

乙醇对 CHSE-1 细胞中细胞色素 P450 2E1 的诱导研究

张宁¹, 杨先乐^{1,2}, 王翔凌¹, 林茂³, 喻文娟¹, 张书俊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; 3. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:以乙醇为细胞色素 P450 2E1 的诱导剂, 在 CHSE-1 细胞中研究了该诱导剂与酶活性之间的时间效应关系和剂量效应关系。细胞传代后培养 48 h, 加入含有不同浓度乙醇的新鲜培养基, 孵育诱导 24 h, 之后加入底物苯胺反应 30 min。以苯胺的代谢产物 4-氨基酚的生成量来反映 CYP2E1 活性。苯胺浓度为 10~16 mmol/L 时 CYP2E1 活性最大, 可达 $(0.152 \pm 0.095) \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 该浓度范围的苯胺适合用于指示 CYP2E1 的活性。以 Gentox 模型对诱导的剂量效应进行拟合, 得到一个先升高后降低的曲线, 说明乙醇对 CHSE-1 细胞中 CYP2E1 有先诱导后抑制作用。拟合方程 $F(x) = (p_0 + kx) / (1 + (x/EC_{50})^{nH})$ 参数 p_0 为 0.140, nH 为 2.456, k 为 0.024, EC_{50} 为 34.938。CYP2E1 酶活性随着诱导时间的增加逐渐增强, 24 h 内酶活性随时间的增加而增强, 可达 $(0.446 \pm 0.092) \text{ nmol} / (\text{min} \cdot \text{mg})$, 呈典型的酶诱导现象, 建立了乙醇对 CHSE-1 中 CYP2E1 的诱导模型。[中国水产科学, 2007, 14 (5): 856-859]

关键词:细胞色素 P450 2E1; CHSE-1 细胞系; 乙醇; 诱导

中图分类号: S94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2007)05-0856-04

细胞色素 P450 2E1 (Cytochrome P450 2E1, CYP2E1) 属于药物代谢酶 P450 家族, 其代谢的药物占 P450 代谢的药物总量的 7%^[1], 参与多种外来化学物的代谢活化, 包括大量的强亲电子物和前致癌物, 至少有 70 多种有机化合物 (如乙醇、酮、二烷基亚硝胺、卤族溶剂等) 在体内被 CYP2E1 代谢转化为有毒物质^[2-4]。1998 年 Wall 等以氯喹沙宗为底物, 首次报道硬骨鱼 winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) 肝脏中有 CYP 2E1 代谢活性酶, 并发现 CYP 2E1 将前毒物代谢转化为毒物, 造成肝损伤, 鱼类的这种肝损伤与哺乳动物极为相似^[5], 开创了以鱼肝脏中 P450 酶系的诱导作为评价环境污染状况的生物学反应的局。这种生物学反应的实验材料包括鱼肝微粒体和细胞系。细胞系相比较肝微粒体, 可不用加入 NADPH 辅酶系统, 反应在整个细胞水平实现, 可以更加准确地反映外源化合物的代谢、毒理和一般药理学特征^[6-9]。而且细胞培养模型易控制外源化合物跟与细胞的接触浓度和接触时间, 故成为药理毒理检测中的理想实验材料。但是细胞系在体外的培养过程中, 细胞本身

的酶活性会逐渐降低甚至消失, 契诺克鲑鱼胚胎细胞系 CHSE-1 (*Chinook Salinon embryo*) 细胞形态呈上皮状, 生长周期短, 一般 1~2 d 长满单层, 适合做毒理和药理方面检测用材料, 但是在长期的传代培养中, 细胞中蛋白酶活性会逐渐降低甚至消失, 而酶的活性高低决定了外源性化合物在细胞内代谢为有毒物质的速度, 与毒物对机体的最终毒性大小呈正相关^[10]。以诱导剂诱导增加鱼类传代细胞中 CYP2E1 活性的研究国内外尚未见报道。本实验以苯胺为特异性底物, 以苯胺羟化酶 (Aniline hydroxylase, ANH) 活性作为 CYP2E1 的活性指标, 以乙醇为 CYP2E1 诱导剂, 诱导增加 CHSE-1 细胞中 CYP2E1 活性, 并以 Gentox 模型对诱导的剂量效应进行拟合, 建立乙醇对 CYP2E1 酶的诱导模型, 为研究环境污染物和毒素对水生生物的作用提供良好的技术平台。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

契诺克鲑鱼胚胎细胞系 CHSE-1 (*Chinook*

收稿日期: 2007-01-05; 修订日期: 2007-04-22.

