

CCl₄ 对建鲤肝细胞 DNA 的毒性作用及 对 CYP3A 基因表达的影响

曹丽萍^{1,2}, 贾睿^{1,2}, 杜金梁^{1,2}, 丁炜东¹, 殷国俊^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室,江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,鱼类免疫药理学国际联合实验室,江苏 无锡 214081)

摘要: 四氯化碳(CCl₄)作为一种经典的肝脏毒物,被广泛应用于哺乳动物的肝损伤模型构建及保肝药物筛选。低、中、高浓度的 CCl₄-橄榄油溶液(6.25%、12.50%和 15.00%,0.01 mL/g)腹腔注射建鲤 72 h 后,采用单细胞凝胶电泳和肝组织病理切片技术,测定血清中肝损伤生化酶来考察 CCl₄对肝细胞 DNA 的毒性作用;同时采用实时荧光定量 PCR 法测定肝组织中 CYP3A 表达量的变化。结果显示,6.25% CCl₄作用建鲤 72 h 后肝组织切片检查没有发生明显的改变,对血清中酶学指标无显著影响,CYP3A 的 mRNA 表达量与空白对照组相比也没有显著变化,而彗星实验结果显示该浓度的 CCl₄作用肝细胞后,尾长、TDNA、尾矩及 Olive 尾矩等 DNA 损伤指标与对照组相比,显著增大;随着 CCl₄作用浓度的增加,肝细胞肿胀、广泛空泡变性,出现核固缩和核溶解等组织学的变化,12.50%和 15.00% CCl₄均能显著引起血清中谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)水平升高,15.00% CCl₄能显著促进乳酸脱氢酶(LDH)和丙二醛(MDA)大量生成;彗星实验中各项损伤指标也随着染毒剂量增加而极显著增大;同时,12.50%和 15.00% CCl₄组的 CYP3A mRNA 表达量显著降低。结果表明,CCl₄对建鲤肝细胞 DNA 具有毒性作用,在实验的浓度范围内,CCl₄能抑制 CYP3A mRNA 表达;随着 CCl₄作用浓度的增大,血清酶、病理切片和彗星实验结果表现出剂量效应,并有一定的一致性,彗星实验表现出更高的灵敏性。

关键词: 建鲤;四氯化碳;CYP3A;彗星实验

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

四氯化碳(CCl₄)是一种已知的具有肝毒性的化合物,使得动物肝脏出现类似于人类急性肝炎的症状特征,常应用于构建动物的肝损伤模型,其损伤机制与其在体内代谢过程中产生大量的活性氧密切相关^[1],能导致 DNA 单、双链断裂和其他一些形式的染色体损伤。DNA 损伤是评价环境毒物遗传毒性的一个重要参数。20 世纪 80 年代末发展起来的单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE),又称彗星实验(comet assay),可在单个细胞水平上检测 DNA 损伤和修复,还可以用来检测各种细胞的遗传损伤。其技术原理主要是:细胞 DNA 断裂时,DNA 的超螺旋

结构被破坏,在裂解液的作用下促使 DNA 变性和解螺旋。在电场作用下,单链和双链 DNA 片段向阳极迁移,而核 DNA 分子由于分子量太大留在原位。经荧光染色后,在荧光显微镜下可见形似彗星的外观^[2-3]。如今在分子毒理学研究领域,彗星实验被认为是检测各种环境污染物诱发生物体 DNA 损伤程度的一个极其敏感的方法^[4-6],有关鱼类细胞彗星实验国内报道并不多见。

研究表明,氧化应激相关基因—细胞色素 P450 酶系(CYP450)在 CCl₄肝损伤发生过程中起到了十分重要的作用。CCl₄通过 CYP450 作用代

收稿日期:2013-05-28 修回日期:2013-08-28

资助项目:国家自然科学基金项目[青年科学基金(31200918,31202002)];江苏省自然科学基金项目(BK2011184)

通信作者:殷国俊,E-mail:yingj@ffrc.cn

谢为三氯甲烷自由基 (CCl₃·) 进而引起膜脂质过氧化,这是其造成肝损伤的一个重要原因^[7]。CYP450 酶主要参与内源性(内固醇激素、维生素 D、胆酸等)和外源性化合物(药物、化学毒物、致癌物等)代谢,分布于多种组织和器官中,肝脏中含量最为丰富。以 P450 酶系作为生物指标,在毒理学中的应用日渐广泛^[8-9],具有极大的潜力。国外有学者^[10-11]选择两种海鱼的乙氧基异酚曝唑酮(EROD)活性及鲶鱼 CYP1A 的诱导作为对多环芳烃、卤代化合物和农药等污染的监测指标。而国内这方面的报道相对较少,朱必凤等^[12]提出可用鲫 (*Carassius auratus*) 肝微粒体芳烃羟化 (AHH) 酶指示水体中多环芳烃的污染。作为 CYP450 酶系中含量最多的亚型, CYP3A 参与该酶系中 50% 以上临床常用药物的氧化代谢^[13],研究 CYP3A 的表达变化对探讨外来物的潜在危害、毒性及代谢遗传多态性分子机制等有重要意义。

