

猪苓多糖对四氯化碳诱导的建鲤肝细胞损伤中生化指标及 CYP3A 表达的影响

杜金梁¹ 刘英娟² 曹丽萍¹ 贾睿² 王加豪² 殷国俊^{1,2}

1. 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室/鱼类免疫药理学国际联合实验室/

中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081

摘要 采用胰酶消化法分离原代建鲤肝细胞并进行培养, 用四氯化碳(CCl_4)构建建鲤肝细胞损伤模型, 以3种不同浓度的猪苓多糖进行干预, 检测肝细胞培养液中丙氨酸转氨酶(GPT)、天冬氨酸转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的含量及肝细胞存活率; 收集肝细胞进行RNA提取, 并用RT-PCR法测定CYP3A基因表达情况。结果表明: 以前处理组中质量浓度为0.8 mg/mL的猪苓多糖效果最好, 与 CCl_4 组相比, 显著降低了GOT、GPT、MDA在肝细胞中的释放; 极显著降低了LDH在肝细胞中的释放; 显著升高了肝细胞中SOD活性值; 显著提高了肝细胞的存活率; 显著诱导了CYP3A mRNA的表达。这说明猪苓多糖能有效抑制 CCl_4 所造成的建鲤肝细胞损伤。

关键词 建鲤; 猪苓多糖; 四氯化碳; 肝细胞

中图分类号 S 942.5; Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)03-0078-06

近年来, 鱼类肝胆综合症发病率越来越高, 给广大养殖户造成了不小的损失。鱼类肝胆综合症发病原因多样, 但其共性都是造成鱼类肝组织损伤, 进而引起代谢紊乱并引发细菌和病毒感染而造成鱼类的死亡。关于该病, 目前还没有有效治疗方法。现代药理学研究表明, 猪苓多糖(polyporus polysaccharide, PPS)具有抗氧化、增强免疫功能和保护肝脏等作用, 临床应用也取得了较好疗效。如聂红等^[1]研究发现, 猪苓多糖具有提高免疫功能低下小鼠T、B淋巴细胞转化能力, 增强或促进小鼠的非特异性和特异性免疫功能; 刘洪超等^[2]研究发现猪苓多糖具有抗氧化、清除自由基作用, 对羟自由基和超氧阴离子自由基均具有较好的清除作用; 王伟^[3]研究发现猪苓多糖与乙肝疫苗等药物联合用于慢性肝炎的治疗, 可取得良好的治疗效果。但猪苓多糖在鱼类方面的研究国内少有相关报道。

本试验主要以原代培养的建鲤肝细胞为试验材料, 从细胞及分子水平研究猪苓多糖对于抗药物四

氯化碳(CCl_4)所造成的肝细胞损伤是否有保护作用。原代培养的鱼类肝细胞在国外已经被广泛应用于研究肝结构和功能的诸多方面, 而我国的鱼类肝细胞研究还比较薄弱, 运用肝细胞的体外模型来研究肝细胞的功能和药物的药理则更是少见, 国内的药理研究还停留在个体水平上。笔者进行本试验, 旨在为新型保肝药物的开发奠定基础, 为鱼类肝脏疾病的治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

试验用建鲤取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔场, 体质健康、无伤, 体质量为60 g左右。将建鲤饲养于循环水系统中驯养1周, 培养水温为25℃, 每天投喂2次商品饲料。

1.2 试剂和仪器

猪苓多糖, 购自南通四海植物精华有限公司(有效成分猪苓多糖为60%); L15培养基、HBSS

收稿日期: 2013-06-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31202002、31200918)、江苏省自然科学基金项目(BK2012535)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2013JBFM12、2013JBFM11)

杜金梁, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 临床药理与药物代谢, E-mail: dujl@ffrc.cn

