基础研究 文章编号：0253-3626（2011）09-1029-04

酶抑制剂对 V79-hCYP2E1-SULT1A1 细胞酶依赖性化学诱变的影响

刘云岗，胡克歧
（南方医科大学公共卫生与热带医学学院毒理学系，广州 510515）

【摘 要】目的：V79-hCYP2E1-hSULT1A1 是一个表达人细胞色素 P450（CYP）2E1 和硫酸基转移酶（Sulfotransferase，SULT）1A1 的重组中国地鼠 V79[Chinese hamster lung（V79）cells]细胞系，它对于需有关代谢酶活化的间接诱变剂有基因突变反应；为观察单个酶的作用，需要建立对细胞中任一酶特异抑制的模型。方法：以细胞 *Hprt* 位点的正向突变为试验终点，*N*-二甲基亚硝胺（*N*-Nitrosodimethylamine，NDMA）和 2-硝基丙烷（2-Nitropropane，2-NP）为依赖 CYP2E1 和 SULT1A1 的间接诱变剂，观察 CYP 抑制剂反式二氯乙烯（Trans-1,2-dichloroethylene，DCE）和 1-氨基苯并三唑（1-Aminobenzotriazole，ABT）、SULT1 抑制剂槲皮素和五氯酚（Pentachlorophenol，PCP）对上述间接诱变剂作用的影响。结果：在一定浓度下，ABT 抑制 NDMA 的诱变率达 99%而不影响 2-NP 的作用，DCE 对其抑制仅达 55%且对 2-NP 的细胞毒性有明显加强作用。槲皮素和 PCP 抑制 2-NP 的诱变率达 63%和 98%，且都对 NDMA 的作用无影响。结论：ABT 和 PCP 可完全且特异地抑制该细胞中 CYP2E1 和 SULT1A1 依赖的诱变反应，此模型对于探讨遗传毒物的代谢活化有可靠价值。

【关键词】基因重组细胞；CYP2E1；*Hprt* 位点；酶抑制剂；转硫酸基酶（SULT）1A1
【中国图书分类法分类号】R114 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-10

Effects of enzyme inhibitors on enzyme-dependent and chemical-induced mutagenesis in V79-hCYP2E1-hSULT1A1 cells

LIU Yun-gang，HU Ke-qi
（*Department of Toxicology，School of Public Health and Tropical Medicine，Southern Medical University*）

【Abstract】*Objective*：V79-hCYP2E1-hSULT1A1，a genetically engineered Chinese hamster V79 cell line expressing human CYP2E1 and human sulfotransferase（SULT）1A1，demonstrates mutagenic response to promutagens requiring metabolic activation by either expressed enzyme. For the purpose of investigating the effect of either enzyme alone，it is highly necessary to establish a test model wherein either of the enzymes is specifically inhibited. *Methods*：Using the forward mutation at *Hprt* locus as the end point to observe，*N*-nitrosodimethylamine（NDMA）and 2-nitropropane（2-NP）as CYP2E1- and SULT1A1-dependent promutagen，the effects of CYP inhibitors，trans-1，2-dichloroethylene（DCE）and 1-aminobenzotriazole（ABT），and that of SULT1 inhibitors，quercetin and pentachlorophenol（PCP）on each promutagen-induced mutagenic response were observed. *Results*：ABT prohibited NDMA-induced mutagenic activity by 99% with the action of 2-NP unaffected，while DCE reduced it only by 55% and simultaneously potentiated 2-NP-induced cytotoxicity. Quercetin and PCP reduced 2-NP-induced mutagenic activity by 63% and 98%，with the action of NDMA unaffected. *Conclusion*：Specifically and completely，ABT and PCP are capable of prohibiting CYP2E1-and SULT1A1-dependent mutagenic response，respectively，which is a test model of reliable value for investigating metabolic activation of genotoxicants.

