

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00720

## 草鱼肾细胞中细胞色素 P450 3A 基因诱导表达及其酶活性分析

符贵红<sup>1</sup>, 杨先乐<sup>1</sup>, 喻文娟<sup>1</sup>, 胡鲲<sup>1</sup>, 章海鑫<sup>1</sup>, 黄宣运<sup>2</sup>

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 农业部渔业动植物病原库, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 农业部水产品质量监督检验测试中心, 上海 200090

**摘要:** 采用基因克隆技术获取草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 细胞色素 P450 3A(CYP3A)cDNA 序列长 1 849 bp, 包含完整开放阅读框(open reading frame, ORF)1 542 bp, 1 个终止密码和含 polyA 信号 3' UTR; ORF 编码 514 个氨基酸, 含信号肽(29 aa), 2 个跨膜螺旋区(23 aa, 23 aa), 血红素结合域(21 aa)和 6 个底物识别位点(SRS1-6); 与其他脊椎动物 CYP3A 氨基酸序列相似度达 60%~92%。用实时定量 PCR 和分光光度计法分别研究了草鱼肾细胞系 (*Ctenopharyngodon idellus* kidney cell line CIK)中利福平(rifampicin, RIF)诱导 CYP3A 基因表达和红霉素-N-脱甲基酶(ERND)活性, 采用红霉素脱甲基酶活性法测定 CYP3A 的活性。结果显示, 诱导组 CIK 细胞中 CYP3A mRNA 表达量在 8 h 最高, 而 CYP3A 酶活在 10 h 最高; CYP3A mRNA 和酶活性与对照组均具显著差异性( $P<0.05$ )。CYP3A 转录水平先于相应酶活变化表达, 且转录水平表达显著高于酶活性, 这很可能反映了 RIF 对 CYP3A 的诱导主要用于转录水平而不直接作用于酶活, 本研究旨在为药物对 CYP3A 转录调控和活性调节提供科学依据, 并为渔药代谢酶的研究提供理论依据。

**关键词:** 细胞色素 P450 3A; 肾细胞; 草鱼; CYP3A 基因和酶活性; 诱导表达; 利福平

**中图分类号:** S941 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2011)04-0720-08

细胞色素 P450 3A(*cytochrome P450 3A*, CYP3A)是药物代谢中最重要且唯一具多个底物识别位点(substrate recognition sites, SRS)的 CYP 亚家族同工酶, 其代谢底物种类繁多, 60%临床药物通过 CYP3A 参与代谢<sup>[1]</sup>。鱼类 CYP3A 活性诱导会导致鱼体内药物相互作用, 从而可能产生渔药残留或影响渔药疗效。药物对 CYP3A 诱导调控主要体现在转录和酶活性这 2 个水平进行<sup>[2]</sup>, 然而, 鱼类对此研究非常少, 特别是缺乏 CYP3A 受到外源物诱导或抑制后其在基因转录和酶活性的相关性研究。

药物对 CYP3A 诱导或抑制效应不仅影响 CYP3A 基因转录而且对 CYP3A 酶催化活性起到

作用。目前, CYP3A 亚型基因结构及功能研究已在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[3]</sup>、底鳉(*Fundulus heteroclitus*)<sup>[4]</sup>和河鲀(*Paraluteres prionurus*)<sup>[5]</sup>等硬骨鱼类中展开。本实验室已建立鱼类 CYP3A 活性体外诱导细胞模型<sup>[6]</sup>, 结果显示, RIF 对 CIK 中 CYP3A 依赖酶 ERND 活性具较好诱导作用, 能建立理想的诱导条件, 是一种较好的诱导剂。因此, 本研究报道了草鱼 CYP3A 基因 cDNA 全长, 并分析了序列主要功能位点; 通过 RIF 对 CYP3A 体外诱导, 研究了时间动态过程中 CYP3A 基因转录和酶活水平变化及相关性。本研究对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)CYP3A 基因特征和酶活性进行研究, 为渔药代谢酶的研究提供理论

收稿日期: 2010-12-07; 修订日期: 2011-01-24.

基金项目: 国家公益性行业专项(nycytx-49-17); 农业部行业专项(200803013).

作者简介: 符贵红(1982-), 女, 博士研究生, 研究方向为水产动物疾病学与药理学. E-mail: snow03221@163.com

通信作者: 杨先乐(1948-), 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物免疫鱼类药理学与渔药检测与监控等研究. E-mail: xlyang@shou.edu.cn

依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

M199 基础培养基和胎牛血清(FBS), 利福平(rifampicin, RIF), 红霉素(erythromycin, ERY), 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), RNA 提取试剂 Trizol Reagent, cDNA 逆转录试剂盒, pMD19-T 载体, PCR 产物纯化试剂盒, SYBR green PCR mix 试剂盒。

