

2015, 41(5): 0870-0878
ISSN 0257-4799; CN 32-1115/S
DOI: 10.13441/j.cnki.cykx.2015.05.013

对乙酰氨基酚在家蚕体内的糖基化代谢特点和对组织的损伤作用

何月¹ 徐旭^{1,2} 王海英¹ 殷为民^{1,3} 司马杨虎^{1,4} 徐世清^{1,4}

(¹苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123; ²常州市第一人民医院, 江苏常州 213001; ³苏州大学心血管病研究所, 江苏苏州 215007; ⁴苏州大学农业生物技术与生态研究院, 江苏苏州 215123)

摘要 以临床解热镇痛药基本成分对乙酰氨基酚(APAP)为模药,调查APAP在家蚕体内的代谢和对蚕体主要组织(系统)的损伤以及蚕体主要解毒酶基因的表达变化,探讨家蚕作为肝毒性药物毒理研究替代实验动物的可能性。家蚕5龄2d幼虫经口给予APAP后0.5h,在消化管、脂肪体和血淋巴中均能够检测到原药,APAP主要糖基化解毒代谢途径中的关键酶——尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸基转移酶(UGT)活性也随即快速上升,其中脂肪体中的UGT酶活性上升早于血淋巴和消化管。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析显示,幼虫消化管和脂肪体细胞中UGT家族基因 $Ugt30$ 、 $Ugt86$ 和 $Ugt89$ 的转录水平在给予APAP后0.5h开始显著上调。HE染色显示,高剂量APAP对蚕体消化管和脂肪体组织具有损伤作用,但AO/PI染色未发现血淋巴中死细胞增多。研究结果表明,家蚕的消化管、脂肪体和血淋巴都有通过糖基化代谢APAP的解毒功能,过量的APAP对消化管和脂肪体组织都有损伤作用。

关键词 家蚕; 对乙酰氨基酚; 糖基化代谢; 尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸基转移酶; 基因表达; 组织损伤; 实验动物

中图分类号 S881.2; Q95-3; R969.1 **文献标识码** A **文章编号** 0257-4799(2015)05-0870-09

Glycosylation Metabolic Characteristics of Acetaminophen in *Bombyx mori* and Damage to Larval Tissues

He Yue¹ Xu Xu^{1,2} Wang Haiying¹ Yin Weimin^{1,3} Sima Yanghu^{1,4} Xu Shiqing^{1,4*}

(¹School of Biology & Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou Jiangsu 215123, China; ²The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou Jiangsu 213001, China; ³Institute for Cardiovascular Science, Soochow University, Suzhou Jiangsu 215007, China; ⁴Institute of Agricultural Biotechnology & Ecology, Soochow University, Suzhou Jiangsu 215123, China)

Abstract Taking the basic component acetaminophen (APAP) in clinical antipyretic analgesics as the model drug, we investigated the metabolism of APAP in silkworm (*Bombyx mori*) and its damage to major tissues (systems) of silkworm larvae, and the expression variation of main detoxification enzyme genes to discuss the possibility of using silkworm as the substituted experimental animal in the study of hepatotoxic drugs' toxicology. At 0.5 h after oral administration to day 2 silkworm larvae of the 5th instar, APAP was tracked in digestive tract, fat body and hemolymph in silkworm. Thereupon, the activity of UDP-glucuronosyltransferases (UGT), which are the key enzymes in main metabolic pathway of glycosylation detoxification of APAP, also increased quickly, and the enzymatic activity in fat body increased earlier than those in hemolymph and digestive tract. The results of real-time fluorescent quantitative (qRT-PCR) analysis showed that at 0.5 h after oral administration, the transcription level of UGT family genes

收稿日期: 2015-05-26 接受日期: 2015-07-01

资助项目: 国家自然科学基金项目(No.31472149), 国家高技术研究发展计划“863”重点项目(No.2011AA100306), 江苏省优势学科项目(No.YX11500211), 江苏省研究生培养创新工程项目(No.KYLX_1248)。

第一作者信息: 何月(1990-), 女, 硕士研究生。

E-mail: 18896500280@163.com

通信作者信息: 徐世清, 教授, 博士生导师。

E-mail: szsqxu@suda.edu.cn

* Corresponding author. E-mail: szsqxu@suda.edu.cn

Ugt30, *Ugt86* and *Ugt89* significantly increased in fat body and digestive tract cells. HE staining showed that high dose of APAP can lead to damage of digestive tract and fat body, while the number of dead haemocytes was not found increased in circulative hemolymph by AO/PI staining. The results showed that the digestive tract, fat body and hemolymph of silkworm all have APAP detoxification function through glycosylation metabolism, while the excessive APAP could lead to injuring of digestive tract and fat body tissues in silkworm.

Keywords *Bombyx mori*; Acetaminophen; Glycosylation metabolism; UDP-glucuronosyltransferases; Gene expression; Tissue injury; Experimental animal

对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是一种临床广泛使用的解热镇痛类非处方药物,能够缓解细菌感染或其他原因所引起的发烧症状。对APAP在包括人体在内的哺乳动物体内的代谢途径研究表明,进入体内血液循环的90%以上APAP能够通过糖基化(55%)和硫酸化(35%)反应形成无毒物质排出肾脏,其中最主要的糖基化代谢依赖于尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronosyl-transferases, UGT)的作用^[1-2]。UGT是广泛存在于动、植物中的蛋白酶超家族,能催化核苷酸的糖基转移到受体分子的糖苷配基上,使疏水性分子转化为亲水性分子,对控制和排除内生与外源毒素具有重要作用^[3]。家蚕幼虫体内已经发现了46个UGT家族基因^[4]。本实验室通过对家蚕UGT家族成员*Ugt86*基因的研究认为,家蚕UGT参与槲皮素5-O-葡萄糖基转移作用的黄色形成反应,不是家蚕主动的环境拟态进化,而是UGT对植源性食物的解毒作用^[5]。因此,可以利用家蚕研究APAP在动物体内的糖基化代谢解毒机制。

