

# 乙醇对鲫鱼 CYP2E1 活性的影响

陈大健,杨海峰,覃少华,张玲玲,江善祥

(南京农业大学 动物医学院,江苏 南京 210095)

**[摘要]** 为了研究乙醇对鲫鱼细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)活性的影响,用药动学方法,以氯唑沙宗为底物探针,将 130 尾鲫鱼随机分为试验组和对照组 2 组,试验组鲫鱼每日经口灌服乙醇 1 g/kg,对照组灌服相同剂量的生理盐水,连续 5 d 后,第 6 天 2 组鲫鱼同时一次性腹腔注射氯唑沙宗 10 mg/kg,于注射后不同时间采血,用高效液相色谱法测定氯唑沙宗在鲫鱼体内不同时间点的血药浓度,并计算药动学参数。结果表明,氯唑沙宗在两组鲫鱼体内的药时数据均符合二室模型;与对照组相比,乙醇处理组氯唑沙宗的半衰期增加了 0.9 倍( $P < 0.01$ ),药时曲线下面积增加了 0.8 倍( $P < 0.01$ ),总清除率减少了 51.2 %( $P < 0.01$ )。提示乙醇对鲫鱼 CYP2E1 的活性具有显著的抑制作用。

**[关键词]** 鲫鱼;细胞色素 P450 2E1;乙醇;氯唑沙宗;药动学

**[中图分类号]** S965.117;S948

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)08-0082-05

## Effect of ethanol on activity of cytochrome P450 2E1 in *Carassius auratus*

CHEN Da-jian, YANG Hai-feng, QIN Shao-hua, ZHANG Ling-ling, JIANG Shan-xiang

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, 210095, China)

**Abstract:** The effect of ethanol (EtOH) on the activity of cytochrome P450 2E1 in *Carassius auratus* was investigated by pharmacokinetics with chlorzoxazone (CZX) as a specific substrate. 130 fish were equally divided into two groups: EtOH-treated group and the control group. EtOH was administered orally to fish at the dose of 1 g/(kg · d) for 5 consecutive days. Fish in control group received an equal volume of normal saline only. On the 6th day, two groups of fish were given an intraperitoneal injection with 10 mg/kg CZX. The plasma concentrations of CZX were determined by HPLC, and the pharmacokinetic parameters were calculated. The results showed that the concentration-time data of CZX in two groups both fitted two compartment models. Compared with the saline-treated control group, elimination half life was increased by 0.9 fold ( $P < 0.01$ ), area under the curve was increased by 0.8 fold ( $P < 0.01$ ), and total clearance was shortened by 51.2 % ( $P < 0.01$ ) in the EtOH-treated group. The results indicated that the activity of CYP2E1 could be obviously inhibited by EtOH.

**Key words:** *Carassius auratus*; cytochrome P450 2E1; ethanol; chlorzoxazone; pharmacokinetics

细胞色素 P450(Cytochrome P450, CYP450)是一组结构和功能相关的超家族基因编码的同工酶,既可参与类固醇激素、维生素、脂肪酸衍生物等内源

性物质的合成与降解,又可参与外来化合物如环境污染、药物和致癌物的代谢<sup>[1]</sup>。CYP450 单加氧酶系在解毒外源性化合物及维持鱼类自身种族稳定

†收稿日期] 2006-05-29

[基金项目] 江苏省“十五”科技攻关项目(J H02-085)

