

· 综 述 ·

镉对细胞钙稳态与相关酶活性影响的研究进展

徐 斌, 徐兆发

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 镉作为一种有毒的环境污染物, 可对机体的多种器官和组织造成损伤。镉的毒作用机制十分复杂, 其中镉引起的细胞钙稳态失调是镉造成机体损伤的一个重要方面, 也是当今镉毒作用机制研究的热点。本文就镉影响细胞内钙稳态调节机制, 引起细胞钙超载后激活蛋白激酶 C, 干扰细胞内与钙相关的信息传递系统作一综述。

关键词: 镉; 钙调蛋白; Ca^{2+} -ATP 酶; Na^{+} - K^{+} -ATP 酶; 蛋白激酶 C

中图分类号: O614. 242 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2003)06-0351-04

Research progress in effect of cadmium on intracellular calcium homeostasis and its related enzymes

XU Bin, XU Zhao-fa

(Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: As a poisonous environmental pollutant, cadmium can cause damage in many organs and tissues. The mechanism of cadmium toxicity is very complicated, in which cadmium-induced disturbance of intracellular calcium homeostasis is an important aspect of its body injury, as well as current research focus on cadmium. Effect of cadmium on regulation of intracellular calcium homeostasis and interference of activation of protein kinase C by intracellular calcium overload with intracellular calcium-related message transfer system were reviewed in this paper.

Key words: Cadmium; Calmodulin; Ca^{2+} -ATPase; Na^{+} - K^{+} -ATPase; Protein kinase C

镉是一种有毒的重金属, 其毒作用机制比较复杂, 至今尚未完全阐明。近年来大量实验结果显示, 镉进入细胞后, 干扰细胞内与维持钙稳态相关的酶如 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶, 使细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加, 引起细胞内 Ca^{2+} 超载; 镉以及细胞内 Ca^{2+} 均可激活蛋白激酶 C (PKC), 干扰细胞内与钙相关的信息传递系统, 产生细胞毒性。

1 镉与细胞内钙稳态的相互关系

钙普遍存在于生物体的各系统中, 在细胞内的钙有两种类型: 游离的钙离子和与蛋白质结合的钙。现已知 Ca^{2+} 不仅可直接激活多种具有重要生理意义的胞内机械活动, 而且也可作为细胞信使介导胞外信号对胞内的反应。目前的研究表明, 细胞内 Ca^{2+} 稳态的维持主要靠 Ca^{2+} 跨膜内流, 胞内钙池钙释放与重储, 以及有赖于 Ca^{2+} -ATP 酶 (钙泵) 的 Ca^{2+} 外流^[1,2]。细胞内钙稳态的维持在细胞生理、生化过程中起着极为重要的作用。细胞内 Ca^{2+} 稳态调节过程相当复杂, 是通过多种机制实现的, 一旦这种稳态机制的一环或多环失调就会产生一系列反应, 导致细胞损伤或死亡。

1. 1 镉对细胞钙稳态的影响

Blazka 等^[3]测得 Cd^{2+} 半径 (0.97) 与 Ca^{2+} 半径 (0.99) 非常接近, 使得 Cd^{2+} 可以通过 Ca^{2+} 通道, 而 Cd^{2+} 与钙通道内阴离子结合位点的亲和力比 Ca^{2+} 还高, 这就使得 Cd^{2+} 占据了钙通道, 阻碍 Ca^{2+} 的内流。他观察到无细胞毒作用浓度的 Cd^{2+}

