

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.004

实验用西藏小型猪 CYP3A 基因的克隆及序列分析 *

卢康荣^{1#} 白 静^{2#} 张嘉宁³ 顾为望³ 黄黎珍² 王万山^{3△}

(1 南方医科大学基础医学院 广东 广州 510515; 2 华南理工大学生物科学与工程学院 广东 广州 510515;

3 南方医科大学实验动物中心 广东 广州 510515)

摘要 目的:克隆西藏小型猪 CYP3A 基因并与人及其它小型猪品种进行序列比对分析。**方法:**根据 Genebank 数据库设计引物,取西藏小型猪新鲜肝脏组织,Trizol 法提取肝脏总 RNA,应用 RT-PCR 反转获得肝脏 cDNA。分别扩增基因 CYP3A46、CYP3A22、CYP3A29 及 CYP3A39,PCR 片段回收后分别连接 pMD-18T 载体,获得重组质粒 pT-CYP3A,阳性重组克隆送测序。采用 NCBI Blast 及 vector NTI 软件进行序列比对分析。**结果:**CYP3A46、CYP3A22、CYP3A29 及 CYP3A39 基因编码序列全长 1512 bp,编码 503 个氨基酸,与人 CYP3A4 相同。其中 CYP3A22 和 CYP3A39 与 NCBI 记录巴马小型猪序列相同;CYP3A46 与巴马小型猪 CYP3A46(NM_001134824.1)有 6 个位点碱基不同。CYP3A29 与巴马小型猪 CYP3A46(EU918131.1)亦有 6 个位点碱基不同。对来自 2 个母本后代猪的基因经过 PCR 扩增后测序发现 CYP3A46、CYP3A29 序列完全一致。**结论:**成功克隆西藏小型猪 CYP3A 的 4 个基因,其中 CYP3A46 与人 CYP3A4 的序列相似性最高。所得 CYP3A46 与 CYP3A29 序列可能为西藏小型猪独有。

关键词:细胞色素 P450 酶;西藏小型猪;克隆;序列分析

中图分类号:R-33;Q78;R918 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)07-1218-04

Cloning and Sequence Analysis of CYP3A Gene in Tibet Minipig*

LU Kang-rong^{1#}, BAI Jing^{2#}, ZHANG Jia-ning³, GU Wei-wang³, HUANG Li-zhen², WANG Wan-shan^{3△}

(1 Basic Medical College of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China;

2 School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong, 510515, China;

3 Laboratory Animal Service Center, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China)

ABSTRACT Objective: Cloning of CYP3A from laboratory Tibet minipig and sequence comparison with human and other minipig breeds. **Methods:** Primers were synthesized according to Genebank data. Liver cDNA was gained by RT-PCR methods from total RNA, which was extracted from fresh Tibet minipig liver tissue, CYP3A46, CYP3A22, CYP3A29 and CYP3A39 were amplified respectively, PCR fragments were recovered and cloned into vector pMD18-T, and recombinant plasmids were obtained, the positive clones were sequenced. NCBI Blast and vector NTI software were employed to analyze the sequences. **Results:** Full length of the coding sequence of CYP3A46, CYP3A22, CYP3A29 and CYP3A39 is 1512bp, coding 503 amino acids, same as human CYP3A4, of which CYP3A22 and CYP3A39 sequences were same as the NCBI-recorded Bama minipig. Different bases in 6 sites were found in CYP3A46 when compared to Bama minipig CYP3A46 (NM_001134824.1), and this was also found in CYP3A29 when compared to Bama minipig CYP3A46 (EU918131.1). CYP3A46, CYP3A29 sequences of all the offspring coming from 2 female parent were in full accord. **Conclusions:** 4 genes of Tibet minipig CYP3A were successfully cloned, of which CYP3A46 had the highest sequence similarity to human CYP3A4. CYP3A46 and CYP3A29 sequences may be unique to Tibet minipigs.

