

草鱼体外培养细胞中 β -萘黄酮对CYP1A基因表达的诱导

林茂^{1,2*}, 杨先乐², 纪荣兴¹

(1.集美大学水产学院,福建厦门 361021;

2.上海海洋大学农业部渔业动植物病原库,上海 201306)

摘要: 为了建立以CYP1A cDNA为探针的水环境毒理学细胞模型,以 β -萘黄酮(BNF)作为诱导剂,通过半定量PCR技术研究CYP1A在草鱼不同细胞系及其对应组织中的诱导表达情况。在半定量PCR反应参数研究中,对关键的退火温度和循环次数进行了优化,结果显示退火温度为57℃,循环次数为30次较为合适,该条件下Gauss迹量的CYP1A/ACT比值能更准确的反映CYP1A的表达水平。对照组和诱导组草鱼细胞中ACT和CYP1A cDNA扩增结果表明,细胞中CYP1A的基础表达量较低,而BNF诱导使GCL、CIK和CO细胞中CYP1A的表达水平得到显著的提高。GCL、CIK和CO细胞三者之间诱导后CYP1A的表达水平有显著差异($P < 0.05$),诱导表达量大小顺序为GCL > CIK > CO。草鱼细胞系的相应组织中ACT和CYP1A cDNA扩增以及电泳的结果与细胞中较为相似,组织中CYP1A诱导表达量大小顺序也与相应的细胞相同:肝 > 肾 > 卵巢。比较分析的结果表明,CYP1A在体内与体外的诱导表达水平具有一定的相关性。

关键词: 草鱼; 细胞; CYP1A; cDNA; 诱导

中图分类号: Q 786; S 917

文献标识码: A

细胞色素P450酶系(cytochrome P450,简称CYP或P450)是参与药物与环境等化学物质体内生物转化的主要药物代谢酶,CYP1A则属于CYP超家族中非常重要的一个亚家族,它已成为水环境毒理学研究领域的一个热点。CYP1A主要参与多环芳香烃(PAHs)和芳香胺类化合物的代谢,在正常鱼体组织中的浓度很低,但在某些外来化学物质特别是PAHs的诱导下,它的活性异常增高。进一步研究发现,这主要是由于CYP1A基因的表达被PAHs等诱导剂高度诱导,其表达水平以几何级数增加。正因如此,鱼类CYP1A基因的表达水平已被作为水体环境中特定污染物的监测指标^[1-4]。CYP1A诱导情况的评价可以通过多种方法实现,在酶活水平可以检测乙氧异吩噻唑酮-O-脱乙基酶(EROD)活性的变化^[3-5],在蛋白水平可以利用免疫组化、ELISA和Western印迹等手段^[1,6],

在mRNA水平可以采用狭孔印迹、Northern或者定量PCR(quantitative PCR, Q-PCR)等技术^[7-12]。在这些方法中定量PCR技术最为敏感,目前已被大量运用于鲑鳟等鱼类的药酶诱导研究中^[8-11]。

定量PCR分外标法和内标法,内标法包括竞争性和非竞争性PCR等。非竞争性PCR也称为半定量PCR,它是通过目的基因与内参物PCR产物的相对比值来定量。本实验采用 β -肌动蛋白(β -actin, ACT)基因作为定量PCR的内参物,在对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)CYP1A和ACT cDNA片段分别克隆和鉴定基础之上^[12],通过半定量PCR技术研究CYP1A基因在草鱼不同细胞中的基础和诱导表达情况,并与细胞相应的来源组织进行比较,从而为进一步建立以CYP1A cDNA为探针的水环境毒理学细胞模型奠定基础。

收稿日期:2010-02-07 修回日期:2010-03-25

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(NYCYTX-49-17);国家自然科学基金项目(30371109)

通讯作者:林茂, E-mail: linmao@jmu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品, DNA Marker DL2000 为 TaKaRa 公司产品, *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、RNasin、DEPC 和 MOPS 等购自上海鼎国公司, First Strand cDNA Synthesis Kit (MMLV) 为 Promega 公司产品, β -萘黄酮 (BNF) 为 Fluka 公司产品。