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: 张宁 (1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物药理学. Tel: 021-65710870; E-mail: nzhang@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者: 杨先乐. Tel: 021-65710870; E-mail: xlyang@shfu.edu.cn

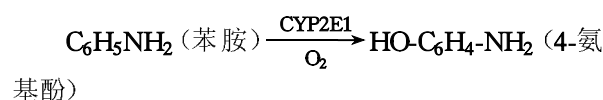
salinon embryo)由农业部渔业动植物病原库提供,细胞编号为 BYK-C16-01。4-氨基酚为 Panya Chemical 公司产品,DMEM 无酚红培养基为 HyClone 公司产品,胎牛血清购自四季青生物公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养及 CYP2E1 酶的诱导

CHSE-1 细胞以 DMEM 培养基加 10% 胎牛血清培养,细胞传代后培养至对数生长期,分别换入含有不同浓度乙醇 (0、4、40、50、100、150、200 mmol/L) 的新鲜培养液,每个浓度设 5 个平行样,于 28 °C CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,加入底物苯胺孵育 30 min。

1.3 CYP2E1 酶活性的测定及模型拟合

以苯胺为底物,以测定苯胺羟化酶 (Aniline hydroxylase, ANH) 活性作为 CYP2E1 的活性指标^[11]。反应原理如下:



生成的 4-氨基酚代谢物可转变为一种酚-吡啶复合物,于 630 nm 处有最大吸收峰,4-氨基酚的测定依照 Schenkmen 法^[12]进行,蛋白含量按 Lowry 法^[13]进行。CYP2E1 活性以每 mg 蛋白 1 min 内的 4-氨基酚生成量 (nmol) 表示。

根据 Excel Macro REGTOX_EV7.0 中的 Gentox 模型对 ANH 诱导剂的剂量效应曲线进行拟合,以峰为界可将此曲线分为上升和下降两个阶段。方程式如下:

$$F(x) = \frac{p_0 + kx}{1 + \left(\frac{x}{\text{EC}_{50}}\right)^n}$$

式中 $F(x)$ 表示当诱导剂浓度为 x 时的 ANH 活性, p_0 表示无诱导剂对照组的 ANH 活性, k 表示上升阶段 ANH 活性线性增加的斜率, nH 表示 Hill 常数, EC_{50} 表示概率函数 $f(x) = \text{EC}_{50}^{nH} / (x^{nH} + \text{EC}_{50}^{nH})$ 等于 0.5 时的诱导剂浓度,即诱导剂产生 50% 最大效应时的诱导剂浓度^[14]。

1.4 数据处理

通过 SPSS 13.0 软件进行显著性分析,采用 oneway ANOVA (单因素方差分析) 中的 Duncan's 检验进行多重比较。数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{X} \pm \text{SD}$) 表示。样本组以英文字母进行标记,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 结果与分析

2.1 CHSE-1 细胞中 CYP2E1 活性与底物浓度的关系

CYP2E1 与底物苯胺浓度的关系如图 1 所示。由图 1 可知,苯胺浓度在 2.5~16 mmol/L 时,产物 4-氨基酚的生成量回归方程为 $Y = 0.0092X + 0.018$ ($R^2 = 0.91$),产物量呈线性增加,说明 CYP2E1 活性随苯胺浓度的升高而升高。苯胺浓度在 10~16 mmol/L 时,CYP2E1 活性最大,可达到 0.152 nmol/(min·mg),是苯胺浓度为 2.5 mmol/L 时的 6.57 倍。该浓度范围的苯胺适合用于指示 CYP2E1 的活性。

