi deficiency and blood stasis; rats; hemorheology; spleen; metabolic enzyme activity

作者单位: 1. 广州中医药大学第二临床医学院(广州 510006); 2. 广州中医药大学中药学院(广州 510006); 3. 广州中医药大学第二附属医院公共实验室(广州 510006)

通讯作者: 邓时贵, Tel: 020-39318571, E-mail: dengshigui@aliyun.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190529.049

中医学认为,“脾为后天之本”、“脾主运化”、“脾主升清”,脾功能决定了人体后天基础。而诸多疾病如糖尿病、胃炎、胃溃疡、肠炎等多种疾病与脾虚相关。人们常常基于“脾主运化”功能从消化系统如肠道菌群、物质能量代谢方面阐释其可能的基础和机制,将中医脾与解剖学上“脾脏”割裂开来。然而,黄帝内经记载《素问·太阴阳明论篇第二十九》指出:“脾与胃以膜相连耳,而能为之行其津液”;《难经·四十二难》中:“脾重二斤三两,扁广三寸,长五寸,有散膏半斤”^[1],与现代医学解剖位置、色泽、重量均一致。

脾虚模型常常采用大黄灌胃而成,大黄的主要活性成分为大黄酸,文献结果显示大黄酸的主要代谢产物为大黄酸硫酸酯和大黄酸葡萄糖醛酸苷,其代谢产物主要集中于脾脏,占体内总代谢产物的 60% 以上^[2]。代谢酶是体内负责物质转化的主要物质之一,有多种结构与功能不同的酶,负责内源性及外源性物质的代谢。代谢酶在全身各组织器官中广泛存在^[3-6],且不同组织器官中代谢酶的功能不尽相同。因此猜测脾脏的运化功能可能与脾脏代谢酶功能相关。赵亚等^[7]研究显示脾肾阳虚状态下大鼠脾脏药物代谢酶的活性会发生显著变化,提示疾病状态可能通过影响脾脏功能进一步影响机体“运化”功能而影响预后。因此,本实验探讨了气虚血瘀症大鼠脾中药物代谢酶变化情况,期望从代谢角度探讨“脾主运化”内涵。

材料与方法

1 动物 健康成年 SD 大鼠,鼠龄 6~8 周,24 只,SPF 级,雌雄各半,体重为(200±20) g,由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号:44002100006129。在广东省中医院实验动物中心饲养,室温 22~25℃,相对湿度 40%~70%,饲料为全价营养饲料。本实验经广东省中医院实验动物中心伦理委员会审核通过(No. 2014001)。

2 主要试剂及仪器 主要试剂:二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量分析试剂盒(赛默飞世尔科技公司,批号:ML166920);尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1(UGT1)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号:015010135);雌激素硫酸转移酶(SULT1E1)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号:N17010136);细胞色素 P4502C9(CYP2C9)、细胞色素 P4502C8(CYP2C8)、细胞色素 P4501A2(CYP1A2)、细胞色素 P4503A4(CYP3A4)、细胞色素 P4502D6(CYP2D6)、细胞色素 P4502C19(CYP2C19)试剂盒均由上海酶联生物科技有限公司提供,批

号:201507。

主要仪器:LBY-N6K 型血流变仪(北京普利生广州中利医疗仪器科技有限公司);IKA T10 型匀浆机(美国 IKA 公司);赛多利斯 BS224S 万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司,批号:00000246);VG3 型涡旋机(美国 IKA 公司);Centrifuge 5430 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);5430R 型高速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);USC-702 型超声波清洁仪(上海波龙电子设备有限公司);VICTOR X5 型酶标仪(上海珀金埃尔默有限公司);EPOCH 超微量微孔板分光光度计(广州云星科学仪器有限公司);移液枪(20、200、1000 μL,德国 Eppendorf 公司)。

