

昆明种小鼠细胞色素氧化酶 *CYP1A* 基因表达的昼夜节律变化

金涛¹, 张丹¹, 徐懿乔¹, 徐尚福¹, 刘杰², 陆远富¹

(1. 遵义医学院药理学教研室及贵州省基础药理重点实验室, 贵州遵义, 563000; 2. *University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66160, USA*)

摘要: 目的 探究昆明种小鼠细胞色素氧化酶 1A1 (*CYP1A1*) 的昼夜节律、性别差异以及对肝毒物毒性变化的影响。方法 昆明小鼠在环境控制的 SPF 饲养室内适应性饲养 2 周后, 于 06:00, 10:00, 14:00, 18:00, 22:00 和次日 02:00 处死取肝, 用逆转录 PCR 方法检测 24 h 内核激素孤儿受体 α (*Rev-erb α*), 时钟基因 (*Per*) 1, *Per*2 和 *CYP1A1*, *CYP1A2* 及其调控核受体基因 AhR 的表达。另取小鼠于 6:00 和 18:00 ip 给予对乙酰氨基酚 500 mg·kg⁻¹, 12 h 后检测血清中丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 活性。结果 细胞色素氧化酶基因 *CYP1A1*, *CYP1A2* 及其调节基因 AhR 在 18:00 左右表达最高, 且雌鼠的表达高于雄鼠, 在 6:00 左右表达最低, 表达峰谷差为 4~7 倍, 其节律变化的差异与 *Rev-erb α* , *Per*1, *Per*2 的节律差异大致相符。与此节律相对应, 对乙酰氨基酚引起的肝毒性在 18:00 给药高于 6:00 给药。结论 昆明种小鼠细胞色素氧化酶 *CYP1A1* 基因表达存在昼夜节律及性别差异, 该差异可影响肝毒物如对乙酰氨基酚的代谢和毒性。

关键词: 细胞色素 P450 *CYP1A1*; 昼夜节律; 性别特性; 基因表达

中图分类号: Q55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2013)03-0406-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.03.017

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 是以还原态与 CO 结合后在 450 nm 处具有最高吸收峰的含血红素的单链蛋白质。90% 以上药物和毒物代谢都要通过肝微粒体酶 CYP, 因此 CYP 活性差异会造成其催化的许多代谢和药理毒理效应的差异^[1]。昼夜节律是多种生物行为和生理水平周期性波动的现象, 而昼夜节律产生和维持的分子基础是时钟基因的节律性表达^[2]。最新发现表明, 昼夜节律在生物学和药理学研究中极为重要, 尤其是细胞色素氧化酶的节律。时钟基因调控下的 CYP 能够随着机体昼夜活动而变化, 是时辰药理学研究的一个重要部分。对昆明小鼠血液中 cAMP 和 cGMP 含量昼夜节律的变化^[3]及光周期对其昼夜节律的影响的研究已有报道^[4], 但对其细胞色素氧化酶昼夜节律却未见报道, 故本研究主要通过检测

芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 介导的 *CYP1A1* 和 *CYP1A2* 基因在昆明小鼠肝中昼夜表达的变化, 来探讨 *CYP1A1* 节律的变化、性别差异及其对肝毒物毒性作用的影响。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和仪器

对乙酰氨基酚, 购自美国 Sigma 公司, 临用时用蒸馏水配成 500 mg·kg⁻¹。Trizol 和 Power SYBR Green PCR Master Mix, 购自美国 TakaRa 公司; RNA 纯化试剂盒, 购自上海华舜生物技术有限公司; High Capacity Reverse Transcriptase Kit, 购自美国 Applied Biosystems 公司; 丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 测定试剂盒和天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 测定试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所。

荧光定量 PCR 仪, 为美国 Bio-Rad 公司产品。多功能梯度 PCR 仪, 为德国 Eppendorf 公司产品。TU-1810 紫外-可见分光光度计, 为北京普析通用仪器有限责任公司产品。KDL-2044 低速冷冻离心机, 为科大创新股份有限公司产品。

