

酒精对人原代培养肝细胞的氧化损伤与 CYP 2E1 关系的研究

刘烈刚¹ 张 文² 姚 平¹ 章锡平¹ 毛丽梅¹ 杨年红¹ 孙秀发¹

(1. 华中科技大学同济医学院, 湖北 武汉 430030;

2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030)

摘 要:目的 研究急性酒精暴露下对人原代培养肝细胞中 CYP 2E1 依赖的毒性作用和氧化损伤。方法 分离培养人原代肝细胞,以 25~100 mmol/L 乙醇作用于人原代肝细胞 9 h 及 100 mmol/L 乙醇作用于人原代肝细胞 0~24 h 后,检测人原代肝细胞中 CYP 2E1 的含量,并研究 100 mmol/L 乙醇作用于人原代肝细胞 0~24 h 后,天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase,AST)的释放量及肝细胞中谷胱甘肽(Glutathione,GSH)、丙二醛(Malondialdehyde,MDA)的含量。结果 急性酒精暴露导致人原代肝细胞中 CYP 2E1 的释放增加,并呈明显的剂量效应和时间效应关系;在 100 mmol/L 乙醇作用下,AST 和 MDA 明显升高,在 0~24 h 内呈明显的时间效应关系,而 GSH 含量在 6 h 后明显降低。结论 100 mmol/L 乙醇急性暴露可导致人原代培养肝细胞明显的氧化损伤,这种损伤与 CYP 2E1 活性的变化直接相关。

关键词:乙醇;肝疾病;酒精性;细胞色素 P-450 CYP2E1;氧化损伤

The relationship between CYP 2E1 activity and oxidative damage after acute ethanol exposure in human primary hepatocytes

Liu Liegang, et al.

(Department of Nutrition and Food Hygiene, Tongji Medical College, Hubei Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To study the oxidative damage to human primary cultured hepatocytes by acute ethanol exposure. Methods Primary hepatocytes were isolated and cultured from human liver tissue. After acute exposure to ethanol of different concentrations and different durations, CYP 2E1 activity in the hepatocytes was measured, meanwhile, glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) in the hepatocytes and aspartate transaminase (AST) in the supernatant were determined to indicate oxidative damage to the cells. Results There was a remarkable dose- and time-dependent relationship between ethanol exposure and CYP 2E1 activity in the human primary cultured hepatocytes. Moreover, there was a time-dependent increase in MDA content in hepatocytes and AST release in supernatants, while the GSH rose at the beginning and later declined significantly. Conclusion There was a markedly oxidative damage to human primary hepatocytes after acute ethanol exposure, and it is clearly related to the activity of CYP 2E1.

Key Words: Ethanol; Liver Disease; Alcoholic; Cytochrom P-450 CYP2E1; Oxidative Damage

酒精进入机体后,主要由肝细胞中的乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶、细胞色素 P-450 (CYP 2E1) 和过氧化氢物分解酶进行代谢,^[1]同时产生大量的活性氧(ROS),造成肝脏的氧化损伤。在此过程中,酒精通过诱导 CYP 2E1 活性起重要作用,肝细胞的氧化损

伤程度与 CYP 2E1 息息相关。^[2]目前,关于酒精对肝氧化损伤与 CYP 的关系研究较多,但是,试验对象多为动物和细胞株,由于人类与动物的酒精代谢酶及乙醛的毒性反应种属差异很大,建立在动物实验的基础之上实验结果的实用性受一定的限制,由此,

基金项目:国家自然科学基金资助(30271130)。

作者简介:刘烈刚 男 副教授

This work was supported by the Funds of Natural Science of National Natural Science Foundation of China. (30271130)

本研究以分离培养的人原代肝细胞为研究对象,以培养的肝细胞上清液中 AST 的释放量,肝细胞中 GSH 及 MDA 等作为细胞氧化损伤的指标,进行酒精对人原代培养肝细胞的氧化损伤与 CYP 2E1 关系的研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料 Williams 'E 培养基 德国 Life Technologies; AST 检测试剂盒 德国 Deisenhofen 公司;NADPH、谷胱甘肽还原酶、标准谷胱甘肽,德国 Boehringer, Mannheim 公司;其它均为分析纯试剂。

