

· 实验研究 ·

CYP2E1 在 1,2-二氯乙烷致脑氧化损伤中的作用

Role of CYP2E1 played in oxidative damage of brain induced by 1,2-dichloroethane

王凌霄, 谭孝琼, 杨光谦, 王高阳, 赵凤红, 金亚平

(中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110122)

摘要: 分别将昆明种小鼠随机分为对照组、单纯染毒组及低、中和高剂量二烯丙基硫化物 (DAS) 干预组。检测脑组织中 CYP2E1 蛋白和 mRNA 表达、MDA 和 GSH 含量及 SOD 活性。单纯染毒组与对照组相比, 小鼠脑组织中 CYP2E1 蛋白和 mRNA 表达及 MDA 含量显著升高, 而 GSH 含量显著下降; DAS 各干预组与单纯染毒组相比, CYP2E1 蛋白和 mRNA 表达及 MDA 含量显著下降, GSH 含量显著升高。提示 1,2-DCE 可诱导 CYP2E1 表达, 导致脑组织氧化损伤。

关键词: 1,2-二氯乙烷 (1,2-DCE); CYP2E1; 氧化损伤; 二烯丙基硫化物 (DAS)

中图分类号: R994.3 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2017)02-0115-02

DOI:10.13631/j.cnki.zgggyx.2017.02.011

1,2-二氯乙烷 (1,2-DCE) 属高毒类物质, 极易挥发, 职业接触主要是经呼吸道吸入。上世纪 90 年代, 广东省陆续发生多起亚急性 1,2-DCE 职业中毒事故, 其临床表现为中毒性脑病, 脑水肿是其主要的病理过程^[1,2]。

CYP2E1 是细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 的重要亚型, 是氯代烃类化学物质的主要代谢酶之一。1,2-DCE 可经 CYP2E1 代谢生成毒性更强的中间产物 2-氯乙醛和 2-氯乙醇, 并最终代谢为氯乙酸随尿液排出体外^[3]。与其他 CYP450 亚型相比, CYP2E1 具有较强的 NADPH 氧化酶活性, 在代谢底物的过程中可产生大量活性氧自由基, 进而导致组织细胞的氧化损伤^[4,5]。

二烯丙基硫化物 (diallyl sulfide, DAS) 是一种大蒜提取物, 是目前公认的 CYP2E1 抑制剂^[6-8]。本研究以昆明种小鼠为实验对象, 探讨 CYP2E1 在 1,2-DCE 致脑损伤中的作用, 为揭示 1,2-DCE 中毒性脑水肿的形成机制及其防治提供实验参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1,2-二氯乙烷 (国药)、二烯丙基硫化物 (Sigma)、CYP2E1 一抗 (millipore, 美国) 及 SOD、MDA 和 GSH 试剂盒 (南京建成试剂有限公司)。T6 型紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司) 及高速台式离心机

(TGL-16G, 上海安亭科学仪器厂)。

1.2 实验动物与分组

选用健康雌性昆明种小鼠 50 只, 体重 (24.0±2.0) g, 由中国医科大学实验动物中心提供 [合格证号: SCXK (辽) 2013-0001]。适应性喂养 1 周后, 将小鼠随机分为对照组、单纯染毒组及低、中和高剂量 DAS 干预组, 每组 10 只。将 DAS 溶解于玉米油中, 于 1,2-DCE 染毒前 4 h, 各干预组小鼠灌胃给予 25、50 和 100 mg/kg DAS; 对照组和单纯染毒组小鼠灌胃给予玉米油; 灌胃容量均为 0.2 ml, 每日上午 8:00 灌胃, 下午 13:00 染毒, 灌胃前称重, 1,2-DCE 染毒浓度为 1.2 g/m³, 采用静式吸入方式, 每天染毒 3.5 h, 连续染毒 3 d, 染毒柜体积为 100 L。于末次染毒的次日处死小鼠, 快速取大脑额叶和颞叶组织进行相关指标检测。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 Real-time PCR 法检测 CYP2E1 mRNA 表达水平 提前将实验器具及材料高压灭菌备用。取左侧额叶和颞叶部分脑组织 30 mg, 加入 Trizol 0.5 ml, 匀浆 1 min×3 次, 颠倒混匀后室温静置 10 min。加入氯仿 0.2 ml, 颠倒混匀, 随后离心取上层水相, 加入等体积异丙醇, 混匀后 4℃ 静置 30 min, 离心弃上清, 加入预冷的 75% 乙醇 0.5 ml, 离心 5 min 继续弃上清, 超净工作台开风机干燥 30 min, 将沉淀重新溶于焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水中。分光光度计在 260 nm 和 280 nm 波长处测定其吸光度值 (OD 值), OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间时说明提取的总 RNA 纯度较高, 随后通过 RT-PCR 反应将样本中 mRNA 转录为 cDNA, 引物见表 1。建立 Real-time PCR 反应体系, 进行 Taqman 荧光实时定量 PCR 检测。测定各实验样本的循环指数 (cycethreshold, Ct), 求各样本等质量总 RNA 的 mRNA 的 Ct 值。

