

锰中毒对鸡肝脏细胞色素 P450 酶系及 CYP2H1 mRNA 转录水平的影响

唐洪鹏, 毕明玉, 陈 蕾, 张 雯, 于宪一, 徐世文*

(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 本研究旨在探讨锰对公鸡肝脏细胞色素 P450 酶系的影响。50 日龄海兰褐公鸡 400 只, 随机分为 4 组, 分别在饲料中添加 0、600、900、1 800 mg · kg⁻¹ MnCl₂ 建立亚慢性锰中毒模型, 于 30、60、90 d 采取肝脏检测肝微粒体细胞色素 P450 酶系活性以及 CYP2H1 基因转录水平的变化。结果显示, 细胞色素 P450、b₅ 含量, 氨基吡啉-N-脱甲基酶(AND)和苯胺-4-羟化酶(AH)活性在各个时间点随染锰剂量的增加, 基本呈降低趋势, 且高剂量组均极显著($P < 0.01$)低于正常组, 低、中剂量组有高于正常组的情况。NADPH-细胞色素 C 还原酶(CR)和红霉素-N-脱甲基酶(ERND)的活性的变化规律不明显, 30 和 60 d NADPH-细胞色素 C 还原酶活性呈降低趋势, 而 90 d 时呈升高趋势, 且高剂量组极显著($P < 0.01$)高于正常组。红霉素-N-脱甲基酶在 30 d 时呈升高趋势, 60 和 90 d 时呈波动性降低变化, 且高剂量组均极显著($P < 0.01$)低于正常组。在各个时间点, CYP2H1 mRNA 的转录水平除 30 d 低、高剂量组, 60 d 中剂量组, 90 d 低剂量组高于正常组外, 其他组均低于正常组。结果提示, 锰中毒可影响鸡肝脏细胞色素 P450 酶系以及 CYP2H1 mRNA 的转录水平。

关键词: 锰中毒; 鸡; 肝脏; 细胞色素 P450; CYP2H1 基因

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)02-0214-06

Research on the Effects of Manganism on Hepatic Cytochrome P450 Enzyme System and the Transcription Level of CYP2H1 mRNA in Cocks

TANG Hong-peng, BI Ming-yu, CHEN Lei, ZHANG Wen, YU Xian-yi, XU Shi-wen*

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of manganese on the hepatic cytochrome P450 enzyme system in cocks. 400 fifty-day old Hy-line brown cocks were randomly divided into four groups. The cocks in four groups were respectively fed with the basal diet containing 0, 600, 900 and 1 800 mg · kg⁻¹ MnCl₂ to establish the sub-chronic manganism model. After 30, 60 and 90-day treatment, the livers in every group were collected to detect the activity of microsomal cytochrome P450 enzyme system and the transcription level of CYP2H1 gene. The contents of cytochrome P450 and b₅, the activities of aminopyrin-N-demethylase(AND) and aniline-4-hydroxylase(AH) were gradually declined with the increase of manganese in diet. The high dose group was significantly lower than the control group while there were no difference between the low and middle dose group and the control group. There were no markedly changes in the activities of NADPH-cytochrome C reductase(CR) and erythromycin-N-demethylase(ERND). The activity of CR declined at 30 and 60 d, but increased at 90 d. Besides, the CR activity of the high dose group was significantly higher than that in the control group($P < 0.01$). The activity of ERND increased at 30 d but no markedly tendency appeared at 60 and 90 d. The ERND activity in

收稿日期: 2009-09-16

作者简介: 唐洪鹏(1985-), 男, 汉族, 黑龙江东宁人, 硕士生, 主要从事动物营养代谢病与中毒病学研究, E-mail: thpzhu1@126.com

* 通讯作者: 徐世文, E-mail: xushiwen101@sohu.com

the high dose group was significantly higher than that in the low dose group ($P < 0.01$). The transcription level of CYP2H1 mRNA in the low dose and high dose group at 30 d, the middle dose group at 60 d, and the low dose group at 90 d were higher than that in the control group. The transcription level of CYP2H1 mRNA in other treatment groups were lower than that in the control group. These results indicated that manganese could significantly changes the activities of microsomal-cytochrome P450s and the transcription level of CYP2H1 mRNA.