Key words: Cytochrome P450 enzyme; Tibet minipig; Clone; Sequence analysis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R918 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1218-04

前言

利用小型猪进行生物医学研究尤其是进行新药开发和临床前安全性评价研究已成为热点^[1-3],小型猪已被 OECD、FDA、ICH 等国际新药注册和评审机构引入其药物研究指导原则中^[4,5]。

2005 年国家食品药品监督管理局(SFDA)明确规定小型猪作为临床前研究的适宜实验动物^[6]。西藏小型猪作为我国小型猪资源品系代表品种之一,已在生物医学领域大量应用,是一种新型实验动物。但目前对西藏小型猪主要代谢酶系 CYP450 及药物代谢特征等基础资料缺乏,限制其动物模型的使用和药

* 基金项目:广东省科技计划项目(2011B060300028; 2012B040304010)

为共同第一作者

作者简介:卢康荣(1977-),博士,主要研究方向:人类疾病动物模型,电话:020-62789009, E-mail: chunhuitd@163.com;

白静(1994-),硕士研究生,研究方向:药物研发相关模型研发

△通讯作者:王万山(1978-),博士,副教授,主要研究方向:人类疾病模型和实验动物培育, E-mail: 610389236@qq.com

(收稿日期:2018-08-07 接受日期:2018-08-31)

理、毒理的深入研究^[78]。

CYP450 系统是人和动物体内主要的 I 相代谢酶, 参与了人和动物体内超过 90% 的内外源物质的转化。其中, CYP3A 约占 CYP450 总量的 30%-40%, 具有广泛的底物代谢谱^[9,10]。肝微粒体水平的研究表明小型猪与人 CYP 酶代谢特性相似, 其中猪的 CYP3A 在催化活性及抑制特性上与人较为接近, 在与大鼠、兔、犬、猴等常用实验动物比较时也得出小型猪适合作为人 CYP3A 评价的动物模型这一结论。对于 CYP3A 来说, 仅有小型猪 CYP3A29 与人 CYP3A4 代谢特性比较的少量报道^[11,12], 信息量十分有限。而西藏小型猪的 CYP450 研究目前还是空白。因此探讨研究西藏小型猪的主要 P4503A 药物代谢酶的基础数据和特征, 将为相关药物代谢研究动物模型使用以及代谢物相关的毒理研究提供理论依据, 进一步推动其在生物医药领域的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

① 6 月龄成年西藏小型猪肝脏组织置液氮中保存; ② 质粒与菌株: pMD18-T 载体(TakaRa 公司), DH5 α 菌株(本实验室保存); ③ 主要试剂: Trizol 总 RNA 抽提试剂 (GIBCO), PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; DNA Marker、普通质粒小提试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于天根公司; 其它试剂为国产分析纯或常规生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 Genebank 中基因序列 CYP3A22 (NM_001195509)、CYP3A29 (NM_214423)、CYP3A39 (NM_214422)、CYP3A46 (NM_001134824), 同时对四个基因序列进行比对, 设计合成共用正向引物 Scyp3a-F: 5'gtggc catgg acctg atc-cc3'; 反向引物 Scyp3a46-R: 5'aagtc aggct ccact tgtgg3', Scyp3a22/29/39-R: 5'aagtc aggct ccact(c) tacgg3'。四个基因扩增共用正向引物 Scyp3a-F, CYP3A46 扩增反向引物 Scyp3a46-R, CYP3A22/29/39 扩增共用反向引物 Scyp3a22/29/39-R。引物送英骏生物技术有限公司合成, 合成规格 20D, PAG 纯化。

1.2.2 西藏小型猪肝脏总 cDNA 的制备 TRIZOL 法提总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。使用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒, 反应体系 10 μ L: dNTP Mixture 1 μ L, OligodT Primer 1 μ L, 模板 RNA 1 μ L, RNase Free dH₂O 7 μ L。于 65 $^{\circ}$ C 保温 5 min 后, 冰上迅速冷却。然后加入: 5 $\times$ PrimeScript II Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor, 0.5 μ L, PrimeScript II RTase 1 μ L, 上述反应液 10 μ L, RNase Free dH₂O 4.5 μ L, 总体积 20 μ L。轻轻混匀, 于 42 $^{\circ}$ C 放置 30~60 min 后, 移至 70 $^{\circ}$ C 放置 15 min, 最后在冰上冷却。

1.2.3 西藏小型猪 CYP3A 基因编码序列的 PCR 扩增 (1) CYP3As 基因 PCR 扩增及目的片段的凝胶回收: 反应体系 25 μ L, 2 $\times$ Prime STAR Max Premix 12.5 μ L, 正向引物(3aF)1 μ L, 反向引物 (3a22/39/46/29R)1 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O, 8.5 μ L。反应程序: 预变性 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10s, 60 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 20s; 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 最后储于 4 $^{\circ}$ C。