通信作者: 殷国俊, 博士, 研究员, 研究方向: 鱼类免疫与药理, E-mail: yingj@ffrc.cn

(hanks balanced saults)溶液、链霉素/青霉素(streptomycin/penicillin)购于美国Sigma公司;胎牛血清(FBS)和细胞培养板购于GIBCO公司; CCl_4 (分析纯)购于国药集团化学试剂有限公司;GPT、GOT、LDH、MDA和SOD测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所科技有限公司;WST-1购自于碧云天生物技术有限公司;ABI Prism7500 Fast Real-Time PCR System购自美国应用生物系统公司;723分光光度计购自上海欣茂仪器有限公司;酶标仪MK3购于美国Thermo公司。

1.3 建鲤肝细胞的分离和培养

无菌采取建鲤肝脏,放入含双抗的HBSS液漂洗,修剪,加入约为剪碎组织5倍体积的胰蛋白酶消化液,27℃水浴下消化15~20 min。74 μm 过滤网过滤,滤液在1 200 r/min离心10 min,用HBSS洗3次。弃上清,加入含10%(体积分数)胎牛血清(FBS)的L-15培养基制成细胞悬液,分别接种于24孔培养板和96孔培养板中,27℃、5% CO_2 (体积分数)条件下培养,备用。

1.4 肝细胞处理及分组

将培养于96孔板和24孔板中建鲤肝细胞培养24 h后,上清,换用含 CCl_4 和不同浓度猪苓多糖的L-15培养基进行培养处理,观察猪苓多糖对肝细胞的保护作用。具体分组情况为:

1)空白对照组:不添加任何药物处理肝细胞,用L-15培养基培养8 h后,再换用新鲜的L-15培养基继续培养4 h,然后24孔板收集上清液。

2)四氯化碳造模组:肝细胞用L-15培养基培养8 h后,再换用含8 mmol/L CCl_4 的L-15培养基继续培养4 h,然后24孔板收集上清液。

3)猪苓多糖对照组:用L-15培养基培养8 h后,换用含0.8 mg/mL猪苓多糖的L-15培养基继续培养4 h,然后24孔板收集上清液。

4)猪苓多糖前处理组:用L-15培养基培养4 h后,换用含猪苓多糖(0.2、0.4、0.8 mg/mL)的L-15培养基继续培养4 h,再换用含8 mmol/L CCl_4 的L-15培养基培养4 h,然后24孔板收集上清液。

5)猪苓多糖后处理组:用L-15培养基培养4 h后,换用含8 mmol/L CCl_4 的L-15培养基培养4 h,再换用含猪苓多糖(0.2、0.4、0.8 mg/mL)的L-15培养基继续培养4 h,然后24孔板收集上清液。

6)猪苓多糖前后处理组:用含猪苓多糖(0.2、0.4、0.8 mg/mL)的L-15培养基培养4 h后,换用

含8 mmol/L CCl_4 的L-15培养基培养4 h,再换用含猪苓多糖(0.2、0.4、0.8 mg/mL)的L-15培养基继续培养4 h,然后24孔板收集上清液。

以上每个试验组均设8个重复孔。取24孔板各组上清液进行生化指标检测。

1.5 细胞活力检测

将接种于96孔板中的肝细胞继续培养24 h,分别用 CCl_4 和猪苓多糖进行处理,然后每孔加10 μL WST-1,混合均匀后继续孵育2 h,于450 nm波长处,用酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值,并记录结果。细胞存活率计算公式:细胞存活率= A_{450} (处理组)/ A_{450} (I组) $\times 100\%$ 。

1.6 生化指标活力测定

参照试剂盒说明书测定肝细胞培养液中生化参数:GPT、GOT、LDH、SOD和MDA。

1.7 建鲤肝细胞总RNA的提取和反转录

收集抗 CCl_4 损伤较好的前处理组肝细胞进行试验,采用Trizol试剂盒提取总RNA,根据试剂盒(Reverse Transcriptase M-MLV)说明书进行反转录。将获得的cDNA溶液放入-20℃冰箱备用。