小鼠经口摄入的APAP,不足10%由细胞色素P450(cytochrome P450, CYP450)催化形成亲电子的代谢产物N-乙酰-对-苯醌亚胺(N-acetyl-parabenzquinone, NAPQI)^[2]。常规剂量下,小鼠体内生成的NAPQI极易与肝脏中的还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)共价结合生成水溶性无毒物质,通过肾脏排出体外^[6]。服用过量APAP时,产生的NAPQI最终会耗竭肝脏内的GSH^[7],剩余的NAPQI将与其他蛋白质的半胱氨酸残基结合,进而使细胞内产生氧化应激以及线粒体的通透性改变,导致细胞凋亡^[1],这也是APAP临床应用中发生肝毒性反应的主要分子机制。家蚕的血淋巴和脂肪体作为主要代谢解毒组织(系统),具有研究肝毒性药物作用机制的潜在价值^[8-11]。本实验室已有的研究显示,家蚕的消化管也对经口给予的药物具有代谢解毒作

用^[5]。为此,本研究以APAP为模药,追踪经口给予APAP后,原药在家蚕消化管、血淋巴和脂肪体组织(系统)间的分布与转移,调查APAP诱导蚕体的UGT酶活性以及UGT家族基因*Ugt30*、*Ugt86*和*Ugt89*的转录水平变化,观察经口给予过量APAP对幼虫消化管和脂肪体组织以及血细胞的损害作用,据此探讨家蚕作为肝毒性药物的毒理研究替代实验动物的可能性。

1 材料与方法

1.1 家蚕给药处理

供试家蚕品种皓月,由苏州大学基础医学与生物科学学院应用生物学系保存。家蚕幼虫在25~26℃下用新鲜桑叶饲养至5龄2d供试,选取体质量为1.60 g±0.10 g的家蚕幼虫备用。

模拟哺乳动物口服药物的方式,以磨圆针头的100 μL微量注射器口腔注射方式灌喂给药。灌喂处理前,供试家蚕幼虫饥饿处理3h以排空消化管中的食物。将APAP(美国Sigma公司)溶于超纯水中,灌喂量为100 μL/头。给药剂量参照文献[12]的调查结果,选择对家蚕没有表现发育毒性和组织损伤作用的安全剂量(低剂量组)为600 mg/kg,损伤剂量为3600 mg/kg,损伤临界剂量为1800 mg/kg。对家蚕经口灌喂给予药液的处理过程中确保无漏液,处理后调查期间无吐液的家蚕个体视为灌喂成功,每组处理3头蚕。每头蚕灌喂时间约为30s,准确记录每头蚕的灌喂结束时间,于处理后的相应时间点取材。对照处理为经口灌喂100 μL超纯水。

1.2 蚕体组织中的APAP原药浓度测定

供试家蚕幼虫经口给予APAP后0.5、1.0和2.0h取样制作检测样品。从幼虫尾角取血,4℃下12000 r/min离心1min,获得上清液血浆,-80℃下保存备用;采血后的幼虫快速解剖取出脂肪体和消化管,称量后加液氮充分研磨,然后加入超纯水,移

入 EP 管中用细胞破碎仪破碎 1 min ,最后在 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min ,取上清 , -80 ℃ 下保存备用。每个样本以 3 头蚕取样 ,雌、雄随机。

采用高效液相色谱法(HPLC)^[13]测定组织中的原药浓度。室温条件下使用 Sepax HP-C18 柱 (150 mm×4.6 mm ,粒径 5 μm ,孔径 1 200 nm; 美国 Delaware 公司) 进行测定 ,流动相的流速 0.7 mL/min ,检测波长 254 nm。流动相 A 为色谱级乙腈(国药集团化学试剂有限公司) ,流动相 B 为 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 2.3)。流动相 A 与流动相 B 的体积比为 3.75 : 96.25 ,等比例洗脱。

1.3 蚕体组织中的 UGT 酶活性测定

供试家蚕幼虫以 600 mg/kg 的剂量经口给予 APAP 后 8 min、16 min、24 min 和 32 min 解剖蚕体 ,取脂肪体、消化管以及血淋巴。在 100 μL 血淋巴或加液氮磨碎的组织(鲜重约 100 mg) 中 加入 500 μL 含 100 mmol/L PMSF 的单去污剂裂解液(上海冠泰生物科技有限公司) ,移入离心管中用细胞破碎仪破碎 1 min ,冰浴条件下继续裂解 30 min 后 ,然后在 4 ℃ 下 12000 r/min 离心 5 min ,取上清液供试 ,采用 BCA 方法测定总蛋白质含量。UGT 酶活性测定参照文献[14]的方法并略作修改 ,利用槲皮素(美国 Sigma 公司) 作为底物 ,具体步骤为: 取 400 mmol/L Tris·HCl 溶液 12.5 μL、40 mmol/L MgCl₂ 溶液 12.5 μL、1 mmol/L 槲皮素 10 μL 和蛋白提取液(酶液) 10 μL 混匀 ,37 ℃ 孵育 5 min; 加入 50 mmol/L 尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸(UDP glucuronic acid ,UDPGA) 5 μL ,37 ℃ 孵育 5 min; 加入 50 μL 甲醇终止反应 ,1 000 r/min 离心 10 min 取上清 , -80 ℃ 保存用于 HPLC 检测。HPLC 条件为: Sepax GP-C18 柱(150 mm×4.6 mm ,粒径 5 μm ,孔径 1 200 nm; 美国 Delaware 公司) ,流动相 A(100% 甲醇) 与流动相 B(含 0.2% 甲酸的纯水 ,pH 2) 的体积比为 1 : 1 ,流速 1.0 mL/min ,检测波长 368 nm。

