

四环素类药物对鲤细胞色素 P450 酶系生化指标的影响

李在建,刘文强,司振书,朱明霞
(聊城大学 农学院,山东 聊城 252000)

摘要:为研究四环素类药物对鲤 P450 酶系生化指标的影响,采用超速离心法制得鲤肝微粒体,Bradford 法测定肝微粒体蛋白含量,紫外分光光度法测 CYP450 酶系的活性,测定了土霉素(OTC)、四环素(TC)、霉素(CTC)、多西环素(DOTC)4 种四环素类药物对鲤的肝微粒体蛋白含量、肝脏细胞色素 P450 含量以及酶系活性的影响。结果表明,空白对照组 CYP450 含量为(0.39±0.03) nmol/mg,OTC、TC、CTC、DOTC 处理组 CYP450 含量分别为(0.22±0.02)、(0.28±0.02)、(0.21±0.03)、(0.25±0.03) nmol/mg;空白对照组氨基比林-N-脱甲基酶(AND)活性为(1.27±0.09) nmol/(min·mg),OTC、TC、CTC、DOTC 处理组其活性分别为(0.86±0.09)、(0.79±0.05)、(0.84±0.05)、(0.86±0.06) nmol/(min·mg);空白对照组红霉素-N-脱甲基酶(ERND)活性为(0.85±0.04) nmol/(min·mg),OTC、TC、CTC、DOTC 处理组其活性分别为(0.63±0.03)、(0.57±0.02)、(0.49±0.04)、(0.52±0.02) nmol/(min·mg);空白对照组苯胺-4-羟化酶(AH)活性为(0.034±0.001) nmol/(min·mg),OTC、TC、CTC、DOTC 处理组其活性分别为(0.026±0.004)、(0.027±0.003)、(0.025±0.004)、(0.028±0.004) nmol/(min·mg)。综上,四环素类药 OTC、TC、CTC、DOTC 处理会使鲤 CYP450 含量明显降低,对 AND、ERND 活性具有明显的抑制作用,经统计学检验,差异极显著($P<0.01$);对鲤肝微粒体蛋白和 CYPb5 的含量没有影响。

关键词:四环素类药物;细胞色素 P450;肝微粒体;鲤;生化指标

中图分类号: S965.116 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2018)07-0144-05

Effects of Tetracyclines on the Biochemical Indexes of Carp CYP450s

LI Zaijian, LIU Wenqiang, SI Zhenshu, ZHU Mingxia
(College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China)

Abstract: In order to study the effect of tetracyclines on the biochemical index of the CYP450s, the carp liver microsomal protein content and the CYP450 activities were measured in this experiment. The carp liver microsomes were extracted by ultracentrifugation and their protein content was measured by Bradford method. The activities of CYP450s were measured by ultraviolet spectrophotometric method. The results showed that the CYP450 content was 0.39±0.03 nmol/mg in control group, and the 0.22±0.02, 0.28±0.02, 0.21±0.03, 0.25±0.03 nmol/mg in treatment group (OTC, TC, CTC, DOTC); the activities of AND, ERND, AH were 1.27±0.09, 0.85±0.04, 0.034±0.001 mol/(min·mg) in control group, in treatment groups the 0.86±0.09, 0.79±0.05, 0.84±0.05, 0.86±0.06 nmol/(min·mg) for AND activity, the 0.63±0.03, 0.57±0.02, 0.49±0.04, 0.52±0.02 nmol/(min·mg) for ERND activity, and the 0.026±0.004, 0.027±0.003, 0.025±0.004, 0.028±0.004 nmol/(min·mg) for AH activity. In conclusion, tetracyclines could reduce the CYP450 content and significantly inhibit the activities of AND and ERND.

Key words: Tetracyclines; CYP450; Liver microsome; Carp; Biochemical indicator

四环素类药物是在鱼类上应用比较早的抗菌药物,具有疗效确定、抗菌谱广、方便安全的特点。它们对革兰氏菌、立克次体、螺旋体、支原体等均可产生抑制作用。对淡水鱼养殖中的鱼类赤鳍病、弧菌病、烂尾病及鲤科鱼类痘疮病具有较好的效果,在淡水鱼养殖过程中被大量使用。该类药物在鱼病防治上通常采用口服给药方式,用来治疗鱼类的全身感染或肠道疾病^[1]。细胞色素 P450 是含有血红素的一组蛋白质,是一个由结构和功能相关的基因超家族编码的同工酶所组成的超家族酶系,该酶系主要分布在线粒体和内质网内膜上^[2]。其主要生理功能是参与内源性物质和外源性物质的生物转化,在调节外环境与机体的相互作用以及保持机体内环境的稳定中起到至关重要的作用^[3-5]。四环素类药物对肝药酶的影响在鱼类上研究较少,为此研究了 4 种四环素类药物对鲤肝细胞色素 P450(CYP450)酶系生化指标的影响,旨在为进一步研究四环素类药物对探针药物在肝微粒体中代谢的影响提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物

