

草鱼肾细胞中双氟沙星代谢酶的酶动力学

于灵芝¹, 杨先乐^{1,2*}, 王翔凌³, 喻文娟¹, 胡 颀¹

(1. 上海海洋大学农业部渔业动植物病原库, 上海 201306;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306;

3. 上海美迪西普亚医药科技有限公司, 上海 201200)

摘要:细胞色素 P450s (CYPs) 主要参与动物体内药物代谢。水产养殖中不合理的联合用药常会导致治疗失败, 这通常与 CYP 活性的诱导有关。然而, 关于鱼类 CYP 的诱导却知之甚少。为获得有关 CYP 诱导的信息, 实验采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 的方法测定了草鱼肾细胞 (CIK) 中 CYPs 的特异性诱导剂对双氟沙星 (DIF) 的代谢作用及酶动力学分析。对照组和 β -萘黄酮 (BNF) 诱导组的酶动力学方程分别为 $1/V = 0.1375 \times 1/[S] + 0.003$ 和 $1/V = 0.0245 \times 1/[S] + 0.0013$ 。DIF 与经 BNF 处理的 CIK 共孵育后, 其代谢量增加了 1 倍, 酶动力学参数 C_{lim} 和 V_{max} 值分别增加了 7 倍和 2 倍。BNF 是 CYP1A 的特异性诱导剂, 因此, CYP1A 可能参与了 DIF 的代谢。

关键词:草鱼; 细胞色素 P450; 双氟沙星; 酶动力学; 反相高效液相色谱

中图分类号:S 965.112; R 969.1

文献标识码:A

细胞色素 P450s (CYPs) 主要参与药物代谢, 在水产动物的肝和肾中广泛分布^[1-2]。CYPs 的活性能被诱导或抑制, 因而一种药物可通过对酶的诱导或抑制改变其它药物的代谢^[3]。因此, 两种药物联用不当常会发生药物间的代谢性相互作用。酶动力学参数 V_{max} 和 C_{lim} 表示了其产生代谢物的催化效率, 鱼类 CYPs 的酶动力学分析日渐引起人们的兴趣, 在草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 和大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 的体内外已经研究了喹诺酮类药物代谢酶的酶动力学, 及 CYP2E1 及 CYP3A 活性的诱导和抑制作用^[4-9]。同时证实, 鱼类细胞模型适用于渔药的酶动力学分析^[4-9]。CYP1A、CYP3A 和 CYP2E 是鱼类体内含量丰富的 CYPs, β -萘黄酮 (BNF)、乙醇 (EA) 和利福平 (RIF) 分别是鱼类 CYP1A、2E 和 3A 的特异性诱导剂^[4,10-11]。然而关于鱼类 CYP 的诱导剂在草鱼肾细胞 (CIK) 中对喹诺酮类药物的作用及双氟沙星 (DIF) 代谢酶的酶动力学分析至今未见报道。

本文采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 方法, 研究了草鱼肾细胞中鱼类 CYP 诱导剂对 DIF 代谢的作用及 DIF 代谢酶的酶动力学。这些信息为用鱼类细胞模型预测渔药联用的相互作用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试剂

盐酸双氟沙星 (> 99.8%), RIF (> 97%), MTT, BNF 和 DMSO (99.9%) 购自 Sigma。Lowry 蛋白测定试剂盒购自上海尚谊化工科技有限公司。M199 和 FBS 购自 Gibco BRL (UK)。HPLC 级乙腈和甲醇购自德国 Darmstadt。其它化学药品和试剂是分析纯, 购自国药集团上海化学试剂公司。

1.2 试剂处理

盐酸双氟沙星用氢氧化钠助溶。BNF 和 RIF 溶于 DMSO, DIF、BNF 和 RIF 溶解后加入到培养基中, EA 直接加入培养基。本实验所有用水都

是三蒸水。

1.3 细胞培养

CIK 由农业部渔业动植物病原库提供,细胞培养用含 10% (v/v) FBS 的 M199 培养基,条件为 28 ℃,5.0% CO₂。48 h 后贴满壁,加入新鲜 M199 培养基,消化,悬浮液在 6 孔板中培养,至密度为每毫升 5×10^5 个细胞,供诱导处理用。