1.2 动物

68 只昆明小鼠, 6 周龄, 体质量 18~22 g, 雌雄

基金项目: 贵州省科技厅国际合作基金 (2009-70019); 贵州省科技厅药物代谢动力学平台项目 (黔科 2008-002); 贵州省研究生教育创新基地 (023)

作者简介: 金涛 (1984 -), 男, 硕士研究生, 主要从事药物代谢与毒理研究, E-mail: jintaoCX1@163.com; 陆远富 (1971 -), 教授, 博士, 研究生导师, 主要从事药物代谢与毒理研究。

通讯作者: 陆远富, E-mail: yflu@ZMC.edu.cn, Tel: (0852)8609623

各半,由重庆第三军医大大坪医院动物中心提供,动物许可证号: SCXK(渝)2007-0005。饲养于遵义医学院 SPF 程控环境,光照 12 h ~ 12 h 交替,给予充分自由饮水、进食,观察活动,毛色,二便,适应性饲养两周后进行实验。动物许可证号: SYXK(黔)2011-004。

1.3 逆转录 PCR 法检测时钟基因和 *CYP1A1*, *CYP1A2* 和 *AhR* 的表达

为了确定昆明小鼠 *CYP1A* 和 *AhR* 的时间节律性,本实验首先检测时钟蛋白基因(*period protein*, *Per*) *1*, *Per2*, 核激素孤儿受体(*Rev-erb alpha*, *Rev-erb α*)的昼夜节律。小鼠 48 只,雌雄各半,随机分为 12 组,每组 4 只。在 24 h 内分别于 06:00, 10:00, 14:00, 18:00, 22:00 及次日 02:00 处死取肝。取 50 ~ 100 mg 肝组织置于 1 ml Trizol 中匀浆,按试剂盒要求提取和纯化总 RNA。纯化的 RNA 测其 A_{260}/A_{280} 值,检测其纯度和浓度。采用 High Capacity Reverse Transcriptase Kit 逆转录纯化的 RNA,所得 cDNA 利用特异引物(表 1)进行实时定量 PCR 扩增,反应条件参照试剂盒说明书进行。利用 β 肌动蛋白对各基因的表达进行归一化处理来表示目的基因的相对表达量(%)。

Tab. 1 Primer sequences for reverse transcription (RT)-PCR

Gene	Primer	Length/bp
β -Actin	F: 5'-TGACCGAGCGTGCTACAG-3'	84
	R: 5'-GGGCAACATAGCACAGCTTCT-3'	
AhR	F: 5'-ACCAGAACTGTGAGGGTTGG-3'	114
	R: 5'-CTCCCATCGTATAGGGAGCA-3'	
CYP1A11	F: 5'-TGCCCTTCATTGGTCACATG-3'	83
	R: 5'-CACGTCCCCATACTGCTGACT-3'	
CYP1A12	F: 5'-GACATGGCCTAACGTGCAG-3'	83
	R: 5'-GGTCAGAAAGCCGTGGTTG-3'	
Per1	F: 5'-ACCAGGTCATTAAGTGTGTGC-3'	130
	R: 5'-CTCTCCCGTCTTGCTTCA-3'	
Per2	F: 5'-CCTACAGCATGGAGCAGGTTGA-3'	94
	R: 5'-TTCCAGAAACCAGGGACACA-3'	
Rev-Erb α (Nr1d1)	F: 5'-GTGAAGACATGACGACCCTGGA-3'	126
	R: 5'-TGCCATTGGAGCTGCTACTGTAG-3'	

AhR: aryl hydrocarbon receptor; Per: period protein; Rev-Erb α : nuclear receptor.