采用体质量为 (350 ± 30) g 的健康鲤 72 尾,饲喂不含有抗菌药物的鲤全价饲料并采用循环水养殖,适应性饲养 10 d,水的 pH 值保持在 7.0。温控系统控制水池温度在 (15 ± 1) °C。

1.2 主要试剂

牛血清蛋白,购于 Roche 公司;NADPH,购于 Roche 公司;考马斯亮蓝 G250,进口分装;细胞色素 C,购于 Sigma 公司;一氧化碳,购于常州市京华工业气体有限公司;氨基比林、红霉素、二甲基亚砷,购于国药集团化学试剂有限公司;其余试剂为国产化学试剂,分析纯 AR。

1.3 主要仪器和设备

低温高速离心机、低温超速离心机,Beckman 公司生产;紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司生产;电子天平(JY2002),上海市精密科学仪器有限公司生产;分析天平(BP211D),德国 Sartorius 公司生产;漩涡混悬器,上海沪西分析仪器厂生产;HHS 型不锈钢电热恒温水浴锅,武汉市琴台医疗器械厂生产;YKH 性液体快速混合器,江西医疗器械厂生产。

1.4 给药处理

将试验鲤鱼随机分为 6 组,即空白对照组、溶剂对照组(二甲基亚砷)、土霉素(OTC)处理组、四环素

(TC)处理组、金霉素(CTC)处理组和多西环素(DOTC)处理组。OTC、TC、CTC 处理组按 20 mg/kg · bw, DOTC 处理组按 5 mg/kg · bw,将药物溶于二甲基亚砷,灌入鲤鱼的前肠,对照组不做任何处理,溶剂对照组灌入等剂量的二甲基亚砷,每天一次无回吐者保留试验,连续处理 5 d,第 5 天将鱼处死,制备鱼的肝微粒体,测定鲤的肝微粒体蛋白含量、氨基比林 - N - 脱甲基酶、肝脏细胞色素 P450 含量以及酶系的活性。

1.5 肝微粒体的制备

肝微粒体的制备参照文献[6-7],取出鲤肝脏,用生理盐水冲去血渍、滤纸擦干、称量。根据肝质量和体质量计算相对肝质量。微粒体采用差速离心法制备,即靠近肝门静脉处取肝脏 4 g,放入小烧杯中,剪碎后按 1:3 的比例加入匀浆缓冲液,用玻璃匀浆器在冰水浴中匀浆。匀浆液 4 °C、 $11\,000 \times g$ 高速离心 20 min,上清液 4 °C、 $105\,000 \times g$ 超速离心 60 min,红色沉淀即为肝细胞微粒体组分。将微粒体沉淀取出后用含 250 mL/L 甘油的 KCl - 磷酸盐缓冲液悬浮,每克肝加悬浮液 1 mL 涡旋混匀后分装于冻存管中, - 80 °C 存放。

1.6 测定项目与方法

1.6.1 肝微粒体蛋白含量 BSA 标准曲线的制备参照文献[8],取 8 支试管,标号,依次在试管中加入 2 mg/mL BSA 溶液 0、10、20、30、40、50、60、70 μ L,各管用超纯水补足至 0.1 mL,得到 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL 系列质量浓度的 BSA 溶液 0.1 mL;然后加入 5 mL Bradford 应用液,立即混匀,25 °C 水浴 10 min 后,以空白管为对照,用紫外分光光度计在 595 nm 波长处进行比色,测定各管 OD 值。以系列质量浓度的牛血清白蛋白为横坐标,OD 值为纵坐标,进行线性回归,计算牛血清白蛋白线性回归方程。

微粒体样品中蛋白质含量测定:做标准蛋白质定量时,另取试管加入 2 倍稀释的微粒体悬液 0.1 mL,每个样品均做复管,以后操作同上,测定各样品的 OD 值,依据线性回归方程计算样品中蛋白质含量,并换算成每克肝中所含的微粒体蛋白含量。