【Key words】genetically engineered cells；CYP2E1；*hprt* locus；enzyme inhibitor；sulfotransferase（SULT）1A1

化学致癌是目前肿瘤预防的一个研究热点，而致突变作用又是多数致癌物作用的基础。许多致突变物是间接致突变物，其作用的前提是被特异代谢酶转化为活性代谢物；然而常规用于筛检化学致突变物的哺乳动物细胞缺乏特异代谢酶的表达。即使是从肝脏分离出的肝细胞，也会在短时间内失去大部分代谢活性[1]。大鼠肝微粒体代谢活化系统（S_9 混合物）可以提高某些体外毒理试验的敏感性，但对于在 S_9 混合物中缺乏的酶[如细胞色素 P450（CYP）2E1 和硫酸基转移酶（Sulfotransferase，SULT）等]有关的间接致突变物的试验则没有作用[2]。因此，以分子克隆和细胞工程的方法使通常用于体外毒理学试验的细胞稳定表达特异代谢酶，可以克服这些细胞对某些间接致突变物的假阴性误差；尤其用表达人类代谢

作者介绍：刘云岗（1964-），男，教授，博士，研究方向：遗传毒理与代谢活化。

基金项目：广东省高等学校人才引进专项基金资助项目（编号：粤财教[2010]343 号）。

酶的细胞可以免去从动物的代谢资料外推至人的不确定性。

我们建立了同时表达人 CYP2E1 和 SULT1A1 的重组中国地鼠 V79 [Chinese hamster lung (V79) cells]细胞系(V79-hCYP2E1-hSULT1A1)[3]。这一细胞系同时表达Ⅰ相和Ⅱ相代谢酶，有利于观察这两个酶对某些化学物代谢上的联合作用。应用该细胞系敏感地检测出多种间接致癌物的致突变活性[3]，但是，为了清晰地鉴别观察到的代谢活化作用究竟依赖于其中哪一个酶，我们需要在试验中特异性地抑制其中一个酶的活性。体内和体外试验显示，反式二氯乙烯(Trans-1,2-Dichloroethylene，DCE)是一个对人肝脏 CYP2E1 的选择性抑制剂[4]，并可有效地降低依赖 CYP2E1 活化的丙烯晴对大鼠的急性毒性[5]；1-氨基苯并三唑(ABT)则对多个亚型的CYP 都具有不可逆的抑制作用，对人 CYP2E1 尤其敏感[6]；槲皮素是从天然植物中纯化出的一个黄酮类化合物，在人体试验中对肝脏 SULT1A1 具有抑制作用[7]，而五氯酚(Pentachlorophenol，PCP)对多个亚型的 SULT1 具有抑制作用[8]。本研究拟观察以上化合物分别对间接致突变物 *N*-二甲基亚硝胺(*N*-Nitrosodimethylamine，NDMA)(依赖 CYP2E1 代谢活化)[9]和 2-硝基丙烷(2-Nitropropane，2-NP)(依赖 SULT1A1 代谢活化)[9]诱发 *Hprt* 位点基因突变的影响，目标是建立一个 V79-hCYP2E1- hSULT1A1 细胞中一个酶的代谢活化作用受到完全抑制，同时另一酶的作用完全不受影响的模型。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

NDMA、2-NP、ABT、DCE、PCP 和槲皮素均为 Sigma-Aldrich 公司产品(德国 Taufkirchen)。NDMA、2-NP 以纯水作溶剂，ABT、DCE、PCP 和槲皮素以二甲基亚砜作溶剂，溶剂在培养液中的终浓度为 0.04%(v:v)。

1.2 细胞系

V79-hCYP2E1-hSULT1A1 细胞系是从 V79-Mz 经 2 次转染构建而成。V79-Mz 细胞经鉴定完全缺乏 CYPs、SULTs 及 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶的表达[10]。经第一次转染，人 CYP2E1得到稳定表达[11]；所建立的V79-hCYP2E1细胞经第二次转染，人SULT1A1(野生型，即SULT1A1*1，重组于pMPSV 真核表达载体)得到稳定表达，构建成V79-hCYP2E1-hSULT1A1 细胞系[3]。

