

硒对氟中毒雏鸡肝脏细胞色素 P450 酶系主要亚型的影响

于倩, 左楠, 贾海燕, 李金敏, 王俊杰, 李术*

(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 本试验旨在研究硒对氟中毒雏鸡肝脏细胞色素 P450 酶系主要亚型活性(含量)的影响及 CYP3A37 基因转录情况。选取 180 羽 7 日龄健康雏鸡, 随机分为 3 组, 分别为正常组、氟中毒组和加硒组。正常组饲喂全价日粮; 氟中毒组在正常日粮中添加氟化钠(NaF), 使日粮中氟含量为 $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 加硒组在氟中毒组日粮基础上添加亚硒酸钠(Na_2SeO_3), 使日粮中硒含量为 $4\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。分别在第 30、60、90 天从各组随机选取 20 羽鸡, 采用比色法测定 P450 酶系主要亚型活性(含量), 利用 RT-PCR 方法测定 CYP3A37 mRNA 转录水平的变化。在添加氟化钠后第 30 天, 氟中毒组除细胞色素 P450 含量和氨基比林-N-脱甲基酶(AND)活性低于正常组外, 其余各酶活性(含量)较正常组均有增加($P < 0.05$); 在加硒组中, 除 NADPH-细胞色素 C 还原酶和苯胺-4-羟化酶活性低于氟中毒组外, 其余各亚型酶活性(含量)均高于氟中毒组($P < 0.05$)。第 60 天时, 氟中毒组酶活性(含量)均极显著高于正常组($P < 0.01$); 在加硒组中, 除 NADPH-细胞色素 C 还原酶和氨基比林-N-脱甲基酶活性略高于氟中毒组外($P > 0.05$), 其余各亚型酶活性(含量)均极显著低于氟中毒组($P < 0.01$)。第 90 天时, 氟中毒组除细胞色素 P450 含量略高于正常组外($P > 0.05$), 其余各亚型酶活性(含量)均极显著低于正常组($P < 0.01$); 加硒组中细胞色素 P450 含量和 NADPH-细胞色素 C 还原酶活性略低于氟中毒组, 其余各亚型酶活性(含量)均高于氟中毒组。在各时间点氟中毒组 CYP3A37 mRNA 转录水平均明显高于正常组($P < 0.01$); 加硒组中 mRNA 转录水平介于氟中毒组和正常组之间。结果提示, 饲料中添加氟化钠和亚硒酸钠可使鸡肝脏细胞色素 P450 酶系各亚型活性(含量)及 CYP3A37 mRNA 转录水平发生明显变化。

关键词: 细胞色素 P450; 鸡; 硒; 氟

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)06-0922-06

The Effect of Selenium on Main Subtypes of Hepatic Microsomal-cytochrome P450s in Chickens with Exposure of Fluoride

YU Qian, ZUO Nan, JIA Hai-yan, LI Jin-min, WANG Jun-jie, LI Shu

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

Abstract: The antagonism effect of selenium to fluorine on main subtypes of hepatic microsomal-cytochrome P450s and the CYP3A37 mRNA transcription level in chickens were investigated. 180 7-day-old healthy chickens were divided into 3 groups at random. The first group were fed with adequate ration (normal control group). The second group were fed with $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ diet NaF adequate ration (fluorosis group). The third group were fed with $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ diet NaF and $4\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ diet Na_2SeO_3 adequate ration (selenium group). The whole experiment lasted for 90 days. On 30th, 60th, 90th day, 20 chickens in each group were randomly selected for detecting hepatic microsomal-cytochrome P450s activities and CYP3A37 transcription level. Results: On the 30th day, the hepatic microsomal-cytochrome P450s activities of fluorosis group were higher