(2) PCR 产物两端加 A 反应: 在高保真酶 Prime STAR 进行

PCR 反应结束后, 直接将反应产物加入 ExTaq 酶, 72 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后, 再进行片段的回收。反应体系如下: 上一步 PCR 反应产物 25 μ L, Ex Taq 0.5 μ L, 10 $\times$ Ex Taq Buffer 2.5 μ L, 72 $^{\circ}$ C 进行 10 min, 4 $^{\circ}$ C 储存。

(3) PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳及片段回收: PCR 产物置于 1% 琼脂糖凝胶, 切下目的片段进行回收。取回收后的目的片段 2 μ L, 进行琼脂糖凝胶电泳鉴定回收效率。

1.2.4 CYP3As 连接 pMD18-T 载体 连接反应体系 20 μ L: pMD18-T 质粒 0.5 μ L, 目的基因 10 μ L, T4ligase 0.5 μ L, 10 $\times$ T4ligase Buffer 2 μ L, ddH₂O 7 μ L, 于 16 $^{\circ}$ C 连接两小时或过夜。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 进行阳性克隆的酶切鉴定。反应体系 10 μ L, 10 $\times$ K Buffer 1 μ L, 质粒 3 μ L, BamHI 0.25 μ L, HindIII 0.25 μ L, ddH₂O 5.5 μ L。于 37 $^{\circ}$ C 酶切 2 小时后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 阳性克隆 T-CYP3AX 送去测序。

1.2.5 测序结果的比对分析 应用 NCBI blast 工具, 分别将测序结果与数据库内序列进行比对分析。找出其与其他猪种对应基因及人 CYP3A4 基因的同源性。同时根据 DNA 序列推测其编码蛋白质的氨基酸序列, 并进一步进行氨基酸序列的比对分析。应用 vector NTI 软件对西藏小型猪 CYP3AX 各亚型基因序列的同源性及其差异性进行比对分析。

2 结果

2.1 总 RNA 提取

1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提总 RNA, 可见清晰的 28S、18S、5S 三条带(图 1)。

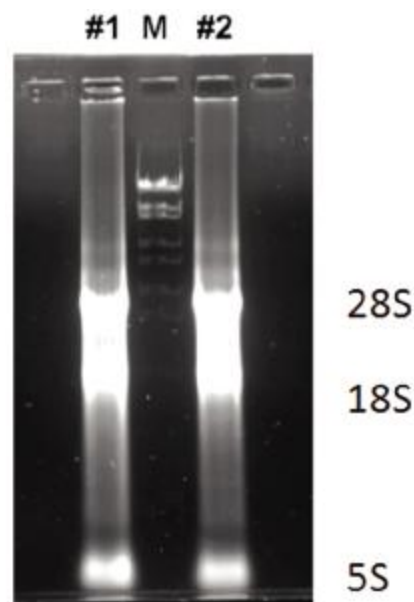


图 1 西藏小型猪肝脏总 RNA 的提取(#1、#2 为分别来自两个母本的后代)

Fig.1 Total RNA extracted from Tibet minipig(#1, #2 representing offspring respectively coming from 2 female parent)

2.2 RT-PCR 结果

分别以混合引物 CYP3A22R、CYP3A29R 及 CYP3A39R, 扩增 CYP3A22、CYP3A29 及 CYP3A39, 结果见图 2。

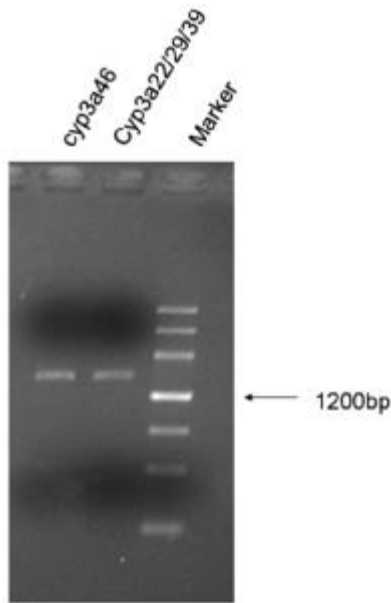


图2 CYP3A PCR 扩增结果电泳图
Fig.2 PCR amplification of CYP3A

2.3 克隆筛选结果

对挑取的克隆 T-CYP3AX,提取质粒,进行 *Bam*HI /*Hind*III 酶切鉴定,结果见图3。可见多数克隆都酶切出 1500bp 大小的片段,即为阳性重组质粒。因此酶切鉴定为阳性的重组质粒送公司进行序列测定。