1.2 细胞系的诱导

实验用草鱼肝细胞 GCL、肾细胞 CIK、囊胚细胞 GCB、吻端成纤维细胞 PSF、卵巢细胞 CO 等均为农业部渔业动植物病原库 (APCCMA) 保藏物。培养基为 90% M199 + 10% NBS, 培养条件为 28 °C、5% CO₂。各细胞系和囊胚分别以 5 μ mol/L BNF (溶解于 0.01% DMSO) 诱导 72 h 后^[4], 检测 *CYP1A* 的表达水平, 设 3 个重复, 以溶剂处理为空白对照组。

1.3 鱼体内的诱导

草鱼在连续 3 d 的时间内每天腹腔注射 5 mg/kg 体重的 BNF (以玉米油溶解) 后^[13], 提取与上述细胞系相对应的来源组织的总 RNA, 检测 *CYP1A* 的表达水平, 设 3 个重复, 以溶剂处理为空白对照组。

1.4 引物设计

以 Primer Premier 5.0 软件设计 *CYP1A* 和 *ACT* cDNA 片段的特异性扩增引物^[12], 其中 *CYP1A* 的上游引物为 5'-ACAACATCCGAGAC-ATCACA-3', 下游引物为 5'-TTCCACAGTTCTGGGTCA-3'; *ACT* 的上游引物为 5'-TCGGTATGGGACAGAAGG-3', 下游引物为 5'-GTCAGCAATGCCAGGGTA-3'。引物由上海华冠生物公司合成。

1.5 总 RNA 的提取

采用 Trizol 法^[12] 提取草鱼肝组织总 RNA, 通过紫外分光光度计测 260 nm 和 280 nm 处的吸收

值, 检测 RNA 的产量和纯度。

1.6 cDNA 的扩增与电泳

根据 MMLV 产品说明书合成 cDNA 第一链, 以此为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积 25 μ L, 包含 100 ng cDNA 模板, 200 ng PCR 引物, 1U *Taq* DNA 聚合酶, 200 μ mol/L dNTPs 等。PCR 反应在 Eppendorf PCR 仪上进行, 首先 94 °C 预变性 2 min, 之后以 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min 的程序循环 35 次, 最后 72 °C 再延伸 10 min。以上扩增完成后, 取 5 μ L 反应产物, 在 1% 的琼脂糖凝胶上以 4 V/cm 恒定电压进行电泳检测。

1.7 扩增产物电泳条带的定量分析

利用 Quantity One 4.5 软件对扩增产物电泳条带进行定量分析, 以 Gauss 建模的光密度分布曲线下面积 (Gauss 迹量) 分别表示条带中 *CYP1A* 和 *ACT* cDNA 的相对含量, 再通过 *CYP1A/ACT* 的比值对 *CYP1A* 的表达水平进行相对定量。不同细胞或组织中 *CYP1A* 相对表达量利用 SPSS 11.5 软件进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 半定量 PCR 条件优化

分别以特异性引物扩增可得到预期大小的草鱼 *CYP1A* (439 bp) 和 *ACT* (800 bp) cDNA 片断, 对这两个 cDNA 序列分别进行克隆和鉴定^[12], 并提交 GenBank 获得登录号 DQ211095 和 DQ211096。在此基础上对半定量 PCR 条件进行优化, 实验结果表明, 退火温度为 57 °C 较为合适, 该条件下扩增产物的电泳条带清晰、明亮 (图 1); PCR 循环次数则以 30 个循环为宜, 此时 *CYP1A* 和 *ACT* 均处于指数扩增期, 而 35 个循环时二者扩增产物已处于饱和状态, 扩增平台的出现使目的序列对内参物的 PCR 产物的比值与初始数目不再成比例, *CYP1A/ACT* 的 Gauss 迹量比值也就不能准确反映 *CYP1A* 的表达水平 (图 2)。