Key words: manganese;cocks;liver;CYP450;CYP2H1 gene

锰是人和动物体内必需的微量元素,在机体正常发育和维持功能中发挥着重要作用,但摄入过量锰也会造成多种器官损伤,产生中枢神经系统毒性、肝脏毒性、生殖毒性等^[1]。近年来,由于用甲基环戊二烯碳基锰(MMT)代替四乙基铅作为汽油防爆剂,造成环境中锰含量逐渐增加,其潜在的危害性逐渐为人们所关注^[2]。肝脏是人和动物机体重要的解毒器官,细胞色素氧化酶 P450(Cytochrome P450, CYP450)是一种主要存在于肝微粒体内的亚铁血红素的超家族蛋白酶,由多种成分组成,在内源性化合物(如内固醇激素、维生素 D、胆酸等)和外源性化合物(包括药物、化学毒物、致癌物等)的代谢过程中起着十分重要的作用,是机体混合功能氧化酶系中最重要的一族氧化酶系。研究发现,90%以上的药物或外源性毒物在体内的代谢、解毒都要通过肝微粒体 CYP450 完成^[3]。已有研究表明,过量摄入铅、汞、锡等金属均可抑制实验动物肝微粒体 CYP450 的活性,锰在急性试验中对 CYP450 也呈抑制作用^[4],而 CYP2 家族是目前已知的细胞色素 P450 同工酶中最大、最复杂的家族^[5],其活性的高低可间接反映许多环境污染物对机体的毒性反应。为此,本试验通过在饲料中添加不同浓度锰以建立育成鸡亚慢性锰中毒模型,来观察鸡肝微粒体细胞色素 P450 酶系含量和活性以及 CYP2H1 mRNA 的转录水平的变化,探讨锰中毒对肝微粒体细胞色素 P450 酶系的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

50 日龄体重质量相近的健康海兰褐公鸡 400 只,随机分为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组 4 组,每组 100 只,参照张健等^[6]报道的雏鸡氯化锰灌胃染毒的半数致死量,设计 4 个不同浓度染锰组,对照组饲喂含锰为 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的基础日粮,低剂量组饲喂基础日粮添加 $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ MnCl}_2$,中剂量组

饲喂基础日粮添加 $900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ MnCl}_2$,高剂量组饲喂基础日粮添加 $1800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ MnCl}_2$ 。在染毒后的第 30、60、90 天每组随机选取 30 只,禁食 12 h 后,称重后剖杀,快速分离肝脏。

1.2 主要试剂

氯化锰(分析纯,含量为 99.0%),由天津市博迪化工有限公司生产。SYBR Premix Ex Tag(Perfect Real Time)试剂盒、M-MLV 反转录酶等 PCR 反应试剂购自大连宝生物公司;DNABack 胶回收试剂盒购自天津基因工程有限公司;Fastgene RNA 提取试剂盒购自上海飞捷生物公司;牛血清白蛋白(BSA)、氨基比林、细胞色素 C、NADPH、试卤灵购自 Sigma 公司;红霉素购自 Merck 公司;CO 气体购自哈尔滨黎明气体公司。

1.3 方 法

1.3.1 鸡肝微粒体的制备 用预冷的生理盐水冲去肝脏表面的血渍,滤纸擦干,称重,记录肝脏质量,用差速离心法制备肝脏微粒体。

1.3.2 肝微粒体细胞色素 P450 酶系含量及活性的检测 肝微粒体蛋白含量的测定采用 Bradford 法,以牛血清白蛋白作为标准。P450 含量的测定采用 CO 还原差示光谱法。 b_5 含量和 CR 活性的测定采用化学比色法。AND 活性的测定和 ERND 活性的测定采用 Nash 比色法,以甲醛的生成速率表示 AND 和 ERND 的活性。AH 活性的测定采用 Schenkmen 法,以 4-氨基酚的生成速率表示 AH 活性^[7-8]。

1.3.3 荧光实时定量 PCR 法测定 CYP2H1 mRNA 的表达 根据原鸡 CYP2H1 和 β actin 基因序列,设计了 2 对特异性引物(表 1),并由上海英骏生物工程有限公司合成。使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,取总 RNA $5 \mu\text{L}$,加 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Oligo d(T)18 $4 \mu\text{L}$,加 0.1% DEPC 处理的灭菌水 $14 \mu\text{L}$,混匀,70 °C 水浴 10 min,迅速冰浴 3 min,离心数秒,加 $5 \times$ Buffer $8 \mu\text{L}$,dNTP($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $8 \mu\text{L}$,RNase 抑制剂 $1 \mu\text{L}$,M-MLV $1 \mu\text{L}$,42 °C 水浴 1 h,