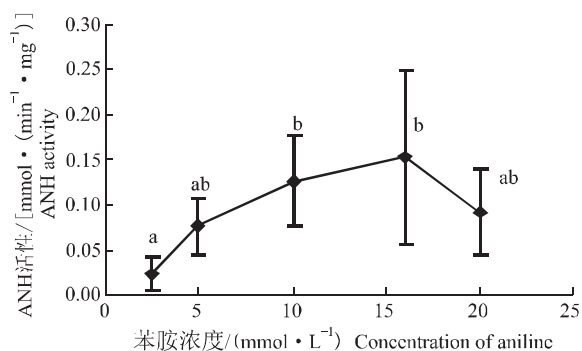


图 1 不同苯胺浓度下苯胺羟化酶 (ANH) 活性 ($n = 5$)

Fig.1 Aniline hydroxylase activity (ANH) at different aniline concentration ($n = 5$)

2.2 乙醇诱导的剂量效应

CHSE-1 细胞以不同浓度乙醇诱导 24 h 后分别检测 ANH 酶活性,以 Gentox 模型对诱导的剂量效应关系进行拟合,拟合模型曲线如图 2 所示,拟合参数 p_0 为 0.140, nH 为 2.456, k 为 0.024, EC_{50} 为 34.936。乙醇可以在较低浓度下对 CHSE-1 细胞中的 CYP2E1 产生诱导作用,这种作用随着诱导剂浓度的增加而增强,达到峰值后随着乙醇浓度的增加逐渐减弱至零。

2.3 乙醇诱导的时间效应

分别选取乙醇浓度为 4 mmol/L 和 40 mmol/L 的细胞样品,在 24 h 内连续检测诱导后活性,研究乙醇的诱导结果与诱导时间的关系。

由图 3 可见,即便是较低的乙醇浓度 (4 mmol/L),在前 6 h,苯胺羟化酶活性也没有显著变化,说明低浓度的乙醇对 CHSE-1 细胞的诱导需要一定时

间才能发生。40 mmol/L 乙醇的诱导也是在 4 h 后才会使苯胺羟化酶活性明显增加。0~24 h 时间内, 4 mmol/L 乙醇诱导的回归方程 $Y = 0.014X + 0.1521$ ($R^2 = 0.816$), 40 mmol/L 乙醇诱导的回归 $Y = 0.007X + 0.1521$ ($R^2 = 0.981$), 说明在 24 h 内随着诱导的持续, 酶的活性持续增加, 呈典型的酶诱导现象。

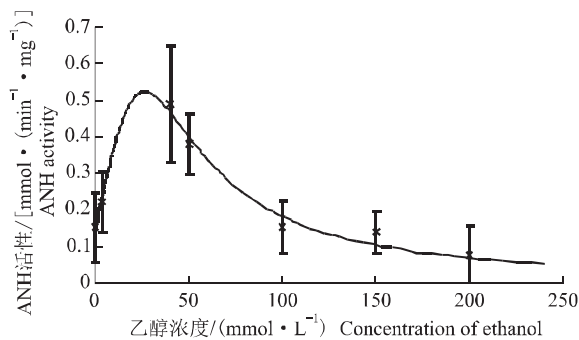


图2 不同乙醇浓度诱导的 CHSE-1 细胞苯胺羟化酶活性水平 ($n = 5$)

Fig.2 Induction of ANH in CHSE-1 following incubation with ethanol of different concentration ($n = 5$)

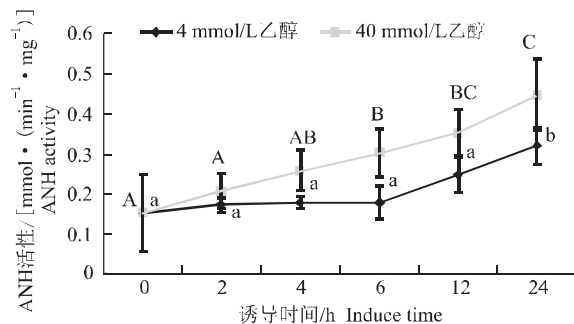


图3 4 mmol/L 和 40 mmol/L 乙醇诱导 24 h 内 CHSE-1 细胞的 ANH 活性 ($n = 5$)

