

草鱼肝细胞中 CYP2E1 活性的诱导研究

王翔凌¹ 杨先乐^{1,2} 张 宁¹ 喻文娟¹ 胡 鲲¹

(1. 上海水产大学农业部渔业动植物病原库, 上海 200090 2. 上海高校水产养殖学 E 研究院, 上海 200090)

摘要: CYP2E1 为代谢大部分药物及环境中毒物的关键酶。以草鱼肝细胞 (*Ctenopharyngodon idellus* hepatocyte) 为反应体系, 选取氯喹沙宗 (CZX) 为底物, 采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 法测定其产物 6-OH-氯喹沙宗 (HCZX) 的量, Lowry 法测定肝细胞中蛋白的浓度从而反映 CYP2E1 活性, 并采用该酶特异性诱导剂乙醇对其进行诱导, 观察其酶活变化及 CZX 在细胞中代谢情况。结果表明, CZX 在草鱼肝细胞中的基础代谢较低, 经过对 CYP2E1 诱导条件的优化及筛选, 得到最佳诱导剂剂量为 $4\mu\text{g/mL}$, 诱导时间为 24h, 底物浓度为 $50\mu\text{g/mL}$ 并且孵育时间为 1h 时, 其酶活达到最高, 约为 $0.47\mu\text{g/min}\cdot\text{mg}$ 。对照组和诱导组的草鱼肝细胞中 CZX 的消除半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 202.10h 和 28.75h, 差异极显著, 表明乙醇诱导的 CYP2E1 能够加快底物的代谢。酶促反应动力学参数表明乙醇诱导的 CYP2E1 与底物的亲和力较高, 酶促反应强度较大。该结果能够为 CYP2E1 代谢的药物及环境毒物的研究提供理论依据。

关键词: 反相高效液相色谱法; 草鱼肝细胞; CYP2E1; 氯喹沙宗; 诱导

中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)04-0469-06

药物在动物体内代谢, 不论是何种方式, 均有酶的参与。与药物代谢关系最密切的是细胞色素 P450 酶系 (CYP450s), 它主要存在于动物体肝脏中, 是一族重要的混合功能氧化酶, 可被许多物质诱导或抑制^[1]。其中 CYP2E1 在肝脏中占 P450 总量的 7%^[2], 参与了药物的代谢以及许多前致癌物和前毒物的活化过程, 因此酶活性的高低直接影响物质的代谢速度, 从而影响特定药物或毒物对机体的作用大小, 所以测定 CYP2E1 的活性水平及其外源物质对该酶活性的影响是探讨属于该酶底物的一类药物或毒物与机体相互影响的基础工作。

氯喹沙宗 (Chlorzoxazone, CZX) 为该酶最常见的底物, 其中约有 90% 在肝脏经 6-羟化代谢生成 6-羟基氯喹沙宗 (6-OH-CZX, HCZX) (图 1)^[3]。因该代谢途径主要由 CYP2E1 催化, 故 CZX 能在体内外作为 CYP2E1 的探针药物反映其活性^[4,5]。关于 P450 酶活性的测定报道多数是测肝微粒体的酶活性^[6], 而用鱼类体外传代细胞直接测定酶活未见报道。药物代谢酶中有很一部分属于可诱导型酶。关于此方面的研究在虹鳟肝原代细胞中对 CYP1A

已有所报道^[7], 而未见 CYP2E1 在草鱼传代肝细胞 (*Ctenopharyngodon idellus* hepatocyte) 中的酶活检测及诱导研究的报道。因此本研究选用该细胞为反应体系, 建立了反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 来检测 CZX 在草鱼肝细胞中经 CYP2E1 代谢的产物 HCZX 从而反映该酶的活性, 并选用其特异性诱导剂来筛选该酶活研究的最佳诱导条件, 建立 CYP2E1 的最佳诱导模型, 从而为环境毒理学和临床合理用药提供依据。

