

3 Gy γ 射线照射和丝裂霉素 C 对大鼠肝脏细胞色素 P450 含量及其同工酶 CYP2B1、CYP2E1 活性的影响

严敏芬 郝福荣 许立明 童顺高 季华钧 沈芝芬 金一尊

(复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 为研究 3 Gy γ 射线全身照射和丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC) 对雄性 (Sprague-Dawley, SD) 大鼠肝脏细胞色素 P450 含量、CYP2B1、CYP2E1 活性的影响, 分别给大鼠腹腔注射 1 mg/kg d 的 MMC (分 1 d, 连续 3 d 及 6 d 用药三组), 3 mg/kg 的 MMC 1 d, 3 Gy γ 射线全身照射, 3 Gy γ 射线全身照射加 1 d 3 mg/kg MMC, 另设空白对照和溶剂对照。各组处理结束后 24 h, 处死大鼠取肝脏, 制备微粒体, 测 P450 含量、CYP2B1、CYP2E1 活性。实验结果表明, 给 MMC 1 mg/kg d, 1 d 后 P450 含量、CYP2B1 活性变化无统计学差异 ($p>0.05$), CYP2E1 活性明显上升 ($p<0.01$); 连续 3 d 或 6 d 后, P450 含量、CYP2B1、CYP2E1 活性均无明显变化 ($p>0.05$)。给 3 mg/kg 的 MMC 1 d, 对 P450 含量、CYP2B1 活性影响无统计学差异 ($p>0.05$), CYP2E1 活性上升明显 ($p<0.01$); 3 Gy γ 射线全身照射后, P450 含量、CYP2B1 活性无明显变化 ($p>0.05$), CYP2E1 活性下降 ($p<0.05$); 分析发现, 3 mg/kg MMC 与 3 Gy γ 射线之间没有交互作用。结果提示, γ 射线可以抑制雄性 SD 大鼠肝脏 CYP2E1 活性, MMC 对 CYP2E1 活性有诱导作用, 但多次刺激使其耐受, P450 含量、CYP2B1 活性对 γ 射线、MMC 不敏感。

关键词 γ 照射, 丝裂霉素 C, P450, CYP2B1, CYP2E1

中图分类号 R730.53, R730.55

恶性肿瘤的发病率和死亡率逐年上升, 已经成为严重威胁人类健康和生命的主要疾病之一。目前, 肿瘤治疗的手段主要为: 手术切除、化学治疗和放射治疗。而这三种手段的合用已成为肿瘤治疗的重要方法, 如: 放疗和化疗的联合, 化疗中的多药联用。在其他疾病的治疗中也经常采用联合用药手段。随之而来的是药物相互作用所致的不良反应, 这已引起人们的重视。其中, 以前知之甚少的药物代谢性相互作用, 更是人们关注的热点。大多数严重的药物相互作用, 给患者造成人身危害, 甚至死亡, 一些新药也因此迅速告退。因而代谢性相互作用的研究, 具有重要的社会意义和经济意义。细胞色素 P450 是哺乳动物肝脏药物代谢的主要酶类, 它对各类药物代谢和疗效的影响, 已越来越受到国内外学者的重视^[1-3]。在肿瘤的治疗中, 它不仅参与大量抗癌药物的代谢转化, 而且在一些细胞增殖分化有关的内源性物质的代谢中发挥重要作用。P450 酶系中各类同工酶在药物代谢中所起的作用并不相同, 所以 P450 及其同工酶活性的不同, 影响机体对药物

的代谢转化, 影响肿瘤对抗癌药物的敏感性。如丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC) 就是如此^[4]。同时, 外界环境 (如药物、射线等) 也会影响机体 P450 及其同工酶的水平, 进一步影响机体、肿瘤对药物的敏感性。研究药物、射线对 P450 含量及其同工酶的影响, 对多药联用、受电离辐射照射人群的用药合理化, 具有重要意义和指导作用。