70 °C 水浴 15 min 灭活反转录酶, -20 °C 保存备用。按照试剂盒说明书选用 20 μL 体系及相应反应条件, 所有样品做 3 个重复孔, 并在同一块 96 孔平板

上同时进行某一样品 5 倍逐级稀释相对标准曲线和待测样品的实时定量 PCR, 用 7500system 软件分析结果。

表 1 扩增目的基因的引物序列及目的片段长度

Table 1 Primer sequence and amplification length of destination fragment

基因 Gene	序列号 Accession number	引物序列 Sequence	引物长度/bp Primer size	产物长度/bp Product size
CYP2H1	M13454	UP: 5'-GGAGAAGCCTTCAGTG3'	18	118
		DOWN: 5'-TGGTGAGGGCAAATCGTC-3'	18	
<i>βactin</i>	L08165	UP: 5'-ACCGCAAATGCTTCTAAACC-3'	20	93
		DOWN: 5'-CCAATCTCGTCTTGTTTTATGC-3'	22	

1.4 数据分析及统计

数据采用 SAS 软件 Mantel-Haenszel 卡方检验 (Chi-Square) 模块进行统计, 用 Microsoft Excel 2003 对试验数据作图。

2 结果

2.1 肝脏微粒体 CYP450 酶系含量及活性的检测结果

2.1.1 细胞色素 P450 含量的检测结果 不同时间点, 除高剂量组肝脏 CYP450 含量呈波动性变化外, 其他各组均呈升高趋势。染锰 30 d 时, 低剂量组高于正常组且差异极显著 ($P < 0.01$), 中、高剂量组均低于正常组。60 和 90 d 随着染锰剂量的增加, 肝脏 CYP450 含量呈下降趋势, 60 d 中、高剂量组与正常组间差异极显著 ($P < 0.01$)。90 d 高剂量组极显著 ($P < 0.01$) 低于正常组, 中剂量组显著 ($P < 0.05$) 低于正常组。

2.1.2 细胞色素 b_5 含量的检测结果 不同时间点, 各组肝脏细胞色素 b_5 含量呈升高趋势。30 d 细胞色素 b_5 含量呈波动性降低, 高剂量组极显著 ($P < 0.01$) 低于正常组。60 和 90 d 细胞色素 b_5 含量均呈先升高后降低的趋势, 低、高剂量组与正常组间差异极显著 ($P < 0.01$), 60 d 中剂量组显著 ($P < 0.05$) 低于正常组。

2.1.3 NADPH-细胞色素 C 还原酶活性的检测结果 不同时间点, 除高剂量组 CR 活性呈升高趋势, 其他组变化不规律。30 d 中剂量组略高于正常组, 低、高剂量组均低于正常组且高剂量组极显著 ($P < 0.01$) 低于正常组。60 d CR 活性呈波动性降低, 且各染毒组与正常组相比差异均极显著 ($P <$

0.01)。90 d 低、高剂量组高于正常组, 中剂量组显著 ($P < 0.05$) 低于正常组, 高剂量组与正常组间差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.1.4 氨基吡啉-N-脱甲基酶活性的检测结果

随着时间的延长, 正常组和低剂量组呈先降低后升高趋势, 中、高剂量组呈波动性降低趋势。30 d 高剂量组极显著 ($P < 0.01$) 低于正常组, 低、中剂量组均高于正常组, 中剂量组与正常组间差异极显著 ($P < 0.01$)。60 d 低剂量组显著 ($P < 0.05$) 高于正常组, 中、高剂量组均极显著 ($P < 0.01$) 低于正常组。90 d 酶活性随着染锰剂量增加逐渐降低, 且各组间差异均极显著 ($P < 0.01$)。

2.1.5 红霉素-N-脱甲基酶活性的检测结果 不同时间点, 随着染毒时间的延长, 各组酶活性变化趋势各不相同。30 d 低剂量组低于正常组, 中剂量组极显著 ($P < 0.01$) 高于正常组, 高剂量组显著 ($P < 0.05$) 高于正常组。60 d 各染毒组均低于正常组, 低剂量组与正常组间差异显著 ($P < 0.05$), 高剂量组与正常组间差异极显著 ($P < 0.01$)。90 d 各染毒组均低于正常组, 且各组间差异均极显著 ($P < 0.01$)。