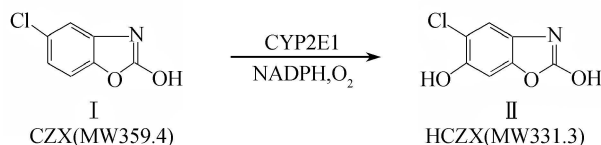


图 1 CZX 经 CYP2E1 代谢成 HCZX

Fig. 1 Metabolism of CZX (iv) to HCZX (⊖) by CYP2E1

1 材料与方法

1.1 材料 草鱼肝细胞系 (L8824) 由农业部渔业动植物病原库提供, 编号 BYK-C12-01, M199 培养

收稿日期: 2007-06-15 修订日期: 2008-03-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30371109); 上海市教委 E-研究院建设项目 (E03009); 上海市重点学科建设项目 (Y1101) 资助

作者简介: 王翔凌 (1979-), 女, 汉族, 山东临沂人; 博士研究生; 主要从事水产药理学研究。Tel 021-65710870 E-mail nancywx@eyou.com

通讯作者: 杨先乐, Tel 021-65710503; E-mail xlyang@shfu.edu.cn

基, 28℃, 充 5% CO₂。

1.2 药品及试剂 CZX, 由鲁南贝特制药厂生产, 含量 ≥99%; HCZX, 购自 Sigma 公司; 安替比林, 购自国药集团上海化学试剂公司, 含量 ≥99%; 其他试剂均为分析纯, 从中国医药集团上海化学试剂有限公司购置; 乙腈为色谱纯, 美国 Fisher 生产。

1.3 高效液相色谱仪及色谱条件 Agilent 1100 型高效液相色谱 (HPLC) 仪 (色谱柱类型: ZORBAX SB-C18 4.6 × 150 mm, 5 μm); 可变波长紫外检测器; 流动相 0.1 mol/L 醋酸铵: 乙腈: 四氢呋喃 = 72: 22.5: 5.5 (V/V/V), 用 H₃PO₄ 调 pH 至 3.0 过滤脱气后现用; 流速 1.0 mL/min; 柱温 40℃; 紫外检测波长 280 nm; 进样量 20 μL。

1.4 样品处理及测定 (内标法定量) 取生长状态良好的 L8824 倒掉培养基, 用 D-hanks 液轻洗细胞 2—3 次。将细胞轻轻吹打后用 D-hanks 液稀释成一定浓度, 计数。取 1 mL 该细胞于离心管中加入一定量的所需浓度的 CZX、HCZX 以及内标安替比林, 参考文献 [8] 所报道的该类药物的提取方法, 将制得的细胞样品于漩涡混合器上混合 2 min, 再根据所取细胞量按 1: 4 (V/V) 分别加入二氯甲烷, 混合 2 min, 液体快速混合器上混合 10 min, 8000 r/min 离心 10 min 弃去上层水相, 将下层有机相倒入 7 mL 具塞离心管中, 用样品蒸干仪在 45℃ 恒温中蒸干。蒸残留物用 0.5 mL 流动相溶解, 漩涡混合器上混匀 2 min, 加入 1 mL 正己烷, 液体快速混合器上混匀 10 min, 8000 r/min 离心 10 min, 吸取下层液体 20 μL 进样, 进行 HPLC 测定。

测得 CZX 和 HCZX 的标准曲线分别为 $A_i = 0.52 C_i - 0.32$ 和 $A_i = 0.07 C_i - 0.02$ 其中 A_i 表示药物与内标的峰面积比, C_i 表示药物标准品在空白细胞中的浓度, 二者在 0.05—100 μg/mL 范围内, 线性关系良好, 其相关系数 r 均为 0.9998。本法的最低检测限均为 0.01 μg/mL, CZX 和 HCZX 在细胞中的最低平均回收率分别为 79.96% 和 84.84%, 所有样品日内变异系数小于 5.18%, 批间变异系数小于 5.40%。此方法能满足检测要求。

1.5 CYP2E1 在草鱼肝细胞中酶活的测定及诱导

对培养过程中 L8824 的形态观察, 选择传代后第 5 天的 L8824 作为诱导细胞, 浓度约 2×10^6 个/mL。加入药酶诱导剂乙醇以 0.5、1、2、4、6 μg/mL 分别诱导 L8824 0、12、24、48、72 h, 然后加入底物 CZX, 使之孵育浓度为 50 μg/mL, 振荡后置温箱中孵育 1 h, 同时选取未加诱导剂作为对照组, 每点设 5 个平行样,