放射增敏剂可提高肿瘤细胞特别是乏氧细胞对射线的敏感性。第三代放射增敏剂生物还原活性物。除具有放射增敏作用外, 它还会在乏氧环境下通过还原酶 (如 P450 酶系) 的作用, 还原成具有细胞毒性的代谢物^[5]。MMC 是一种吡啶酮类的生物还原活性剂, 是唯一已用于临床的生物还原活性物, 其抗肿瘤谱广, 大多数国家目前都在使用。但有关 MMC 代谢性相互作用的报道却很少。

γ 射线对大鼠 P450、CYP2B1、CYP2E1 的影响, 国内外报道很少。国外曾报道 3 Gy 以下 γ 射线全身照射小鼠, 肝脏 P450 含量无变化, 而对大鼠未作此剂量的研究, 也未见 γ 射线对大鼠

国家自然科学基金 (30100042) 资助

第一作者: 严敏芬, 女, 1968 年 12 月出生, 1992 年毕业于上海医科大学, 放射医学专业, 讲师, 现为复旦大学在读研究生
收稿日期: 初稿 2004-12-10, 修回 2005-01-27

CYP2B1、CYP2E1 活性影响的研究。

本研究观察 MMC、3Gy γ 射线和两者合用对大鼠 P450、CYP2B1、CYP2E1 的影响。可以预测对人体 P450 及其同工酶的影响,为临床上 MMC 应用病人及受 γ 射线照射人群的安全合理用药提供实验和理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(Reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADPH), 7-戊氧基香豆素 (7-pentoxoresorufin), 9-羟基-3-异噻唑 (Resorufin), 考马斯亮蓝 G-250, 以上试剂均购于 Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA); 1-4 二硫苏糖醇 (1,4-Dithiothreitol, DTT) 购于 Amresco; α -甲苯磺酰氟 (Phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)、甲醇和乙腈购于 Merk KGaA (Darmstadt, Germany); 1-苯基 2-硫脲 (Phenyl thiourea, PTU)、乙二胺四乙酸二钠 (Disodium ethylenediamine tetraacetate, Na_2EDTA)、甘油、N-二甲基硝胺、甲醛、连二亚硫酸钠等本实验使用的其它所有试剂均为分析纯。MMC 购于协和发酵工业株式会社 (日本)。

1.2 仪器

^{137}Cs γ 照射装置, γ cell 40; 高速离心机, HITACHI, 20PR-520; 超速离心机, SORVALL, Uitra-80; 紫外分光光度计, Shimadzu, UV-260; 荧光光度计, HITACHI, F-3000。

1.3 动物与预处理

将无特定病原体 (Specific pathogen free, SPF) 级健康雄性 SD 大鼠 (160-180g) 随机分组, 每组 5 只。连续 3d、6d 腹腔注射 20% ID_{50} MMC (1mg/kg d), 溶剂对照组给予生理盐水, 设空白对照组。另设空白对照组, 一次腹腔注射 20% ID_{50} MMC (1mg/kg), 一次腹腔注射 60% ID_{50} MMC (3mg/kg), 3Gy γ 射线全身照射, 3Gy γ 射线全身照射后加 3mg/kg MMC 组。各组处理后 24h, 断头处死动物迅速取出肝脏, 制备微粒体。制得的微粒体立即冻存于液氮。动物以标准实验室饲料饲养直至分离肝脏前 24 h。

1.4 微粒体制备

用改良的 Omura 法制备^[6-8], 使 P450 的失活率大大减少。将取得的肝脏用 0-4℃磷酸缓冲液冲洗,

用滤纸洗干称取 2g 左右肝, 将肝脏剪成约 2mm³ 大小碎块, 加 20mL 匀浆缓冲液 (甘油:10%, PTU:1mmol/L, PMSF:1mmol/L, Na_2EDTA :1mmol/L, DTT:0.1mol/L, 溶解于 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液, pH7.5)。用电动匀浆器制成匀浆。用一层纱布过滤, 事先将纱布用冰冷的磷酸钠缓冲液湿润。肝匀浆在 2℃下用 1×10^4 g 离心 20min, 上清液用二层纱布过滤, 过滤液部分即为 S_{90} 。将 S_{90} 部分在 2℃下用 1×10^5 g 离心 60min, 沉淀部分即为微粒体, 加稀释缓冲液 (甘油:20%, PMSF:1mmol/L, Na_2EDTA :1mmol/L, DTT:0.1mol/L, 溶解于 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液, pH7.5)。以上操作均在低温下进行。

