

黄芩苷对牙鲆肝 CYP1A 酶活性及基因表达的影响

韩华^{1,2}, 李健², 李吉涛², 张喆²

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 本研究以中药黄芩苷为受试药物, 研究其在不同剂量和作用时间下对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 肝 CYP1A 酶活性和基因表达的影响。采用体内实验, 将黄芩苷按低 (50 mg/kg · d)、中 (100 mg/kg · d)、高 (200 mg/kg · d) 3 个剂量分别口灌牙鲆, 连续给药, 并分别于给药 3 d、6 d、9 d 后取样, 测定 CYP1A 酶活性。结果表明, 较空白组而言, 给药 3 d, 黄芩苷各剂量组鱼肝中 EROD 酶 (CYP1A 标志酶) 活性没有明显变化 ($P>0.05$); 给药 6 d, 高剂量组的 EROD 酶活性极显著增加 ($P<0.01$), 中剂量组的则显著增加 ($P<0.05$); 给药 9 d, 高、中剂量组的 EROD 酶活性均极显著增加 ($P<0.01$), 低剂量组的 EROD 酶活性显著增加 ($P<0.05$), 且黄芩苷对该酶的诱导作用与剂量和药物作用时间均呈正相关。半定量 RT-PCR 结果表明, 各药物剂量组的 CYP1A 基因表达水平都发生了上调, 且这种表达上调的幅度同 CYP1A 酶的活性一样, 随给药时间和剂量的增加而加强, 提示黄芩苷作为诱导剂对 CYP1A 酶活性的作用机制可能与调控 CYP1A 的转录水平有关。[中国水产科学, 2010, 17 (5): 1121–1127]

关键词: 黄芩苷; 牙鲆; CYP1A; 酶活; 基因表达

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-1121-07

细胞色素 P450 酶 (CYP450) 是混合功能氧化酶系中最重要的一族, 参与众多药物在动物体内的生物转化, CYP1A 是其中主要的一个亚族, 可催化多种药物的代谢, 与许多前致癌物和前毒物的代谢活化有关^[1], 其活性高低可直接影响药物的治疗效果和毒性效应, 同时, 药物、环境污染物等诸多外界因素也可对其活性产生诱导或抑制作用, 影响其活性。鱼类也具有 P450 酶, 水产养殖中所用到的药物在鱼体内的生物转化同样也是通过该酶起作用的, 其中 CYP1A 普遍存在于所检测的鱼类中^[2], 也是鱼类中研究最多的一个家族, 其主要用作生物标志物, 应用于环境毒理学研究中^[3-4], 通过观测环境物质对其活性的影响来指示环境污染, 但是针对于与水产药物直接相关的药理学研究却很少。

黄芩苷 (Baicalin) 是从唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根中提取的一种黄酮类化合物, 是黄芩中的有效成分之一, 具有保肝、利胆、抗菌消炎等多种药理作用^[5]。由于其具有低毒、低污染和不易产生耐药性等优点, 已逐渐应用于水产养殖业中鱼类细菌性疾病的防治。近年来, 国内外开展了黄芩苷对鱼类肝功能及免疫机能方面影响的免疫学研究^[6], 但是对鱼类药物代谢酶 CYP450 的影响及药物相互作用的研究还属空白, 鉴于此, 本研究选取牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 为试验动物, 研究黄芩苷在不同药物剂量及药物作用时间下对 CYP1A 酶活性及基因表达的影响, 旨在探讨黄芩苷对 CYP1A 的影响及作用机制, 以指导水产临床配伍用药, 减少因药物相互作用而导致的药物不良反应, 发挥药物的最大疗效。

收稿日期: 2009-06-05; 修订日期: 2009-11-26.

基金项目: 国家自然科学基金 (30700617); 科技部社会公益研究专项 (2004DIB4JH165); 公益性农业行业科研专项 (nyhyzx07-046).