1.4 蚕体组织中 UGT 基因表达的实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测

供试家蚕幼虫以 600 mg/kg 的剂量经口给予 APAP 后 0.5、1.0、2.0、3.0 和 4.0 h 解剖蚕体 ,取脂肪体、消化管组织以及血淋巴 ,使用 RNAiso™ Plus 试剂盒[宝生物工程(大连) 有限公司] ,参照使用说明提取总 RNA ,电泳检测 RNA 提取质量 ,测定总 RNA 浓度。取 1 μg 总 RNA ,使用 Prime Script™ RT

reagent Kit 试剂盒[产品编号 RR037A ,宝生物工程(大连) 有限公司] ,参照试剂盒说明书反转录合成 cDNA , -80 ℃ 保存备用。

利用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒[产品编号 RR420A ,宝生物工程(大连) 有限公司] 按照说明书步骤 ,以 *BmRp49* 为内参基因 ,qRT-PCR 检测目的基因 mRNA 转录水平。参照本研究室报道的基因序列^[14] ,利用软件 Primer 5.0^[14] 设计 UGT 家族基因 *Ugt30*、*Ugt86* 和 *Ugt89* 的实时荧光定量 PCR 引物: *Ugt30*-F(5'-CACCATCAATCAGTCATCAAGT-3') 和 *Ugt30*-R(5'-CAAGTTGTGTACGAAATGTCA-3') ,*Ugt86*-F(5'-CGT-TGAGTGATGTATTGCCGA-3') 和 *Ugt86*-R(5'-AAATA-CTTGTTGTGGTGCCC-3') ,*Ugt89*-F(5'-TTGCCACCG-GATCTACAA-3') 和 *Ugt89*-R(5'-GTCCCTCTTTAATC-TCCTTCG-3') ,内参基因 *BmRp49* 的引物为 *Bm-Rp49*-F(5'-GCATCAATCGGATCGCTATG-3') 和 *Bm-Rp49*-R(5'-GGACCTTACGGAATCCATTG-3')。反应程序由 ABI7300 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司) 软件自动设定 ,反应体系为 20 μL ,每个样品重复测定 3 次。检测结果由仪器自带的 Sequence Detection Software Version1.3.1 软件处理。参照文献[15]的方法进行效率校正。用不同稀释浓度的组织 cDNA 为模板 ,绘制 UGT 基因和内参 *Actin* 基因的标准曲线。所测数据根据以下公式计算: $Ct = a \times \lg(\text{copy}) + b$, a 值代表直线的斜率 ,根据不同基因和不同 PCR 片段而不同 , b 值为直线的截距。

1.5 蚕体组织切片的制作与 HE 染色

供试家蚕幼虫按照 3 600 mg/kg 的剂量经口给予 APAP 后 ,于 12 h 和 18 h 解剖蚕体 ,取消化管和脂肪体组织。参照文献[16]的方法 ,固定和包埋后制作蚕体组织石蜡切片 ,切片厚度为 5~10 μm。组织切片经过脱蜡后用苏木精和伊红(hematoxylin and eosin ,HE) 染色 ,进行观察、拍照。

1.6 家蚕血细胞 AO/PI 染色

供试家蚕幼虫以 600 mg/kg 的剂量经口给予 APAP 后 8 min、32 min 和 12 h ,取血淋巴 ,参照文献[17]的方法 ,用上海生工生物工程技术有限公司生产的吖啶橙(acridine orange ,AO) 和碘化丙锭(propidium iodide ,PI) 进行双染色 ,观察、调查血细胞死亡情况。

1.7 数据统计分析

所有试验数据至少重复测定或调查 3 次。对照组

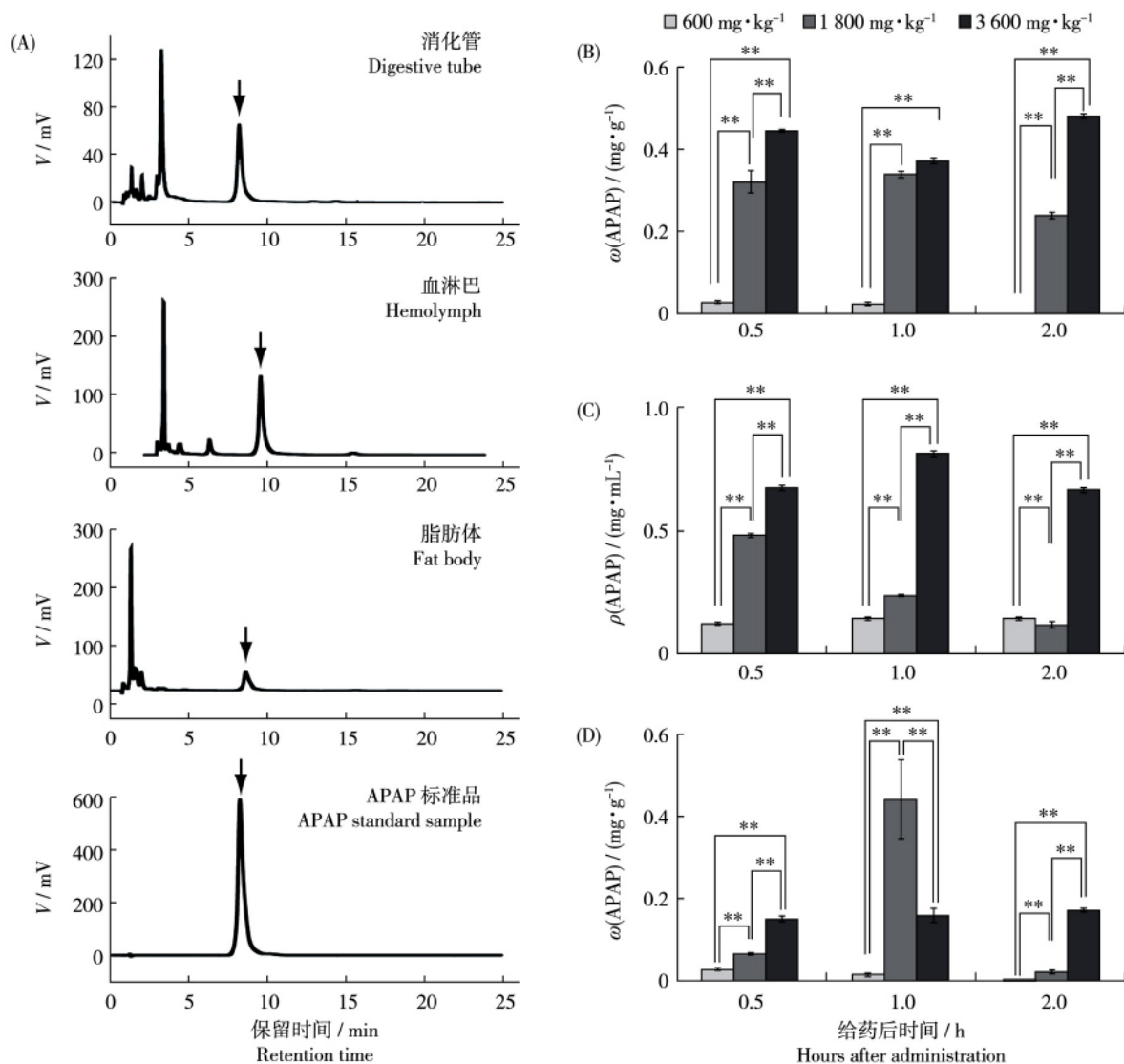
和实验组之间的差异显著性分析采用 *t*-test 检验, 多个时间点和多种浓度之间的差异显著性分析使用 Origin 7.5 软件中的 one-way ANOVA 方法。