1.5 蛋白质测定^[9]

用 Bradford 法测定微粒体蛋白质含量, 以牛血清白蛋白为标准, 作标准曲线。微粒体悬液与考马斯亮蓝试剂充分混合后, 10min 后在分光光度计上测 595nm 处的 A 值, 求蛋白质浓度。

1.6 CYP2B1 活性测定^[10]

取微粒体蛋白 0.02-0.25mg, 加 0.5mmol/L 7-Pentoxoresorufin 20 μL [溶解于二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 与乙腈], 10 μL 水, 溶解于磷酸钾缓冲液 (pH7.4, 含 3mmol/L MgCl_2) 中, 旋涡混匀, 37℃ 预热 1min 后, 加 NADPH 50 μL (10mmol/L), 反应开始计时, 终体积为 2mL。水浴振荡 30min 后加冰冷的无水乙醇 300 μL 终止反应。以不加底物作空白, 以标准 (Resorufin) 代替底物作标准。标准在反应开始一半时加入 (10 μL 0.05mmol/L resorufin)。在荧光分光光度计上测 resorufin 的荧光强度, 激发波长 (EX) 570nm, 发射波长 (EM) 582nm, 狭缝 5nm。标准曲线以不同浓度 resorufin 为底物反应, 测得 A 值绘制。

1.7 CYP2E1 活性测定^[11]

取微粒体蛋白 0.25-0.7mg, 加 100mmol/L N-二甲基亚硝胺 0.2mL, 40 μL 水, 溶解于 Tris 缓冲液 (pH7.4, 含 3mmol/L MgCl_2) 中, 混匀后, 37℃ 预热 1min 后, 加 NADPH 50 μL (10mmol/L), 反应开始计时, 终体积为 2.6mL。水浴振荡 20min 后, 在冰水中冷却, 加 25% ZnSO_4 0.2mL 终止反应, 立即混匀后, 再加饱和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.2mL。混匀后, 在 2.5×10^3 g 离心 20min。以不加底物作空白, 加入 40 μL 甲醛标准液 (3.33mmol/L) 代替底物作标准, 标准在反应开始一半时加入。吸上清液 2.4mL, 加 Nash 试剂 (5g 醋酸氨, 0.1mL 乙酰丙酮, 6mL 3%

醋酸,三者混匀) 0.6 mL,混匀后放入 50℃ 水浴温孵 30 min,冷却后在 420 nm 测定样品 A 值。标准曲线以不同浓度甲醛 (Formalin, HCHO) 为底物反应,测得 A 值绘制。

1.8 P450 含量测定^[12]

在 6 mL 以上的试管里加入适量连二亚硫酸钠,倒入微粒体悬液,混匀后倒入两个试管,其中一个作为空白,另一个作为样品通 CO 气体 (浓 H₂SO₄+HCOOH 的气体发生装置) 1 min,在分光光度计上 400—500 nm 范围进行扫描,并测得 A₄₅₀ 及 A₄₉₀ 的 OD 值,则 P450=(A₄₅₀-A₄₉₀)/(91×Pr)×1000 (nmol/mg 蛋白),其中 91 为吸光系数,Pr 为蛋白质浓度 (mg/mL)。

1.9 统计处理

用 SPSS 软件的单因素方差分析、t 检验及两因

素析因分析。

2 结果

2.1 蛋白质浓度回归方程

蛋白质浓度的回归方程为:

$$y=0.6207x+0.0302 \quad (R^2=0.9941)$$

式中: x 为蛋白质浓度, y 为吸光度 A (OD) 值。

2.2 连续给 1 mg/kg d 的 MMC 对大鼠肝脏 P450 含量、CYP2B1、CYP2E1 活性影响

连续 3 d、6 d 给大鼠腹腔注射 20% ID₅₀ MMC (ID₅₀ 为 5 mg/kg), 即 1 mg/kg d。与空白对照组和溶剂对照组相比,大鼠肝脏 P450 含量、CYP2B1、CYP2E1 活性无明显变化 ($p>0.05$)。实验结果如表 1 所示。