1.8 实时定量RT-PCR

实时定量PCR采用美国应用生物系统公司生产的ABI Prism7500 Fast Real-Time PCR System。具体操作方法参照SYBR Premix Ex TaqTM说明书。目的基因CYP3A(Cytochrome P450 3A)和 β actin的定量引物序列如下:CYP3A(F1: CACCGCTTTATTTC-CTTTCATC, R1: CTCGCTTCTTCTTGTGGTCCT), β actin(F1: GTCAAGTCCGTTGAGATGCACC, R1: GGATG AGACCTGAGCATTGAAGC), CYP3A引物及内参 β actin引物分别按照鲤(GU046696.1)和 β actin(M24113.1)基因序列设计,由上海捷瑞生物技术有限公司合成。

1.9 统计学处理

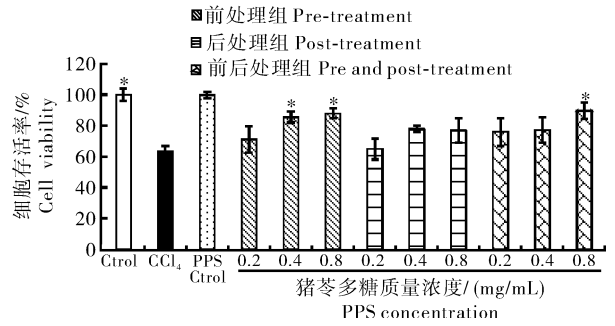
数据分析采用SPSS16.0软件包进行处理, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 猪苓多糖对建鲤肝细胞存活率的影响

由图1可以看出,经 CCl_4 处理后的细胞存活率下降明显,与空白对照组相比,差异显著。经过猪苓多糖处理后,3个处理组中肝细胞存活率均出现不同程度的升高,在前处理组,0.4 mg/mL和0.8 mg/mL组显著提高了建鲤肝细胞的存活率,与

CCl₄ 组相比差异显著;在前后处理组中,0.8 mg/mL 的猪苓多糖显著提高建鲤肝细胞的存活率,与 CCl₄ 组相比,差异显著。综合比较,以前处理组中 0.8 mg/mL 的猪苓多糖提高肝细胞存活率效果较好。



* $P < 0.05$; * * $P < 0.01$ 表示:与 CCl₄ 组相比较,差异显著或极显著。下同。Values are expressed as mean \pm SD ($n = 8$).
* $P < 0.05$; * * $P < 0.01$, compared with the group treated with CCl₄ alone. The same as below.

图 1 猪苓多糖对 CCl₄ 诱导肝细胞损伤存活率的影响
Fig.1 Effects of PPS on the cell viability in CCl₄-treated primary hepatocytes

2.2 猪苓多糖对肝细胞中 GOT、GPT 和 LDH 活性的影响

由图 2A 可以看出,经 CCl₄ 处理后的 GPT 活性值升高明显,与空白对照组相比,差异极显著。加入 3 种不同质量浓度的猪苓多糖后,3 个处理组 GPT

活性值出现不同的变化,在前处理组中,0.8 mg/mL 的猪苓多糖显著降低 GPT 活性值,与 CCl₄ 组相比,差异显著;在后处理组中,GPT 活性值无明显变化;在前后处理组中,以 0.8 mg/mL 的猪苓多糖效果较好,能显著降低肝细胞培养液中 GPT 活性值,与 CCl₄ 组相比,差异显著;综合比较可知,以前处理组中 0.8 mg/mL 的猪苓多糖效果较好。

由图 2B 可以看出,经 CCl₄ 处理后的 GOT 活性值升高明显,与空白对照组相比,差异极显著。加入 3 种不同质量浓度的猪苓多糖后,3 个处理组 GOT 活性值出现不同的变化,在前处理组中,0.8 mg/mL 的猪苓多糖显著降低 GOT 活性值,与 CCl₄ 组相比,差异显著;在后处理组中,GOT 活性值无明显变化;在前后处理组中,以 0.8 mg/mL 的猪苓多糖效果较好,显著降低肝细胞培养液中 GOT 活性值,综合比较可知,以前处理组中 0.8 mg/mL 的猪苓多糖效果较好。

