

文章编号: 1004 - 7271(2007)03 - 0248 - 04

鲈鱼和小鼠肝组织几种功能指标的比较

杨筱珍, 郁达义, 李燕玮, 吴旭干, 成永旭

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:为探索处于不同进化地位的两种动物(鲈鱼和小鼠)肝功能指标的异同,分别采用Lowry法、CO还原差示光谱法和比色法,对鲈鱼和小鼠肝组织重要细胞器(线粒体和微粒体)蛋白、药物代谢酶(细胞色素P450)和反映肝功能的重要指标(血清中天冬氨酸转氨酶和丙氨酸氨基转移酶含量)进行了比较。结果显示,鲈鱼肝脏线粒体蛋白、细胞色素P450和丙氨酸氨基转移酶均明显低于小鼠,而微粒体蛋白和天冬氨酸氨基转移酶与小鼠差异不明显。这些结果提示,肝功能指标在不同进化地位的动物(鲈鱼和小鼠)间存在着差异,其中肝脏细胞色素P450和丙氨酸氨基转移酶的含量可能与肝功能差异密切相关。

关键词:鲈鱼;小鼠;肝;P450;天冬氨酸转移酶;丙氨酸转氨酶

中图分类号:S 917 **文献标识码:**A

Comparative study on functional indices of liver in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and mice

YANG Xiao-zhen, YU Da-yi, LI Yan-wei, WU Xu-gan, CHENG Yong-xu

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem Certificated
by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The important organelles protein (mitochondria and microsomes), cytochromes P450 of drug-metabolizing enzymes as well as aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) in serum of important liver functional indices were comparatively analyzed by Lowry protein measure, CO difference spectrum and colorimetric method to explore the difference of liver functional indices between largemouth bass and mice from different evolution status. Results showed that the level of mitochondria protein, cytochromes P450 as well as ALT in largemouth bass liver were significantly lower compared to mice. The level of microsomes protein and AST in largemouth bass and mice liver were not significantly different. These data suggest that liver functional indices of largemouth bass and mice from different evolution status are significantly different, the functions of liver are closely correlated with the content of cytochromes P450 as well as ALT in liver.

Key words: largemouth bass; mice; liver; P450; AST; ALT

肝脏是各种动物重要的解毒器官,其微粒体中细胞色素P450的含量决定着高等哺乳动物肝脏药物

收稿日期:2006-10-12

基金项目:国家自然科学基金(30471349);上海市曙光计划(02-SG-40);上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介:杨筱珍(1977-),女,山东济南人,讲师,博士,主要从事水生动物生殖免疫方面的研究。Tel:021-65711346,

E-mail: xzyang@shfu.edu.cn

通讯作者:成永旭, Tel:021-65711346, E-mail: yxcheng@shfu.edu.cn

代谢和解毒能力,而血清中天冬氨酸转移酶和丙氨酸转氨酶含量的变化间接反映着高等哺乳动物肝功能异常与否^[1-4]。然而,目前在较低等的水产动物中有关肝功能的研究相对还比较薄弱。随着环境污染的日益加剧及药物在水产界的广泛使用,水产动物肝脏解毒功能也越来越受到重视,目前尚未见有将两种不同进化程度脊椎动物肝功能指标比较的研究,而这方面的研究,将有助于从进化角度阐明低等脊椎动物肝功能的形成及作用,同时也将为这两种生物间的进化关系提供佐证。

1 材料与方 法

1.1 动物血清和肝组织匀浆的制备

成年雄性大口黑鲈(10 条,400 g 左右)和昆明雄性小白鼠(10 只,35 g 左右)分别购自上海青浦区金泽鱼类良种场和第二军医大学。小鼠采用眼眶采血后,断脊椎处死;鲈鱼尾部静脉脊椎采血后,断尾法处死。所采集的血液分别放入 2 mL 的离心管,静置约 12 h,待上层有血清析出为止。取出肝组织后用生理盐水漂洗,去血液,用滤纸吸干,称重后将肝组织剪碎移入匀浆器,按每克肝组织加 4 mL 0.25 mol/L 的蔗糖溶液(需要预冷至 0 ℃),在碎冰上进行组织匀浆的制备。

1.2 提取肝线粒体和微粒体

使用差速离心法提取肝组织中线粒体和微粒体。将肝组织匀浆液移入离心管,4 ℃ 下用 1 000 G 离心 10 min,取上清液,此上清液经 4 ℃ 10 000 G 离心 30 min 后,所得沉淀为线粒体,用 TMS 缓冲液(Tris 6.05 g, MgCl 220.6 g, 蔗糖 68.4 g, 加蒸馏水 500 mL, 调 pH 至 7.5, 补水至 1L)制成悬液备用,而此时的上清液再用 4 ℃ 105 G 超速冷冻离心 60 min,淡红色沉淀为微粒体,将所获得的微粒体用 TMS 缓冲液制成悬液备用。按每毫升 10 mg 蛋白稀释分装, -70 ℃ 保存。