Table 1 Cytochrome P450 content and CYP2B1 and CYP2E1 activities in rats after 3 or 6 days' continual administration of MMC (1mg/kg d) (Mean±s, n=5) / %

Groups	Cytochrome P450 ⁽¹⁾	CYP2B1 activity ⁽²⁾	CYP2E1 activity ⁽³⁾
Blank control for the 3 d group	1.432±24	8.0±46	10.895±42
Blank control for the 6 d group	1.257±43	9.0±34	10.693±42
Solution control (NS for 3 days)	1.656±51	9.8±38	7.373±34
MMC injection for 3 days	1.868±93	6.6±33	6.622±40
Solution control (NS for 6 days)	1.886±17	9.0±53	14.858±39
MMC injection for 6 days	1.410±48	4.4±68	8.380±32

⁽¹⁾ In nmol / mg protein

⁽²⁾ In pmol resorufin produced/min mg protein

⁽³⁾ In nmol HCHO produced/min mg protein

2.3 一次性给 1 mg/kg MMC 对大鼠肝脏 P450 含量、CYP2B1、CYP2E1 活性影响

第一天腹腔注射 MMC 1mg/kg 组与空白

组相比, P450 含量无明显变化 ($p>0.05$); CYP2B1 活性变化不明显 ($p>0.05$); CYP2E1 活性则非常明显增大 ($p<0.01$), 上升 65%。结果如表 2 所示。

Table 2 Cytochrome P450 content and CYP2B1 and CYP2E1 activities in rats injected to their stomach with MMC at 1mg/kg on the first day (Mean±s, n=5) / %

Groups	Cytochrome P450 ⁽¹⁾	CYP2B1 activity ⁽²⁾	CYP2E1 activity ⁽³⁾
The control	0.424±36	7.4±54	10.419±32
The MMC injected	0.538±40	7.7±34	17.178±16 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ In nmol / mg protein

⁽²⁾ In pmol resorufin produced/min mg protein

⁽³⁾ In nmol HCHO produced/min mg protein

⁽⁴⁾ $p<0.01$ vs control;

2.4 3mg/kg MMC、3 Gy γ 射线对大鼠肝脏 P450 含量、CYP2B1、CYP2E1 活性影响

两因素析因分析发现：一次性腹腔注射 3 mg/kg 的 MMC，P450 含量、CYP2B1 活性无明显变化 ($p>0.05$)，而使 CYP2E1 活性上升显著 ($p<0.01$)，其中单纯用药组比对照组增加 61%，

照射加用药组比单纯照射组增加 115%，比对照组增加 26%；3 Gy γ 射线全身照射后，大鼠肝脏 P450 含量、CYP2B1 活性无明显变化，CYP2E1 活性有所下降 ($p<0.05$)，其中单纯照射组比对照组减少 41%，照射加用药组比单纯用药组下降 21%；未见 MMC 和 γ 射线间的交互作用。结果如表 3 和表 4 所示。

Table 3 Cytochrome P450 content and CYP2B1 and CYP2E1 activities in rats given with MMC(3mg/kg) and 3 Gy ¹³⁷Cs γ-ray irradiation (Mean±s, n=5) /%

Groups	Cytochrome P450 ⁽¹⁾	CYP2B1 activity ⁽²⁾	CYP2E1 activity ⁽³⁾
Control	0.424±36	7.4±54	10.419±32
MMC injected	0.510±32	7.5±45	16.795±16
Irradiated.	0.615±72	8.1±49	6.130±21
MMC injected and irradiated	0.527±12	7.2±22	13.185±36

⁽¹⁾ In nmol/mg protein

⁽²⁾ In pmol resorufin produced/min mg protein

⁽³⁾ In nmol HCHO produced/min mg protein

Table 4 Factorial experiment analysis of the CYP2E1 activity

Source	Type III sum of squares	Mean square	F	Sig
γ-ray Hypothesis	78.0	78.0	5.46	0.032
MMC Hypothesis	225	225	15.8	0.001
Error	243	14.3		