由图 2C 可以看出,经 CCl₄ 处理后的 LDH 活性值升高明显,与空白对照组相比,差异极显著。加入 3 种不同质量浓度的猪苓多糖后,3 个处理组 LDH 活性值均出现了降低,在前处理组中,0.4 mg/mL 猪苓多糖显著降低 LDH 活性值,与 CCl₄ 组相比,差异显著,0.8 mg/mL 的猪苓多糖极显著降低 LDH 活性值,与 CCl₄ 组相比,差异极显著;在后处理组中,0.4 mg/mL 的猪苓多糖显著降低了细胞培养液

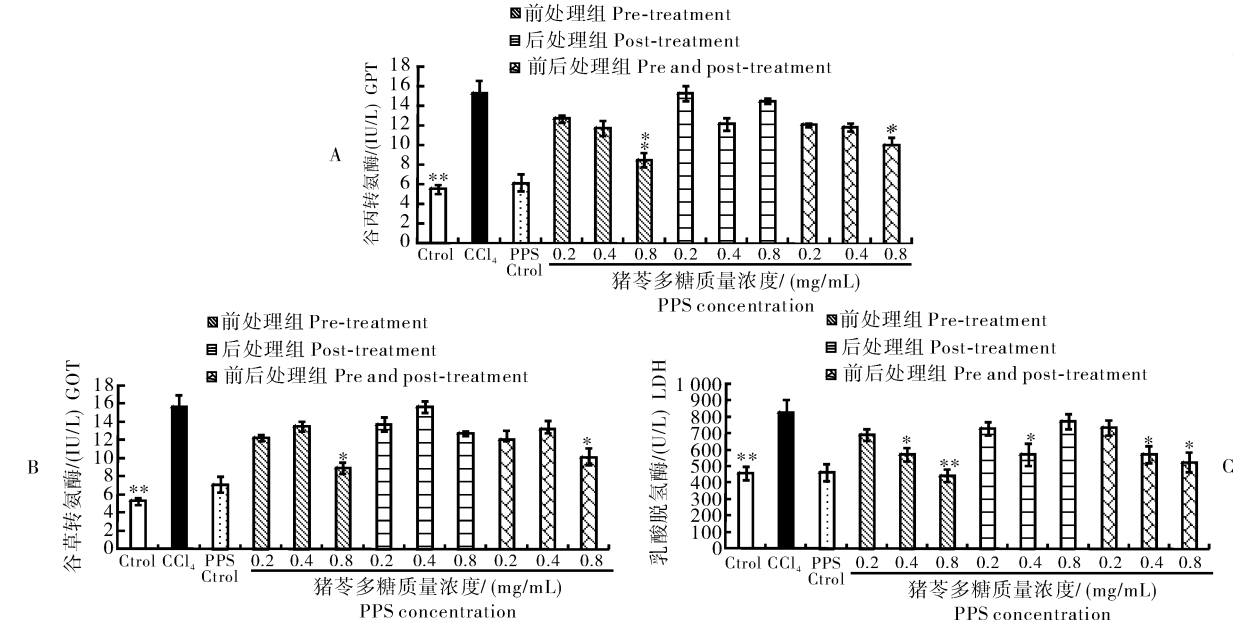


图 2 猪苓多糖对 CCl₄ 损伤原代肝细胞中 GPT(A)、GOT(B)和 LDH(C)活性的影响
Fig.2 Effects of PPS on GPT,GOT and LDH in CCl₄-treated primary hepatocytes

中 LDH 的活性值,与 CCl₄ 组相比,差异显著;在前后处理组中,0.4 和 0.8 mg/mL 的猪苓多糖都显著降低 LDH 活性值,与 CCl₄ 组相比,差异显著,结果以前处理组中 0.8 mg/mL 的猪苓多糖效果较好。