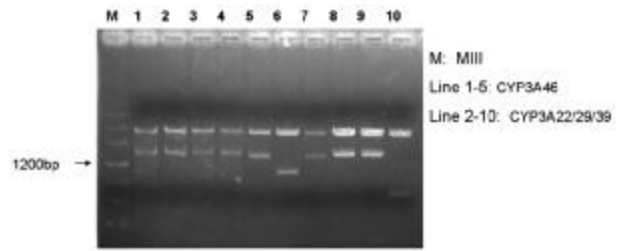


图3 pT-CYP3A 酶切鉴定结果电泳图(1-6,7-9 为阳性克隆)
Fig.3 Enzyme digestion results of pT-CYP3A(1-6,7-9 positive clones)

2.4 测序结果

对扩增所获的 CYP3A 基因进行测序和序列分析发现, CYP3A46、CYP3A22、CYP3A29 及 CYP3A39 基因编码序列全长 1512 bp, 编码 503 个氨基酸, 与人 CYP3A4 相同。其中 CYP3A22 和 CYP3A39 与 NCBI 记录巴马小型猪序列相同; CYP3A46 与巴马小型猪 CYP3A46(NM_001134824.1)有 6 个位点碱基不同:G30A、G81T、C918G、C921T、A958G、A1406G, 推定编码氨基酸序列有两个差异:Lys320Glu、Lys469Arg。CYP3A29 与巴马小型猪 CYP3A46(EU918131.1)亦有 6 个位点碱基不同:A26C、G393A、C909T、A1267C、A1373G、C1471T, 推定编码氨基酸序列有两个差异:Lys9Thr、Lys457Arg。且对来自 2 个母猪后代猪的基因经过 PCR 扩增后测序结果完全一致,故此序列可能为西藏小型猪特有。西藏小型猪 CYP3A46 与巴马小型猪及人 CYP3A 序列比对结果见表 1。

表 1 西藏小型猪 CYP3A46 与巴马小型猪及人 CYP3A 序列相似性

Table 1 The similarity of nucleic acid/amino acid sequences of CYP3A46 in Tibet minipig, Bama minipig and human

Tibet minipig CYP3A46	Bama minipig CYP3A46 (NM_001134824.1)	Human CYP3A4 (AJ563375.1)
CYP3A46 nucleic acid	99%	83%
CYP3A46 amino acid	99%	78%

此外,将所获得的西藏小型猪 CYP3A 的 4 个基因与人 CYP3A4 比对发现,CYP3A46 与人的相似性最高。而西藏小型猪 CYP3A22、CYP3A29、CYP3A46 三个基因之间的序列同源性也非常高,尤其是一些跨膜区的序列非常保守。

3 讨论

利用小型猪进行生物医学研究尤其是进行新药开发和临床前安全性评价研究已成为热点,小型猪作为非啮齿类动物应用于新药非临床安全性评价研究在国际上已占据相当高的地位^[13,14]。西藏小型猪是从西藏引进,在广州地区进行风土驯化及实验动物化的小型猪猪种,研究表明与其他品系小型猪相比,该小型猪具备抗疾病能力强、应激反应小、术后愈合快等优点,是非常有特色的较理想实验小型猪^[9]。本研究首次对该小型猪 CYP3A 代谢酶进行研究,克隆 CYP3A 亚型基因 CYP3A46、CYP3A22、CYP3A29 和 CYP3A39,其编码序列均为 1512bp,编码 503 个氨基酸,与人 CYP3A4 相同。序列比对发现,CYP3A46 及 CYP3A29 是西藏小型猪特有,其中与人 CYP3A4 同源性最高的为 CYP3A46。

