

- 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。

上清液移入另一试管(内盛 1ml 1%酚),混匀后加入 1 ml 碳酸钠,混匀,室温放置 30 min,在分光光度计下用空白管调零后,630 nm 处测定光密度值(ΔOD),同时制备氨基酚标准曲线,计算斜率 k ,用 Lowry 法测定样品中的蛋白浓度。结果可表示为:

酶活性 ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$) = $\Delta OD / (k \cdot \text{时间} \times \text{蛋白含量})$

由于使用该测定方法必须进行肝穿刺,这种侵入性的方法在人群筛检的应用中受到限制。

2 CYP2E1 活性的测定——体内实验

随着色谱技术的发展,人们开始采用高效液相色谱法来测定 CYP2E1 的活性,结合氯唑沙宗的体内药代动力学原理,Reginald 等^[9]已经成功地用该方法测定了体内 CYP2E1 的活性。氯唑沙宗是一种肌松药,在体内主要被 CYP2E1 代谢生成 6-羟氨基氯唑沙宗(6-hydroxychlorzoxazone),测定该产物在体内的生成和清除即可以测定 CYP2E1 的活性。氯唑沙宗的成人给药剂量以 250 mg、500 mg、750 mg 不等^[10~12]。目前研究发现,综合血浆氯唑沙宗的浓度和它的 k_m 值考虑,以 500 mg 和 750 mg 的剂量更能反映 CYP2E1 的活性。当给予氯唑沙宗剂量超过 750 mg 时,氯唑沙宗经 6-羟化代谢变为非线性消除,不能用来准确反映 CYP2E1 的活性,并且在该剂量下,除了轻微的嗜睡以外,未发现其他不良反应。

氯唑沙宗的药代动力学研究可以简单描述如下^[13]:研究对象禁食 12 h 后,口服 500 mg 氯唑沙宗片,2 h 后采血,用高效液相色谱测定血样中 6-羟氨基氯唑沙宗和氯唑沙宗的浓度,两者之比用于反映氯唑沙宗羟化的速率,从而判定肝中 CYP2E1 的活性。在大范围的人群筛检试验中,这种方法同样存在局限性。为了排除其他因素的影响,除上述禁食和采血以外,研究对象在试验前一周左右就应该禁用任何可能对 CYP2E1 活性有影响的食物和药物,尤其是扑热息痛(paracetamol)、戒酒硫(disulfiram)、异烟肼(isoniazid)。因为这些物质可能较长时间存在于血中,在上述试验中与氯唑沙宗竞争 CYP2E1,从而影响试验的结果。另外,在欧洲国家氯唑沙宗是一种禁止使用的药物,美国食品和药品管理局近来也警告民众,氯唑沙宗具有肝毒性并认为“没有理由使用该药”^[14]。

近年来,有学者用口服氯唑沙宗的清除率检测 CYP2E1 的表型,并将表型与基因型联系起来。Marchoud 等^[15]发现携带 CYP2E1 c2/c2 基因型的个体口服氯唑沙宗后的清除率低于 CYP2E1 c1/c1 型或 CYP2E1 c1/c2 型者的清除率,但是,逐步回归分析结果显示 CYP2E1 的基因型不是影响氯唑沙宗清除率的主要因素。Haufroid 等^[16]研究职业接触苯乙烯工人 CYP2E1 活性和快型 CYP2E1 (CYP2E1 *5B, *6, *1B, *1D) 之间的关系,发现只有携带杂合型 CYP2E1 *11D 的工人显示较高的氯唑沙宗代谢率;与携带野生型 CYP2E1 的个体相比,至少有一个 CYP2E1 *6 等位基因突变的个体其氯唑沙宗代谢率低。他们认为,尽管部分 CYP2E1 的基因型对其活性有影响,但用氯唑沙宗的代谢率作为职业接触某毒物(CYP2E1 参与代

谢)的生物标志物还有待考虑。

鉴于上述这些局限性,人们开始寻求其他更加可行的替代方法。近来认为,水杨酸在体内部分由 CYP2E1 代谢转化。目前,该方法只局限在实验室阶段。成人志愿者口服 1 g 赖氨酸乙酰水杨酸,2 h 后测定血浆中水杨酸、2,3-和 2,5-二羟基苯甲酸的浓度。这一测定方法目前已用于嗜酒者和对照、嗜酒者戒酒前后自身对照的研究。