2.1.6 苯胺-4-羟化酶活性的检测结果 不同时间点, 随着染毒时间的延长, 各组酶活性呈先升高后降低趋势。30 d 随着染锰剂量的增加, 酶活性随着染锰剂量增加呈逐渐降低趋势, 且各组与正常组间差异极显著 ($P < 0.01$)。60 d 低、高剂量组极显著 ($P < 0.01$) 高于正常组, 中剂量组低于正常组。90 d 酶活性呈先升高后降低趋势, 低剂量组极显著 ($P < 0.01$) 高于正常组, 高剂量组极显著 ($P < 0.01$) 低于正常组。

表 2 肝脏 Cyt450、Cytb₅、NADPH-CytC、AND、ERND 及 AH 的检测结果Table 2 Detection results of Cyt450, Cytb₅, NADPH-CytC, AND, ERND, and AH in liver of cocks

项目 Item	组别 Group	30 day	60 day	90 day
细胞色素 P450/ (nmol/mgprot) Cytochrome P450	正常组 Control	0.851±0.080 ^{Bb}	2.184±0.483 ^{Aa}	5.789±0.446 ^{Aa}
	低剂量组 Low-dose	1.134±0.211 ^{Aa}	1.832±0.439 ^{ABab}	5.413±0.849 ^{Aab}
	中剂量组 Middle-dose	0.711±0.099 ^{Bb}	1.372±0.398 ^{Bb}	4.595±0.838 ^{Ab}
	高剂量组 High-dose	0.730±0.086 ^{Bb}	0.658±0.085 ^{Cc}	1.822±0.542 ^{Bc}
细胞色素 b ₅ / (nmol/mgprot) Cytochrome b ₅	正常组 Control	0.655±0.095 ^{Aa}	1.291±0.421 ^{Bb}	2.393±0.387 ^{Bb}
	低剂量组 Low-dose	0.587±0.090 ^{Aa}	2.141±0.278 ^{Aa}	3.493±0.358 ^{Aa}
	中剂量组 Middle-dose	0.603±0.111 ^{Aa}	0.916±0.172 ^{BCc}	2.106±0.221 ^{Bb}
	高剂量组 High-dose	0.394±0.086 ^{Bb}	0.699±0.083 ^{Cc}	0.989±0.125 ^{Cc}
NADPH-细胞色素 C 还 原酶/(nmol/mgprot/min) NADPH-Cytochrome C reductas	正常组 Control	3.557±0.631 ^{Aa}	4.103±0.541 ^{Aa}	3.176±0.422 ^{BCb}
	低剂量组 Low-dose	3.110±0.430 ^{ABa}	3.013±0.527 ^{Bb}	3.388±0.417 ^{ABb}
	中剂量组 Middle-dose	3.782±0.454 ^{Aa}	1.453±0.457 ^{Cc}	2.509±0.458 ^{Cc}
	高剂量组 High-dose	2.211±0.445 ^{Bb}	2.577±0.702 ^{Bb}	4.158±0.473 ^{Aa}
氨基吡啶-N-脱甲基酶/ (nmol/mgprot/min) Aminopyrine-N- demethylase	正常组 Control	0.883±0.075 ^{Bb}	0.851±0.045 ^{Ab}	2.202±0.137 ^{Aa}
	低剂量组 Low-dose	0.926±0.093 ^{Bb}	0.926±0.038 ^{Aa}	1.168±0.011 ^{Bb}
	中剂量组 Middle-dose	1.398±0.066 ^{Aa}	0.575±0.078 ^{Bc}	0.852±0.072 ^{Cc}
	高剂量组 High-dose	0.585±0.054 ^{Cc}	0.288±0.021 ^{Cd}	0.406±0.029 ^{Dd}
红霉素-N-脱甲基酶/ (nmol/mgprot/min) Erythromycin-N- demethylase	正常组 Control	0.731±0.031 ^{Bc}	1.516±0.154 ^{Aa}	1.695±0.089 ^{Aa}
	低剂量组 Low-dose	0.711±0.056 ^{Bc}	1.301±0.181 ^{Ab}	0.936±0.151 ^{Bb}
	中剂量组 Middle-dose	1.045±0.128 ^{Aa}	1.382±0.076 ^{ABab}	0.341±0.038 ^{Dd}
	高剂量组 High-dose	0.842±0.071 ^{Bb}	0.766±0.082 ^{Bc}	0.734±0.062 ^{Cc}
苯胺-4-羟化酶/ (nmol/mgprot/min) Aniline-4-hydroxylase	正常组 Control	0.151±0.017 ^{Aa}	0.172±0.011 ^{Bc}	0.112±0.015 ^{Bb}
	低剂量组 Low-dose	0.104±0.015 ^{Bb}	0.204±0.013 ^{Ab}	0.197±0.016 ^{Aa}
	中剂量组 Middle-dose	0.095±0.017 ^{Bb}	0.152±0.021 ^{Bc}	0.105±0.015 ^{Bb}
	高剂量组 High-dose	0.064±0.008 ^{Cc}	0.232±0.019 ^{Aa}	0.032±0.009 ^{Cc}