1.4 草鱼肾细胞的诱导处理

6 孔板中的细胞完全贴壁后,用无血清的含相应诱导浓度的 BNF (10 μmol/L)^[11],EA (100 μmol/L)^[12] 和 RIF (40 μmol/L)^[4] 的培养基处理,对照只用无血清的培养基处理,放置于 28 ℃ 培养箱,24 h 之后,弃去原来的培养基,用无血清的含非致死浓度的 DIF (62.5 μmol/L) 的培养基孵育,于 28 ℃ 培养箱中孵育诱导 2 h。之后,每份细胞悬液分为两份,一份用于该细胞悬液蛋白含量测定,另一份用于鱼类诱导剂对 DIF 代谢的诱导分析。每一组做 3 个重复。

1.5 色谱条件

Agilent 1100 型高效液相色谱系统包括四元泵(德国),真空脱气机(日本)和自动进样器(德国)。细胞样品中的 DIF 用 6 倍体积二氯甲烷萃取,充分混合至少 5 min,4 ℃ 8 000 × g 离心 10 min 分离两相,小心弃去液相,将有机相转移到干净的管子里,45 ℃ 样品蒸干仪中恒温中蒸干。残留溶于 1.0 mL 流动相中,10 μL 溶解物转移进反相分析柱中进行 HPLC 测定(色谱柱类型:ZORBAX SB-C18,4.6 mm × 150 mm,5 μm)。流动相包括 5% 乙腈(A)和 95% 四丁基溴化铵(B)。流速为 1.5 mL/min,紫外检测波长 276 nm。柱温是 40 ℃。

1.6 酶动力学分析

为确定 DIF 代谢的酶动力学,在 28 ℃ 培养箱中用浓度为 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 和 125 μmol/L 的 DIF 与细胞孵育 2 h。部分经诱导处理的细胞先进行样品前处理,之后再通过 RP-HPLC 方法检测,DIF 代谢酶的活性以酶促反应速率,即每毫克蛋白单位时间内的 DIF 代谢量表示 [nmol/(min · mg protein)]。K_m 和 V_{max} 值是由米氏方程决定的,即 $V = V_{\max} [S] / (K_m + [S])$, 其中, V 表示酶促反应速率, K_m 为米氏常数,反映酶与底物亲和力的大小, V_{max} 指该酶促反应的最大速度。K_m 和 V_{max} 由 Lineweaver-Burk 方程式作

图确定。细胞蛋白浓度测定参照商品说明书。

1.7 数据分析和统计

数据分析用软件 SPSS 16.0 进行显著性分析,由 ANOVA(单因素方差分析)的 Duncan 氏进行多重比较, P < 0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 DIF 检测方法的确定

DIF 在所用色谱条件下基线分离良好,空白组在滞留时间内无杂峰。DIF 的标准曲线是由细胞与一系列梯度浓度的 DIF 共孵育,然后用 RP-HPLC 方法确定的。结果显示了良好的相关性,相关系数为 0.999 2 (n = 3)。以峰面积为纵坐标,相应的浓度为横坐标(μmol/L),所得标准曲线的回归方程为 $y = 5.875 7x - 1.02$ 。DIF 的检测限和定量限分别是 0.5 μmol/L 和 1 μmol/L (S/N = 3)。回收率为 84.5% ± 0.85%。平均相对标准偏差(RSD)都小于 1.9%。DIF 的检测方法可重复并且精确(表 1)。

2.2 CIK 中 DIF 的代谢

MTT 实验结果表明,浓度为 125 μmol/L 的 DIF 与 CIK 孵育 6 h 为 DIF 代谢研究的亚致死条件(数据未列出)。为了优化 DIF 代谢的最佳孵育浓度和时间,采用不同浓度(从 3.9 μmol/L 到 125 μmol/L)和不同时间(从 1 h 到 6 h)与 CIK 孵育,样品处理后,采用 RP-HPLC 检测 DIF 量, DIF 在孵育浓度为 62.5 μmol/L 和孵育时间 2 h 时有最大代谢量(图 1),因此, DIF 浓度 62.5 μmol/L 和孵育时间 2 h 作为诱导分析的最佳条件。CIK 与诱导剂 BNF, RIF 和 EA 诱导后 DIF 的代谢量与对照相比, BNF 处理组导致了 DIF 代谢水平增加了 1 倍,而 RIF 和 EA 处理组没有使 DIF 代谢发生明显改变(图 2)。