3 淋巴细胞中 CYP2E1 的活性测定

早在 1990 年, Song 等^[17]就用 Western blot 的方法研究发现, CYP2E1 能在淋巴细胞中表达。1995 年, Raucy 等^[18]发现用诱导剂诱导家兔肝微粒体中的 CYP2E1,其淋巴细胞中的 CYP2E1 水平呈同步升高。由此认为淋巴细胞中的 CYP2E1 水平可以作为肝微粒体 CYP2E1 表达水平的一个标志。目前, Raucy 等^[19]已经研究阐明了淋巴细胞中 CYP2E1 含量和氯唑沙宗清除率之间的关系。但是,测定人淋巴细胞中的 CYP2E1 需要耗费大量的血(约为 320 ml),即便如此,也并不一定能发现人淋巴细胞中的 CYP2E1 具有氯唑沙宗 6-羟化酶或对硝基苯酚羟化酶的催化活性。对该酶结构的研究发现,与肝微粒体 CYP2E1 相比,淋巴细胞中的 CYP2E1 缺乏某些重要基团,分子更小。目前多倾向于认为这种截短的酶可能缺乏肝微粒体 CYP2E1 所具有的重要活性部分。Lucas 等^[14]用 20 ml 血样测定淋巴细胞中 CYP2E1 的活性未能取得成功。因此,用该方法进行大规模的人群筛检也是不可行的。

综上所述, CYP2E1 活性测定的成功经验主要来自实验室研究。就目前的国内外研究水平而言,要在大规模的人群流行病学研究中成功测定 CYP2E1 的活性还存在一定的困难,有待于寻找更加简更、可行的方法。

参考文献:

- [1] Dai Y, Rashbasteo J, Cederbaym A I. Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HePG2 cells; characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates [J]. Biochemistry, 1993, 32: 6928-6937.
- [2] Coon M J, Ding X, Pernecky S J, et al. Cytochrome P450: Progress and predictions [J]. FASEB J, 1992, 6: 669-673.
- [3] Gonzalez F J. Human cytochrome P450: problems and prospects [J]. Trends Biosci, 1992, 13: 346-352.
- [4] Guengerich F P. Reactions and significance of cytochrome P450 enzymes [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 10019-10022.
- [5] Koop P R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P4502E1 [J]. FASEB J, 1992, 6: 724-730.
- [6] Guengerich F P. Cytochrome P450: advances and prospects [J]. FASEB J, 1992, 6: 667-668.
- [7] Dupont L, Berthou F, Bodenez P, et al. Involvement of cytochromes P-450 2E1 and 3A4 in the 5-hydroxylation of salicylate in humans [J]. Drug Metab Dispos, 1999, 27: 322-326.
- [8] Kalipada P, Brian TS, Avtar K, et al. Cytochrome P-450 2E1 in rat liver peroxisomes; downregulation by ischemia/reperfusion-induced oxidative stress [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 23 (7): 963-971.

[9] Reginald FF, Dwight D S. Determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of chromatography B* 1996; 686: 291-296.

[10] Lucas D, Menez C, Girre C, et al. Decrease in cytochrome P450 2E1 as assessed by the rate of chlorzoxazone hydroxylation in alcoholics during the withdrawal phase [J]. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 362-366.

[11] Kim R B, Yamazaki H, Chiba K, et al. In vivo and in vitro characterization of CYP2E1 activity in Japanese and Caucasians [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 4-11.

[12] Frye R F, Adenoyin A, Mautio K, et al. Use of chlorzoxazone as in vivo probe of CYP2E1: choice of dose and phenotypic trait measure [J]. *J Clin Pharmacol* 1998; 38: 82-89.

[13] Girre C, Lucas D, Hispard E, et al. Assessment of cytochrome CYP2E1 induction in alcoholic patients by chlorzoxazone pharmacokinetics [J]. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 1503-1508.

[14] Lucas D, Ferrara R, Gonzeles E, et al. Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments [J]. *Toxicology Letters* 2001; 124: 71-78.

[15] Marchand L L, Grant R. W, Lynne R W. Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity: a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone [J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1999; 8: 495-500.

[16] Haufriod V, Buchet J P, Cardinal S, et al. Cytochrome P450 2E1 phenotyping by the chlorzoxazone metabolic ratio: assessment of its usefulness in workers exposed to styrene [J]. *Int Arch Occup Environ Health* 2002; 75 (7): 453-458.

[17] Song B J, Veech G L, Saenger P. Cytochrome P450 2E1 is elevated in lymphocytes from poorly controlled insulin-dependent diabetics [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1036-1040.