1.4 对乙酰氨基酚不同时段给药后血清中 ALT 和 AST 的检测

另取 1.2 小鼠 20 只,雌雄随机分为 4 组,在 24 h 内分加别于 6:00 和 18:00 时 ip 给予对乙酰氨基酚 500 mg · kg⁻¹, 12 h 后断头取血。上述全血经 1566 × g 离心 15 min 后取上清,采用 ALT 测定试剂盒

、AST 测定试剂盒测定血清中的 ALT 和 AST 活性。

1.5 统计学分析

实验结果数据采 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析,组间比较用 LSD 检验。

2 结果

2.1 时钟基因 *Per1*, *Per2* 和 *Rev-erb α* mRNA 在小鼠肝中的昼夜节律变化

Per1, *Per2* 和 *Rev-erb α* mRNA 在昆明小鼠肝中的表达具有明显的昼夜节律波动,并且具有雌雄差异。图 1 可见,*Per1* mRNA 雌性表达高峰约位于 18:00 时,雄性约位于 22:00 时,其表达低谷均约位于 10:00 时,雌性和雄性谷值与峰值相差分别为 29 和 20 倍。*Per2* mRNA 雌性表达在 18:00 时左右达到高峰,14:00 时表达最低,其峰谷值相差 23 倍;雄性表达低谷较雌性提前 4 h,而高峰却较雌性晚

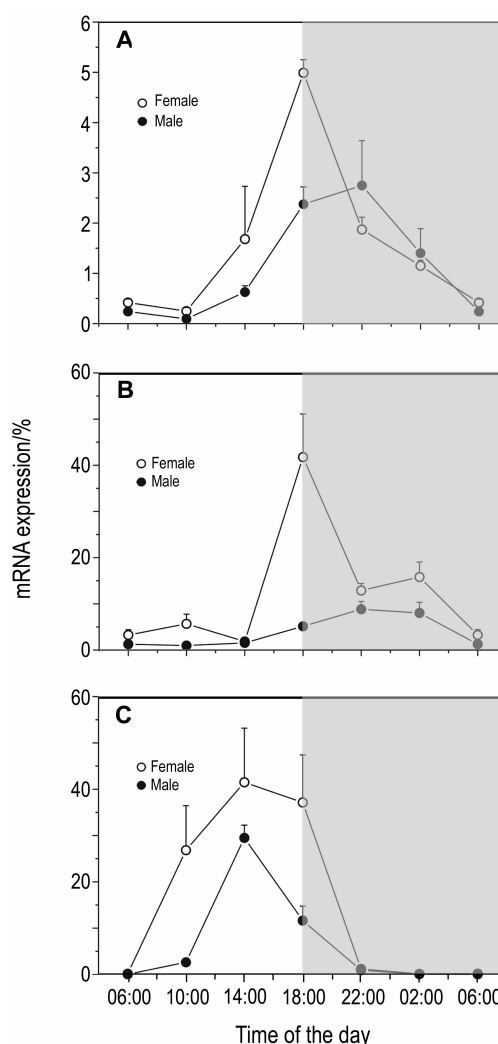


Fig. 1 Expression of *Per1* (A), *Per2* (B) and *Rev-erb α* (C) mRNA in liver of mice by RT-PCR. Forty eight mice were anesthetized and livers were collected at 6:00, 10:00, 14:00, 18:00, 22:00 and 2:00. $\bar{x} \pm s$, $n=4$.

4 h,其峰谷值相差 9 倍。雌性和雄性 *Rev-erb α* mRNA 表达高峰均约位于 14:00 时,表达低谷也同在 6:00 时;雌性最低值与峰值相差 347 倍,雄性相差 717 倍。由图 2 可见,在严格控制光照、食物的 SPF 级动物饲养条件下,昆明种小鼠肝的时钟基因表达显示明显的昼夜节律变化,类似于其他哺乳类动物具有节律性。且以雄性 *Per1*, *Per2* 和 *Rev-erb α* mRNA 表达峰值(1.90 \pm 0.38, 8.80 \pm 1.71, 29.5 \pm 2.76)为基准,雌性 *Per1* 和 *Per2* 表达均明显高于雄性($P < 0.05$)。

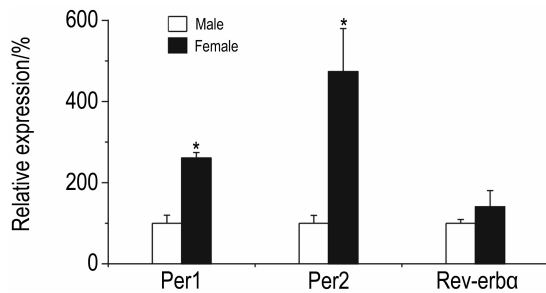


Fig. 2 Sex variation of *Per1*, *Per2* and *Rev-erb α* mRNA expression in livers of mice. See Fig. 1 for mice treatment. Take the peak of *Per1*, *Per2* and *Rev-erb α* in male as 100. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. * $P < 0.05$, compared with male group.