3 动物分组与造模 取 24 只大鼠适应性饲养 1 周,观察各项指标均无异常后纳入实验。按随机区组法分为模型组和空白对照组,每组 12 只,雌雄各半,做好标记。参照文献[8]方法并修改其每日增加喂食量和降低游泳的水温,制备气虚血瘀症模型:(1)饥饿法:模型组大鼠按每日 50 g/kg 体重提供饲料,空白组大鼠按每日 100 g/kg 体重提供饲料,均提供充足饮水;(2)寒冷环境合并疲劳法:模型组大鼠每日相同时间强迫其在冰水(0~2℃)中游泳至力竭,力竭以大鼠不再划动、自然下沉为准,当大鼠出现力竭时,将其从冰水中捞出使其稍作恢复,再继续强迫其游泳直至游泳时间达 30 min,将大鼠从水中捞出并擦干水,放回笼中;空白对照组不进行冰水游泳处理。游泳时间长短存在个体差异,单次游泳时间平均为(10±4) min,连续 14 天。期间观察大鼠的一般状态,第 14 天晚上禁食不禁水,次日早晨用乙醚麻醉,称重,取血和脾脏。其中一部分血液用于全血黏度检测,另一部分离心后取血浆,用于血浆比黏度检测;脾脏置于-80℃冰箱保存备用。

4 检测指标及方法

4.1 一般行为学观察和造模后体重测定 每天观察大鼠的毛发光泽度、大小便情况、活动和精神状况等;造模前后测量动物的体重。

4.2 全血黏度和血浆比黏度的测定 造模后取部分全血,4 000 r/min 低温离心 15 min,取上清液做血浆比黏度测定;同时测定动物的全血黏度(高切、中切、低切)。

4.3 代谢酶活性测定 取 0.2 g 脾组织在冰冷的 PBS 缓冲液中漂洗,除去血液,滤纸吸除表面水分,称量;用移液枪加入预冷的 PBS 缓冲液,体积为组织质量的 10 倍,机器匀浆,2 000 r/min 低温离心

15 min,上清液即为匀浆液,将各上清液分别分装为 10 份,每份 140 μ L,于 -80 $^{\circ}$ C 下保存备用;取制备好的匀浆液以 9 000 r/min 低温离心 15 min,所得上清液为胞浆液,沉淀为线粒体;在线粒体中加入 PBS 缓冲液 140 μ L,用超声波清洁仪超声震荡 20 min,使线粒体破碎,并用涡旋仪涡旋,制得线粒体混悬液;然后严格按照各试剂盒说明书采用酶标仪分别测定模型组和空白对照组大鼠脾脏各部位(胞浆液、线粒体)中各代谢酶的活性,BCA 试剂盒测定组织总蛋白含量。

5 统计学方法 用 Curve Expert 1.3 曲线制作软件制作标准曲线,吸光值代入标准曲线得到代谢酶的浓度,再乘以稀释倍数,得出各代谢酶活性。采用 SPSS 2.0 统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组数据比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组大鼠一般状态比较 造模过程中无大鼠死亡。空白对照组大鼠皮肤红润,毛发有光泽,活动和精神状态正常;模型组大鼠毛发枯槁无光泽、易脱落,舌色紫暗,背部皮肤及脚掌皮肤发白发紫,精神萎靡,有便溏现象。且在造模期间发现,造模一周左右模型组大鼠精神状态开始变差,单次游泳时间缩短 3 ~ 4 min。

2 两组大鼠体重比较(表 1) 造模前两组大鼠体重比较,差异无统计学意义($P>0.05$);造模后与空白对照组比较,模型组大鼠体重降低($P<0.01$)。

表 1 两组大鼠体重比较(g, $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	造模前	造模后
空白对照	12	249.83 $\pm$ 22.41	288.58 $\pm$ 51.69
模型	12	241.92 $\pm$ 20.32	231.00 $\pm$ 15.12 *

注:与空白对照组比较, * $P<0.01$

3 两组血液流变学指标比较(表 2) 与空白对照组比较,模型组全血黏度(高切、中切、低切)升高($P<0.01$),血浆比黏度无明显变化($P>0.05$)。

表 2 两组血液流变学指标(mPa $\cdot$ s, $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	全血黏度			血浆比黏度
		高切(150/s)	中切(60/s)	低切(10/s)	
空白对照	12	5.45 $\pm$ 0.39	6.67 $\pm$ 0.57	10.93 $\pm$ 1.34	1.21 $\pm$ 0.07
模型	12	6.05 $\pm$ 0.49 *	7.65 $\pm$ 0.65 *	13.42 $\pm$ 1.32 *	1.22 $\pm$ 0.04

