

DOI: 10.1360/yc-007-0575

实时荧光定量检测中国实验用小型猪肝脏 CYP3A29 mRNA 表达水平

杨家大¹, 商海涛², 魏泓², 杨婉身¹, 刘昕³

1. 四川农业大学生命科学与理学院生物化学教研室, 雅安 625014;
2. 第三军医大学基础部实验动物学教研室, 重庆 400038;
3. 第三军医大学基础部分子遗传学教研室, 重庆 400038

摘要: CYP3A29 是猪肝脏最重要的药物代谢关键酶。研究中国实验用小型猪肝脏 CYP3A29 mRNA 的表达特性对于评估其是否适宜于作为人 CYP3A4 介导的药理学研究动物模型具有一定意义。以 β -actin 作校正, 利用 TaqMan 定量技术对巴马香猪、贵州小型香猪肝脏 CYP3A29 mRNA 表达水平进行检测, 并以荣昌猪作为对照。结果表明, 巴马香猪、贵州小型香猪、荣昌猪肝脏 CYP3A29 mRNA 表达水平与报道的人肝脏 CYP3A4 相近; 三品系(种)猪间肝脏 CYP3A29 mRNA 表达水平较为接近, 但品系(种)内个体间变异较大。提示巴马香猪、贵州小型香猪作为药物评价的实验动物具有一定可行性。

关键词: 巴马香猪; CYP3A29; TaqMan 定量

Expression of CYP3A29 mRNA in Chinese experimental miniature pig's livers quantitated with real-time reverse transcription polymerase chain reaction

YANG Jia-Da¹, SHANG Hai-Tao², WEI Hong², YANG Wan-Shen¹, LIU Xin³

1. Department of Biochemistry, College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;
2. Department of Animal Science, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;
3. Department of Molecular Genetics, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: CYP3A29 is the most important key enzyme for drug metabolism in pig's liver. Research of the characters of CYP3A29 mRNA expression in Chinese experimental miniature pig's livers is significant for evaluating it whether suitable for experimental model for drug metabolism mediated by human CYP3A4 enzyme. In this study, the levels of CYP3A29 mRNA expression in livers of Bama miniature pigs, Guizhou miniature pigs and Rongchang pigs were studied by TaqMan-mediated quantitative RT-PCR. Results indicated that the CYP3A29 mRNA expression levels in livers of these species were close to literatures of human. Levels of CYP3A29 mRNA expression were similar among livers of Bama miniature pigs, Guizhou miniature pigs and Rongchang pigs, but interindividual variations were quite large. It was suggested that Bama miniature pigs and Guizhou miniature pigs were both feasible for experimental animal model for evaluating drug metabolism in some degree.

收稿日期: 2006-07-09; 修回日期: 2006-09-29

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划重点项目(编号: 2004BA717B-3)资助[Supported by the Key Project of the 10th State “Five-year Plan” for the Science and Technology of China (No: 2004BA717B-3)]

作者简介: 杨家大(1975-), 男, 贵州省天柱县人, 侗族, 博士研究生, 专业方向: 应用生物化学。E-mail: yangjiada2@21cn.com

商海涛(1974-), 男, 河南省浚县人, 讲师, 专业方向: 实验动物学。E-mail: shanght@mail.tmmu.com.cn

杨家大、商海涛为并列第一作者

通讯作者: 魏泓(1963-), 男, 四川省泸州市人, 医学博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物遗传学。E-mail: weihong63528@163.com

致谢: 感谢重庆市养猪科学研究院白小青、李琴二位同志在样品采集过程中给予的支持和帮助。

Keywords: Bama miniature pig; Guizhou miniature pig; CYP3A29; TaqMan

中国实验用小型猪除具有生物学特性与人相似^[1-3]的优点外,其遗传特性更为稳定^[4-7],作为新药安全性有效性评价的实验动物具有良好前景。细胞色素氧化酶P450(CYP)是一类重要的药物代谢酶类,主要存在于人及动物的肝脏。CYP3A4 是人类肝脏最重要的CYP酶之一^[8-10],猪体内对应的酶是CYP3A29^[11-13]。因此,研究中国实验用小型猪肝脏CYP3A29 mRNA的表达水平对于评估其是否适宜作为人CYP3A4 介导的药理学研究动物模型具有重要意义。

