

原位肠肝灌流模型灌流液的优化研究

王怡薇, 梁日欣, 杨庆, 陈颖, 杨伟鹏, 王彦礼, 翁小刚, 李玉洁, 刘晓霓, 王岚, 朱晓新*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 对大鼠原位肠肝灌流模型的灌流液组成成分进行优化, 以获取最佳灌流液配方。方法: 根据灌流液配方不同, 共分 8 组。观察各组灌流液的 pH、乳酸脱氢酶(LDH)、丙氨酸氨基转移酶(ALT) 活性, 以及肝、肠干湿重比, 从而比较不同灌流液对肝功能、肝细胞损伤以及组织水肿程度的影响。结果: 第 8 组灌流液(不加红细胞、地塞米松、去甲肾上腺素组)的 pH、LDH、ALT 与第 1 组灌流液(加红细胞、地塞米松、去甲肾上腺素组)相比无显著性差异; 第 8 组灌流液肠干湿重比与正常对照组相比无显著性差异; 结论: 红细胞、地塞米松、去甲肾上腺素对于维持肠肝灌流模型功能无显著影响。

[关键词] 原位肠肝灌流; 乳酸脱氢酶; 丙氨酸氨基转移酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0133-04

自从 1985 年 Pang 等^[1] 建立大鼠原位肠肝灌流模型并应用于研究依那普利的吸收、代谢及首过效应以来, 该模型在药代动力学的研究中得到了广泛应用。后经不断完善^[2-6], 该模型日渐成熟。

目前该模型灌流液中主要含有 K-H 缓冲液, 1% 牛血清白蛋白溶液(牛血清白蛋白配成 25% 台氏溶液备用), 3% 右旋糖酐, 10% 大鼠红细胞, 临用前加地塞米松、去甲肾上腺素(分别为 4%, 2%)^[7]。灌流液中加入红细胞、地塞米松、去甲肾上腺素的目的是为了模拟生理环境, 发挥缓冲作用, 维持肝细胞的正常形态、功能并减轻肝、肠组织水肿^[7], 使模型能够较长时间保持活性, 从而观察肝脏的首过效应、对药物代谢的影响等。但是我们在试验中发现, 10% 红细胞、地塞米松、去甲肾上腺素的准备过程非常耗费人力、物力、财力。首先需要抽取多只动物的新鲜全血, 离心制备灌流液中 10% 红细胞, 而红细胞容易发生溶血, 对进一步的指标检测会产生影响。其次地塞米松和去甲肾上腺素为处方药, 必须在医

院急诊病房购买, 而且每次限量供应, 易缺货、断货。以上这些因素都限制了试验的顺利完成。因此, 本试验对灌流液组成成分进行优化, 通过观察比较不同灌流液组成对肝功能、肝细胞损伤情况以及组织水肿程度的影响, 明确红细胞、地塞米松、去甲肾上腺素对于肠肝灌流模型的影响, 以期能够更加顺利、高效的完成实验研究。

1 材料

1.1 药物与试剂 牛血清白蛋白, 批号 20090813; 右旋糖酐, 批号 20090614, 均购自北京科海海军舟有限责任公司; 地塞米松 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 天津金耀氨基酸有限公司, 批号 0908011; 去甲肾上腺素 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上海禾丰制药有限公司, 批号 091202; 娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2 动物 SD 大鼠, 雄性, 体重 250 g 左右, 清洁级, 由中国药品生物制品检定所实验动物资源中心提供, 动物合格证号 scxk(京) 2005-0004。

1.3 仪器 BT100-1F 恒流泵(保定兰格恒流泵有限公司); HJ-5 电动加热搅拌器(常州国华电器有限公司); 美的电暖器(广东美的电器有限公司); DZF-6020 真空干燥箱(上海一恒科技有限公司); 日立 7180 自动生化仪(日本), PHS-3BW 酸度计(上海理达仪器厂)。