1.6.2 细胞色素 P450 含量 参照文献[9],取微粒体悬液 0.3 mL 并加入 0.1 mol/L PBS 缓冲液 5.7 mL(pH 值 7.4)于试管中,再加入 0.1 g/mL 连二亚硫酸钠 40 μ L,立即混匀,静置 2 min,等量分装到 2 个比色杯中,分别作为对照和样本,向样本杯中缓慢通入 CO 60 s,稳定 2 min,以对照杯调 400 nm 向 500 nm 扫描,CYP450 含量计算公式如下:

$$\text{CYP450 含量 (nmol/mg)} = \frac{(OD_{450\text{nm}} - OD_{490\text{nm}}) \times 1\,000 \times \text{稀释倍数}}{91 \times \text{反应体系中蛋白质质量浓度 (mg/mL)}}。$$

1.6.3 NADPH - 细胞色素 C 还原酶活性 取微粒体悬液 0.2 mL 并加入 0.1 mol/L PBS(含 0.1 mmol/L EDTA)缓冲液 5.6 mL、5 mg/mL 细胞色素 C 溶液 0.2 mL 于试管中,混匀,等量分装于对照杯和样品杯。样品杯内加 5 mg/mL NADPH 溶液 20 μL,立即混匀,550 nm 处测定吸光度,秒表计时,每 30 s 测定一次 OD 值,连续测 5 min,计算公式如下:

$$\text{还原型细胞色素 C [nmol/(mg \cdot min)]} = \frac{(\Delta OD/\text{min}) \times 1\,000}{19.1 \times \text{稀释后的蛋白质质量浓度 (mg/mL)}}。$$

1.6.4 氨基比林 - N - 脱甲基酶 (AND) 活性 甲醛标准曲线的制备:分别取 0.1 mmol/L 甲醛工作液 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mL,各管用超纯水补足至 2.0 mL,加入 Nash 试剂 2.0 mL,60 ℃ 水浴 10 min,自来水冷却,以空白管调零,420 nm 处测定各管的吸光度,以 OD 值为纵坐标,甲醛浓度为横坐标,绘制甲醛标准曲线。

AND 活性测定参考文献[10],取含 250 mL/L 甘油的 KCl 磷酸盐缓冲液 (0.15 mol/L KCl、0.1 mol/L PBS,pH 值 7.4) 1.7 mL,加微粒体蛋白悬液 0.1 mL,20 mg/mL 氨基比林溶液 0.1 mL 37 ℃ 水浴温孵 2 min 后,测定管加 10 mmol/L NADPH 溶液 0.1 mL,空白管加蒸馏水 0.1 mL 37 ℃ 水浴 30 min。各管均加 150 g/L ZnSO₄ 0.35 mL,混匀,冰浴 5 min,加饱和 Ba(OH)₂ 0.35 mL,混匀,放置 5 min 后 3 000 r/min 离心 5 min。取上清液 2.0 mL 加 Nash 试剂 2.0 mL,以后操作同甲醛标准曲线制备。根据标准曲线计算酶活性,以甲醛的产生速度表示 AND 的活性[nmol/(mg · min)]。

1.6.5 红霉素 - N - 脱甲基酶 (ERND) 活性 参考文献[11],在反应体系中,红霉素终浓度为 0.4 mmol/L,其余步骤同氨基比林 - N - 脱甲基酶活性测定。

1.6.6 苯胺 - 4 - 羟化酶 (AH) 活性 4 - 氨基酚标准曲线的制备:分别取 50 μmol/L 4 - 氨基酚 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,用 60 g/L 的 TCA 补足至 1 mL,加 10 mL/L 的酚 1 mL,混匀,加 1 mol/L 的碳酸钠 1 mL,混匀,室温放置 30 min,空白管调零,630 nm 处测吸光度。以 OD 值为纵坐标,4 - 氨基酚浓度为横坐标,绘制 4 - 氨基酚标准曲线。

AH 活性的测定参考文献[12],取 1 mmol/L NADPH 溶液 1 mL 和盐酸苯胺溶液 0.5 mL,置于 10 mL 试管内混匀,对照管加 0.1 mol/L PBS 缓冲液 (pH 值 7.4) 1.0 mL 取代 NADPH 溶液,37 ℃ 水浴

