

镭对大鼠肝微粒体细胞色素 P-450 同功酶的影响

肖功华* 刘毓谷

(同济医科大学环境毒理研究室,武汉)

关键词 镭,细胞色素, P-450, 同功酶

近年来的研究已经确定,细胞色素 P-450 并非一单纯酶蛋白,而具有多型性,存在多种类型同功酶^[1,2]。对细胞色素 P-450 多型性的研究有助于理解和解释与细胞色素 P-450 有关代谢酶存在种属、品系、年龄、性别和组织器官等差异的现象。过去实验已经证实,镭对经苯巴比妥诱导和未经诱导肝微粒体细胞色素 P-450 均具有明显抑制作用^[3,4],苯巴比妥是一种已知的细胞色素 P-450 合成诱导剂^[5],从而提示镭降低细胞色素 P-450 含量的机理之一是抑制后者在微粒体中的新生合成。此种抑制作用是否具有选择性,抑制作用主要发生在何种同功酶报道尚少。为了确定镭对细胞色素 P-450 同功酶的抑制作用,我们进行了实验研究。

材料和方法

1. 试剂和材料

主要试剂及其生产厂: 聚乙二醇 6000 为 Chrompack 产品,胆酸钠属 Serva 产品, Emulgen 911 为日本 Kao Atlas Co Ltd 产品, DEAE 纤维素 52 为 Whatman 产品, EDTA 和甘油为国内产品,纯度均为 AR 或生化试剂。

2. 动物处理

实验使用本校动物房繁殖的雄性 Wistar 纯系大鼠,体重 200 克左右,随机分组。苯巴比妥诱导组动物

* 现在地址: 湖南省劳动卫生研究所。

应性及脾细胞对 IL-2 反应性亦较对照有增强的趋势。其最明显刺激剂量单次照射为 75mGy,持续照射为累积 65mGy。已知 PFC 反应的完成需要 T、B 淋巴细胞的相互作用及协调。因此我们用双重双标记方法检测了丝裂原诱导后淋巴细胞内 DNA、RNA 及蛋白质合成的变化,以此评价照射后淋巴细胞的功能状态。实验发现,受低剂量 X 线照射动物在免疫后初期,ConA 诱导的三种大分子合成均较对照显著增强,而 LPS 诱导的三种大分子合成虽有增强趋势但无统计学意义。上述实验结果提示,照后免疫初期 T 淋巴细胞受小剂量辐射刺激而致功能活化,一方面通过 T-B 细胞接触发挥辅助功能,另一方面可通过释放免疫增强性淋巴因子促进抗体形成反应。此外, B 淋巴细胞受小剂量辐射刺激后亦有功能活化的趋势,虽不显著,但至少可说明在此剂量范围内(<0.1 Gy)未出现有 B 细胞功能减弱的反应。

就目前所获得的实验结果分析,低水平辐射刺激脾脏 PFC (空斑形成细胞)反应,似以 T 细胞系统的反应增强为主。由于 T 淋巴细胞的功能活化,辅助能力增强,IL-2 形成增多而致抗体形成增强。

ConA 诱导的丝裂原反应中,对 ConA 起反应的既有辅助性 T 细胞 (T_H) 也有抑制性 T 细胞 (T_s),且 T_s 的放射敏感性大于 T_H^[7]。我们曾用 ANAE 染色颗粒分型法检测受照小鼠外周血 T 细胞亚组数目的变化,未发现 T_s/T_H 比例的变化,提示小剂量辐射未引起调节性 T 淋巴细胞亚组数目的改变^[8,9]。同时有关 T_s 功能变化的研究也已初步证实低剂量(<0.1Gy)低 LET 辐射并未引起抑制性 T 细胞功能的减弱^[8]。

参 考 文 献

- 1 Luckey TD. *Health Phys.* 1982; 43(6):771
- 2 Gualde N, Goodwin J S. *Cell Immunol.* 1984; 84: 439
- 3 刘树铮,等. *中华放射医学与防护杂志*,1985;5(2);124
- 4 刘伟宏,刘树铮. *中华放射医学与防护杂志*,1986; 6 (2): 77
- 5 刘伟宏,刘树铮. *中华放射医学与防护杂志*,1987; 7 (5): 336
- 6 刘克良等. *生物化学与生物物理进展*,1984;(5): 43
- 7 Miyawaki T *et al.* *J Immunol.* 1982; 128:899
- 8 刘伟宏,刘树铮. *白求恩医科大学学报*,1989;待发表

[本文于1988年9月28日收到]

腹腔一次注给 60mg/kg 体重苯巴比妥钠。镉加苯巴比妥处理组动物除一次注给上述剂量苯巴比妥钠外,同时分别一次腹腔注给 2.4mg/kg 体重醋酸镉。上述处理后 72 小时断头处死动物,处死前断食 24 小时。