1.2 人原代肝细胞的分离与培养 在无菌条件下从手术病人获取肝组织(肝组织的收集依据有关规定,并有病人签署同意书),立即保存在 Williams 'E 培养基中。根据二步胶原酶灌注技术分离人原代肝细胞,[3] 接种新鲜获取的肝细胞于培养皿中,在 95 % 空气、5 % CO₂、Williams 'E 培养基中培养,每天更换培养基。

1.3 人原代肝细胞暴露于酒精中的剂量效应关系和时间效应关系研究 人原代肝细胞种植于 60 mm 的培养皿内,培养 2 d 后,用 25~100 mmol/L 的乙醇作用于肝细胞 9 h,收集细胞,用于剂量效应关系研究。100 mmol/L 的乙醇作用于肝细胞 0~24 h,收集细胞,用于时间效应关系研究。

1.4 肝细胞中 CYP 2E1 活性测定^[4] 根据肝细胞中硝基苯酚的羟基化率来反应 CYP 2E1 的活性。细胞收集后,4 °C,1 500 g 离心 5 min,细胞沉淀物用生理盐水洗 2 次后,细胞沉淀物与 0.5 mmol/L p - 硝基苯酚孵育 60 min,37 °C,然后用 5 %三氯醋酸终止反应,每毫升反应液中加入 0.1 mL 10 mol/L NaOH,在 546 nm 处测定 4 - nitrocatechol 的含量,转换为 CYP 2E1 的系数为 10.28 mmol/L cm⁻¹。CYP 2E1 的活性单位用 nmol/min mg⁻¹ protein 表示。

1.5 肝细胞中 AST 的测定 按 AST 检测试剂盒提供的方法进行,单位用 U/L 表示。

1.6 肝细胞中 GSH 含量的测定^[5] 细胞收集后,1 500 g 离心 5 min,4 °C,细胞沉淀物用 PBS 洗 2 次后,细胞沉淀物溶于 3 %的偏磷酸缓冲液中,液氮速冻后,- 80 °C保存备用。试样在 20 000 g,4 °C,离心 15 min,用 5 mol/L K₂CO₃ 调 pH 至 7.0,然后与 NADPH 及 GSH 还原酶混合,在 405 nm 处测定光密度值,单位用 nmol/mg protein 表示。

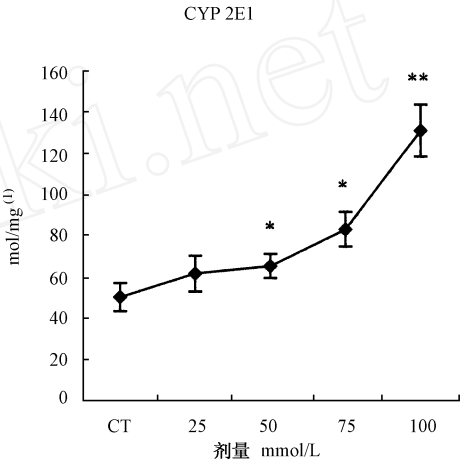
1.7 肝细胞中 MDA 含量的测定 按硫代巴比妥法进行检测^[6],单位用 nmol/mg protein 表示。

1.8 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件,进行方差分析。

2 结果

2.1 酒精对人原代培养肝细胞中 CYP 2E1 活性的影响

人原代培养肝细胞暴露于 25~100 mmol/L 乙醇 9 h后,细胞中 CYP 2E1 活性增加,在 50~100 mmol/L 乙醇剂量处明显增加,差异有显著性意义,由此可见,急性乙醇暴露可明显诱导人原代肝细胞 CYP 2E1 活性,并且急性乙醇暴露与 CYP 2E1 活性呈明显的剂量效应关系(见由图 1)。