本研究以建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *Jian*) 为实验对象,腹腔注射 CCl₄ 溶液,通过观察肝细胞 DNA 损伤及肝组织中 CYP3A mRNA 表达情况,采用单细胞凝胶电泳和分子生物学技术,结合肝功能、组织病理学变化等指标,探讨 CCl₄ 对鱼类肝细胞的毒性作用及肝组织中 CYP3A 表达的影响,为防治氧化损伤导致的鱼类肝胆疾病提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

建鲤来自中国水产科学院淡水渔业研究中心渔场,健康无伤,6 月龄,体质量 150 g 左右,饲养于循环水系统中,25 ℃,每天投喂商品饲料 2 次。

1.2 主要仪器和设备

DYY-7 型转移电泳仪(北京六一仪器厂); Olympus LX70 荧光显微镜和 Olympus SP6T 拍摄系统(日本 Olympus 公司); MK3 酶标仪(Thermo 公司); ABI-7500 型 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.3 主要药品与试剂

低熔点(LMA)为美国 Amresco 公司生产,生工生物(上海)有限公司分装; DuGreen 核酸染料(10 000 × 水溶液)购自于硕世生物科技有限公司; CCl₄(分析纯)购于国药集团化学试剂有限公司,配置成 6.25%、12.50% 和 15.00% 的 CCl₄-橄榄油溶液; 谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶

(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)和丙二醛(MDA)测定试剂盒购自于南京建成生物工程研究所科技有限公司; 总 RNA 抽提试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒购自于 TaKaRa 公司。

1.4 实验设计

CCl₄-橄榄油溶液使用剂量参照本实验室前期实验^[14]。将健康建鲤随机分为 4 组,每组 10 尾,投喂 12 h 后,称重,按 0.01 mL/g(体质量)剂量分别一次性腹腔注射 6.25%、12.50% 和 15.00%(体积分数,下同)的 CCl₄-橄榄油溶液,对照组注射等体积橄榄油溶液。72 h 后,MS-222 麻醉,各组抽取鱼血。

1.5 单细胞凝胶电泳

肝细胞的分离 无菌条件下打开腹腔,分离肝脏,取适量肝组织置平皿中,预冷 Hanks 液洗涤。用眼科剪将肝组织切成 1 mm³ 大小后,100 目筛网过滤,滤液转入离心管中,4 ℃,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,预冷 Hanks 液悬浮后冰浴保存,本实验经台盼蓝染色后计数活细胞数 > 90%。

碱性彗星实验 采用 Piperakis 等^[15]方法改良进行。25 μL 受检细胞(约 5 000 个肝细胞)与 0.75% 的 75 μL 低熔点琼脂糖混合,铺于 12 孔细胞培养板板盖的小圆凹槽中,每个样品设置 3 个重复。迅速加盖玻片,使凝胶均匀铺开,4 ℃ 固化 30 min。取下盖玻片,板盖浸入新配制的冰冷裂解液中,避光,4 ℃ 裂解 2 h。再从裂解液中取出样品,蒸馏水清洗,置于水平电泳槽中,倒入新配制的电泳液,液面高于胶面 2.5 mm 左右,低温,避光,链解旋 15 min。25 V,300 mA,电泳 20 min。电泳结束后,样品浸入预冷中和液中,4 ℃ 避光浸泡 30 min。中和结束后,酒精梯度脱水。观察时,滴加适量 Du-green 工作液,作用 1 min。置荧光显微镜下观察,拍照。每个重复随机观察 50 个细胞, Comet Assay Software Project (CASP, 1.2.3 b1 版本)彗星图像分析软件进行图像分析,以慧尾长(tail length), L_T , μm; 尾部 DNA 百分含量(tail DNA%), T_{DNA} , %; 尾矩(tail moment), M_T , μm 及 Olive 尾矩(olive tail moment), M_{OT} , μm 为分析指标。

