

速眠新对大鼠原代肝细胞 CYP3A1、 CYP2E1 的影响

徐丽娜, 杜金梁, 马玉忠

(河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001)

摘要: 胶原酶二步灌注法获取原代大鼠肝细胞, 用不同浓度的速眠新和保定宁处理, Western blot 法测定肝细胞中细胞色素酶 P450 3A1 (CYP3A1) 和细胞色素酶 P450 2E1 (CYP 2E1) 的表达水平。结果表明: 通过胶原酶灌注法, 每只大鼠可获得 $2\sim 4\times 10^8$ 个肝细胞, 成活率约为 95%。用速眠新、保定宁处理后, 肝细胞 CYP3A1 和 CYP 2E1 的表达随速眠新、保定宁浓度的增加和处理时间的延长而呈升高的趋势。原代大鼠肝细胞可用于速眠新药物代谢分子机制的研究, 为其临床上合理地应用提供了理论依据。

关键词: 速眠新; 大鼠; 原代肝细胞; CYP3A1; CYP2E1

中图分类号: S854 文献标识码: A

Effects of SU-MIAN-XIN on CYP3A1 and CYP2E1 in Rat Primary Cultured Hepatocytes

Xu Lina, Du Jinliang, Ma Yuzhong

(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: Rat primary cultured hepatocytes were isolated by two-step collagenase digestion method and treated with gradient concentration of SU-MIAN-XIN and BAO-DING-NING, and the expression of cytochrome P450 3A1 (CYP3A1) and cytochrome P450 2E1 (CYP 2E1) were determined by Western blot. The results as follows: $2\sim 4\times 10^8$ hepatocytes per rat were obtained and the viability was about 95%. The expression of CYP3A1 and CYP 2E1 in rat hepatocytes increased gradually with treatment of SU-MIAN-XIN and BAO-DING-NING. Rat primary cultured hepatocytes can be used for molecular mechanism of SU-MIAN-XIN metabolism, it provides a foundation for its clinical application.

Key words: SU-MIAN-XIN, rat, primary cultured hepatocyte, CYP3A1, CYP2E1

速眠新又名 846 合剂, 主要由保定宁、双氢埃托啡和氟哌啶醇组成, 具有很好的镇静、镇痛和肌松作用, 已广泛应用于各种动物的麻醉。该麻醉药在临床应用中虽然取得了满意的效果, 但也伴随着一些麻醉意外的发生^[1]。

麻醉药进入体内要进行生物转化, 肝脏是生物转化的主要场所。药物在肝脏中的生物转化有赖于其微粒体中的多种酶系, 其中最重要的是细胞色素 P450 混

合功能氧化酶系统^[2]。其中的 CYP3A1 和 CYP2E1 与麻醉药的代谢密切相关^[3,4]。

因此研究从影响麻醉药的各种因素入手, 用大鼠的原代肝细胞作为实验材料, 通过 Western Blot 的方法, 来研究与麻醉药代谢相关的细胞色素酶 CYP2E1 和 CYP3A1 的表达水平, 探讨在 CYP3A1 和 CYP2E1 基因的参与下速眠新代谢的分子机制, 为它的合理选择和使用提供理论依据, 也为其它麻醉药的药物代谢

基金项目: 河北农业大学校长基金“中兽药药物代谢的分子机制研究”(2005-710)。

第一作者简介: 徐丽娜, 女, 1982 年出生, 硕士研究生, 从事临床兽医学的研究。通信地址: 071001 河北省保定市灵雨寺街 289 号河北农业大学动物科技学院, Tel: 0312-7528443, Email: xulina-0128@sohu.com。

通讯作者: 马玉忠, 男, 教授, 博士, 博导。通信地址: 071001 河北省保定市灵雨寺街 289 号河北农业大学动物科技学院, Tel: 0312-7528443, Email: dkma@hebau.edu.cn。