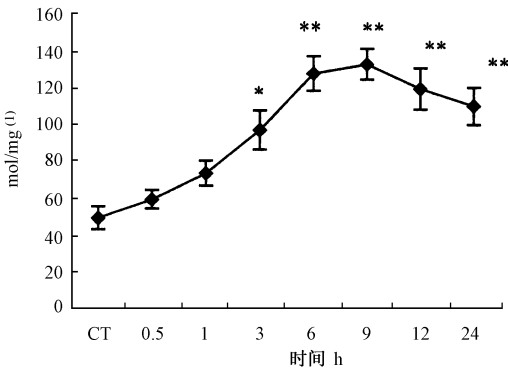


1) 每分钟每毫克蛋白质的摩尔数;
2) 与对照组相比 * P<0.05, ** P<0.01,CT为对照组。

图 1 肝细胞暴露于乙醇后 CYP 2E1 活性变化的剂量效应关系

2.2 急性酒精暴露对人原代培养肝细胞中 CYP 2E1 活性的影响时间效应关系 由图 2 可见,从 1 h 开始,100 mmol/L 乙醇暴露便可以使 CYP 2E1 活性增加,9 h 达到高峰,并一直到 24 h 均维持较高的水平,可见急性乙醇暴露与人原代培养肝细胞中 CYP 2E1 活性呈明显的时间效应关系。

2.3 酒精暴露下人原代培养肝细胞上清液中的 CYP 2E1



1) 每分钟每毫克蛋白质的摩尔数;
2) 与对照组相比 * P<0.05, ** P<0.01,CT为对照组。

图 2 肝细胞暴露于乙醇后 CYP 2E1 活性变化的剂量效应关系

AST 释放量 由表 1 可见,从 3 h 开始,100 mmol/L 乙醇暴露便可以使肝细胞上清液中的 AST 释放增加明显,差异有显著性,并且可见急性乙醇暴露与人原代培养肝细胞上清液中的 AST 释放呈明显的时间效应关系。

表 1 酒精暴露下人原代培养肝细胞上清液中的 AST 释放量	
时间 h	AST nmol/mg protein
对照组	94.22 ±8.42
0.5	118.56 ±15.06
1	142.33 ±10.06
3	154.12 ±20.36 ⁽¹⁾
6	166.88 ±7.40 ⁽¹⁾
9	178.90 ±21.48 ⁽²⁾
12	179.88 ±20.04 ⁽²⁾
24	181.91 ±11.55 ⁽²⁾

注:(1) 和对照组相比 $P<0.05$, (2) 和对照组相比 $P<0.01$ 。

2.4 酒精暴露对人原代肝细胞中 MDA 及 GSH 的影响 由表 2 可见,在人原代肝细胞暴露于 100 mmol/L 乙醇后,可使肝细胞中的 MDA 发生明显的变化,在 0.5~1 h 时开始升高,3~6 h 后明显升高,和对照组相比,差异有显著性,9~24 h,差异有极显著性;由此人原代肝细胞暴露于 100 mmol/L 乙醇后,肝细胞脂质过氧化水平升高,并且 MDA 水平与乙醇呈明显的时间效应关系;而与此同时,肝细胞中的 GSH 水平,在 0.5~1 h 内先有升高,3 h 后开始降低,6 h 时明显降低,和对照组相比,差异有显著性,9 h 后下降更明显,差异有极显著性,24 h 达到最低点。

表 2 酒精暴露对人原代肝细胞的 MDA 及 GSH 的影响		
时间 h	MDA	GSH
	nmol/mg protein	nmol/mg protein
对照组	36.37 ±3.64	7.52 ±0.29
0.5	40.54 ±3.87	7.62 ±0.47
1	44.88 ±3.52	8.02 ±0.65
3	58.88 ±4.06 ⁽¹⁾	6.87 ±0.69
6	61.64 ±4.23 ⁽¹⁾	4.12 ±0.86 ⁽¹⁾
9	69.05 ±4.41 ⁽²⁾	2.95 ±0.45 ⁽²⁾
12	71.10 ±3.68 ⁽²⁾	3.07 ±0.35 ⁽²⁾
24	72.11 ±3.26 ⁽²⁾	1.50 ±0.51 ⁽²⁾