1.3 肝线粒体和微粒体蛋白浓度测定

用 Lowry 法^[5]测定肝线粒体和微粒体蛋白含量, Lowery 法中以系列浓度牛血清白蛋白为横坐标,相应的 A 值为纵坐标,得标准曲线方程为 $y = 0.012 1x + 0.005 4$ ($R^2 = 0.996 3, n = 5$)。该方法的检测范围为 25 ~ 250 mg/L,最低检测限为 25 mg/L。

1.4 细胞色素 P450 含量测定采用 CO 还原差示光谱法^[6]

取制备好的肝微粒体,放置室温,保存液弃去。用 Tris 缓冲溶液(pH7.4 0.1 mol/L)稀释成 10 mg/mL 的蛋白悬液。取此蛋白悬液 0.3 mL,加 Tris 缓冲溶液(pH7.4 0.1 mol/L)5.7 mL,混合,分装与两个比色杯(大约有 3 mL)置于紫外分光光度计(UV-2800 UNICO,美国),扫描测定 400 nm 和 500nm 的基线,向两个比色皿中加数毫克连二亚硫酸钠(保险粉),用玻璃棒小心搅拌,通入 CO 大约 1 min,再扫描 400 ~ 500 nm 差示光谱,分别读取在 450 nm 和 490 nm 处的 OD 值。结果计算 P450 含量(nmol · mg 蛋白)

$$\text{白}) = \frac{\Delta\text{OD}(450 - 490) \times 1000}{91 \times \text{蛋白浓度}(5\text{mg/mL})}$$

1.5 天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT) 含量测定

按试剂盒(购自上海名典生物工程有限公司)说明书进行操作,先用丙酮酸标准液绘出标准曲线,AST 和 ALT 的测定分别按下表进行操作后,将反应后的各管液体充分混合,置室温 10 min,分别于 505 nm、520 nm 处以空白管校零,在紫外分光光度计下读取各管吸光度,再查标准曲线,求得相应酶的含量(单位:卡门氏单位)。

1.6 数据分析

所得数据用 SPSS 软件的 Independent-sample T test 进行统计学分析,试验结果用均数 ± 标准差(±S)表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 线粒体(Mitochondria)和微粒体(Microsome)蛋白含量

实验结果发现:鲈鱼肝脏线粒体蛋白含量明显比小鼠的低,小鼠肝线粒体蛋白含量约是鲈鱼的1.5倍为(24.12 ± 2.22) mg/g,两者间差异显著($P < 0.05$);鲈鱼和小鼠肝微粒体蛋白含量较接近,小鼠略高于鲈鱼为(19.48 ± 0.41) mg/g,两种动物肝微粒体蛋白含量平均在17.31 mg/g左右,两者间差异不显著($P > 0.05$)(图1)。

2.2 细胞色素 P450、天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)

本研究结果发现:小鼠肝脏微粒体细胞色素 P450 的含量约为0.4 nmol/mg左右,明显高于鲈鱼,约为鲈鱼的2倍,两者间的差异极为显著($P < 0.01$);鲈鱼和小鼠肝功能指标血清中天冬氨酸转氨酶(AST)含量,分别在(149.39 ± 34.93)卡门氏单位和(130 ± 14.87)卡门氏单位,鲈鱼略高于小鼠,但两组间无显著性差异($P > 0.05$);小鼠丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量在(47.66 ± 4.78)卡门氏单位,比鲈鱼[(28.18 ± 1.85)卡门氏单位]高,两者间的差异显著($P < 0.05$)(图1)。

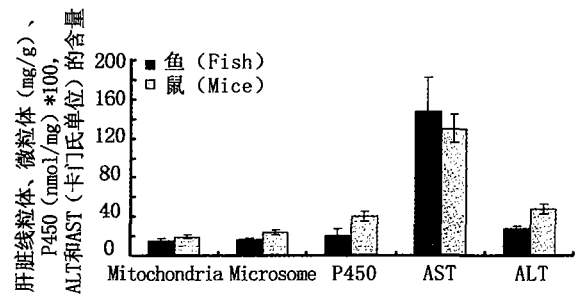


图1 鲈鱼和小鼠肝脏线粒体(Mitochondria)和微粒体(Microsome)蛋白含量、细胞色素 P450、天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量的比较

Fig.1 Comparison of protein content in mitochondria and microsome, P450, AST and ALT between *Mjcropterus salmoides* and mice of liver