3. 分离肝微粒体

断头处死大鼠,放尽血液,迅速取出肝脏,在冰冷生理盐水中冲洗数次,剪碎,然后用 2 倍体积 pH 7.4 250mmol/L 蔗糖 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液,在 Potter-Elvehjem 电动匀浆器中匀浆,应用常规差速离心的方法从肝匀浆中分离制备微粒体。制备的肝微粒体悬浮于适量的 0.25mol/L 蔗糖液中,使每毫升悬液中所含蛋白量为 30mg。

4. 细胞色素 P-450 同功酶分离和部分纯化

微粒体增溶和蛋白分级分离以及微粒体蛋白的柱层析分离主要参照 Warner 等的方法^[6],但洗脱流速减慢了约 1 倍。通过对洗脱流出液 A415 吸光度的检测,得到细胞色素 P-450 同功酶洗脱图,再分别收集各个峰(A>0.5 的点)进行蛋白含量和细胞色素 P-450 含量测定。

蛋白含量测定采用 Lowry 等的方法,以结晶牛血清白蛋白为标准^[7]。细胞色素 P-450 含量采用 Omura 和 Sato 的方法^[8]测定。

结 果

1. 苯巴比妥诱导细胞色素 P-450 的部分纯化

动物经苯巴比妥处理后,用超速离心制备出肝微粒体(3000mg 微粒体蛋白,5379nmol 细胞色素 P-450),再经胆酸钠增溶和聚乙二醇分级分离得到细胞色素 P-450 蛋白质,经过这个过程细胞色素 P-450 的回收率为 53.6—61.1%,加到 DEAE 纤维素 52 层析柱中,经氯化钾梯度洗脱出三个富含细胞色素 P-450 的峰,按其出峰顺序分别称为 a、b、c,其洗脱图如下(见图 1)。

将上述三个峰面积进行积分处理,结果发现 a 峰

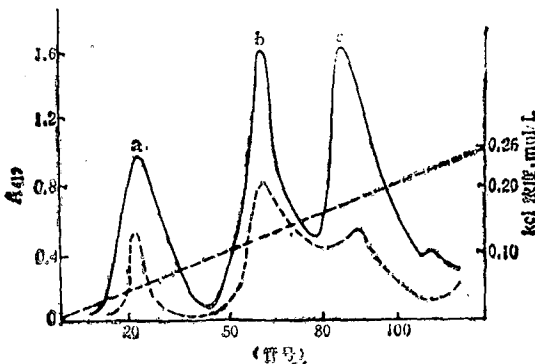


图 1 镉对细胞色素 P-450 同功酶的影响 (DE52 柱层析图)

PB: 苯巴比妥处理 Cd + PB: 镉加苯巴比妥处理

占总面积的 19%, b 峰占 32%, c 峰占 49%, 三个组分细胞色素 P-450 特异含量分别为 4.33—5.20nmol/mg 蛋白, 9.00—10.50nmol/mg 蛋白和 8.70—9.10 nmol/mg 蛋白,本结果与 Ryan 等的结果相类似^[9]。

表 1 表示苯巴比妥诱导产生的细胞色素 P-450 的纯化情况。

表 1 苯巴比妥诱导产生的细胞色素 P-450 纯化

组 分	蛋白质 (mg)	细胞色素 P-450		
		总量 (nmol)	特异含量 (nmol/mg 蛋白)	回收率 (%)
微粒体	3000	5379 (5160—5580)	1.79 (1.72—1.86)	100
聚乙二醇 (9—16%) 组分	750	3084 (2883—3286)	4.11 (3.84—4.38)	57.6
DE-52 柱层析 组分 a	30	143 (130—156)	4.77 (4.33—5.20)	2.65
组分 b	50	489 (450—528)	9.78 (9.00—10.50)	9.08
组分 c	100	890 (870—910)	8.90 (8.70—9.10)	16.5

2. 镉对大鼠肝微粒体细胞色素 P-450 同功酶的影响

在给予苯巴比妥同时,用 2.4mg/kg 醋酸镉处理动物所得肝微粒体蛋白 3000mg (3350nmol 细胞色素 P-450)经增溶和分级分离后,剩余 486mg 微粒体蛋白 (1881nmol 细胞色素 P-450),最后进行柱层析,其细胞色素 P-450 也可分成三个主要峰组分(见图 1),其各组分的出峰位置与苯巴比妥诱导所产生的细胞色素 P-450 极为相似,但其 a、b、c 各峰面积均比单纯苯巴比妥诱导处理小,其中镉加苯巴比妥处理组细胞色素 P-450。峰面积占单纯苯巴比妥处理组动物的 21%(减少 79%),b 峰面积占 64%(减少 36%),c 峰面积占 58%(减少 42%)。三峰面积均有减少,但以 a 峰减少

表 2 镉对细胞色素 P-450 同功酶的影响

组 分	蛋白质 (mg)	细胞色素 P-450		
		总量 (nmol)	特异含量 (nmol/mg 蛋白)	回收率 (%)
微粒体	3000	3350 (3100—3500)	1.12 (1.03—1.20)	100
聚乙二醇(9—16%)组分	468	1881 (1800—1962)	4.02 (3.85—4.19)	56.1
DE-52 柱层析 组分 a	6.1	30.0 (28.0—32.0)	4.92 (4.59—5.25)	0.90
组分 b	31.8	320 (308—332)	10.05 (9.67—10.45)	9.55
组分 c	57.5	516 (501—531)	8.98 (8.71—9.24)	15.40