2 方法

2.1 分组 48 只雄性 SD 大鼠, 随机分为 8 组, 每组 6 只。第 1 组含所有成分即: K-H 缓冲液, 牛血清白蛋白溶液, 右旋糖酐, 红细胞, 地塞米松, 去甲肾上腺素; 第 2 组不含红细胞; 第 3 组不含地塞米松; 第 4

[收稿日期] 2010-07-23

[基金项目] 国家自然科学基金重点课题(30930114); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ20090211); 2008 年度中医药行业科研专项(200807036)

[第一作者] 王怡薇, 助理研究员, 博士, 研究方向: 中药药代动力学研究, Tel: 010-64046469, E-mail: yiwei1231@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 朱晓新, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药药代动力学研究, Tel: 010-64056154, E-mail: zhuxx59@yahoo.com.cn

组不含去甲肾上腺素;第 5 组不含红细胞和地塞米松;第 6 组不含红细胞和去甲肾上腺素;第 7 组不含地塞米松和去甲肾上腺素;第 8 组不含红细胞、地塞米松和去甲肾上腺素,见表 1。

表 1 动物分组及灌流液组成

组别	缓冲液	牛血清白蛋白 /%	右旋糖酐 /%	红细胞 /%	地塞米松 /%	去甲肾上腺素 /%
1	K-H	1	3	10	4	2
2	K-H	1	3	-	4	2
3	K-H	1	3	10	-	2
4	K-H	1	3	10	4	-
5	K-H	1	3	-	-	2
6	K-H	1	3	-	4	-
7	K-H	1	3	10	-	-
8	K-H	1	3	-	-	-

注:K-H 缓冲液:NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, MgCl₂ 0.22 g, NaH₂PO₄ 0.22 g, NaHCO₃ 1.37 g, Glucose 3.0 g, CaCl₂ 0.37 g, pH 7.4。

2.2 肠肝灌流模型制备^[1,7] 大鼠用 20% 乌拉坦 (5 mL·kg⁻¹) ip 麻醉后,腹部切口,先结扎腹腔动脉与肝动脉。将上肠系膜动脉、右肾动脉和腹主动脉游离出来,用线围绕主动脉与右肾动脉和上肠系膜动脉分支处上下松结扎,右肾动脉在靠近右侧肾门处扎紧,然后用动脉夹夹住右肾动脉入腹主动脉处,在右肾动脉上夹子和结扎点之间作切口,用 0.5 mm × 1 mm 的塑料管插入右肾动脉,穿过腹主动脉进入上肠系膜动脉,插管固定后立即开通灌流,流速 5 mL·min⁻¹,同时通入氧气(95% O₂ 和 5% CO₂, 流速 1 L·min⁻¹)。随即快速打开胸腔,在右心房上作一切口,用 1.5 mm × 2 mm 的塑料管插入切开的右心房,其尖端顺下腔静脉进入肝静脉,固定插管后将流速提高到 10 mL·min⁻¹。将上述松结扎处扎紧,电暖器维持模型温度 37 左右。先用不含右旋糖酐和红血球的灌流液冲洗残血,待肝脏转为浅黄色时换用完整灌流液进行灌流。灌流液体积 150 mL。

2.3 灌流模型功能的评定

2.3.1 灌流液 pH 于不同时间点(0, 30, 60, 90, 120 min) 采集灌流液,在酸度计上测 pH。

2.3.2 肝、肠干湿重比(D/W) 灌流结束后取肝、肠组织,排去器官内存液或内容物,去除脂肪,称湿重;然后经 120 烘烤 24 h 后称干重,计算两者比率,并与正常大鼠比较,由此检查脏器水肿情况。

2.3.3 灌流液中 LDH, ALT 活性 测定不同时间点(同 2.3.1) 酶活性,判断肝功能及肝细胞损伤情况。

2.4 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 灌流液 pH 的变化 随着时间的延长,各组灌流液 pH 均逐渐升高。灌流结束时,8 组与 1 组相比, pH 无显著性差异。见表 2。