[作者简介] 陈大健(1981-),男,江苏滨海人,在读硕士,主要从事兽医药理与毒理研究。

[通讯作者] 江善祥(1966-),男,安徽潜山人,教授,博士生导师,主要从事新兽药开发研究。

性等方面的重要性已为大家所认识,20多种鱼的CYP450基因也已经被鉴别<sup>[2]</sup>。CYP2E1是CYP450中的重要成分,是鱼体内许多低分子有机化合物及药物的主要代谢酶。CYP2E1由于能够活化包括一些毒物和致癌物在内的许多潜在的有害化合物而倍受关注<sup>[3]</sup>。氯唑沙宗(Chlorzoxazone, CZX)是测定CYP2E1活性的特异性敏感底物,其经肝微粒体代谢可生成惟一可检测到的代谢产物6-羟基氯唑沙宗<sup>[4]</sup>。乙醇是哺乳动物CYP2E1的经典诱导剂,但乙醇对鱼类CYP2E1是否有诱导作用,迄今尚未见有关报道。本研究以最具代表性的水产动物鲫鱼为研究对象,采用体内探针药物动力学方法,研究了乙醇对鱼类CYP2E1活性的影响,以期鱼类CYP450的相关研究提供技术参考和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 130尾雌性健康鲫鱼(*Carassius auratus*),平均质量( $151.5 \pm 23.4$ )g,平均体长( $16.24 \pm 0.81$ )cm,购自江苏省淡水水产研究所,室内养殖于60cm×50cm×40cm的塑料水箱内,水源为充分曝气后的自来水,pH( $7.2 \pm 0.1$ ),空气增氧机连续供氧,溶解氧(D.O)为7.5~8.5mg/L,可调控温度装置控制水温在( $22 \pm 2$ )℃,每个水箱放养5尾,每天换水3次。试验前驯养2周,每日投喂不含抗生素的鲫鱼配合饲料,试验前1d停止喂食。为防止饲料对试验结果的影响,试验期间也停止投喂。

1.1.2 药品、试剂及仪器 CZX标准品,Sigma公司产品,批号043K9020,纯度99.5%;CZX原粉,江苏神龙药业有限公司生产,批号050708,纯度≥98%;乙醇,分析纯,含量≥99.7%,南京化学试剂有限公司生产,批号050610607;甲醇,德国Merck公司产品,色谱级;乙腈,Sigma-Alorich公司产品,色谱级;超纯水,用Millipore公司的Milli-Q Biocel超纯水系统制备,电阻值18.2MΩ。

高效液相色谱仪,Waters公司生产;台式高速冷冻离心机,Beckman公司生产;微型涡旋混合仪,上海沪西分析仪器厂生产;电子分析天平,北京赛多利斯天平有限公司生产。

### 1.2 给药与采血

将130尾试验鱼随机分为对照组和乙醇处理组2组,每组65尾。乙醇处理组按1g/kg剂量将250

g/L的乙醇溶液灌入鲫鱼前肠,每日1次,连续5d;对照组鲫鱼给予等量生理盐水。第6天按10mg/kg剂量给试验组和对照组鲫鱼腹腔注射探针药物CZX<sup>[5]</sup>,每组随机取5尾鱼,分别于注射给药后0.083,0.167,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,3,4,6,8,12h从尾静脉一次性无菌采血1mL,做5个平行样,分别置于预先涂有肝素钠的塑料离心管中,4℃3000r/min离心5min,分离出血浆,于-20℃冰箱中保存待测。

### 1.3 CZX血药浓度的测定

1.3.1 鲫鱼血浆样品的处理 将冷冻保存的血浆自然解冻,摇匀后吸取200μL置于尖底具塞离心管中,加入400μL乙腈,在漩涡混合器上充分混合,12000r/min离心10min,取上清液备检。

1.3.2 鲫鱼血浆样品的HPLC分析<sup>[6-7]</sup> 吸取20μL上清液进行HPLC分析,色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>柱(250mm×4.6mm,5μm),柱温30℃,流动相为V(甲醇):V(水)=65:35,流速为0.8mL/min,检测波长为282nm。

1.3.3 分析方法的确证 取7份空白鲫鱼血浆,每份250μL,置7个尖底具塞离心管中,分别加入不同浓度CZX标准液250μL,制成含CZX0.1,0.25,0.5,1,5,10,20μg/mL的血浆,按样品处理方法处理后进样,每样品重复测定5次,以CZX的峰面积(Y)对其血浆浓度(X)进行线性回归,求出回归方程和相关系数。另取空白血浆3份,加入标准液,制成含药物浓度为0.5,5.0,20μg/mL的血样,按上述方法处理后作HPLC测定,每浓度分别于日内、日间各测5次,计算日内变异和日间变异。

1.3.4 CZX血药浓度的计算 所得血药浓度-时间数据采用3P97实用药代动力学程序处理,对照组与试验组的主要药动学参数用t检验进行比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲫鱼血浆的HPLC分析