### 1.2 *CYP3A* 基因 cDNA 序列克隆

总 RNA 提取按 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)说明书方法进行, 检测后 -80℃ 保存备用。根据 GenBank 中鲮(*Pimephales promelas*, ACA35027.1) 和斑马鱼(NP\_001032515.1)等 *CYP3A* cDNA 序列, 应用 Primer Primer 5.0 软件设计引物(表 1)。按 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)说明书逆转录合成 cDNA 第一链。PCR 扩增, 反应条件: 94℃ 3 min; 30 个循环 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 35 s; 72℃ 延伸 10 min。反应产物经 1.2% 琼脂糖电泳并用试剂盒回收(TaKaRa 公司)纯化, 经克隆检测后, 样品委托上海生工生物工程技术有限公司双向测序, 序列测定仪为美国 ABI 公司 377 型全自动序列分析仪。

### 1.3 序列分析及蛋白质结构预测

将所测 cDNA 序列用 NCBI 网站中 Blastn 软件<sup>[7]</sup>进行同源基因搜索并分析; 通过 Jellyfish 软件推导 ORF 氨基酸序列; 使用 Clustal X 2.0 软件进行氨基酸序列多重同源比较; 用 MEGA 4.0 软

件包中系统发育分析程序以邻接法(neighbor-joining, NJ 法)构建系统发育树, 用 Bootstrap 法进行 1 000 次评估。将推导氨基酸序列利用 SignalP 3.0 在线预测可能的信号肽及切割位点位置。对氨基酸一级和二级结构在 PredictProtein: <http://www.predictprotein.org/> 网站上在线分析, 预测可能的跨膜结构、血红素结合位点和底物识别位点等功能区域分布。

### 1.4 细胞及样品处理

草鱼肾细胞系(CIK, 编号 BYK-C06-02)来自农业部渔业动植物病原库, 以含 10%(v/v)FBS 的 M199 培养基(Gibco BRL (UK) 产品)置 28℃ 培养。48 h 后贴满壁, 加入新鲜 M199 培养基, 0.25% 胰酶消化, 悬浮液分别在 6 孔板中培养, 至密度为  $5 \times 10^5$  个/mL。用无血清 40 μmol/L RIF (Sigma-Akdrich 产品)培养基处理, 对照组用不含药物无血清培养基处理, 分别作用 8 个时间点(1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h), 倒去培养基, 用 D-hanks 缓冲液清洗, 经处理后细胞分别用于 *CYP3A* 酶活性和基因表达检测。

### 1.5 *CYP3A* 基因表达

采用 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)提取样品的 RNA, 并用 PrimeScript<sup>TM</sup> RTase(TaKaRa 公司)合成 cDNA 第一链, Primer 5.0 和 Beacon Designer 7.0 软件设计 *CYP3A* 和内参  $\beta$ -actin 基因的荧光定量引物, 采用 iQ5 Real Time PCR 检测仪(Bio-Rad), 选用 SYBR green PCR mix (TaKaRa 公司)进行 Real-time PCR 扩增, 扩增体系和扩增标准程

表 1 草鱼 *CYP3A* 基因 PCR 扩增引物序列  
Tab. 1 Primer used to amplify the grass carp *CYP3A* gene

扩增 application	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature
cds 引物 CYP3A-F(1)	ATGAGCTACGACCTGTTCT	
CYP3A-R(1)	GTCACAGATGTCGGGAAA	52.2
CYP3A-F(2)	CGTTCAGCGTGGACATCG	
CYP3A-R(2)	CTTTGGGAGCCAGTAGACC	53.0
3' RACE CYP3A-F(3)	GCCTCAATGGTCTACTGG	
CYP3A-R(3)	TCATTTCCATATAAATTTCTTAACAG	50.0
Real time PCR: CYP3A F	GTCCCAACCTTCGTCCTCCA	
Real time PCR: CYP3A R	ATTCATCCCGATGCAAGTTC	60.0
Real time PCR: $\beta$ -actin-F	CTGTATGCCTCTGGTCGT	
Real time PCR: $\beta$ -actin-R	GCTGTAGCCTCTCTCGGT	60.0

序按说明书使用, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 CYP3A mRNA 在 CIK 中各时间点处理的相对表达量。

### 1.6 CYP3A 活性检测

RIF 处理的 CIK 细胞样本, 用 2 mL 含 CYP3A 依赖性底物 400  $\mu\text{mol/L}$  ERY(上海生工生物工程有限公司)的 TMS 缓冲液替代培养液, 置 28 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 1 h 后制成细胞悬液用于酶活性检测。蛋白浓度利用 BCA 法进行测定; 细胞样品中加入 0.35 mL 15% 的硫酸锌, 冰浴 5 min, 然后加入 0.35 mL 饱和氢氧化钡, 静置 5 min 后离心(5 000 r/min, 60 min), 吸取上清液 2 mL 至反应管, 采用 Nash 比色法<sup>[8]</sup>于 413 nm 处紫外分光光度测定吸光值, 根据标准曲线计算甲醛含量。细胞中 CYP3A 依赖酶类(ERND)活性( $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )以每毫克蛋白单位时间内的甲醛生成量表示, CYP3A 活性直接以依赖性酶 ERND 活性进行评价, 每个样品设置 3 个平行。CYP3A mRNA 相对表达量和 CYP3A 酶活性结果采用 SPSS 15.0 软件进行显著性分析, 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; 利用 SigmaPlot 10.0 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 CYP3A 基因 cDNA 序列结构