2 结果与分析

2.1 经口给予 APAP 后原药在蚕体内的转移与分布

通过 HPLC 法追踪原药 APAP 在家蚕 5 龄幼虫

消化管、血淋巴以及脂肪体中的浓度变化, 结果如图 1-A 所示。给药后 0.5 h, 在幼虫消化管、脂肪体和血淋巴中均能检测到原药。这与本实验室用其他化学材料(药物)处理的结果非常一致^[16]。表明家蚕内脏组织器官均浸润在开放的血液循环系统中, 经口给予的药物进入消化管后, 一旦经消化管吸收进入血淋巴, 能够很快进入脂肪体等组织。



A. HPLC 指纹图 图中箭头表示 APAP 峰 B. 消化管 C. 血淋巴 D. 脂肪体

每个样本以重复处理的 3 头蚕取样 雌、雄随机 图 2~5 同。 ** $P < 0.01$ 。

A. HPLC fingerprint, the arrows indicate APAP peak B. Digestive tube C. Hemolymph D. Fat body

Every sample contained 3 larvae and both male and female larvae were randomly selected (the same in Fig. 2 to 5). ** $P < 0.01$.

图 1 HPLC 法测定家蚕 5 龄 2 d 幼虫经口给予对乙酰氨基酚 (APAP) 后不同时间各组织中的原药浓度变化

Fig. 1 Change of acetaminophen (APAP) content in various tissues at different time after oral administration to day 2 silkworm larvae of the 5th instar determined by HPLC method

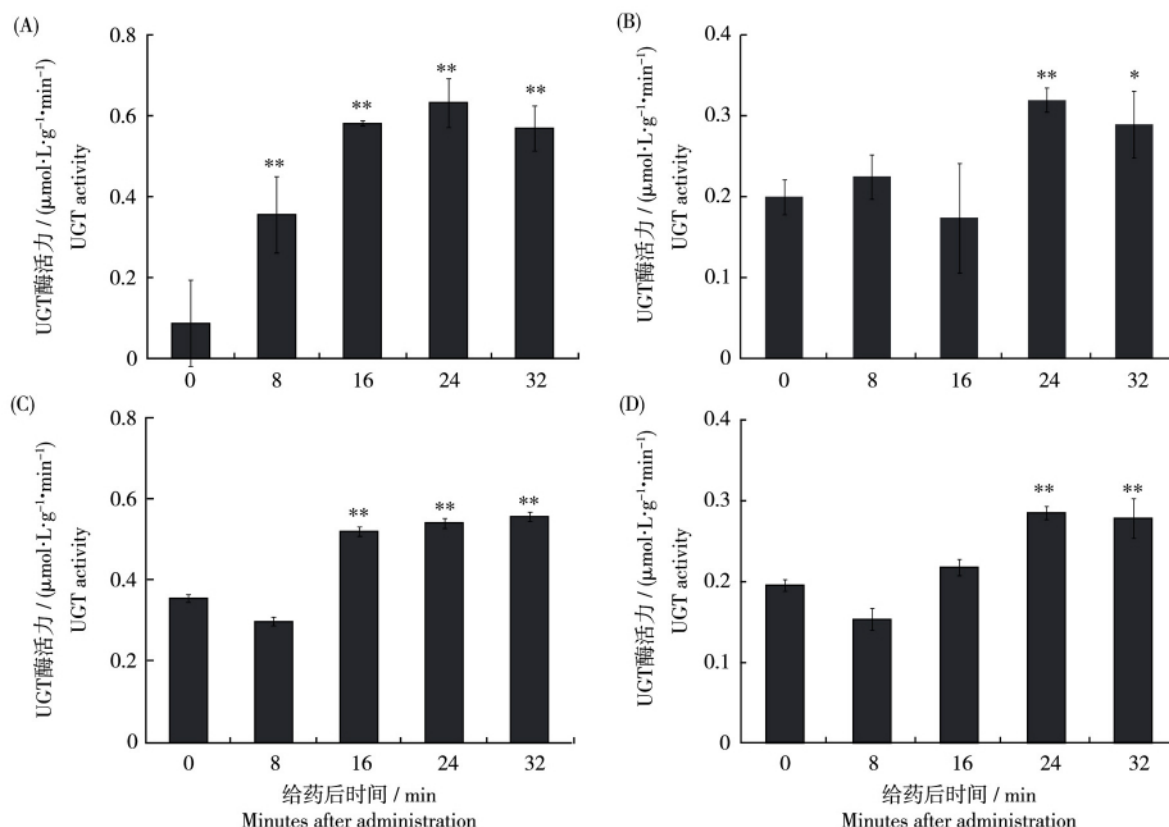
家蚕消化管中 APAP 的含量变化如图 1-B 所示。无论经口给药处理的中剂量(1 800 mg/kg) 组还是低剂量(600 mg/kg) 组, 药物在蚕体内的代谢均符合典型的时间-剂量效应药代动力学规律; 而高剂量(3 600 mg/kg) 组蚕体内的药物代谢则出现先下降后上升的趋势, 可能是经口给予高浓度 APAP 后家蚕的消化管组织出现了吸收障碍^[18]。对血淋巴中的 APAP 浓度变化测定结果如图 1-C 所示。给药后各时期血淋巴中 APAP 的浓度与消化管中的浓度变化非常接近, 表明 APAP 能迅速通过消化管吸收进入血淋巴, 而且血淋巴中 APAP 的浓度变化也符合时间-剂量效应, 不同给药剂量组之间存在极显著差异。对脂肪体中 APAP 的浓度变化测定结果如图 1-D 所示, 各时期的药物浓度略低于消化管和血淋巴, 但通过比较不同剂量处理后原药浓度的变化