2 min。各管加 0.5 mL 微粒体悬液,37 ℃ 水浴再温孵 30 min,加冰冷的 200 g/L 的 TCA 1 mL 终止酶反应,冰浴 5 min,11 000 r/min 离心 10 min,取 1 mL 上清液于另一试管,以后操作同 4 - 氨基酚标准曲线制备,根据 OD 值和标准曲线计算酶活性,以 4 - 氨基酚的生成速度表示 AH 的活性[nmol/(mg · min)]。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制定

牛血清蛋白标准曲线 (图 1):以一系列牛血清蛋白浓度作为横坐标,OD₅₉₅值为纵坐标绘制标准曲线。得到标准曲线的线性方程: $y = 0.613x + 0.0019$, $r = 0.9993$ 。通过标准曲线可知牛血清蛋白质量浓度和 OD 值线性关系良好,可用于肝微粒体蛋白质量浓度的测定。

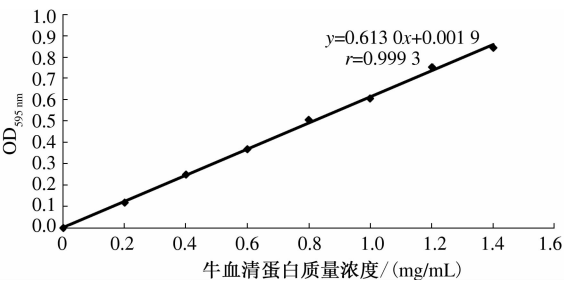


图 1 牛血清蛋白的标准曲线

甲醛标准曲线 (图 2):以一系列甲醛浓度作为横坐标,OD₄₂₀值为纵坐标绘制标准曲线。得到标准曲线的线性方程: $y = 3.7001x - 0.0028$, $r = 0.9994$ 。通过标准曲线可知甲醛浓度和 OD 值线性关系良好,可用于反应过程中 4 - 氨基酚浓度的测定,间接测定 AND 活性。

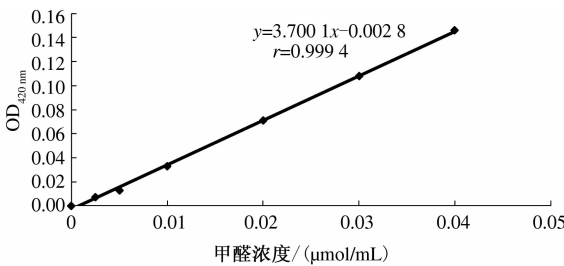


图 2 甲醛的标准曲线

4 - 氨基酚标准曲线 (图 3):以一系列 4 - 氨基酚系列浓度作为横坐,OD₆₃₀值为纵坐标绘制标准曲线。得到标准曲线的线性方程: $y = 0.0103x - 0.0030$, $r = 0.9988$ 。通过标准曲线可知 4 - 氨基酚浓度和 OD 值线性关系良好,可用于反应过程中 4 -

氨基酚浓度的测定,间接测定 AH 的活性。

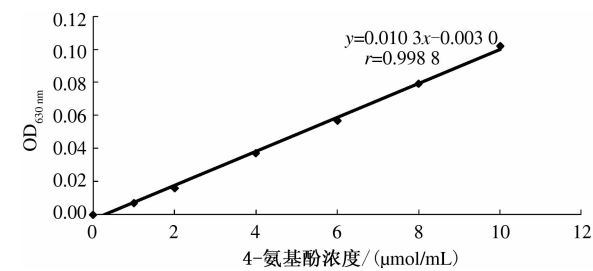


图 3 4-氨基酚的标准曲线

2.2 4 种四环素类药物对鲤肝微粒体蛋白及 CYP450 酶系含量的影响

试验结果见表 1。空白试验结果表明,该试验具有较好的重复性,可作为鲤肝微粒体酶 CYP450 酶系的检测方法和用来探讨研究药物对肝微粒体酶 CYP450 酶系影响的研究方法。