作者简介: 韩华 (1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物药理学研究. E-mail: hanhua19821229@163.com

通讯作者: 李健, 研究员. Tel: 0532-85830183; E-mail: lijian@ysfri.ac.cn.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康牙鲆购自青岛茂余水产养殖有限公司,体质量(106±6.5)g,饲养于中国水产科学研究院黄海水产研究所鳌山卫实验基地,水温(24±1)℃,充气。实验前暂养2周,每日投喂不含药物的配合饲

料,实验前1天及实验期间停止投喂。

1.1.2 引物 根据已有牙鲆*CYP1A* cDNA序列,以Primer Premier 5.0软件设计特异性扩增引物,用于扩增牙鲆*β-actin*基因(作为内参照基因)的1对引物则参照文献[7](表1)。引物合成和cDNA序列测定均委托上海生工生物工程技术有限公司完成。

表1 牙鲆*CYP1A*以及内参*β-actin*基因cDNA的扩增引物
Tab. 1 Primers used for amplification of *Paralichthys olivaceus CYP1A* and *β-actin* cDNA

cDNA	正向引物(3′-5′) Forward primer(3′-5′)	反向引物(3′-5′) Reverse primer(3′-5′)	预期产物大小/bp Product size
<i>β-actin</i>	F0: TGGCATCACACCTTCTACAAC	R0: CTGCATCTCCTGCTCAAAGTC	429
<i>CYP1A</i>	F1: GCTACGACCACGACGAT	R1: CTCTGGGTAAGCCACAAG	398

1.1.3 药品和试剂 黄芩苷药粉购自青岛胶南市科奥植物制品有限公司,含量≥85%。1-苯基-2-硫脲(PTU)(98%)、7-羟基-3-异吩噻唑酮(Resorufin, RF)、7-乙氧基-3-异吩噻唑酮(Ethoxyresorufin, ERF)购于Sigma公司;乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)、 α -苯甲磺酰氟(PMSF)(99%)、考马斯亮兰均为Amresco产品;1,4-二硫苏糖醇(DTT)(99.5%)为Merck产品,还原型辅酶(NADPHN₄)(≥99.9%)、牛血清白蛋白均为Roche产品;Trizol试剂为Invitrogen公司产品;dNTPs和DNA Marker DL2000为TaKaRa公司产品; *Taq* DNA聚合酶为博日公司产品;oligo-(dT)₁₈和DEPC购自上海生工生物工程公司;RNasin、First Strand cDNA Synthesis Kit(M-MLV)和琼脂糖为Promega公司产品;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 将88尾体质量(106±6.5)g的禁食过夜的暂养牙鲆随机分为4组,分别为对照组、低剂量组(黄芩苷50 mg/kg体质量)、中剂量组(黄芩苷100 mg/kg体质量)、高剂量组(黄芩苷200 mg/kg体质量)。每日口灌给药1次,每次1 mL。对照组则以等体积0.9%生理盐水口灌。连续给药,并于给药3 d、6 d、9 d后将鱼处死,迅速取出肝脏分成两部分,一部分用于肝S₉(肝匀浆液的去线粒体上清液)的制备,以测定酶活,一部分用于提取RNA,并立即放入液氮中保存备用。

1.2.2 肝S₉制备 采用沈钧等^[8]的方法并加以改进,肝组织用4℃的PBS(pH 7.4)缓冲液反复冲洗,尽可能彻底除去血细胞,用滤纸吸去多余液体称重,并按1:5(W/V)的比例加入冰冷的匀浆缓冲液(0.1 mol/L pH 7.4 PBS,含1 mmol/L EDTA-Na₂,1 mmol/L PMSF,1 mmol/L PTU,0.1 mmol/L DTT,15%甘油),将肝脏剪成细小碎块,转入预冷的手动玻璃匀浆器制成匀浆,然后用1层已被PBS缓冲液湿润过的纱布过滤后,将肝匀浆在4℃下用10 000 g离心30 min,上清液用2层已被PBS缓冲液湿润过的纱布过滤,将漂浮的脂类物质除去,即制成S₉,分装于冻存管中,置于液氮中保存备用。

1.2.3 蛋白含量的测定 参照文献[9]的方法稍加改进后进行测定,以系列浓度的牛血清白蛋白为横坐标,OD值为纵坐标,进行线性回归,制备牛血清白蛋白标准曲线并求得牛血清白蛋白线性回归方程。将待测样本稀释20倍,取稀释后样本0.1 mL,其余同标准曲线制备步骤,依据线性回归方程计算待测样本中蛋白含量。