可以看到, 脂肪体中的原药浓度变化也呈现典型的时间-剂量效应。

2.2 经口给予 APAP 对蚕体组织中糖基化解毒酶系 UGT 的影响

2.2.1 APAP 对 UGT 酶活性的影响

家蚕幼虫经口给予没有表现发育毒性和组织损伤作用的低剂量(600 mg/kg) APAP 后, 脂肪体组织中的 UGT 酶活性在给药后 8 min 出现显著上升现象(图 2-A), 随后血淋巴和消化管中的 UGT 酶活性也相继上升(图 2-B、C)。分析酶活性上升幅度, 消化管和血淋巴中上升后的 UGT 酶活性都未超过给药前酶活性的 50%, 而脂肪体中的 UGT 酶活性上升到给药前的 6 倍以上。与哺乳动物肝脏对 APAP 的快速反应相似, 家蚕脂肪体中的 UGT 酶对 APAP 表现出快速反应, 反应速度快于先接触 APAP 的消化管和血淋巴 2 个组织。



“*” “**” 分别表示与给药后 0 h 比较差异达显著($P<0.05$) 和极显著($P<0.01$) 水平。图 3 同。

* and ** indicate significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) respectively. The same in Fig. 3.

图 2 家蚕 5 龄 2 d 幼虫经口给予对乙酰氨基酚(APAP) 后脂肪体(A)、消化管(B)、血淋巴(C) 组织及个体(D) 水平的 UGT 酶活性变化

Fig. 2 Change of UDP-glucuronosyltransferase activity in fat body (A), digestive tube (B), hemolymph (C) and larva body (D) after oral administration with acetaminophen (APAP) to day 2 silkworm larvae of the 5th instar

2.2.2 APAP 对 UGT 基因表达水平的影响 qRT-PCR 检测结果显示, 经口给予 APAP 后 4 h 之内, 消化管中的 *Ugt30*、*Ugt86* 以及 *Ugt89* 基因的表达量均上调(图 3-A)。其中 *Ugt30* 和 *Ugt89* 基因的表达变化最迅速, 在给药后 0.5~1.0 h 时即上升至峰值水平, 推测这 2 个基因的蛋白酶产物可能参与了 APAP 的最初糖基化代谢过程^[19]。而 *Ugt86* 基因在给药后 2 h 才出现上调表达, 此后 *Ugt86* 基因的转录水平还在继续上调, 至给药后 4 h 又迅速下降至给药前的本底水平。已有报道表明 UGT86 一般参与糖基化中间产物的 5-O 位糖基化^[15-20], 因此本试验结果暗示该基因编

码的蛋白酶可能只是参与 APAP 代谢中间产物的糖基化, 是一个继发的诱导表达过程。测定脂肪体组织中 UGT 基因的转录水平(图 3-B), 经口给予 APAP 后 4 h 内, *Ugt30*、*Ugt86* 以及 *Ugt89* 基因的表达水平都在给药后 0.5 h 时迅速上调, 但与消化管组织中这 3 个基因表达量的变化不同, *Ugt30* 和 *Ugt86* 都出现了第 2 次上调表达。图 2 显示脂肪体中 UGT 活性对 APAP 的响应最快, 是最重要的 APAP 代谢解毒组织, 但基因表达量的变化则暗示脂肪体不是 APAP 第一作用靶器官, 可能是受 APAP 代谢中间产物或家蚕体内应急系统继发诱导的反应组织^[19]。

