

文章编号: 1000-0615(2019)06-1416-07

DOI: 10.11964/jfc.20180911465

CYP3A65及上游核受体基因PXR和AHR2 在斑马鱼生长发育阶段的表达

祁美娟¹, 石美智^{2,3}, 张婧娴³, 陈君君^{2,3}, 张湘奇³,
杨姣^{2,3}, 郭澄³, 韩永龙^{2,3*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;
2. 上海健康医学院附属第六人民医院东院, 药剂科, 上海 201306;
3. 上海交通大学附属第六人民医院, 药剂科, 上海 200233)

摘要: 为了选择处于最佳生长阶段的斑马鱼用于药物代谢研究, 本实验考察不同生长阶段斑马鱼全鱼、肝脏和肠道组织中CYP3A65及其上游核受体基因(PXR、AHR2) mRNA表达水平的变化规律。实验测定CYP3A65、PXR和AHR2相对表达量, 并通过比较核受体基因与代谢酶基因mRNA之间的相关性来证实核受体基因的调控作用。结果显示, 144 hpf和75 dpf两个生长阶段的斑马鱼中CYP3A65、PXR和AHR2 mRNA表达量最高; 斑马鱼生长阶段中代谢酶基因和核受体基因的表达趋势一致, 且受肝脏、肠道组织占全鱼比重的影响。研究表明, 幼鱼期144 hpf斑马鱼及稚鱼期75 dpf的斑马鱼最适用于CYP3A65代谢研究; CYP3A65与PXR、CYP3A65与AHR2的mRNA表达之间有显著的相关性, 与AHR2的相关性更显著。

关键词: 斑马鱼; CYP3A65; PXR; AHR2; mRNA表达; 发育阶段

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

斑马鱼(*Danio rerio*)作为一种成熟的模式生物, 已被广泛用于药效筛选和毒性评价试验^[1]。斑马鱼与人(*Homo*)基因组具有87%同源性^[2-3], 其信号通路、生理结构与功能等均与哺乳动物高度相似^[4]。斑马鱼可表达多种药物代谢酶, 包括I相代谢酶细胞色素P450(CYP450)、II相代谢酶尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(UGT)和磺基转移酶(SULT)等, 这些酶的基因或氨基酸序列与人类具有50%以上同源性^[5]。国内外对斑马鱼药物代谢酶基因表达的研究已有报道, 且受重视程度日益升高。

在哺乳动物中CYP450只有CYP3A一个亚家族, 因其有灵活多变的活性位点, 因此可以代谢多种结构不同的化合物。CYP3A65是斑马鱼

CYP3A家族的唯一成员, 在肝脏和肠道中高度表达^[6-7]。CYP3A65是位于1号染色体的a13外显子基因, 与人CYP3A4有54%的同源性^[8]。CYP3A65基因在斑马鱼生长发育过程中的表达水平及变化趋势仍未知。

核受体与药物代谢密切相关, 外源物可通过核受体诱导或抑制药物代谢酶。核受体(PXR)基因在药物代谢酶的转录调节中起着重要作用, PXR在斑马鱼中有功能表达, 其配体结合区(ligand binding domain, LBD)同人类PXR的LBD存在52%的同一性^[9]。关于PXR调节斑马鱼中CYP3A的表达尚存在争议, 有研究报道显示, 减少PXR或芳香烃受体2(AHR2)的合成, 能显著下调CYP3A65的内源性转录, 表明上述2个调节因子对CYP3A65

收稿日期: 2018-09-28 修回日期: 2018-12-03

资助项目: 国家自然科学基金(81773949); 浦东科经委(PKJ2017-Y07); 浦东卫计委(PW2017E-2); 上海市第六人民医院东院人才(2016018)

通信作者: 韩永龙, E-mail: yonglongh@126.com

的基础表达是必须的, *CYP3A65*是*PXR*-, *AHR2*-依赖型基因^[10-12]。虽然已有研究表明, 一些化合物可以通过*PXR*或*AHR2*依赖性途径诱导或抑制斑马鱼*CYP3A65*的转录。但在斑马鱼的发育过程中, *CYP3A65*与其上游核受体基因之间的关系仍需进一步研究。