1.2.4 7-乙氧基异吩噻唑酮-脱乙基酶(EROD)活性测定

(1) 7-羟基-3-异吩噻唑酮(RF)标准曲线的制备 用改进的文献[10]方法测定,反应在黑色96孔酶标板中进行,在板中依次加入0 μL、0.15 μL、0.3 μL、0.9 μL、3 μL、6 μL的RF标准液,并用甲醇补充至6 μL,使其终浓度分别为0.012 5 μmol/L、

0.025 $\mu\text{mol/L}$ 、0.075 $\mu\text{mol/L}$ 、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$, 再加入90 μL 的25%甘油-PBS缓冲液、30 μL 的ERF(终浓度为50 mmol/L)、15 μL 的NADPH(终浓度为1 mmol/L), 22 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温孵10 min后, 加入60 μL 的乙腈, 并静置15 min后用荧光酶标仪进行荧光强度的测定, 激发和发射波长分别为535 nm和580 nm, 每个样本均为8个复孔。以系列浓度的RF为横坐标, 荧光强度为纵坐标, 绘制RF标准曲线。

(2) EROD活性测定

用改进的文献[10]方法, 反应体系为: 25%甘油-PBS缓冲液(样品板中90 μL , 空白样板中为105 μL)、 S_9 6 μL 、ERF 30 μL 、NADPH 15 μL (空白样板不加), 22 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温孵10 min后, 加入60 μL 的乙腈, 并静置15 min后用荧光酶标仪进行荧光强度的测定, 每个样本均为8个复孔。根据标准曲线计算RF浓度, 计算EROD活性[$\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$], 以1 mg蛋白在1 min内的RF生成量表示。

1.2.5 RNA的提取和cDNA第一链的合成 称取50 mg肝组织样品放入研钵, 加液氮研磨成粉, 趁液氮尚未挥发完时, 将粉末迅速转至1.5 mL的已加入1 mL Trizol液的离心管中, 并按Trizol试剂说明书提取总RNA, RNA沉淀用DEPC水溶解, 用核酸定量仪测定260 nm和280 nm处的光吸收值, 检测RNA的产量和纯度, 以1 $\times$ MOPS作为电泳缓冲液, 用1%琼脂糖凝胶进行RNA非变性电泳检测RNA的完整性。取等量(2 μg)的RNA, 按照M-MLV说明书反转录肝组织的总RNA, 合成cDNA第一链。

1.2.6 PCR扩增 以1.2.5合成的cDNA为模板, PCR扩增反应总体积为20 μL , 反应体系为10 $\times$ PCR buffer(含15 mmol/L MgCl_2) 2.0 μL , dNTPs(2.5 mmol/L) 1.0 μL , Forward primer(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , Reverse primer(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , cDNA(50 ng/ μL) 1.0 μL , dd H_2O 13.8 μL , *Taq* DNA聚合酶(5 U/ μL) 0.2 μL 。

将样品放入Eppendorf PCR仪中进行PCR扩增, 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 循环条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、59.8 $^{\circ}\text{C}$ (扩增 β -actin为53.1 $^{\circ}\text{C}$) 30 s和72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共28个循环; 最后在72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。扩增完成后, 在

2.0%的琼脂糖凝胶上以120 V恒定电压进行电泳, 采用凝胶成像系统对电泳产物进行拍照。

1.2.7 扩增产物电泳条带的定量分析 通过Quantity One 4.5软件对扩增产物电泳条带进行定量分析。

1.3 统计分析

实验数据通过SPSS13.0软件的ANOVA方法进行显著性分析, 结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示。

2 结果与分析

2.1 酶活的测定结果

2.1.1 标准曲线 以系列浓度的牛血清白蛋白为横坐标, OD_{595} 值为纵坐标, 得标准曲线的线性回归方程为 $Y=0.6088X-0.0022$, $R^2=0.9983$ 。