已获取 CYP3A 基因 cDNA 序列 1 849 bp, (GenBank 登录号: HQ191278), 经 BLAST 分析确定为 CYP3A 基因完整序列。包含完整 ORF 区 1 542 bp, 编码 513 个氨基酸; 3'UTR 区含一个保守的 mRNA 加尾信号序列 AATAAA 及含 23 个碱基的 PolyA 加尾信号。

### 2.2 氨基酸序列和二级结构预测

由 Jellyfish 软件推导的草鱼 CYP3A 氨基酸序列由 514 aa 编码, 经预测 CYP3A 蛋白量为 57.56 kD, 等电点为 6.71。结合 CYP3A 基因二级结构在线分析显示(图 1): CYP3A 是一种膜蛋白, 其蛋白质序列含有 1 个长 29 个 aa 的信号肽序列(1 Met-Thr 29), 切割位点位于 29~30 之间(T-H)。两个跨膜螺旋区均由 23 个 aa 组成(5 Leu-27 Ser; 214 Asp-Met 236)。血红素结合域由 21aa 组成, 其

中草鱼、鲮(*Pimephales promelas*)和斑马鱼(*Danio rerio*)完全相同, 而鲫(*Carassius gibelio*)与草鱼在 Ser 和 Ile 两位点不同; 虹鳟和大西洋鲑(*Salmo salar*)两者序列完全相同, 但与草鱼间保守性降至 76.1%(表 2); 哺乳类间仅存 1~2 个位点差异且与鱼类保守性达 76.1%。6 个底物识别位点(SRS 1~6), 其中, 草鱼 CYP3A 基因血红素结合域和底物识别位点 SRS-1、-2、-4、-5 在硬骨鱼类中保守性高, 而 SRS-3、-6 保守性较低(表 2)。而 CYP3A 蛋白中 SRS-3、-6 序列差异最为明显, 可进一步研究并证实其功能。

### 2.3 CYP3A 氨基酸多重比对及系统发育树

应用 Clustal 2.0 软件对草鱼 CYP3A 基因(*Ctenopharyngodon idellus* HQ191278)与底鳉(*Fundulus heteroclitus* Q9PVE8.2)、鲮(*Pimephales promelas* ACA35027.1)、鲫(*Carassius gibelio* ADF 87312.1)、斑马鱼(*Danio rerio* NP\_001032515.1)、大西洋鲑(*Salmo salar* ACI33861.1)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* O42563.1)、人(*Homo sapiens* NP\_059488.2)、野猪(*Sus scrofa* NP\_999587)及小鼠(*Mus musculus* NP\_031844.1)CYP3A 基因进行多重比对(图 1), 鱼类中各功能区域保守性较高, 与哺乳类中功能区域保守性降低, 物种间氨基酸序列差异可以从基因水平来解释功能的差异性。系统发育树结果显示(图 2), 所有陆生动物共聚为一支, 鱼类共聚为一支, 而草鱼、鲮和鲫鱼则进一步聚在一起。

### 2.4 CIK 中 RIF 处理 CYP3A 基因表达

经 40  $\mu\text{mol/L}$  RIF 诱导的 CIK 细胞样本, 提取总 RNA, 经 Real-time RT-PCR 扩增, 选用管家基因( $\beta$ -actin)对 CYP3A 基因 mRNA 进行相对表达量分析。实验结果表明(图 3-A), 诱导组比对照组 CYP3A mRNA 表达量增高, 经 SPSS 15.0 统计软件中 Paired-Samples *T*-Test 检验样本差异分析。诱导组 CYP3A mRNA 量在 8 h 升至最高, 结果显示其极显著高于其他时间点的表达量( $P < 0.01$ )。

### 2.5 CIK 中 RIF 处理 CYP3A 催化活性(ERND)

经 40  $\mu\text{mol/L}$  RIF 诱导的 CIK 细胞样本均以 400  $\mu\text{mol/L}$  红霉素作用 60 min 后检测 ERND 活性

用于评价 CYP3A 活性, 实验结果表明(图 3-B), 诱导组 CYP3A 比对照组酶活性提高, 经统计学分析, 诱导组具有显著性诱导( $P < 0.05$ ), CYP3A 酶活性在 10 h 升至最高。

**2.6 CIK 中 CYP3A 酶活性与基因表达量相关性分析**  
 经 40  $\mu\text{mol/L}$  RIF 诱导处理 CIK, 分析 CYP3A 酶活性(ERND)和 mRNA 表达量显示 CYP3A 转录

水平在 2 h 诱导量开始提高, 而酶活性在 4 h 开始升高; 当转录水平在 8 h 达最高, 而酶活性在 10 h 达最高。CYP3A 转录水平先于相应酶活 2 h 表达, 且转录水平的诱导表达量明显高于酶活性, 这很可能反映了 RIF 诱导 CYP3A 表达是直接作用于基因的转录水平, 而不直接作用于酶活性, 且在诱导过程中具有一定时间依赖性。