3 讨论

生物还原活性物不但能提高乏氧状态下细胞对射线、药物的敏感性，还可以利用这类药物的乏氧靶向特点，将其用于基因向导的酶前药治疗^[13]，是今后肿瘤增敏药物研发的主要方向之一。所以有必要研究生物还原活性物对机体药物代谢的影响，从而指导临床合理用药。本课题从 γ 射线和 MMC 着手，研究对大鼠肝脏细胞色素 P450 含量、CYP2B1 和 CYP2E1 活性的影响。实验中每 1g 肝脏制得 6.40—8.76 mg 蛋白质微粒体，微粒体回收率比较稳定。

CYP2B1、CYP2E1 是 P450 酶系中重要的同工酶。CYP2B 具有催化底物，形成非活性的易于排泄的代谢产物而解毒的作用，也可使某些药物（如抗癌药物环磷酰胺）经 CYP2B 代谢活化^[14]。SD 大鼠体内主要以 CYP2B1 形式存在。CYP2E1 主要参与乙醇等小分子化合物的代谢，其中大部分为前致癌物和前毒物，小部分为临床药物，特别是亚硝酸胺在体内产生致癌诱变产物必须经过 CYP2E1 α-羟化作用^[15]。

一次性给 1mg/kg 或 3mg/kg 的 MMC，使大鼠肝脏 CYP2E1 活性分别提高了 65%、61%，

而 CYP2B1 活性变化不明显，P450 含量有所提高，但无统计意义。Wissel^[16]曾经报道 MMC 可使大鼠 P450 含量略降 (<10%)，但不明显，与本实验结果一致。连续 3d 或 6d 给 1mg/kg d 的 MMC，大鼠肝脏 P450 含量及 CYP2B1 的活性仍不受影响，CYP2E1 的活性也不发生变化。提示 MMC 可诱导 CYP2E1，多次刺激后使机体产生耐受，对 CYP2E1 不产生影响，其机理有待进一步研究。因此，临床上使用 MMC 时，要特别注意对经 CYP2E1 代谢的药物的影响，设计合理的用药方案。MMC 对 CYP2B1 不产生影响，可能是由于 SD 大鼠肝脏中 CYP2B1 活性较低，MMC 对其影响就不明显，也可能是 MMC 对 CYP2B1 本身不产生作用，未见此方面的报道，有待进一步研究。

Chandra 等^[17]报道 3 Gy 以下 γ 射线全身照射小鼠，肝脏 P450 含量无变化，3—5 Gy 照射后 24 h，P450 含量开始增加，7—9 Gy 照射使 P450 含量下降明显。本实验采用 3Gy γ 射线对 SD 大鼠全身照射，24 h 后肝脏 P450 含量未改变，与文献报道小鼠的情况一致。3 Gy γ 射线对 CYP2B1 活性无明显改变，使 CYP2E1 活性明显下降为 41%。根据本实验结果，对核事故病人及放疗病人用药时要注意对经 CYP2E1 代谢药物的影响。

两因素析因分析未见 3 mg/kg MMC 和 3 Gy γ 射线之间交互作用,发现 3 mg/kg MMC 对 CYP2E1 有明显诱导作用,3 Gy γ 射线对 CYP2E1 有抑制作用。所以 3 Gy γ 射线全身照射合并 3 mg/kg 的 MMC 后,与对照组相比,CYP2E1 活性变化不显著,略增 26%;与单纯照射组相比,CYP2E1 活性增加明显,为 115%,这是由于照射使 CYP2E1 活性下降,MMC 对低水平的 CYP2E1 诱导幅度更大;与单纯用药组相比,CYP2E1 活性变化无统计意义,略降 21%。由于射线和 MMC 对 P450 含量、CYP2B1 活性不产生影响,与对照组、单纯用药组或单纯照射组相比,P450 含量、CYP2B1 活性无明显变化。

