

文章编号: 1004 - 7271(2007)05 - 0495 - 05

· 研究简报 ·

草鱼肝细胞系中 CYP3A 活性检测方法

李 聃¹, 杨先乐^{1,2}, 张书俊¹, 喻文娟¹, 陈 昱¹

(1. 上海水产大学农业部渔业动植物病原库, 上海 200090;

2. 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海 200090)

摘要:红霉素-N-脱甲基酶(ERND)是细胞色素 P450 3A(CYP3A)依赖的酶类,可通过测定该酶催化代谢产物甲醛的量来反映其活性,从而评价 CYP3A 活性的高低。以草鱼肝细胞系(GCL)为模型,红霉素为底物,采用 Nash 比色法检测 ERND 产物甲醛含量,Lowry 比色法测定细胞蛋白含量,建立鱼类细胞中 CYP3A 活性的简便检测方法。研究表明,底物以 0.4 mmol/L 作用 60 min 后进行检测较为合适。细胞样品中 ERND 产物甲醛平均回收率为 78.80% ± 4.37%,平均日内精密密度为 2.80% ± 1.40%,平均日间精密密度为 3.91% ± 1.45%,通过计算探针酶 ERND 活性可为鱼类细胞 CYP3A 活性的评价提供简便可靠的方法,从而为鱼类药物代谢酶体外诱导模型的研究奠定了基础。

关键词:细胞色素 P450 3A; 红霉素-N-脱甲基酶; 鱼类; 细胞; 甲醛

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Analysis of the activity of cytochrome P450 3A in grass carp liver cell line

LI Dan¹, YANG Xian-le^{1,2}, ZHANG Shu-jun¹, YU Wen-juan¹, CHEN Yu¹

(1. Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai
Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 200090, China)

Abstract: The activity of erythromycin N-demethylase, whose catalysate is formaldehyde, can indicate the activity of cytochrome P450 3A (CYP3A). A simple method of determination of the activity of CYP3A in grass carp liver cell line (G4) was established. The study showed that the appropriate concentration of substrate was 0.4 mmol/L, and the optimal reaction time was 60 min. The protein concentration of fish cell suspension was determined according to the method of Lowry, the activity of erythromycin N-demethylase was estimated by the method of Nash. The mean recovery of formaldehyde in fish cell suspension samples was 78.80% ± 4.37%, the mean intraday and interday precision were 2.80% ± 1.40% and 3.91% ± 1.45%, respectively. This method is available to evaluate the activity of CYP3A in fish cells with reliable results. Our

收稿日期: 2006-11-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371109); 上海市教委 E-研究院建设资助项目(E03009); 上海市重点学科建设资助项目(Y1101)

作者简介: 李 聃(1983-), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物疾病与药理学。Tel: 021-65710870, E-mail: danli@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者: 杨先乐, Tel: 021-65710503, E-mail: xlyang@shfu.edu.cn

research laid a foundation for the *in vitro* study of CYP3A induction using cultured fish cell lines.

Key words: CYP3A; erythromycin N-demethylase; fish; cell; formaldehyde

细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP) 是由亚铁血红素蛋白组成的超基因家族酶系, 广泛参与生物体内的药物代谢。鱼类 CYP3A 可被外源性物质诱导或抑制^[1], 是造成药物互作的主要原因, 影响到渔药生物利用度及其药代动力学参数^[2]。哺乳动物中 CYP3A 活性主要通过肝微粒体法检测依赖 CYP3A 酶类的活性来反映^[3], 尽管大量鱼类 CYP3A 成员被发现^[4-5], 却仍缺乏准确检测鱼类细胞 CYP3A 活性的方法。研究表明红霉素 (ERY) 作为曾经广泛使用的渔药, 是 CYP3A 的特异性底物, 通过检测红霉素-N-脱甲基酶 (ERND) 活性可以很好地评价鱼类 CYP3A 的活性^[6]。本文通过草鱼肝细胞模型建立了鱼类细胞中 CYP3A 活性检测方法, 为鱼类药物代谢酶体外诱导模型的建立提供了方法上的支持。

1 材料和方法

1.1 细胞

草鱼肝细胞系 (GCL, 保藏编号 BYK-C12-02) 由农业部渔业动植物病原库提供, 以 M199 细胞培养液置于 28 °C 培养。

1.2 试剂

M199 基础培养基 (GIBCO BRL), 胰蛋白酶 (DIFCO), 胎牛血清 FBS (杭州四季清), Folin 酚、利福平 (北京鼎国), 红霉素 (上海生工), 牛血清白蛋白 BSA (上海博光), 其它常规试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞中 CYP3A 活性的检测