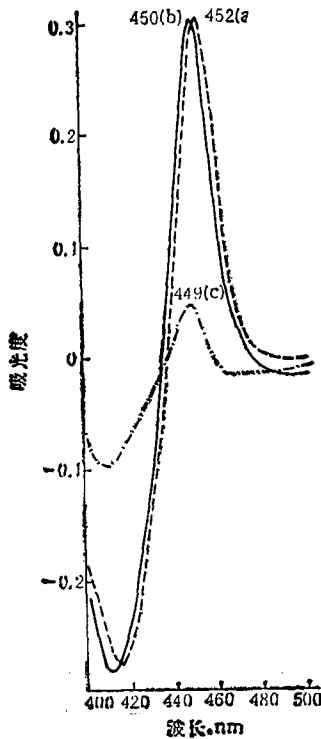


图2 苯巴比妥诱导的结合CO的还原型细胞色素P-450扫描图

最为显著，其次为c峰。将此三个峰的峰面积进行积分处理，a峰占总面积11.5%，b峰占61.4%，c峰占27.1%。表2是镉对P-450同功酶的影响情况。

3. 细胞色素P-450还原状态与CO结合光谱特性

图2显示由苯巴比妥诱导产生的细胞色素P-450同功酶三个组分a、b、c经过CO通气再经连二亚硫酸钠还原后波长从400到500nm的扫描图。这三种不同的血色素蛋白的最大吸收峰略有差异，分别在452nm、450nm和449nm处。镉加苯巴比妥处理组动物肝细胞色素P-450三种同功酶的光谱特性与苯巴

比妥的相应组分相同，图略。

讨 论

苯巴比妥是一种最常用的诱导剂，在分离其诱导大鼠产生的细胞色素P-450过程中，有人分离出4种同功酶^[10]，有人分出3种^[11]。本研究中也分离出3种主要细胞色素P-450，即细胞色素P-450_{a,b,c}。造成这种差异的原因在于各个实验室分离纯化细胞色素P-450时所用的动物种属、年龄、性别以及所用层析材料和层析条件不尽相同。

实验结果表明镉对苯巴比妥诱导的三种细胞色素P-450同功酶具有一定的选择性抑制作用。已知不同类型的细胞色素P-450同功酶对各种底物代谢可以表现出不同的特异性^[12]，因此，本实验结果或许可以解释为什么镉在体内对I型底物氨基比林和丁基吗啡代谢的抑制作用强于对II型底物苯胺代谢的抑制作用^[13]。

参 考 文 献

- 1 Aström A *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1986;853: 1
- 2 Waxmar DJ *et al.* *J Biol Chem*, 1982; 257:10446
- 3 肖功华等. *武汉医学学报*, 1983;1: 19
- 4 肖功华等. *中国药理学与毒理学杂志*, 1988;2(1): 61
- 5 Bruin A. *Biochemical toxicology of environmental agents*. Netherlands: Elsevier/North-holland Biomedical Press, 1976: 303—360
- 6 Warner M *et al.* *Drug Metab Dispos*, 1978; 6:353
- 7 Lowry OH *et al.* *J Biol Chem*, 1951; 193:265
- 8 Omura T *et al.* *J Biol Chem*, 1964; 239:2370
- 9 Ryan ED *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1982; 216:272
- 10 Guengerich FP. *J Biol Chem*, 1978; 253:7931
- 11 Ryan DE *et al.* *J Biol Chem*, 1979; 254:1365
- 12 Lu, AYH. *Fed Proc*, 1976; 35:2460
- 13 Means JR *et al.* *Toxicol Appl Pharmacol*, 1979; 48:293

[本文于1988年12月20日收到]

信息服务

植 酸 钙 及 植 酸 的 制 法

植酸广泛用于食品、化工、医药、石油轻纺等领域。农业上可做生产激素使用。过去依赖进口，现在我国还组织出口，国内市场价格每吨14—21万元。

生产植酸钙及植酸的主要原料是米糠、麸皮糠饼以及其它农产品。每100公斤原料可生产植酸钙5—6公斤：(植酸2—3公斤)其下脚渣料仍为禽畜优质饲料。生产植酸钙工艺简单投资约300—1000元即可生产办厂，植酸钙除可制肌醇外，大量用于植酸，设备投

资约2万元左右，培训收费，植酸钙面授单位300元，个人250元。函授单位150元，个人100元。学习植酸时面授：单位1200元，个人1000元。函授：单位500元，个人400元，另外学习植酸化验技术外加100元。每月8、18、28日三天开班学习，每次三天。(B58号)

[北京星火技术研究所提供，通讯处：北京867信箱20816组李群，邮政编码：100024]