2.3 猪苓多糖对肝细胞培养液中 SOD 活性和 MDA 含量的影响

由图 3A 可以看出,经 CCl₄ 处理后的 SOD 活性值下降明显,与空白对照组相比,差异显著。加入 3 种不同质量浓度的猪苓多糖处理后发现,在前处理组中,0.8 mg/mL 的猪苓多糖显著提高了肝细胞培养液中 SOD 活性值,与 CCl₄ 组相比,差异显著;在后处理组中,猪苓多糖提高 SOD 活性值效果较差,SOD 活性值无明显变化;在前后处理组中,0.8

mg/mL 的猪苓多糖均显著提高了肝细胞培养液中 SOD 活性值,与 CCl₄ 组相比,差异显著,综合结果后发现,以前处理组中 0.8 mg/mL 的猪苓多糖效果较好。

由图 3B 可以看出,经 CCl₄ 处理后的 MDA 含量升高明显,与空白对照组相比,差异显著。加入不同质量浓度的猪苓多糖处理后发现,3 个处理组中 MDA 值均出现了不同程度的降低,在前处理组中,0.8 mg/mL 的猪苓多糖可以显著降低 MDA 含量值,与 CCl₄ 组相比,差异显著;在后处理组中 MDA 含量值无明显变化。在前后处理组中,0.4 和 0.8 mg/mL 的猪苓多糖均可以显著降低 MDA 含量值,与 CCl₄ 组相比,差异显著,综合各结果分析,以前处

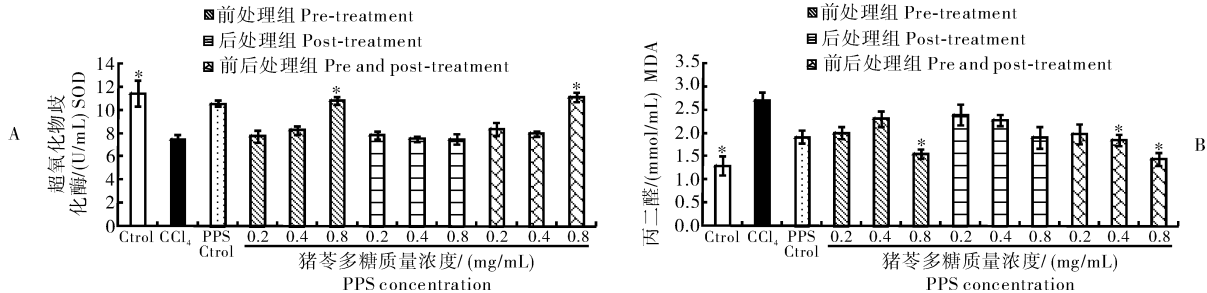


图 3 猪苓多糖对 CCl₄ 损伤肝细胞培养液中 SOD 活性和 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effects of PPS on the content of SOD and MDA in CCl₄-treated primary hepatocytes culture medium

理组中 0.8 mg/mL 的猪苓多糖效果较好。

2.4 猪苓多糖对肝细胞中 CYP3A mRNA 相对表达量的影响

由图 4 可以看出,CCl₄ 处理肝细胞后,细胞中 CYP3A mRNA 的表达明显下降,与空白对照组相比,差异显著,待加入猪苓多糖后,3 个质量浓度处理组中肝细胞 CYP3A mRNA 的表达均升高,有随着质量浓度的加大而升高的趋势,呈浓度依赖性关系,与 CCl₄ 组相比,分别升高了 5%、20%、25%,0.8 mg/mL 的猪苓多糖处理组肝细胞 CYP3A mRNA 表达量最多,与 CCl₄ 组相比,差异显著。因此以