甲醛标准曲线制备参考徐淑云等^[7]的方法。取贴壁生长细胞, 用 2 mL 含底物的反应缓冲液替代培养液, 置 28 °C 培养箱中反应一段时间后制成细胞悬液, 经细胞破碎, 以 Lowry 比色法^[8]测定蛋白含量, 甲醛测定样品中加入 ZnSO₄ 0.35 mL, 混匀, 冰浴 5 min, 加饱和 Ba(OH)₂ 0.35 mL, 混匀, 静置 5 min 后以 5 000 rpm 离心 60 min。取上清液 2 mL 移至反应瓶, 以 Nash 比色法^[9]于 413 nm 处测定吸光值, 根据标准曲线计算甲醛含量。细胞中 ERND 活性 [pmol/(min · mg)] 以每毫克蛋白单位时间内的甲醛生成量表示, CYP3A 活性直接以依赖性酶 ERND 活性进行评价, 每个样品设置 3 个平行。

1.4 回收率及精密度的测定

取 800 μL 细胞悬液 (2.0 × 10⁵ cells/mL) 分别加入 200 μL 浓度为 80、160、240 μmol/L 的甲醛标准溶液, 样品以 1.3 方法前处理后进行测定, 重复 5 次, 回收率以实测浓度与理论浓度的百分比值表示。上述样品在同一天内每隔 3 h 重复测定 5 次计算日内精密度, 每隔 24 h 连续 5 天进行重复测定计算日间精密度。

1.5 曲线拟合及统计分析

使用 SigmaPlot 8.0 软件的 4 参数 Peak Log-Normal 模型拟合底物红霉素的剂量效应曲线; 通过 SPSS 11.5 软件进行显著性分析, 多重比较采用单项方差分析 (One-Way ANOVA) 中的 Student-Neuman-Keuls (SNK) 检验, 样本组以英文字母进行标记, 含相同字母表明组间无显著差异, 反之则表明组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 细胞样品酶活产物的测定

2.1.1 甲醛波谱扫描及其标准曲线

ERND 代谢产物的测定使用分光光度计法, 检测细胞单位蛋白单位时间产生甲醛的量。样品波谱

扫描显示在 413 nm 处有最大吸收峰(图 1)。实验表明,在 2.7 ~ 26.7 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内甲醛标准液的浓度与吸光值呈显著线性相关,其线性回归方程为 $y = 0.0035x - 0.0042$, 相关系数 $R^2 = 0.9966$ (图 2)。根据此线性回归方程可以计算出样品中甲醛的生成量,从而得到细胞中 ERND 活性用于 CYP 3A 活性的评价。

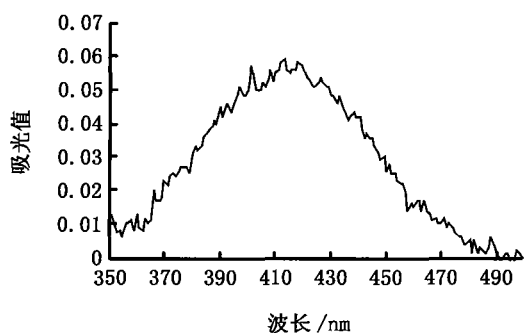


图 1 细胞样品中甲醛测定光谱扫描

Fig. 1 Spectral scan result of formaldehyde in treated cell samples

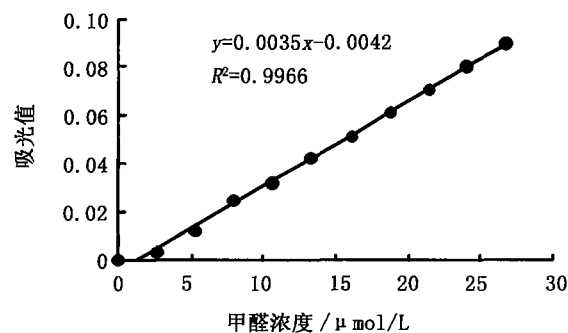


图 2 甲醛标准曲线

Fig. 2 Standard curve for the determination of formaldehyde concentration

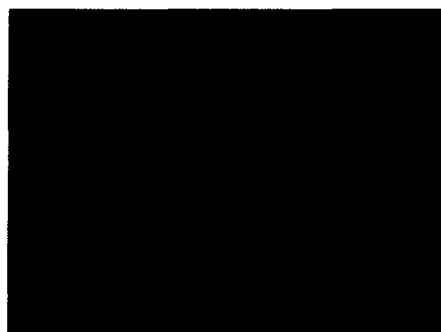
2.1.2 回收率与精密度

检测产物甲醛在细胞悬液中的回收率及精密度,实验结果表明,回收率受细胞量及培养时间影响不大,高浓度甲醛回收率较大而变异系数较小,细胞悬液中甲醛的平均回收率为 $78.80\% \pm 4.37\%$, 日内和日间平均变异系数分别为 $2.80\% \pm 1.40\%$, $3.91\% \pm 1.45\%$, 能满足测定要求。