标大写字母完全不相同者表示同一指标两组数值比较差异极显著 ($P < 0.01$), 标有完全不同小写字母者表示同一指标 2 组数值比较差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同字母者表示同一指标两组数值比较差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同
Values with different capital letter superscripts in the same column are significant different ($P < 0.05$), while with different lower case letter superscripts in the same column are extremely different ($P < 0.01$). Means with the same superscripts in the same column differ insignificantly ($P > 0.05$). The same as below

2.2 CYP2H1 mRNA 表达的检测结果

2.2.1 PCR 产物鉴定结果 应用设计的引物分别从海兰褐公鸡肝脏中扩增出 2 条分别约为 93 和 118 bp 的片段, 未见非特异性条带出现, 这与预期结果基本相符(图 1)。

2.2.2 肝脏 CYP2H1 和 β actin 基因 PCR 产物序列分析 测序结果表明海兰褐公鸡肝脏 CYP2H1 和 β actin 基因核苷序列测定结果与 GenBank 中已经发表的 Gallus 序列比对同源性分别为 96.61% 和 100%。

2.2.3 肝脏 CYP2H1 基因荧光实时定量 PCR 检测结果 依据 5 倍梯度稀释的 cDNA 样品构建 CYP2H1 mRNA 的标准曲线。通过溶解曲线分析, 发现 CYP2H1 的 Tm 值比较固定, 在 83~84 °C 左右有一个特异峰, 表明其被特异扩增, 无引物二聚体及非特异性产物形成。在荧光定量 PCR 后, 获得了循环数与荧光相对强度的 S 型动力学曲线,

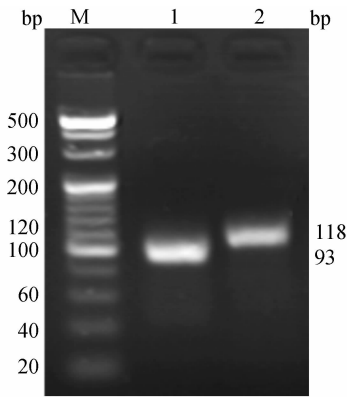
CYP2H1 的指数扩增期和平台期均十分明显, 表现为理想的扩增曲线, 表明本次 PCR 是成功的, 试验数据可以应用于 CYP2H1 基因的相对定量分析。

2.2.4 锰中毒对鸡肝脏 CYP2H1 转录的影响

由图 2 可知, 30 d 时随着染毒剂量的增加, 中剂量组肝脏 CYP2H1 基因的 RNA 水平低于正常组, 低、高剂量组均高于正常组; 60 d 低、高剂量组 CYP2H1 基因的 RNA 水平均低于正常组, 而中剂量组明显高于正常组; 90 d 只有低剂量组高于正常组, 中、高剂量组均低于正常组, 且明显降低。

3 讨论

以细胞色素 P450 酶系作为毒物毒性的生物学标志物已广泛应用于毒理学研究中。肝脏是脊椎动物 P450 含量最丰富的器官。鱼肝 CYP4501A1 作为有机污染物的生物标志物, 已经大量地应用于野外现场研究, 并且, 在研究中还发现, CYP4501A1 与