0.8 mg/mL 的猪苓多糖诱导效果最好。

3 讨论

3.1 猪苓多糖对建鲤原代肝细胞存活率的作用

关于 CCl₄ 的损伤机制研究^[4-6],目前普遍认为 CCl₄ 在细胞色素 P450 的作用下转化为三氯甲基(—CCl₃),继而形成自由基 CCl₃OO[•]。正常情况下,自由基不断产生也不断地被清除,如果机体发生了病理反应,自由基产生和消除会失去平衡,失去平衡后会攻击细胞膜和膜样物质,如线粒体和内质网,引起脂质过氧化,使得细胞内环境紊乱,最后引起细胞死亡。

通过研究建鲤肝细胞的存活率发现,用 CCl₄ 来刺激建鲤肝细胞后,肝细胞存活率明显下降,与空白对照组相比,差异显著。加入中药猪苓多糖后,3 个处理组均能不同程度地提高肝细胞的存活率,但尤以前处理组中猪苓多糖效果较好,随着质量浓度的增加,猪苓多糖提高肝细胞存活率的作用逐渐增大。质量浓度为 0.8 mg/mL 的猪苓多糖显著提高建鲤肝细胞的存活率,明显抵抗 CCl₄ 对肝细胞存活率的

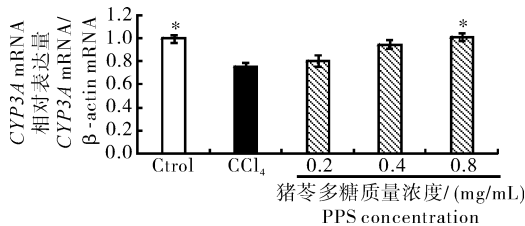


图 4 猪苓多糖对 CCl₄ 损伤肝细胞中 CYP3A mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effects of PPS on the level of CYP3A mRNA in CCl₄-treated primary hepatocytes

抑制作用,与 CCl_4 组相比,差异显著。这说明猪苓多糖能够抑制 CCl_4 造成的肝细胞损伤,具有保护建鲤肝细胞的作用。

3.2 猪苓多糖对建鲤肝细胞培养液中生化指标的影响

国内有不少学者对猪苓多糖的抗氧化性进行了研究,如朱月等^[7]研究发现,猪苓多糖对羟自由基有一定的清除作用,并且在一定的浓度范围内随着多糖浓度的增加,对羟自由基的清除能力增强;李志洲^[8]对猪苓多糖的提取及其锌配合物抗氧化性研究发现,猪苓多糖和猪苓多糖锌对羟自由基和超氧阴离子自由基具有较好的清除作用,清除能力随加入量的增大而增大;陈卓鹏等^[9]对 28 例慢性肝炎患者进行药理试验后发现,猪苓多糖具有稳定肝细胞膜、保护肝细胞线粒体和维持肝细胞 CAMP/CGMP 比值相对稳定的作用,可以降低血清转氨酶、促进糖原生成、病变肝细胞的再生及修复;汪茂荣等^[10]研究猪苓多糖和水飞蓟宾对 CCl_4 中毒肝细胞膜超微结构的保护作用时,发现猪苓多糖和水飞蓟宾对肝细胞膜表面超微结构均有一定的保护作用,可能是通过清除氧自由基而实现的。

在本试验中, CCl_4 造模损伤后,由于建鲤肝细胞膜受损,通透性增加,导致肝细胞中 GOT、GPT、LDH、MDA 的含量显著升高,SOD 活性值显著下降,使建鲤肝细胞处于氧化应激状态,这说明 GOT、GPT、LDH、MDA、SOD 可能参与了 CCl_4 在建鲤肝细胞中的代谢解毒过程,来抵抗 CCl_4 对肝细胞所造成的损伤,由于消耗过多,才出现了上述酶在细胞培养液中的结果。加入 3 种不同质量浓度的猪苓多糖后,降低了 GOT、MDA、GPT、LDH 在肝细胞中的释放,提高了肝细胞中 SOD 活性值,可能是由于猪苓多糖参与了对 CCl_4 的抵抗作用,对肝细胞有一个修复作用。本试验结果与陈卓鹏等^[9]、汪茂荣等^[10]相关研究报道相符,猪苓多糖具有较好的抗氧化性能,可以抵抗 CCl_4 所造成的肝损伤。