[18] Raucy J L, Curley G, Carpenter S P. Use of lymphocytes for assessing ethanol-mediated alterations in the expression of hepatic cytochrome CYP2E1 [J]. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 1369-1375.

[19] Raucy J L, Schultz E D, Wester M R, et al. Human lymphocyte cytochrome CYP2E1, a putative marker for alcohol-mediated changes in hepatic chlorzoxazone activity [J]. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 1429-1435.

口腔科医生汞中毒 4 例报告

付京秋, 胡英华, 杨惠敏

(黑龙江省第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150010)

口腔科医生使用银汞合金充填牙体, 由于长期与汞接触, 易引起汞吸收和汞中毒。我院近来收治了 4 例口腔科医生患慢性汞中毒, 现报告如下。

1 工作环境调查

4 位医生在同一单位同一诊室工作, 诊室面积约 80 m², 地面原为粗糙的水泥地, 2002 年修建成大理石地面, 有 5 个塑钢窗, 没有气窗。室内有一高温消毒柜, 紧挨着调治台和例 4 王某的诊椅。银汞合金均用手工研磨调制而成, 调制时未戴指套, 用纱布包裹挤出余汞, 患者多时直接用手挤压余汞, 剩余的银汞合金及余汞随废物丢弃, 未置水中作净化处置。室内未放置碘片, 每人每月使用汞量 60~90 g。

2 临床资料

【例 1】 黄某, 女, 53 岁, 工龄 23 年, 1993 年起性格变急躁易怒, 经常烦躁不安, 同时伴有心悸、失眠、记忆力减退、手指震颤、麻木、月经不调等症状。口腔检查: 口腔卫生良好, 全口牙龈炎, 后牙牙龈萎缩, 牙周袋 3 mm 以上, 牙齿 II 度松动, 第二磨牙全部松动脱落。心、肝、肾及神经系统检查无异常。1998 年尿汞测定 0.062 μmol/L, 2002 年尿汞测定 0.18 μmol/L。既往健康, 无遗传史。

【例 2】 李某, 女, 50 岁, 工龄 23 年。自觉失眠、烦躁不安、记忆力减退、手指震颤、腰痛约 2 年。口腔检查: 轻度口腔炎。尿汞测定两次分别为 0.1 μmol/L 和 0.08 μmol/L, 其

他检查均正常, 既往健康。

【例 3】 白某, 女, 50 岁, 工龄 23 年, 10 年前确诊为糖尿病 I 型, 半年前无明显诱因出现头晕、乏力、记忆力减退, 并出现腹痛、腹泻、便秘等症状, 入院前 8 天上述症状加重, 并出现眼睑及双下肢水肿。尿汞测定两次分别为 0.1 μmol/L 和 0.3 μmol/L。尿常规、肾功能及其他检查均正常。

【例 4】 王某, 34 岁, 工龄 13 年, 1 年前自觉腰痛, 伴轻度水肿, 出现性格急躁易怒、头晕、手指震颤等症状。内科及血尿常规未见异常。尿汞测定两次均为 0.1 μmol/L, 既往健康。

上述 4 例根据职业接触史、临床表现、尿汞测定 (冷原子吸收法, 正常值 < 0.05 μmol/L) 及结合现场工作环境调查, 按 GBZ89-2002 职业汞中毒诊断标准, 确诊为慢性汞中毒。入院后用二巯丙磺钠驱汞和对症治疗, 症状明显减轻。

3 讨论

汞在常温下蒸发, 且温度每增加 10℃, 汞蒸发增加 1.2~1.5 倍^[1]。银汞合金是汞和合金粉按比例研磨调和而成, 在调制和填充过程中, 患者呼出的汞蒸气、操作不慎撒落在地面上的汞、废弃的银汞合金以及磨除旧充填物产生的汞尘, 均能附着于墙壁、地面、用具或衣物上, 不易清除而形成毒源。口腔科医生长期受汞源污染影响健康, 甚至患慢性汞中毒。因此使用银汞合金充填牙体, 一定要使用银汞调拌器, 要保证室内通风良好, 穿不易吸附汞的涤棉工作服, 戴口罩和工作帽, 地面要光滑, 余汞要作净化处置, 室内放置碘片等。同时每年要作一次健康体检。有条件单位使用光固化复合树脂等^[2]替代银汞合金充填牙体, 由此可杜绝口腔科医生慢性汞中毒。

参考文献

[1] 李家泰. 临床药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 1387.
[2] 王光华. 牙体修复学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 161.