目前已命名的猪 P450 基因 59 个,分布于 18 个家族,34

个亚家族,但通过国际细胞色素 P450 命名委员会命名的基因中仅有 30 个功能基因,猪 P450 基因的研究还较为缺乏。国外用于 CYP 酶研究的小型猪主要是 Yucantan 和 Goettingen 这 2 个品系的小型猪。至今,猪的许多种 CYP 酶已进行了 cDNA 测序,有的还提供了完整的 DNA 序列,然而只有少数 CYP 酶进行了深入研究^[16,17]。研究显示,人 CYP 酶的主要典型活性在猪及小型猪肝脏微粒体中均有发现,小型猪 P450 整体活性稍高于普通猪,而和人相近,其中 CYP2E1 和 3A4 活性和人相近,小型猪的 1A2、2A6、2E1、3A、4A 亚型均适合于做为药物代谢模型。小型猪 CYP3A 与人的 CYP3A4 有 60% 的序列同源性,该亚家族共有 4 个基因,即 CYP3A22、CYP3A29、CYP3A39 和 CYP3A88,其中 CYP3A29 研究最多,该酶为人 CYP3A4 在猪体内的同源酶,与人相似,猪肝脏 CYP3A29 也可被苯巴比妥和利福平诱导,但地塞米松的诱导作用较弱。CYP3A22、CYP3A39 和 CYP3A88 的药物代谢特征报道甚少^[18,19]。

国内有研究显示贵州小型香猪肝微粒体内 CYP 酶的主要亚型的反应活性人肝的相应活性接近,其与人 CYP3A 酶的特异性抑制反应亦相似^[20]。还有研究揭示巴马小型猪、贵州小型香猪肝脏 CYP3A29 mRNA 表达水平与报道的人肝脏