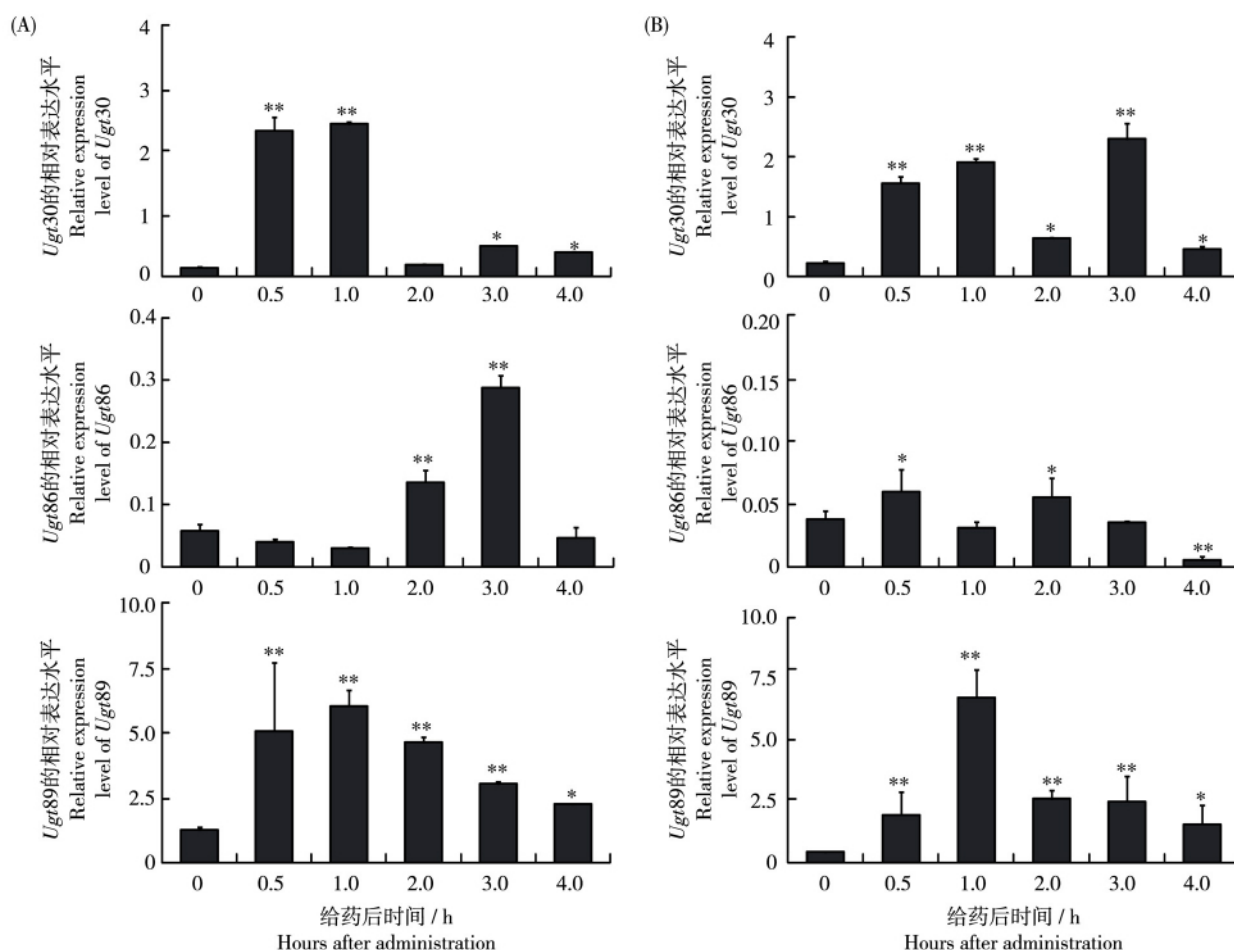


图3 家蚕5龄2d幼虫经口给予乙酰氨基酚(APAP)后消化管(A)和脂肪体(B)中3个UGT基因的表达变化

Fig. 3 Expression variation of 3 UGT genes in digestive tube (A) and fat body (B) after oral administration with acetaminophen (APAP) to day 2 silkworm larvae of the 5th instar

2.3 过量 APAP 对蚕体组织的损伤作用

过量 APAP 在哺乳动物体内代谢能够生成大量的代谢产物 NAPQI, 最终引发组织细胞内的氧化应

激与氧化损伤^[20]。观察家蚕幼虫经口给予高剂量 (3 600 mg/kg) APAP 后消化管、脂肪体和血细胞的损伤情况。

给药后 12 h, HE 染色的消化管组织切片(图 4-A) 可见 细胞中的空泡体积增大、数量增多, 消化管组织的内膜出现局部破损; 至给药后 18 h, 消化管组织出现溃烂, 组织内膜结构被严重破坏, 细胞膜出现破损, 柱状细胞、微绒毛和杯状细胞等主要结构已模糊不清。表明高浓度 APAP 已对家蚕消化管组织造成了严重损伤。

给药后 12 h, HE 染色的脂肪体组织切片(图 4-B) 可见 原本呈长条形的脂肪体细胞变成了圆形, 细胞膜增厚或破损, 细胞内空泡增加、细胞核变小, 细胞缩短并变成圆形, 细胞排列变得杂乱松散; 至

给药后 18 h, 脂肪体细胞中的空泡较 12 h 时进一步增大, 细胞核变圆, 并出现了细胞核被完全破坏的无核细胞, 细胞分布杂乱。可见, 高浓度 APAP 对家蚕的脂肪体组织造成了严重损伤。

给药后 12 h, 通过血细胞计数发现家蚕血淋巴中的血细胞总数有上升现象(图 5-A), 血淋巴中死亡血细胞的比率虽然有所增高, 但与对照处理组无显著性差异(图 5-B); 对血细胞的 AO/PI 染色结果发现, 死亡的血细胞数目与对照处理组无明显差异(图 5-C)。该结果显示高浓度 APAP 并未对家蚕血细胞造成严重的直接损伤。