表 2 不同灌流液对不同时点 pH 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	pH				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
1	7.42 ± 0.01	7.44 ± 0.01	7.47 ± 0.01	7.49 ± 0.02	7.52 ± 0.03
2	7.42 ± 0.01	7.62 ± 0.09 ²⁾	7.81 ± 0.10 ²⁾	7.97 ± 0.11 ²⁾	8.14 ± 0.10 ²⁾
3	7.43 ± 0.02	7.62 ± 0.07 ²⁾	7.80 ± 0.10 ²⁾	8.01 ± 0.11 ²⁾	8.12 ± 0.08 ²⁾
4	7.42 ± 0.01	7.66 ± 0.07 ²⁾	7.81 ± 0.11 ²⁾	7.98 ± 0.10 ²⁾	8.12 ± 0.12 ²⁾
5	7.41 ± 0.04	7.74 ± 0.06 ²⁾	7.88 ± 0.05 ²⁾	8.06 ± 0.09 ²⁾	8.21 ± 0.08 ²⁾
6	7.42 ± 0.01	7.71 ± 0.01 ²⁾	7.89 ± 0.08 ²⁾	8.05 ± 0.07 ²⁾	8.21 ± 0.06 ²⁾
7	7.42 ± 0.01	8.19 ± 0.17 ²⁾	8.85 ± 0.17 ²⁾	9.47 ± 0.27 ²⁾	9.99 ± 0.19 ²⁾
8	7.41 ± 0.01	7.43 ± 0.01	7.44 ± 0.01	7.46 ± 0.01	7.47 ± 0.01

注:与灌流液 1 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 肝、肠干湿重比(D/W) 干湿重比越小,表示水肿越严重。与正常对照组比,1 ~ 8 组的肝脏干湿重比均有显著性差异,但是以 2, 3, 4, 8 组水肿较轻;3, 4, 8 组的肠干湿重比与对照组比无显著性差异。与 8 组相比,5, 6, 7 组肝脏、肠干湿重比均有显著性差异;1 组与 8 组比,肝、肠干湿重比无显著性差异。见表 3。

表 3 不同灌流液对肝、肠干湿重比的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	干湿重比(D/W)	
	肝脏	肠道
正常对照	0.33 ± 0.01 ⁴⁾	0.19 ± 0.01
1	0.23 ± 0.02 ²⁾	0.16 ± 0.02 ²⁾
2	0.24 ± 0.02 ²⁾	0.16 ± 0.02 ²⁾
3	0.26 ± 0.02 ²⁾	0.18 ± 0.01
4	0.24 ± 0.01 ²⁾	0.18 ± 0.02
5	0.21 ± 0.01 ^{2,4)}	0.15 ± 0.01 ^{2,3)}
6	0.21 ± 0.02 ^{2,3)}	0.16 ± 0.01 ^{2,3)}
7	0.21 ± 0.02 ^{2,3)}	0.15 ± 0.01 ^{2,3)}
8	0.24 ± 0.01 ²⁾	0.18 ± 0.02

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与灌流液 8 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 ~ 5 同)。

3.3 灌流液中 LDH 的变化 随着时间的延长, 各组灌流液中 LDH 不断升高。灌流结束时, 8 组的 LDH 活性最低。与 1 组相比, 2, 7 组有显著性差异; 与 8 组相比, 2, 3, 4, 7 组有显著性差异。见表 4。