1.6 CYP3AmRNA 的表达情况的实时荧光定量 PCR 法测定

建鲤处死后,剖取适量肝组织,参照 RNAiso

Reagent 说明书操作,抽提总 RNA。采用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度, OD_{260}/OD_{280} 值达到 1.8 ~ 2.0 认为符合标准。以 Oligo(dT)₁₈ 为引物进行 RT 反应合成 cDNA; 实时荧光定量 PCR 反应按照 TaKaRa 公司生产的 ExScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time: SYBR Green I) 进行。基因特异引物及内参 β -actin 引物分别按照鲤 CYP3A (GU046696.1) 和 β -actin (M24113.1) 基因序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计。

CYP3A 的上游引物: 5'-CACCGCTTTATTT-CCTTTCATC-3', 下游引物: 5'-CTCGCTTCTTCT-TGTGGCCT-3'。

β -actin 的上游引物: 5'-GTCAAGTCCGTT-GAGATGCACC-3', 下游引物: 5'-GGATGATGA-CCTGAGCATTGA AGC-3'。

1.7 血清中生化指标的测定

各组血样分离血清,按照试剂盒操作说明分别测定其中谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)含量。

1.8 肝脏病理学观察

各组实验动物采血处死后立即解剖摘取肝

脏,肉眼观察肝脏表面病理变化,并固定于 10% 甲醛溶液中,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,4 ~ 5 μ m 切片, H. E (苏木精和伊红) 染色,光学树脂胶封片,光镜下观察。

1.9 数据分析

实验数据用平均值 \pm 标准误表示,数据分析采用 SPSS 15.0 软件包中的单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 处理,对样本之间进行 *T* 检验。*P* 值取 0.05 和 0.01。

2 结果

2.1 DNA 损伤的 SCGE 分析

标本染色后,在荧光显微镜下细胞 DNA 呈蓝色,无 DNA 断裂的细胞为圆形,荧光强度均匀,边缘整齐;损伤的细胞 DNA 则表现为断片向阳极迁移,形成彗星样的拖尾(图 1)。CCl₄ 对建鲤 DNA 损伤的 SCGE 分析结果表明 6.25% CCl₄ 损伤肝细胞 72 h, DNA 损伤指标与空白对照组之间,已存在显著差异 ($P < 0.01$); 随着染毒剂量增加, DNA 损伤加重 ($P < 0.01$), 各指标存在良好的剂量-效应关系(表 1)。

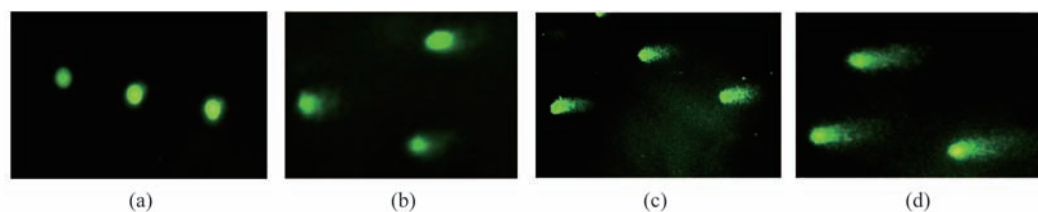


图 1 CCl₄ 对建鲤肝细胞 DNA 损伤 72 h 的彗星实验荧光显微镜下图像 ($\times 400$)

(a) 空白组; (b) 6.25% CCl₄ 作用肝细胞的彗星图像; (c) 12.50% CCl₄ 作用肝细胞的彗星图像; (d) 15.00% CCl₄ 作用肝细胞的彗星图像

Fig. 1 Fluorescence photomicrographs of DNA damage in hepatocytes of (*C. carpio* var. *Jian*) induced by CCl₄ for 72 h ($\times 400$)

(a) control cells; (b) comet figures of hepatocytes treated with 6.25% CCl₄; (c) comet figures of hepatocytes treated with 12.50% CCl₄; (d) comet figures of hepatocytes treated with 15.00% CCl₄

表 1 CCl₄ 对建鲤肝细胞的 DNA 损伤作用

Tab. 1 DNA damage in hepatocytes of *C. carpio* var. *Jian* induced by CCl₄

CCl ₄ 浓度/% concentration	尾长/ μ m L_T	尾部 DNA 百分含量/% T_{DNA}	尾矩/ μ m M_T	Olive 尾矩/ μ m M_{OT}
0 (control)	36.00 \pm 3.65	2.02 \pm 0.47	0.73 \pm 0.21	2.31 \pm 0.51 **
6.25	62.00 \pm 6.65 **	23.14 \pm 1.48 **	14.34 \pm 0.72 **	11.75 \pm 1.01 **
12.50	251.00 \pm 11.04 **	33.90 \pm 2.98 **	85.09 \pm 4.25 **	64.41 \pm 0.98 **
15.00	268.00 \pm 9.68 **	46.48 \pm 1.96 **	124.56 \pm 2.21 **	63.72 \pm 1.25 **

