

蛋白营养不良对大鼠胃及脾脏花生四烯酸代谢的影响¹

岳天立、麦凯 (第二军医大学药理学系药理教研室, 上海 200433)

提要 采用 HPLC 和放射性测定以及 GC-MS 测定了大鼠胃及脾 AA 主要代谢产物。蛋白营养不良 (PM) 引起胃合成 6-oxo-PGF_{1α} 和脾合成 PGD₂ 及 12-HE-TE 显著减少。吲哚美辛抑制环氧酶的作用不受 PM 影响, 然在所试各浓度下, PM 鼠脾合成 PGD₂ 的量显著低于对照鼠。PM 引起大鼠 PG 合成减少可能是非甾体抗炎药在 PM 鼠胃溃疡发生率增高的原因之一。

关键词 花生四烯酸类; 蛋白质; 营养障碍; 吲哚美辛; 6-酮前列腺素 F_{1α}; 前列腺素 D₂; 12-羟廿碳四烯酸

蛋白营养不良 (protein malnutrition, PM) 目前仍是全球性的问题, 不仅在某些发展中国家存在, 在发达国家也不鲜见⁽¹⁾。PM 可影响

某些药物的药效学和药物动力学^(1,2)。Varma 等在研究 PM 对非甾体抗炎药物 (NSAID) 作用的影响时, 发现在 PM 大鼠, NSAID 引起胃溃疡的作用增强, 但其机理不清楚⁽³⁾。鉴于目前认为胃组织形成的前列腺素 (PGs) 对胃肠细胞具有保护作用, 而 NSAID 诱发的胃溃疡与其抑制胃组织 PGs 的合成有关^(4,5,13), 故我们研究了 PM 对大鼠胃组织花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 代谢的影响。同时也观察了 PM 对大鼠脾脏 AA 代谢的影响。

材 料 和 方 法

Sprague-Dawley 大鼠, ♂。起始体重 115 ± SD 10 g, 6-7 wk, 分别给予含蛋白 21% (对照) 及 5% (PM) 的食物⁽⁶⁾, 3 wk 后进行试验,

1987年1月8日收稿 1987年6月5日接受¹

¹ 中国科学院科学基金部分资助的课题生字 No 85-445

AA 和 $[1-^{14}\text{C}]$ AA (2205.2 GBq/mol) 分别购自 Nu Chek Prep 及 Amersham 公司, 临用前经 HPLC 纯化。6-酮-PGF_{1α} (6-oxo-PGF_{1α}) 及 $[3, 3, 4, 4-^3\text{H}]$ 6-oxo-PGF_{1α} 系 Upjohn 药厂 Pike 博士赠送, 6-oxo $[5, 8, 9, 11, 12, 14, 15(n)-^3\text{H}]$ PGF_{1α} (2220 GBq/mol) 为 New England Nuclear 产品, $[9\beta-^3\text{H}]$ PGF_{2α} 按文献(7) 自行制备。

孵育及 AA 代谢物的提取 大鼠禁食过夜, 断头后取出胃及脾脏, 用冰冷盐水洗净, 分取胃底部。组织剪碎后加入 Tris-HCl 0.1 mol/L (pH 7.5, 含 EDTA 0.02 mol/L), 于冰浴中用 Polytron 匀浆器制成匀浆, 脾匀浆中加入 $[1-^{14}\text{C}]$ AA 37 kBq, 于 37°C 下振荡孵育 10 (脾) 或 20 (胃) min, 加入二倍量无水乙醇以终止反应。向胃样品中加入 $[^2\text{H}]$ 6-oxo-PGF_{1α} 200 ng 及示踪量的 $[^3\text{H}]$ 6-oxo-PGF_{1α} (6×10^4 cpm), 向脾样品中加入 $[9\beta-^3\text{H}]$ PGF_{2α} 3.8×10^5 cpm 作内标物。代谢物的提取采用 SEP-PAKC₁₈ 小柱 (Waters 产品)⁽⁸⁾。如观察药物作用则于孵育前加入被试药物。

AA 代谢物的分离与定量

1. 脾脏 AA 代谢物的分离与定量 将上述洗脱物溶于 50 μl 甲苯-甲醇 (10:1) 液中, 行 NP-HPLC。层析条件: 硅胶柱 (Partisil, 5 μm, 0.46 × 30 cm), 流动相: 甲液为苯:乙酸乙酯:乙腈:甲醇:乙酸 (30:40:30:2:0.5), 乙液为环己烷:苯:乙酸 (50:50:0.5), 开始 20 min 用含 4% 甲液之乙液行等梯度洗脱, 后 40 min 行线性梯度洗脱, 使乙液中含甲液量从 4% 增至 100%, 用 Berthold HPLC 放射活性检测器检测, 收集相应于 PGD₂ 及 12-羟廿碳四烯酸 (12-HETE) 放射峰的洗脱液行液体闪烁计数测定。同时收集相应于内标物 $[9\beta-^3\text{H}]$ PGF_{2α} 峰的洗脱液 ($R_t = 57$ min), 测定放射性强度以计算回收率。