	信号肽 signal peptide	跨膜螺旋 1 transmembrane helices 1
<i>C.idell3A</i>	-MSYGLFFSAETWALLVLFGALLVIYGSWTHSIFPKKLGIAAGPKPIPFPGTMLRYREGHFNFDLECFKKYGRVWGVIYDARQPVLICMDQSIKLTILIKECY	
<i>P.promelas3A126</i>	-...D.....S.LV...L..H.P.RQ.....I.....T.....	
<i>C.gibelio3A37</i>	-.....I..VT..F....P.GV.....P...L.....E..K.....M...N.....L.....V....	
<i>D.rerio3A65</i>	----M.....T..AFLA.....P.RY.....P...A.....KD...V..MD..E...I.....G.....T.....V....	
<i>O.mykiss3A27</i>	M..FLPY.....T..A.LIT.I.V..Y.PYGV.T.M.P...L.Y...E.KK..T...T...Q...I.....G.....K.M...V....	
<i>S.salar3A</i>	M..FLPY.....T..A.LIT.I.V..Y.PYGV.T.M.VP...L.Y...ME.KK..T...T...Q...I.....G.....T...K.M.....	
<i>F.heteroclitus3A30</i>	-G.F-YLT...T..A.VT..LV.AY.PYGT..R...S...V.....H..R..FT..E..K...K.....G.....VT.PE...AV.V...L	
<i>H.sapiens3A4</i>	-ALIPDLAM...L..AVSLV..YL..THIS.GL.....P..T.L..L.NI.S.HK..CM..M..H...K...F..GQ...A.T.PDM...V.V...	
<i>S.scrofa3A29</i>	-DLIPG..T...V..ATSLV..YL..TYS.GL.....P..R.L.Y..NI.G..K.VDH..KK..QQ..KM..V..G...L.AVT.PNM..SV.V...	
<i>M.musculus3A11</i>	-DLVSAL.L...V..AISLV..YR..TRK.EL...Q..P...L..L..V.N.YK.LWK..M..Y...KT..LF.GQT.L.AVT.PET..NV.V...F	
	<b>SRS-1</b>	
<i>C.idell3A</i>	SLFTNRRNFRLNGPLYDAVSIVEDDWRRI RSVLSPSFTSGRLKEMFQIMKAHISKILVENL GKSATRGENVDIKEFFGAYSMDDVTSTAFSVDIDSLNPN	
<i>P.promelas3A126</i>	.....Q...Q.....V.....	
<i>C.gibelio3A37</i>	.....T..HT..D...T...A.E.....	
<i>D.rerio3A65</i>	.....A.....A.....K..H...DSM..T.K...SA.....	
<i>O.mykiss3A27</i>	NI.....H...E.F..L.VA...T.....Q..ST.LSGMK.Q.DKDQTIEV...P.....	
<i>S.salar3A</i>	NI.....H...E.F...VA...T.....Q..AN.LSGMK.Q.DKDQATEL...P.....	
<i>F.heteroclitus3A30</i>	F.....A...Q.K.....E...N..AN.IRSMK.K.DKD.PL.L...S.....	
<i>H.sapiens3A4</i>	V....P.GPV.FMKS.L.A..EE.K.L..L...T...K...VP.IAQYGDV..R..RRE.ET.KP.TL.DV.....I...S.G.N.....	
<i>S.scrofa3A29</i>	V....S.GPL.AMRN.L.LA..EE.K...TL...T...K...P.ISHYGD...S..R.E.EK.KP.TM.DI.....I...G.N.....	
<i>M.musculus3A11</i>	V....D.GPV.IMSK.I..SK..E.K.Y.AL...T...K...PVIEQYGD...KY.RQK.KK.KP.TM.DVL.....I...S.G.NV.....	
	<b>SRS-2 跨膜螺旋 2 SRS-3</b>	
	<b>transmembrane helices 2</b>	
<i>C.idell3A</i>	KDPFVVTNIKMLKSDFLNPLFLISALFPFVIPVLEKMDFALEFPTSVTDFFYAALQKIKSER---VANDHKKRVRDFLQLMVDSQTAGTKQHDEEHTERG	
<i>P.promelas3A126</i>	.....F..S.V...V...T..I...ELGF..I.....---SSEQ.....QG.....	
<i>C.gibelio3A37</i>	.....F...V...V...IT...G..F.....K.....SSEQ.....GS.....	
<i>D.rerio3A65</i>	.....F.L.....LI.F...MA.....D.DTKT..K.NT.....GV.HKS.G.....	
<i>O.mykiss3A27</i>	S...S.V...F.LF...LV...TG.I...K.SF...A.....S.A...G...DTGNSTN.....I...KGSD.KTG..Q..-	
<i>S.salar3A</i>	S...S.V...F.LF...LV...TG.I...K.SF...A.....S.A...G...DTGNSTN.....I...KGSD.KTG..Q..-	
<i>F.heteroclitus3A30</i>	S.....F.....AV.F...LG.I...FELSF..K.....S.E...N...EASQQ.S.....I...KNS---GAQQD-.S	
<i>H.sapiens3A4</i>	Q...E.T..L.RF...D.F..SITV...L..I..VLN CV..RE..N.LRKSVKRM.ES.---LE.TQ.H.....I...N-S.---TESH.A	
<i>S.scrofa3A29</i>	Q...E.S..L..FS.FD.FL.SLIF...LT.IF.VLN T...K.SVN..TKSVKRM.ES.---LT.QQ.R...L...IN..N-S.---MDPH.S	
<i>M.musculus3A11</i>	E...EKA..L.RF..FD..LFSVV...LT..Y.MLN CM..KDSIE..KKFVDRM.ES.---LDSKQ.H.....MN.HNNS.---DKVSH.A	
	<b>SRS-4 SRS-5</b>	
<i>C.idell3A</i>	LSDHEILSQSMIFIFAGYETSSSTLMFFFFYNLATNPETMKKLQEEIDETFPDKAPVDYEAVMNM DYLDAALNESLRLYPVAARLERVCKKTVDINGLIIP	
<i>P.promelas3A126</i>	.....A.....S.....A.....V.....N.....F.....E..V...	
<i>C.gibelio3A37</i>	.....G.....S.....H..A.E...G...QS.SRED...GI..E.....F..IV.....LV.	
<i>D.rerio3A65</i>	.....S.L.....NQ...TL.S.....S...F.....E...L..	
<i>O.mykiss3A27</i>	.T.....A.....MS.LA.....HHIV.T.....TV..N..IQ..L.Q...CV.....I.P...A...E...IV..	
<i>S.salar3A</i>	.T.....A.....MS.LA.....HV.A.....TV..N..IQ..L.Q...CV.....I.P...A...E...IV..	
<i>F.heteroclitus3A30</i>	.T.....S.T.LA.....V.....A...N...H.QPL.E.E..CVI...F..I.....A.AA.E...VV..	
<i>H.sapiens3A4</i>	...L.LVA..I.....T..V.S.IM.E...H.DVQQ...AVL.N...PT.DT.LQ.E...MVV..T...F..I.M.....D.E.H.MF..	
<i>S.scrofa3A29</i>	..NE.LVA.GI.....T..A.SLLA.E...H.DVQQ...EA..N...PT.D.LAQ.E...MVV..T...I.....A...D.E.H.VFV..	
<i>M.musculus3A11</i>	..M..TA..I.....T...S.TLHS...H.DIQ...D...AL.N...PT.DT..E.E...MV...T...I.N.....D.E.L..VY..	