以荧光强度为纵坐标, RF浓度为横坐标绘制标准曲线, 其线性回归方程为 $Y=1271.5X+268.31$, $R^2=0.9967$ 。

2.1.2 不同黄芩苷剂量及作用时间对牙鲆EROD酶活性的影响 从图1可知, 各药物处理组对EROD酶活性的影响与药物作用时间有关, 其中, 低剂量组的EROD活性随着药物作用时间的延长而缓慢增加, 在给药9 d后显著高于空白组($P<0.05$); 中、高剂量组的EROD活性则持续稳定上升, 其中, 中剂量组在给药6 d后的EROD活性与空白组相比较显著增加($P<0.05$), 9 d的则极显著增加($P<0.01$), 高剂量组在给药6 d和9 d的EROD活性均极显著增加($P<0.01$)。在同一测定时间, 3个黄芩苷给药组的EROD活性由高到低依次为: 高剂量组、中剂量组、低剂量组。给药6 d, 低剂量组、中剂量组、高剂量组活性分别增加了23.57%、65.54%、76.80%; 给药9 d, 低、中、高剂量组活性则分别增加了45.42%、70.59%、89.99%。此结果说明, 黄芩苷对牙鲆EROD酶具有诱导作用, 且这种诱导作用与黄芩苷的剂量及作用时间有关, 呈现剂量-效应和时间-效应关系。

2.2 肝脏中CYP1A基因表达水平

2.2.1 不同黄芩苷剂量及作用时间对牙鲆肝CYP1A mRNA水平的影响 由图2可见, 取等量肝脏组织RNA进行RT-PCR半定量后, 各实验组均有CYP1A

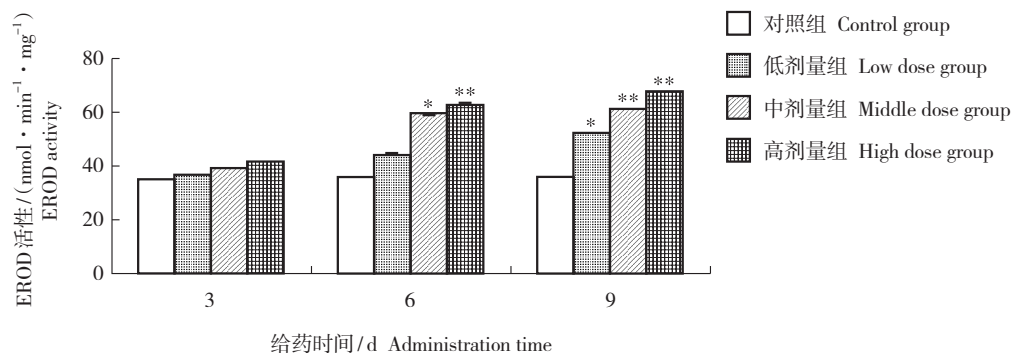


图1 黄芩苷给药剂量和给药时间对牙鲆EROD酶活性的影响

*表示与对照组相比差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$).

Fig. 1 Effects of baicalin dose and administration time on EROD activity in *Paralichthys olivaceus*

*means significant difference compared with control group ($P<0.05$); ** means extremely significant difference compared with control group ($P<0.01$).

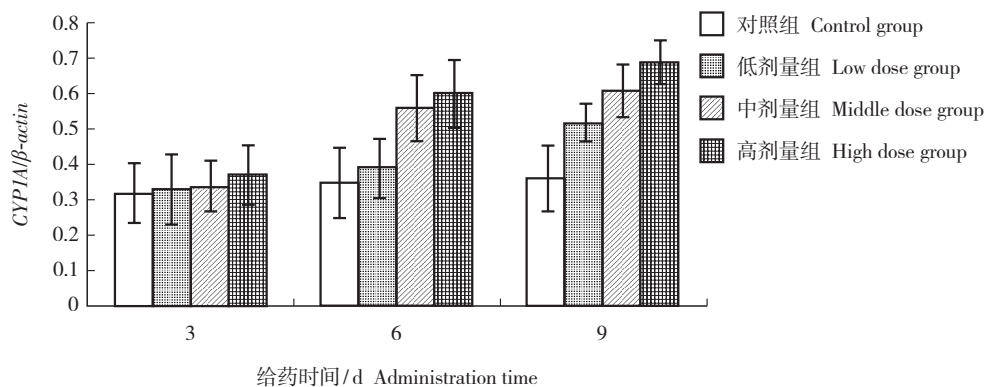


图2 黄芩苷给药剂量与给药时间对牙鲆CYP1A mRNA表达的影响

Fig. 2 Effects of baicalin dose and administration time on relative CYP1A mRNA level in *Paralichthys olivaceus*