1.3 致突变试验

细胞在 *Hprt* 位点的正向突变(即获得对 6-巯基嘌呤的抗性)是本研究中致突变试验观察的遗传学终点。试验参照已报道过的方法[9]，并简略概括如下：细胞以每瓶(250 cm^2，加入 30 ml 培养液)1.5×10^6 个的密度接种，6 h 后加入无水乙醇(终浓度 0.2%，v:v)以稳定 CYP2E1 酶蛋白(在需要加入 CYP2E1 抑制剂的组则不加入乙醇)。于 22 h 以新鲜培养液更换(除去乙醇)，并分别加入各抑制剂，即 ABT、DCE、PCP 或槲皮素，以及二甲基亚砜(溶剂对照)。2 h 后，加入 NDMA、2-NP，或纯水(溶剂对照)。继续培养 3 d 后，各组细胞以胰蛋白酶消化收集；各组细胞数计数占对照组细胞数的百分比作为各化合物细胞毒性的指标。各组细胞传代于正常培养液，继续培养 3 d 后，再 1 次传代并接种细胞于含有 6-巯基嘌呤(7 μg/ml)的选择性培养液(每个 15 cm 培养皿接种 10^6 个细胞，每个培养瓶收集的细胞被接种至 6 个培养皿)，另外按每个培养皿 100 个细胞的密度接种细胞于 3 个 6 cm 培养皿并在正常培养液中培养，以测定细胞的克隆形成率。10 d 后试验终止，经固定和染色，获得每个培养皿细胞集落的数目，以平行接种的各培养皿所得均数作为相应的观察值(克隆形成率和突变率)。每个处理组设立 2 个初始培养瓶，各组观察值为 2 个培养瓶相应的观察值的均数和标准误。

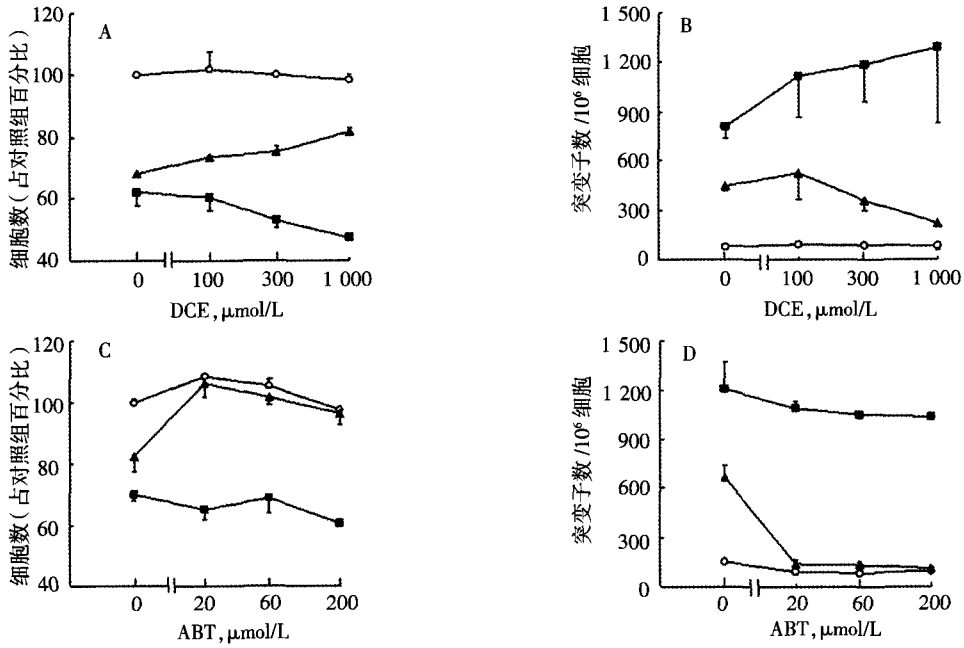
2 结 果

如图 1A 和 1C 所示，DCE 和 ABT 本身在其应用浓度范围内对细胞生长无影响，而间接诱变剂 NDMA 和 2-NP 在实验所用浓度(分别为30 μmol/L和5 mmol/L)影响V79-hCYP2E1-hSULT1A1 细胞生长(收获细胞时计数仅有对照组细胞数目的60%~80%)。在 DCE 存在的情况下，随着其浓度增高，2-NP 引起的细胞数目下降逐步加重，同时 NDMA 组的细胞数目逐渐回升。说明 DCE 可以在一定程度上抑制 NDMA 的细胞毒性，但对 2-NP 的细胞毒性有加强作用(图 1A)。ABT 则可完全阻断 NDMA 引起的细胞数目下降(细胞数目几乎完全回升至对照组水平)，同时对 2-NP 引起的细胞数目减少无明显影响(图 1B)。

DCE 和 ABT 对 NDMA 和 2-NP 致突变作用的影响如图 1B 和 1D 所示：在实验所用浓度范围 DCE 和 ABT 本身不具有致突变作用，DCE 在一定程度上抑制 NDMA 的致突变效应(DCE 达 1 000 μmol/L 浓度时抑制率为 55%)，且这一作用呈现与 DCE 浓度的相关性；同时 DCE 对 2-NP 诱导的基因突变频率无明显影响(图 1B)。ABT 则近乎完全抑制 NDMA 诱导的致突变效应(ABT 浓度为 200 μmol/L 浓度时抑制率为 99%)，同时对 2-NP 的诱变作用无明显影响(图 1D)。