2.3 DIF 代谢的酶动力学分析

DIF 浓度为 3.9 ~ 62.5 μmol/L, 其代谢酶显示了典型的 Michaelis Menten 行为(图 3)。根据 Lineweaver-Burk 图, 获得对照组和 BNF 诱导组的酶动力学方程分别为 $1/V = 0.137 5 \times 1/[S] + 0.003$ 和 $1/V = 0.024 5 \times 1/[S] + 0.001 3$ (图 3)。根据方程计算酶动力学参数,与对照相比, BNF 导致 V_{max} 约 2 倍增加, Clint 近 7 倍增加,而 EA 和 RIF 对 Clint 和 V_{max} 值的改变不显著(表 2)。蛋白浓度是 (0.35 ± 0.02) mg/mL 细胞。

表1 CIK中DIF的回收率
Tab.1 Recovery of DIF in CIK

空白浓度 ($\mu\text{mol/L}$) spiked amount	检测浓度 ($\mu\text{mol/L}$) measured amount	日内回收率(%) recovery intra-day	日间回收率(%) recovery inter-day	相对标准偏差(%) relative standard deviation	
				intra-day	inter-day
1	0.98 ± 0.07	98.33 ± 6.80	81.49 ± 1.00	0.12	1.73
10	10.50 ± 0.64	105.03 ± 6.37	82.38 ± 1.06	1.11	1.84
100	99.26 ± 0.93	99.26 ± 9.30	85.49 ± 0.60	1.61	0.60

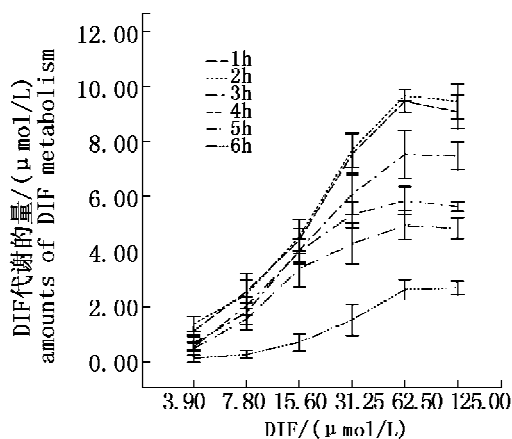


图1 CIK中DIF的代谢量($n=3$, mean \pm SD)

Fig.1 Amounts of DIF metabolism in CIK
($n=3$, mean \pm SD)

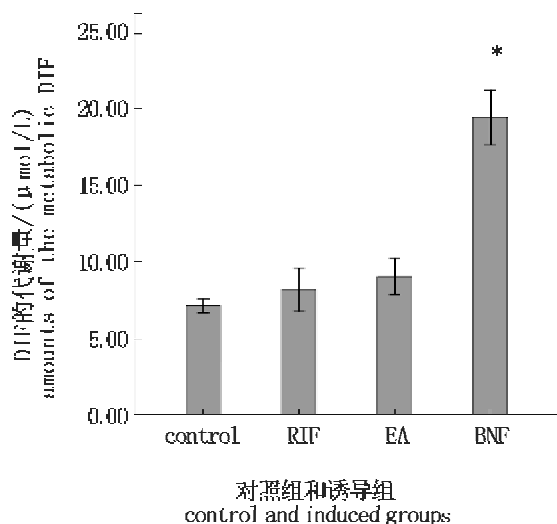


图2 CYP诱导剂处理后DIF的代谢量($n=3$)

*表示与对照差异显著($P < 0.05$)。

Fig.2 Amounts of DIF metabolism in CIK
pre-treated with fish CYP inducers

Asterisks indicate significant difference from the control
($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 体外模型在CYPs研究中的利用

体外模型可以得到生物转化途径的早期信息并可预测代谢水平的药物间相互作用^[13]。目前已经建立的几种细胞系包括 PLHC-1^[14], RTG-2^[15], BB^[15], RTL-W1^[16], CIK^[17] 和 GCL^[4-6] 已被成功用于环境化合物的毒性检测,如有机锡、酚类和药物制剂^[18]。结果表明,鱼类体外与体内的急性毒性有相似的趋势^[19-22]。细胞培养系统适合研究化合物的毒性和酶动力学^[5, 6, 20-22],这还有助于减少水产药理学研究中活体动物的利用。细胞系还有助于减少水产药理学研究中活体动物的利用,并且自身有代谢外源物的优点。首先它们有研究外源物代谢的代谢活性,其次是细胞容易培养,最后是它们有稳定的诱导活性,这对外源物的代谢和解毒很重要^[22]。在鱼类细胞系中研究 CYP 酶的酶动力学及其调控引起了广泛关注。草鱼肝细胞(GCL)已经被用于研究渔药的 CYP 酶动力学分析^[4, 6]。本研究证实,CIK 是适合研究 CYP 对 DIF 代谢作用的影响和渔药之间相互作用的体外模型。