注:与空白对照组比较, * $P<0.01$

4 两组大鼠脾脏代谢酶活性变化

4.1 胞浆液中代谢酶活性变化(表 3) 与空白对照组比较,模型组脾脏胞浆液中代谢酶 CYP2C8、CYP2C19、CYP2D6 的活性均降低($P<0.05$, $P<0.01$), CYP1A2、CYP2C9、CYP3A4、UGT1、SULT1E1 的活性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

4.2 线粒体中代谢酶活性变化(表 4) 与空白对照组比较,气虚血瘀组的脾脏线粒体中代谢酶 CYP1A2、CYP2D6、CYP3A4 的活性均降低,代谢酶 UGT1 活性升高($P<0.01$);CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、SULT1E1 的活性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

讨 论

中医学理论认为“饥则损气”、“劳则气耗”、“气虚日久则致血瘀”;同时,《灵枢·痼疽》中还提到:“寒邪客于经络之中,则血泣,血泣则不通”。因此本研究采用饥饿、疲劳和寒冷相结合的方法造模^[8]。前期实验发现,当每天喂食量较少时,大鼠之间会出现撕咬,为避免该情况发生,本实验将参考文献中模型组的喂食量从 40 g/kg 增大到 50 g/kg;另外,中医学理论证明“寒凝”越甚、血瘀越严重,因此本试验在疲劳实验中将水温从文献中的(15 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 降至 0 ~ 2 $^{\circ}$ C,以便缩短造模时间和提高成模效果。

表 3 两组脾脏胞浆液代谢酶活性变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	I 相代谢酶(IU/L)						II 相代谢酶(ng/mL)	
		CYP1A2	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4	UGT1	SULT1E1
空白对照	12	65.93 $\pm$ 6.76	1.02 $\pm$ 0.11	2.78 $\pm$ 0.35	489.65 $\pm$ 105.50	257.37 $\pm$ 44.99	18828.17 $\pm$ 1671.29	1.91 $\pm$ 0.55	3.55 $\pm$ 1.33
模型	12	72.52 $\pm$ 15.00	0.85 $\pm$ 0.15 **	2.66 $\pm$ 0.32	394.70 $\pm$ 80.85 *	217.00 $\pm$ 32.89 *	17770.32 $\pm$ 2600.53	1.80 $\pm$ 0.67	4.73 $\pm$ 3.04

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表 4 两组脾脏线粒体代谢酶活性变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	I 相代谢酶(IU/L)						II 相代谢酶(ng/mL)	
		CYP1A2	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4	UGT1	SULT1E1
空白对照	12	59.02 $\pm$ 5.12	0.76 $\pm$ 0.09	2.40 $\pm$ 0.17	850.41 $\pm$ 68.38	290.23 $\pm$ 69.98	16614.70 $\pm$ 1322.56	0.34 $\pm$ 0.06	1.38 $\pm$ 0.39
模型	12	50.86 $\pm$ 6.66 *	0.72 $\pm$ 0.08	2.33 $\pm$ 0.21	808.96 $\pm$ 66.14	192.00 $\pm$ 44.70 *	13945.88 $\pm$ 1924.92 *	0.48 $\pm$ 0.07 *	1.41 $\pm$ 0.54

注:与空白对照组比较, * $P<0.01$

临床研究显示,血瘀患者全血黏度升高^[9],所以本实验将全血黏度作为评价模型成功的指标;而上述结果显示模型组大鼠的全血黏度显著高于空白对照组大鼠,提示血瘀模型造模成功,血瘀可能与红细胞异常有关,与文献报道^[10]一致,符合临床病机^[11]。

气虚血瘀状态下脾脏胞浆液中 3 种 I 相代谢酶(CYP2C8、CYP2C19、CYP2D6)的活性、线粒体中 3 种 I 相代谢酶(CYP1A2、CYP2D6、CYP3A4)的活性均显著降低,Ⅱ相代谢酶 UGT1 的活性显著性升高提示气虚血瘀状态影响了脾脏的内环境。本实验中观察到,尽管动物并未使用泻药,但便溏现象普遍存在,与中医学“脾虚”临床表现一致,说明“脾主运化”功能受损,提示脾虚与体内代谢酶活性变化关系密切。