鲫鱼血浆CZX血药浓度的HPLC分析结果如图1所示。由图1可见,在设定的色谱条件下,峰形较好,基线走动平稳,CZX的保留时间在7.8min左右,对照品与血浆中的杂质分离良好,无干扰峰出现。

### 2.2 方法学考察结果

回归结果显示,CZX的鲫鱼血浆标准曲线方程为 $Y = 18\,955X - 53.213$ ,相关系数 $r = 0.9997$ 。分析结果表明,其线性为0.1~20μg/mL,最低检测限为0.1μg/mL。高、中、低3个浓度的回收率均大于

95 %,日内、日间变异系数均小于 6 %,符合生物样品分析的方法学要求。

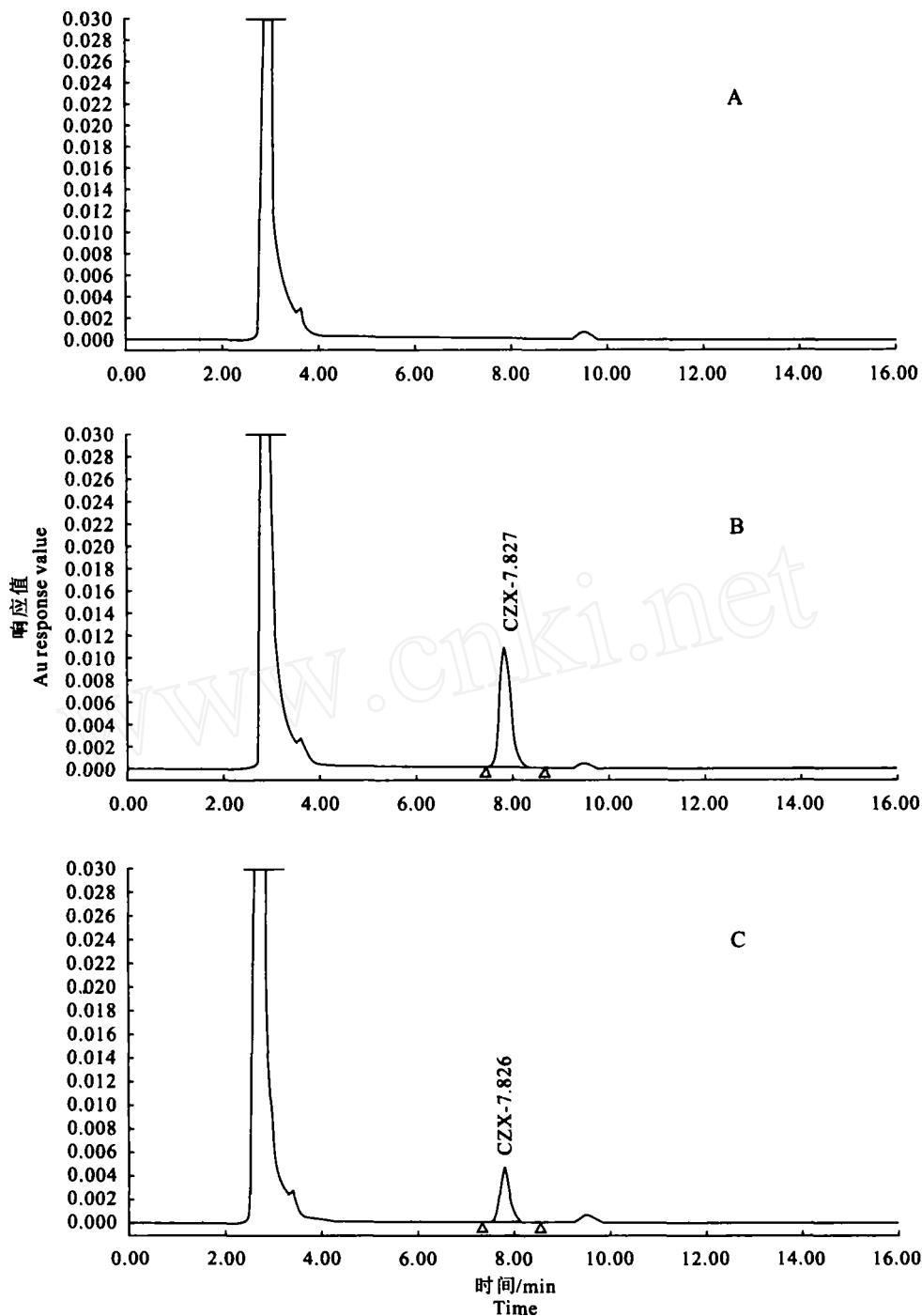


图 1 鲫鱼血漿的 HPLC 分析图谱

A. 空白血漿;B. 加入 CZX 的标准血漿;C. 体内注射 CZX 后的样品血漿

Fig. 1 Representative HPLC chromatograms of fish plasma

A. Blank plasma;B. Blank plasma spiked with CZX;C. Plasma sample obtained after injection of CZX

### 2.3 乙醇对 CZX 血药浓度的影响

由图 2 可知,乙醇组各时间点 CZX 的平均血药浓度均高于对照组。

### 2.4 乙醇对 CZX 药动学参数的影响

乙醇组和对照组鲫鱼腹腔注射 CZX (10

mg/kg) 后,其最佳药物动力学模型均为一级吸收二室模型,与在大鼠上的有关报道<sup>[8]</sup>一致。主要药物动力学参数分析结果(表 1)表明,与对照组相比,乙醇组 CZX 的半衰期 ( $t_{1/2\beta}$ ) 增加了 0.9 倍 ( $P < 0.01$ );药时曲线下面积(AUC)增加了 0.8 倍 ( $P <$

0.01);总清除率(CL)减少了 51.2 % (  $P < 0.01$  )。

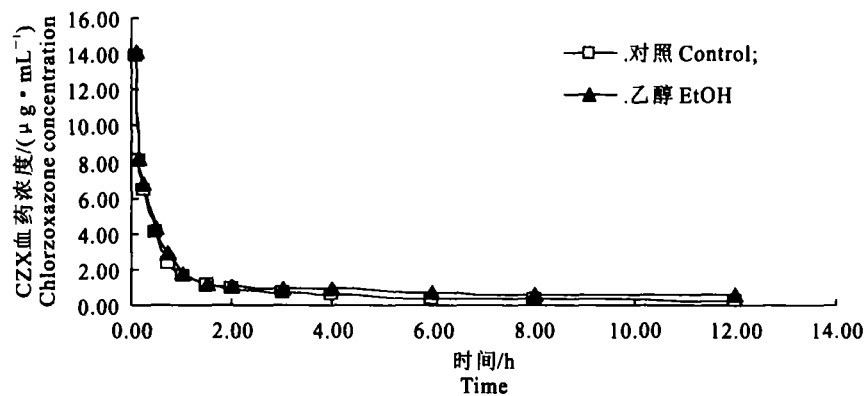


图 2 乙醇对鲫鱼单次腹腔注射 CZX 后血药浓度的影响 (  $n = 5$  )

Fig. 2 Effect of ethanol on plasma concentration-time curve in *Carassius auratus* after single *i. p.* administration of CZX at 10 mg/ kg (  $n = 5$  )

表 1 乙醇对鲫鱼体内 CZX 主要药动学参数的影响

Table 1 Effect of ethanol on pharmacokinetic parameters of CZX after single *i. p.* administration at 10 mg/ kg in *Carassius auratus*

| 处理<br>Treatment | $t_{1/2\beta}$ / h   | AUC/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | CL/ ( $\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) |
|-----------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 对照组 Control     | 6.809 $\pm$ 0.584 A  | 14.083 $\pm$ 1.615 A                                            | 0.672 $\pm$ 0.074 A                                         |
| 乙醇组 EtOH        | 13.027 $\pm$ 1.425 B | 25.741 $\pm$ 3.203 B                                            | 0.328 $\pm$ 0.058 B                                         |

注:表中同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著 (  $P < 0.01$  )。

Note:Different capital letters in the same column indicate significant difference at 0.01 level.