注:数值用平均值 \pm 标准误表示,每个浓度 3 个重复,每个重复随机观察 50 个细胞。与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Notes: Values are expressed as mean \pm SD of three slides per concentration; 50 randomly chosen nuclei were counted per slide. Compared to control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 CYP3A 的 mRNA 表达情况

应用实时定量 PCR, CYP3A 表达数据通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法求得个样品的 mRNA 的相对含量。结果发现,随着 CCl₄ 作用浓度的增加, CYP3A 基因表达水平明显抑制(图 2)。浓度为 12.50% 和 15.00% CCl₄ 作用建鲤 72 h 后, CYP3A mRNA 表达量与空白对照组相比,显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 血清中生化指标的测定

一次性腹腔注射 6.25%、12.50% 和 15.00% 的 CCl₄-橄榄油溶液,各组建鲤均无死亡现象。血清中 GOT, GPT, LDH 和 MDA 含量测定结果见图 3。与对照组相比,12.50% CCl₄ 作用建鲤 72 h 能引起血清中 GPT 和 GOT 显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 15.00% CCl₄ 组血清中 GOT, GPT, LDH 和 MDA 含量均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 而 6.25% CCl₄ 对建鲤血清中相应生化指标无显著

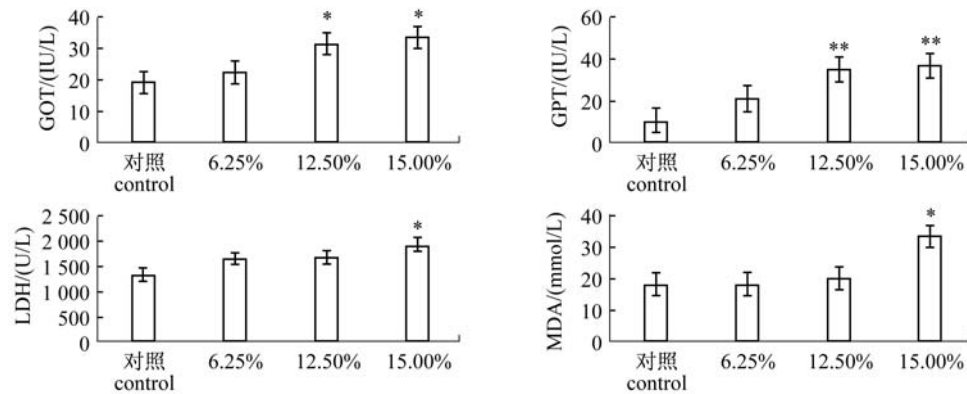


图 3 不同浓度的 CCl₄ 对建鲤血清中 GOT、GPT、LDH 和 MDA 含量的影响

数值用平均值 ± 标准误表示 ($n = 10$)。与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 3 Effects of CCl₄ at different concentrations on the serum GOT, GPT, LDH and MDA in *C. carpio* var. Jian

Values are expressed as mean ± SD ($n = 10$). Compared to control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 肝脏病理学检查

空白对照组肝切片(图 4-a)在光镜下显示肝细胞索状排列整齐,肝细胞呈多边形,边缘清晰,核大而圆,位于肝细胞中央,肝细胞间隙清晰可见,未见肝细胞变性、坏死等病理变化;6.25% CCl₄ 组切片(图 4-b)光镜检查显示没有发生明显的改变,部分肝细胞轻微变性;12.50% CCl₄ 组切片(图 4-c)可见肝组织结构基本正常,肝细胞核偏移或溶解,部分肝细胞界限不清;15.00% CCl₄ 组切片肝细胞广泛空泡变性(图 4-d);细胞轮廓模糊,肝细胞肿胀,一些细胞核侧移,核大小和形状不规则,出现核溶解胞浆空泡和颗粒;核固缩

影响 ($P > 0.05$),表现出一定的剂量效应。

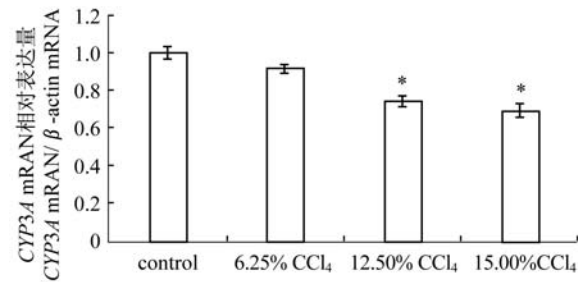


图 2 不同浓度 CCl₄ 溶液对建鲤肝组织 CYP3A mRNA 表达量的影响

数值用平均值 ± 标准误表示 ($n = 10$)。与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 2 The expression of CYP3A in *C. carpio* var. Jian by different concentrations of CCl₄