空白对照组 CYP450 含量为 (0.39 ± 0.03) nmol/mg,OTC、TC、CTC 和 DOTC 处理组 CYP450 含

量分别为 (0.22 ± 0.02)、(0.28 ± 0.02)、(0.21 ± 0.03)、(0.25 ± 0.03) nmol/mg,与空白对照组相比具有极显著差异;空白对照组 NADPH - 细胞色素 C 还原酶活性与 4 种四环素类药物的活性差异不显著;空白对照组 AND 活性为 (1.27 ± 0.09) nmol/(min · mg),OTC、TC、CTC 和 DOTC 处理组其活性分别为 (0.86 ± 0.09)、(0.79 ± 0.05)、(0.84 ± 0.05)、(0.86 ± 0.06) nmol/(min · mg),与空白对照组相比差异极其显著;空白对照组 ERND 活性为 (0.85 ± 0.04) nmol/(min · mg),OTC、TC、CTC 和 DOTC 处理组其活性分别为 (0.63 ± 0.03)、(0.57 ± 0.02)、(0.49 ± 0.04)、(0.52 ± 0.02) nmol/(min · mg),与空白对照组相比差异极其显著;空白对照组 AH 活性为 (0.034 ± 0.001) nmol/(min · mg),OTC、TC、CTC、DOTC 处理组其活性分别为 (0.026 ± 0.004)、(0.027 ± 0.003)、(0.025 ± 0.004)、(0.028 ± 0.004) nmol/(min · mg),与空白对照组相比差异显著。

表 1 四环素类药物对鲤肝微粒体蛋白及 CYP450 酶系含量的影响 (n = 12)

指标	空白对照组	溶剂对照组	OTC 处理组	TC 处理组	CTC 处理组	DOTC 处理组
肝微粒体蛋白含量/(mg/g)	4.76 ± 0.12	4.52 ± 0.17	4.68 ± 0.13	4.74 ± 0.18	4.56 ± 0.14	4.64 ± 0.18
CYP450 含量/(nmol/mg)	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.22 ± 0.02**	0.28 ± 0.02**	0.21 ± 0.03**	0.25 ± 0.03**
CYPb5/(nmol/mg)	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.02
NADPH - 细胞色素 C 还原酶活性/[nmol/(min · mg)]	2.52 ± 0.17	2.47 ± 0.16	2.45 ± 0.13	2.38 ± 0.15	2.68 ± 0.14	2.63 ± 0.15
AND 活性/[nmol/(min · mg)]	1.27 ± 0.09	1.25 ± 0.08	0.86 ± 0.09**	0.79 ± 0.05**	0.84 ± 0.05**	0.86 ± 0.06**
ERND 活性/[nmol/(min · mg)]	0.85 ± 0.04	0.87 ± 0.05	0.63 ± 0.03**	0.57 ± 0.02**	0.49 ± 0.04**	0.52 ± 0.02**
AH 活性/[nmol/(min · mg)]	0.034 ± 0.001	0.032 ± 0.003	0.026 ± 0.004*	0.027 ± 0.003*	0.025 ± 0.004*	0.028 ± 0.004*

注: * 表示与空白对照组具有显著差异 (P < 0.05), ** 表示与空白对照组具有极显著差异 (P < 0.01)。

3 结论与讨论

药物间相互作用可发生在吸收、分布、代谢和排泄 4 个阶段,代谢性相互作用发生率较高,大约占药物相互作用的 40%^[13]。在外源化合物的生物转化中 CYP450 酶系起着非常重要的作用,其活性决定着药物的代谢速率,是药物相互作用的主要原因。药物间相互作用 70% 是由酶的抑制作用引起的,其中酶抑制作用导致药物相互作用的临床意义大于酶的诱导作用^[14]。

空白对照组和溶剂(二甲基亚砜)对照组测得的 CYP450 酶系的活性差异不显著,说明本次试验选用的溶剂二甲基亚砜对鲤肝微粒体酶 CYP450 酶系的活性没有影响。空白组数据表明,鲤在冬季水温条件下肝药酶 CYP450 酶系的含量及活性较其他鱼类和动物的活性偏低^[15-16],这可能是鲤的药物代谢速率较其他鱼类慢的原因。通过统计分析可以看出四环素类药物 OTC、TC、CTC、DOTC 对鲤肝微粒体

蛋白含量,细胞色素 b5 (CYPb5) 的活性、NADPH - 细胞色素 C 还原酶活性没有明显的影响,对 CYP450 含量,AND、ERND 的活性具有显著的抑制作用,该研究结果与作者研究的磺胺类药物对鲤 CYP450 酶系的影响存在一定的差异^[17]。试验结果说明四环素类药物在一定程度上能够抑制 CYP450 酶系的活性,部分药物(与 AND、ERND 代谢相关)在和四环素类药物联合使用时,其在鲤体内的代谢会明显受到抑制,甚至会由于药物间相互作用出现蓄积现象,进而出现毒性反应。