显著抑制 Ca^{2+} 的内流。Smith^[4]的研究则表明在 $0.05 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 浓度时 Cd^{2+} 可引起成纤维细胞内游离钙浓度显著升高。在细胞外有钙和无钙的条件下, 存在着相似的效应, 提示胞内游离钙的升高可能是由于胞内钙池钙释放的结果。Yamagami 等^[5]研究发现 Cd^{2+} 和 Co^{2+} 在 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度时引起 Ca^{2+} 内流和细胞内钙动员 (即钙池钙的释放), 使胞浆游离钙离子浓度升高, 当加入 $1 \mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 时也可引起胞浆钙离子浓度显著增加。在加入钙通道阻滞剂或无钙溶液时 Cd^{2+} 仍然能引起细胞内 Ca^{2+} 浓度一时性的短暂升高, 提示 Cd^{2+} 可能引起细胞内 Ca^{2+} 的动员。Yamagami 认为 Cd^{2+} 引起胞浆游离 Ca^{2+} 浓度一时性的短暂升高是由于三磷酸肌醇 (IP_3) 敏感性钙池钙释放引起的, 而持续的胞浆 Ca^{2+} 浓度升高却是由于 Ca^{2+} 内流引起的。

1. 2 钙离子通道阻断剂对镉毒性的影响

钙通道是一种慢通道, 广泛分布于各种细胞中, 参与多种重要生物学效应。钙离子通道阻断剂选择性地阻断细胞外 Ca^{2+} 经钙通道进入细胞内, 加大剂量还可以抑制细胞内储存的 Ca^{2+} 释放, 防止因 Ca^{2+} 过量所致的平滑肌痉挛和细胞损伤。因此, 钙离子通道阻断剂可用来抑制镉所致的钙超载。Shiraishi^[6]报道了异搏定 (Verapamil, Ver) 以及硝苯地平 (Nifedipine) 都可抑制肝细胞对 Cd^{2+} 的吸收。唐玲芳等^[7]也报道了钙通道阻断剂尼莫地平 (Nimodipine, NIMO) 给予染镉小鼠, 其肝、肾组织中镉金属硫蛋白含量提高, 提示其对小鼠镉中毒肝、肾毒效应有一定的保护作用。Blazka^[3]利用肝细胞培养实验研究了 Cd^{2+} 进入细胞的途径。发现当培养液中加入钙通道阻断剂地尔硫䓬 (Diltiazem)、维拉帕米 (Verapamil)、尼非地平 (Nifedipine) 等后能抑制 31% 的 Cd^{2+} 进入肝细胞。

收稿日期: 2003-06-30; 修回日期: 2003-08-26

基金项目: 国家自然科学基金资助 (编号: 30371200)

作者简介: 徐斌 (1979-), 男, 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 主要从事镉毒理学研究。

2 镉与钙-钙调蛋白的相互关系

钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 是真核细胞内 Ca^{2+} 的重要受体, 用于传递 Ca^{2+} 对各种细胞功能的调节信息。据生化研究, 不同来源的 CaM 都具有 4 个 Ca^{2+} 结合位点, 尽管彼此对 Ca^{2+} 的亲力和特异性具有很大的差别, 但其中任何一个位点与 Ca^{2+} 结合后均可引起 CaM 构象的明显改变, 从无活性的螺旋构型变为有活性的螺旋构型, 活化的 Ca-CaM 与无活性的靶酶如磷酸二酯酶 (PDE)、 Ca^{2+} -ATP 酶结合, 通过激活靶酶发挥其生物学效应。

2.1 镉对钙调蛋白的影响

Cheung 等最早发现钙调蛋白^[8]。他们认为, 离子半径在 $(0.1 \pm 0.02) \text{ nm}$ 范围内的 2 价或 3 价重金属阳离子能有效地代替钙离子, 激活钙调蛋白。大量实验结果表明, Cd^{2+} 能对 CaM 依赖体系产生交叉作用, 但与 Ca^{2+} 相比, Cd^{2+} 对 CaM 依赖酶的激活效率较低。Flik 等^[9]在试管中研究 Cd^{2+} 对磷酸二酯酶 (PDE) 的影响时发现, 等量的 Cd^{2+} 和 Ca^{2+} 在含有相同 CaM 的体系中, 对 PDE 的活性分别激活 62% 和 94%。因此, 在 Cd^{2+} 、 Ca^{2+} 共存的体系中, 由于镉钙的交叉作用, 表现出 Cd^{2+} 对 CaM 依赖酶激活的相对低效性。Suzuki 等^[10]利用试管模拟实验进一步验证了 Cd^{2+} 对 CaM 依赖体系的作用, 当镉离子浓度低于 $50 \mu\text{mol/L}$ 时 Cd^{2+} 和 CaM 结合形成的复合物 $\text{Cd}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 能象 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 复合物一样激活 CaM 依赖酶 PDE 的活性。这种由镉离子刺激引起的 PDE 活性的升高能被钙调蛋白拮抗剂或金属螯合剂乙二醇双 (2-氨基乙基) 四乙酸 (EGTA) 等抑制; 当镉离子浓度高于 $50 \mu\text{mol/L}$ 时, 镉离子却抑制 PDE 的基础活性 (即无 CaM 存在时酶所具有的活性)。结果提示, 镉在高浓度时可能与酶的功能性巯基直接结合, 降低酶的活性。这与传统的“巯基封闭学说”是一致的。