采用 HPLC 鉴定胃底组织 AA 代谢物时所用层析条件同上。

2. 胃 6-oxo-PGF_{1α} 的分离与定量 将洗

脱物溶于 25 μl 甲醇:乙醚 (1:1) 混合液中, 加入示踪量的 $[^3\text{H}]$ 6-oxo-PGF_{1α}, 行 TLC。采用 Silica gel G 板 (5 × 20 cm), 展开剂为乙酸乙酯:乙酸:异辛烷 (110:20:50), 展开距离 17 cm。用放射性扫描仪扫描, 收集相应于 6-oxo-PGF_{1α} 之峰带 ($R_F = 0.21$), 用含 15% 甲醇之乙醚将被测物洗脱下, 制成甲酯-三甲基硅醚-甲氧衍生物⁽⁸⁾, 于 LKB 9000 型 GC-MS 联用仪上选择性检测质荷比为 598 及 602 的离子峰 (后者为 $[^2\text{H}]$ 标记物的相应离子), 根据二离子峰高度比从标准曲线上查得样品中 6-oxo-PGF_{1α} 的含量。

标准曲线制备 分别向系列试管中加入 6-oxo-PGF_{1α} 0, 20, 100, 250 及 500 ng, 并向各管中加入 $[^2\text{H}]$ 标记物 200 ng, 按同样方法制备衍生物, 行 GC-MS 测定, 以质荷比为 598 及 602 的二离子峰的峰高比为纵坐标, 加入之 6-oxo-PGF_{1α} 量为横坐标作图, 见图 1。

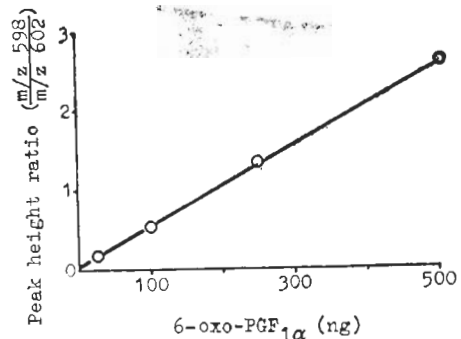


Fig 1. Quantitation of 6-oxo-prostaglandin F_{1α} by GC-MS using selected ion monitoring on an LKB-9000 instrument.

结 果

PM 引起的一般效应 给予低蛋白饲料后 1 wk 左右大鼠即出现 PM 的表现, 进食减少, 生长缓慢, 2-3 wk 出现典型症状: 体重、血浆总蛋白及白蛋白、肝重及蛋白含量均显著降低, 与文献(1)一致。

大鼠胃及脾 AA 的主要代谢产物 图 2 为

大鼠胃底及脾匀浆加入 $[1-^{14}C]$ AA 孵育后提取物的 HPLC 放射色谱图。从图可见大鼠胃组织 AA 的主要代谢产物为 6-oxo-PGF_{1α}，由于该产物存在酮式及环式二种互变体，所以放射峰呈现肩状⁽⁸⁾。此外胃组织还形成少量 PGD₂ 及一未知物(R_t = 13 min)。大鼠脾脏 AA 经环氧酶代谢途径的主要产物为 PGD₂，并有少量血栓素 B₂(TXB₂)。经脂氧酶代谢途径的主要产物为 12-HETE。上述产物均经 MS 鉴定之。

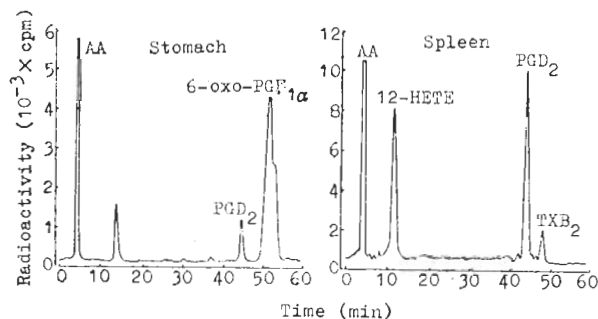


Fig 2. High-pressure liquid radiochromatogram of the products obtained after incubation of rat stomach and spleen homogenates with $[1-^{14}C]$ arachidonic acid. 12-HETE = 12-hydroxyeicosatetraenoic acid.

PM 对大鼠胃及脾 AA 代谢的影响 见表 1.