按 1.4 中所述方法制样后做 HPLC 测定。

在 L8824 中加入 4 μg/mL 的药酶诱导剂, 培养箱中静置 24 h, 加入 CZX 的标准品, 使得底物孵育终浓度为 50 μg/mL, 分别孵育 0.25、0.5、1、2、4、8 h, 另取 L8824 与 5、10、20、50、100 μg/mL 的底物共孵育 1 h。同时选取未加诱导剂作为对照组, 每点设 5 个平行样, 处理方法同上。

采用 Lowry 法^[9]测得 L8824 中蛋白含量, 根据标准曲线计算各点 CZX 的剩余浓度 (C_t) 和 HCZX (C_n) 的生成量, 则以每 mg 蛋白单位时间内 HCZX 的生成量表示 CYP2E1 酶活 ($\mu\text{g}/\text{min} \cdot \text{mg}$)。

1.6 数据处理 CZX 在 L8824 中消除过程采用指数方程 $C_t = C_o \cdot e^{-k_{\text{el}} t}$ 表示; CZX 转化率采用公式: $(1 - C_t/C_o) \times 100\%$ 表示; 药酶反应动态图采用 Excel 软件绘制; Lineweaver-Burk 方程式作图反映药酶动力学, 并计算酶动力学参数, 其公式为: $\frac{1}{V} =$

$$\frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}; \text{清除率 } Cl_{\text{int}} = V_{\max}/K_m。$$

2 结果

2.1 CYP2E1 酶活诱导模型的优化

从 L8824 培养过程中的形态观察, 选择传代后第 5 天的 L8824 并且浓度为 5×10^5 cells/mL 时作为诱导细胞, 以不同的诱导剂量和诱导时间分别进行诱导。其诱导时间对诱导剂的剂量-效应曲线 (图 2), 可知 4 μg/mL 诱导剂乙醇诱导 24 h 时, CYP2E1 酶活性达到峰值, 约为基础酶活的 4 倍。同样的诱导剂量下, 其诱导酶活依次为 24 h > 48 h > 12 h > 72 h, 诱导剂剂量对酶活的影响也是先升高后降低。

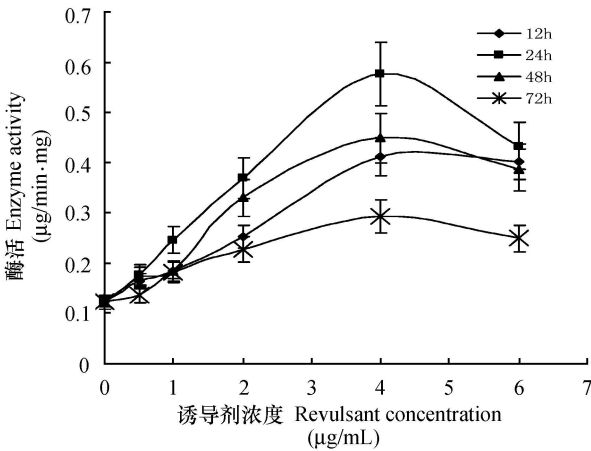


图 2 乙醇作用时间对诱导 CYP2E1 剂量-效应曲线的影响 ($n = 5 \bar{x} \pm s$)
Fig 2 Effect of exposure time to ethanol on dose-response curves of CYP2E1 induction ($n = 5 \bar{x} \pm s$)

同样条件下研究了不同孵育时间对酶活及 HCZX 生成量的影响(图 3), 可看出, 随着孵育时间的延长, 其酶活呈现先升高后下降的趋势, 当孵育时间为 1h 时, 其酶活最高, 而 HCZX 的生成量是呈现一直升高的趋势, 在 1h 左右生成速率最大。无论是 CYP2E1 酶活还是 HCZX 的生成量, 诱导组显著高于对照组。

