

氰戊菊酯对草鱼肝微粒体 CYP3A 活性的影响*

陈秀荣^{1,2} 罗宇良^{1,2*} 曾令兵¹ 闫海燕²

1. 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室/中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000;
2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 通过设计 1.2、6.0、12.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 3 个氰戊菊酯质量浓度组, 1 个空白对照组, 1 个恩诺沙星阳性对照组, 进行氰戊菊酯对草鱼肝微粒体 CYP3A 活性影响及草鱼 CYP3A 活性的组织分布研究。结果表明: CYP3A 存在于肝脏、鳃、肾脏、脾、肠、脑组织中, 其中肝脏中活性最高; 氰戊菊酯能显著抑制 CYP3A 的活性, 随暴露时间的延长抑制作用增强, 但抑制趋势减弱, 3 d 内趋势最强, 各试验浓度组之间的差异不显著。建议临床用药, 尤其是联合用药、多次用药时要充分考虑氰戊菊酯对代谢酶活性的影响。

关键词 草鱼; CYP3A 活性; 氰戊菊酯; 药物代谢

中图分类号 S 948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0768-04

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 是最重要的 I 相代谢酶系, 主要催化药物的氧化反应; CYP3A 是含量极为丰富的 CYP450 亚家族酶系, 约占 30%~40%。机体内大部分内源性的物质以及外源性脂溶性的物质都能被 CYP3A 转化成水溶性的物质, 减少毒物在体内的积累^[1]。CYP3A 可被外源性物质诱导或抑制, 从而导致由该酶代谢的药物的药代动力学性质发生显著变化, 在临床上引起药物相互作用。很多药物是 CYP3A 的诱导剂或抑制剂, 例如, 农药氰戊菊酯与辛硫磷混配后, 小鼠体内氰戊菊酯的消除半衰期延长、消除速率降低^[2]; 恩诺沙星对鲈的 CYP3A 活性起抑制作用^[3]; 多溴联苯对鲫 CYP3A 起诱导作用^[4]。由此可见, CYP3A 抑制可改变药物的代谢和血药浓度, 并影响药物的疗效。

氰戊菊酯在水产养殖上常用来治疗淡水鱼类体表锚头蚤、中华蚤、鲰等甲壳类寄生虫。了解氰戊菊酯对鱼类 CYP3A 活性影响, 对于预测药物在鱼体内的代谢、消除、临床上药物间的相互作用有着重要的意义。红霉素是 CYP3A 的特异性底物, 通过检测红霉素-N-脱甲基酶活性 (ERND) 可以很好地评价鱼类 CYP3A 的活性^[3,5-7]。本研究以草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 为研究对象, 探讨氰戊

菊酯对鱼类 CYP3A 活性的影响, 旨在指导氰戊菊酯在水产养殖上的合理、安全使用。

1 材料与方法

1.1 材料

试验草鱼: 1 龄, 体长 (19.08 ± 1.74) cm, 体重 (109.27 ± 15.26) g, 购于湖北省仙桃渔场。

氰戊菊酯原药: 质量分数为 90%, 武汉农大生物科技有限公司生产, 批号: 081126; 制成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液备用。

恩诺沙星原药: 质量分数为 92%, 浙江新华制药股份有限公司生产, 批号: 20080518; 现用现配。

1.2 方法

1) 暴露染毒。试验在直径为 0.8 m 圆形水族箱中进行, 有效水量 200 L。根据危险化学品鱼类急性毒性分级试验方法 (GB/T 21281-2007), 进行氰戊菊酯对草鱼 96 h 的急性毒性试验, 求出 96 h 半致死质量浓度 (96 h-LC₅₀) 为 60.62 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。本试验选取 96 h-LC₅₀ 的 1/50、1/10、1/5 三个浓度, 即 1.2、6.0、12.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 作为试验浓度组, 同时设空白对照组和阳性对照组 (恩诺沙星 10 mg/L), 每个浓度组中投放 30 尾驯养好的草鱼。正式试验期为 9 d, 并于第 1 次染毒后第 1、2、3、6、9 天采样。试验

收稿日期: 2010-01-25; 修回日期: 2010-06-04

* 国家“973”项目子课题 (2009CB118706) 和中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放基金 (2010FEA03011) 资助

** 通讯作者。E-mail: liang@mail.hzau.edu.cn

陈秀荣, 女, 1984 年生, 华中农业大学水产学院硕士研究生。研究方向: 水产动物疾病防治。E-mail: chenxr625@yahoo.com.cn

期间,每 24 h 更换药液 1 次,定时投喂,采样前 24 h 禁食。养殖水温(23 ± 2) °C,溶氧(6 ± 0.5) mg/L, pH 值为 7.5 ± 0.5 。