2.2 AhR, *CYP1A1* 和 *CYP1A2* mRNA 在小鼠肝中的昼夜节律变化

如图 3 所示,*CYP1A1* 和 *CYP1A2* 及其调节基因 *AhR* 的 mRNA 节律性表达明显, *CYP1A1* 和 *CYP1A2* mRNA 表达存在明显的性别差异。在检测的六个时间点中, *AhR* mRNA 雌雄表达高峰均约位于 18:00 时;而低谷时间点分别为 6:00 时, 2:00 时。雌、雄最低值与峰值相差 6 倍。 *CYP1A1* 和 *CYP1A2* mRNA 表达高峰雌雄一致位于 14:00 时,表达低谷同位于 6:00 时。 *CYP1A1* mRNA 峰谷值雌性相差 4 倍,雄性相差 29 倍;雌性 *CYP1A2* mRNA 最低值与峰值相差 3 倍,雄性相差 5 倍。由图 4 可见,昆明种小鼠的 *AhR*, *CYP1A1* 和 *CYP1A2* mRNA 均呈明显的昼夜节律变化,且与时钟基因 *Per1*, *Per2* 和 *Rev-erb α* mRNA 的节律性一致,并存在着性别差异。以 *AhR*, *CYP1A1*, *CYP1A2* mRNA 表达峰值雄性(2.5 \pm 0.29, 10.6 \pm 0.84, 384.1 \pm 63.7)作为基准,雌性 *CYP1A1* 和 *AhR* 表达均明显高于雄性($P < 0.05$)。

2.3 对乙酰氨基酚在不同时间点给药对血 ALT 和 AST 活性的影响

图 5 结果显示,于 6:00 时给予过量对乙酰氨基酚,其 ALT 和 AST 均已超过正常值,升至 58.8

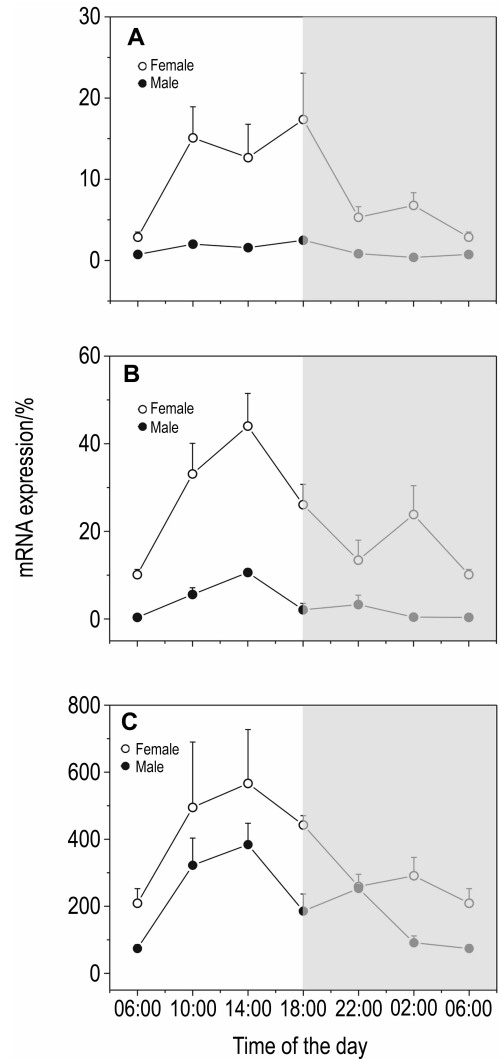


Fig. 3 Expression of *AhR* (A), *CYP1A1* (B) and *CYP1A2* (C) mRNA in liver of Kunming mice. See Fig. 1 for mice treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