收稿日期: 2008-08-15, 修回日期: 2008-09-02。

研究提供模型。

1 材料和方法

1.1 试验时间、地点：

试验期为2007年9月—2008年7月，在河北农业大学内进行。

1.2 试验材料

1.2.1 试验动物 成年SD大鼠，雄性，清洁级，体重150~250g，购自河北省实验动物中心。

1.2.2 主要试剂 速眠新II注射液、保定宁(军事医学科学院军事兽医研究所)，Williams E培养基、Hanks、ITS、地塞米松(Sigma公司)，胶原酶I(Gibco公司)，兔抗大鼠CYP2E1和CYP3A1抗体(Chemicon公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 肝细胞的分离培养和处理 胶原酶二步灌注法获取原代大鼠肝细胞。先用含0.5mM EGTA的无钙Hanks液漂洗大鼠肝脏2min，再用150U/ml胶原酶I消化5~6min，最后用Hanks液漂洗2min后取出肝脏，分离、纯化肝细胞。肝细胞悬浮于Williams E培养基(含0.1 μ M地塞米松，1 \times ITS，10%胎牛血清)后接种到

12孔板中(6 \times 10⁵个/孔)，37 $^{\circ}$ C/5%CO₂条件下培养3~4h，待细胞贴壁后，更换Williams E培养基(含0.1 μ M地塞米松，1 \times ITS)培养24h后，速眠新和保定宁处理不同时间。

1.3.2 Western blot 50mM Tris-HCl(pH7.4)裂解速眠新和保定宁处理后的肝细胞，所得蛋白用Bradford定量试剂盒定量，10%SDS-PAGE电泳，每孔加蛋白6 μ g，半干转印槽转膜(Bio-Rad)，5%脱脂奶封闭，加兔抗大鼠CYP2E1和CYP3A1一抗，羊抗兔的IgG-AP，NBT/BCIP显色。

2 试验结果

2.1 大鼠原代肝细胞的数量

通过胶原酶两步灌注法，每只大鼠可获得2~4 \times 10⁸个肝细胞，成活率约为95%。说明所分离到的肝细胞可以用于后续试验。

2.2 肝细胞形态观察

肝细胞接种后30min开始贴壁，3~4h后贴壁完全，细胞呈圆球形，边界轮廓清晰(图1)。培养24h后，多数肝细胞相互黏连，呈岛屿状连接(图2)。

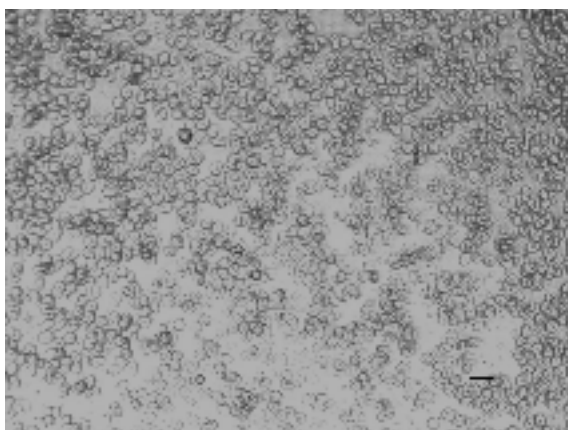


图1 肝细胞形态(4h, 标尺=50 μ m)

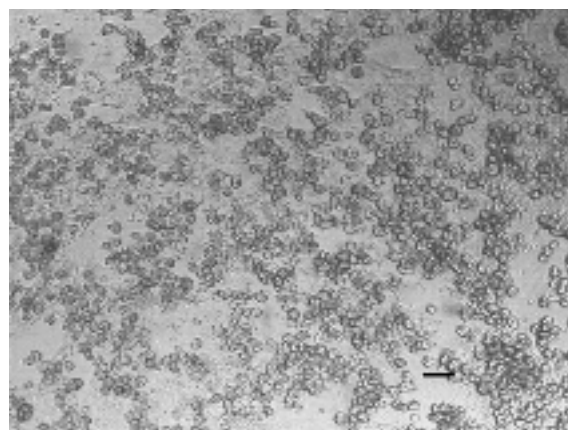


图2 肝细胞形态(24h, 标尺=50 μ m)