Values are expressed as mean ± SD ($n = 10$). Compared to control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(图 4-e, f)。

3 讨论

CCl₄ 通过细胞色素 P450 系统代谢并转换成三氯甲烷和过氧化三氯甲烷自由基^[16], 触发细胞膜成分——不饱和脂肪酸的脂质过氧化, 从而继发性损害的细胞膜, 严重干扰酶的分泌, 促进 MDA 大量生成^[17]; 定位于细胞质中的 GOT 和 GPT 由于 CCl₄ 对肝脏结构的破坏, 释放到了血清中导致其含量增加^[16, 18]。本研究中一次性腹腔注射 12.50% 和 15.00% 的 CCl₄-橄榄油溶液 72 h 后, 血清中 GPT 和 GOT 含量均显著升高 ($P <$

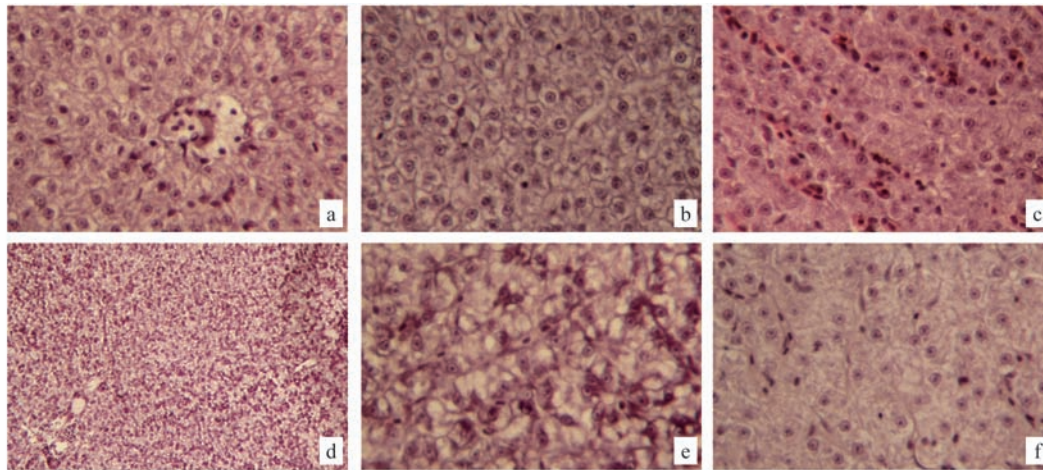


图4 建鲤的肝组织病理学观察(伊红苏木精染色)

a. 对照组(H. E., $\times 400$); b. 6.25% CCl_4 染毒后轻微肝细胞变性(H. E., $\times 400$); c. 12.50% CCl_4 染毒后局部细胞界限模糊,核溶解(H. E., $\times 400$); d. 15.00% CCl_4 染毒后广泛空泡化(H. E., $\times 100$); e. 15.00% CCl_4 染毒后空泡化、核固缩(H. E., $\times 400$); f. 15.00% CCl_4 染毒后细胞结构模糊、细胞肿胀、核碎裂和核溶解(H. E., $\times 100$)

Fig. 4 H. E stained liver tissue sections of *C. carpio* var. *Jian*

a. control(H. E., $\times 400$); b. low level of degeneration after exposure to 6.25% of CCl_4 (H. E., $\times 400$); c. local unclear cells border and karyolysis after exposure to 12.50% of CCl_4 (H. E., $\times 400$); d. widespread vacuoles after exposure to 15.00% of CCl_4 (H. E., $\times 100$); e. vacuoles, pyknotic nuclei after exposure to 15.00% CCl_4 (H. E., $\times 400$); f. unclear structure, swelling, nuclear fragmentation and karyolysis after exposure to 15.00% CCl_4 (H. E., $\times 400$)

0.01 或 $P < 0.05$), 随着作用剂量的增加, 15.00% CCl_4 能显著提高血清中 LDH 和 MDA 含量($P < 0.05$), 验证了 CCl_4 对建鲤肝细胞的毒性作用。同时对建鲤肝脏切片的病理学检查发现 CCl_4 作用后肝细胞变性, 界限不清, 且随着攻毒浓度的增加细胞肿胀、广泛空泡变性, 出现核固缩和核溶解等组织学的变化, 支持了对血清酶的测定结果, 与血清生化酶的测定结果有一致性。