TaqMan定量具有特异、灵敏、准确、快速和高通量的优点,已成功地应用于人类^[14-16]和小鼠^[17]CYP mRNA的定量研究。本文旨在建立一套适合于猪CYP3A29 mRNA定量的TaqMan方法,以其定量巴马香猪、贵州小型香猪两个中国实验用小型猪品系肝脏CYP3A29 mRNA的表达水平。并与已报道的人肝脏CYP3A4 mRNA的表达水平进行比较,分析中国实验用小型猪CYP3A29 mRNA的表达特性,为其用于药理和毒理学研究及用作药物代谢动物模型可行性提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 猪肝脏样品来源

4~6 月龄大小的巴马香猪、贵州小型香猪(体重约为 10 kg,均由第三军医大学实验动物学教研室提供。其巴马香猪种群于 1999 年引种于广西巴马瑶族自治县巴马香猪原种场,贵州小型香猪种群于 1998 年引种于贵阳中医学院甘世祥教授选育的贵州小型香猪种群)及荣昌猪(体重约为 25 kg,由重庆市养猪科学研究院提供)各 6 头,经戊巴比妥钠麻醉后活体取出肝脏中叶左侧部分组织,生理盐水冲洗,切成小块后,迅速置于液氮中冻存。

1.2 TaqMan 引物及探针

根据猪 CYP3A29 mRNA(GenBank accession number NM_214423)及 β -actin mRNA 序列(GenBank accession number AY550069)设计实时荧光定量标准品引物、定量引物、Taqman 探针,并由上海基康生

物有限公司合成,其中探针 5'端标记荧光报告基团 FAM(6-Carboxy-fluorescein),3'端标记荧光淬灭基团 TAMRA(6-Carboxy-tetramethylrhodamine)。引物及探针具体信息见表 1。

1.3 总 RNA 提取

取 50~100 mg 液氮冻存肝脏组织按照 Tripure RNA 提取试剂盒(Roche)操作说明书进行总 RNA 抽提,并经琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性, NanoDrop® ND-1000 分光光度计(NanoDrop Technologies)测定 A_{260} 和 A_{280} 确定 RNA 质量。28S rRNA 条带强烈且 A_{260}/A_{280} 位于 1.8~2.0 之间的 RNA 样品用于后续实验。

1.4 逆转录反应

逆转录反应使用 Promega 试剂盒进行,反应总体积 15 μ L。过程如下: 8.1 μ L 总 RNA, 加入 Oligo(dT)₁₅ 0.9 μ L, 混匀, 70 $^{\circ}$ C 放置 5 min。立即冰水浴 5 min, 瞬时离心, 再加 5 \times AMV buffer 3 μ L、dNTP 1.5 μ L、RNasin 0.6 μ L、AMV Reverse Transcriptase 0.9 μ L, 混匀, 瞬时离心, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 10 min 终止反应。

1.5 CYP3A29-pMD18-T 实时荧光定量标准品的制备

采用 CYP3A29 标准品引物,以逆转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR。扩增产物经 EZNA® Gel Extraction Kit(Omega bio-tek)回收后,与 pMD18-T 载体(TaKaRa, 大连)连接过夜,转化到大肠杆菌 DH5 α 中,用 EZNA® Plasmid Miniprep Kits I(Omega bio-tek)提取质粒,经测序证实包含有定量扩增子序列后,用 NanoDrop® ND-1000 分光光度计(NanoDrop Technologies)测定 CYP3A29-pMD18-T 质粒的 A_{260} 和 A_{280} ,选择 A_{260}/A_{280} 位于 1.8~2.0 之间的质粒,根据以下公式计算每毫升质粒的拷贝数。

$$N = \frac{C \times 10^{-9}}{M \times 660} \times 6.02 \times 10^{23}$$

其中, N 为每毫升质粒的拷贝数(copies/ μ L), C 为测得质粒的浓度(ng/ μ L), M 为质粒的碱基对数。以 10 倍梯度连续稀释质粒,得到 2.29×10^{10} ~ 2.29×10^2 拷贝/ μ L 质粒的实时荧光定量标准品。