收稿日期: 2008-07-11

作者简介: 于倩(1982-), 女, 硕士生, 主要从事动物生理学及动物中毒病学研究, E-mail: yuqian_@163.com

* 通讯作者: 李术, E-mail: lishu101@yahoo.com.cn

than that of normal group ($P < 0.05$), except the CYP450 contents and the AND activities. In selenium group, except NADPH-CytC activities and AH activities were lower than that of fluorosis group, the other enzymes' activities were higher ($P < 0.05$). On the 60th day, all the fluorosis group's hepatic microsomal-cytochrome P450s activities were significantly higher than that of normal group ($P < 0.01$). In selenium group, the activities of NADPH-CytC and AND were higher than that of fluorosis group ($P > 0.05$), and the other enzymes' activities were significantly lower ($P < 0.01$). On the 90th day, all the fluorosis group's hepatic microsomal-cytochrome P450s activities were significantly lower than that of normal group ($P < 0.01$) except CYP450. In selenium group, CYP450 and NADPH-CytC activities were slightly lower than that of fluorosis group, and the other enzymes' activities were higher. During each stage, transcription level of CYP3A37 mRNA in fluorosis group was higher than that of normal group's ($P < 0.01$). The mRNA transcription level in selenium group lies between that of normal group and fluorosis group. Fluoride can make significant changes on the activities of microsomal-cytochrome P450s and the transcription level of CYP3A37 mRNA. These results indicated that microsomal-cytochrome P450s participated in the process which selenium antagonized the toxicity of liver induced by fluoride.

Key words: cytochrome P450s; chicken; selenium; fluoride

氟是动物机体必需微量元素之一,适量的氟对动物体的生长发育以及维持骨骼、牙齿的正常结构和功能发挥重要作用,但过量摄入则对机体几乎所有的组织器官都有不同程度的损害。近年来,氟化物所致非骨相损害已引起广泛关注,对于如何减弱氟毒性也进行了一些研究,一些学者认为硒对氟中毒引起的机体损伤有一定的拮抗作用^[1-4]。

细胞色素 P450 (Cytochrom P450, CYP) 是广泛存在于生物体内的一类含血红素和巯基的蛋白质,由结构和功能相关的基因超家族编码形成的超家族酶系^[5]。CYP 450 酶系作为生物体内混合功能氧化酶系统的重要组成部分,不仅与内源性物质的代谢有关,还与外来化合物的生物转化有关,参与药物毒物的代谢灭活,是细胞药物及毒物代谢的主要酶系,具有广泛的生物学意义。现有研究表明,在肝损伤情况下,细胞色素 P450 酶系主要亚型活性(含量)均有明显变化^[6-7]。各亚型酶活性(含量)降低将直接或间接引起肝脏的解毒能力下降,加重肝脏损害。本试验旨在探讨硒对氟中毒雏鸡肝脏细胞色素 P450 酶系的影响,以及细胞色素 P450 酶系在此过程中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与处理

200 羽 1 日龄海蓝褐雏鸡(购自东北农业大学

孵化场)饲养 1 周后,选取健康雏鸡 180 羽,随机分为 3 组,每组 60 羽,分别为正常组、氟中毒组、加硒组。正常组饲喂全价日粮(购自哈尔滨新胜饲料有限公司);氟中毒组在正常日粮中添加氟化钠(NaF),使日粮中氟含量为 $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;加硒组在氟中毒组日粮基础上添加亚硒酸钠(Na_2SeO_3),使日粮中硒含量为 $4\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。采用阶梯式笼养方式,定期进行免疫预防,自由饮水和采食。试验期为 90 d,分别在第 30、60、90 天于每组中随机选取 20 羽进行采样及相关指标的检测。

1.2 主要试剂和仪器

考马斯亮蓝(Amresco);牛血清白蛋白,NADPH(Roche);红霉素,细胞色素 C(Sigma);CO 气体(哈尔滨市黎明气体有限公司)。GeneQuant1300 紫外/可见分光光度计(Biochrom);低温超速离心机(Beckman)。