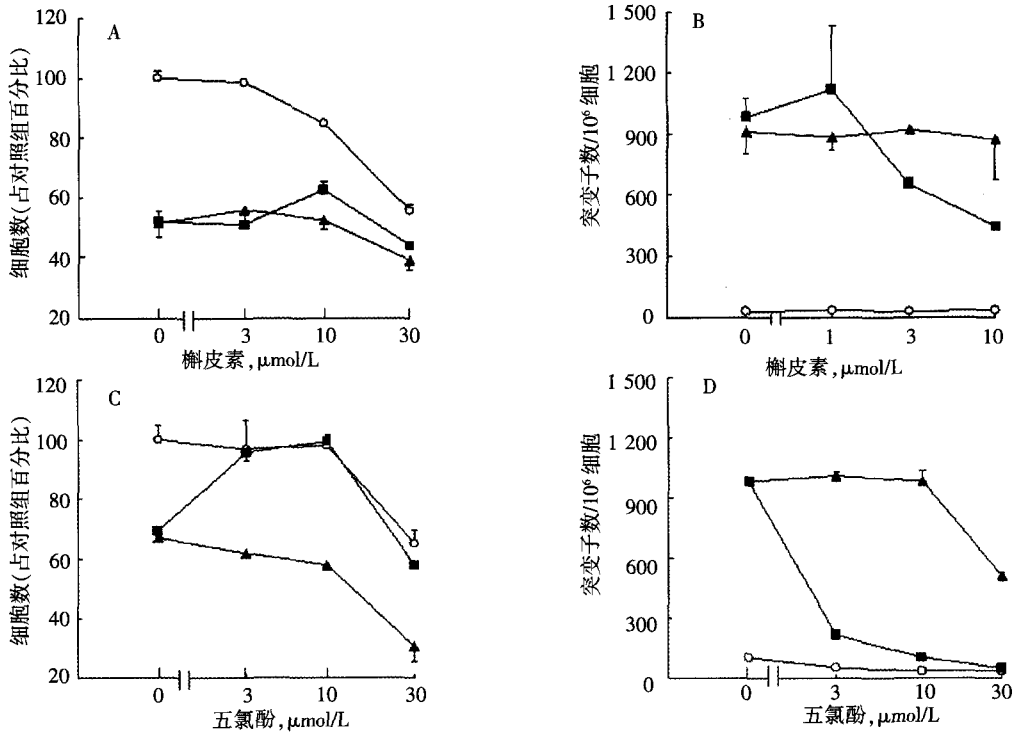
如图 2A 和 2C 所示，槲皮素和 PCP 在各自的最高浓度组(分别为10 μmol/L和30 μmol/L)对V79-hCYP2E1-hSULT1A1 呈现明显的细胞毒性作用。槲皮素在 3 μmol/L 浓度使 2-NP 作用下的细胞数目有所回升，而对 NDMA 的细胞毒性则无影响；在 10 μmol/L 浓度则进一步降低两个间接致突变物作用下的细胞数目(图 2A)。PCP 在 3 μmol/L 和 10 μmol/L 能完全阻断 2-NP 的细胞毒性，而对 NDMA 的细胞毒性无明显影响；但在 30 μmol/L 加重两个间接致突变物的细胞毒性作用。

如图 2B 和 2D 所示，槲皮素在 3 μmol/L 和 10 μmol/L 浓度可降低 2-NP 诱导的突变频率(在后一浓度其抑制率达 63%)，而对 NDMA 的作用无影响；PCP 在 3~30 μmol/L 浓度对 2-NP 诱导的突变频率呈现浓度相关性抑制(在无细胞毒性的 10 μmol/L 浓度抑制率达 98%)，但在 30 μmol/L 浓度则对NDMA 的致突变作用也有明显抑制作用。



抑制剂单独的细胞毒性和致突变效应（圆圈），抑制剂对 N- 二甲基亚硝胺（NDMA，三角形）和 2- 硝基丙烷（2-NP，正方形）细胞毒性和致突变效应的影响；A、C 为细胞毒性曲线，而 B、D 为致突变作用曲线。4 个图的横坐标均表示各抑制剂及其浓度，A、C 的纵坐标以相对细胞数表示细胞毒性作用，B、D 的纵坐标表示突变频率