药物代谢酶包括了微粒体代谢酶(主要位于内质网上)和线粒体中的某些代谢酶,它们除负责药物代谢外,对内源性物质(如 I 相代谢酶对类固醇激素、甲状腺激素、脂肪酸、前列腺素、维生素 D、甾体激素等;Ⅱ相代谢酶对胆红素等)的体内转化也有重要意义;其中,微粒体代谢酶参与大部分物质的氧化还原等反应,而线粒体中的代谢酶主要参与内源性物质的代谢与合成等^[2]。机体内源性物质的正常代谢是保证机体正常生命活动不可或缺的条件,例如类固醇激素可调节糖代谢和水盐代谢、甲状腺激素具有浓集碘和促进脂肪酸氧化的作用、维生素 D 可维持血清钙磷浓度的稳定和促进怀孕及哺乳期输送钙到子体、而胆红素的代谢异常会导致机体出现黄疸症状等。一旦内源性物质代谢失调,将导致各种疾病的发生,因此猜测代谢酶活性与机体功能变化具有较强的相关性。

然而,由于有关代谢酶研究数据均来自于代谢酶与药物体内过程的相互作用,鲜见文献报道疾病下机体代谢酶特别是肝外代谢酶的变化,上述代谢酶具体影响了哪些内源性物质的代谢进而引起胃肠功能失调,脾脏代谢酶又是如何影响肠道水吸收功能、肠蠕动功能,肝外药物代谢酶作为机体的关键组成部分本身肩负的生理、病理意义还有待进一步深入探讨。

中医学理论认为“脾主运化”,既往已有学者对“脾-内质网”、“脾-线粒体”之间的联系进行过报道,但主要是从内质网或线粒体形态结构和生理功能的角度探讨“脾主运化”的中医机制^[12-14]。本文首次从代谢酶角度入手,从脾脏代谢酶变化角度探讨了“脾主运化”功能失调的可能原因,补充了前人对中医学理论下的“脾”与西医脾脏功能相关性的认识,为中

医学理论的现代阐释积累了数据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 刘渊,吴潜智主编. 难经[M]. 成都:四川科学技术出版社,2008:160.
- [2] Zhao RZ, Yuan D, Liu SJ, et al. Liver targeting effect of vingar-baked Radix Bupleuri on rhein in rats[J]. *Ethnopharmacol*, 2010, 132(2): 421-428.
- [3] 杨然,马晓慧,郭嘉华,等. 药物代谢酶的特性[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(7): 751-759.
- [4] Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(1): 103-141.
- [5] 杨波,王静,丛宇婷,等. 基于蛋白质组学的药物代谢酶与转运体定量分析研究进展[J]. *药学学报*, 2015, 50(6): 668-674.
- [6] Sakakibara Y, Katoh M, Imai K, et al. Expression of UGT1A subfamily in rat brain[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2016, 37(5): 314-319.
- [7] 赵亚,滕培颖,朱惠华,等. 脾肾阳虚大鼠脾中 I 相和Ⅱ相药物代谢酶活性变化的研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2017, 34(2): 218-221.
- [8] 许颖智,王晓玲,庞树朝,等. 气滞血瘀与气虚血瘀心肌梗死大鼠模型的生物学标记物表达差异[J]. *中医杂志*, 2018, 59(18): 1606-1610.
- [9] 邢煜奎,周海纯. 头穴丛刺联合补阳还五汤加减对缺血性中风(气虚血瘀型)患者血液流变学的影响[J]. *针灸临床杂志*, 2017, 33(10): 13-15.
- [10] 牛雯颖,张禹,卞敬琦,等. 寒凝血瘀模型大鼠红细胞膜生物学研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(12): 204-207.
- [11] 李莹,王磊沙,刘建勋,等. 脑梗死气虚血瘀证大鼠模型表征及病理生理变化研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(4): 786-793.
- [12] 吕林,王风云,唐旭东,等. 基于内质网功能探讨“脾主运化”“脾主统血”的科学内涵[J]. *中医杂志*, 2015, 56(14): 1174-1177.
- [13] 朱慧渊,王江,苗琦. 基于“脾主运化”理论仙鹤草调控线粒体能量代谢抗脑缺血损伤的探讨[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(12): 2929-2931.
- [14] 杨晔,刘悦,张帆,等. 基于线粒体研究论脾虚与脏腑疾病的相关性[J]. *中医杂志*, 2018, 59(20): 1742-1746.

(收稿:2018-07-04 在线:2019-07-31)

责任编辑:白霞