1.3 方法

1.3.1 肝脏微粒体的制备 每次试验前 12 h 动物禁食,称重后颈静脉放血处死,迅速取出肝脏,用预冷的生理盐水冲去血渍,滤纸擦干,称重,根据体质量和肝脏质量,用差速离心法制备肝脏微粒体。

1.3.2 肝脏微粒体 CYP450 酶系主要亚型的检测

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。细胞色素 P450 含量的测定采用 CO 还原差示光谱法。细胞色素 b_5 含量和

NADPH-细胞色素 C 还原酶活性的测定采用化学比色法。氨基比林-N-脱甲基酶(AND)活性的测定和红霉素-N-脱甲基酶(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。苯胺-4-羟化酶(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。具体操作参考文献[8]。

1.3.3 肝脏 CYP3A37 mRNA 转录的测定 提取肝脏总 RNA,并用紫外分光光度计进行定量。取 1 μg 总 RNA 经引物 oligo(dT)18 在逆转录酶作用下合成 cDNA,以 cDNA 为模板,CYP3A37 引物(由上海生工生物工程技术有限公司合成)介导下进行 PCR 分析,并以 β -actin 作为内参。CYP3A37(序列号 AJ250337)引物序列:5'-CACTTGGTTACTGGCTTAC-3', 5'-CAGAGTCAGGAGAGCAAATC-3'; β -actin(序列号 BQ038127)引物序列:5'-AGCTATGAACTCCCTGATGG-3', 5'-TTCA-TCGTACTCCTGCTTGC-3'。PCR 程序:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火(温度 CYP3A37 为 52 $^{\circ}\text{C}$, β -actin 为 57.8 $^{\circ}\text{C}$)30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。预期扩增产物片段长度分别为 419 bp (CYP3A37)、378 bp(β -actin)。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,得到特异条带后测序进行产物鉴定,获得目的片段后使用 ChampGel-3000 凝胶图像处理系统扫描并分析 PCR 产物 OD 值。

1.4 数据处理

数据的统计分析应用 SAS for Windows 6.12 软件 Mantel-Haenszel 卡方检验(Chi-Square)模块进行;应用 Microsoft Excel 2003 对试验数据进行作图。

2 结果

2.1 牛血清白蛋白标准曲线

以系列浓度的牛血清白蛋白为横坐标,以 $OD_{595\text{nm}}$ 值为纵坐标绘制标准曲线,见图 1。此标准曲线的线性回归方程为 $y = 0.5685x + 0.0057$, $R^2 = 0.9979$ 。

2.2 甲醛标准曲线

以系列浓度的甲醛为横坐标,以 $OD_{420\text{nm}}$ 值为纵坐标绘制标准曲线,见图 2。其线性回归方程为 $y = 2.1268x - 0.0015$, $R^2 = 0.9978$ 。