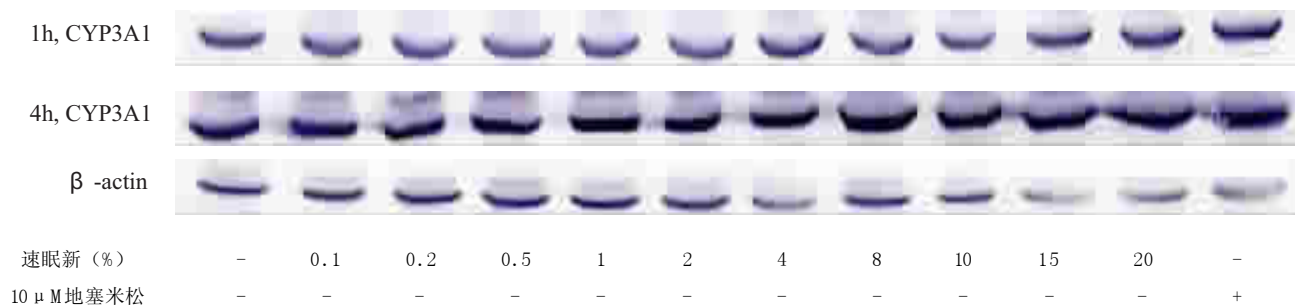


图3 速眠新对大鼠肝细胞CYP3A1的诱导作用

2.3 速眠新对大鼠肝细胞CYP3A1和CYP2E1的影响

2.3.1 速眠新对大鼠肝细胞CYP3A1的影响 速眠新分别处理肝细胞1h、4h。结果发现，随药物浓度的增加，CYP3A1的表达增强。在相同的浓度梯度下，作用

时间越长，CYP3A1的诱导效果越明显(图3)。

2.3.2 速眠新对大鼠肝细胞CYP2E1的影响 速眠新分别处理肝细胞1h、4h。结果发现，随药物浓度的增加，CYP2E1的表达增强。在相同的浓度梯度下，

作用时间越长, CYP2E1 的诱导效果越明显。但 15%、20%速眠新作用肝细胞 4h, CYP2E1 的表达减弱(图 4)。

2.4 保定宁对大鼠肝细胞 CYP3A1 和 CYP2E1 的影响

2.4.1 保定宁对大鼠肝细胞 CYP3A1 的影响 保定宁分别处理肝细胞 1h、4h。结果发现, 随药物浓度的增加, CYP3A1 的表达增强。在相同的浓度梯度下, 作用

时间越长, CYP3A1 的诱导效果越明显(图 5)。

2.4.2 保定宁对大鼠肝细胞 CYP2E1 的影响 不同浓度的保定宁分别处理肝细胞 1h、4h。结果发现, 随药物浓度的增加, CYP2E1 的表达增强。在相同的浓度梯度下, 作用时间越长, CYP2E1 的诱导效果越明显。保定宁处理肝细胞 4h 时, 从 8%浓度开始, CYP2E1 的表达呈递减趋势(图 6)。