图 1　CYP2E1 抑制剂反式 1，2- 二氯乙烯（DCE）和 1- 氨基苯并三唑(ABT)对 V79-hCYP2E1- hSULT1A1 细胞的作用



抑制剂单独的细胞毒性和致突变效应（圆圈），抑制剂对 N- 二甲基亚硝胺（NDMA，三角形）和 2- 硝基丙烷（2-NP，正方形）细胞毒性和致突变效应的影响；A、C 为细胞毒性曲线，而 B、D 为致突变作用曲线。4 个图的横坐标均表示 SULT1A1 抑制剂及其浓度，A、C 的纵坐标以相对细胞数表示细胞毒性作用，B、D 的纵坐标表示突变频率

图 2　SULT1A1 抑制剂槲皮素和五氯酚对 V79-hCYP2E1- hSULT1A1 细胞的作用

3　讨　论

有报道 DCE 对人 CYP2E1 有特异性抑制作用（CYP2E1 抑制率达 80%时其它亚型的 CYPs 活性无改变）[4]，因此 DCE 可能在体内用药特异抑制 CYP2E1 活性上比较适用。在本研究中，DCE 虽然可在一定程度上抑制 CYP2E1，但同时具有一定细胞毒性，因此它不适合作为 V79-hCYP2E1-hSULT1A1细

胞中 CYP2E1 的特异抑制剂。ABT 因为在所测试的浓度范围没有明显的细胞毒性，且能完全地抑制 CYP2E1 所活化的致突变和细胞毒性反应，同时又对 SULT1A1 活化的致突变和细胞毒性反应无明显影响，在用 V79-hCYP2E1-hSULT1A1 细胞作有关化合物代谢的研究时是一理想的 CYP2E1 抑制剂。

槲皮素因为其天然植物来源，以药物形式由胃肠道给予是符合人类用药安全的理想的 SULT1A1 抑制剂[12]。其抑制机制可能是作为一个底物与其它底物竞争 SULT1A1 的活性中心[13]。在本研究所用的体外试验中，槲皮素虽然在低浓度下即可一定程度地抑制 2-NP 的致突变作用，同时对 NDMA 的作用无明显影响，但它降低细胞生长数目，提示有一定细胞毒性，因此不是理想的针对 V79-hCYP2E1-hSULT1A1 细胞中 SULT1A1 的特异抑制剂。PCP 在 3~10 μmol/L 浓度范围不影响细胞生长，能高效抑制细胞中 SULT1A1 所活化的细胞毒性和致突变反应（细胞毒性完全阻断，致突变作用在 3 μmol/L 和 10 μmol/L 浓度抑制率达 82%和 98%），同时对 NDMA 的作用无明显影响。因此 PCP 是 V79-hCYP2E1-hSULT1A1 细胞在体外试验中 SULT1A1 的一个理想的特异抑制剂，其最佳应用浓度为 10 μmol/L。

综合起来，ABT 在 20~200 μmol/L 浓度范围、PCP 在 10 μmol/L 浓度可分别完全而特异地抑制 V79-hCYP2E1-hSULT1A1 细胞中 CYP2E1 和 SULT1A1 的代谢活化作用。这一实验模型对于研究某些药物与毒物的代谢及其与生物活性的关系具有可靠的应用价值。这是由于：(1)V79 细胞是用于毒理学体外实验的经典细胞系，具有大量可供对照和分析的相关数据资料；(2)V79 对照细胞本身不具有可检测到的内源性生物转化酶活性[14]，因此在该重组细胞观察到而对照细胞缺乏的生物学活性就可特异性地判断为所重组表达的特定酶的活性，较各种Ⅰ相和Ⅱ相代谢酶都表达的肝细胞系（如肝癌细胞系 HepG2 细胞）具有特异性强的优点；(3) CYP2E1 和 SULT1A1 在该细胞系的表达水平很稳定（在连续 6 周的传代过程中重组表达的酶蛋白水平未见变化）[9]；CYP2E1 和 SULT1A1 具有较广泛的底物谱，前者的底物有醋氨酚、异烟肼、乙醇、亚硝胺、苯、氯乙烯等小分子化合物[15]，后者的底物包括多种含酚羟基结构的化合物（如多巴胺、肾上腺素、苯酚、羟基多氯联苯等）[16]，且有的化合物（如苯）可以受该二酶连续的催化作用进行Ⅰ相和Ⅱ相反应。(4)有了本研究所建立的特异而高效的酶抑制剂，这一细胞模型可用于观察在二酶联合作用中各个酶单独的作用。当然，这一细胞模型也具有它的局限性，主要是该细胞系为地鼠细胞，不能用它观察外源性化学物对人类靶细胞的作用；此外，该酶-抑制剂-细胞模型的应用范围仅限于体外试验，如果要在体内试验中应用该二酶的抑制剂，可能需要回头考虑在体内试验中证明有效的槲皮素和 DCE（当然二者在体内具体模型中是否具有交互作用还是一个未知点，需要实验观察才能明确）。