2.3 对氨基酚标准曲线

以系列浓度的对氨基酚为横坐标,以 $OD_{420\text{nm}}$ 值为纵坐标绘制标准曲线,见图 3。其线性回归方

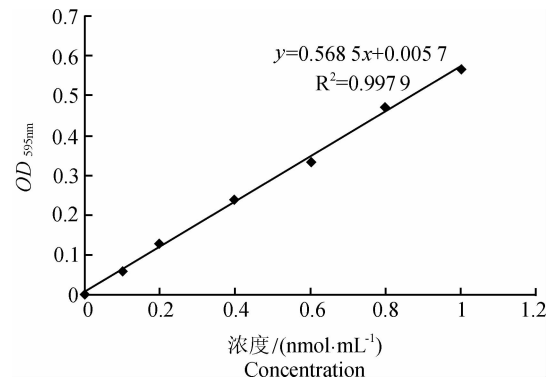


图 1 牛血清白蛋白标准曲线

Fig. 1 The calibration curve of bovine albumin

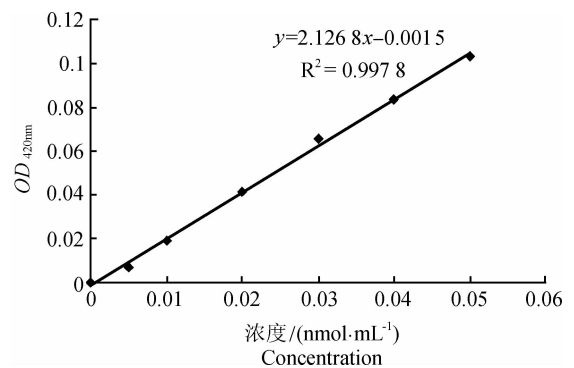


图 2 甲醛标准曲线

Fig. 2 The calibration curve of formaldehyde

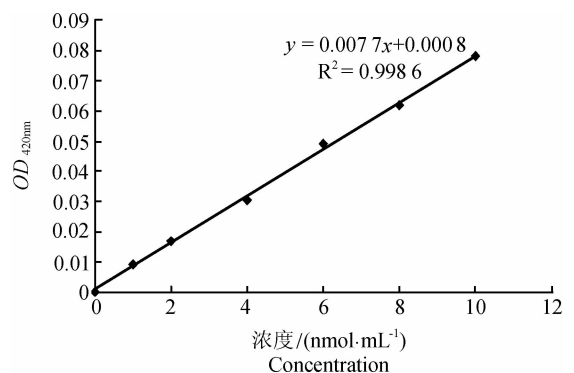


图 3 对氨基酚标准曲线

Fig. 3 The calibration curve of AND

程为 $y = 0.0077x + 0.0008$, $R^2 = 0.9986$ 。

2.4 肝脏微粒体 CYP450 酶系主要亚型的检测

2.4.1 细胞色素 P450 含量的测定结果 在不同时间点,各组肝脏 CYP450 含量均呈上升趋势。第 30 天时,氟中毒组低于正常组,加硒组高于正常组,各组间差异均极显著($P < 0.01$)。第 60 天时,氟中毒组 CYP450 含量极显著高于正常组($P < 0.01$),

加硒组酶含量极显著低于正常组 ($P < 0.01$)。第 90 天时, 氟中毒组与正常组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 加硒组酶含量低于正常组和氟中毒组 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 肝脏微粒体 CYP450 酶系主要亚型的检测结果

Table 1 Influence of fluorine and selenium on the liver CYP, Cytb5, NADPH-CytC, AND, ERND, AH in chicken