mRNA的表达,光密度分析表明,给药3 d时低、中、高剂量组的CYP1A/β-actin比值分别比对照组增加了3.13%、6.25%与12.5%;给药6 d后,低、中、高剂量组的CYP1A/β-actin比值分别比对照组增加了11.43%、60%与71.43%;给药9 d后,低、中、高剂量组的CYP1A/β-actin比值分别比对照组增加了44.44%、69.44%与91.76%,可知黄芩苷各实验组的CYP1A表达水平随用药时间和剂量的增加而升高,这与前面黄芩苷对CYP1A酶(EROD酶)活性的影响结果基本一致。

3 讨论

3.1 中草药对CYP1A酶活性的作用

CYP1A是重要的CYP450酶之一,可催化多种药物的代谢。当今中草药在世界范围推广的同时,越来

越多的临床和药理研究表明,许多中草药(包括其单体成分、代谢物、复方等)可对CYP1A产生诱导或抑制作用,从而引起自身和其他药物的药代动力学的变化。如刺五加(*Acanthopanax senticosus*)、黄芩的黄酮成分汉黄芩素分别对大鼠、小鼠肝CYP1A1和CYP1A2的活性具有抑制作用^[11-12],葛根(*Pueraria lob*)中分离出的葛根素却诱导CYP1A1和CYP1A2的活性^[13],大蒜抑制CYP1A2的作用,降低CYP1A2底物的口服清除率^[14],贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.)提取物则可诱导CYP1A2,从而加速人体茶碱等药物的代谢,降低了常规剂量的治疗效果^[15-16],本研究发现,黄芩苷对牙鲆肝CYP1A具有诱导作用,这与侯艳宁等^[17]在小鼠中的研究结果是基本相符的。

3.2 黄芩苷对牙鲆CYP1A酶活性的影响

中草药对CYP450的作用与药物剂量密切相关^[18]。施畅等^[19]分别用125 mg/(kg·d)、750 mg/(kg·d)、4 500 mg/(kg·d)的复方丹参滴丸连续灌胃处理大鼠5 d后,发现在4 500 mg/(kg·d)的剂量时,对大鼠肝脏CYP2B1/2有轻度诱导作用,而在125 mg/(kg·d)、750 mg/(kg·d)剂量时则无诱导作用;姜蕾^[20]按10 mg/(kg·d)、25 mg/(kg·d)、40 mg/(kg·d)的剂量连续给鲤(*Cyprinus carpio*)注射五倍子(*Galla chinensis*)提取液后发现,五倍子对CYP3A的抑制作用与药物剂量有关,药物剂量越高,抑制作用越大,呈现出明显的剂量-效应关系。本实验在研究黄芩苷对牙鲆CYP1A影响时也发现了这种剂量影响作用的现象,牙鲆连续用药6 d后,黄芩苷对CYP1A的诱导作用由高到低依次为:高剂量组、中剂量组、低剂量组。

有研究表明,中草药的给药次数,也能够显著影响中药对CYP450的诱导或抑制作用,如唐江芳等^[21]观察了五倍子提取液给药3 d、7 d和10 d后对鲫(*Carassius auratus*)肝微粒体CYP3A的影响,发现其对CYP3A的抑制作用可随给药次数的增加而增强,呈时间-效应关系。本实验也发现,黄芩苷对给药3 d、6 d和9 d后的牙鲆的CYP1A的诱导作用也有这种效应关系。另外,本实验中也发现,给药3 d,各剂量组的黄芩苷对牙鲆的各CYP1A酶活性没有明显变化,这可能是由于黄芩苷作为中药,机体对其吸收代谢较慢,发挥药效所需的时间较长有关。

黄芩苷可使CYP1A的标志酶EROD活性升高,说明它们对CYP1A有诱导作用,揭示了当黄芩苷与CYP1A酶的底物药物合用时,很可能发生药物的相互作用,应适当调整用量,避免发生不良反应。由于CYP1A主要参与许多前致癌物和前毒物的代谢活化,而黄芩苷对CYP1A酶的这种诱导作用在一定程度上可能会增加水体中一些前毒物和前致癌物的活化,从而增加这些有害物质对鱼体的损害,所以对鱼类使用黄芩苷时应予以考虑这些因素。