3 讨论

肝组织是重要的代谢器官,参与了体内的许多的生物化学反应。肝脏线粒体酶参与呼吸链,产生大量能量以驱动 ATP 合成。本研究结果发现鲈鱼与小鼠线粒体蛋白含量有显著性差异,鲈鱼线粒体蛋白含量明显低于小鼠。这可能与小鼠的体温较高,活动方式更为多样,需要较多的供能有关。本研究发现,肝脏微粒体中的蛋白含量在鲈鱼和小鼠间差异并不明显。但我们接下来的研究却发现小鼠肝微粒体中细胞色素 P450 酶含量明显高于鲈鱼说明细胞色素 P450 酶含量与微粒体蛋白含量间并没有成正比的关系,这些结果可能与小鼠细胞色素 P450 是肝微粒体蛋白的主要成分,并发挥药代功能,而鲈鱼这种药代功能由其它蛋白完成有关,也有可能是鲈鱼肝脏的药代功能比小鼠弱不需要较高的 P450 含量。鼠作为高等动物,活动血液循环是完全双循环的方式与鱼类单循环方式造成毒物蓄积可能存在不同,两种不同进化水平的生物药物代谢模式是否一致,进化规律如何还有待于进一步研究。

细胞色素 P450 酶,几乎存在于生物体内的所有组织,对于脊椎动物来说,它在肝脏中含量最高,它作为毒物毒性的生物学标志物(biomarker)已广泛应用于毒理学研究中,作为评价环境污染状况的生物指标之一。本研究的结果显示,昆明小鼠肝脏中细胞色素 P450 的含量为0.4 nmol/mg,明显低于 Wister 大鼠中为0.9 nmol/mg^[1],却高于比它低等的鲈鱼,约是鲈鱼的2倍。这些研究表明,不同种类间肝微粒体细胞色素 P450 的含量存在着差异。有关人类肝微粒体中 P450 的研究已深入到对不同亚型分子研究的水平^[2],而在水产动物中相对还比较薄弱,这一研究的开展,将有助于寻找 P450 的进化规律,进而更有效的阐明 P450 的功能及其在水产动物肝药物代谢中的作用。

血清中转氨酶 AST/ALT 的比值变化是衡量肝功能正常与否的重要指标之一,由于此方法简单准确,已被广泛用于人类肝功能检测中,人类这一比值的正常值在1左右,通过此值的变化可以间接反映肝损伤的程度^[4]。有研究表明大鼠血清中 AST/ALT 的比值为151.1/49.3约为4.06^[7],明显高于人类,在鲫鱼为95/66约为1.44^[3],而在本研究的结果中,昆明小鼠和鲈鱼中分别约为3.43和5.32,这一

研究表明不同动物间这一比值的数据是有差异的。在人类 AST/ALT 的比值与肝功能损伤程度的对应关系是否也适用于水产动物还有待于进一步的研究加以证实。

参考文献:

- [1] 王睿,朱曼,张永青,等. 加替沙星和环丙沙星对大鼠肝细胞色素 P450 酶系的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2004, 20(6):433-436.
- [2] 刘冬英,杨敏,祝慧娟,等. 几种植物化学物对人孕烷 X 受体介导的细胞色素 P450 3A4 转录调节作用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2006, 35(1):8-13.
- [3] 陈鹏飞,杨德强,邹红,等. 两种中草药组方对鲫鱼肝脏转氨酸的影响[J]. 饲料工业, 2005, 26(6):28-31.
- [4] 张丽君. AST/ALT 比值测定在病毒性肝炎诊治中的临床意义[J]. 职业与健康, 2005, 21(9):1404.
- [5] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folinphenol reagent[J]. J Biochem, 1951, 193:265-269.
- [6] Goks A, Forlin L. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring[J]. Aquat Toxicol, 1992, 22:287-312.
- [7] 白娟,李文凡,李淑玲. 灯盏花液对实验性大鼠肝纤维化防治作用的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(5):34-35.

会议预告

2007' 水产科技论坛

水产科技论坛是由中国水产科学研究院于 2003 年始创,其主要目的是为中国以及世界范围科学家提供一个高水平的水产科技交流平台,并努力将之打造为中国与世界各国间的水产科技合作以及世界各国科学空间共享研究体验与成果的新渠道。自 2003 年第一次成功主办了水产科技论坛后,该论坛已成为公认的重要的国际性水产科技交流平台。2007' 水产科技论坛将锁定捕捞(捕捞技术、负责任的捕捞),渔业资源与环境(渔业资源的可持续利用与保护、渔业环境与生态的维护和修复),水产养殖(养鱼技术、遗传育种、营养与饲料、疾病防治),水产品加工(加工技术、质量与安全)等议题进行交流与研讨。

联系人:陈欣然,于瑞,方平

地址:100039 北京永定路南青塔村 150 号中国水产科学研究院论坛秘书处

邮编:100039

电话:010-68673921,68673919

传真:010-68673918,68676685

E-mail:07forum@cafs.ac.cn