3 讨 论

探针药物广泛地用于各种药物代谢和药代动力学方面的研究。药动学参数的变化可间接反映肝脏对药物的体内代谢情况。某种药物对药酶的诱导和抑制效应,可通过特异性的探针药物药动学参数的变化来评价。CZX 是目前惟一的对生物体无损害的 CYP2E1 体内探针药物,约 90 %在肝脏经 6-羟化代谢生成 6-氯唑沙宗,该代谢途径主要由 CYP2E1 催化,故其在体内的代谢情况可以反应 CYP2E1 的活性。目前,已确定的 CYP2E1 的底物多达 70 余种,其中大部分为前致癌物 (Procarcinogen) 和前毒物 (Protoxin),包括芳香族化合物、醚类、亚硝胺和偶氮化合物、醇、酮和腈类及卤烷、烯类和烷类等。这些物质实为工业和家庭常用的化学溶剂和环境污染物,其共同特点是分子量低、极性较大、本身并无毒性或致癌作用,但在体内经 CYP2E1 作用后,可氧化代谢生成毒物或致癌物,严重危害人体健康。CYP2E1 也因此而成为近年来肿瘤学和毒理学领域研究的热点。迄今为止,国外已有数篇文献[9-10]报道了鱼类肝脏具有 CYP2E1 酶活性。经 CYP2E1 代谢的小分子化合物极易通过各种途径污染水域,

因此可以预见,CYP2E1 必将成为继 CYP1A1 之后水生毒理学领域研究的又一热点。鱼类 CYP2E1 的深入研究,将对鱼类肿瘤性疾病发病机理的探索和防治以及渔药的合理使用产生积极的影响。在哺乳动物方面,CYP2E1 活性已被用于指示外源性化合物引起的肝脏疾病<sup>[11]</sup>。鱼类存在的这种酶活性,对生活于污染水域中鱼的肝脏畸形的产生具有重要意义<sup>[12]</sup>。然而,目前国内尚未见有关鱼类 CYP2E1 研究的报道,国外相关研究亦十分有限,本试验属该方面的基础研究。

从本试验的结果可以看出,CZX 在鲫鱼体内吸收非常迅速,本试验最早一个采血点是给药后 5 min,但并没有观察到明显的吸收相。CZX 于相同条件下在美洲拟鲈 ( *Pseudopleuronectes americanus* ) 肝微粒体测得的代谢速率较哺乳动物低,分别为 65~148 和 400~800 pmol/ ( min · mg )<sup>[13]</sup>。本试验对照组鱼 CZX 的半衰期为 6.809 h,而文献[5]报道,在类似条件下 CZX 在大鼠体内的半衰期为 89.2 min,这种半衰期的差异与上述 CZX 在鱼类及哺乳动物肝微粒体的体外代谢速率的差异是一致的,均表明 CYP2E1 在鱼类的基础水平较低。目前,CZX 作为 CYP2E1 活性的药物探针主要通过观