M. 20 bp DNA Ladder Marker; 1. β actin PCR 产物; 2. CYP2H1 PCR 产物

M. 20 bp DNA Ladder Marker; 1. PCR product of β actin; 2. PCR product of CYP2H1

图1 肝脏 CYP2H1 和 β actin 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of CYP2H1 and β actin in liver

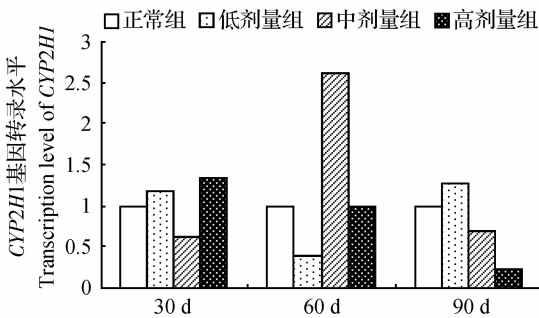


图2 CYP2H1 mRNA 转录水平检测结果

Fig. 2 The results of CYP2H1 mRNA transcription level in liver

污染物含量之间存在较明显的剂量反应关系^[9]。肝微粒体细胞色素 P450 系统可催化多种内外源性物质的代谢,一方面把亲脂性的有毒化合物通过生物转化,变成极性强的易溶物质,使毒性物质失活,易于排出体外,从而起到解毒作用。另一方面也可激活一些内外源性毒物,使其毒性增强^[10]。可见, CYP450 的代谢作用不仅与肝脏的解毒功能密切相关,同时也在中毒性肝损伤的发病中起重要作用。而大量研究发现过量的锰可诱发中毒性肝损伤。张素蓉等^[11]报道对大鼠腹腔注射 30 mg · kg⁻¹ 氯化锰, 1 次 · d⁻¹, 连续注射 40 d, 发现染锰组大鼠肝线粒体肿胀并出现空泡样变化、变性, 内质网脱颗粒、扩张, 溶酶体聚集等病理变化。

国内外肝微粒体 CYP450 的研究多集中于人、

实验动物(大鼠,小鼠)、植物和昆虫,关于鸡的报道较少,而染锰对鸡肝微粒体细胞色素 P450 酶系的影响未见报道。杨海峰研究发现苯巴比妥(80 mg · kg⁻¹)和地塞米松(5 mg · kg⁻¹)连续腹腔注射 5 d 后,对鸡肝微粒体细胞色素 P450 产生明显的诱导作用^[12],韦小敏等发现急性大剂量(250 μ mol · kg⁻¹)染锰以及低剂量(76 μ mol · kg⁻¹ · d⁻¹)长时间染锰都可抑制大鼠肝微粒体 CYP450 的活性^[13]。本试验通过对公鸡染锰,检测肝微粒体中细胞色素 P450、b₅ 含量以及 CR、AND、ERND、AH 4 种酶的活性,结果显示,肝微粒体 CYP450 酶系的含量和活性在各个时间点与正常组相比均发生了改变,在染锰 30 d 时,低剂量染锰组细胞色素 P450 含量,中剂量组 CR 活性,低、中剂量组 AND 活性,中、高剂量组 ERND 活性均比对照组高。提示短时间低剂量染锰可以增加细胞色素 P450 含量,提高 CR 和 AND 的活性,但短时间高剂量染锰可使 ERND 活性高于正常组。60 d 时,低剂量组细胞色素 b₅ 含量、AND 活性、AH 活性均高于正常组。染锰 90 d 时,低剂量组细胞色素 b₅ 含量、AH 活性,低、高剂量组 CR 活性均高于正常组。这说明长时间低剂量的锰可以诱导细胞色素 b₅ 含量以及 AND 和 AH 的活性,而高剂量则转为抑制的双相效应,随着染锰剂量的增加,整体表现为降低趋势。这与韦小敏等^[4]的报道 15 mg · kg⁻¹ MnCl₂ 给大鼠灌胃,与对照组比较,染锰组大鼠肝微粒体的细胞色素 P450 和 b₅ 含量分别下降 26% 和 16%, AND 活性下降 31% 基本一致。推测其可能是由于锰进入肝脏后能直接作用于肝微粒体混合功能氧化酶系中的某些敏感部位,引起酶的破坏或失活,或者抑制肝微粒体混合功能氧化酶在体内的合成或促进其在体内的降解。ERND 呈现出短时间随染锰剂量增加活性增强,长时间则基本呈下降趋势。而 CR 的活性呈现一定的波动性,在 90 d 时,低、高剂量组 CR 活性都高于正常组,说明在长时间染锰可以诱导 CR 的活性,但肖功华等^[14]报道镉、铅等重金属可明显改变细胞色素 P450 的含量,而不影响 CR 活力,这与本试验的结论不一致,原因可能是由于不同金属对肝微粒体细胞色素 P450 酶系的影响机制不同。