2) 肝微粒体的制备。采用聚乙二醇提取法^[6]制备。解剖草鱼,立即取肝脏组织,用预冷的 KCl- H_3PO_4 缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4, 含 KCl 0.15 mol/L)反复冲洗除净组织上血液,滤纸吸干,称质量,加入 1:5 冰浴的匀浆缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 含 KCl 0.15 mol/L, EDTA 1 mmol/L, PMSF 0.1 mmol/L),微量组织匀浆器匀浆,匀浆液在 4 °C 下 10 848 r/min 离心 25 min,取上清,加入质量分数为 50% 的聚乙二醇,使终质量分数为 8.5%,4 °C 下 12 369 r/min 离心 20 min,弃去上清液,沉淀部分即为微粒体。沉淀用 KCl-Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)漂洗,再用匀浆器匀浆,加入质量分数为 50% 的聚乙二醇至终质量分数为 8.5%,重复离心后即得微粒体组分。将微粒体用悬浮液(0.1 mol/L PBS, pH 7.4, 含 KCl 0.15 mol/L、甘油 30%、PMSF 1 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, DTT 0.1 mmol/L)悬浮,每 g 组织加 1 mL 悬浮缓冲液,分装于冻存管中,−80 °C 冰箱中保存。所有操作都在 4 °C 以下进行。

3) 肝微粒体蛋白浓度测定。以 Bradford 法进行。

4) 甲醛标准曲线的制备。配制系列甲醛标准溶液,浓度分别为 0.00、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mmol/L,采用 Nash 比色法,412 nm 处测定吸光值。以 $D_{412 \text{ nm}}$ 值为纵坐标,甲醛浓度为横坐标,绘制甲醛标准曲线。

5) 红霉素 N-脱甲基酶活性法(ERND)测定 CYP3A 活性^[5-7]。N-脱甲基反应是药物经肝脏 P450 代谢酶代谢的一个共同途径, α -碳原子羟化,之后甲醇胺中间产物分解释放出甲醛,Nash 比色法测定甲醛的生成量。反应体系选取 CYP3A 的特异性底物——红霉素,反应温度为 25 °C,反应时间 30 min。根据甲醛标准曲线计算 CYP3A 酶活性(nmol/(min·mg))。

6) 另取 10 尾草鱼,取肝脏、肾脏、脾脏、肠、鳃、脑,按上述 2)~5) 步骤分别测定各个组织中 CYP3A 的活性。

1.3 数据分析

用 SPSS11.5 软件,对试验数据进行统计分析,One-Way ANOVA Duncan 进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 曲线方程

以系列的牛血清白蛋白浓度为横坐标, $D_{595 \text{ nm}}$ 值为纵坐标绘制蛋白质标准曲线。当蛋白质量浓度在 0.1~0.8 g/L 时与 D 值有良好的线性关系,其最低检测限为 0.1 g/L。曲线方程和相关系数见图 1。

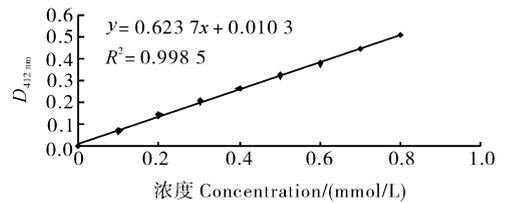


图 1 牛血清白蛋白标准曲线

Fig. 1 Standard curve of bovine serum albumin

以系列甲醛浓度为横坐标, $D_{412 \text{ nm}}$ 值为纵坐标绘制甲醛标准曲线。当甲醛浓度在 0.005~0.070 mmol/L 时与 D 值有良好的线性关系,其最低检测限为 0.005 mmol/L。曲线方程和相关系数见图 2。

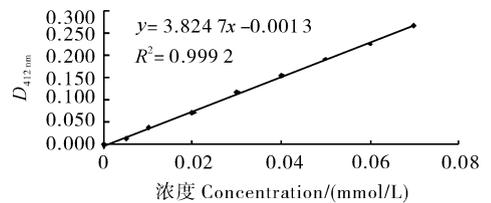


图 2 甲醛标准曲线

Fig. 2 Standard curve of formaldehyde

2.2 草鱼 CYP3A 的组织分布

通过对草鱼各组织中 CYP3A 活性的检测,发现肝脏、鳃、肾脏、脾脏、肠、脑组织中都含有 CYP3A,说明 CYP3A 广泛分布于草鱼各组织中,但活性不同。肝脏中活性最高,为 0.837 nmol/(min·mg),是其他组织的 2~4 倍;其次为鳃(0.323 nmol/(min·mg))、肾脏(0.303 nmol/(min·mg));再次为脾脏(0.227 nmol/(min·mg))、肠(0.215 nmol/(min·mg)),最后为脑(0.192 nmol/(min·mg))。