彗星实验是近年建立和逐渐发展起来的一种快速检测哺乳动物细胞 DNA 损伤的实验方法^[19], 与水产上用来检测 DNA 损伤的³²P 后标记法及碱基解旋^[20]等传统方法相比较, 技术更简便、快速、灵敏且适合体内外不同类型实验和各种类型细胞。Mitchelmore 等^[21]认为, 彗星实验特别适用于鱼类和其他水生生物的遗传毒理学检测, 可以作为非特异性的生物标记。Devaux 等^[22]利用碱性彗星实验, 研究了两种常见的能诱发细胞氧化应激的环境毒物——过氧化氢(H_2O_2)和苯并芘(B[a]P)对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)体外培养的原代肝细胞的毒性作用, 结果证明了碱性彗星实验在研究水环境毒物的潜在基因毒性方面的可靠性和灵敏性。同样 Ping 等^[23]

利用彗星实验验证了敌敌畏残留物对泥鳅肝细胞的毒性作用, 提示了其对水环境及其他水生生物的潜在威胁。本研究应用该技术检测了不同浓度的 CCl_4 对建鲤肝细胞 DNA 损伤的毒性作用, 结果表明 6.25% CCl_4 损伤肝细胞 72 h, 尾长、TDNA、尾矩及 Olive 尾矩显著增加, 与空白对照组之间存在显著差异($P < 0.01$), 损伤效果随着染毒剂量增加而加重, 该化合物对肝细胞 DNA 的损伤作用呈现一定的剂量效应关系, 证实了该方法的可行性。与血清中酶指标的测定结果相比, 低浓度的 CCl_4 虽然没有表现出对相关酶活性的影响, 但是彗星实验结果证实肝细胞的 DNA 已经造成损伤。

CYP 酶系是 CCl_4 在体内进行代谢活化的主要酶类, 在 CCl_4 损伤过程中含量会发生变化, 但是不同亚型 CYP 对 CCl_4 的损伤作用表现出不同的敏感性, 而且这种差异与 CCl_4 作用剂量和接触时间有关^[24]。CYP3A 作为 CYP 酶系重要亚族, 在肝脏中含量丰富, 研究其在 CCl_4 损伤作用过程中含量变化对揭示 CCl_4 的损伤机制、损伤防护及损伤后的指导用药都有一定的意义^[25]。尽管目前对 CYP 酶系统内各亚型与肝损伤之间的联系

尚不清楚^[26],但研究证明高剂量的 CCl₄能显著降低 CYP3A 和 CYP1A 活性^[25]。Zangar 等^[27]在研究不同剂量 CCl₄下人类肝微粒体中 CYP450 酶系中各亚型的活性变化时发现:CYP3A 在高剂量的 CCl₄作用(530 μmol/L)作用下会被诱导表达,而低剂量的 CCl₄(17 μmol/L)主要诱导 CYP2E1 的表达。Xie 等^[28]的研究也证实 CCl₄诱导大鼠急性肝损伤,能导致 CYP3A 大量损失,且与肝中生化标志酶 GOT 和 GPT 活性有相关性。Igarashi 等^[29]及 Masuada 等^[30]对此类现象做出了推测:CCl₄的活化产物如三氯甲烷自由基,诱导肝脏脂质过氧化,产生大量的自由基,一些自由基与 CYP3A 亚基结合引起其活力降低;或 CCl₄在体内引起炎症反应,破坏了 CYP450 酶系统,导致 CYP3A 含量降低^[31]。本研究结果显示 12.50% 和 15.00% CCl₄作用建鲤 72 h 后,CYP3A mRNA 表达量显著下降($P < 0.05$),CCl₄对 CYP3A 的抑制程度与引起的脂质过氧化水平之间表现出一定的负相关,该结果与 Zangar 等^[27]与 Xie 等^[28]的研究类似。表明在本研究测试的浓度范围和作用时间内,CCl₄的活化产物可能与 CYP3A 亚基的结合能力随着脂质过氧化程度提高而加强,导致 CYP3A 的大量损失。