表 4 不同灌流液对不同时间点 LDH 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	LDH/U·L ⁻¹				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
1	19.17 ±9.09 ⁴⁾	66.67 ±27.26 ⁴⁾	134.17 ±49.78 ³⁾	284.67 ±119.02	659.33 ±175.98
2	11.33 ±3.39 ^{1,3)}	44.17 ±9.62 ^{1,4)}	185.50 ±129.69 ⁴⁾	792.00 ±576.38 ^{2,4)}	1 448.67 ±467.79 ^{2,4)}
3	11.33 ±2.80 ^{1,3)}	41.33 ±17.33 ^{1,4)}	130.50 ±120.57 ³⁾	387.17 ±366.12 ³⁾	917.00 ±749.97 ⁴⁾
4	20.50 ±6.75 ⁴⁾	69.67 ±17.24 ⁴⁾	233.00 ±120.45 ⁴⁾	421.50 ±220.99 ³⁾	943.67 ±334.92 ⁴⁾
5	8.83 ±2.79 ⁴⁾	15.33 ±5.79 ²⁾	69.50 ±33.42	165.83 ±78.94	540.00 ±268.70
6	5.50 ±2.59 ⁴⁾	17.17 ±18.10 ²⁾	36.00 ±15.58	106.17 ±89.06	498.00 ±663.47
7	11.75 ±10.78 ^{1,3)}	30.00 ±12.68 ^{2,3)}	204.75 ±121.37 ⁴⁾	543.00 ±150.53 ⁴⁾	1 581 ±632.97 ^{2,4)}
8	2.67 ±2.33 ²⁾	8.67 ±8.66 ²⁾	19.67 ±12.68 ¹⁾	56.17 ±25.77	131.83 ±78.05

表 5 不同灌流液对不同时间点 ALT 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ALT/U·L ⁻¹				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
1	0.50 ±0.55	2.17 ±0.75	4.67 ±2.07	14.00 ±5.73	59.17 ±16.04
2	1.00 ±0.63	2.67 ±1.03	7.83 ±1.17	41.17 ±9.04	177.00 ±41.68
3	1.50 ±1.22	3.33 ±1.51	9.67 ±4.59	45.67 ±25.06	203.83 ±151.77
4	1.67 ±2.16 ³⁾	5.17 ±5.98	11.00 ±4.60	38.50 ±22.92	208.67 ±188.49
5	1.17 ±2.32	2.33 ±2.66	16.17 ±22.34 ^{1,3)}	47.83 ±62.11	210.17 ±273.80
6	0.67 ±1.37	5.00 ±7.38	9.83 ±7.39	42.33 ±44.51	309.67 ±432.87
7	0.00 ±0.00	3.50 ±2.38	6.25 ±0.96	68.50 ±22.07 ^{1,3)}	1 510.50 ±379.77 ^{2,4)}
8	0.00 ±0.00	1.17 ±0.75	3.67 ±2.34	17.83 ±10.89	40.00 ±26.80

4 讨论

肠肝灌流模型在药代动力学研究方面有其独特的优势, 利用该模型可以同时采集不同部位的灌流液研究药物的吸收、代谢情况, 比如采集门静脉灌流液考察药物的吸收情况; 采集肝静脉灌流液考察肝药酶对药物的代谢情况; 采集胆汁考察有无存在肠肝循环; 十二指肠给药与上肠系膜动脉给药有助于比较分析肠道菌群、黏膜对于药物的代谢作用。

灌流液本身的 pH、营养、渗透压等对于肠肝灌流模型成功与否意义重大, 只有确保灌流液最大限度的模拟体内生理环境, 才能使模型中的组织器官具有活性, 以便进行后续的药代、药效研究。此外, 影响肠肝灌流模型的因素还有很多, 比如温度、流速等^[8]。

本试验结果显示, 第 8 组灌流液不加红细胞、地塞米松、去甲肾上腺素, 对 pH, LDH, ALT 活性指标

3.4 灌流液中 ALT 的变化 随着时间的延长, 各组灌流液中 ALT 不断升高。灌流结束时, 8 组的 ALT 活性最低。与 1 组、8 组比, 7 组显著升高($P < 0.01$)。见表 5。

的影响, 均小于其余各组, 且在正常值范围内^[9]; 肠干湿重比与正常对照组相比, 无显著性差异; 肝干湿重比虽然与正常对照组相比有显著差异, 但是低于 1, 2, 4, 5, 6, 7 组(与 5, 6, 7 组相比, 有统计学意义); 说明 8 组灌流液的配方对于维持肝细胞的正常形态、功能以及减轻肝、肠组织水肿是较为合理的。结果提示, 红细胞、地塞米松、去甲肾上腺素对于肠肝灌流模型的功能稳定无明显影响, 灌流液配方可以简化。如此, 可以节省时间, 资金, 人力, 从而使肠肝灌流模型更加简便、高效的应用于药物体内过程的研究。

[参考文献]

[1] Pang K S, Cherry W F, Ulm E H. Disposition of enalapril in the perfused rat intestine-liver preparation: absorption, metabolism and first-pass effect [J] . J Pharmacol Exp

Ther, 1985, 233(5): 788.