图 4 速眠新诱导肝细胞 CYP 2E1 的诱导作用

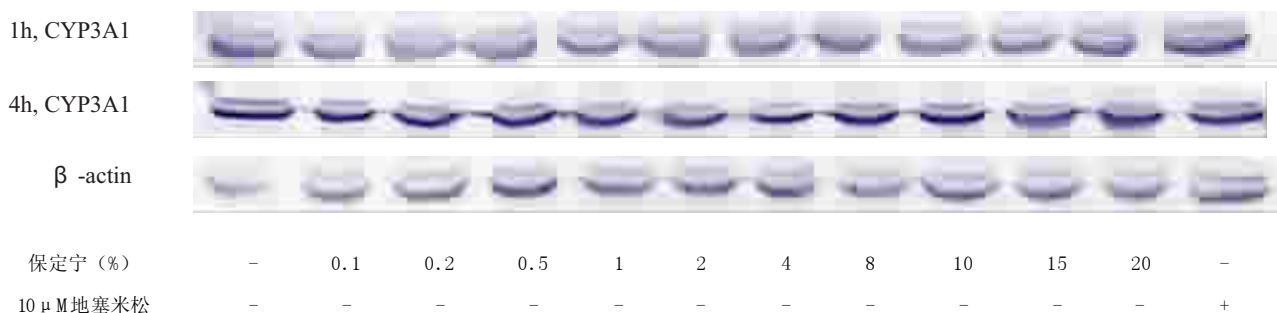


图 5 保定宁诱导肝细胞 CYP 3A1 的诱导作用

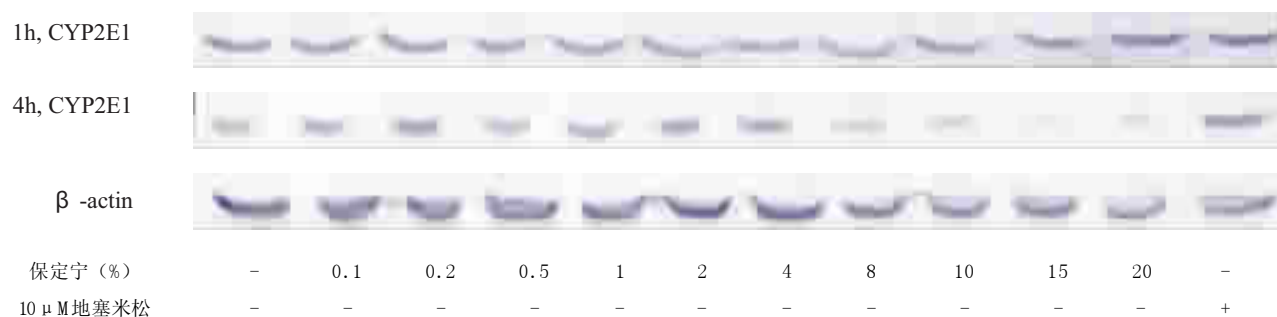


图 6 保定宁诱导肝细胞 CYP 2E1 的诱导作用

3 讨论

通过胶原酶两步灌流法, 每只大鼠可获得 2~4×10⁸ 个肝细胞, 成活率在 95%左右。肝细胞生长良好, 为下一步的实验打下了基础。

利用体外培养的原代肝细胞进行药物代谢的研究^[5], 可以排除其它因素的干扰, 直接观察细胞色素 P450 酶对底物的选择代谢性, 为体内试验提供可靠的理论依据。且当一些对机体损害较大的药物不适合进行体内试验时, 体外试验无疑成为很好的替代方法。肝

细胞经胶原酶分离接种后 3~4h 即可紧密贴壁生长, 且在一定的培养条件下仍保留体内的细胞功能和活性, 尤其是药物代谢酶的活性, 这使原代肝细胞成为研究药物代谢等的很好材料。

速眠新虽被兽医临床广泛应用^[6], 但用分子生物学的方法来对其代谢机制的研究还较少。笔者用不同剂量的速眠新及其主要成分保定宁处理大鼠的原代肝细胞, 来研究与麻醉药代谢相关的细胞色素酶 CYP2E1 和 CYP3A1 的表达水平。结果发现, CYP3A1 和 CYP

2E1 的表达水平随速眠新、保定宁浓度的增加而升高。速眠新和保定宁处理肝细胞 4h 后, CYP2E1 和 CYP3A1 的表达水平要比处理 1h 时高, 因而术后用苏醒灵等药非常有必要。15%速眠新和 8%保定宁作用肝细胞 4h 时, CYP2E1 的表达减弱。说明麻醉药的浓度过大时, 可引起肝细胞的严重损伤乃至死亡, 因而造成 CYP2E1 的表达减弱。10%的速眠新和 4%保定宁是诱导肝细胞内 CYP3A1 和 CYP 2E1 表达的最佳剂量。

参考文献

- [1] 张俊红. 动物麻醉研究进展[J]. 山西农业科学, 2007, 35(2): 85-88.
- [2] Zhu Y, Silverman RB. Revisiting Heme Mechanisms. A Perspective on the Mechanisms of Nitric Oxide Synthase (NOS), Heme Oxygenase (HO), and Cytochrome P450s (CYP450s) [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(8): 2231-2243.
- [3] Plate AY, Crankshaw DL, Gallaher DD. The effect of anesthesia by diethyl ether or isoflurane on activity of cytochrome P450 2E1 and P450 reductases in rat liver [J]. *Anesthesia and Analgesia*, 2005, 101(4): 1063-1064.
- [4] Kang HJ, Song IS, Lee SS, et al. Effects of dietary salt on the expression of drug transporters, cytochrome P4503a, and nuclear receptors in rats[J]. *Xenobiotica*, 2008, 38(2): 147-155.
- [5] Miki R, Tatsumi N, Matsumoto K, et al. New primary culture systems to study the differentiation and proliferation of mouse fetal hepatoblasts[J]. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2008, 294(2): 529-539.
- [6] 林德贵主编. 兽医外科手术学(第四版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 59-60

致谢: 感谢军事兽医研究所闫章年研究员提供保定宁。