3.2 鱼类CYPs诱导后的酶动力学

与对照相比,RIF处理的CIK中DIF代谢酶的酶动力学参数 V_{\max} 和 Cl_{int} 表明,DIF代谢酶有较低的底物亲和力和催化DIF代谢的作用(表2)。DIF的代谢量表明,RIF对DIF的代谢没有诱导作用(图2)。本文结果与下述结论是一致的,即罗非鱼不同组织间CYP3A的诱导活性不同,肝和小肠中广泛存在,肾中不存在^[23]。最近还有结果表明,RIF在GCL中有增强恩诺沙星脱乙基转化为环丙沙星的作用^[6]。因此可以推出,适合研究CYP3A诱导的体外模型是GCL,而不是CIK^[4]。

表 2 CIK 中 DIF 代谢的酶动力学参数表
Tab.2 Enzymatic parameters of DIF metabolism in CIK

处理组 treatments	米式常数($\mu\text{mol/L}$) K_m	最大反应速率[$\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$] V_{max}	内在清除率[$\text{L}/(\text{min} \cdot \text{g protein})$] Cl_{int}
对照	33.19 ± 4.33	401.36 ± 23.47	8.72 ± 0.54
RIF	36.65 ± 3.23	423.57 ± 23.25	9.77 ± 0.69
EA	31.03 ± 3.98	461.45 ± 32.34	12.39 ± 1.14
BNF	$16.5 \pm 2.39^{**}$	$1225 \pm 124.96^{**}$	$60.61 \pm 5.24^{**}$

注: $Cl_{\text{int}} = V_{\text{max}}/K_m$; 诱导组与对照进行 t -Test, “**”表示差异极显著($P < 0.01$)。

Notes: $Cl_{\text{int}} = V_{\text{max}}/K_m$; ** means significant difference ($P < 0.01$).

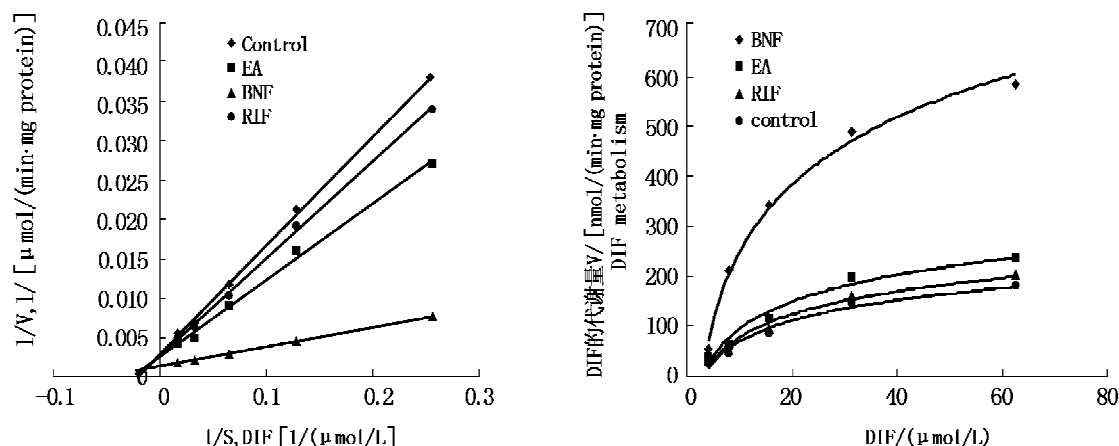


图 3 CIK 中由诱导剂处理的 DIF 代谢酶的 Lineweaver-Burk 图和 Michaelis Menten 图 ($n = 3$)

Fig.3 Lineweaver-Burk plots and Michaelis Menten plots of DIF metabolism by inducers in CIK ($n = 3$)

酶动力学参数表明, BNF 处理组有较高的底物亲和力和较强的代谢 DIF 的能力(表 2 和图 2)。BNF 是鱼类 CYP1A 的特异性诱导剂, 因此 CYP1A 可能参与了上述反应(图 3)。为了研究 CIK 中参与 DIF 代谢的酶, 还需要确定相应 CYP 抑制剂存在时的代谢信息。