本研究探讨了建鲤肝细胞 DNA 的毒性及对肝组织中 CYP3A 表达的影响。结果显示在实验浓度范围之内,CCl₄导致肝细胞肿胀、广泛空泡变性,出现核固缩和核溶解;CCl₄能显著促进血清中 GOT、GPT 和 LDH 活性及脂质过氧化产物 MDA 的含量的提高;低浓度的 CCl₄(6.25%)能显著造成肝细胞 DNA 的损伤;血清酶、病理切片和彗星实验结果均表现出剂量效应,且结果具有一致性;肝组织中 CYP3A 的表达随着 CCl₄作用浓度的增加而显著抑制。结果表明 CCl₄对建鲤肝细胞 DNA 的具有毒性作用,该损伤作用与脂质过氧化有关,彗星实验技术能够非常灵敏地指示这种损伤作用;CYP3A 的活性变化与 CCl₄作用浓度范围有关,CCl₄的活化产物能与 CYP3A 亚基结合导致其大量损失。

参考文献:

- [1] 仲来福,张瑾岗,张富勤,等. 四氯化碳致大鼠肝损伤的机理[J]. 中国药理学与毒理学杂志,1989,3(4):298-300.
- [2] Hara A, Zhang W, Kobayashi H, et al. A single cell

gel electrophoresis technique for the detection of DNA damage induced by ACNU, an alkylating agent or irradiation in murine glioma cell lines [J]. Neurological Research, 1994, 16(4):234-240.

- [3] Schöber C, Gibbs J F, Yin M B, et al. Cellular heterogeneity in DNA damage and growth inhibition induced by ICI D1694, thymidylate synthase inhibitor, using single cell assays [J]. Biochemical Pharmacology, 1994, 48(5):997-1002.
- [4] Burlinson B, Tice R R, Speit G, et al. In vivo comet assay workgroup, part of the fourth international workgroup on genotoxicity testing: Results of the in vivo comet assay workgroup [J]. Mutation Research, 2007, 627(1):31-35.
- [5] Capriglione T, De Iorio S, Gay F, et al. Genotoxic effects of the fungicidethiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis [J]. Ecotoxicology, 2011, 20(4):885-891.
- [6] Frenzilli G, Nigro M, Lyons B P. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments [J]. Mutation Research, 2009, 681(1):80-92.
- [7] Castro G D, Diaz Gomez M L, Castro J A. DNA bases attack by reactive metabolites produced during carbon tetrachloride biotransformation and promotion of liver microsomal lipid peroxidation [J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997, 95(3):253-258.
- [8] Förlin L, Andersson T, Bengtsson B E, et al. Effects of pulp bleach plant effluents on hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in fish: laboratory and field studies [J]. Mar Environ Res, 1985, 17(2-4):109-112.
- [9] 陈国胜,张甬元. 鲫鱼肝脏中 CYP1A1 的诱导作用作为沉积物中二噁英的毒理学指标的研究 [J]. 中国环境科学, 1997, 17(3):264-267.
- [10] Galgani F, Bocquene G, Truquet P, et al. Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the French coasts [J]. Oceanologica ACTA, 1992, 15(4):355-364.
- [11] Goksøyr A. Characterization of the cytochrome P-450 mono-oxygenase system in fish liver: Metabolism and effects of organic xenobiotics [D]. Bergen: University of Bergen, 1987.
- [12] 朱必凤,马海燕. 鲫鱼肝微粒体芳烃羟化酶指示多环芳烃对水体污染的研究 [J]. 中国环境科学, 1995, 15(2):153-156.