项目 Items	组别 Group	The 30 th day	The 60 th day	The 90 th day
细胞色素 P450/(nmol·mg ⁻¹) Cytochrome P450	正常组 Control	1.577±0.016 ^{Bb}	2.141±0.050 ^{Bb}	7.209±0.226 ^{Aa}
	氟中毒组 Fluorosis	1.064±0.023 ^{Cc}	3.539±0.053 ^{Aa}	7.375±0.246 ^{Aa}
	加硒组 Selenium	1.901±0.114 ^{Aa}	0.948±0.006 ^{Cc}	6.739±0.108 ^{Ab}
细胞色素 b ₅ /(nmol·mg ⁻¹) Cytochrome b ₅	正常组 Control	2.162±0.391 ^{Bc}	2.116±0.141 ^{Bb}	5.867±0.422 ^{Aa}
	氟中毒组 Fluorosis	3.207±0.290 ^{Bb}	3.931±0.621 ^{Aa}	2.444±0.444 ^{Bc}
	加硒组 Selenium	5.407±0.389 ^{Aa}	1.241±0.374 ^{Bc}	3.512±0.189 ^{Bb}
NADPH-细胞色素 C 还原酶/ (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹) NADPH-Cytochrome C reductase	正常组 Control	3.006±0.048 ^{Bc}	3.102±0.118 ^{Bb}	4.319±0.233 ^{Aa}
	氟中毒组 Fluorosis	4.307±0.237 ^{Aa}	3.770±0.199 ^{Aa}	3.153±0.204 ^{Bb}
	加硒组 Selenium	3.376±0.175 ^{Bb}	4.102±0.276 ^{Aa}	2.859±0.204 ^{Bb}
氨基比林-N-脱甲基酶(AND)/ (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹) Aminopyrine-N-demethylase	正常组 Control	2.268±0.164 ^{Aa}	2.045±0.134 ^{Bb}	2.192±0.173 ^{Ba}
	氟中毒组 Fluorosis	1.612±0.135 ^{Bb}	2.584±0.012 ^{Aa}	1.622±0.052 ^{Bc}
	加硒组 Selenium	2.015±0.179 ^{ABa}	2.721±0.046 ^{Aa}	2.448±0.091 ^{Aa}
红霉素-N-脱甲基酶(ERND)/ (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹) Erythromycin-N-demethylase	正常组 Control	0.545±0.016 ^{Cc}	1.380±0.154 ^{Cc}	2.044±0.066 ^{Aa}
	氟中毒组 Fluorosis	1.889±0.062 ^{Bb}	2.387±0.164 ^{Aa}	1.085±0.134 ^{Bb}
	加硒组 Selenium	2.314±0.063 ^{Aa}	1.841±0.127 ^{Bb}	2.237±0.152 ^{Aa}
苯胺-4-羟化酶(AH)/ (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹) Aniline-4-hydroxylase	正常组 Control	0.199±0.004 ^{Cc}	0.083±0.002 ^{Bb}	0.210±0.001 ^{Bb}
	氟中毒组 Fluorosis	0.306±0.001 ^{Aa}	0.193±0.002 ^{Aa}	0.150±0.001 ^{Cc}
	加硒组 Selenium	0.237±0.012 ^{Bb}	0.077±0.001 ^{Cc}	0.259±0.003 ^{Aa}

标大写角码字母完全不同者表示同一指标两组数值比较差异极显著 ($P < 0.01$), 标有完全不同小写角码字母者表示同一指标两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 same superscripts in the same column differ insignificantly ($P > 0.05$). The same as below

2.4.2 细胞色素 b₅ 含量的测定结果 在不同时间点, 正常组细胞色素 b₅ 含量先略有下降后呈上升趋势, 氟中毒组呈先上升后下降趋势, 加硒组呈先下降后上升趋势。第 30 天时, 氟中毒组酶含量高于正常组 ($P < 0.05$), 加硒组酶含量极显著高于氟中毒组 ($P < 0.01$)。第 60 天时, 氟中毒组高于正常组, 加硒组低于正常组, 差异均极显著 ($P < 0.01$)。第 90 天时, 氟中毒组和加硒组酶含量均极显著低于正常组 ($P < 0.01$), 且氟中毒组酶含量显著低于加硒组 ($P < 0.05$), 详见表 1。

2.4.3 NADPH-细胞色素 C 还原酶活性的测定结果 在不同时间点, 正常组酶活性呈上升趋势, 氟中毒组呈持续下降趋势, 加硒组呈先上升后下降趋势。第 30 天时, 氟中毒组酶活性极显著高于正常组和加硒组 ($P < 0.01$), 加硒组略低于氟中毒组 ($P < 0.05$)。第 60 天时, 氟中毒组酶活性极显著高于正

常组 ($P < 0.01$), 加硒组酶活性与氟中毒组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。第 90 天时, 氟中毒组极显著低于正常组 ($P < 0.01$), 加硒组与高氟组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。详见表 1。