2.2 钙调蛋白拮抗剂对镉毒性的影响

自 20 世纪 60 年代以来陆续发现许多药物具有拮抗 CaM 的性质, 其中以抗精神病类药物氯丙嗪 (Chlorpromazine, CPZ) 和三氟拉嗪 (Trifluoperazine, TFP) 的作用最强。Pernone 等^[11]人也发现 Cd^{2+} 在细胞骨架模式系统下可以诱导微管系统的解聚, 而 CaM 拮抗剂三氟拉嗪可以防止 Cd^{2+} 的这种解聚。 Cd^{2+} 能使小鼠睾丸重量增加和血红蛋白吸收率升高, 若先用 CaM 拮抗剂三氟拉嗪处理, 以上两个参数的变化减弱, 结果表明, CaM 拮抗剂能够防止镉的某些毒性。Tang^[12]等研究表明, CaM 拮抗剂氯丙嗪能明显降低血镉, 降低尿中 γ -谷氨酰转移酶 (γ -GT) 及 N -乙酰 β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 活性; 氯丙嗪和钙离子通道阻断剂尼莫地平对镉引起的钙泵活性降低, 均表现出明显的保护作用, 两药合用作用增强, 而且氯丙嗪与尼莫地平相比对镉中毒小鼠的肝肾保护作用更明显。此外, α -肾上腺素能阻断剂、平滑肌松弛剂以及一些抗肿瘤药、局麻药等, 对镉毒性均具有不同程度的保护作用。

3 镉与 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的相互关系

细胞内 Ca^{2+} 流出径路主要靠细胞质膜、内质网和线粒体膜等钙转运系统。为了维持细胞溶质内的低 Ca^{2+} 浓度, 质膜

上有 2 个 Ca^{2+} 转运系统将 Ca^{2+} 排至胞外, 即 Ca^{2+} 泵 (Ca^{2+} -ATP 酶) 与 Na^{+} - Ca^{2+} 交换。

3.1 Ca^{2+} -ATP 酶

细胞膜 Ca^{2+} -ATP 酶 (plasma membrane calcium-ATPase, PMCA) 是一种疏水的膜结合蛋白质, 为一单肽链, 分子质量约为 13.8 万, 它分解 1 个 ATP 分子可将 1~2 个 Ca^{2+} 跨膜转移到胞外, 同时以 1:2 比例将 H^{+} 转运到细胞内, 使离子交换结果为电中性, 质膜两侧膜电位差不致影响 Ca^{2+} 的转运。由于此酶转运 Ca^{2+} 、水解 ATP 时都需要 Mg^{2+} 存在, 故又称 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶。由于 PMCA 本身结构及其生理生化特性, 使其可受以下几种因素调节^[13]: (1) 钙调蛋白: PMCA 胞浆区 C 末端含有钙调蛋白结合位点, 当缺少 CaM 时 CaM 结合区与其胞浆内区相互作用抑制 PMCA 活性。当 CaM 出现时这种抑制作用消失, CaM 之所以能激活 PMCA 主要是由于导致 PMCA 结合区形态改变, 从而增加 PMCA 与 Ca^{2+} 亲和力及 Ca^{2+} 转运速率。(2) 蛋白激酶 C 和依赖 cAMP 的激酶: PMCA 胞浆区 C 末端还含有几种蛋白激酶底物, 主要为 cAMP-cGMP 依赖性蛋白激酶和蛋白激酶 C 的底物, 这些底物磷酸化后可使 PMCA 构象改变而活化。(3) PMCA 的活性依赖于周围磷脂的出现。所有的酸性磷脂, 尤其是一、二磷脂酰肌醇, 均可不同程度促进 PMCA 与 Ca^{2+} 亲和力及最大速率。 Ca^{2+} 泵调节机制比较复杂, 与多个胞内信使系统有关, 说明它在细胞生命活动中很重要。