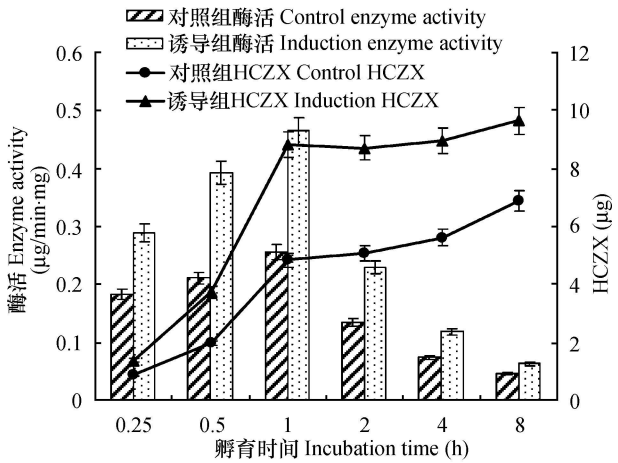


图 3 底物孵育时间对酶活及 HCZX 生成量的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)
Fig 3 Affect of incubation time to enzyme activity and HCZX ($n=5, \bar{x} \pm s$)

2.2 CZX 体外代谢的药时曲线

L8824 细胞与初始浓度 (C_0) 为 $50\mu\text{g/mL}$ 的 CZX 分别共孵育 0.25、0.5、1、2、4、8h 后检测 CZX 的剩余浓度 (C_t) 和 HCZX 生成量 (C_n)。经回归分析对照组和诱导组的药时曲线方程分别为 $C_t/C_0 = -0.07\text{Ln}(t) + 0.88$ ($r = 0.9971$) 和 $C_t/C_0 = -0.10\text{Ln}(t) + 0.82$ ($r = 0.9935$), 消除半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 202.10h 和 28.75h。其消除曲线方程分别为 $C_t = 46.56e^{-0.038t}$ ($r^2 = 0.8370$) 和 $C_t = 44.54e^{-0.052t}$ ($r^2 = 0.8771$), 结果显示对照组 CZX 的代谢较为缓慢, 而乙醇诱导组代谢较快(图 4)。其底物转化率(表 1), 通过显著性比较分析可以看出, 除 0.25h 外, 诱导组均极显著高于对照组。

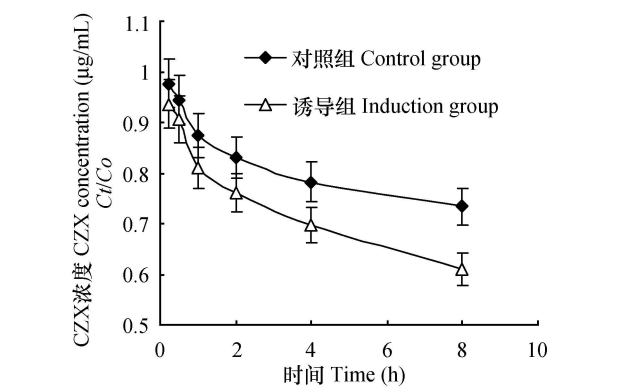


图 4 CZX 在 L8824 中代谢的药时曲线 ($n=5, \bar{x} \pm s$)
Fig 4 Concentration-time curve of CZX in L8824 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

表 1 不同代谢时间内的 CZX 转化率 ($n=5, \bar{x} \pm s$)		
Tab. 1 The conversion for CZX in different time ($n=5, \bar{x} \pm s$)		
时间 Time (h)	对照组 Control group	诱导组 Induction group
	CZX 转化率 CZX conversion (%)	CZX 转化率 CZX conversion (%)
0.25	2.36 ± 1.35	5.98 ± 1.91
0.5	5.59 ± 1.91	9.42 ± 1.97*
1	12.59 ± 2.02	19.01 ± 1.72*
2	16.98 ± 3.04	23.95 ± 1.76*
4	21.84 ± 1.21	30.39 ± 0.86*
8	26.59 ± 1.52	38.97 ± 1.17*

注: CZX 转化率 (%) = $(1 - C_t/C_0) \times 100\%$ 。诱导组与对照组进行 T-Test, “*” 表示显著差异 ($p < 0.05$), “**” 表示极显著差异 ($p < 0.01$)
Note CZX Conversion (%) = $(1 - C_t/C_0) \times 100\%$. T-Test was done between induction and control group “*” represent significant deviation ($p < 0.05$), “**” represent extreme significant deviation ($p < 0.01$)