Fig.3 ANH activity in CHSE-1 cell following incubation with 4 mmol/L and 40 mmol/L ethanol within 24 h ($n = 5$)

3 讨论

将细胞体系应用于药物代谢酶的诱导研究, 可以排除体内因素干扰, 直接观察诱导剂对酶的调节以及酶对底物的选择代谢性, 为整体试验提供可靠的理论依据^[15]。本实验以契诺克鲑鱼胚胎细胞为研究对象, 探讨了乙醇对细胞体系中对 CYP2E1 的影响, 确定了乙醇对 CHSE-1 细胞的可诱导性, 确定

了底物剂量、诱导时间以及诱导剂剂量效应参数, 建立了乙醇对 CHSE-1 细胞中 CYP2E1 的诱导模型。

以特异性底物代谢反应研究 CYP2E1 活性时, 合适的底物浓度很重要^[16]。本研究发现在 CHSE-1 细胞反应体系中, 苯胺终浓度在 2.5~16 mmol/L 时苯胺的羟化代谢有较好的线性 ($R^2 = 0.91$), 随着苯胺浓度的增大 CYP2E1 活性增强, 苯胺浓度超过 16 mmol/L 时, CYP2E1 的活性有下降趋势, 本实验以 10~16 mmol/L 的苯胺浓度作为底物浓度。

本研究发现, 乙醇要与细胞共孵一段时间后会诱导 CYP2E1 活性。不管是较低剂量还是较高诱导剂量, 在与乙醇共孵 2 h 后都没有改变苯胺羟化酶的活性, 4 mmol/L 的乙醇在与细胞共孵 6 h 后都没有影响苯胺羟化酶活性。在 24 h 内 4 mmol/L 和 40 mmol/L 的乙醇对 CHSE-1 细胞中 CYP2E1 的诱导与时间相关系数分别为 0.816 和 0.980, 呈典型的酶诱导现象, 说明 CHSE-1 细胞可作为理想的体外模型来研究乙醇的诱导作用。乙醇对 CHSE-1 细胞中 CYP2E1 的影响表现为复合效应, 即低剂量的诱导作用和高剂量的抑制作用。与氯乙烯对大鼠染毒研究中大鼠肝微粒体 CYP2E1 活力增加现象相似^[17], 都是低剂量组诱导剂会随着时间的增加 CYP2E1 活性明显增强, 而中高剂量组 CYP2E1 活性有一个先升高后降低的过程, 表明长期接触较高剂量的诱导剂不会一直引起该酶的诱导而表现为消耗和抑制。

CYP2E1 在体内主要负责小分子量外源性药物或毒物的代谢^[18], 其介导的反应既有利于机体健康的一方面, 如加快二氯甲烷在体内的代谢消除, 减少二氯甲烷对机体的毒性。也有对机体有害的一方面, 如转化一些前毒物或前致癌物为毒物和致癌物^[19]。本研究在 CHSE-1 中研究乙醇对 CYP2E1 的诱导效应, 并以 Gentox 模型对乙醇诱导的剂量效应进行拟合, 建立乙醇诱导的模型参数。得到的参数 p_0 可预测无诱导剂存在时的基础酶活, k 值反映了诱导剂与酶之间的反应性, EC_{50} 是诱导剂产生 50% 最大效应时的诱导剂浓度。这些参数对评价诱导剂的效应有重要的意义, 也为以鱼类体外细胞评价环境污染物和毒素对水生生物的影响提供新的思路。

参考文献:

- [1] 伍忠奎, 谢红光, 周宏灏, 等. 细胞色素 P450 2E1 的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 1997, 13 (1): 57-62.