参考文献

- 1 孙忠实,朱珠. 药物不良反应杂志,2000,2(1): 6-14
SUN Zongshi, ZHU Zhu. J Adverse Drug React, 2000, 2(1): 6-14
- 2 Palamanda J R, Casciano C N, Norton L A, *et al.* Drug Metab Dispos, 2001, 29(6): 863-867
- 3 Chu I, Favreau L, Soares T, *et al.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(4): 207-214
- 4 Goeptar A R, Koppele J M, Glatt H R, *et al.* Chem Biol Interact, 1995, 97(2): 149-168
- 5 Naylor M A, Thomson P. Mini Rev Med Chem, 2001, 1(1): 17-19
- 6 沈钧,徐佩佩,金锡鹏. 工业卫生与职业病,1997,23(4): 236-238
SHEN Jun, XU Peipei, JIN Xipeng. Ind Health Occup Dis, 1997, 23(4): 236-238
- 7 Lee S S T, Scott J G. J Economical Entomology, 1989, 82(6): 1559-1563
- 8 Ronis M J J, Hodgson E, Dauterman W C. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1988, 32(1): 74-90
- 9 Bradford M M. Analytical biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254
- 10 Donato M T, Go'mez-Lcho'n M J, Castell V. Analytical Biochemistry, 1993, 213(1): 29-33
- 11 Yang C S, Tu Y Y, Koop D R, *et al.* Cancer Res, 1985, 45(3): 1140-1145
- 12 Omura T, Sato R. J Biol Chem, 1964, 239(7): 2370-2378
- 13 Jaffer M, Williams K J, Stratford I J. Adv Drug Deli Rev, 2001, 53(2): 217-228
- 14 Kivistore K T, Kroemer H K, Eichelbaum M. Br J Clin Pharmacol, 1995, 40(6): 523-530
- 15 Gonzalez F J, Gelboin H V. Drug Metab Rev, 1994, 26(1-2): 165-183
- 16 Wissel P S. Life Sci. 1998, 42(11): 1139-1145
- 17 Chandra D, Kale R K. Int J Radiat Biol, 1995, 5(3): 335-349

Effects of mitomycin(MMC) and γ -ray irradiation on cytochrome p450 content and activities of CYP2B1 and CYP2E1 in rats

YAN Minfen HAO Furong XU Liming TONG Shungao JI Huajun SHEN Zhifen JIN Yizun
(Shanghai Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032)

ABSTRACT In this paper, content of cytochrome P450 and activities of CYP2B1 and CYP2E1 in liver of male SD rats subjected to intraperitoneal injection of MMC or γ -ray irradiation, were studied. Groups No.1-3 of the rats were injected with MMC of 1 mg/kg d for 1, 3 or 6 days. Group No.4-6 of the rats were treated respectively with one injection of MMC at 3 mg/kg, 3 Gy of ^{137}Cs γ -ray irradiation, or a combination of the MMC injection at 3 mg/kg after 3 Gy γ -ray irradiation. Biological measurements of the experimental groups were compared to blank groups and solvent control groups. The results showed that for the group administered on the first day with MMC at 1 mg/kg, the CYP2E1 activity increased ($p < 0.01$), whereas the P450 content and the CYP2B1 activity did not change. For the group injected with MMC at 1 mg/kg d for 3 d or 6 d, no significant changes were found in the P450 content and the activities of CYP2B1 and CYP2E1. With the 3 mg/kg MMC group, the CYP2E1 activity increased significantly ($p < 0.01$), but no marked effects were observed in the P450 content and the CYP2B1 activity. The CYP2E1 activity decreased in the 3 Gy irradiated group ($p < 0.05$), with no effect on the P450 content and the CYP2B1 activity. There was no interaction between 3 mg/kg MMC and 3 Gy irradiation. The results indicated that MMC induced the CYP2E1 activity, yet repeated treatment with MMC might cause the rats to gain some resistance to it, in addition, 3 Gy γ -irradiation inhibited the CYP2E1 activity, but combined treatments of the 3 Gy irradiation and MMC injection showed no significant effect on the P450 content and the CYP2B1 activity in vivo.

KEYWORDS γ -irradiation, MMC, P450, CYP2B1, CYP2E1

CLC R730.53, R730.55