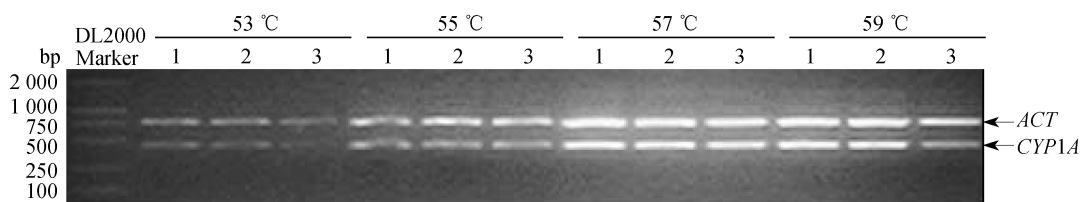
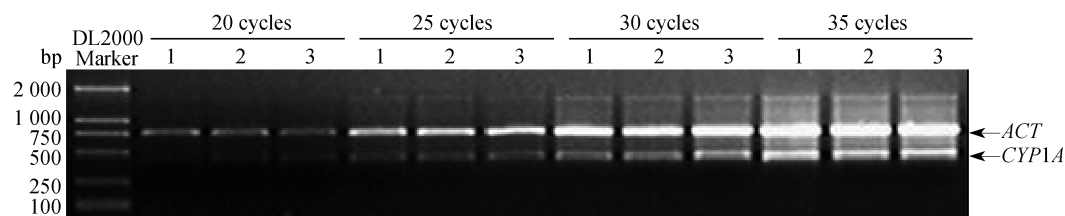


图 1 不同退火温度下草鱼 *CYP1A* 和 *ACT* cDNA 的扩增产物

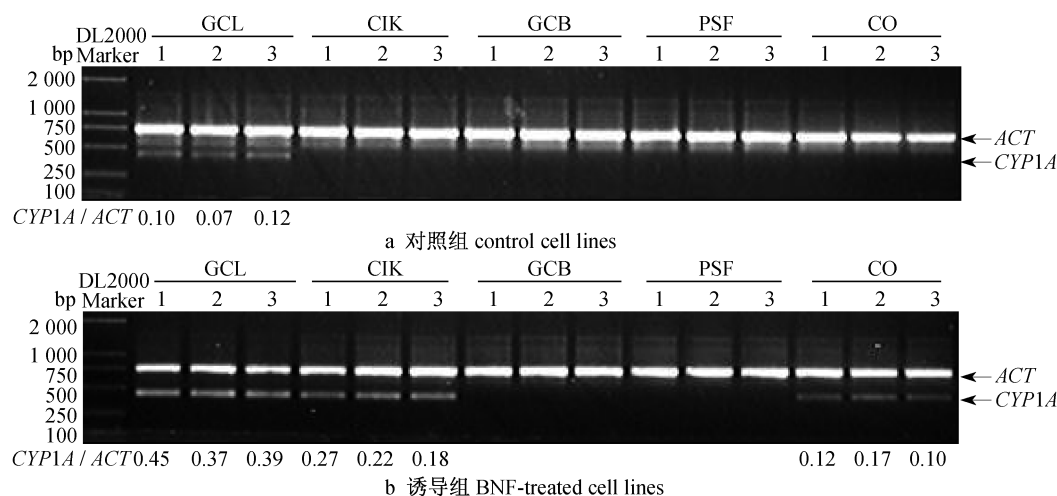
Fig. 1 Amplification product of *CYP1A* and *ACT* cDNA annealing at different temperature

图2 不同 PCR 循环次数扩增的草鱼 *CYP1A* 和 *ACT* cDNA 扩增产物Fig.2 Amplification product of *CYP1A* and *ACT* cDNA after different PCR cycles

2.2 草鱼不同细胞系中 *CYP1A* 基因的基础和诱导表达

草鱼各细胞系中 *CYP1A* 和 *ACT* cDNA 扩增结果表明,不论是对照组还是诱导组,*ACT* 在不同细胞中的表达均较为恒定,而 *CYP1A* 在不同细胞中基础和诱导表达的水平均有所不同(图3)。*CYP1A* 在对照组 CIK、GCB、PSF 和 CO 细胞中的

表达量太低以至无法检测,但经过诱导后 CIK 和 CO 细胞扩增产物的电泳图谱均有明显的条带出现。GCL 细胞中 *CYP1A* 基础表达水平较高,而 BNF 诱导后表达量极显著提高 ($P < 0.01$),为基础水平的 4.17 倍。GCL、CIK 和 CO 细胞诱导后 *CYP1A* 的表达水平三者之间有显著差异 ($P < 0.05$),诱导表达量大小顺序为 $GCL > CIK > CO$ 。

图3 对照组和 BNF 诱导组草鱼细胞系中 *CYP1A* 和 *ACT* cDNA 的扩增产物Fig.3 Amplification product of *CYP1A* and *ACT* cDNA from control and BNF-treated grass carp cell lines