2.4.4 氨基比林-N-脱甲基酶(AND)活性的测定结果 在不同时间点, 正常组 AND 活性变化不明显, 氟中毒组和加硒组酶活性均呈先升高后降低的趋势。第 30 天时, 氟中毒组酶活性极显著低于正常组 ($P < 0.01$), 加硒组显著高于氟中毒组 ($P < 0.05$)。第 60 天时, 氟中毒组酶活性极显著高于正常组 ($P < 0.01$), 加硒组略高于氟中毒组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。第 90 天时, 氟中毒组酶活性极显著低于正常组 ($P < 0.01$), 加硒组酶活性极显著高于氟中毒组 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.4.5 红霉素-N-脱甲基酶(ERND)活性的测定结果 在不同时间点, 正常组酶活性呈持续上升趋势,

氟中毒组呈先升高后降低趋势,加硒组呈先降低后升高趋势。第30天时,氟中毒组ERND活性极显著高于正常组($P < 0.01$),加硒组酶活性极显著高于氟中毒组($P < 0.01$)。第60天时,氟中毒组酶活性极显著高于正常组,加硒组介于正常组与氟中毒组之间,组间差异均极显著($P < 0.01$)。第90天时,氟中毒组酶活性极显著低于正常组($P < 0.01$),加硒组酶活性极显著高于氟中毒组($P < 0.01$),见表1。

2.4.6 苯胺-4-羟化酶(AH)活性的测定结果 在不同时间点,正常组呈现持续下降趋势,氟中毒组和加硒组均呈先下降后上升趋势。第30天时,氟中毒

组AH活性极显著高于正常组($P < 0.01$),加硒组酶活性低于氟中毒组($P < 0.05$)。第60天时,氟中毒组酶活性极显著高于正常组($P < 0.01$),加硒组极显著低于氟中毒组($P < 0.01$)。第90天时,氟中毒组酶活性极显著低于正常组($P < 0.01$),加硒组极显著高于氟中毒组($P < 0.01$),见表1。

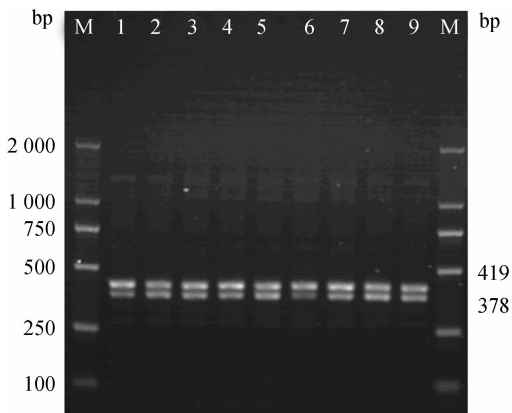
2.5 肝脏 CYP3A37 mRNA 转录的检测结果

如表2所示,各时间点氟中毒组CYP3A37 mRNA转录水平明显高于对照组($P < 0.01$),加硒组转录水平介于氟中毒组和正常组之间,见图4。

表2 肝脏 CYP3A37mRNA 转录的检测结果

Table 2 mRNA transcription level of CYP3A37 in chicken liver

组别 Group	The 30 th day	The 60 th day	The 90 th day
正常组 Control	0.827±0.006 ^{Cc}	0.892±0.030 ^{Bb}	0.883±0.049 ^{Bb}
氟中毒 Fluorosis	0.956±0.037 ^{Aa}	0.949±0.016 ^{Aa}	1.017±0.052 ^{Aa}
加硒组 Selenium	0.894±0.032 ^{Bb}	0.798±0.012 ^{Cc}	0.904±0.034 ^{Bb}



M. DL2000 marker;1,4,7. 正常组第30、60、90天;2,5,8. 氟中毒组第30、60、90天;3,6,9. 加硒组第30、60、90天

M. DL2000 marker; 1, 4, 7. Products of the 30th, 60th, 90th day of control group; 2, 5, 8. Products of the 30th, 60th, 90th day of Fluorosis group; 3, 6, 9. Products of the 30th, 60th, 90th d of selenium group