察  $t_{1/2\beta}$ 、CL 和 AUC 等指标来实现,其中药物的消除半衰期( $t_{1/2\beta}$ )是决定药物消除速度与程度的重要指标,也是最主要的评价指标。乙醇是哺乳动物经典的体内 CYP2E1 诱导剂,而从本试验结果可以看出,和对照组相比,乙醇处理组可以使 CXZ 血药浓度明显升高,药时曲线下面积增加,清除率降低, $t_{1/2\beta}$ 延长(乙醇组为 13.03 h,约为对照组的 1.9 倍)( $P < 0.01$ ),表明乙醇对鲫鱼 CYP2E1 有一定的抑制作用。鱼类的 CYP2 同功酶可被哺乳动物的 CYP2E 和 CYP2B 抗体识别,但不出现哺乳动物上观察到的苯巴比妥和乙醇型诱导剂对 CYP450 的诱导作用<sup>[14-16]</sup>。Schlenk 等<sup>[17-18]</sup>的研究显示,按 1 mL/kg 剂量给斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)腹腔注射乙醇后,肝 Western 印迹中抗 CYP2K1 的 CYP2 样条带均减少;肝脏 CYP450 CATL1 和 CATL2(属于 CYP2 基因家族)表达分别减少了 31%和 41%。随后,他们又发现将斑鲷分别暴露于含体积分数 0.5%和 1.0%乙醇的静水中 24 h,低分子量(47 000 u)的 CYP2 相关条带呈剂量依赖性减少,和哺乳动物 CYP2E1 对乙醇的反应相比,给予 EtOH 后 47 000 u 条带也有表达,但呈下调趋势<sup>[19]</sup>。这与本试验乙醇对鲫鱼 CYP2E1 活性有抑制作用的结果相符,说明乙醇对鱼类 CYP2E1 没有诱导作用,相反却有一定的抑制作用,其具体作用机制还有待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Honkakovski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors[J]. *Biochem J*, 2000, 347(2): 321-337.
- [2] Nelson D R, Koymans L, Kamataki T, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature[J]. *Pharmacogenetics*, 1996, 6(1): 1-42.
- [3] Powell H, Kitteringham N R, Pirmohamed M, et al. Expression of cytochrome P4502E1 in human liver: assessment by mRNA, genotype and phenotype[J]. *Pharmacogenetics*, 1998, 8(5): 411-421.
- [4] Conney A H, Burns J J. Physiological disposition and metabolic fate of chlorzoxazone (Paraflex) in man[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1960, 128(4): 340-343.
- [5] Mizuno D, Tanaka E, Tanno K, et al. Chlorzoxazone: a probe drug whose metabolism can be used to monitor toluene exposure in rats[J]. *Arch Toxicol*, 2000, 74(3): 139-144.
- [6] 何怀冰, 刘德林, 岳群英. RP-HPLC 测定人体血浆中氯唑沙宗[J]. *上海医科大学学报*, 1990, 17(4): 306-309.
- [7] 张玮芳, 郁韵秋. 血浆氯唑沙宗的反相高效液相色谱法测定[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2002, 37(5): 660-662.
- [8] 扈金萍, 闫淑莲, 唐静成, 等. Cocktail 探针药物评价姜黄对肝细胞色素 P450 酶的影响[J]. *首都医科大学学报*, 2004, 25(4): 427-430.
- [9] Crivello J F, Schultz R J. Genetic variation in the temperature dependence of liver microsomal CYP2E1 activity, within and between species of the viviparous fish *Poeciliopsis*[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1995, 14(1): 1-8.
- [10] Kaplan L A E, Fielding E, Crivello J F. The genetic regulation of liver microsomal CYP2E1 activity among strains of the viviparous fish *Poeciliopsis*[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 128(2): 143-152.
- [11] Lucas D, Menez C, Garre C, et al. Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects[J]. *Pharmacogenetics*, 1995, 5(5): 298-304.
- [12] Murchelano R A, Wolke R E. Neoplasms and nonneoplastic liver lesions in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts[J]. *Environ Health Perspect*, 1991, 90: 17-26.
- [13] Wall K L, Crivello J. Chlorzoxazone metabolism by winter flounder liver microsomes: evidence for existence of a CYP2E1-like isoform in teleosts[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1998, 151(1): 98-104.
- [14] Kaplan L A E, Schultz M E, Schultz R J, et al. Nitrosodietilamine metabolism in the viviparous fish *Poeciliopsis*: evidence for the existence of liver P450j activity and expression[J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12(4): 647-652.
- [15] Kleinow K M, Haasch M L, Williams D E, et al. A comparison of hepatic P450 induction in rat and trout (*Oncorhynchus mykiss*): delineation of the site of resistance of fish to phenobarbital-type inducers[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 1990, 96(2): 259-270.
- [16] Stegeman J J, Hahn M E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species[C]//Malins D C, Ostrander G K. *Aquatic Toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives*. Boca Raton: CRC Press, 1994: 87-206.
- [17] Schlenk D, Ronis M J, Miranda C L, et al. Channel catfish liver monooxygenases: immunological characterization of constitutive cytochromes P450 and the absence of active flavin-containing monooxygenases[J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45(1): 217-221.
- [18] Schlenk D, Ronis M J, Miranda C, et al. Effects of 2-methylsoborneol (MIB), and ethanol on the expression and activity of cytochrome P450s from the channel catfish[J]. *Journal of Fish Biology*, 1995, 46(2): 282-291.
- [19] Perkins E J, Schlenk D. Immunochemical characterization of hepatic cytochrome P450 isozymes in the channel catfish: assessment of sexual, developmental and treatment-related effects[J]. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1998, 121(1-3): 305-310.