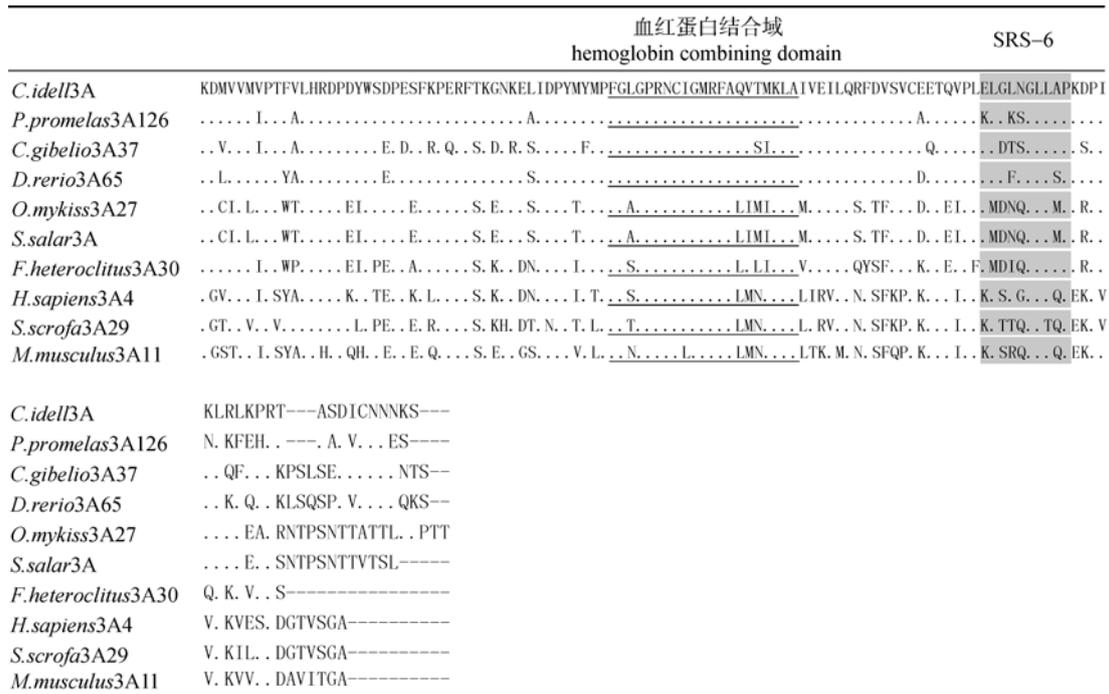


图 1 草鱼预测氨基酸序列与其他物种 CYP3A 基因用 CLUSTAL-W 法同源比较

“.”表示相同氨基酸，“~”表示预测的信号肽序列，斜体字母表示预测跨膜螺旋区域，阴影部分表示底物识别位点，“—”表示血红素结合域。

Fig.1 Sequence alignment of CYP3A with other vertebrate CYP3A members by the CLUSTAL-W method  
The consensus amino acids are indicated by “-”. The predicted signal peptide indicated as “~”. The transmembrane helices region were indicated in italics The putative substrate recognition sites SRS1-6 were in shadows. The heme binding domain(HBD) were showed with “—”.