图4 CYP3A37的RT-PCR产物凝胶电泳

Fig. 4 The gel electrophoresis of CYP3A37 PCR amplification products

3 讨论

20世纪80年代末期,通过对氟病区流行病学的调查,人们开始关注氟与硒的相互关系。研究发现,外环境硒含量与氟中毒发生有密切关系^[9],氟、

硒配比浓度低或低硒高氟时,硒对氟表现为拮抗作用。作者参照刘国艳^[10]的报道,选用饲料中添加氟化钠,使氟含量为1000 mg·kg⁻¹,可成功复制出鸡氟中毒模型,同时饲料中添加亚硒酸钠,使硒含量为4 mg·kg⁻¹进行硒拮抗效应的探讨。

细胞色素P450酶系作为功能单位由许多组部分组成,主要包括2种细胞色素(细胞色素P450和细胞色素b₅)、2种黄素蛋白(NADPH-细胞色素P450还原酶和NADH-细胞色素b₅还原酶)、磷脂等。几乎所有的生命体中都发现有CYP450的存在,且在同种生物的不同器官和组织中其分布具有一定的选择性。脊椎动物的肝脏是CYP450含量最丰富的器官^[11]。同时肝脏也是动物机体物质转化的主要器官和场所,也是毒物最先、最易侵袭的器官。大量研究表明,氟化物作为一种外源性毒物,可导致肝脏线粒体的畸形和增生、内质网的减少和破坏^[12-14],而微量元素硒对维持生物膜的完整性及生物大分子的正常功能均产生至关重要的影响,因此认为适量的硒可有效拮抗由氟中毒引起的肝脏损伤。

在外源物质对细胞色素P450酶系主要亚型酶活性(含量)产生的影响方面许多学者也进行了相应的研究。侯艳宁等发现黄芩甙对由于各种原因造成肝损伤动物模型具有明显的保护作用,连续7d给小鼠灌胃黄芩甙(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)后检测细胞色素P450酶系,结果显示黄芩甙可显著诱导小鼠

肝微粒体细胞色素 P450 的含量及活性,但对细胞色素 b_5 、CYP3A2、CYP2D1 以及 CYP2E1 却无诱导作用^[15]。王启斌等研究了葛根素体外对细胞色素 P450 酶系 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 活性的影响,结果表明低浓度葛根素 ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 CYP1A2 和 CYP2D6 酶活性有较明显的体外抑制作用,且随着葛根素浓度的增高,对这两种酶活性的抑制作用也增强^[16]。

饲喂氟化钠和亚硒酸钠后鸡 P450 酶系中主要亚型细胞色素 P450 含量,细胞色素 b_5 含量, NADPH-细胞色素 C 还原酶活性, AND、ERND 和 AH 活性均发生了明显变化。试验结果表明,在添加氟化钠后第 30 天时,过量氟可降低肝脏微粒体中 CytP450 含量和 AND 活性,加硒后则可抑制这两种酶活性(含量)的降低。提示过量氟造成肝脏膜性结构损伤,加硒可拮抗氟的细胞毒性。第 60 天时,氟中毒组各酶活性(含量)均高于正常组,加硒组中 CytP450 含量、细胞色素 b_5 含量和 AH 活性低于正常组,其余各酶活性均高于正常,表明硒对 CytP450、细胞色素 b_5 含量及 AH 活性具有抑制作用,其机制可能为 CytP450 在缓解氟毒性过程中可产生过氧化物,细胞色素 b_5 则可促进此过程的发生,过氧化物大量增多则导致肝脏组织的进一步损伤,而硒可以硒蛋白形式清除体内过量自由基。第 90 天时,氟中毒组除 CytP450 含量略高于正常组外,其他主要亚型酶活性(含量)均低于正常,而加硒组 CytP450 含量、细胞色素 b_5 含量和 NADPH-细胞色素 C 还原酶活性低于正常组, AND、ERND 和 AH 活性均高于正常组,各时间点亚型活性变化无显著规律可能是由于 CYP450 在进化过程中保守性差,其亚型活性在受外源物质作用时存在被抑制或被活化两种情况,并且大多数 CYP450 表现有临床意义的遗传多态性,即当外源物质主要由某一特定 CYP450 亚型酶代谢时,不同个体对外源物质的代谢可能有显著差异^[17]。