- [13] 邵敬伟,董海燕,王涛,等. 中药莪术激活 PXR 及对大鼠肝细胞色素 P450 3A 的影响[J]. 中国药理学通报,2008,24(4):504-509.
- [14] 曹丽萍,贾睿,丁炜东,等. 建鲤体内外急性肝损伤模型的建立[J]. 安徽农业大学学报,2012,39(6):885-889.
- [15] Piperakis S M, Kontogianni K, Karanastasi G, *et al.* The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child, adult, and old age populations[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2009, 25(1):65-71.
- [16] Zhou D, Ruan J, Cai Y, *et al.* Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanol extract of *Arachniodes exilis* (Hance) Ching [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 129(2):232-237.
- [17] Stehbens W E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc [J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2003, 75(3):265-276.
- [18] Huang Q F, Zhang S J, Zheng L, *et al.* Hepatoprotective effects of total saponins isolated from *Taraphochlamys affinis* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 50(3-4):713-718.
- [19] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1988, 175(1):184-191.
- [20] Shugart L R. Quantification of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay [J]. *Aquatic Toxicology*, 1988, 13(1):43-52.
- [21] Mitchelmore C L, Chipman J K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring [J]. *Mutation Research*, 1998, 399(2):135-147.
- [22] Devaux A, Pesonen M, Monod G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes [J]. *Toxicology in Vitro*, 1997, 11(1-2):71-79.
- [23] Ping N, Shuaiguo Y, Li L, *et al.* Toxicity effect of dichlorvos on loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) assessed by micronucleus test, hepatase activity analysis and comet assay [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2013, 29(5):1-10.
- [24] Chaudhury S, Mehendale H M. Amplification of CCl₄ toxicity by chlordecone: Destruction of rat Hepatic microsomal cytochrome P-450 subpopulation [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1991, 32(3):277-294.
- [25] Kronbach T, Fischer V, Meyer U A, *et al.* Cyclosporine metabolism in human liver: Identific action of acytochrome P-450III gene family as major cyclosporine-metabolizin-enzyme explains interactions cyclosporine with other drugs [J]. *Clinic Pharmacology Therapeutics*, 1988, 43(6):630-635.
- [26] Xie Y, Hao H, Kang A, *et al.* Integral pharmacokinetics of multiple lignan components in normal, CCl₄-induced hepatic injury and hepatoprotective agents pretreated rats and correlations with hepatic injury biomarkers [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 131(2):290-299.
- [27] Zangar R C, Benson J M, Burnett V L, *et al.* Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, 125(3):233-243.
- [28] Xie Y, Hao H, Kang A, *et al.* Integral pharmacokinetics of multiple lignan components in normal, CCl₄-induced hepatic injury and hepatoprotective agents pretreated rats and correlations with hepatic injury biomarkers [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 131(2):290-299.
- [29] Igarashi T, Muramatsu H, Ohmori S, *et al.* Plasma glutathione S-transferase in carbon tetrachloride treated rats and its association to hepatic cytosolic isozymes [J]. *Journal of Pharmacology Japan*, 1988, 46(3):211-216.
- [30] Masuda Y. Learning toxicology from carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2006, 126(10):885-99.
- [31] 陈小丽,周炯亮,杨杏芬. 四氯碳抑制大鼠肝细胞色素 P450 同工酶的研究 [J]. *卫生毒理学杂志*, 2000, 14(4):214-215.

Toxicity effects of CCl₄ on DNA and expression of CYP3A gene in hepatocytes of *Cyprinus carpio* var. *Jian*

CAO Liping^{1,2}, JIA Rui^{1,2}, DU Jinliang^{1,2}, DING Weidong¹, YIN Guojun^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. International Joint Research Laboratory for Fish Immunopharmacology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Carbon tetrachloride (CCl₄) has been widely used as a kind of classic liver poison in constructing mammalian liver injury model and screening liver protecting drug. To investigate toxicity effects of CCl₄ on hepatocyte DNA of *Cyprinus carpio* var. *Jian*, the alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay), histopathological examination of liver and the measuring of biomarkers of hepatocyte damage were performed respectively after low, middle and high concentrations (6.25% and 12.50% and 15.00% CCl₄ in olive oil, v/v) of CCl₄ at a volume of 0.01 mL/g of body weight being injected intraperitoneally into *C. carpio* var. *Jian* for 72 h. Meanwhile, the Real-time PCR was carried out to evaluate the effects of CCl₄ on CYP3A mRNA expression. Results showed that the group injected with 6.25% of CCl₄ for 72 h has no obvious change ($P > 0.05$) on histopathological examination, serum hepatase activities and mRNA expression of CYP3A, compared to the control, however, the comet assay results of hepatic cells showed that tail length, tail DNA (%), tail moment and olive tail moment increased significantly ($P < 0.01$). With the increase of concentrations, histological changes such as cell swelling, extensive vacuoles degeneration, karyopyknosis and karyolysis were observed. The groups injected with 12.5% and 15% of CCl₄ could significantly elevate the serum levels of glutamate oxalate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and the group with 15.00% of CCl₄ produced a significant effect in the case of lactate dehydrogenase (LDH) and malondialdehyde (MDA) ($P < 0.05$). All damage indexes of comet assay also increased with the increase of CCl₄ concentrations ($P < 0.01$). At the same time, the expressions of CYP3A of the groups injected with 12.5% and 15% of CCl₄ were significantly reduced ($P < 0.05$). Overall results proved the toxicity effects of CCl₄ on hepatocyte DNA of *C. carpio* var. *Jian*. Within the range of experimental concentrations, CCl₄ could inhibit CYP3A mRNA expression. And the results of serum hepatase activities, histopathological examination and comet assay were observed not only in a dose-dependent manner but also having good coherence with the increase of CCl₄ concentrations. The technique of comet assay showed high sensitivity.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *Jian*; carbon tetrachloride; CYP3A; comet assay

Corresponding author: YIN Guojun. E-mail: yingj@ffrc.cn