表 2 鱼类和脊椎动物 CYP3A 成员在底物识别位点和血红素结合域序列比对

Tab.2 Sequence comparison between CYP3A in fish and other vertebrate CYP3A members at substrate recognition sites (SRS1-6) and heme binding domain (HBD)

区域 domain	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	野猪 <i>Sus scrofa</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>
	3A	3A4	3A29	3A11
SRS-1	100(102-123) <sup>a</sup>	52.1	43.4	47.8
SRS-2	100(201-211) <sup>a</sup>	50.0	50.0	37.5
SRS-3	100(238-243) <sup>a</sup>	28.5	57.1	28.5
SRS-4	100(300-318) <sup>a</sup>	73.6	68.4	78.9
SRS-5	100(347-382) <sup>a</sup>	77.7	77.7	77.7
SRS-6	100(482-491) <sup>a</sup>	60.0	40.0	50.0
HBD	100(441-461) <sup>a</sup>	80.9	80.9	76.1

注：每组数字表示与草鱼 CYP3A 序列比较后百分比；<sup>a</sup>表示 CYP3A 氨基酸位点。

Note: Percentage of identity comparing with sequence of *Ctenopharyngodon idellus* CYP3A; <sup>a</sup> Represent the residues in CYP3A.

### 3 讨论

#### 3.1 CYP3A 基因结构及活性位点分析

SRS 位点被认为参与底物识别和酶催化活性<sup>[9-10]</sup>，而 SRS 位点发生氨基酸替代可使 CYP3A 底物特异性发生变化<sup>[11]</sup>，分析了硬骨鱼类 CYP3A

成员的催化活性不同于其他脊椎动物可能是受到 SRS 位点保守性影响。鱼类和哺乳类底物识别的功能差异首先体现在，硬骨鱼类 CYP3A 基因底物识别位点(SRS-1, -3, -6)与其他物种保守性较低，由此推断鱼类和哺乳类间功能差异的分子基础原

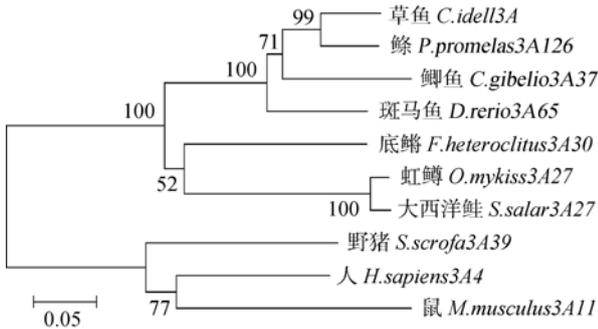


图 2 草鱼和其他鱼类、物种的 CYP3A 系统发育树  
Fig.2 Construction of Phylogenetic tree based on CYP3A amino acids in grass carp and other species

因可能是序列保守性低; 而 SRS-4 保守性高于 68%, 可由 SRS-4 是反应机制中重要保守区且是与底物结合相连的部分来解释<sup>[12]</sup>。其次, SRS-5 为主要活性位点, 在硬骨鱼类和哺乳类间保守性达 77.7%~100%。鱼类 CYP3A 可能由于这些高度保守位点使其保留了哺乳类 CYP3A 蛋白原始结构, 最终使鱼类和哺乳类 CYP3A 功能进化趋势大致相同。最后, SRS-3 和 SRS-6 是 CYP3A 蛋白中在各物种间差异显著的区域, 是影响各物种 CYP3A 底物特异性和酶活性差异的主要结构位点, 因此, 其功能值得更深层次研究和探索。CYP450 为整合膜蛋白, 分析了 CYP3A 两个主要

跨膜螺旋结构域, 其跨膜螺旋与 SRS 区域共同参与底物结合, 与底物特异性密切相关。血红素结合位点经序列分析在各物种间保守性高, 可解释为其功能差异不明显主要参与氧化还原作用。