3.2 Na^{+} - Ca^{2+} 交换

细胞膜特别是质膜的 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交换, 已被认为是钙稳态调节过程中的一个重要组分。一般情况下, 3 个 Na^{+} 进入细胞内, 可以使 1 个 Ca^{2+} 排出细胞。由于细胞内外 Na^{+} - K^{+} 的不均匀分布是由 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶维持的, 而细胞内外 Na^{+} 的不均匀分布又是 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交换的前提, 因此, Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的功能与 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交换有着密切的关系。 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶又称钠泵, 是一完整的膜蛋白, 由催化性 α 亚基、糖基化的 β 亚基、有时还辅以 γ 亚基以非共价键构成异质低聚体。 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶对 Na^{+} 、 K^{+} 代谢起主要作用, 它在细胞浆膜间主动转运 Na^{+} 、 K^{+} , 建立起跨膜的电化学梯度, 用以维持细胞膜电位, 控制细胞容量, 并为其他离子和营养素的转运提供动力。在高等动物中几乎所有组织都存在钠泵, 在肾脏最为丰富, 尤为近端小管^[14]。

3.3 Cd^{2+} 对细胞 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的影响

肾小管上皮细胞基底膜处存在大量 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶, 这两种酶富含巯基, 镉可以和巯基结合, 从而抑制这些酶的活性。镉与 Ca^{2+} -ATPase 有很高的亲和力, Cd^{2+} 可与 Ca^{2+} 竞争 Ca^{2+} -ATPase 的结合位点, 镉与 Ca^{2+} -ATPase 结合阻抑了 Ca^{2+} 与 Ca^{2+} -ATPase 的结合, 从而抑制了 Ca^{2+} -ATPase 的活性。Friedman 等^[15]认为 Cd^{2+} 因其离子半径与 Ca^{2+} 相似, 因而可取代 Ca^{2+} 与 Na^{+} 进行交换, 从而妨碍 Ca^{2+} 的外流。姜悦等^[16]研究发现肾小管上皮细胞用镉体外染毒 30 min 后, 其超微结构表现出明显的损伤性变化; 与此同时, 细胞 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活力出现明显受抑, 胞浆内游离 Ca^{2+} 浓度显著

升高, 呈现钙超载状态; 胞浆内 Ca^{2+} 浓度的升高与 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATP}$ 酶活性下降之间存在着明显的相关关系。因而推测镉的毒性作用与其引起肾小管上皮细胞 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATP}$ 酶活性下降及钙稳态失调有关。钙泵和钠泵活性降低的结果, 一方面使肾重吸收钙减少, 尿钙排泄增多; 另一方面引起肾细胞内钙代谢障碍, 进一步影响肾功能。

4 镉与蛋白激酶 C 的相互关系

蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 是重要的细胞内信号转导分子, 它的活动依赖于磷脂, 可以被 Ca^{2+} 激活。PKC 是由 Nishizuka 等人于 1977 年首次发现的一组磷脂依赖性 Ca^{2+} 激活的蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶。它由单一多肽链组成, 相对分子质量为 77~83KD, 包括两个功能区, 即与磷脂、二酯酰甘油 (DGA) 及佛波酯 (TPA) 结合的疏水性调节区和与 ATP 及底物结合的亲水性催化区。激活的 PKC 可使多种蛋白 (如代谢途径中关键酶、离子通道、与信息有关的蛋白质、调控基因表达的转录因子等) 的丝氨酸、苏氨酸发生磷酸化, 从而影响细胞内生物信息的传递。在调节细胞代谢、分化、增殖及癌变中也具有十分重要的作用^[17]。