在全基因组水平, mRNA可解释约40%的蛋白质水平变异^[13], 因此, 在一定程度上mRNA的表达水平能反映代谢酶蛋白的表达水平。本实验考察了*CYP3A65*及其上游核调节因子*PXR*和*AHR2*基因表达变化的趋势, 及不同生长阶段斑马鱼的*CYP3A65*与*PXR*、*AHR2* mRNA表达之间的相关性。根据不同生长时期斑马鱼*CYP3A65*、*PXR*、*AHR2* mRNA表达水平的高低, 选择最有利于*CYP3A65*代谢研究的斑马鱼生长阶段。本文旨在优化斑马鱼生长时期, 缩短斑马鱼的培养周期, 让斑马鱼的药物代谢研究更经济有效。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用斑马鱼为野生型(AB型)斑马鱼, 均来自同一亲本, 购自国家斑马鱼资源中心, 饲养于上海海洋大学水产与生命学院。斑马鱼饲养在20 L的容器中, 于光周期L:D=14 h:10 h、循环脱氯的温度为28.5 °C的水环境中。不同生长阶段的斑马鱼分别为孵育后72 h (72 hpf)、96、120、144 hpf以及孵育后7 d (7 dpf)、21、30、45、60、75和90 dpf^[14]。

1.2 实验方法

斑马鱼全鱼、肝脏和肠道组织的总RNA提取参照试剂盒说明书进行操作, 分别取斑马鱼幼鱼(72、96、120、144 hpf、7、21 dpf)、稚鱼(30、45、60、75 dpf)和成鱼(90 dpf)的全鱼及斑马鱼稚鱼、成鱼的肝脏、肠道组织25 mg用于提取总RNA。以提取的经验证质量合格的总RNA作为模板进行实时荧光量PCR(qRT-PCR), 每个实验组设置3个重复。通过M-MuLV逆转录酶(Sangon Biotech)合成第一链cDNA的模板, 以 β -actin为内参, 利用相应引物(表1)扩增*CYP3A65*、*PXR*和*AHR2*。

使用iQ SYBR Green Supermix试剂盒, 在LightCycler® 480多色实时PCR检测系统中进行qRT-PCR。每次PCR运行结束时, 进行熔解曲线

表1 *CYP3A65*、*PXR*、*AHR2*和 β -actin的引物序列

Tab. 1 The primers of *CYP3A65*, *PXR*, *AHR2* and β -actin

基因 gene	序列 sequence
<i>CYP3A65</i>	5'-CGGAGCATCGG CTTTATTCT-3'
	5'-CTCTCTCTCTGTTGTGTGTGTG-3'
<i>PXR</i>	5'-GCATTCGCGTCCATATCACAGAG-3'
	5'-CTAACTAGGGCTCCACTTCTCTGG-3'
<i>AHR2</i>	5'-CTACTTGGGC-TTCCATCAGTCG-3'
	5'-GTCACTTGAGGG ATTGAGAGCG-3'
β -actin	5'-TGAGGAGGGCAA AGTGGTAAA-3'
	5'-CCCCGAGAGGACAA-CAATGTA-3'

分析以确保扩增单一产物。计算每个样品的总分子数, 并通过 β -actin校正因子归一化($2^{-\Delta\Delta C_T}$; 其中 $\Delta C_T=[C_T(\text{靶基因})-C_T(\beta\text{-actin})]$ ^[15])。qRT-PCR用于检测目的基因的表达量, 以72 hpf的斑马鱼作为基准, 确定其他样本相对表达量。

1.3 统计学分析

采用GraphPad Prism 6软件进行统计学分析处理。为提高方差齐性, 根据需要对数据进行对数转换。使用单因素方差分析(One-Way ANOVA, $P<0.05$)评估qRT-PCR测定的转录物水平之间的显著性差异, 然后进行Dunnett的多重比较测试。通过GraphPad Prism 6中的Pearson相关系数, 分析*CYP3A65*与*PXR*、*AHR2*之间的相关性。

2 结果

2.1 不同生长阶段斑马鱼全鱼中*CYP3A65*、*PXR*和*AHR2* mRNA水平的表达

实验考察了斑马鱼幼鱼全鱼组织、稚鱼、成鱼肝组织和肠组织中*CYP3A65*、*PXR*和*AHR2*基因表达。斑马鱼幼鱼全鱼组织中*CYP3A65*、*PXR*和*AHR2*的mRNA表达在幼鱼期先升高后降低, 144 hpf时最高, 然后在7 dpf后开始下降(图1)。在稚鱼期斑马鱼中, *CYP3A65*、*PXR*和*AHR2*的mRNA表达则逐渐增加, 并在75 dpf时显著增加。在生长发育过程中, 成鱼斑马鱼(90 dpf)比稚鱼期斑马鱼的*CYP3A65*、*PXR*和*AHR2*的mRNA表达降低。*CYP3A65* mRNA在肝脏和肠道中的表达最高^[7], 而肝脏和肠道组织占全鱼组织的重量比例于75 dpf最大、90 dpf最低(图2-a), 导致