### 3.2 CYP3A 基因诱导与酶活性分析

渔药代谢酶 CYP3A 代谢谱非常广<sup>[13]</sup>, 大量已用或新用渔药由 CYP3A 参与代谢<sup>[14-15]</sup>, 且 CYP3A 转录表达和催化活性易外源物诱导和抑制, 导致 CYP3A 活性变化直接影响药物治疗效果和毒性反应。CYP450 活性及表达受药物种类、研究物种和性别差异等因素影响, 而外源物对 CYP450 影响体现在编码 CYP450 蛋白的 mRNA<sup>[2]</sup>、CYP450 蛋白浓度<sup>[16]</sup>和酶催化活性<sup>[17]</sup>。鱼类研究着重于诱导剂对 CYP3A 酶活性影响<sup>[18]</sup>和 CYP3A 活性诱导后导致的药物间相互作用, 而药物诱导 CYP3A 不同水平的机理及相关性研究甚少。哺乳类中如仔鸡用探针法检测喹诺酮类药物对 CYP450 抑制效应, 表现为 CYP1A 和 CYP3A 蛋白表达下调, 而 CYP1A4 和 CYP3A37 mRNA 表达不受影响, 显示喹诺酮类药物在鸡体内不是通过 CYP450 酶转录水平, 而是转录后翻译来影响 CYP450 表达<sup>[19]</sup>。人肝细胞通过 IL-6 处理检测是否能抑制 CYP450 酶表达, 结果显示 IL-6 抑制

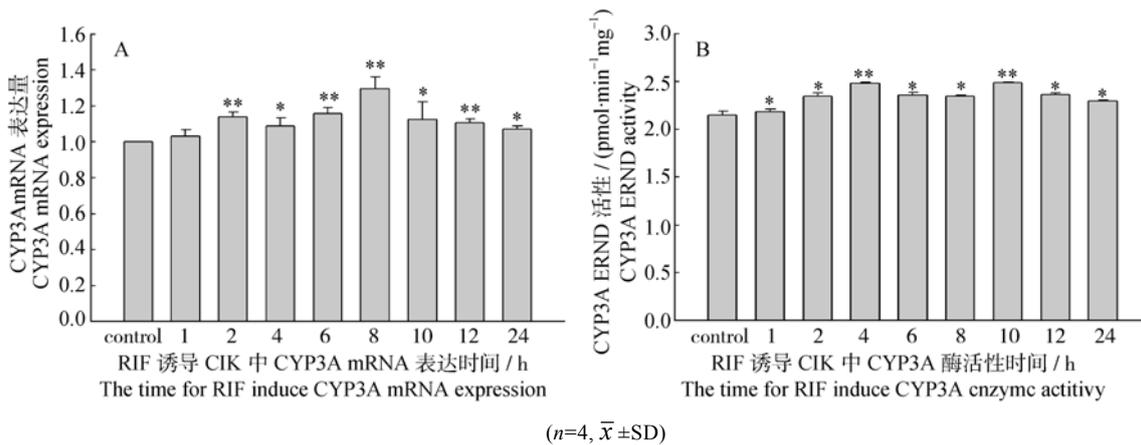


图 3 RIF 诱导 CIK 中 CYP3A mRNA 表达量和 CYP3A ERND 活性

3-A: RIF 诱导 CIK 中 8 个时间点 CYP3A mRNA 表达量; 3-B: RIF 诱导 CIK 中 8 个时间点 CYP3A ERND 活性. 利用 SigmaPlot 10.0 软件作图分析, 实验组与对照组相比具显著差异性(\* $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ).

Fig.3 CYP3A mRNA expression and CYP3A ERND activity induced by RIF in CIK

A: CYP3A mRNA expression induced by RIF with 8 time-point.B: The activity of CYP3A ERND induced by RIF in CIK with. Analysis using SigmaPlot 10.0 software, the test compared with the control indicated that significant differences (single asterisk:  $P < 0.05$ ; double asterisk:  $P < 0.01$ ).

CYP3A4 mRNA 和蛋白表达量来降低药物代谢, 而酶活性影响小, 分析可能是 CYP3A mRNA 转录受到抑制或 CYP3A4 mRNA 降解性增强而导致 CYP3A4 蛋白表达受抑制<sup>[20]</sup>。而本研究结果显示 CIK 中 CYP3A 经 RIF 诱导, 其转录和酶活性均被诱导, 但 RIF 对 CYP3A 诱导主要体现在转录水平, 即 CYP3A 基因水平的上调趋势明显高于酶活性变化, 主要是通过诱导 CYP3A 转录水平变化达到酶活性增强的效果。