表1 CYP3A29 和 β -actin 引物以及 TaqMan 探针序列Table 1 Sequence of PCR primers and TaqMan probes for CYP3A29 and β -actin mRNA

猪基因 Pig gene	引物/探针 Primers/probes	位置 Location	5'→3'序列及荧光基因 5'→3' sequence and fluorescent dye	扩增子大小 Amplicon length (bp)
CYP3A29 (For standardization)	Forward primer	32~52	GAAAATCCGAGGAGAGAATCA	1571
	Reverse primer	1582~1602	CAAAGCCCCAAGTCCTTAGAGA	
CYP3A29 (For standardization)	Forward primer	839~860	AAAGTCGCCTCACAGATCAACA	173
	Reverse primer	989~1011	GGAGAGAGCACTGCTAGTGGTCT	
	Probe	863~886	FAM-AGCGCCGAGTGGACCTTCTTCAGC-TAMRA	
β -actin	Forward primer	790~810	TCCCTGGAGAAGAGCTACGAG	254
	Reverse primer	1025~1043	GCCGTGATCTCCTTCTGCA	
	Probe	866~889	FAM-CGCTCTCCAGCCCTCCTTCTGG-TAMRA	

1.6 实时荧光定量 PCR

反应在DNA Engine Opticon™ 2 连续荧光检测系统(MJ research)上进行, 体系为 10 μ L。其中含 Tris-HCl (pH 8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 5.5 mmol/L, dNTP 800 μ mol/L, 上、下游引物各 300 nmol/L, TaqMan探针 100 nmol/L, rTaq 0.2 U/ μ L, 模板 1 μ L。每个样品待检基因进行 3 次重复实验。PCR 反应条件为 94 预变性 5 min, 然后进入循环阶段, 每个循环包括 94 变性 15 s, 60 复性及延伸 45 s, 读板, 共 40 个循环。每次 96 孔板上设置未知样品、用于作空白对照的不含cDNA模板的反应混合物、用于作标准曲线的 $2.29 \times 10^{10} \sim 2.29 \times 10^2$ 拷贝/ μ L 的 10 倍连续梯度质粒。每次 96 孔板上分开测定 CYP3A29 和 β -actin mRNA 的拷贝数。

1.7 统计分析

定量 PCR 反应结束后, 经扣除空白及基线荧光信号得到所有样品的 C_t 值。根据各标准品拷贝数的对数与其对应的 C_t 值可计算得到一回归方程。再根据样品待检基因的 C_t 值通过回归方程即可计算出其待检基因的拷贝数。样品 CYP3A29 及 β -actin mRNA 的拷贝数均由该回归方程求出, 并以平均数 \pm 标准差表示。以 CYP3A29 mRNA 拷贝数与对应样品 β -actin mRNA 拷贝数的比值表示 CYP3A29 mRNA 表达水平。2 品系中国实验用小型猪及荣昌猪肝脏 CYP3A29 mRNA 的平均表达水平以中位数表示。

2 结果

2.1 猪 CYP3A29 mRNA 实时荧光定量标准曲线

定量 PCR 反应结束并经扣除空白及基线荧光信号后, 仪器软件自动以标准品拷贝数的对数为纵坐

标、以各拷贝数对应的 C_t 值为横坐标绘制标准曲线, 如图 1。每次扩增标准曲线上都有 9 个连续的点, 线性检测范围为 9 个数量级, 检测下限为 2.29×10^2 拷贝, 检测上限为 2.29×10^{10} 拷贝, 数据变化与标准曲线之间的拟合度 r^2 不小于 0.998。标准曲线回归方程为 $y = -0.29x + 10.26$ 。