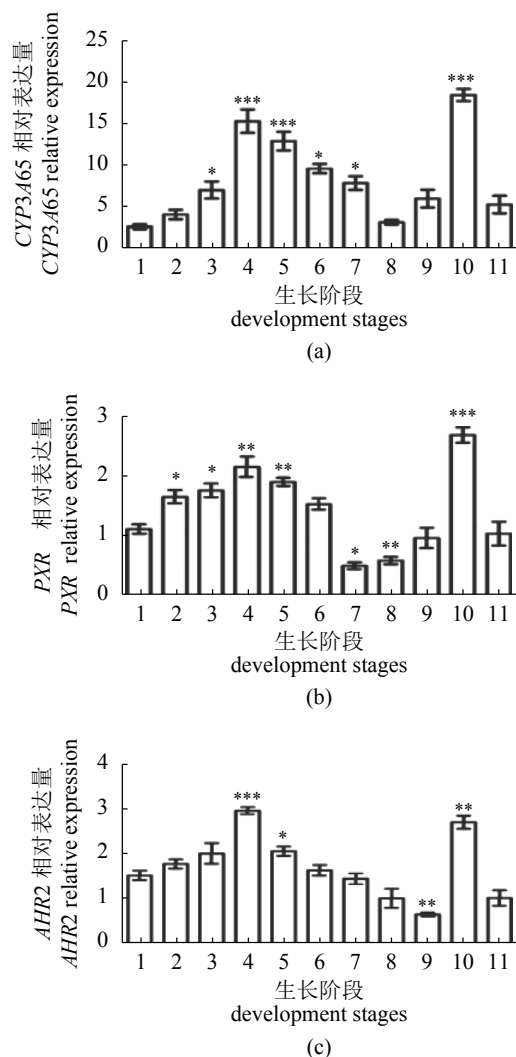


图1 斑马鱼组织中CYP3A65和核受体mRNA水平的相对表达量

(a) CYP3A65, (b) PXR, (c) AHR2; 1. 72 hpf, 2. 96 hpf, 3. 120 hpf, 4. 144 hpf, 5. 7 dpf, 6. 21 dpf, 7. 30 dpf, 8. 45 dpf, 9. 60 dpf, 10. 75 dpf, 11. 90 dpf; 每个生长阶段的统计学差异由*表示 (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$); 下同

Fig. 1 Relative mRNA expression levels of CYP3A65 and nuclear receptor in pool tissue of *D. rerio*

(a) CYP3A65, (b) PXR, (c) AHR2; 1. 72 hpf, 2. 96 hpf, 3. 120 hpf, 4. 144 hpf, 5. 7 dpf, 6. 21 dpf, 7. 30 dpf, 8. 45 dpf, 9. 60 dpf, 10. 75 dpf, 11. 90 dpf; statistically significant difference at each time point is represented by asterisks(*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$); the same below

CYP3A65在75 dpf的全部鱼组织中基因表达最高(图1-a)。PXR调控哺乳动物CYP3A基因, PXR和AHR2可调控斑马鱼CYP3A65的转录表达。同时,在斑马鱼发育阶段中, PXR和AHR2 mRNA表达的变化趋势(图1-b, 1-c)与CYP3A65一致(图1-a),