#### 参考文献:

- [1] Li A P, Kaminski D L, Rasmussen A. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4 [J]. *Toxicology*, 1995, 104: 1-8.
- [2] Courtenay S, Grunwald C, Kreamer G, et al. Induction and clearance of cytochrome P4501A mRNA in Atlantic tomcod caged in bleached kraft mill effluent in the Miramichi River [J]. *Aquat Toxicol*, 1993, 27: 225-244.
- [3] Lee S J, Buhler D R. Cloning, tissue distribution, and functional studies of a new cytochrome P450 3A subfamily member, CYP3A45, from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal ceca [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 412: 77-89.
- [4] McArthur A G, Hegelund T, Cox R L, et al. Phylogenetic analysis of the cytochrome P4503 (CYP3) gene family [J]. *J Mol Evol*, 2003, 57: 200-211.
- [5] Nelson D R. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 409: 18-24.
- [6] Li D, Yang X L, Zhang S J. 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 Physiol*, 2008, 147 C: 17-29.
- [7] Altschul S F, Thomas L M, Alejandro A, et al. Gapped BLAST and PSI-LAST: a new generation of protein database search program [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25: 3389-3402.
- [8] Nash. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction [J]. *Biochemistry*, 1953, 55: 416-426.
- [9] Roussel F, Khan K K, Halpert J R, et al. The importance of SRS-I residues in catalytic specificity of human cytochrome P450 3A4 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 374: 269-278.
- [10] Xue L, Zgoda V G, Arison B, et al. Structure-function relationships of rat liver CYP3A9 to its human liver orthologs: site-directed active site mutagenesis to a progesterone dihydroxylase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 409: 113-126.
- [11] Kullman S W, Hamm J T, Hinton D E, et al. Identification and characterization of a cDNA encoding cytochrome P450 3A from the fresh water teleost medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 380: 29-38.
- [12] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 11-13.
- [13] Tseng H P, Hseu T H, Buhler D R, et al. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 205: 247-258.
- [14] Kashiwada S, Kameshiro M, Tatsuta H, et al. Estrogenic modulation of CYP3A38, CYP3A40, and CYP19 in mature male medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 145C: 370-378.
- [15] Vaccaro E, Giorgi M, Longo V, et al. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, 62: 27-33.
- [16] Giorgi M, Marini S, Longo V, et al. Cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and their inducibility by classic P450 inducers in the liver, kidney, and nasal mucosa of male adult ring-necked pheasants [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 167: 237-245.
- [17] Martel PH, Kovacs TG, O'Connor BI, et al. A survey of pulp and paper effluents for their potential to induce mixed function oxidase enzyme activity in fish [J]. *Water Res*, 1994, 28: 1835-1844.
- [18] 李聘, 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.
- [19] Zhang L L, Zhang J R, Guo K, et al. Effects of fluoroquinolones on CYP4501A and 3A in male broilers [J]. *Res Vet Sci*, 2010.
- [20] Yang J, Hao DF. Pregnane X receptor is required for interleukin-6-mediated down-regulation of cytochrome P450 3A4 in human hepatocytes [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 197: 219-226.

## Induction of CYP3A gene and enzyme activity expression in kidney cell of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

FU Guihong<sup>1</sup>, YANG Xianle<sup>1</sup>, YU Wenjuan<sup>1</sup>, HU Kun<sup>1</sup>, ZHANG Haixin<sup>1</sup>, HUANG Xuanyun<sup>2</sup>

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, State Collection Centre of Aquatic Pathogen, Shanghai 201306, China;

2. Laboratory of Fishery Environments and Aquatic Products Processing, East China Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

**Abstract:** Cytochrome P450 3A (CYP3A) is the major cytochrome P450 responsible for the metabolism of endogenous and xenobiotic substrates. Unexpected drug–drug interactions in fish are generally associated with the induction of CYP3A activity, and can lead to the formation of drug residues, which threaten the safety of fishery products. We determined the *in vitro* effects of rifampicin (RIF) on CYP3A mRNA expression and enzyme activity in a freshwater teleost, the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Recently, a number of CYP3A genes have been isolated from several teleost species. Although CYP3A genes in fish contain multiple paralogs differing in gene expression pattern and tissue distribution, CYP3A enzymes exhibit similar catalytic properties because of their structural similarities. The CYP3A gene and its full-length cDNA of 1 849 bp were cloned from grass carp by RT-PCR. The CYP3A gene has an open reading frame (ORF) of 1 542 bp, a stop codon, a 3'-untranslated regions (3' UTR), and a polyA signal is present in the 3'UTR region. The ORF encodes a 513 amino acid (aa) protein, which has a signal peptide (29aa), two transmembrane helices (23aa and 23aa), a heme binding domain (HBD, 21aa), and six substrate recognition sites (SRS1-6). Multiple alignments showed that the CYP3A amino acid sequence from grass carp is 60% to 92% similar to other vertebrate CYP3As. CYP3A gene expression after induction by RIF in grass carp kidney cells (CIK) was assayed by quantitative real-time PCR. CYP3A-dependent erythromycin N-demethylase (ERND) activity was determined by spectrophotometry, and CYP3A activity was assessed by measuring the formation of formaldehyde. In the induced group, CYP3A mRNA expression reached a plateau at 8h, while the highest level of CYP3A activity occurred at 10h. The results indicated that CYP3A mRNA expression and enzyme activity were significantly higher than in the control group ( $P<0.05$ ). The highest level of CYP3A mRNA expression appeared 2 hours before the maximum of enzyme activity. In addition, the transcription of level CYP3A was apparently higher than the enzyme activity, implying that induction by RIF affected enzyme activity by transcriptional regulation of the CYP3A gene.

**Key words:** cytochrome P450; kidney cell; Chinese idle (CIK); CYP3A; rifampicin; RIF

**Corresponding author:** YANG Xianle. E-mail: xlyang@shou.edu.cn