3.3 猪苓多糖对肝细胞细胞色素酶 CYP3A 的影响

CYP3A 是 CYP450 酶系中含量最丰富的亚型^[11-13],主要存在于肝脏和小肠中,在药物代谢中发挥着重要的作用。CYP3A 的研究多集中于哺乳动物^[14-18],对鱼类的研究还非常欠缺,且大多从环境毒理及鱼类繁殖入手,如 Vaccaro 等^[19]指出恩诺沙星和红霉素对黑鲈 CYP3A 活性有抑制作用,提示在水产临床用药上应加以注意;Hasselberg 等^[20]研究

了烷基酚和 E2 对初次抱卵的两性大西洋鲑鱼 CYP3A 的抑制,发现抑制存在着性别差异;张国伟等^[21]研究发现猪苓及猪苓多糖均可使样本中 CYP450 酶活性显著降低,其中猪苓对 CYP450 酶活性抑制呈剂量依赖性关系。当前,涉及到药物对鱼类细胞色素酶 CYP3A 基因表达的调控作用的报道较少,利用原代肝细胞作为试验材料来进行鱼类药物筛选工作的报道国内则几乎是空白。而对鱼类细胞色素 P450 酶进行科学研究,将有助于阐明药物作用机制及毒副作用发生机制,对于指导临床合理用药及保障水产品安全具有非常重要的意义。

本研究筛选了保护肝细胞效果较好的前处理组的肝细胞进行试验,结果发现 3 种不同质量浓度猪苓多糖均诱导了 CYP3A mRNA 的表达,且随着浓度的加大,表达量也在不断增加,以质量浓度为 0.8 mg/mL 的猪苓多糖效果较好。从试验结果可以看出,猪苓多糖可以明显诱导 CYP3A mRNA 的表达,本试验的成功开展为以后研究中药对细胞色素 CYP3A 的相互作用机制提供了科学依据。

由以上结果可以看出,猪苓多糖作为猪苓的主要成分,可以从抗氧化、清除自由基等多方面来发挥抗 CCl_4 所引起的肝细胞损伤,在以后肝病防治当中具有良好的发展前景。本次研究尤其以前处理组中质量浓度为 0.8 mg/mL 的猪苓多糖的效果较好,能有效抵抗 CCl_4 所造成的自由基及脂质过氧化,增加肝细胞的抗氧化能力,同时也初步了解了猪苓多糖对细胞色素 CYP3A 的诱导作用,为以后新渔药的开发奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 聂红,马安伦,沈佰华,等.复方猪苓多糖对小鼠免疫功能的调节[J].细胞与分子免疫学杂志,2000,16(5):384-386.
- [2] 刘洪超,蔡林衡,王淑英.猪苓多糖抗肿瘤机制研究进展[J].河南科技大学学报:医学版,2011,29(3):236-238.
- [3] 王伟.猪苓多糖联合乙肝疫苗治疗慢性乙型肝炎疗效观察[J].中国美容医学,2011,20(24):358.
- [4] 何秋霞,彭维兵,韩利文,等.四氯化碳致斑马鱼肝损伤的初步研究[J].中国药理学通报,2012,28(8):1182-1183.
- [5] 汪涛,姜华,陆国才,等.四氯化碳肝脏毒性研究新进展[J].毒理学杂志,2008,22(4):324-327.
- [6] 唐云安,刘玉清,王国钦.肝损伤动物模型研究进展[J].卫生毒理学杂志,2002,16(4):236-238.
- [7] 朱月,李彩霞,毕晓丹.猪苓多糖分级纯化及对羟自由基清除作用的研究[J].安徽农业科学,2011,39(30):18553-18555.

[8] 李志洲. 猪苓多糖的提取及其锌配合物抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(2): 45-50.