3.3 与喹诺酮类药物代谢相关的 CYPs 的诱导及抑制作用

哺乳动物中有许多喹诺酮类药物都能对 CYP 酶系统产生抑制效应, 从而导致某些药物代谢和清除率降低, 但也并不是所有喹诺酮类药物有此效应^[24-27]。此外, 药物可同时作为 P450 底物, 诱导剂和抑制剂, 在某些情况下, 能调控自身的代谢^[28]。如 Moutou 等^[29]的研究结果表明, 虹鳟线粒体中喹诺酮类抗生素试剂噁喹酸和氟甲喹是 CYP1A 亚家族弱的剂量依赖性抑制剂。恩诺沙星在草鱼体内外显著抑制 CYP2E1 活性^[7,12], GCL 中 CYP3A4 参与了恩诺沙星脱乙酰基代谢^[6]。因此, 喹诺酮类药物与 CYP (s) 之间的相互作用需要深入研究。

总之, 鱼类 CYP 诱导为预测可能的药物相互作用保证治疗效果提供了有利的信息。本研究表明,

BNF 明显地增加了 DIF 的代谢作用, 因此, 推测 CYP1A 参与了该反应, 这些结果为鉴定代谢 DIF 的 CYP 酶和保证联合用药的疗效提供了有利的信息。

参考文献:

- [1] Pesonen M, Celander M, Förlin L, et al. Comparison of xenobiotic biotransformation enzymes in kidney and liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Toxicol and Appl Pharmacol, 1987, 91: 75-84.
- [2] Lorenzana R M, Hedstrom O R, Buhler D R, Localization of cytochrome P-450 in the head and trunk kidney of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1988, 96: 159-167.
- [3] Khan M N, Reddy P K, Renaud R L, et al. Effect of cortisol on the metabolism of 17-hydroxyprogesterone by Arctic charr and rainbow trout embryos [J]. Fish Physiol Biochem, 1997, 16: 197-209.
- [4] Li D, Yang X L, Zhang S J, et al. Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment

- of a fish CYP3A induction model [J]. *Comp Biochem and Physiol, Part C*, 2008, 147: 17–29.
- [5] 林茂, 杨先乐, 房文红, 等. 草鱼肝细胞中诱导剂对EROD作用的剂量效应研究[J]. *水产学报*, 2006, 30(3): 311–315.
- [6] 林茂, 杨先乐, 王翔凌, 等. 草鱼肝细胞中恩诺沙星脱乙酰代谢的酶动力学研究[J]. *高技术通讯*, 2007, 16(12): 38–42.
- [7] 王翔凌, 杨先乐, 林茂, 等. 大口黑鲈肝细胞中恩诺沙星的消除及其代谢酶活性的测定[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(6): 1004–1009.
- [8] 李聃, 杨先乐, 张书俊, 等. 草鱼肝细胞系中CYP3A活性检测方法[J]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(5): 495–499.
- [9] 李聃, 杨先乐, 张书俊, 等. 草鱼肝细胞中细胞色素P450 3A的酶促动力学[J]. *高技术通讯*, 2008, 18(8): 863–867.
- [10] Kim J H, Raisuddin S, Ki J S, *et al.* Molecular cloning and beta-naphthoflavone-induced expression of a cytochrome P450 1A (CYP1A) gene from an anadromous river pufferfish, *Takifugu obscurus* [J]. *Mari Pollut Bull*, 2008, 57: 433–440.
- [11] Bhakta K Y, Jiang W, Couroucli X I, *et al.* Regulation of cytochrome P4501A1 expression by hyperoxia in human lung cell lines; Implications for hyperoxic lung injury [J]. *Toxicol and Appl Pharmacol*, 2008, 233: 169–178.
- [12] 王翔凌, 杨先乐, 张宁, 等. 草鱼肝细胞中CYP2E1活性的诱导研究[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(4): 469–474.
- [13] Brandon E F A, Raap C D, Meijerman I, *et al.* An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 189: 233–246.
- [14] Celander M, Hahn M E, Stegeman J J. Cytochromes P450 (CYP) in the *Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma cell line (PLHC-1); dose and time-dependent glucocorticoid potentiation of CYP1A induction without induction of CYP3A [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 329: 113–122.
- [15] Araújo C S A, Marques S A F, Carrondo M J T, *et al.* *In vitro* response of the brown bullhead catfish (BB) and rainbow trout (RTG-2) cell lines to benzo[a]pyrene [J]. *Sci Total Environ*, 2000, 247: 127–135.
- [16] Babín M, Casado S, Chana A, *et al.* Cytochrome P4501A induction caused by the imidazole derivative Prochloraz in a rainbow trout cell line [J]. *Toxicol In Vitro*, 2005, 19: 899–902.
- [17] Tan F X, Wang M, Wang W M, *et al.* Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals *in vitro* [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22: 164–170.
- [18] Janošek J, Hilscherová K, Bláha L, *et al.* Environmental xenobiotics and nuclear receptors-interactions, effects and *in vitro* assessment [J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, 20: 18–37.
- [19] Caminada D, Escher C, Fent K, *et al.* Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines [J]. *Aquat Toxicol*, 2006, 79: 114–123.
- [20] Ackermann G E and Fent K. The adaptation of the permanent fish cell lines PLHC-1 and RTG-2 to FCS-free media results in similar growth rates compared to FCS-containing conditions [J]. *Mar Environ Res*, 1998, 46: 363–367.
- [21] Ackermann G E, Schwaiger J, Negele R D, *et al.* Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogen exposure in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 60: 203–221.
- [22] Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology; Assessment of cytotoxicity, cytochrome P450 1A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples [J]. *Toxicol In Vitro*, 2001, 15: 477–488.
- [23] Bainy A C D, Woodin B R, Stegeman J J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-Sao Paulo, Brazil [J]. *Aquat Toxicol*, 1999, 44: 289–305.
- [24] Brouwers J R. Drug interactions with quinolone antibacterials [J]. *Drug Saf*, 1992, 7: 268–281.
- [25] Davies B I, Maesen F P. Drug interactions with quinolones [J]. *Rev Infect Dis*, 1989, 11: 1083–1090.
- [26] Harder S, Fuhr U, Staib A H, *et al.* Ciprofloxacin-caffeine; a drug interaction established using *in vivo* and *in vitro* investigations [J]. *Am J Med*, 1989, 87: 89–91.
- [27] Xu X, Liu H Y, Liu L, *et al.* The influence of a newly developed quinolone: antofloxacin, on CYP activity in rats [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacol*, 2008, 33: 1–7.
- [28] Plant N J, Ogg M S, Crowder M, *et al.* Control and statistical analysis of *in vitro* reporter gene assays [J]. *Anal Biochem*, 2000, 278: 170–174.

- [29] Moutou K A, Burke M D, Houlihan D F. Hepatic P450 monooxygenase response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) administered aquaculture antibiotics [J]. *Fish Physiol and Biochem*, 1998, 18: 97–106.

Enzymatics on DIF metabolism in kidney cell of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

YU Ling-zhi¹, YANG Xian-le^{1,2*}, WANG Xiang-ling³, YU Wen-juan¹, HU Kun¹

(1. Aquatic Pathogen Collection Centre of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, College of Fisheries and Life Science,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Medicilon & MPI Inc., Shanghai 201200, China)

Abstract: Cytochrome P450s (CYPs) is the most important enzyme for drug metabolism in animals. Inappropriate coadministration often causes treatment failure in fisheries owing to induction of CYP activity. However, limited information is available about CYP induction in fish. In order to supply useful information on CYP induction, the present study assessed the effects of fish specific CYP inducers on difloxacin (DIF) metabolism and the enzyme kinetics in kidney cell of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (CIK) by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The enzymatic equations of control and groups induced by β -naphthoflavone (BNF) were $1/V = 0.1375 \times 1/[S] + 0.003$ and $1/V = 0.0245 \times 1/[S] + 0.0013$. Results demonstrated that the amounts of DIF metabolism were increased by 1 fold and enzymatic parameters Cl_{int} and V_{max} of DIF metabolism were significantly increased by 7 and 2 folds due to BNF pretreatment. BNF is the specific inducer of CYP1A in fish. Therefore, CYP1A may be responsible for DIF metabolism. This study provides instructive information to ensure treatment success in fisheries medication with two or more drugs.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; cytochrome P450; difloxacin; kinetics; RP-HPLC

Corresponding author: YANG Xian-le. E-mail: xlyang@shou.edu.cn