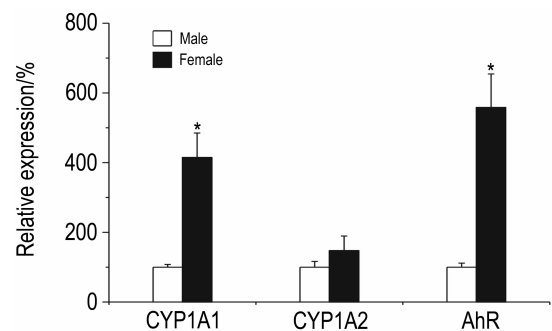


Fig. 4 Sex variation of *AhR*, *CYP1A1*, *CYP1A2* mRNA in liver of mice. See Fig. 1 for mice treatment. Take the peak of *AhR*, *CYP1A1* and *CYP1A2* in male as 100. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. * $P < 0.05$, compared with male group.

和 182.2 U·L⁻¹。再于 18:00 时给予等量的对乙酰氨基酚,与 6:00 相比较,小鼠血清中 ALT 和 AST 均明显升高($P < 0.05$),其检测值变化为 359.8 和 449.6 U·L⁻¹,损伤程度明显加重,且与 *CYP1A2*

mRNA 表达相一致。

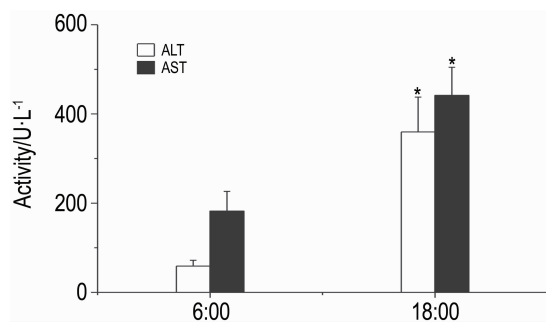


Fig. 5 Effect of paracetamol on serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) at different time points in Kunming mice. Paracetamol 500 mg·kg⁻¹ was ip given 20 mice at 6:00 and 18:00, respectively, and hepatotoxicity was evaluated 12 h later by serum enzyme activities. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with the same enzyme at 06:00.

3 讨论

时钟基因昼夜节律也影响其他基因的表达^[5-6]。而时钟基因的节律性表达构成了昼夜节律产生和维持的分子基础。在昼夜不同时间点分别给予动物相同剂量的药物可能产生不同的吸收、分布、代谢和排泄过程,导致其药效、药代动力学、毒性均具有明显的昼夜节律差异^[7]。本实验揭示了昆明小鼠基因 *CYP1A1* 及其调控基因 *AhR* 存在的明显昼夜节律,并与时钟基因 *Per1*, *Per2* 和 *Rev-erb α* 节律性一致,且此变化影响对乙酰氨基酚对小鼠肝毒性。

研究表明, *AhR* 及相应的核受体存在着节律变化,且这种变化受到时钟基因 *Per1* 和 *Per2* 的影响^[8], *AhR* 在野生型小鼠的肺中表达具有明显的 24 h 节律,而在时钟基因 *Clk/Clk* 缺失的小鼠中却不具备节律性^[9],说明时钟基因参与 *AhR* 和 *CYP1A1* 的昼夜节律调节。另一方面,在小鼠肝中受到激活的 *AhR* 能改变 *Per1* 的节律,提示了 *Per1* 基因与 *AhR* 的相互作用^[10]。本实验结果显示,在昆明小鼠肝中 *AhR* 与时钟基因 *Per1* 和 *Per2* 的表达的一致性,同在 18:00 达到高峰。

AhR 通过与多环芳烃和多卤化烃结合后,进而影响 I 相代谢酶 *CYP1A1* 的表达^[11]。*CYP1A1* 亚族包括 *CYP1A1* 与 *CYP1A2*。*CYP1A1* 可能通过某种物质对 *AhR* 存在反馈调节, *CYP1A1* 与 *CYP1A2* 存在着相互作用,通过雌激素受体介导 *CYP1A2* 可以影响 *CYP1A1* 的表达^[12]。本实验结果显示,昆明小鼠肝中 *CYP1A1*, *CYP1A2* 与 *AhR* 基因表达高峰并不在同一时间点上,但都在下午到