本实验结果与上述结论一致。

2.2 稚鱼和成鱼斑马鱼肝脏、肠道组织中CYP3A65, PXR和AHR2 mRNA水平表达

与哺乳动物CYP3A相似, 斑马鱼CYP3A65在肝脏、肠道中高表达^[7]。斑马鱼发育过程中, 肝脏、肠道组织占全鱼组织重量的比例变化(图2-a), 可能会影响CYP3A65、PXR和AHR2 mRNA表达趋势。由于幼鱼期斑马鱼太小, 无法取肝脏和肠道组织, 因此, 本实验取稚鱼期和成鱼期斑马鱼肝脏和肠道组织考察CYP3A65、PXR和AHR2的mRNA表达。肝脏和肠道组织中CYP3A65, PXR和AHR2的mRNA表达均在60和75 dpf时升高, 75 dpf时最高, 而成鱼斑马鱼中相应的表达则降低(图2-b, c)。斑马鱼生长过程中肝脏和肠道的发育变化可能导致了以上结果。斑马鱼发育过程中, 肝脏和肠道组织重量占全鱼组织重量比例的变化趋势与CYP3A65, PXR和AHR2基因表达的趋势一致(图2-a)。同时, 肝脏和肠道组织中CYP3A65, PXR和AHR2 mRNA表达的变化与全鱼组织中基因的变化趋势一致。

2.3 斑马鱼全鱼组织、肝脏和肠道组织中PXR、AHR2与CYP3A65表达相关性分析

通过分析CYP3A65和PXR、AHR2之间的表达相关性, 证实在斑马鱼发育过程中, PXR和AHR2对调控CYP3A65起重要作用。在斑马鱼全鱼组织中, CYP3A65与PXR($R^2=0.806$, $P < 0.0001$)(图3-a)比与AHR2($R^2=0.750$, $P < 0.0003$)表达水平之间的相关性更显著(图3-b)。在肝脏中, CYP3A65与AHR2($R^2=0.978$, $P < 0.001$)(图3-a)比与PXR($R^2=0.789$, $P < 0.041$)表达水平之间相关性更显著。在肠组织中, CYP3A65与AHR2($R^2=0.975$, $P < 0.002$)(图3-a)比与PXR($R^2=0.732$, $P < 0.064$)的表达水平之间的相关性更显著(图3-b)。

3 讨论

本实验研究了斑马鱼生长发育过程中药物代谢酶基因水平表达的变化趋势。CYP3A亚家族介导大量内源性物质和外源性化合物的代谢。通过对斑马鱼CYP3A亚家族的唯一成员—CYP3A65, 及其上游核受体基因PXR、AHR2的表达进行考察, 为选择最适宜生长阶段的斑马鱼用于药物代谢研究提供一定的参考和依据。

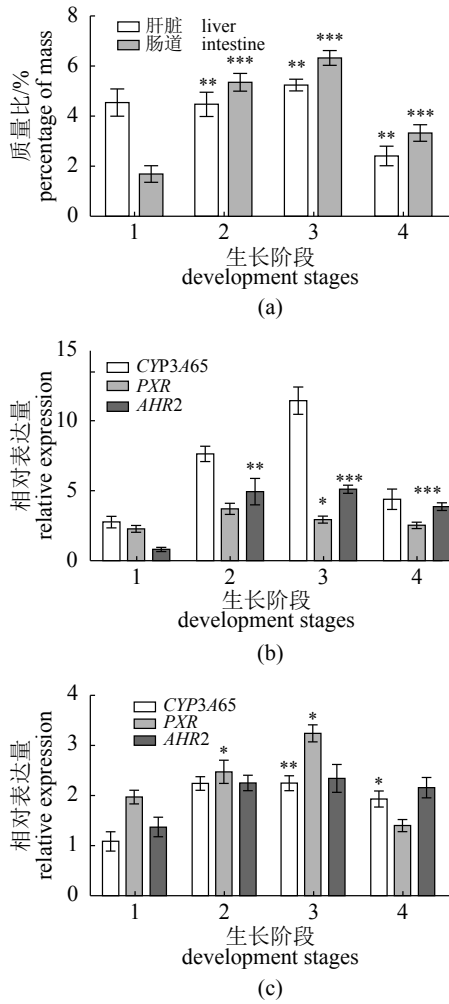


图2 斑马鱼的肝和肠组织中*CYP3A65*、*PXR*和*AHR2*的mRNA表达量以及斑马鱼肝和肠的重量所占斑马鱼全鱼重量的比例

(a) 稚鱼期、成鱼期斑马鱼的肝组织和肠组织质量占全鱼组织质量的比例, (b) 斑马鱼肝脏, (c) 肠道中*CYP3A65*, *PXR*, *AHR2*的mRNA水平的相对表达量, 45 dpf作为对照组; 1. 45 dpf, 2. 60 dpf, 3. 75 dpf, 4. 90 dpf