表 1 小鼠 CYP2E1 和 GAPDH 引物序列

基因	引物序列	长度 (bp)
CYP2E1	5'-CAGGAGTACAAGAACAAGGGG-3'	195
	5'-CAGAAAGGTAGGGTCAAAAGG-3'	
GAPDH	5'-CAATGTGTCCGTCGTGGATCT-3'	102
	5'-GTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG-3'	

1.3.2 Western blot 法检测蛋白含量 取小鼠对应右侧额叶和颞叶大脑组织 50 mg 置于 1.5 ml EP 管中, 加入 300 μl RIPA 裂解液置于冰上进行超声裂解, 重复多次使细胞破碎。4℃ 孵育 1 h 后, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清。用 BCA 试剂盒法检测样品蛋白浓度, 调整脑组织样品浓度至 5 μg/μl, SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 转膜, 抗体结合后用 ECL 法显色。用所测蛋白条带与 β-actin 条带的灰度值比值作

收稿日期: 2016-10-26; 修回日期: 2017-03-09

基金项目: 国家自然科学基金 (81172644, 81573105); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划 (LR2013038)

作者简介: 王凌霄 (1991—), 女, 硕士在读, 研究方向: 职业中毒防治研究。

通信作者: 金亚平, 教授, E-mail: yypjin@cmu.edu.cn。

为该蛋白的相对表达量。

1.3.3 GSH、MDA 含量及 SOD 活性 准确称取小鼠额叶和颞叶脑组织重量，以 1：9 的比例加入生理盐水制成组织匀浆，4℃ 下 2 500 r/min 离心 10 min，取上清液按照试剂盒说明书进行操作。GSH 含量的测定选用 DTNB 改良比色试剂盒法，MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸试剂盒法，SOD 活性测定为黄嘌呤氧化酶试剂盒法。

1.4 统计分析

用 SPSS 13.0 统计软件对检测数据进行分析处理，多组间比较采用单因素方差分析（One Way ANOVA），两两组间比较采用 SNK 法，以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的判定标准。

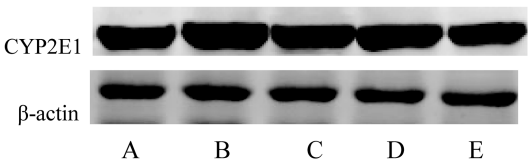
2 结果

2.1 小鼠染毒期间的体重变化

单纯染毒组小鼠从染毒第 2 天开始体重明显下降，各 DAS 干预组小鼠在染毒第 3 天体重开始下降。但与单纯染毒组相比，50、100 mg/kg DAS 干预组小鼠体重明显增加。

2.2 CYP2E1 抑制剂对各组小鼠脑组织中 CYP2E1 表达的影响

与对照组相比，单纯染毒组脑组织中 CYP2E1 蛋白和 mRNA 表达显著升高。与单纯染毒组相比，DAS 干预组 CYP2E1 蛋白和 mRNA 表达明显下降。见图 1，表 2。



注：A—对照组，B—单纯染毒组，C—25 mg/kg DAS 组，D—50 mg/kg DAS 组，E—100 mg/kg DAS 组。

图 1 各组小鼠脑组织 CYP2E1 蛋白表达

表 2 各组小鼠脑组织中 CYP2E1 蛋白和 mRNA 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蛋白表达灰度值 (与 β -actin 比值)	mRNA 表达
对照组	5	2.16 $\pm$ 0.10 [*]	0.99 $\pm$ 0.05 [*]
单纯染毒组	5	2.71 $\pm$ 0.08	1.46 $\pm$ 0.01
25 mg/kg DAS 组	5	2.30 $\pm$ 0.18 [*]	0.88 $\pm$ 0.03 [*]
50 mg/kg DAS 组	5	2.31 $\pm$ 0.10 [*]	0.89 $\pm$ 0.01 [*]
100 mg/kg DAS 组	5	2.10 $\pm$ 0.14 [*]	0.79 $\pm$ 0.03 [*]

注：*，与单纯染毒组比， $P < 0.05$ 。

2.3 DAS 对小鼠脑组织中氧化应激的影响

表 3 显示，单纯染毒组小鼠脑组织中 MDA 含量与对照组比较显著升高，而 GSH 含量显著下降。各 DAS 干预组小鼠脑组织中 MDA 含量与单纯染毒组比较均显著降低，GSH 含量显著升高。各组小鼠脑组织中 SOD 活性的差异均无统计学意义。