注:(1) 和对照组相比 $P<0.05$, (2) 和对照组相比 $P<0.01$ 。

2.5 酒精暴露下人原代肝细胞 CYP 2E1 的变化与细胞损伤之间的关系

表 3 酒精暴露下人原代肝细胞 CYP 2E1 活性的变化与细胞损伤之间的关系		
	<i>r</i>	<i>P</i>
AST	0.934	<0.01
GSH	- 0.8298	<0.01
MDA	0.9279	<0.01

由表 3 可见,人原代肝细胞 CYP 2E1 活性与肝细胞上清液中的 AST 释放量和肝细胞 MDA 水平呈明显的正相关,而与肝细胞 GSH 水平呈明显的负相关,由此提示酒精暴露对人原代肝细胞的氧化损伤可能与 CYP 2E1 活性的变化直接相关。

3 讨论 机体有一套完整的抗氧化系统如超氧化物歧化酶,谷胱甘肽氧化酶,谷胱甘肽还原酶,谷胱甘肽,维生素 A、C、E 等清除活性氧(自由基)或将其转化为无毒的代谢产物。当抗氧化系统和活性氧的平衡被打破时,活性氧(ROS)将会对细胞造成氧化损伤。ROS 是在细胞代谢过程中自然形成的,可导致大量的细胞分子如膜脂质、蛋白质及核酸的氧化损伤。乙醇可激活线粒体活性氧的形成,乙醇的毒性与活性氧的增加有关。^[7]

肝细胞膜通透性发生改变,细胞 LDH、AST 释放增加是肝细胞膜受损伤最明显的标志。本研究检测了乙醇暴露下人原代肝细胞上清液 AST 的释放水平。在乙醇的作用下,细胞上清液中 AST 释放明显增加,并与乙醇呈明显的时间效应关系。由此表明,急性乙醇暴露引起人原代肝细胞的明显损伤。

GSH 为细胞内最丰富的抗氧化剂,它在细胞清除 ROS 的过程中起关键作用。GSH 能与 ROS 及亲电子代谢物直接反应,以保护机体必须的巯基免受氧化。^[8] Reed 等研究证实,^[9] GSH 的降低不仅损伤机体的抗氧化系统,而且会增加氧化应激和组织损伤。Ponsoda 研究结果表明,乙醇的毒性与抗氧化防御系统的耗竭,特别是与 GSH 的耗竭有直接关系。^[10] 本研究结果亦证实了这一点:在 100 mmol/L 乙醇的作用下,由于机体的代偿作用,人原代肝细胞 GSH 在 0~1 h 内代偿增加以对抗酒精所致的氧化应激,但随着酒精的持续作用,GSH 被大量消耗,使得作用 6 h 后明显降低,并呈时间效应关系。MDA—脂质过氧化的终产物,是反应 ROS 对细胞膜损伤程度的一个重要指标。^[11] 肝组织中高水平脂质过氧化与酒精主要在肝脏中代谢有关。^[12] 本研究结果表明,在 100 mmol/L 乙醇的作用下,MDA 明显升高,并与酒精暴露呈时间效应关系。

CYP 2E1 可被许多化学物质包括乙醇所诱导,同其它 CYP 相比,可以产生更多的活性氧,如超氧自由基和 H₂O₂,因 CYP 2E1 诱导所产生的活性氧与酒精性肝病直接相关或至少增加乙醇的毒性。^[13] Hep G2 细胞株暴露于 20~100 mmol/L 乙醇,可导致 CYP 2E1 酶活性和 CYP 2E1 蛋白表达明显升高,并且 CYP 2E1 酶活性高低与乙醇的毒性直接相关;在大鼠肝细胞中,用乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶或 CYP

2E1 的抑制剂可以预防乙醇的毒性,并且乙醇代谢所形成的活性氧也明显减少。^[14] French^[15] 研究发现,酒精对 CYP 2E1 基因敲除的小鼠几乎不引起氧化损伤作用,其主要原因是与无 CYP 2E1 表达有关。