2.3 氰戊菊酯对草鱼肝微粒体 CYP3A 活性的影响

氰戊菊酯对草鱼肝微粒体 CYP3A 活性影响结果见表 1。可以看出:试验组 CYP3A 活性下降,染毒 1 d 氰戊菊酯 6 $\mu\text{g/L}$ 浓度组就显著下降($P < 0.05$),12 $\mu\text{g/L}$ 浓度组极显著下降($P < 0.01$)。表明氰戊菊酯对草鱼肝微粒体 CYP3A 活性起抑制作用,且随暴露时间的延长抑制作用增

强,但抑制趋势减弱,在 1~3 d 内抑制趋势最强。强,低浓度组抑制作用弱,但各浓度组之间差异不显著抑制作用在各浓度组之间表现为高浓度组抑制作用显著($P>0.05$)。

表 1 氰戊菊酯对草鱼肝 CYP3A 活性的影响¹⁾

Table 1 The effects of fenvalerat on hepatic CYP3A activity in grass carp

nmol/(min·mg)

组别 Group	暴露时间 Exposed time/d				
	1	2	3	6	9
0.0 μg/L	0.827±0.049 a	0.830±0.083 a	0.822±0.059 a	0.814±0.077 a	0.809±0.028 a
1.2 μg/L	0.763±0.034 a	0.555±0.014 b	0.467±0.050 b	0.377±0.028 b	0.353±0.010 b
6.0 μg/L	0.733±0.032 ab	0.571±0.023 b	0.417±0.004 b	0.358±0.061 b	0.323±0.068 b
12.0 μg/L	0.649±0.028 b	0.536±0.028 b	0.409±0.036 b	0.367±0.061 b	0.253±0.021 b
阳性对照 Positive control	0.356±0.022 c	0.256±0.005 c	0.230±0.046 c	0.206±0.052 c	0.186±0.017 b

1)表中同一列数据后,字母相同表示差异不显著($P>0.01$),字母不同表示差异极显著($P<0.01$)。In the same column, the same letter shows no difference($P>0.01$), the different letters show very significance of difference($P<0.01$).

3 讨论

3.1 鱼类肝微粒体的提取及测定方法的选择

哺乳动物肝微粒体提取的常见方法有钙沉淀法、聚乙二醇法、差速离心法,但鱼类肝微粒体的提取方法研究较少。舒耀皋^[6]研究表明差速离心法优于聚乙二醇法,聚乙二醇法优于钙沉淀法,但测得 CYP450 总活性、CYP3A 活性差别甚微。差速离心法虽然操作简单,但耗时较长,对离心机要求较高,不适合一般实验室的需求。所以本文采用聚乙二醇法提取肝微粒体。

CYP3A 活性测定常用的方法有 2 种,一是体外肝微粒体酶生化分析法^[3,5-7],通过加入特异性的底物红霉素,采用紫外或荧光分光光度计测定甲醛的生成速率;二是体内探针药物代谢法^[3,8],通过测定 CYP3A 代谢的特异性底物(探针药)的消除速率来反映 CYP3A 的活性,但要确信探针药物和要评价的药物无反应、无相互作用。本试验采用特异性底物红霉素、紫外分光光度计法,无论体外还是体内都被研究者^[5-7]证明灵敏可靠、重复性良好,操作也简便。笔者在前人研究的基础上优化了反应体系的孵育温度,25℃孵育,减少了高温对酶系的损伤。本试验得出草鱼肝药酶 CYP3A 的活性为 0.837 nmol/(min·mg),远远高于张宁等^[9]用氨基比林-N-脱甲基酶测得的草鱼 CYP3A 活性(0.207 nmol/(min·mg))。

3.2 草鱼肝微粒体组织分布比较

Briubo 曾证明鱼类的 CYP450 主要分布于肝、肾和鳃,并且肝脏中的 CYP450 含量明显高于其他组织^[10]。本试验研究得出 CYP3A 活性在组织中的含量从高到低为肝脏、鳃、肾脏、脾、肠、脑,肝脏中的含量是其他组织的 2.6~4.4 倍,与姜蕾对鲤

CYP3A 活性的组织分布高低顺序基本一致,但姜蕾测得肝脏中的含量是其他组织的 5~8 倍^[5],高于本试验的结果。这可能是因为 CYP3A 活性在草鱼的肝脏中活性比鲤低,CYP3A 活性具有种的差异性的原因。

本试验中 CYP3A 活性肝脏中最高,其次为鳃、肾、脾等,可能与肝脏是药物代谢的主要场所有关;可以推测药物等外源物质主要在鱼类的肝脏中代谢,但鳃、肾、脾等组织也可能参与了部分代谢。