2.2 底物作用条件的确定

2.2.1 助溶剂及缓冲液

底物红霉素的反应体系为液体环境,包括助溶剂及缓冲液。红霉素(ERY)在水中的溶解度很低,经筛选得到的乙醇与二甲亚砜(DMSO)助溶效果较好,且对细胞毒性小。研究表明,高剂量长时间红霉素作用会加速细胞的老化,细胞中空泡(箭头指示)越多越大表明细胞老化越严重。考察使用不同助溶剂的 2 mmol/L 红霉素作用于对数生长期 GCL 24 h 后的形态(图 3),结果显示以乙醇助溶较好。此外,用成分复杂的培养液作为反应环境对测定存在潜在干扰,反应选择在缓冲液环境下进行,本文考察的六种缓冲液对细胞的损伤程度从小到大依次为 TMS 缓冲液、生理盐水、磷酸盐缓冲液、平衡盐溶液、KHB 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液,可见使用 TMS 缓冲液作为反应缓冲液较为合适。



a. 乙醇助溶



b. DMSO 助溶

图 3 助溶剂对 GCL 的影响

Fig. 3 Effect of auxiliary solvent on GCL

2.2.2 底物作用浓度

经 40 $\mu\text{mol/L}$ 利福平诱导处理的 GCL 细胞以不同浓度红霉素作用 120 min 后检测 ERND 活性, 实验结果表明(图 4), 红霉素浓度为 0.05 mmol/L 时底物基本达到饱和, 在 0.05 ~ 0.4 mmol/L 浓度范围内检测酶活无显著差异, 浓度再加大 ERND 酶活反而减小, 说明 CYP3A 活性受到抑制。形成的这种钟形剂量-效应曲线以 Log-Normal 模型进行拟合, 拟合度(R^2) 为 0.974 2。为扩大方法适用范围, 在后续诱导模型研究中我们选取 0.4 mmol/L 为底物作用浓度用于评价 CYP3A 活性。

2.2.3 底物作用时间

经 40 $\mu\text{mol/L}$ 利福平诱导处理的 GCL 细胞用 0.4 mmol/L 红霉素作用不同时间检测 ERND 活性, 实验结果表明(图 5), 甲醛生成量随反应时间延长而不断增加, 但在 60 min 以后趋于平缓。进一步计算反映甲醛形成速率的 ERND 活性, 结果表明反应时间在 60 min 时 ERND 值最高(30 - 75 min 之间无显著差异), 随着时间的延长 ERND 值逐渐减小。因此, 在药酶诱导 GCL 细胞中 CYP3A 活性时 60 min 为 ERY 底物最佳作用时间。

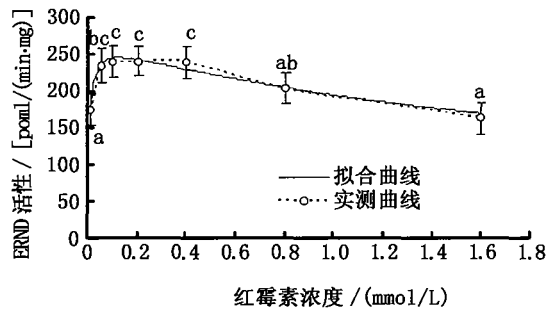


图4 红霉素对 ERND 活性的剂量-效应曲线($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Concentration-response curves of erythromycin to affect ERND activity

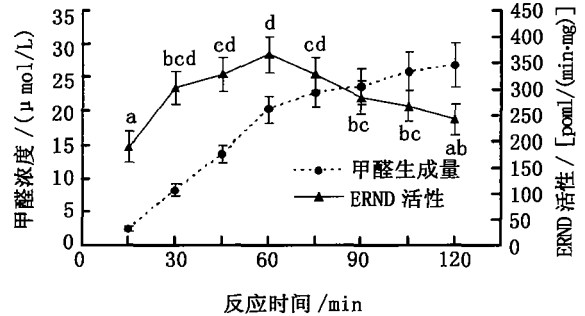


图5 红霉素不同反应时间甲醛生成量及 ERND 酶活性($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Formaldehyde concentration and ERND activity produced after a period of time

3 讨论

CYP3A 亚家族各成员虽具有一定差异, 但它们具有高度相似的氨基酸组成, 大多数情况下, 药物的代谢研究反映的是 CYP3A 的总体活性^[10], 通过依赖于 CYP3A 的酶(ERND) 进行活性评价并非针对某一种同工酶, 而是专一性地指示 CYP3A 酶系的活性。我们的相关研究表明使用 CYP3A 的典型诱导剂或抑制剂处理鱼类细胞后, 用本文方法测定的 ERND 活性有相应的增加或降低, 证实了方法的特异性。