参 考 文 献

[1] Kim H M, Ha J R, Park S K, et al. Presence of hexobarbital in primary cultures of rat hepatocytes maintains cytochrome P-450 levels and drug metabolizing enzyme activities[J]. Drug Chem Toxicol, 1988, 11(1): 29-24.

[2] Mori Y, Yamazaki H, Konishi Y. Mutagenicity of N-nitrosodi ethanolamine in the Samonella/microsome test[J]. Mutat Res, 1987, 192(1): 91-94.

[3] Glatt H, Schneider H, Liu Y. V79-hCYP2E1-hSULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals[J]. Mutat Res, 2005, 580(1): 41-52.

[4] Mathews J M, Etheridge A S, Raymer J H, et al. Selective inhibition of cytochrome P450 2E1 in vivo and in vitro with trans-1,2-dichloroethylene[J]. Chem Res Toxicol, 1998, 11(7): 778-785.

[5] Suhua W, Rongzhu L, Wenrong X, et al. Induction or inhibition of cytochrome P450 2E1 modifies the acute toxicity of acrylonitrile in rats: biochemicall evidence[J]. Arch Toxicol, 2010, 84(6): 461-469.

[6] Emoto C, Murase S, Sawada Y, et al. In vitro inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes: a comparison with SKF-525A and ketoconazole[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2003, 18(5): 287-295.

[7] De Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, et al. Inhibition of phenol sulfotransferase (SULT1A1) by quercetin in human adult and foetal livers [J]. Xenobiotica, 2002, 32(5): 363-368.

[8] Meerman J H N, Sterenborg H M, Mulder G J. Use of pentachlorophenol as long-term inhibitor of sulfation of phenols and hydroxamic acids in the rat in vivo[J]. Biochem Pharmacol, 1983, 32(10): 1587-1593.

[9] Liu Y G, Glatt H. Human cytochrome P450 2E1 and sulfotransferase 1A1 co-expressed in Chinese hamster V79 cells enhance spontaneous mutagenesis[J]. Environ Mol Mutagen, 2010, 51(1): 23-30.

[10] Glatt H, Gemperlein I, Setiabudi F, et al. Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds[J]. Mutagenesis, 1990, 5(3): 241-249.

[11] Schmalix W A, Barrenscheen M, Landsiedel R, et al. Stable expression of human cytochrome P450 2E1 in V79 Chinese hamster cells [J]. Eur J Parmacol, 1995, 293(2): 123-131.

[12] Ghazali R A, Waring R H. The effects of flavanoids on human phenolsulphotransferases: potentiall in drug metabolism and chem.oprevention[J]. Life Sci, 1999, 65(16): 1625-1632.

[13] Ung D, Nagar S. Variable sulfation of dietary polyphenols by recombinant human sulfotransferase (SULT)1A1 genetic variants and SULT1E1[J]. Drug Metab Dispos, 2007, 35(5): 740-746.

[14] Glatt H, Gemperlain I, Setiabudi F, et al. Expression of xennobiotic-matabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds[J]. Mutagenesis, 1990, 5(3): 241-249.

[15] Ghanayem B I, Hoffler U. Investigation of xenobiotics metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity using Cyp2e1 (-/-) mice[J]. Curr drug Metab, 2007, 8(7): 728-749.

[16] Duffel M W, Marshall A D, McPhie P, et al. Enzymatic aspects of the phenol (aryl) sulfotransferases[J]. Drug Metab Rev, 2001, 33(3&4): 369-395.

（责任编辑：张学颖）