2.3 草鱼不同组织中 *CYP1A* 基因的基础和诱导表达

选取上述草鱼细胞系的相应组织,比较研究 *CYP1A* 在体外培养细胞与组织中的表达差异,结果表明,各组织中 *CYP1A* 和 *ACT* cDNA 扩增以及电泳的结果与细胞中较为相似,对照组中各组织 *CYP1A* 的基础表达量也很低,而在诱导组肝、肾、卵巢等组织中 *CYP1A* 的表达量均得到了明显的提高,组织中 *CYP1A* 诱导表达量大小顺序与相应的细胞相同:肝 > 肾 > 卵巢(图4)。定量分析结果表明,*CYP1A* 在体内与体外的表达水平具有一定的相关性。

3 讨论

自从 Elcombe 等^[14] 率先报道虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝 CYP 依赖型单加氧酶的诱导和鉴定,就有较多研究表明苯巴比妥、多氯联苯、苯并芘、萘黄酮、二噁英、多氯氧芴、3-甲基胆蒽等芳香烃化合物能诱导鱼类 CYP 相关的单加氧酶活性^[1-20]。PAHs 化合物如 β -萘黄酮对 *CYP1A* 基因表达和酶活性的诱导能力极强,而研究表明化学物质对 *CYP1A* 的诱导能力越大,则往往意味着具有更大的生态毒性,这也使得 *CYP1A* 表达量可以作为评价环境污染物的生物标记^[15]。

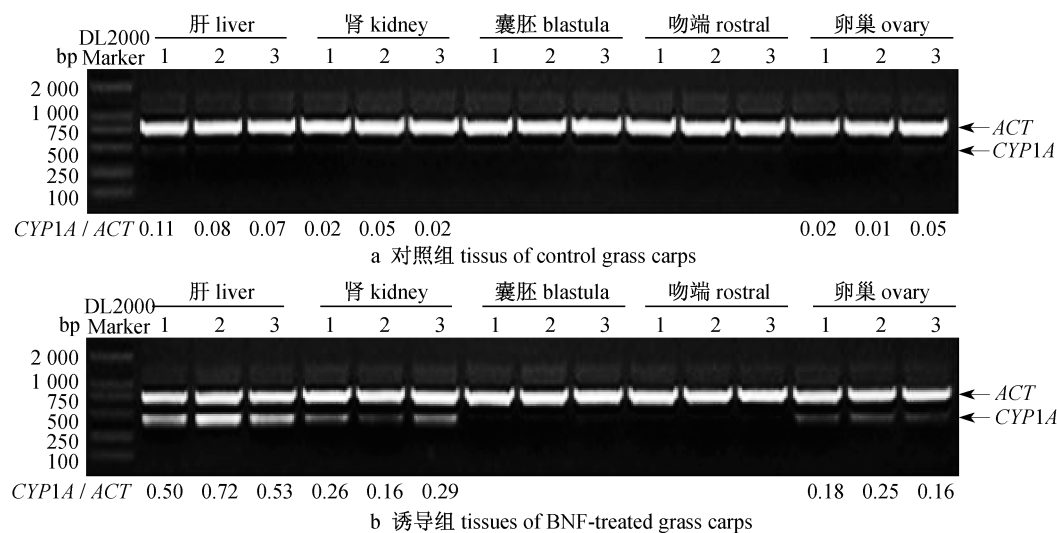


图4 对照组和BNF诱导组草鱼组织中CYP1A和ACT cDNA的扩增产物

Fig. 4 Amplification product of CYP1A and ACT cDNA from control and BNF-treated grass carp tissues

CYP1A 被 PAHs 化合物诱导的机制主要是诱导剂与细胞内的芳香烃受体 (AhR) 结合, 刺激 mRNA 的转录, 从而使粗面内质网内 CYP 含量增加或活性增强^[6]。笔者对草鱼 GCL、CIK 和 CO 细胞的 CYP 含量和 EROD 酶活检测的结果表明(文中未列)^[12], BNF 诱导 CYP1A 基因表达量升高的同时, 也导致了 CYP 的相对含量以及 CYP1A 依赖的 EROD 酶活性在不同程度上相应的提高, 这也侧面印证了 PAHs 等化合物诱导的机制。