以往 CYP3A 活性测定方法均针对微粒体体系, 其离心所需时间较细胞样品短, 且大多未考虑缓冲液及底物的影响, 表现在缓冲液中常加入甘油防止 P450 转化为 P420^[7], 底物仅保证足量而未研究其剂量、时间效应。本文测定针对细胞体系, 细胞中 P450 具有稳定性, 且甘油对细胞损伤大, 不利于给底物跨膜入胞提供稳定的环境, 在缓冲液中无需加入甘油。此外, 红霉素作为 CYP3A 的特异性底物, 可与 CYP3A 形成代谢物-CYP3A-二价铁的化合物, 从而使 CYP3A 失活^[11], 特别是细胞被诱导后抑制作用更为明显^[12], 故底物浓度不宜过大, 作用时间不宜过长, 防止底物对酶产生抑制作用和加速细胞老化, 另外 Log-Normal 模型除能较好的拟合药酶诱导前升后降的药效曲线外, 同样可用于拟合底物对酶活的影响。由于不同类型细胞及批间细胞酶活存在差异^[13], 底物进入细胞需要充足的时间, 因此底物作用浓度、时间应选择无显著抑制的较高值, 保证酶促反应充分, 使方法同样适用于活性高的细胞。研究鱼类细胞色素 P450 特别是 CYP3A 的活性及其诱导抑制是了解渔药代谢情况及药物间相互作用的基础, 鉴于 P450 酶存在显著的种属差异, 利用鱼类作为研究对象才能更准确地研究鱼类 CYP3A, 本文借助体外培养鱼类细胞系进行研究具有很多的优点, 包括可获得大量性状稳定均一样本、排除环境干扰、贴壁易

于加药、真实反映体内代谢情况等。国外一般使用虹鳟细胞系(RTG-2等)及食蚊鱼肝癌细胞系(PLHC-1)建模进行P450酶的相关研究^[14],而在我国草鱼是淡水养殖的重要品种,我们之前研究发现其肝细胞系(GCL)、肾细胞系(CIK)及卵巢细胞系(CO)均具有一定的P450诱导潜力,其中又以GCL最强,且40 $\mu\text{mol/L}$ 利福平对其CYP3A诱导效果明显。我们选择经诱导的GCL建立了鱼类CYP3A活性体外检测方法,能真实地反映渔药胞内代谢情况,适用于大样本测定,可以很好地应用于鱼类药物代谢酶体外诱导模型的研究。

参考文献:

- [1] Margaret O J, Zhen L, Laura R F, *et al.* Properties and regional expression of a CYP3A-like protein in channel catfish intestine[J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 72:361 - 371.
- [2] Tang J, Yang X L, Zheng Z L, *et al.* Pharmacokinetics and its active metabolite of enrofloxacin in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Aquaculture*, 2006, 260:69 - 76.
- [3] 张渝娟, 金钰珠. 大鼠肝微粒体细胞色素 P450 3A 参与吡嗪酮 A 环羟化代谢[J]. *药学学报*, 1997, 32(1):5 - 10.
- [4] Lee S J, Wang-Buhler J L, Cok I, *et al.* Cloning, sequencing, and tissue expression of CYP3A27, a new member of the CYP3A subfamily from embryonic and adult rainbow trout livers[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1998, 360(1):53 - 61.
- [5] Kullman S W, Hamm J T, Hinton D E. Identification and characterization of a cDNA encoding cytochrome P450 3A from the fresh water teleost medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 380:29 - 38.
- [6] Vaccaro E, Giorgi M, Longo V, *et al.* Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 62:27 - 33.
- [7] 徐淑云, 卞如濂, 陈 修. 药理试验方法学(第3版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:511 - 561.
- [8] Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with folin-phenol reagent[J]. *Biochemistry*, 1951, 193:265 - 275.
- [9] Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction[J]. *Biochemistry*, 1953, 55:416 - 426.
- [10] 朱学慧, 娄建石. 细胞色素 P450 3A 选择性探针药物的评价[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(4):365 - 369.
- [11] 王军升, 许振华, 周宏颢. 细胞色素 P450 3A4 与药物氧化代谢[J]. *中国临床药理学杂志*, 1996, 12(4):231 - 235.
- [12] 刘 萍, 迈 强. 细胞色素 P450 酶系对药物生化转化的作用[J]. *国外医药(成生化制剂分册)*, 2000, 21(50):303.
- [13] Roymansa D, Looveren C V, Leone A, *et al.* Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 67:427 - 437.
- [14] Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P450 1A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples[J]. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15:477 - 488.