1. PM 引起胃合成 6-oxo-PGF_{1α} 降低 22%，同时也显著降低脾合成 PGD₂ 及 12-HETE，与对照鼠相比二者分别减少 40% 和 31%。

Tab 1. Effects of protein malnutrition on the biosynthesis of 6-oxo-prostaglandin F_{1α} in rat-stomach and prostaglandin D₂ and 12-HETE in rat spleen. $\bar{x} \pm SD$. *** $p < 0.01$

Product	Rats	Control	Malnutrition
nmol/g tissue			
6-oxo-PGF _{1α}	9	32 ± 4	25 ± 3***
10 ⁻⁴ × cpm/g tissue			
PGD ₂	13	9.3 ± 2.8	5.5 ± 2.1***
12-HETE	13	5.5 ± 1.6	3.8 ± 1.1***

加入不同量 AA 对脾合成 PGD₂ 及 12-HETE 的影响 见图 3。随 AA 量的增加，无论对照鼠及 PM 鼠脾合成 PGD₂ 及 12-HETE 量

均增加，但在所加入各浓度的 AA 下，PM 大鼠脾合成的上述二产物量均显著低于对照鼠。

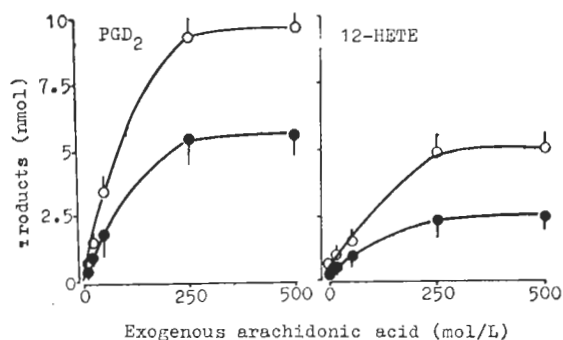


Fig 3. Effects of exogenous arachidonic acid on the biosynthesis of prostaglandin D₂ and 12-HETE in spleen homogenates from control (○) and protein malnutrition (●) rats. $n = 5$, $\bar{x} \pm SD$.

吲哚美辛对大鼠脾 AA 代谢的影响 从图 4 可见吲哚美辛对脾合成 PGD₂ 呈剂量依赖性抑制，其抑制 PGD₂ 合成 50% 的浓度 (IC₅₀) 在二组大鼠相似但在所试各药物浓度下，PM 大鼠脾合成 PGD₂ 的绝对量显著低于对照鼠。吲哚美辛对 12-HETE 的合成无明显影响，当药物浓度达 2.5 mol/L 时，12-HETE 的合成分别增加 9% (对照组) 及 5% (PM 组)。

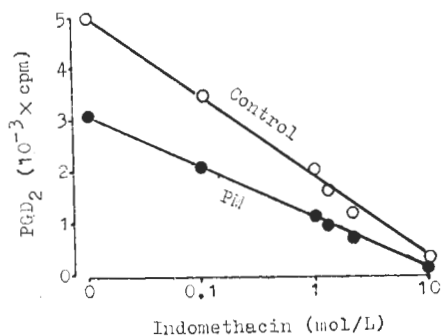


Fig 4. Effects of indomethacin on the biosynthesis of prostaglandin D₂ in spleen homogenates from control (○) and protein malnutrition (●) rats. Each value is the \bar{x} of 2 experiments in duplicate, with variability < 5%.

讨 论

有关 PM 对 AA 代谢的影响文献记载极少，作者等曾发现 PM 引起大鼠中性白细胞环

氧酶和 5-脂氧酶活性下降。本实验一方面通过观察 PM 对胃合成 PGs 的影响, 探究在 PM 大鼠 NSAID 引起胃溃疡发生率增高的机理; 另一方面通过观察 PM 对大鼠胃及脾 AA 代谢的影响进一步肯定 PM 与 AA 代谢的关系。

文献中有关大鼠胃及脾 AA 主要代谢物的种类尚有异议^(10,11), 本实验对 AA 代谢物除根据 HPLC 上与标准品比较外, 均进行了 MS 鉴定。胃 AA 主要代谢物为 6-oxo-PGF_{1α}, 与文献(11)报道一致。脾 AA 经环氧酶代谢途径的主要产物是 PGD₂, 与文献(11)报道的主要产物为 TXB₂ 的结果不一, 其原因尚不知。作者发现大鼠脾环氧酶活性很高, 且该组织还具脂氧酶活性, 是观察 AA 代谢的较理想组织, 这是本实验选用脾脏的原因。

为排除 PM 可能引起内源性 AA 释放量的改变故观察了加入不同量 AA 对脾形成 PGD₂ 及 12-HETE 的影响。同样发现 PM 引起二者合成量降低, 说明 PM 引起了上述组织 AA 代谢酶系活性的降低。这与在中性白细胞上观察到的结果一致。吲哚美辛抑制脾合成 PGD₂ 的 IC₅₀ 在二组大鼠相似, 表明 PM 并未改变酶系统对药物的敏感性。