Long^[18] 研究发现, 在镉引起细胞内钙稳态失调时, 给予 PKC 抑制剂 calphostin C (CC) $0.1 \mu\text{mol/L}$ 可抑制细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 提示镉经 PKC 途径干扰细胞内 Ca^{2+} 代谢。镉通过钙离子通道进入肾小管上皮细胞胞浆后, 它既可以通过与钙调蛋白结合, 激活蛋白激酶 C (PKC)^[19], 也可以直接激活蛋白激酶 C^[20], 干扰细胞内的信息传递系统, 产生细胞毒性。Beyersmann^[21] 推测镉可能取代锌作用于 PKC 调节区, 使 PKC 的蛋白结合位点暴露而被激活。镉可直接作用于 PKC, 也可能借助于 Ca^{2+} 的作用, 间接激活 PKC, 抑制胶原合成; 并且 PKC 抑制剂 CC $0.1 \mu\text{mol/L}$ 不能抑制这种效应^[22]。Yu 等^[23] 研究发现, PKC 参与金属诱导的金属硫蛋白基因表达过程。PKC 的激活也可以进一步促进细胞内钙超载。活化的 PKC 可减少 Mg^{2+} 对电压依赖性钙通道的阻挡作用, 亦可使钙通道开放, 使细胞外 Ca^{2+} 内流。陈康宁等^[24] 研究发现, PKC 激动剂 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 可以引起培养神经元内游离钙浓度增加, 当加入 5ng PMA 时, 神经元内游离钙增加更为明显地高于对照组, 随 PMA 量的增大——当加入 10ng PMA 时, 神经元内游离钙增加更为明显, 不仅明显高于对照组, 而且明显地高于 5ng PMA 组。结果提示, PKC 的激活, 可以促进神经元内钙积聚。研究也发现, 随着 PMA 剂量的增大, 细胞内钙积聚越明显, 细胞损伤也越明显 (细胞毒性率明显的升高)。

综上所述, 镉可以通过多种方式影响细胞内游离钙水平, 导致钙稳态失调。钙离子是细胞内的第二信使, 参与多种信息传递。钙稳态失调将导致细胞一系列生理、生化功能紊乱, 是镉毒作用机制研究中的一个重要方面, 对此有必要进行更加深入细致的研究。

参考文献:

[1] 陈松海, 韩启德. 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的调节机制 [J]. 生理科学进展, 1993, 24 (1): 10-13.