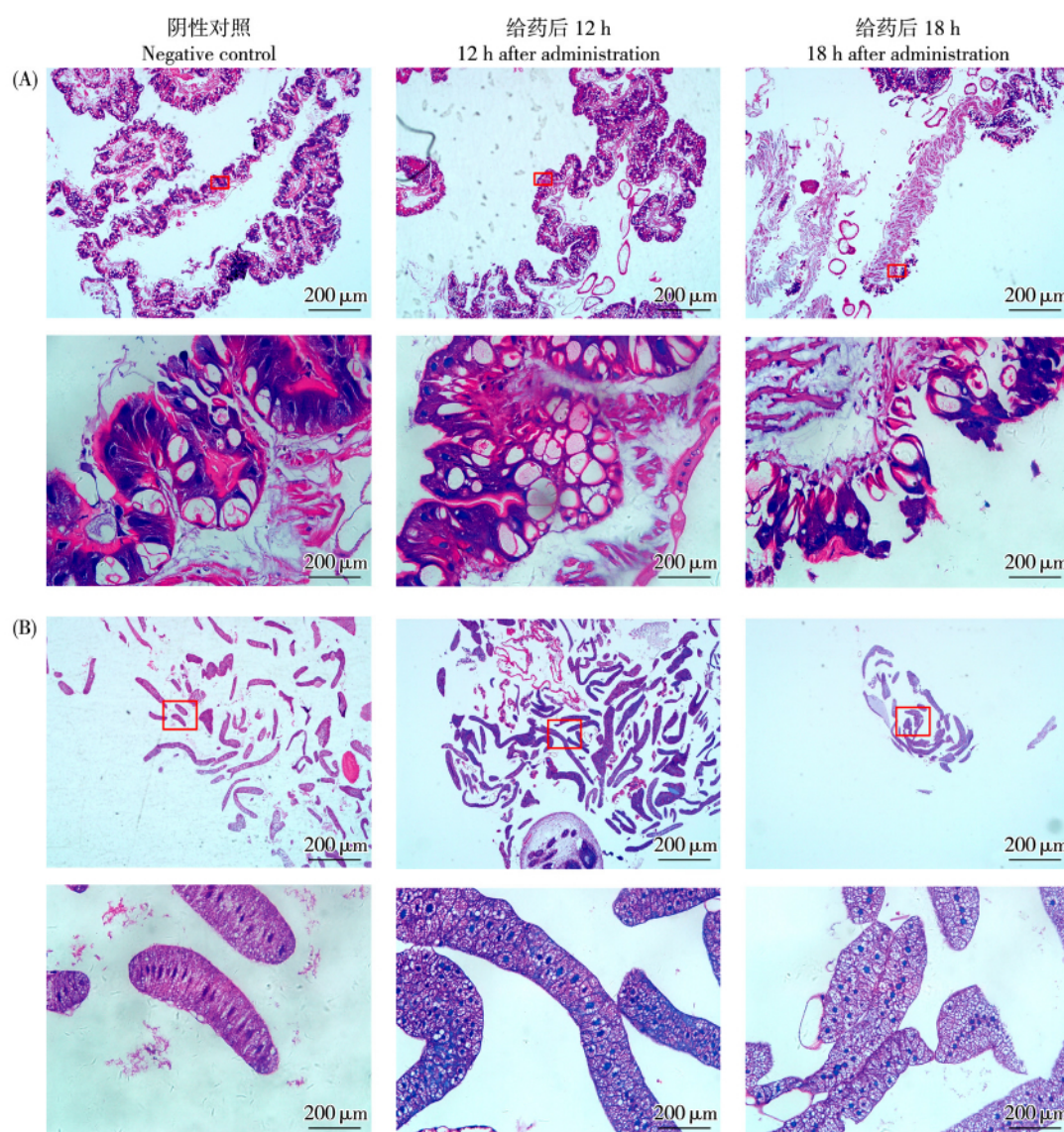
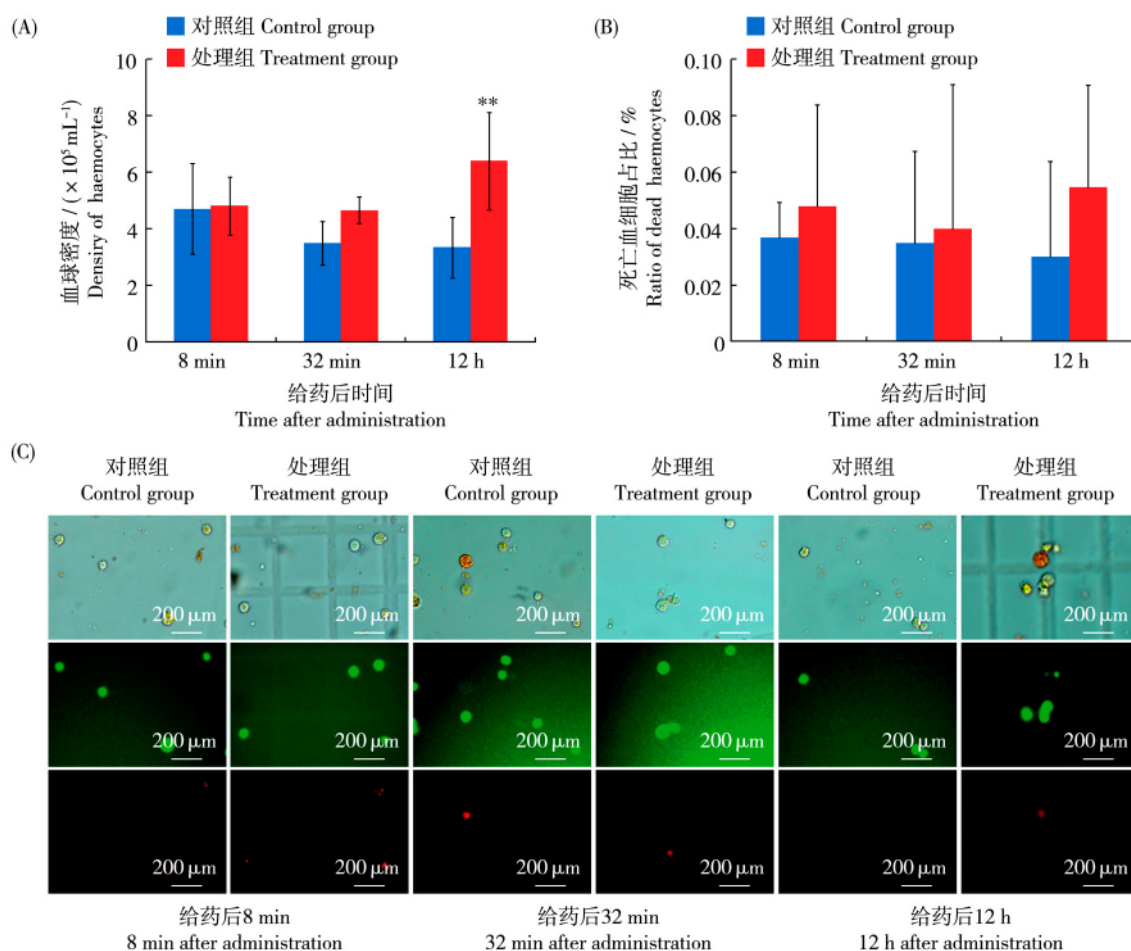


图 4 高浓度乙酰氨基酚(APAP) 对家蚕 5 龄幼虫消化管(A) 和脂肪体(B) 组织构造的影响

Fig. 4 Effect of high concentration acetaminophen (APAP) on the organizational form of digestive tube (A) and fat body (B) of day 2 silkworm larvae of the 5th instar



C 图中死亡血细胞被碘化丙锭 (PI) 染成红色, 所有血细胞被吖啶橙 (AO) 染成绿色。

In Fig. C, dead haemocytes were stained to red by propidium iodide (PI), and all haemocytes were stained green by acridine orange (AO).

图 5 高浓度乙酰氨基酚 (APAP) 对家蚕血球密度 (A) 和死亡血细胞比率 (B) 的影响及血细胞的 AO/PI 染色结果 (C)

Fig. 5 Effect of high concentration acetaminophen (APAP) on density of haemocytes (A) and dead haemocyte percentage (B), and staining results of AO/PI (C) in haemocyte of silkworm

3 讨论

家蚕是鳞翅目模式昆虫,也是有特色的无脊椎实验动物。已有研究表明,家蚕的脂肪体有类似哺乳动物肝脏的强大解毒功能^[21]。本试验以人类肝毒性模式药物 APAP 为材料,观察到家蚕经口给予 APAP 后脂肪体中的糖基化解毒酶 UGT 活性显著上升。与家蚕脂肪体中 UGT 基因受 APAP 诱导显著上调表达不同,血淋巴中的 UGT 基因的表达水平极低(结果未列出),对 UGT 酶活性的影响极小。过量的 APAP 损伤实验也显示,高浓度 APAP 会导致家蚕消化管和脂肪体组织受到严重损伤,但循环系统血淋巴中的血细胞密度调查和血细胞 AO/PI 染