Fig. 2 Relative mRNA expression of *CYP3A65*, *PXR* and *AHR2* in the *D. rerio* liver and intestine and the proportion of *danio rerio* liver and intestine weight to the whole *D. rerio* weight

(a) the proportion of *D. rerio* liver and intestine weight to the whole weight in the juvenile fish and adult fish, (b) liver, (c) intestine, transcript experimental data for each sample was normalized to the 45 dpf expression control; 1. 45 dpf, 2. 60 dpf, 3. 75 dpf, 4. 90 dpf

睾酮是人*CYP3A4*的特征性代谢底物, 在斑马鱼肝微粒体和幼鱼中, 经代谢均产生6 β -羟基睾酮, 证实了斑马鱼具有*CYP3A4/5*类似的活性。同时, Chng等^[16]证实斑马鱼*CYP3A65*在睾酮的代谢中发挥重要作用。*PXR*是人类和哺乳动物中*CYP3A*

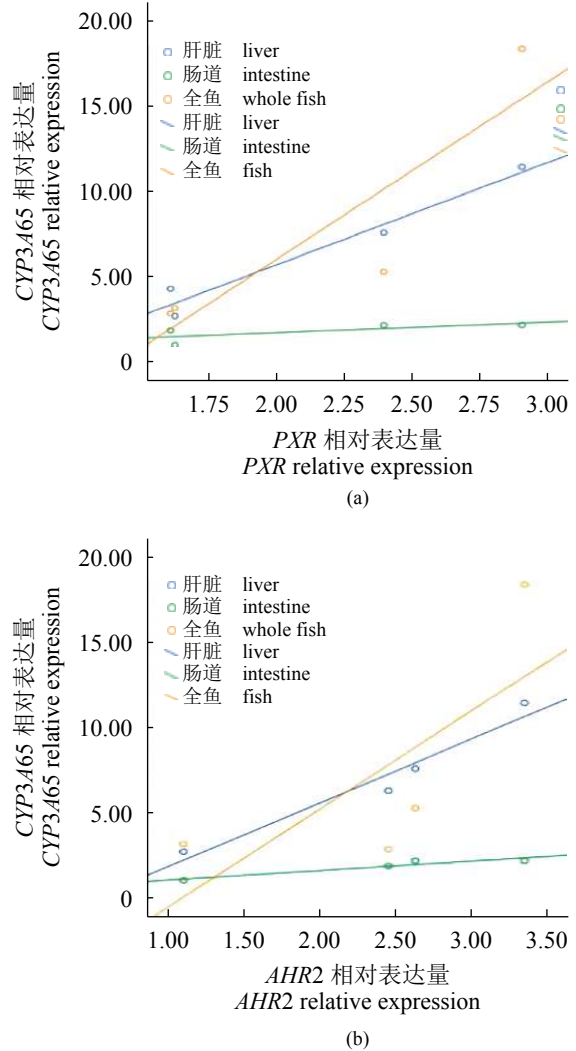


图3 斑马鱼全部鱼组织、肝脏组织和肠道组织中*PXR*、*AHR2* mRNA表达与*CYP3A65* mRNA表达的成对相关性分析

(a) *PXR*与*CYP3A65* mRNA表达之间的成对相关性分析($n=3$); *AHR2*与*CYP3A65* mRNA表达之间的成对相关性分析($n=3$)

Fig. 3 Pairwise correlation analysis of *CYP3A65* between *PXR* and *AHR2* mRNA expression in *D. rerio* pooled tissue, the liver and the intestine

(a) pairwise correlation analysis of *PXR* and *CYP3A65* mRNA expression in *D. rerio* pool tissue, liver and intestine($n=3$); (b) pairwise correlation analysis of *AHR2* and *CYP3A65* mRNA expression in *D. rerio* pooled tissue, the liver and the intestine($n=3$)

的重要上游转录基因。激活斑马鱼*PXR*、*AHR2*可有效调节*CYP3A65*转录。敲除*PXR*或*AHR2*可完全消除*CYP3A65*的转录, *CYP3A65*与这2种核受体基因之间存在相关性, 它们对于*CYP3A65*的表达是必需的^[12]。综上所述, 斑马鱼*CYP3A65*能够代谢人*CYP3A4*的特异性底物睾酮, 同时, 与人类