不同 NSAID 诱发胃溃疡的机理可能不一, 但抑制环氧酶从而降低 PG 合成是这类药物引起胃溃疡的共同原因^(5,12,13), PM 导致胃组织合成 PG 显著减少, 当应用 NSAID 时 PM 大鼠胃 PG 水平降得更低, 使 PG 的细胞保护作用削弱更著, 这就更易引起溃疡的发生。PM 引起的药动学的改变也可能增强药物的作用, 但作者等发现, 在 PM 大鼠虽然水杨酸类的代谢加快⁽¹⁴⁾, 然大鼠胃溃疡发生率仍增高, 提示了 NSAID 在 PM 大鼠胃溃疡增高的原因主要不是药动学的改变, 而是 PG 合成的降低。本实验结果提示了临床上对伴有 PM 的患者使用抑制环氧酶的 NSAID 时, 有必要加强对药物不良反应的监测。

致谢 本实验曾得到 McGill 大学 D R Varma 及 W S Powell 两教授的帮助。

参 考 文 献

- 1 Varma DR. Protein deficiency and drug interaction. *Drug Dev Res* 1981; 1 : 183
- 2 岳天立. 蛋白营养不良与药物代谢. *生理科学进展* 1987; 18 : 246
- 3 Varma DR. Influence of dietary protein on the anti-inflammatory and ulcerogenic effects and on the pharmacokinetics of phenylbutazone in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 211 : 338
- 4 Chaudhury TK, Jacobson ED. Prostaglandin cytoprotection of gastric mucosa. *Gastroenterology* 1978; 74 : 58
- 5 Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hancher AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. *Ibid* 1979; 77 : 433
- 6 Yue TL, Varma DR. Influence of protein-deficiency on lysosome stabilizing and paw edema suppressant activity of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 217 : 776
- 7 Powell WS. Metabolism of prostaglandins, prostaglandin analogs and thromboxane B₂ by lung and liver microsomes from pregnant rabbits. *Biochim Biophys Acta* 1979; 575 : 335
- 8 Yue TL, Varma DR, Powell WS. Effects of protein deficiency on the metabolism of arachidonic acid by rat pleural polymorphonuclear leukocytes. *Ibid* 1983; 751 : 332
- 9 Pace-Asciak CR, Nashat M. Mechanistic studies on the biosynthesis of 6-ketoprostaglandin F_{1α}. *Ibid* 1977; 487 : 495
- 10 Bennett A, Friedmann CA, Vane JR. Release of prostaglandin E₁ from the rat stomach. *Nature* 1967; 216 : 873
- 11 Pace-Asciak CR, Rangaraj G. Distribution of prostaglandin biosynthetic pathways in several rat tissues, formation of 6-ketoprostaglandin F_{1α}. *Biochim Biophys Acta* 1977; 486 : 579
- 12 Moncada S, Flower RJ, Vane JR. Prostaglandins, prostacyclin, thromboxane A₂, and leukotrienes. In: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. 7th ed. NY:Macmillan, 1985 : 660-73
- 13 Whittle BJR. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology* 1981; 80 : 94

14 Yue TL, Varma DR. Pharmacokinetics, metabolism and disposition of salicylate in

protein-deficient rats. *Drug Metab Dispos* 1982; 10 : 147

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Mar; 9 (2) : 155-159

Effects of protein malnutrition on metabolism of arachidonic acid in rat stomach and spleen

YUE Tian-Li, MAI Kai (Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Second military Medical University Shanghai, 200433)

ABSTRACT The effects of protein malnutrition (PM) on the biosynthesis of the metabolites of arachidonic acid (AA) in rat stomach and spleen were studied. The major metabolites were 6-oxo-PGF_{1α} in stomach and PGD₂ and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) in spleen. They were measured quantitatively by HPLC with a radioactivity detector and by GC-MS. PM in rats resulted in a reduction in the synthesis of 6-oxo-PGF_{1α} in stomach and PGD₂ in spleen by 22% and 40%, respectively. The synthesis of 12-HETE in spleen was also reduced by 31% as a result of PM. Indomethacin inhibited the formation of PGD₂

in spleen in a dose-dependent manner and its effect was not altered by PM, but at any given concentration the amount of metabolites was less in PM rats than that in the control. Thus the enhanced ulcerogenic effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in PM rats may have been due to the lower level of PGs with cytoprotective effects on gastric mucosa.

KEY WORDS arachidonic acids; protein: nutrition disorders; indomethacin; 6-oxo-prostaglandin F_{1α}; prostaglandin D₂; 12-hydroxyeicosatetraenoic acid