3.3 氰戊菊酯对草鱼肝微粒体 CYP3A 活性的影响

CYP3A 是鱼类代谢大部分亲脂性有机化合物的主要酶,而拟除虫菊酯类农药绝大多数属于高亲脂性杀虫剂。本研究表明氰戊菊酯对草鱼肝 CYP3A 的活性起抑制作用,且随暴露时间的延长抑制作用增强,这与贺锡雯等^[11]以大鼠作为对象的研究结果相反,他们的研究表明,氰戊菊酯对大鼠的 P450 起诱导作用,因而可加快药物的消除,减少药物在体内的积累,这也许是氰戊菊酯对鱼类高毒而对哺乳动物低毒的原因之一。

氰戊菊酯对草鱼肝 CYP3A 活性的抑制必然导致依赖该酶代谢的其他药物在体内的滞留,或药物之间的相互作用可能导致临床治疗无效;药物残留甚至会危害人类的健康。Vaccaro 等^[3]研究表明恩诺沙星显著抑制黑鲈 CYP3A 的活性;姜蕾^[5]得出一定剂量的五倍子抑制肝微粒体 CYP3A 的活性,在水产动物疾病防治中要谨慎使用此类药物。氰戊菊酯对草鱼肝 CYP3A 活性的抑制提醒我们,在氰戊菊酯存在的水体中,使用直接以原型药物发挥作用的药物,会使药物的消除率降低,消除时间延长,血药浓度增加,就要考虑适当减少药量;当使用的药物以代谢产物的形式发挥作用,就要适当增加用量,否则难以达到预期的疗效。

参 考 文 献

- [1] 王沫, 谭福杰, 尤子平. 棉铃虫对氰戊菊酯的抗性机理研究[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(4): 344-349.
- [2] 张增利, 童建, 杨淑琴, 等. 混配农药中氰戊菊酯在小鼠体内的代谢和分布[J]. 苏州医学院学报, 2000, 20(6): 517-518.
- [3] VACCARO E, GIORGI M, LONGO V, et al. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquatic Toxicology, 2003, 62: 27-33.
- [4] 吴伟, 瞿建宏, 聂凤琴, 等. 多溴联苯醚胁迫下鲫鱼肝脏微粒体 CYP3A1 和 GST 的响应[J]. 生态环境学报, 2009, 18(3): 805-810.
- [5] 姜蕾. 五倍子对鲤鱼细胞色素 P4503A 的影响和药效研究[D]. 重庆: 西南大学动物科技学院, 2006.
- [6] 舒耀皋. 几种农药对鲫鱼肝脏微粒体 P450 酶系的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学草业与环境科学学院, 2008.
- [7] 李聘, 杨先乐, 张书俊, 等. 草鱼肝细胞系中 CYP3A 活性检测方法[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(5): 495-499.
- [8] 张荣, 宓德卿, 王宁生. 细胞色素 CYP3A 活性标志物咪唑唑仑的药物动力学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(1): 34-37.
- [9] 张宁, 喻文娟, 王翔凌, 等. 草鱼肝微粒体的提取及 CYP 酶活性的测定[J]. 海洋渔业, 2007, 29(2): 148-152.
- [10] BRIUBO E B. Metabosm-dependent blinding of the heteroerele ainine Trip-P. I in endothelial cells of choroids plexus and in large cerebral veins of cytochrome P450-induced mice[J]. Brain Res, 1994, 659(1/2): 91-98.
- [11] 贺锡雯, 张伟华, 吕京, 等. 氰戊菊酯对细胞色素 P450 2B1/2B2 的诱导[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1999, 13(3): 222-226.

Effect of Fenvalerat on Activity of Hepatic CYP3A in Grass Carp

CHEN Xiu-rong^{1,2} LUO Yu-liang^{1,2} ZENG Ling-bing¹ YAN Hai-yan²

1. Key Laboratory of Freshwater Fish Ecology & Healthy Culture of Chinese Academy of Fishery Sciences, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The CYP3A activity in different tissues of grass carp and the effect of fenvalerat on the hepatic CYP3A activity had been studied. There were three test concentrations, 1, 2, 6, 0, 12.0 $\mu\text{g/L}$, respectively, a blank control, and a positive control of enrofloxacin to study the effect of fenvalerat on the hepatic CYP3A activity in grass carp. The results showed that CYP3A activity was detected in liver, gill, kidney, spleen, intestine and brain, with the highest activity in liver. Fenvalerate significantly inhibited the hepatic CYP3A activity and this effect was enhanced with the exposure time. The effect was weakened after 3 days. There were no significant differences between the test groups. Therefore, the clinical use of this pyrethroid, especially combination therapy in aquaculture should be in caution.

Key words grass carp; CYP3A activity; fenvalerat; drug metabolism

(责任编辑: 边书京)