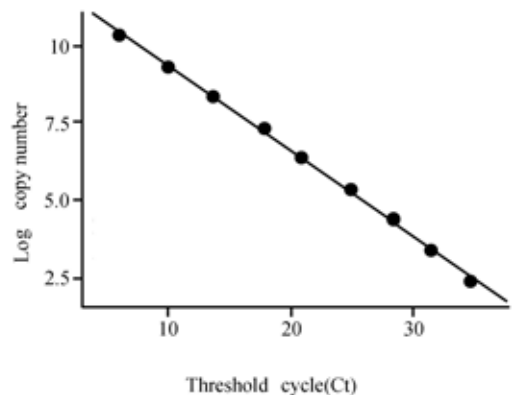


图1 mRNA Taqman 定量标准曲线

Fig. 1 Global standard curve for quantification mediated by TaqMan

将 2.29×10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 拷贝的标准品分别进行 6 次重复定量, 得到其批内 C_t 变异系数分别为 0.77%、1.15%、6.89%、3.54%、2.92%。

2.2 三品系(种)猪肝脏 CYP3A29 mRNA 的表达水平

采用建立的方法, 对巴马香猪、贵州小型香猪、荣昌猪各 6 头的肝脏组织逆转录得到的 cDNA 样品同时进行 CYP3A29 mRNA 及 β -actin mRNA 的定量检测, 结果见表 2。可见, 巴马香猪肝脏 CYP3A29 mRNA 表达水平的最大值为 55.5029, 最小值为 17.9691, 平均值为 32.5661; 贵州小型香猪的最大值为 35.7404, 最小值为 3.2561, 平均值为 24.3130; 荣昌猪最大值为 65.7694, 最小值为 11.1493, 平均值为 35.9559。

表 2 三品系(种)猪肝脏 CYP3A29 和 β -actin mRNA 的定量检测结果Table 2 Copies number of CYP3A29 and β -actin mRNA in livers of three breeds of pigs

品系(种) Breeds(species)	编号 No.	拷贝/mL Copies/mL		CYP3A29 mRNA 表达水平 ratio of copies: CYP3A29/ β -actin	
		CYP3A29	β -actin	Individual	Median
巴马香猪 Bama miniature pig	BM0012	137217 \pm 9036	2852 \pm 248	48.1126	32.5661
	BM0022	125678 \pm 10657	4889 \pm 2978	25.7063	
	BM0023	166574 \pm 7995	4225 \pm 436	39.4258	
	BM0024	739521 \pm 72366	13324 \pm 84	55.5029	
	BM0025	197391 \pm 804	10985 \pm 106	17.9691	
	BM0026	1130867 \pm 217662	44456 \pm 3912	25.4379	
贵州小型香猪 Guizhou miniature pig	GZ0011	387354 \pm 11610	10838 \pm 3041	35.7404	24.3130
	GZ0017	264549 \pm 13833	11651 \pm 2005	22.7061	
	GZ0018	212595 \pm 37107	8202 \pm 1395	25.9199	
	GZ0019	389067 \pm 3025	32306 \pm 4204	12.0432	
	GZ0020	602126 \pm 28960	20636 \pm 4538	29.1784	
	GZ0021	52768 \pm 11356	16206 \pm 2132	3.2561	
荣昌猪 Rongchang pig	RC0001	914086 \pm 19460	34438 \pm 3384	26.5429	35.9559
	RC0002	202725 \pm 77278	3504 \pm 2747	57.8553	
	RC0003	219282 \pm 25836	6059 \pm 560	36.1911	
	RC0004	1221151 \pm 209172	34186 \pm 12695	35.7208	
	RC0005	325098 \pm 11884	4943 \pm 866	65.7694	
	RC0006	36960 \pm 23463	3315 \pm 1003	11.1493	