[9] 陈卓鹏, 罗群超. 猪苓多糖胶囊治疗慢性乙肝 28 例近期疗效观察[J]. 临床荟萃, 2001, 16(7): 314.

[10] 汪茂荣, 乐美兆, 许家璋, 等. 猪苓多糖和水飞蓟宾对四氯化碳中毒肝细胞膜超微结构的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学杂志, 1996, 1(2): 81-84.

[11] 张荣, 朱大岭. CYP3A 基因表达分子机制的研究进展[J]. 医学研究通讯, 2005, 34(2): 57-59.

[12] 钟济华. 药物因素对 CYP3A 基因的调控[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2008, 28(4): 458-461.

[13] 成碟, 徐为人, 刘昌孝. 细胞色素 P450(CYP450)遗传多态性研究进展[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(12): 1409-1414.

[14] 李维亮, 辛华雯, 苏明威. 体外探讨五味子乙素对大鼠肝微粒体 CYP3A 的影响及其作用机制[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1616-1621.

[15] 康晓琳, 薛永志, 武润生, 等. 酒精性肝损伤大鼠细胞色素 P450CYP2E1 和细胞色素 P450CYP3A 的代谢活性[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(4): 286-290.

[16] MATSUNAGA T, MARUYAMA M, MATSUBARA M, et al. Mechanisms of CYP3A induction by glucocorticoids in human fetal liver cells[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2012, 27(6): 653-657.

[17] JIANG B, CAI F, GAO S, et al. Induction of cytochrome P450 3A by Shexiang Baoxin Pill and its main components[J]. Chemico Biological Interactions, 2012, 195(2): 105-113.

[18] WANG K, SHINDOH H, TOMOAKI I, et al. Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines[J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2002, 27(3): 229.

[19] VACCARO E, GIORGI M, LONGO V, et al. Inhibition of cytochrome p450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquat Toxicol, 2003, 62(1): 27-33.

[20] HASSELBERG L, MEIER S, SVARDAL A, et al. Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. Aquat Toxicol, 2004, 67(4): 303-313.

[21] 张国伟, 李彩霞, 王艳峰, 等. 猪苓及猪苓多糖对 BBN 联合糖精作用 Fisher-344 大鼠肝脏代谢酶的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(5): 923-926.

Effects of polyporus polysaccharides on biochemical indexes and CYP3A expression of carbon tetrachloride injured primary hepatocytes of *Jian* carp

DU Jin-liang¹ LIU Ying-juan² CAO Li-ping¹ JIA Rui² WANG Jia-hao² YIN Guo-jun^{1,2}

1. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture/International Joint Research Laboratory for Fish Immunopharmacology, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract In order to study the protect effects of polyporus polysaccharide on hepatocytes injured by carbon tetrachloride (CCl₄), the primary hepatocytes in *Jian* carp were isolated by trypsin digestion method, cultured *in vitro* and induced by CCl₄. The hepatocytes were treated with polyporus polysaccharide of different concentrations, the culture medium of hepatocytes were then collected, the content of alanine aminotransferase (GPT), aspartate aminotransferase (GOT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), lactic acid dehydrogenase (LDH), and cell livability of primary cultured hepatocytes were determinated. Total RNA in primary cultured hepatocytes was extracted with trizol reagent and the mRNA levels of CYP3A were determined by RT-PCR. The results showed that in the pre-treatment group at 0.8 mg/mL of polyporus polysaccharide, the release of GOT, GPT, MDA were significantly decreased, the activity of SOD was increased, the release of LDH was decreased, the cell livability and the expression of CYP3A at mRNA level were increased, indicating best protect effect of this group. It can be concluded from the data obtained that polyporus polysaccharides could effectively protect the primary cultured hepatocytes against CCl₄ induced injury.

Key words *Cyprinus carpio* var. *Jian*; polyporus polysaccharide; carbon tetrachloride; hepatocytes

(责任编辑: 边书京)