傍晚时表达最高,这与 Zhang 等^[13] 关于药物代谢基因表达研究的报道相一致。

多环芳烃经 *CYP1A1* 代谢而致癌,主要致癌靶器官为肺和皮肤。*CYP1A2* 参与许多前致癌物和前毒物的代谢活化,生成亲电性很强的中间产物或终产物,造成细胞损害或诱导凋亡^[14]。有研究显示,在 *Per1*, *Per2* 和 *Per1/Per2* 缺失的小鼠中,经四氯二苯并二噁英诱导的 *CYP1A1* 在乳腺及肝中的表达基本上没有节律性变化,而且其表达量要比正常小鼠要低^[15],提示时钟基因参与 *CYP1A1* 表达的调控。因此推测时钟基因影响下的 *AhR* 和 *CYP1A1* 的变化节律可能会引起某些药物的肝毒性变化。对乙酰氨基酚在体内主要经由 *CYP2E1* 和 *CYP1A1* 代谢。过量服用对乙酰氨基酚,其代谢的毒性产物 N-乙酰-对苯醌亚胺耗尽肝细胞内谷胱甘肽,继而与细胞内含电子基团共价结合,破坏细胞膜的完整性及细胞器的功能,并最终导致肝细胞损伤甚至死亡^[16]。本实验昆明小鼠血清中 ALT 和 AST 检测结果表明,对乙酰氨基酚在 18:00 时肝毒性高于 6:00 时。提示了在不同时间点给予过量的对乙酰氨基酚,其毒性大小可能随着 *CYP1A1* 的节律变化而改变。

时钟基因隐色素 (cryptochrome 1) (*Cry1*) 和 *Cry2* 的调控与 *CYP450* 酶的表达的性别差异有关^[17]。本实验观察中发现,正常昆明种小鼠肝 *AhR* 和 *CYP1A1* mRNA 表达存在性别差异,然而其具体机制需要进一步研究。综上所述,昆明小鼠基因 *CYP1A1* 及其调控基因 *AhR* 存在的明显昼夜节律,且此变化影响了对乙酰氨基酚对小鼠肝毒性。

参考文献:

- [1] Zhu LQ, Lou JS. Resent studies on cytochrome P450 and drug metabolism[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*(中国临床药理学与治疗学), 2004, 9(10):1081-1086.
- [2] Liu S, Cai YN, Xie S, Guan YQ, Chen B. Expression of clock gene in C57 mouse peripheral tissues[J]. *Basic Clin Med*(基础医学与临床), 2007, 27(12):1305-1308.
- [3] Zhu JH. Circadian physiological rhythm of cAMP and cGMP in mice[J]. *Acta Acad Med Suzhou*(苏州医学院学报), 2000, 20(7):626-627, 649.
- [4] Ren XT, Yang YY, Zhang N, Wang ZL, Li YW, Lu JQ. Effects of photoperiods on circadian rhythm and activity of mandarin voles and Kunming mice[J]. *Chin J Zool*(动物学杂志), 2011, 46(4):32-39.
- [5] Hirao J, Nishimura M, Arakawa S, Niino N, Mori K, Furukawa T, et al. Sex and circadian modulatory effects on rat liver as assessed by transcriptome analyses[J]. *J Tox-*