此外,本试验还对肝脏 CYP3A37 mRNA 转录水平情况进行了检测,结果显示氟中毒时肝脏 CYP3A37 mRNA 的表达水平高于正常组,加硒组则介于正常组与氟中毒组之间。提示过量氟可从分子水平改变混合功能氧化酶的活性,从而影响机体肝脏 P450 酶系的正常生理功能和活性,促进氧化应激的发生和发展,最终导致肝脏的结构和功能发生病理性损伤。说明 CYP450 活性和表达的改变可能是氟致肝损伤的毒理机制之一。

由于 CYP450 家族成员多,分布广,有些 CYP450 的底物有交叉重叠,另外外源物质在不同的个体经代谢后的作用呈多向性,因此对 CYP450 催化外源物质代谢过程中的调控作用目前还没有定论,仍需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 李贤相,翟大耀,王玉林,等. 硒对氟致大鼠脂质过氧化拮抗作用[J]. 中国公共卫生,2004,20(1):15-16.
- [2] 边建朝,咸树梅,叶平,等. 硒对氟致机体损伤保护作用的研究[J]. 中国地方病防治杂志,2004,19(5):257-260.
- [3] 杨成峰,陈学敏,吴建平. 氟致大鼠肝脏脂质过氧化及硒的拮抗作用研究[J]. 中国地方病防治杂志,1995,10(5):263-264.
- [4] 王爱国,夏涛,冉鹏,等. 硒与氟对人肝细胞凋亡和脂质过氧化的影响[J]. 中华预防医学杂志,2002,3(4):235-238.
- [5] Nelson D R, Luc K, Tetsuya K, et al. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature[J]. *Pharmacogenetics*, 1996, 6: 1.
- [6] 施畅,王和枚,廖明阳. 异环磷酸胺对大鼠肝脏毒作用及其机理探讨[J]. 中国公共卫生,2001,17(5):388-390.
- [7] 夏伟. 细胞色素 P450 的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册,2000,27(1):41-45.
- [8] 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.
- [9] 边建朝. 硒与氟及自由基代谢与氟病关系研究[J]. 中国地方病防治杂志,1997,12(2):119-122.
- [10] 刘国艳. 鸡氟中毒的毒理学研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2000.
- [11] Mari T, Stefan L, Gustaf H, et al. Gene expression of cytochromes P450 in liver transplantover time[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 60: 413-420.
- [12] 钟山,翟祥虎,钟海,等. 实验性氟中毒小鼠肝细胞超微结构观察[J]. 中国地方病学杂志,1999,189(5):326-327.
- [13] 莫志亚,卢振明,乔广贤,等. 氟中毒大鼠不同系统损害的超微结构观察[J]. 中国地方病学杂志,2005,24(5):523-525.
- [14] 于琳华,张富军,张增铁,等. 过量氟对大鼠肾肝心损害的形态学研究[J]. 中国地方病学杂志,2001,20(2):104-106.
- [15] 侯艳宁,朱秀媛,程桂芳. 黄芩甙对小鼠肝细胞色素 P₄₅₀ 及其亚家族的诱导[J]. 解放军药学报,2000,16(2):68-71.
- [16] 王启斌,狄伟,程晓莉,等. 葛根素对细胞色素 P₄₅₀ 酶活性的影响[J]. 医药导报,2008,27(5):500-504.
- [17] 马小超,屠曾宏. 细胞色素 P450 在药源性肝损伤中的作用[J]. 世界华人消化杂志,2003,11(3):338-341.