- [2] Coon M J, Ding X, Pemecky S J, et al. Cytochrome P450: Progress and prediction [J]. *FASEB J*, 1992, 6: 669 – 673.
- [3] Gonzalez F J. Human Cytochrome P450: Problems and prospect [J]. *Trends Bio Sci*, 1992, 13: 346 – 352.
- [4] Guengerich P. Reactions and significance of Cytochrome P450 enzymes [J]. *J Biochem*, 1991, 266: 10 019 – 10 022.
- [5] Wall K L, Crivello J. Chlorzoxazone metabolism by winter flounder liver microsomes: evidence for existence of a CYP2E1-like isoform in teleosts [J]. *Toxicol and Appl Pharmacol*. 1998, 151: 98 – 104.
- [6] Sirpa E H, Mark E H, Pirjo L S. A fish hepatoma cell line (PLHC-1) as a tool to study cytotoxicity and cyp1a induction properties of cellulose and wood chip extract [J]. *Chemosphere*, 1998, 36 (14): 2 921 – 2 932.
- [7] Courtney S, Sandra L T, Benita L M, et al. WIF-B cells as a model for alcohol-induced hepatocyte injury [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67: 2 167 – 2 174.
- [8] Babin M M, Tarazona J V. In vitro toxicity of selected pesticides on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines [J]. *Environ Poll*, 2005, 135: 267 – 274.
- [9] Daniel C, Claudia E, Karl F. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines [J]. *Aqua Toxicol*, 2006, 79: 114 – 123.
- [10] 王爱红, 夏昭林. 细胞色素 P450 2E1 活性的测定方法 [J]. *中国工业医学杂志*, 2003, 16 (6): 354 – 356.
- [11] 刘苏艳, 刘毓谷, 邱信芳, 等. 诱导物对大鼠细胞色素 P450 2E1 基因表达和活化的影响 [J]. *J Fudan Univ: Natural Science*, 1991, 30 (2): 178 – 186.
- [12] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学: 第3版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 513 – 519.
- [13] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *Biol Chem*, 1951, 193 (1): 265 – 75.
- [14] Vindimian E, Robaut C, Fillion G. A method for cooperative and noncooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer [J]. *Appl Biochem*, 1983, 5: 261 – 268.
- [15] 李文东, 马辰. 药物体外肝代谢研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2003, 38 (10): 737 – 740.
- [16] Koop D R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1 [J]. *FASEB J*, 1992, 6: 724 – 730.
- [17] 王爱红, 朱守民, 周元陵, 等. 氯乙烯染毒对大鼠肝细胞色素 P450 2E1 活力和 mRNA 表达的影响 [J]. *工业卫生与职业病*, 2005, 31 (3): 146 – 148.
- [18] Omiecinski C J, Remmel R P, Hosagrahara V P. Concise review of cytochrome P450s and their roles in toxicology [J]. *Toxicol Sci*, 1999, 48 (2): 151 – 156.
- [19] Dorothee M R, Thomas L, Donna B S. Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture [J]. *Arch Toxicol*, 2001, 75: 335 – 345.

Induced effect of ethanol on cytochrome P450 2E1 in CHSE-1 cell line

ZHANG Ning¹, YANG Xian-le^{1,2}, WANG Xiang-ling¹, LIN Mao³, YU Wen-juan¹, ZHANG Shu-jun¹

(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; 3. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The dose- and time-dependent induction of P450 2E1 by ethanol in CHSE-1 cell was investigated in the present study. 48 h after inoculation, cells were induced with ethanol of different concentrations for 24 h, and then aniline was added. The cells were incubated at 28 °C for 30 min. CYP2E1 activity was measured using the product 4-aminophenol as an index. The optimal concentration of aniline was 10 – 16 mmol/L, and basal activity of cells grew into confluence for aniline hydroxylase was (0.152 ± 0.095) nmol·min⁻¹·mg⁻¹. The dose-dependent effect was fitted by Gentox module, which generated a curve that at first rose and then fell down, indicating that it was firstly induced and inhibited afterward by ethanol. The values of p_0 , nH, k and EC₅₀ were 0.140, 2.458, 0.025 and 34.938 respectively. It was also demonstrated that the activity of CYP2E1 induced by ethanol increased with time with the highest value up to (0.446 ± 0.092) nmol·min⁻¹·mg⁻¹ after 24 h, which was a typical enzyme induction example. Through this study, the model of CYP2E1 induction by ethanol in CHSE-1 was established. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 856 – 859]

Key words: cytochrome P450 2E1; CHSE-1 cell line; ethanol; induction

Corresponding author: YANG Xian-le. E-mail: xlyang@shfu.edu.cn