2.3 CZX 在细胞中体外代谢的酶动力学研究

L8824 细胞分别与 5、10、20、50、 $100\mu\text{g/mL}$ 的底物共孵育 1h 后检测 HCZX 的生成量。根据 Lineweaver-Burk 作图^[10-11], 获得对照组和诱导组的酶促反应动力学方程分别为 $1/V = 192.76 \times 1/[S] + 1.71$ ($R^2 = 0.9604$) 和 $1/V = 52.44 \times 1/[S] + 0.90$ ($R^2 = 0.9918$) (图 5)。根据方程计算酶动力学参数(表 2), 结果显示诱导组中的最大反应速率 V_{max} 和内在清除率 Cl_i 均极显著大于对照组, 表明乙醇诱导的酶催化效能较高。对照组米氏常数 K_m 值约为诱导组的 41 倍, 表明乙醇诱导的酶与底物的亲和力较高, 酶促反应强度较大。

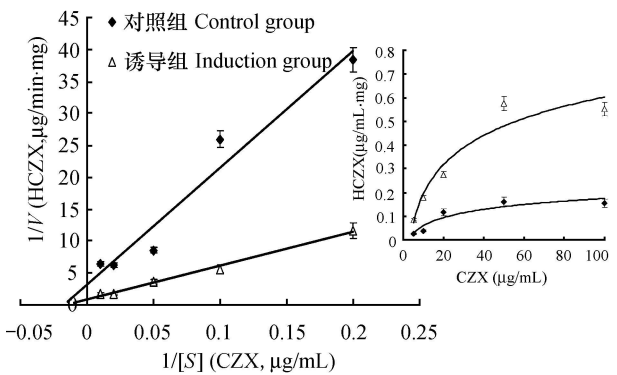


图 5 CYP2E1 在 L8824 中的 Lineweaver-Burk 作图 ($n=5, \bar{x} \pm s$)
Fig 5 Lineweaver-Burk plot of CYP2E1 in L8824 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

3.1 CYP2E1 研究方法的确定

药物在生物体内的生物转化通常是通过酶介导或酶促反应进行的。因此研究鱼类药物代谢酶(亦

简称药酶), 对了解药物在水产动物体内的作用机理与消除规律, 进而对指导临床合理用药及药物残留监控有着重大意义^[12]。鱼类药物代谢酶一般可以通过诱导获得^[12], 药物代谢酶诱导主要有体内诱导和体外诱导两条途径。研究鱼类药物代谢酶及其机理的方法以体内试验居多, 如将药物 (或诱导剂) 制成药饵采用口服、注射、浸泡等给予方式, 研究分析参与药物代谢相关酶的活性或其 mRNA 水平等^[13]。而体内诱导因易受到外界环境、机体健康状况、个体差异等各种混杂因素影响, 影响对药物代谢

深层次的认识, 因此体外诱导研究药物代谢酶已经成为近年来药理学研究的一个热点。因此本实验选用完整的草鱼肝细胞为反应体系研究 CYP2E1 的活性, 能够更加符合药物在体内的代谢情况, 从而能够更加准确、省时、经济的采用体外研究方法, 推测药物在体内的实际代谢。CYP2E1 的探针药物有 3 种: 对位硝基酚、N-亚硝基双甲胺和 CZX, 它们都可以用于体外试验, 通过比较证实^[3 14], 发现 CZX 为较安全的体内外探针药物, 并且能够较好地反应该酶的活性。

表 2 细胞中 CYP2E1 代谢的酶动力学参数
Tab. 2 Enzymatic parameters of CYP2E1 in L8824

组名 Group name	Km (μg/mL)	Vmax (μg/m in• mg)	Clint (mL/m in• mg)
对照组 Control group	113.02	0.59	0.01
诱导组 Induction group	2.72	1.12	0.41