3.3 黄芩苷对牙鲆CYP1A基因表达的影响

研究表明,许多化合物诱导CYP450的机制是以

某种方式激活结构基因,在细胞核内通过DNA的转录而诱导1种特异mRNA,mRNA通过翻译在细胞浆内诱导各种酶蛋白掺入内质网和核膜内,使得新生的CYP450催化底物活性比原来的CYP450强,从而加速对进入体内药物的代谢作用,改变其药理活性,形成水溶性高的代谢产物排出体外^[22]。

目前,关于中草药对CYP1A mRNA表达的影响在哺乳动物中已有报道,如吴宁等^[23]研究了漏芦(*Rhaponticum uniflorum*)对大鼠CYP1A1酶活性及其mRNA水平的影响,指出漏芦抑制大鼠CYP1A1酶活性的机理可能是通过抑制CYP1A1基因表达,减少酶蛋白合成,从而降低酶活性。刘树民等^[24]研究黄药子与当归(*Angelica sinensis*)配伍对大鼠肝脏CYP1A2基因表达的影响,指出黄药子和当归在CYP1A2基因的转录水平发挥作用,提示黄药子可能通过诱导P450酶系的CYP1A2基因表达,导致肝中毒。关于中草药对鱼类的CYP1A的表达影响国内外还未见到相关报道,现有研究主要是环境毒理学领域关于环境污染物对其表达的诱导方面的研究,如,林茂^[25]研究指出, β -萘黄酮可能通过刺激CYP1A的表达,增加细胞中的CYP1A蛋白含量,从而在转录以及转录后水平上影响CYP1A依赖的EROD酶活。本研究则从药理学出发,研究了不同黄芩苷剂量及作用时间对CYP1A表达的调控,发现该药物对牙鲆CYP1A的表达可随剂量及作用时间的增加而增强,呈现出剂量-效应和时间-效应关系,这与前述所得到的CYP1A酶活性随剂量和作用时间的变化趋势是基本一致的,推测黄芩苷对牙鲆CYP1A的诱导机制可能也是通过诱导CYP1A基因表达水平,从而增加蛋白合成升高酶活性。

参考文献:

- [1] 胡云珍,姚彤伟. 细胞色素P4501A的研究进展[J]. 中国药理学杂志,2003,4(38): 246-250.
- [2] Simon C C, Cheryl M G, Guat-Lian K, et al. A comparison of the dose and time response of CYP1A1 mRNA induction in chemically treated Atlantic tomcod from two populations[J]. Aquat Toxicol, 1999,47(1): 43-69.