CYP3A4 相近^[21,22]。本研究结果提示西藏小型香猪作为药物评价的实验动物具有一定可行性。

与当前国际范围内应用小型猪开展药物研发的热潮相比,我国对小型猪的药物研发应用还未形成规模和习惯^[23,24],这其中最主要的原因就是缺乏小型猪药物研发应用基础研究,缺少基于小型猪开展新药研究的药理、毒理及药代等必备的背景数据资料和实验依据,开展小型猪新药研发应用基础研究已刻不容缓^[25,26]。当前关于小型猪各单酶的代谢特性研究还相当缺乏,克隆其基因及编码区序列进行异源表达是研究其单酶代谢特性的基础条件和重要手段。重组酶成分单一,药物代谢表征明确,被广泛用于酶表征的定性定量研究,是对酶进行特征研究的最佳工具。目前有关猪(小型猪)CYP3A 亚家族同工酶的重组研究,在世界范围报道甚少,猪(小型猪)CYP3A 亚家族同工酶的药物代谢表征几乎全部都是通过人 CYP3A 探针药物的活体动物肝微粒体代谢特征获得,由于特异性探针药物对特定 CYP450 的相对性,以及猪肝微粒体成分的复杂性,其可靠性远低于重组酶^[27,28]。本研究将为西藏小型猪新药研发应用奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Descotes J, Allais L, Ancian P, et al. Nonclinical evaluation of immunological safety in Göttingen Minipigs: The CONFIRM initiative [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2018, 94: 271-275
- [2] Stricker-Krongrad A, Shoemaker CR, Liu J, et al. The importance of minipigs in dermal safety assessment: an overview [J]. Cutan Ocul Toxicol, 2017, 36(2): 105-113
- [3] Almaraz AJ, Brown BN, Arzi B, et al. Preclinical Animal Models for Temporomandibular Joint Tissue Engineering [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2018, 24(3): 171-178
- [4] Helke KL, Nelson KN, Sargeant AM, et al. Pigs in Toxicology: Breed Differences in Metabolism and Background Findings [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(4): 575-590
- [5] Weaver ML, Grossi AB, Schütz J, et al. Vehicle Systems and Excipients Used in Minipig Drug Development Studies [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(3): 367-372
- [6] 化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则 [P]. 国家食品药品监督管理局, 2005
- [7] Qiu G, Shi Z, Xu HHK, et al. Bone regeneration in minipigs via calcium phosphate cement scaffold delivering autologous bone marrow mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12(2): e937-e948
- [8] Liu W, Wu LH, Yue M, et al. Generation of DKK1 transgenic Tibet minipigs by somatic cell nuclear transfer (SCNT) [J]. Oncotarget, 2017, 8(43): 74331-74339
- [9] Guengerich FP. Cytochrome P450 research and The Journal of Biological Chemistry [J]. J Biol Chem, 2018[Epub ahead of print]
- [10] Millemann J, De Clerck L, Govaert E, et al. The Ontogeny of Cytochrome P450 Enzyme Activity and Protein Abundance in Conventional Pigs in Support of Preclinical Pediatric Drug Research [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 470
- [11] 薛正楷, 魏泓, 商海涛, 等. CYP3A29 稳定表达 HepG2 细胞株的建立及其硝苯地平代谢活性鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25: 640-644
- [12] Yao M, Dai M, Liu Z, et al. Comparison of the substrate kinetics of pig CYP3A29 with pig liver microsomes and human CYP3A4 [J]. Biosci Rep, 2011, 31: 211-220
- [13] Rubic-Schneider T, Christen B, Brees D, et al. Minipigs in Translational Immunotoxicology: A Perspective [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(3): 315-324
- [14] Willard-Mack C, Ramani T, Auletta C. Dermatotoxicology: Safety Evaluation of Topical Products in Minipigs: Study Designs and Practical Considerations [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(3): 382-390
- [15] 蔡毅, 卢康荣, 陈妙良, 等. 实验用小型猪细胞色素 P450 酶研究进展 [J]. 动物医学进展, 2014, 35(6): 123-126
- [16] Bian Y, Yao Q, Shang H, et al. Expression of Bama Minipig and Human CYP3A Enzymes: Comparison of the Catalytic Characteristics with Each Other and Their Liver Microsomes [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(9): 1336-1340
- [17] Shang H, Guo K, Liu Y, et al. Constitutive expression of CYP3A mRNA in Bama miniature pig tissues [J]. Gene, 2013, 524 (2): 261-267
- [18] Li J, Liu Y, Zhang JW, et al. Characterization of hepatic drug-metabolizing activities of Bama miniature pigs (*Sus scrofa domestica*): comparison with human enzyme analogs [J]. Comp Med, 2006, 56(4): 286-290
- [19] Li Y, Jiang M, Thunders M, et al. Effect of enrofloxacin and roxarsone on CYP450s in pig [J]. Res Vet Sci, 2018, 117: 97-98
- [20] 李健, 刘勇, 张江伟, 等. 贵州小型香猪与人五种 CYP 酶活性的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(3): 157-161
- [21] 杨家大, 商海涛, 魏泓, 等. 实时荧光定量检测中国实验用小型猪肝脏 CYP3A29mRNA 表达水平 [J]. 遗传, 2007, 29(5): 575-580
- [22] Shang H, Yang J, Liu Y, et al. Tissue distribution of CYP3A29 mRNA expression in Bama miniature pig by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. Xenobiotica, 2009, 39 (6): 423-429
- [23] Ramot Y, Obaya A, McNamara A, et al. Cutaneous Candidiasis in a Göttingen Minipig: A Potential Pitfall in Preclinical Studies [J]. Toxicol Pathol, 2017, 45(8): 1032-1034
- [24] Langston JL, Myers TM. VX toxicity in the Göttingen minipig [J]. Toxicol Lett, 2016, 264: 12-19
- [25] Lignet F, Sherbetjian E, Kratochwil N, et al. Characterization of Pharmacokinetics in the Göttingen Minipig with Reference Human Drugs: An In Vitro and In Vivo Approach [J]. Pharm Res, 2016, 33 (10): 2565-2579
- [26] Colleton C, Brewster D, Chester A, et al. The Use of Minipigs for Preclinical Safety Assessment by the Pharmaceutical Industry: Results of an IQ DruSafe Minipig Survey [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(3): 458-466
- [27] Heining P, Ruyschaert T. The Use of Minipig in Drug Discovery and Development: Pros and Cons of Minipig Selection and Strategies to Use as a Preferred Nonrodent Species [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(3): 467-473
- [28] Shida S, Yamazaki H. Human plasma concentrations of five cytochrome P450 probes extrapolated from pharmacokinetics in dogs and minipigs using physiologically based pharmacokinetic modeling [J]. Xenobiotica, 2016, 46(9): 759-764