- [2] Dominiczka AF, Bohr DF. Cell membrane abnormalities and the regulation of intracellular calcium concentration in hypertension [J]. Clin Sci, 1990, 79: 415.
- [3] Blazka ME, Shaikh ZA. Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: Role of calcium channels [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1991, 110: 355-363.
- [4] Smith JB, Dwyer SD, Smith L. Cadmium evoked inositol polyphosphate formation and calcium mobilization [J]. J Biol Chem, 1989, 264: 7115-7118.
- [5] Yamagami K, Nishimura S, Sorimachi M. Cd^{2+} and Co^{2+} at micromolar concentrations stimulate catecholamine secretion by increasing the cytosolic free Ca^{2+} concentration in cat adrenal chromaffin cells [J]. Brain Research, 1994, 646: 295-298.
- [6] Shiraishi N, Waalkes MP. Enhancement of metallothionein gene expression in male Wistar rats by treatment with calmodulin inhibitors: potential role of calcium regulatory pathways in metallothionein induction [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 125 (1): 97-103.
- [7] 唐玲芳, 陈砚朦, 张珍玲. 氯丙嗪、尼莫地平单用和合用对小鼠镉中毒肝肾毒效应的影响 [J]. 癌变、畸变、突变, 1999, 11 (6): 334-337.
- [8] 杨小芳, 杨永年. 镉钙交互作用对钙调素依赖体系的影响 [J]. 国外医学卫生学分册, 1994, 21 (2): 71-74.
- [9] Flik G, Winkel JG, Part P, et al. Calmodulin-mediated cadmium inhibition of phosphodiesterase activity, in vitro [J]. Arch Toxicol, 1987, 59: 353-359.
- [10] Suzuki Y, Chao SH, Zysk JR, et al. Stimulation of calmodulin by cadmium ion [J]. Arch Toxicol, 1985, 57: 205-211.
- [11] Perrino BA, Chou IN. Role of calmodulin in cadmium-induced microtubule disassembly [J]. Cell Bio Int Rep, 1986, 10 (7): 565-573.
- [12] Tang IF, Yang YN, Chen YN. Influences of chlorpromazine, nimodipine and their combination on the toxic effects of cadmium in liver and kidney of mice [J]. Biomed Environ Sci, 1999, 12 (3): 214-221.
- [13] 陈雪莲, 苟文丽. Ca^{2+} -ATP 酶与妊高征研究进展 [J]. 国外医学妇幼保健分册, 2000, 11 (3), 104-107.
- [14] 韩梅, 魏克伦. 缺氧缺血性肾损伤与肾近端小管 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATP}$ 酶 [J]. 新生儿科杂志, 2001, 16 (2): 91-94.
- [15] Friedman PA, Gesek FA. Cadmium uptake by kidney distal convoluted tubule cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 128 (2): 257-263.
- [16] 姜悦, 谭炳德, 董秀清. 镉致肾小管细胞内 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATP}$ 酶与钙稳态的变化 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1995, 13 (2): 75-78.
- [17] 吴洁, 倪沛洲, 凌霞. 蛋白激酶 C 的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11 (3): 182-186.
- [18] Long GJ. Cadmium perturbs calcium homeostasis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells: a possible role for protein kinase C [J]. Toxicol Lett, 1997, 91 (2): 91-97.
- [19] Lemmoglou F, Bernard A. Effect of calmodulin-inhibitors and verapamil on the nephrotoxicity of cadmium in rat. [J]. Toxicol Lett, 1998, 95 (1): 9-13.
- [20] Block C, Freymuth S, Beyersmann D, et al. Role of cadmium in

- activating nuclear protein kinase C and the enzyme binding to nuclear protein [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 19824-19828.
- [21] Beyersmann D, Block C, Makiya AN. Effects of cadmium on nuclear protein kinase C [J]. Environ Health Perspect, 1994, Sep, 102 Suppl 3: 177-180.
- [22] Long GJ. The effect of cadmium on cytosolic free calcium, protein kinase C, and collagen synthesis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells [J].

- Toxicol Appl Pharmacol, 1997, 143: 189-195.
- [23] Yu CW, Chen JH, Lin LY. Metal-induced metallothionein gene expression can be inactivated by protein kinase C inhibitor [J]. FEBS Lett, 1997, 22, 420 (1): 69-73.
- [24] 陈康宁, 董为伟, 张帆, 等. 蛋白激酶 C 激动剂 PMA 对培养神经细胞内游离钙的影响 [J]. 第三军医大学学报, 1997, 19 (5): 408-410.

细胞色素 P450 2E1 活性的测定方法

王爱红 (综述), 夏昭林 (审校)

(复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

摘要: 细胞色素 P450 (cytochrome P450) 是主要的肝细胞 I 相代谢酶之一, 其亚家族细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1) 在外来化学物的代谢活化中起重要作用, CYP2E1 活性的高低与毒物对机体的最终毒性大小直接相关。多年来, 体内 CYP2E1 活性的测定一直是国内外学者颇感棘手的问题。本文从体外、体内以及淋巴细胞中 CYP2E1 活性的测定等几方面对该问题进行综述。

关键词: 细胞色素 P450; 活性测定; 苯胺; 氯唑沙宗

中图分类号: R392; Q343 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)06-0354-03

The assay of CYP2E1 activity in biological system

WANG Ai-hong, XIA Zhao-lin

(Public Health School of Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Cytochrome P450 (CYP) is one of the main hepatic metabolic enzymes of phase I. Cytochrome P450 2E1, one member of CYP family, plays a significant role in the metabolism activation of chemicals and its activity is strongly related to the final toxicity of chemicals. In the past years many experts have put much endeavor to tackle this troublesome problem. This paper reviewed the progress of CYP2E1 activity assay in recent years.