- icol Sci*, 2011, **36**(1):9-22.
- [6] Xu YQ, Zhang D, Jin T, Cai DJ, Wu Q, Lu Y, *et al*. Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(8):e44237.
- [7] Wang HF, Huang CX. Advance in the research of time pharmaceutical dynamics[J]. *China Trop Med*(中国热带医学), 2005, **5**(6):1342-1344, 1375.
- [8] Qu X, Metz RP, Porter WW, Neuendorff N, Earnest BJ, Earnest DJ. The clock genes period 1 and period 2 mediate diurnal rhythms in dioxin-induced Cyp1A1 expression in the mouse mammary gland and liver [J]. *Toxicol Lett*, 2010, **196**(1):28-32.
- [9] Tanimura N, Kusunose N, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Aryl hydrocarbon receptor-mediated Cyp1a1 expression is modulated in a CLOCK-dependent circadian manner [J]. *Toxicology*, 2011, **290**(2-3):203-207.
- [10] Xu CX, Krager SL, Liao DF, Tischkau SA. Disruption of CLOCK-BMAL1 transcriptional activity is responsible for aryl hydrocarbon receptor-mediated regulation of Period1 gene [J]. *Toxicol Sci*, 2010, **115**(1):98-108.
- [11] Zhou XH, Han X. AhR, CYP1A1, CYP1B1 and the metabolism and action of estrogen and their regulation [J]. *J Med Mol Biol*(医学分子生物学杂志), 2005, **2**(3):236-239.
- [12] Ye X, Wang YG, Gao Y. Roles of aryl hydrocarbon receptor regulating cytochrome P-450 1A in toxic responses caused by environmental pollutants [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2008, **22**(4):316-320.
- [13] Zhang YK, Yeager RL, Klaassen CD. Circadian expression profiles of drug-processing genes and transcription factors in mouse liver [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, **37**(1):106-115.
- [14] Hu YZ, Yao TW. Advance in the research of cytochrome P4501A [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2003, **38**(4):246-250.
- [15] Qu X, Metz RP, Porter WW, Cassone VM, Earnest DJ. Disruption of period gene expression alters the inductive effects of dioxin on the AhR signaling pathway in the mouse liver [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, **234**(3):370-377.
- [16] Zhang NH. Advance in the research of the hepatotoxicity of paracetamol [J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2006, **26**(10):1284-1286.
- [17] Bur IM, Cohen-Solal AM, Carmignac D, Abecassis PY, Chauvet N, Martin AO, *et al*. The circadian clock components CRY1 and CRY2 are necessary to sustain sex dimorphism in mouse liver metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284**(14):9066-9073.

Circadian rhythm variation of cytochrome CYP1A gene expression in liver of Kunming mice

JIN Tao¹, ZHANG Dan¹, XU Yi-qiao¹, XU Shang-fu¹, LIU Jie², LU Yuan-fu¹

(1. Dept of Pharmacology and Key Lab of Basic Pharmacology of Guizhou, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China; 2. University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66160, USA)

Abstract: OBJECTIVE To examine circadian rhythm and sex variation of cytochrome P-450 1A1 (*CYP1A1*) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) expression in the liver of Kunming (KM) mice. **METHODS** Adult KM mice were maintained in the SPF-grade animal facilities for 2 weeks, and livers were collected every 4 h during the 24 h period. Total RNA was isolated, purified, and subjected to reverse transcription (RT)-PCR analysis for expression of *CYP1A1*, AhR and clock genes. Paracetamol 500 mg·kg⁻¹ was ip given another 20 mice at 6:00 and 18:00, and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined. **RESULTS** The expressions of AhR and AhR-regulated *CYP1A11* and *CYP1A12* peaked about 18:00 pm and reached the nadir about 6:00 am. Sex-differences for AhR (6-fold for females and 7-fold for males), *CYP1A11* (4-fold for females and 29-fold for males), and *CYP1A12* (3-fold for females and 5-fold for males) were also evident. The circadian variation of *CYP1A1* and AhR resembled the clock genes *Rev-erb α* , *Per1* and *Per2*. Circadian rhythm of *CYP1A1* expression influenced the hepatotoxicity of paracetamol, which is bioactivated by *CYP1A1*. **CONCLUSION** Circadian rhythm and sex variation of *CYP1A1* and AhR were evident in the liver of KM mice, which could impact the pharmacology and toxicology of drugs such as paracetamol.

Key words: cytochrome P-450 CYP1A1; circadian rhythm; gender identity; gene expression

Foundation item: The project supported by Guizhou Science and Technology Funds(2009-70019); Guizhou Science and Technology Pharmacokinetics Platform Project(2008-002); and Guizhou Graduate Education Fund(023)

Corresponding author: LU Yuan-fu, E-mail: yflu@ZMC.edu.cn, Tel: (0852)8609623

(收稿日期: 2012-07-10 接受日期: 2012-10-07)

(本文编辑: 付良青)