色都显示其并没有受到药物的严重损伤,暗示血淋巴中发挥 APAP 代谢作用的主要不是血细胞,而更可能是脂肪体等组织合成和分泌的 UGT 等相关酶类。表明在家蚕通过糖基化代谢 APAP 的过程中,脂肪体的贡献更大。这与哺乳动物中主要依靠肝脏对 APAP 进行代谢解毒非常相似。

哺乳动物经口给予的药物从胃肠道吸收后,必须经过门静脉(portal vein)进入肝脏,然后才进入血液循环^[22]。本试验中,家蚕经口给予 APAP 后 0.5 h 就在消化管、血淋巴和脂肪体组织追踪到原药的分布,显示 APAP 能够很快突破家蚕的消化管膜障碍,进入血淋巴进一步代谢。值得注意的是,高剂量(3 600 mg/kg)处理组家蚕的消化管组织中,APAP 浓度出现

了先下降后上升的趋势,与脂肪体中先升后降的变化趋势不同,显示消化管组织在后期对 APAP 的吸收和转运出现障碍。检测蚕体内对 APAP 的主要代谢酶 UGT 的活性和基因转录水平也显示,虽然脂肪体中 UGT 酶活性对 APAP 的响应最快,是最重要的 APAP 代谢解毒组织,但对代谢酶蛋白的基因表达水平的检测结果暗示脂肪体不是 APAP 第一作用的靶器官,可能是受 APAP 代谢中间产物或家蚕体内应急系统继发诱导的反应组织。这一结果同时暗示家蚕消化管作为首先接触 APAP 的组织,不仅仅是起吸收作用的组织,还可能是最早受到影响的重要代谢组织。消化道和脂肪体共同参与解毒,是家蚕对肝毒性药物代谢有别于哺乳动物的重要特色。本试验结果在进一步证明家蚕脂肪体具有类似哺乳动物肝脏对外源药物解毒作用的同时,也提示了家蚕不同于哺乳动物的生理和组织结构特点,二者在药物代谢时空变化上可能存在显著的差异。因此,需要引入更多类型的肝毒性药物,进一步从不同解毒代谢途径和受损机制中,探讨家蚕与哺乳动物对肝毒性药物的反应,并引入医学模式动物标准化的实验体系,进一步实现家蚕医学替代实验的数据规范性与可比性。

综上所述,得出的研究结论是:家蚕 5 龄幼虫经口给予 APAP,能够快速突破消化管膜屏障,进入血淋巴和脂肪体组织,快速激活 APAP 的糖基化这一主要解毒代谢体系;过量的 APAP 会损伤家蚕的消化管和脂肪体,但不会对血细胞造成直接的影响。

参考文献 (References)

- [1] Kon K, Ikejima K, Okumura K, et al. Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(3): 501-502
- [2] Kalinec G M, Thein P, Parsa A, et al. Acetaminophen and NAPQI are toxic to auditory cells via oxidative and endoplasmic reticulum stress-dependent pathways [J]. *Hear Res*, 2014, 313: 26-37
- [3] Tephly T R, Burchell B. UDP-glucuronosyltransferase: a family of detoxifying enzymes [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1990, 11: 276-279
- [4] Huang F F, Chai C L, Zhang Z, et al. The UDP-glucosyltransferase multigene family in *Bombyx mori* [J/OL]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 563 [2015-05-25]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/563>
- [5] Xu X, Wang M, Wang Y, et al. Green cocoons in silkworm *Bombyx mori* resulting from the quercetin 5-O-glucosyltransferase of UGT86 is an evolved response to dietary toxins [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(5): 3631-3639
- [6] Johnson B P, Walisser J A, Liu Y, et al. Hepatocyte circadian clock controls acetaminophen bioactivation through NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(52): 18757-18762
- [7] Jiang P, Sheng Y C, Chen Y H, et al. Protection of Flos Lonicerae against acetaminophen-induced liver injury and its mechanism [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(3): 991-999
- [8] Hamamoto H, Kurokawa K, Kaito C, et al. Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(3): 774-779
- [9] Hamamoto H, Sekimizu K. Evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworm as an animal model [J]. *Res Adv Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 5: 1-23
- [10] Berger J. Preclinical testing on insects predicts human haematotoxic potentials [J]. *Lab Anim*, 2009, 43(4): 328-332
- [11] Asami Y, Horie R, Hamamoto H, et al. Use of silkworms for identification of drug candidates having appropriate pharmacokinetics from plant sources [J/OL]. *BMC Pharmacol*, 2010, 10: 7 [2015-05-25]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2210/10/7>
- [12] 徐旭. 酰胺类模药 APAP 在家蚕体内的代谢途径研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2011
- [13] Kessler F K, Kessler M R, Auyeung D J, et al. Glucuronidation of acetaminophen catalyzed by multiple rat phenol UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(3): 324-330
- [14] 王猛. 家蚕几种尿苷二磷酸-葡萄糖基转移酶的基因表达与功能研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2011
- [15] Scheffe J H, Lehmann K E, Buschmann I R, et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2006, 84(11): 901-910
- [16] Ji M M, Liu A Q, Gan L P, et al. Functional analysis of 30K proteins during silk gland degeneration by a caspase-dependent pathway in *Bombyx* [J]. *Insect Mol Biol*, 2013, 22(3): 273-283
- [17] Liu T, Xing R, Zhou Y F, et al. Hematopoiesis toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(9): 2942-2951
- [18] 殷为民. 无脊椎动物家蚕为材料的肝毒性模型实验动物替代研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015
- [19] Kessler F K, Kessler M R, Auyeung D J, et al. Glucuronidation of acetaminophen catalyzed by multiple rat phenol UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(3): 324-330
- [20] Kon K, Kim J S, Jaeschke H, et al. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2004, 40(5): 1170-1179
- [21] Fang Y, Wang H, Zhu W, et al. Antioxidative capacity in the fat body of *Bombyx mori* is increased following oral administration of 4-methylumbelliferone [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2014, 159: 31-37
- [22] 李端, 殷明. 药理学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1-33