多种形式的细胞色素 P450,特别是 CYP1A、CYP2 和 CYP3A 亚族的成员在许多外源物的生物转化中起着非常重要的作用^[15]。为此,本试验还对公鸡肝脏 CYP2H1 mRNA 转录水平进行了检测,

结果显示在锰中毒 30 d 中剂量组 CYP2H1 mRNA 的转录水平低于正常组, 低、高剂量组均高于正常组, 但变化不明显; 60 d 低、高剂量组均低于正常组, 而中剂量组 CYP2H1 mRNA 的转录水平却高出正常组 2 倍多; 90 d 低剂量组高于正常组, 而中、高剂量组均低于正常组, 高剂量组降低较明显。这一方面说明低剂量短时间染锰可提高 CYP2H1 mRNA 的转录水平, 高剂量长时间染锰可使其水平降低, 这基本与 P450 酶系的检测结果相吻合。另一方面, 其 mRNA 转录水平的下调直接影响锰的 I 相代谢, 导致其在肝脏内积蓄而产生肝毒性。本试验结果说明, 锰中毒可以从 mRNA 水平改变肝微粒体细胞色素 P450 酶系的活性, 降低肝脏的代谢能力, 导致肝脏损伤。

参考文献:

- [1] ASCHNER M, GUILARTE T R, SCHNEIDER J S, et al. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 221(2): 131-147.
- [2] 宾 萍, 姜岳明, 胡万达. 锰神经毒作用机理及其生物标志物研究 [J]. 铁道劳动安全卫生与环保, 2004, 31(2): 102.
- [3] 陈成伟. 中毒与药物性肝病[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 313-327.
- [4] 韦小敏, 胡万达, 纪淑琴, 等. 锰对大鼠肝混合功能氧化酶的影响 [J]. 卫生毒理学杂志, 1994, 8(1): 51-52.
- [5] 周 园, 胡艳丽, 李丽燕, 等. 细胞色素 P450 酶的研究进展 [J]. 农垦医学, 2002, 24(3): 224.
- [6] 张 健, 张黎明, 李志鹏, 等. 氯化锰对雏鸡半数致死量的测定 [J]. 黑龙江畜牧兽医 2009, 1: 84-85.
- [7] 于 倩, 左楠, 贾海燕, 等. 硒对氟中毒雏鸡肝脏细胞色素 P450 酶系主要亚型的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(6): 922-927.
- [8] 杨海峰, 江善祥. 鸡肝微粒体细胞色素 P450 酶系检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36(2): 148-150.
- [9] 刘 宛, 李培军, 周启星, 等. 植物细胞色素 P450 酶系的研究进展及其与外来物质的关系 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2001, 2(5): 1-9.
- [10] 孟宪清, 李玉兰, 宋其林. T-2 毒素对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 的影响 [J]. 中国地方病学杂志, 1997, 16(5): 277.
- [11] 张素蓉, 傅娟玲, 周宗灿. 染锰大鼠肝和脑超微结构的改变 [J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(3): 171-178.
- [12] 杨海峰. 鸡肝微粒体细胞色素 P450 的初步研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [13] 韦小敏, 胡万达, 纪淑琴, 等. 对氨基水杨酸钠对染锰大鼠肝混合功能氧化酶的作用 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1993, 11(1): 16-18.
- [14] 肖功华, 刘毓谷. 镉、铅、汞对大鼠肝微粒体混合功能氧化酶系的影响 [J]. 湖南医学, 1990, 7(1): 6-7.
- [15] LEWIS D F, LAKE B G. Molecular modelling of CYP1A subfamily members based on an alignment with CYP102: rationalization of CYP1A substrate specificity in terms of active site amino acid residues [J]. *Xenobiotica*, 1996, 26(7): 723-753.