Key words: Cytochrome P450; Activity assay; Aniline; Chlorzoxazone

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 是肝脏代谢最主要的酶系之一, 它主要定位于肝微粒体, 参与各种内源性 (如类固醇激素、维生素 D、胆酸等) 和外源性 (如药物、化学毒物、致癌物等) 化合物在体内的代谢过程^[1]。目前, 已知 P450 中有 20 多种同工酶分别催化不同物质的生物转化, 其中细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1) 亚家族占体内 CYP450 总量的 7%, 在化学物代谢活化而增毒的过程中发挥重要作用。

CYP2E1 在毒物代谢转化中占有重要地位, 参与多种外来化学物的代谢活化, 包括大量的强亲电子物和前致癌物。至少有 70 多种有机化合物 (如乙醇、酮、二烷基亚硝胺、卤族溶剂等) 在体内被 CYP2E1 代谢转化为有毒物质^[2~4]。多项研究表明^[5,6], CYP2E1 在体内能被乙醇和挥发性有机化合物等诱导, 而且体内 CYP2E1 活性水平与机体的多种生理状况 (如肥胖) 有关。虽然目前的研究多倾向于认为个体的酶活性水平主要由基因决定, 但仍不能忽略外界环境因素对酶活性的影响, 同时酶活性的高低又直接影响到物质的代谢速度, 从而影响特定毒物对机体的毒作用大小。所以, 测定 CYP2E1 的活性水平是探讨毒物对机体影响的基础工作。目前, 国内还

没有成熟的测定 CYP2E1 活性的方法, 国外已经初步建立一些体外、体内实验方法来测定 CYP2E1 的活性。反应底物主要包括苯胺 (aniline)、对硝基苯酚 (*p*-nitrophenol) 和氯唑沙宗 (chlorzoxazone)、水杨酸 (salicylate), 其中只有中枢肌松药氯唑沙宗才能作为人类体内试验的安全底物。

1 微粒体 CYP2E1 活性测定——体外实验

应用肝微粒体可以在体外水平测定 CYP2E1 的活性。最常用的底物有对硝基苯酚、苯胺以及氯唑沙宗。Dupont 等认为^[7] 水杨酸主要通过 CYP2E1 代谢, 也可以作为底物。其测定原理是在样本中含有的 CYP2E1 催化下, 特定的底物在辅助因子以及适合的反应温度、时间等因素协同作用下, 产生特定的产物, 然后借助一定的仪器 (如分光光度计、高效液相色谱等) 测定生成的产物量。结果通常用样本中每毫克蛋白每分钟生成的产物的纳摩尔数表示 ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$)。例如, 用苯胺作为测定底物时, CYP2E1 将其羟化为氨基酚。具体的操作可以描述为^[8]: 反应液中含有 5 mmol/L 的苯胺 (空白管用等体积水取代)、5 mmol/L 氯化镁、5 mmol/L 的异柠檬酸盐以及 100 mmol/L 的 Tris 盐酸缓冲液和微粒体蛋白 (样品)。反应以加入 0.5 mmol/L 的还原型辅酶 II (NADPH) 开始, 在 37 °C 水浴中温孵 30 min, 用 250 μ l 质量分数 10% 的冰三氯醋酸结束反应。然后将反应体系在 11 000 g/min 下离心 10 min, 取 1 ml

收稿日期: 2003-05-19

作者简介: 王爱红 (1977-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 职业卫生。