3.2 鱼类 CYP2E1 体外诱导细胞模型的建立

体外药物代谢研究的结果最终可能会影响临床试验的设计, 因此体外研究必须有高度的一致性, 实验条件需严格控制, 才可以使实验结果具有重现性, 得出的结论才会有价值。实验条件的差异会造成对酶活性作出过低或是过高的评估, 最终导致药物间相互作用的不正确的判断。因此为了能够更好地反应药物与酶之间的相互作用情况, 选择反应的最佳条件是很重要的。

在本试验中, 通过对诱导条件的优化和筛选, 最终选择了各反应的最佳诱导条件, 建立了 L8824 中 CYP2E1 的体外诱导的细胞模型。在本试验条件下, 使用该酶特异性诱导剂进行诱导时, 最佳诱导剂量为 4μg/mL, 最佳诱导时间为 4h。其特异性底物的浓度为 50μg/mL 时, 其最佳孵育时间是 1h 时酶活最高。据报道^[15], 外源化学物质诱导不仅影响肝细胞 CYP1A 的表达, 同时还影响肝组织以外的药酶表达, 如 50mg/kg 剂量的萘黄酮处理虹鳟肾微粒体可导致 ECOD 酶和 EROD 酶活性显著升高。进一步研究表明, 虹鳟肝原代细胞暴露于苯巴比妥, 能诱导 CYP1A, 表现在 CYP1A 蛋白 mRNA 量增加和 EROD 酶活性升高, 这是由于转录和后转录上的调节所致。然而, 当诱导剂浓度过高时反而会导致 EROD 酶催化活性下降^[7], 有关草鱼其他细胞的酶活以及 L8824 中诱导酶活与 mRNA 及蛋白表达量的关系有待于进一步研究。关于 CYP2E1 在鱼类体内活性的研究也有报道, 陈大健等^[16]采用药代动力学的方法研究了氟苯尼考等对鲫鱼体内 CYP2E1 的活性的影

响, 研究得到氟苯尼考对 CYP2E1 有抑制作用。因此, 该药与 CYP2E1 酶的底物药物合用时, 很可能会发生药物间的相互作用, 应减少后者的用量, 避免蓄积中毒。另外该抑制作用在一定程度上能够使水体中的由 CYP2E1 活化的前毒物和前致癌物不能或减少活化为有毒物和致癌物, 从而减少这些有害物质对鱼体的损害。关于 CYP2E1 的体内活性如何与本研究中外活性相互联系起来, 即寻找二者之间的相关性有待于进一步探讨, 从而能够做到由体外推体内, 以更好的应用于水产动物的健康养殖。

由此可知, 关于药物代谢酶活性及诱导的研究已有相关报道, 而关于鱼类细胞中 P450 酶诱导条件筛选的研究在国内外尚未见报道, 因此本实验的研究能够有利于获得各种鱼类药物代谢酶, 而且还能直接观察酶对底物的选择代谢, 为揭示渔药代谢的本质及安全使用提供方便、可靠的研究平台。

3.3 代谢性药物的相互作用

近年来, 由于体外研究药物代谢酶已经成为药理学的一个研究热点。在新药的早期阶段, 应用体外代谢体系与酶的特异性探针底物结合的方法进行药物体外代谢的研究, 了解药物对代谢酶的调节及预测可能的代谢性药物相互作用, 并以体外研究所得数据为进一步的临床试验设计提供有价值的信息, 降低临床试验的成本及风险, 避免因药物代谢引起的不良反应的发生^[17-19]。

本试验中研究的是乙醇与 CYP2E1 底物的相互作用, 发现乙醇对 CYP2E1 有明显的诱导作用, 能加快底物的代谢, 因此与同类药物合用时应该加大后

者的用量以达到治疗效果。为了能够解决实际问题, 下一步的研究应该引入有价值的渔药, 从而研究代谢性药物的相互作用。因此该诱导模型的研究能够为以后渔药的引入提供一定的理论基础。通过对诱导前后酶促反应动力学的研究发现乙醇诱导 CYP2E1 的最大反应速率明显快于对照组, 并且内在清除率诱导组约为对照组的 80 倍, 充分说明了乙醇对 CZX 的代谢有显著的促进作用。在上述基础上, 酶动力学方程对 CYP2E1 酶促反应的各种参数进行了更量化的研究, 有助于进一步阐明 CZX 在鱼类细胞中的代谢途径和机理。