许多文献报道表明鱼类肝、肾、鳃等组织中 CYP 含量或酶活较高, 而另外一些证据表明来源于这些组织的原代或建系细胞的 CYP 含量和酶活与之有一定的相关性^[15-17], 本文的研究结果也显示草鱼细胞系 CYP1A 基因的基础和诱导表达与来源组织均具有一定程度的相关性。国内外对鱼类 CYP 基因和酶活性研究以体内试验居多^[1-3, 7-10], 但是目前, 鱼类细胞也已开始作为毒理学研究和环境污染物评估的一种有效工具^[4, 5, 15-20]。Sadar 等^[11]以虹鳟原代培养的肝细胞研究了苯巴比妥对 CYP1A 的诱导情况, Pesonen 等^[17]则进一步比较了幼鳟原代肝细胞和卵黄囊鱼苗中多氯萘对 CYP1A 酶活性的调控, 万小琼等^[18]也利用原代培养的草鱼肝细胞对环境剧毒物质二噁英的毒性效应进行了评价。原代细胞容易获取, 而且相对于传代细胞而言更多地保留了来源器官的生化反应特性, 但原代细胞也有其欠缺性, 如不能保证各批次

细胞的均一性, 不能稳定的传承下来, 因此寻找诱导敏感的永久性细胞系作为技术平台成为了 CYP 研究的热点之一。Ackermann 等^[19]利用鱼类细胞系 PLHC-1 和 RTG-2 检测了不同培养基对测定细胞毒性和 CYP 活性的影响, Araujo 等^[20]利用虹鳟 (RTG-2) 和云斑鲷 (*Ameiurus nebulosus*) (BB) 细胞系进行苯并芘毒性研究, Fent^[16]则全面性地评价了鱼类细胞 (PLHC-1) 在生态毒理学研究中的多用途——评价化学和环境样品的细胞毒性、CYP1A 诱导效能以及雌激素活性等。与体内研究相比, 在药物代谢酶研究中运用鱼类细胞, 具有许多优点: (1) 细胞的均一性好, 在遗传上极为相似; (2) 药物与细胞直接接触, 可较迅速获得结果; (3) 可结合多种技术方法测知药物效应; (4) 比用活鱼更经济、更方便。

草鱼是我国“四大家鱼”之一, 是非常有代表性的鲤科鱼, 目前国内已建成多株草鱼细胞系, 仅农业部渔业动植物病原库保存的 GCB、PSF、CO、GCL、CIK 等细胞可供筛选。此外, 笔者已利用 CYP1A mRNA 诱导前后的差异表达, 对草鱼 CYP1A cDNA 片段进行了克隆和鉴定^[12]。本文的研究结果表明, 利用代谢活性强且诱导敏感的草鱼肝细胞系, 以草鱼 CYP1A cDNA 片段为探针, 可以快速、灵敏的检测外源化合物的诱导效能。下一步将以此建立水产动物细胞模型, 开展渔药药理学和环境污染物生态毒理学等方面的研

究工作。

参考文献:

- [1] Parrott J L, Hodson P V, Servos M R, *et al.* Relative potency of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans for inducing mixed-function oxygenase activity in rainbow trout [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1995, 14(6):1041-1050.
- [2] Celander M, Broman D, Foerlin L. Effects of petroleum hydrocarbons on the hepatic cytochrome P450 1A1 system in rainbow trout [J]. *Mar Environ Res*, 1995, 39(1):61-65.
- [3] Petrulis J R, Bunce N J. Competitive inhibition by inducer as a confounding factor in the use of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to estimate exposure to dioxin-like compounds [J]. *Toxicol Lett*, 1999, 105(3):251-260.
- [4] Tom D J, Lee L E, Lew J. Induction of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity by planar chlorinated hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in cell lines from the rainbow trout pituitary [J]. *Comp Biochem Physiol (Part A)*, 2001, 128(2):185-198.
- [5] 林茂,杨先乐,房文红,等. 草鱼肝细胞中诱导剂对 EROD 作用的剂量效应研究 [J]. *水产学报*, 2006, 30(3):311-315.
- [6] Fallone F, Villard P H, Decome L, *et al.* PPAR α activation potentiates AhR-induced CYP1A1 expression [J]. *Toxicology*, 2005, 216 (2): 122-128.
- [7] Chaty S, Rodius F, Vasseur P. A comparative study of the expression of *CYP1A* and *CYP4* genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 69(1):81-93.
- [8] Campbell P M, Devlin R H. Expression of *CYP1A1* in livers and gonads of Pacific salmon: quantitation of mRNA levels by RT-cPCR [J]. *Aquat Toxicol*, 1996, 34(1):47-69.
- [9] Courtenay S C, Grunwald C M, Kreamer G L, *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.
- [10] Rees C B, McCormick S D, Heuvel J P V, *et al.* Quantitative PCR analysis of *CYP1A* induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, 62(1):67-78.
- [11] Sadar M D, Ash R, Sundqvist J, *et al.* Phenobarbital induction of *CYP1A1* gene expression in a primary culture of rainbow trout hepatocytes [J]. *J Bio Chem*, 1996, 271(30):17635-17643.
- [12] 林茂. 鱼类细胞中药物代谢酶体外诱导的研究 [D]. 上海:上海海洋大学, 2006:85-95.
- [13] Augustine Arukwe. Complementary DNA cloning, sequence analysis and differential organ expression of b-naphthoflavone-inducible cytochrome P4501A in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Comp Biochem Physiol (Part C)*, 2002, 133(4):613-624.
- [14] Elcombe C R, Lech J J. Induction and characterization of hemoprotein (s) P450 and monooxygenation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1979, 49(4):437-450.
- [15] Billiarda S M, Bolsb N C, Hodson P V. *In vitro* and *in vivo* comparisons of fish-specific *CYP1A* induction relative potency factors for selected polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Ecotoxicol and Environ Safe*, 2004, 59(3):292-299.
- [16] Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples [J]. *Toxicol In Vitro*, 2001, 15(4):477-488.
- [17] Pesonen M, Teivainen P, Lundstrom J, *et al.* Biochemical responses of fish sac fry and a primary cell culture of fish hepatocytes exposed to polychlorinated naphthalenes [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2000, 38(1):52-58.
- [18] 万小琼,吴文忠,贺纪正. 利用草鱼原代肝细胞培养评价二噁英毒性效应 [J]. *中国环境科学*, 2002, 22(2):114-117
- [19] Ackermann G E, Fent K. The adaptation of the permanent fish cell lines PLHC-1 and RTG-2 to FCS-free media results in similar growth rates compared to FCS-containing conditions [J]. *Mar Environ Res*, 1998, 46(4):363-367.
- [20] Araujo C S A, Marques S A F, Carrondo M J T. *In vitro* response of the brown bullhead catfish (BB) and rainbow trout (RTG-2) cell lines to benzo [a] pyrene [J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 247(2):127-135.

***CYP1A* gene expression in β -naphthoflavone-induced grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell lines**

LIN Mao^{1,2*}, YANG Xian-le², JI Rong-xing¹

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Cytochrome P450 1A (*CYP1A*) cDNA is used as a probe for evaluation of environmental contaminant. Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) liver cell (GCL), kidney cell (CIK), blastula cell (GCB), snout fibroblast cell (PSF) and ovary cell (CO) were exposed to β -naphthoflavone (BNF) to induce *CYP1A*. The potency of induction was assessed by the ratio of *CYP1A* cDNA to β -actin (*ACT*) cDNA derived from semiquantitative PCR. PCR reaction parameters were optimized so that annealing temperature was chosen to be 57 °C and cycle to be 30 times. Under such conditions, the *CYP1A* expression level could be quantitated by Gauss trace ratio of *CYP1A/ACT*. PCR amplification product of *ACT* and *CYP1A* cDNA showed that *CYP1A* expression level was very low in control grass carp cells while increased in BNF-treated cells significantly. The expression level of *CYP1A* in BNF-treated GCL, CIK and CO cells had significant difference ($P < 0.05$), which was sorted as GCL > CIK > CO. But that of GCB or PSF cell could not yet be detected. The state of *CYP1A* expression in grass carp cells was similar to homologous tissues, and the level in homologous tissues of BNF-treated grass carps was sorted as liver > kidney > ovary. The results indicated *CYP1A* expression level *in vitro* had certain correlation with that *in vivo*. This study illustrates the high potential of fish cell lines in ecotoxicology.

Key words: grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*); cell; *CYP1A*; cDNA; induction

Corresponding author: LIN Mao. E-mail: linmao@jmu.edu.cn