和哺乳动物相似,斑马鱼CYP3A65也受核受体PXR调控。本实验考察斑马鱼CYP3A65及其核受体基因在不同生长阶段的表达,对斑马鱼在药物代谢研究中的应用具有重要意义。有体外实验表明,硝苯地平 and 克霉唑可以激活PXR^[10],但不能诱导成鱼斑马鱼肝脏中CYP3A65的表达^[17]。关于核受体对CYP3A65的调控作用,仍存在一定争议。本实验结果显示,在斑马鱼发育过程中,全鱼组织、肝脏和肠道组织中,CYP3A65与PXR、AHR2 mRNA表达之间存在显著相关性,在一定程度上证实了上游核受体与CYP3A65之间存在调控关系。

斑马鱼幼鱼和成鱼中分离的肝微粒体之间存在生物活性差异。与幼鱼相比,斑马鱼成鱼肝微粒体能代谢睾酮产生更多的羟基化代谢产物^[16]。同时,Alderton等^[18]研究也表明,7 dpf 斑马鱼幼鱼中仅能检测到一种羟基睾酮代谢物。斑马鱼成鱼和人肝微粒均能代谢非特异性CYP450底物苯氧基-甲基-试卤灵(BOMR),但斑马鱼胚胎不能代谢BOMR^[19]。2.5 hpf的斑马鱼胚胎酯酶、Aldh、Gst、Nat和EROD都具有固有的外源性化合物代谢酶活性,代谢酶活性也随斑马鱼发育呈动态变化^[20]。斑马鱼胚胎中CYP450的相关代谢活性较差,作为动物模型应用于药物代谢研究时需要进行考证。了解斑马鱼在发育过程中代谢酶表达与活性的变化,是更好地应用斑马鱼模型的基础。本实验表明,CYP3A65、PXR和AHR2基因在斑马鱼144 hpf和75 dpf 2个发育时间点表达水平最高。因此,基因表达结果表明,幼鱼期144 hpf和稚鱼期75 dpf的斑马鱼最适宜用于与CYP3A65相关的药物代谢研究。

通过考察斑马鱼在不同生长阶段药物代谢酶基因CYP3A65及其上游调控核受体基因PXR、AHR2的表达,分析斑马鱼在生长发育过程中重要药物代谢酶基因表达水平的规律及相关性。在药物代谢研究中需要标准化、规范化选择处于适宜生长阶段的斑马鱼,以确保代谢模型足够稳定,缩短培养周期及节约经济成本。CYP450酶活性与其mRNA表达水平有良好的一致性^[8,21]。基因水平的表达部分解释了CYP3A65蛋白水平的表达,后续将通过酶活性实验为斑马鱼生长发育过程中代谢酶活性的变化提供更多参考。

石美智为本文同等贡献第一作者。

参考文献:

- [1] Kari G, Rodeck U, Dicker A P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery[J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 82(1): 70-80.
- [2] Howe K, Clark M D, Torroja C F, *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [3] Kettleborough R N, Busch-Nentwich E M, Harvey S A, *et al.* A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 494-7.
- [4] Postlethwait J H, Woods I G, Ngo-Hazelett P, *et al.* Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes[J]. *Genome Research*, 2000, 10(12): 1890-1902.
- [5] Thompson E D, Burwinkel K E, Chava A K, *et al.* Activity of phase I and phase II enzymes of the benzo[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology c-Toxicology & Pharmacology*, 2010, 152(3): 371-8.
- [6] Qiu H, Taudien S, Herlyn H, *et al.* CYP3 phylogenomics: evidence for positive selection of CYP3A4 and CYP3A7[J]. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2008, 18(1): 53-66.
- [7] 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]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 205(3): 247-58.
- [8] Goldstone J V, McArthur A G, Kubota A, *et al.* Identification and developmental expression of the full complement of cytochrome P450 genes in zebrafish[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 643.
- [9] Bainy A C, Kubota A, Goldstone J V, *et al.* Functional characterization of a full length pregnane X receptor, expression *in vivo*, and identification of PXR alleles, in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 142-143(20): 447-57.
- [10] Moore L B, Maglich J M, McKee D D, *et al.* Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors[J]. *Molecular Endocrinology*, 2002, 16(5): 977-86.
- [11] Chang C T, Chung H Y, Su H T, *et al.* Regulation of zebrafish CYP3A65 transcription by AHR2[J].

- Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 270(2): 174-84.
- [12] Kubota A, Goldstone J V, Lemaire B, *et al.* Role of pregnane X receptor and aryl hydrocarbon receptor in transcriptional regulation of *pxr*, *cyp2*, and *cyp3* genes in developing zebrafish[J]. *Toxicological Sciences*, 2015, 143(2): 398-407.
- [13] Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control[J]. *Nature*, 2011, 473(7439): 337-42.
- [14] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)[M]. 4th ed. Eugene, America: University of Oregon Press, 2000.
- [15] Jenny M J, Karchner S I, Franks D G, *et al.* Distinct roles of two zebrafish AHR repressors (AHRRA and AHRRB) in embryonic development and regulating the response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin[J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 110(2): 426-41.
- [16] Chng H T, Ho H K, Yap C W, *et al.* An investigation of the bioactivation potential and metabolism profile of zebrafish versus human[J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2012, 17(7): 974-86.
- [17] Bresolin T, de Freitas Rebelo M, Celso Dias Bainy A. Expression of *PXR*, *CYP3A* and *MDR1* genes in liver of zebrafish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C- Toxicology and Pharmacology*, 2005, 140(3): 403-407.
- [18] Alderton W, Berghmans S, Butler P, *et al.* Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae[J]. *Xenobiotica*, 2010, 40(8): 547-557.
- [19] Verbueken E, Alsop D, Saad M A, *et al.* *In vitro* biotransformation of two human CYP3A probe substrates and their Inhibition during early zebrafish development[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(1): 217.
- [20] Otte J C, Schultz B, Fruth D, *et al.* Intrinsic xenobiotic metabolizing enzyme activities in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Toxicological Sciences*, 2017, 159(1): 86-93.
- [21] Jönsson M E, Jenny M J, Woodin B R, *et al.* Role of AHR2 in the expression of novel cytochrome P450 family genes, cell cycle genes, and morphological defects in developing zebra fish exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin[J]. *Toxicological Sciences*, 2007, 100(1): 180-193.

Expression of metabolic enzyme *CYP3A65* and its upstream nuclear receptor *PXR* and *AHR2* genes during zebrafish (*Danio rerio*) developmental stages

QI Meijuan¹, SHI Meizhi^{2,3}, ZHANG Jingxian³, CHEN Junjun^{2,3}, ZHANG Xiangqi³,
YANG Jiao^{2,3}, GUO Cheng³, HAN Yonglong^{2,3*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Department of Pharmacy, Shanghai University of

Medicine & Health Sciences Affiliated Sixth People's Hospital East Campus, Shanghai 201306, China;

3. Department of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

Abstract: Drug metabolizing enzyme *CYP3A65* is the only member of *Danio rerio* *CYP3A* subfamily. Our study was conducted to select appropriate *D. rerio* developmental stage, by investigating the expression of *CYP3A65* and its upstream nuclear receptor (*PXR* and *AHR2*) during developmental stages. The zebrafish in different growth stages were raised, and the whole fish tissues, liver tissues and intestinal tissues were taken. The relative expression levels of *CYP3A65*, *PXR* and *AHR2* were measured, and the correlation between nuclear receptors and metabolic enzyme mRNA was compared to confirm the regulating effect of nuclear receptors. In whole fish, liver and intestine tissues, the mRNA levels of *CYP3A65*, *PXR* and *AHR2* were the highest in 144 hpf larvae and 75 dpf juvenile *D. rerio*. The change trends of metabolic enzyme and nuclear receptors gene expression were consistent, and affected by the proportion of liver and intestine relative to whole fish. The 144 hpf and 75 dpf *D. rerio* may be in the juvenile stage and throughout the growth phase, and are most suitable for *CYP3A65* metabolism studies. There were significant correlations between *CYP3A65* and *PXR* and *AHR2* mRNA expression, and correlation between *CYP3A65* and *AHR2* was better. In our later work, the enzyme activity and protein expression will be further investigated during *D. rerio* development, which would provide more information for the model organism *D. rerio*.

Key words: *Danio rerio*; *CYP3A65*; *PXR*; *AHR2*; mRNA expression; developmental stages

Corresponding author: HAN Yonglong. E-mail: yonglongh@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (81773949), Pudong Commission of Science and Technology and Economy and Informatization (PKJ2017-Y07), Pudong Commission of Health and Family Planning (PW2017E-2); Shanghai Sixth People's Hospital East Campus Scientific Research Foundation (2016018)