我们的研究结果表明,在人原代培养的肝细胞中,乙醇的暴露与 CYP 2E1 活性呈明显的剂量效应和时间效应关系,在 100 mmol/L 乙醇暴露下,CYP 2E1 活性 2~3 倍增加。乙醇暴露可通过产生 ROS,耗竭 GSH、升高 MDA 等使肝细胞内氧化和抗氧化系统平衡失调而导致明显的氧化损伤,而这种氧化损伤与乙醇暴露下诱导 CYP 2E1 活性的升高直接相关,由此为通过抑制 CYP 2E1 活性而有利于减轻乙醇暴露下对人体导致的氧化损伤奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hoek J B, Pastorino J G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury [J]. Alcohol, 2002, 27 (1): 63—68.
- [2] Arthur I C, Defeng W, Monserrat M, et al. CYP-2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2001, 31: 1539—1543.
- [3] Nussler A K, Liu Z Z, Di Silvio M, et al. Hepatocyte inducible nitric oxide synthesis is influenced in vitro by cell density [J]. Am J Physiol, 1994, 267: C394—C401.
- [4] Gasduff T, Cederbaum A I. CYP-2E1 degradation by in vitro reconstituted systems: role of the molecular chaperone hsp90 [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 379: 321—330.
- [5] Ponsoda X, Bort R, Jover R, et al. Increased toxicity of cocaine on human hepatocytes induced by ethanol: role of GSH [J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58: 1579—1585.
- [6] Shu Z, Jung M, Begger H G, et al. pH-dependent changes of nitric oxide, peroxynitrite, and reactive oxygen species in hepatocellular damage [J]. Am J Physiol, 1997, 273: G1118—G1126.
- [7] Kukielka E, Cederbaum A I. DNA strand cleavage as a sensitive assay for the production of hydroxyl radical by microsomes: roles of CYP-2E1 in the increased activity after ethanol treatment [J]. Biochem J, 1994, 302: 773—779.
- [8] Schlorff E C, Husain K, Somani S M. Dose and time dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat [J]. Alcohol, 1999, 17: 97—105.
- [9] Reed D J. Glutathione: toxicological implications [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1990, 30: 603—631.
- [10] Ponsoda X, Bort R, Jover R, et al. Increased toxicity of cocaine on human hepatocytes induced by ethanol: role of GSH [J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58: 1579—1585.
- [11] Husain K, Somani S M. Interaction of exercise and ethanol on hepatic and plasma antioxidant system in rat [J]. Pathophysiology, 1997, 4: 69—74.
- [12] El-Sokkary G H, Reiter R J, Tan D X, et al. Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration [J]. Alcohol, 1999, 34: 842—850.
- [13] Guengerich F P. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species [J]. Chem Biol Interact, 1997, 106: 161—82.
- [14] Carroccio A, Wu D, Cederbaum A I. Ethanol increases content and activity of human cytochrome P4502E1 in a transduced HepG2 cell line. Biochem Biophys Res Commun Aug, 1994, 203: 727—33.
- [15] Bardag-Görce F, Yuan Q X, Li J, et al. The effect of ethanol induced cytochrome P4502E1 on the inhibition of proteasome activity by alcohol [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279: 23—29.

[收稿日期:2003-10-18]

中图分类号:R15;R595.6 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2004)02-0104-04

欢迎订阅使用《食品卫生培训教材》征订通知

《食品卫生培训教材》是培训各类食品生产、销售及管理人員的实用教材,该书由中国医药科技出版社出版,结合食品卫生法,全面介绍了食品生产管理、消毒、饮食、食品加工、冷饮冷食、副食品卫生的知识及对餐饮业的卫生要求,适合各地培训使用,本书最后一章还对企业检验室的条件和要求作了叙述,每节后附有问答题供考核时使用。全书共九章 20 万字,定价:12.00 元,按照 50%收费每本收费 6 元(含运费)

联系单位:北京市昌平区疾病预防控制中心 邮编:102200

联系电话:(010)89710772 69705192 手机:13901168675

联系人:贾树队 来电来函可先寄样书