四环素类药物为广谱抗菌药物,广泛应用于治疗水产动物革兰氏阳性和阴性细菌引起的感染。其主治由弧菌、嗜水气单胞菌等细菌引起的鱼类疾病。能有效地预防和治疗养殖鲤鱼的仔鱼育苗期和商品鱼养成期的腹水病,也可治愈多种细菌性病原造成的和不同地域发生的腹水病^[18]。四环素类药物在鲤养殖过程中使用广泛,但本研究结果表明该类药物对鲤 CYP450 酶系存在一定程度的抑制作用

(AND、ERND 活性),因此其他药物和四环素类药物在鲤上同时使用时应该格外慎重,防止出现药物蓄积或毒性反应。

综上,CYP450 酶的体内试验和临床药物应用试验存在一定的差异。因此,药物与药物之间的相互作用,以及解释药物之间配伍的科学理论依据需要进行更加深入的研究。本试验可为探讨四环素类药物对鲤疾病控制过程中的合理使用提供理论基础。

参考文献:

- [1] 黄春连,范雪梅,黎倩,等.制何首乌对大鼠肝脏 P450 酶 5 种亚型 mRNA 表达的影响[J].中国中药杂志,2017,42(2):352-356.
- [2] 杨晓霞,张薇,龚久平,等.蚯蚓细胞色素 P450 酶系对土壤中芘或苯并[a]芘的响应[J].环境科学学报,2017,37(10):4019-4025.
- [3] 徐鹿,赵春青,徐德进,等.亚致死剂量氟啶虫胺腈对灰飞虱细胞色素 P450 的影响[J].植物保护学报,2017,44(4):679-686.
- [4] 刘萍,边强.细胞色素 P450 酶系对药物生化转化的作用[J].国外医药(合成药 生化药制剂分册),2000,21(5):305-306.
- [5] Dydio P,Key H M,Hayashi H,*et al.* Chemoselective, enzymatic C-H bond amination catalyzed by a cytochrome P450 containing an Ir (Me)-PIX cofactor [J]. Journal of the American Chemical Society,2017,139(5):1750-1753.
- [6] Manikandan P,Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review[J]. Current Drug Targets,2018,19(1):38-54.
- [7] Cuyue T,Magang S,David R. Substrate dependent effect of acetonitrile in human liver microsomal cytochrome P450 2C9 activity[J]. Drug metab Dispos,2000,28(5):567-572.
- [8] 陈毓荃.生物化学试验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002:96-97.
- [9] Omura T,Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes[J]. Biol chem,1964,239(7):2370-2378.
- [10] Nelson C H,Kirby B J,Lu N,*et al.* Evaluation of cytochrome P450-and transporter-mediated drug-drug interactions with the farnesoid x receptor agonist GS-9674 and phenotypic probe substrates and inhibitors/inducers [J]. Journal of Hepatology,2017,66(1):S151.
- [11] 唐跃年,张顺国,李岚,等.肝细胞微粒体的制备和细胞色素 P450 氧化酶活性测定[J].中国医院药学杂志,1998,18(12):535-536.
- [12] Baker S C,Arlt V M,Indra R,*et al.* Cytochrome P450 activity in muscle-invasive bladder cancer: A novel subgroup[J].Urologic Oncology,2017,35(10):608.
- [13] 黄春连,范雪梅,黎倩,等.制何首乌对大鼠肝脏 P450 酶 5 种亚型 mRNA 表达的影响[J].中国中药杂志,2017,42(2):352-356.
- [14] Huang Q,Deshmukh R S,Ericksen S S,*et al.* Preferred binding orientations of phenacetin in CYP1A1 and CYP1A2 are associated with isoform-selective metabolism [J]. Drug Metabolism and Disposition,2012,40(12):2324-2331.
- [15] 陈大健.鲫鱼肝微粒体细胞色素 P450 酶系的初步研究[D].南京:南京农业大学,2006.
- [16] 杨海峰.鸡肝微粒体的细胞色素 P450 酶系的初步研究[D].南京:南京农业大学,2006.
- [17] 李在建,吴玉荣,易维学,等.3 种不同磺胺类药物对鲤鱼肝细胞色素 P450 酶系生化指标的影响[J].中国兽医科学,2010,40(9):970-974.
- [18] 殷亦情,张博.四环素类抗生素研究进展情况[J].南方农机,2018,49(3):190,193.