[2] 王浴生, 李良宏. 肠-肝灌流液实验技术简介 [J]. 四川生理科学杂志, 1985(2): 43.

[3] Xu X, Hirayama H, Pang K S. First-pass metabolism of salicylamide. Studies in the once-through vascularly perfused rat intestine-liver preparation [J]. Drug Metab Dispos, 1989, 17(5): 556.

[4] Hirayama, Xin Xu, Pang K S. Viability of the vascularly perfused, recirculating rat intestine and intestine-liver preparations [J]. Am J Physiol, 1989, 257(2Pt1): G249.

[5] Hiroki Hirayama, Pang K S. First-pass metabolism of gentisamide: influence of intestinal metabolism on hepatic formation of conjugates [J]. Drug Metab Dispos, 1990, 18(5): 580.

[6] Wen Y, Rimmel R P, Zimmerman C L. First-pass

disposition of (-)-6-aminocarbvir in rats. I. Prodrug activation may be limited by access to enzyme [J]. Drug Metab Dispos, 1999, 27(1): 113.

[7] 王素军, 张志伟, 赵艳红, 等. 建立大鼠原位肠-肝灌流模型评价绿原酸的代谢 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(12): 1340.

[8] Chen J, Pang K S. Effect of flow on first-pass metabolism of drugs: single pass studies on 4-methylumbelliferone conjugation in the serially perfused rat intestine and liver preparations [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 280(1): 24.

[9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.

[责任编辑 何伟]

(上接第 132 页)

研究表明, 脑缺血再灌注后 24, 48 h, 在神经细胞出现凋亡的同时, 胞浆中的 p-JNK1/2 蛋白的表达亦显著增强。PNS 可抑制缺血再灌注后脑组织 p-JNK1/2 蛋白表达, 提示三七总皂苷通过线粒体通路抗神经元凋亡的作用可能是通过抑制其上游的 JNK 信号转导通路、抑制 JNK 蛋白磷酸化, 进而调节凋亡相关因子的活性, 从而发挥其抗神经元凋亡的作用。

[参考文献]

[1] Pettmann B, Henderson C E. Neuronal cell death [J]. Neuron, 1998, 20(4): 633.

[2] Li H, Deng C Q, Chen B Y, et al. Total saponins of Panax notoginseng modulate the expression of caspases and attenuate apoptosis in rats following focal cerebral ischemia-reperfusion [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(3): 412.

[3] Yang G, Kitagawa K, Matsushita K, et al. C57BL/6 strain

is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia [J]. Brain Res, 1997, 752(1-2): 209.

[4] 蒋文彬, 金小桦, 朱明真, 等. 血栓通治疗冠心病 70 例疗效观察 [J]. 中国交通医学杂志, 2005, 19(1): 21.

[5] 王欣. 血塞通软胶囊与心脑舒通胶囊治疗脑梗死疗效比较 [J]. 山东医药, 2008, 48(14): 125.

[6] 陈荣林, 李宏, 刘建辉. 关键蛋白酶激活因子 Apaf-2/CytC 在细胞凋亡中的作用 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(3): 89.

[7] 陈宏志, 陈卫民. JNK 蛋白在全脑缺血再灌注损伤中的表达 [J]. 中国医科大学学报, 2007, 36(3): 275.

[8] 汪劼, 易静. JNK 介导的信号转导途径以及活性氧在其中的作用 [J]. 生命科学, 2006, 18(4): 361.

[9] 王宁, 薛荣亮, 姚凤珍, 等. SP600125-JNK 抑制剂对大鼠脑缺血再灌注神经元的保护作用 [J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(20): 1838.

[责任编辑 聂淑琴]