3 讨论

脑组织是 1,2-DCE 中毒损伤的主要靶器官。本研究结果显示，1,2-DCE 染毒可诱导脑组织中 CYP2E1 蛋白及 mRNA 表达的增加，表明 1,2-DCE 染毒对小鼠脑组织中 CYP2E1 的表达有诱导作用。1,2-DCE 染毒引起实验小鼠脑组织中 MDA 含量明显升高和 GSH 含量明显下降，提示 1,2-DCE 染毒可明显

表 3 各组小鼠脑组织中 MDA、GSH 含量及 SOD 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA (nmol/mg prot)	GSH (μ mol/g prot)	SOD (U/mg prot)
对照组	5	0.65 $\pm$ 0.13 [*]	3.90 $\pm$ 0.82 [*]	2.67 $\pm$ 0.44
单纯染毒组	5	0.94 $\pm$ 0.12	2.72 $\pm$ 0.57	2.50 $\pm$ 0.40
25 mg/kg DAS 干预组	5	0.55 $\pm$ 0.13 [*]	3.58 $\pm$ 0.62 [*]	2.42 $\pm$ 0.63
50 mg/kg DAS 干预组	5	0.69 $\pm$ 0.18 [*]	3.23 $\pm$ 0.69 [*]	3.08 $\pm$ 0.67
100 mg/kg DAS 干预组	5	0.48 $\pm$ 0.15 [*]	3.65 $\pm$ 0.27 [*]	2.62 $\pm$ 0.89

注：*，与单纯染毒组比较， $P < 0.05$ 。

削弱脑组织的抗氧化能力，导致脑组织的氧化损伤，进而引起脑水肿。另一方面，DAS 能够明显抑制脑组织中 CYP2E1 蛋白及 mRNA 表达。随着体内 CYP2E1 表达的抑制，1,2-DCE 染毒所致小鼠脑组织中 MDA 含量升高和 GSH 含量下降得到明显改善，这提示 CYP2E1 介导的 1,2-DCE 的体内代谢过程与其神经毒性密切相关。自由基能引起生物膜的脂质过氧化，导致细胞膜和血脑屏障的损伤，同时诱发细胞毒性和血管原性脑水肿^[5]，揭示 CYP2E1 介导 1,2-DCE 代谢过程中产生的大量自由基和活性物质能耗竭体内抗氧化物质，进而导致组织的氧化损伤。

本研究以 DAS 作为 CYP2E1 的抑制剂，探讨了 CYP2E1 表达抑制后对 1,2-DCE 染毒所致脑组织氧化损伤的影响。1,2-DCE 染毒可以明显诱导小鼠脑组织中 CYP2E1 的表达，进而促进其在体内的代谢过程，产生大量的活性中间产物及 ROS，造成脑组织的氧化损伤，并最终导致脑水肿的形成。而 DAS 可以通过抑制脑细胞内 CYP2E1 的表达，明显改善 1,2-DCE 所致脑组织氧化损伤。

参考文献：

[1] Chen S, Zhang Z, Lin H, *et al.* 1,2-Dichloroethane-induced toxic encephalopathy: a case series with morphological investigations [J]. J Neurol Sci, 2015, 351 (1-2): 36-40.

[2] Liu J R, Fang S, Ding M P, *et al.* Toxic encephalopathy caused by occupational exposure to 1,2-dichloroethane [J]. J Neurol Sci, 2010, 292 (1-2): 111-113.

[3] Gwinn M R, Johns D O, Bateson T F, *et al.* A review of the genotoxicity of 1,2-dichloroethane (EDC) [J]. Mutat Res, 2011, 727 (1-2): 42-53.

[4] Collom S L, Laddusaw R M, Burch A M, *et al.* CYP2E1 Substrate Inhibition: Mechanistic interpretation through an effector site for monocyclic compounds [J]. J Biol Chem, 2008, 283: 3487-3496.

[5] 黄建勋, 牛侨, 梁友信, 等. 1,2-二氯乙烷致脑水肿过程中自由基的作用研究 [J]. 中国职业医学, 2002, 29 (1): 2-6.

[6] Sun Q, Wang G, Gao L, *et al.* Roles of CYP2E1 in 1,2-dichloroethane-induced liver damage in mice [J]. Environ Toxicol, 2016, 31 (11): 1430-1438.

[7] Zeng T, Zhang C L, Song F Y, *et al.* The modulatory effects of garlic oil on hepatic cytochrome P450s in mice [J]. Hum Exp Toxicol, 2012, 28 (12): 777-783.

[8] Rao P S, Midde N M, Miller D D, *et al.* Diallyl sulfide: potential use in novel therapeutic interventions in alcohol, drugs, and disease mediated cellular toxicity by targeting cytochrome P450 2E1 [J]. Curr Drug Metab, 2015, 16 (6): 486-503.