3 讨论

3.1 建立了稳定的猪 CYP3A29 mRNA TaqMan 定量方法

本实验建立了猪 CYP3A29 mRNA 的 TaqMan 定量方法。首先, 构建了 CYP3A29-pMD18-T 标准品质粒, 并经 10 倍梯度稀释, 得到 $2.29 \times 10^{10} \sim 2.29 \times 10^2$ 拷贝/ μ L 的系列连续梯度标准品。其次, 绘制了 CYP3A29 mRNA 的 TaqMan 定量标准曲线。曲线上共有连续的 9 个点, 说明检测范围达到 9 个数量级, 结合标准品的浓度及加样量可知, 其检测下限为 2.29×10^2 拷贝, 检测上限为 2.29×10^{10} 拷贝, 完全涵盖了待检基因的拷贝数范围。标准曲线的 9 个点完全位于一条直线上, 说明标准品定标准确, 建立的检测方法可靠。另外, 数据的变化与标准曲线之间的拟合度 r^2 达到 0.998 以上, 说明标准曲线涵盖了 99.8% 以上的数据变化。第三, 进行了方法的重复性验证。将 2.29×10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 拷贝的标准品分别进行 6 次重复定量, 得到其批内 C_t 变异系数分别为 0.77%、1.15%、6.89%、3.54%、2.92%, 说明方法的重复性较好。

3.2 中国实验用小型猪肝脏 CYP3A29 mRNA 表达水平与报道的人 CYP3A4 较为接近, 从转录水平上证明其适宜于用作人 CYP3A4 介导的药物代谢动物模型

细胞色素氧化酶 P450 主要存在于动物的肝脏, 对许多内源性、外源性化合物、药物及毒物的代谢起关键作用, 是药物代谢关键酶。猪体内存在着人类主要 CYP 酶的直系同源蛋白^[18-20]。人体内最主要的 CYP 酶是 CYP3A4, 小型猪体内则是 CYP3A29。

本实验研究结果表明, 巴马香猪、贵州小型香猪肝脏 CYP3A29 mRNA 的表达水平分别为 32.5661 和 24.3130。Masuhiro 等^[14] 利用 TaqMan 相对定量的方法对 2 例成年人(一例 15 岁, 一例 35 岁, 男女各一)肝脏 CYP3A4 mRNA 表达水平的检测结果表明, CYP3A4 mRNA 含量为 2.32, β -actin mRNA 含量为 0.0832, CYP3A4 mRNA 与 β -actin mRNA 含量的比值为 27.8846。这说明 4~6 月龄中国实验用小型猪肝脏 CYP3A29 mRNA 与成年人肝脏 CYP3A4 mRNA 的表达水平较为接近。此外, 本实验室研究人员对巴马香猪、贵州小型香猪及人肝微粒体进行硝苯地平氧化反应、睾酮 6 β 羟化反应检测的结果表明, CYP3A

的这两个探针底物在巴马香猪、贵州小型香猪与人肝微粒体中的代谢产物相似,并且在量上具有可比性;同时,抑制剂三乙酰竹桃霉素(TAO)对巴马香猪和人肝脏微粒体硝苯地平氧化反应的抑制效果很相似^[21,22]。因此,本研究从转录水平证实了中国实验用小型猪适宜于用作人CYP3A4介导的药物代谢动物模型。