由此, 体外代谢研究的瓶颈已经从数据的获得转化为对数据的解释^[17-20]。体外代谢已经被证明在定性预测药物相互作用方面有重要价值, 但是在定量方面仍无法作为单一手段预测药物的相互作用, 因此需要进一步的研究体外-体内的相关性, 充分合理的应用体外酶与药物之间作用的相关数据, 降低渔药研发筛选过程的成本与风险, 为渔药临床合理应用提供有价值的信息。另外由于 CYP2E1 还能够代谢环境中的有毒物质, 因此该研究能够为水域环境毒物的监测提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] Slaughter R L, Edwards D J. Recent advances in the cytochrome P450 enzymes [J]. *Am J Pharmacother*, 1995, **29**(6): 619—624
- [2] Roberts B J, Shoaf S E, Jeong K S, et al. Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, **205**(2): 1064—1071
- [3] Reginald F F, 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
- [4] Koop D R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P4502E1 [J]. *FASEB*, 1992, **6**(2): 724—730
- [5] Dreishach A W, Frenex N, Hopkins N E, et al. Urinary excretion of 6-OH-chlorzoxazone (CZX-OH) is formation rate limited [J]. *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 1995, **58**(5): 498—505
- [6] Ma J Q, Bian B L, Gu X C, et al. Determination of human hepatic cytochromes P450 and activity of CYP1A1 and CYP2A6 [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 1999, **30**(10): 449—452 [马璟, 钱蓓丽, 顾性初, 等. 人肝细胞色素 P450 含量及其同工酶 1A1、2A6 活性的测定. 中国医药工业杂志, 1999, **30**(10): 449—452]
- [7] Weber L P, Janz D M. Effect of β -naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, **54**(1): 39—50
- [8] Wang X L, Fang Z P, Cao J Y, et al. Studies on residue and depletion of sarafloxacin hydrochloride in goldfish *carassius auratus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **2**(30): 198—203 [王翔凌, 方之平, 操继跃, 等. 盐酸沙拉沙星在鲫体内的残留及消除规律研究. 水生生物学报, 2006, **2**(30): 198—203]
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, **193**(1): 265—275
- [10] Kudo S, Uchida M, Odomi M. Metabolism of carteolol by cDNA-expressed human cytochrome P450 [J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1997, **52**: 479—485
- [11] Zhao L, Lou Y Q. Enzyme kinetic studies on the *in vitro* metabolism of omeprazole by Chinese human liver microsomes [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1996, **31**(5): 352—357 [赵莉, 楼雅卿. 中国人肝微粒体体外代谢奥美拉唑的酶促反应动力学. 药学报, 1996, **31**(5): 352—357]
- [12] Buhler D R, Wang-Buhler J L. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1998, **121**(1—3): 107—137
- [13] Wong C K C, Yeung H Y, Woo P S, et al. Specific expression of cytochrome P4501A1 gene in gill, intestine and liver of tilapia exposed to coastal sediments [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, **54**(1): 69—80
- [14] Tassaneeyakul W, Veronese M E, Birkett D J, et al. Validation of 4-nitrophenol as an *in vitro* substrate for human liver CYP2E1 using cDNA expression and microsomal kinetic techniques [J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, **46**(11): 1975—1981
- [15] Ekombe C R, Lech J J. Induction and characterization of hemoprotein(s) P450 and monooxygenation in rainbow trout (*Salmo Gairdneri*) [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1979, **49**(3): 437—450
- [16] Chen D J, Wang J C, Zhang P, et al. Evaluation of effect of florfenicol on cytochrome P4502E1 activity in *Carassius auratus* using pharmacokinetic method of chlorzoxazone [J]. *Veterinary Science in China*, 2007, **37**(3): 269—273 [陈大健, 王加才, 张萍, 等. 氟苯尼考对鲫鱼 CYP2E1 活性影响的药代动力学评价. 中国兽医药, 2007, **37**(3): 269—273]
- [17] Venkatakrishnan K, Molke L L, Obach R S, et al. Drug metabolism and drug interactions: application and clinical value of *in vitro* models [J]. *Current Drug Metabolism*, 2003, **4**(5): 423—459
- [18] Masimirembwa C M, Thompson R, Andersson T B. *In vitro* high-throughput screening of compounds for favorable metabolic properties in drug discovery [J]. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 2001, **4**(3): 245—263
- [19] Björnsson T D, Callaghan J T, Einfeldt J, et al. The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: a PhRMA perspective [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2003, **31**(7): 815—832
- [20] Zhou Q, Yan X F, Yao T W, et al. Prediction of metabolic drug interaction *in vivo* by using *in vitro* drug metabolism data [J]. *Chin*

Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2003, **19**(2): 128–133
[周权, 颜小峰, 姚彤炜, 等. 用体外代谢数据预测临床上药物

体内代谢性相互作用. 中国临床药理学杂志, 2003 **19**(2):
128–133]

INDUCTION OF CYP2E1 ACTIVITY IN *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* HEPATOCYTE

WANG Xiang-Ling¹, YANG Xian-Le^{1,2}, ZHANG Ning¹, YU Wen-Juan¹ and HU Kun¹

(1. Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090

2. E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 200090)

Abstract CYP2E1 can metabolize most of the drug and toxicant. To study the CYP2E1 activity, *Ctenopharyngodon idellus* hepatocyte was prepared and used as reaction system, selecting chlorzoxazone (CZX) as substrate and joining antipyrine as inner standard. RP-HPLC method was established to detect the product of 6-OH-chlorzoxazone (HCZX) and the Lowry method was used to measure the concentration of protein in cell, then the activity of CYP2E1 in cell was reflected. The medicine was extracted by dichloromethane from cell and then the extracts were evaporated to dryness under 45°C and were dissolved in mobile phase. The fat of the solute was degreased by hexane. CZX and HCZX analyses were performed by RP-HPLC. The mobile phase used for the analysis consisted of 0.1 mol/L ammonium acetate, acetonitrile and tetrahydrofuran (72:22.5:5.5 v/v) delivered at a flow-rate of 1.0 mL/min. The mobile phase was degassed and filtered through a 0.45 μm membrane before being used. The column temperature was 40°C and UV detection was measured at 280 nm. Then the *Ctenopharyngodon idellus* hepatocyte was treated with ethanol in different dosage, which was specific inducer of CYP2E1, and the metabolism of CZX after induction *in vitro* was also studied. The result demonstrated that the RP-HPLC method established was simple and accurate for the determination of activity of CYP2E1. The mean recoveries for samples were all exceed 79.96%, Intra-day CV and inter-day CV were under 5.18% and 5.40% respectively. The elementary metabolism for CZX was low, while after the optimization and screening for induction condition, ethanol could significantly accelerate the metabolism of CZX in fish cell. When the cell was induced by ethanol with dosage of 4 μg/mL for 24 h and incubated with CZX (50 μg/mL) for 1 h, CYP2E1 activity achieved the highest level, which was 0.47 μg/min/mg. Elimination equations of CZX metabolism in control group and ethanol-related were $Ct = 46.56e^{-0.038t}$ ($r^2 = 0.8370$) and $Ct = 44.54e^{-0.052t}$ ($r^2 = 0.8771$), respectively. The elimination half-lives were 202.10 h and 28.75 h, respectively. The difference between them was conspicuous and it indicated that ethanol could accelerate the metabolism of CZX. The enzymatic equations for control group and induction group were $1/V = 192.76 \times 1/[S] + 1.71$ and $1/V = 52.44 \times 1/[S] + 0.90$ respectively. Enzymatic parameters demonstrated CYP2E1 induced by ethanol in cell has higher affinity with substrate and stronger potency to catalyze CZX than the control. In conclusion, ethanol has big induction intensity to CYP2E1 in fish cell. The results of this study using an *in vitro* approach to clearly show the potential properties of P450 in fish drug residue and environmental toxicant.

Key words RP-HPLC; *Ctenopharyngodon idellus* hepatocyte; CYP2E1; Chlorzoxazone; Induction