- [3] Malmström C M, Koponen K, Lindström-Seppä P, et al. Induction and localization of hepatic CYP450 1A in flounder and rainbow trout exposed to benzo [a] pyrene [J]. Ecotoxicol Environ Safety, 2004, 58 (3): 365–372.
- [4] 顾海峰. 海水养殖污染区鱼肝EROD酶活力分析 [J]. 台湾海峡, 2002, 21 (3): 292–295.
- [5] 文敏, 李雪, 付守廷. 黄芩苷药理作用研究新进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25 (2): 158–162.
- [6] 喻运珍, 王小玲. 黄芩甙对草鱼肝功能及免疫机理的影响 [J]. 水利渔业, 2006, 26 (3): 97–98.
- [7] Chen S L, Wang Z J, Xu M Y, et al. Molecular identification and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (Nramp) cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 365–371.
- [8] 沈钧, 徐佩佩, 金锡鹏. 肝脏中细胞色素P450测定方法的改进 [J]. 工业卫生与职业病, 1999, 4 (23): 236–238.
- [9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000, 42–47.
- [10] Kennedy S W, Jones S P. Simultaneous measurement of cytochrome p4501a catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader [J]. Anal Biochem, 1994, 222 (1): 217–223.
- [11] 苗丽娟, 孟宪清. 刺五加对大鼠及人肝微粒体酶CYP450的作用观察 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 1998, 32 (5): 336–338.
- [12] 侯艳宁, 朱秀媛, 程桂芳. 黄芩苷对小鼠肝细胞色素P450及其亚家族的诱导 [J]. 解放军药理学学报, 2000, 16 (2): 68–71.
- [13] Guerra M C, Speroni E, Broccoli M, et al. Comparison between Chinese medical herb pueraria lobata crude extract and its main isoflavone pueraria antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism [J]. Life Sci, 2000, 67: 2997–3006.
- [14] Le Bon A M, Verneva M F, Guenot L, et al. Effects of garlic powders with varying alliin contents on hepatic drug metabolizing enzymes in rats [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51 (26): 7617–7623.
- [15] Ernst E. Second thoughts about the safety of St John's Wort [J]. Lancet, 1999, 354 (9195): 2014.
- [16] Bergquist C, Yue Q Y, Geeden B. Safety of St John's wort [J]. Lancet, 2000, 355 (9023): 547–577.
- [17] 侯艳宁, 朱秀媛, 程桂芳. 黄芩甙对小鼠肝细胞色素P450及其亚家族的诱导 [J]. 解放军药理学学报, 2000, 16 (2): 68–71.
- [18] 王丹, 张振清, 阮金秀. 中药对细胞色素P450诱导或抑制作用的影响因素 [J]. 解放军药理学学报, 2008, 24 (3): 242–244.
- [19] 施畅, 吴纯启, 马华智, 等. 复方丹参滴丸对大鼠肝CYP450酶系诱导作用的研究 [J]. 解放军药理学学报, 2003, 19 (5): 344–346.
- [20] 姜蕾. 五倍子对鲤鱼细胞色素P4503A的影响和药效研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [21] 唐江芳, 郑曙明. 复方抗菌剂对鲫鱼细胞色素P4503A活性的影响 [J]. 水利渔业, 2007, 27 (3): 105–108.
- [22] 陈曙霞, 谢龙山, 钱富荣, 等. 定量RT-PCR检测肝细胞色素P450酶基因与苦参的关系 [J]. 上海第二医科大学学报, 2004, 24 (2): 91–93.
- [23] 吴宁, 李红梅, 吴青青, 等. 漏芦对细胞色素P450酶活性及mRNA表达影响 [J]. 中国公共卫生, 2007, 23 (7): 827–829.
- [24] 刘树民, 张琳, 李颖, 等. 黄药子与当归配伍对大鼠肝脏CYP1A2、CYP2E1基因mRNA表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22 (3–4): 97–98.
- [25] 林茂. 鱼类药物代谢酶体外诱导细胞模型的建立 [D]. 上海: 上海水产大学, 2005.

Effects of baicalin on activity and mRNA expression of CYP1A in liver of flounder, *Paralichthys olivaceus*

HAN Hua^{1,2}, LI Jian², LI Jitao², ZHANG Zhe²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources of the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: This study investigated the effects of baicalin on activity and gene expression of CYP1A in liver of flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish were fed with baicalin at doses of 50 mg/(kg · d) (low dose group), 100 mg/(kg · d) (middle dose group) and 200 mg/(kg · d) (high dose group). Group fed with saline was set as control. EROD (the marker enzyme of CYP1A) activities and gene expression of each group were measured on day 3, day 6 and day 9. Results on enzyme activity showed that the three experimental groups had no obvious change on EROD activities after 3 days compared with control group ($P < 0.05$). On day 6, high dose group had extremely significant increase ($P < 0.01$), while the middle dose group had significant increase ($P < 0.05$) in EROD activity compared with control group. On day 9, EROD activities of high dose group and middle dose group both increased extremely significantly ($P < 0.01$), while that of low dose group increased significantly ($P < 0.05$). Results of semi-quantitative RT-PCR showed that CYP1A expression of all experimental groups was up-regulated, and the up-regulation extent was positively correlated with administration time and the dose of baicalin, which was identical with the result of CYP1A activity. It was indicated that the baicalin as an inducer could stimulate CYP1A expression to increase the protein transcription and the enzyme activity. [Journal of Fishery Sciences of China, 17(5): 1121–1127]

Key words: baicalin; *Paralichthys olivaceus*; CYP1A; enzyme activity; gene expression

Corresponding author: LI Jian. Tel: 0532-85830183; E-mail: lijian@ysfri.ac.cn