3.3 三品系(种)猪肝 CYP3A29 mRNA 表达水平较为接近,说明品系(种)对猪肝 CYP3A29 mRNA 表达水平的影响较小

本研究结果表明,巴马香猪、贵州小型香猪、荣昌猪肝CYP3A29 mRNA表达水平以荣昌猪最高,为35.9559,贵州猪最低,为24.3130。但荣昌猪也仅为贵州猪的1.1789倍,三者表达水平较为接近,说明品系(种)对猪肝CYP3A29 mRNA表达水平的影响较小。在猪或人CYP3A酶活性及含量的研究方面有也类似的结果。例如,LI(李健)等^[21,22]的研究结果表明,巴马香猪与贵州小型香猪肝微粒体CYP3A硝苯地平氧化反应、睾酮6 β -羟化反应的活性值均无显著差异。Skaaniid等^[19]的研究结果表明,Göttingen小型猪CYP3A活性(睾酮6 β -羟化反应)约为丹麦长白 \times 约克夏 \times 杜罗克杂交猪的2倍。在人类,Shu等^[23]利用Western杂交分析方法以及探针底物法对汉族、藏族以及苗族人群肝微粒体的研究表明,CYP3A的表达水平及酶活性无民族差异。Shimada等^[24]用免疫组化法对日本人和高加索人肝脏CYP3A含量进行研究发现,其占总P450的比例在两人种间也无大的差别。

3.4 各猪品系(种)内个体间肝脏 CYP3A29 mRNA 表达水平差异较大,与人肝脏 CYP3A4 mRNA 表达存在个体间变异的特性相似

从表2可以看出,各品系(种)内个体间CYP3A29 mRNA表达水平的变异较大。巴马香猪表达水平最大值是最小值的4.088倍,荣昌猪为5.899倍,贵州小型香猪达到10.9632倍。在人类,CYP3A蛋白含量、活性及mRNA表达水平都观察到变异情况。Yengi等^[15]利用TaqMan绝对定量对人类皮肤CYP3A4 mRNA表达水平检测的结果发现存在个体间变异。Shu等^[23]研究发现,中国人(17例汉族人、17例藏族人以及8例苗族)CYP3A蛋白含量及酶活性的个体间变异分别为4.6倍和9.8倍。Forrester等^[25]利用Western杂交法对19份人(年龄为8到68岁;男12,女6,另一人未

知性别)肝脏的研究表明,CYP3A蛋白水平个体间变异达到26倍。Shimada等^[24]在日本人群及高加索人群中都观察到CYP3A活性存在个体间变异。肝脏CYP酶的个体间差异,构成了个体化用药的重要依据之一。

参考文献(References):

- [1] WANG Ai-De, GUO Ya-Fen, LI Bai, HU Chuan-Huo, WEI Hong. Determination of some haemal biochemical parameters in Ba-ma minipig. *Shanghai Laboratory Animal Science*, 2001, 21(1): 8-12.
王爱德, 郭亚芬, 李柏, 胡传活, 魏泓. 巴马香猪血液生化指标. *上海实验动物科学*, 2001, 21(1): 8-12.
- [2] WANG Ai-De, GUO Ya-Fen, LI Bai, HU Chuan-Huo, WEI Hong. Determination of some haemal physiological parameters in Ba-ma minipig. *Shanghai Laboratory Animal Science*, 2001, 21(2): 75-78.
王爱德, 郭亚芬, 李柏, 胡传活, 魏泓. 巴马香猪血液生理指标. *上海实验动物科学*, 2001, 21(2): 75-78.
- [3] LENG Jian-Jun, DONG Jia-Hong, HAN Ben-Li, ZHENG Shu-Guo, ZHENG Ping. Hepatic applied anatomy in Bama miniature pig. *Journal of Digestive Surgery*, 2004, 3(3): 181-184.
冷建军, 董家鸿, 韩本立, 郑树国, 郑萍. 巴马香猪肝脏应用解剖学观察. *消化外科*, 2004, 3(3): 181-184.
- [4] CHEN Bing-Bo, WANG Chuan-Guang, ZHOU Jian-Hua, WEI Hong, WANG Ai-De, GAN Shi-Xiang. DNA fingerprinting analysis of Guangxi Bama and Guizhou miniature pigs. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2003, 25(7): 620-622.
陈丙波, 王传广, 周建华, 魏泓, 王爱德, 甘世祥. 广西巴马小型猪和贵州小型香猪的DNA指纹分析. *第三军医大学学报*, 2003, 25(7): 620-622.
- [5] SHANG Hai-Tao, NIU Rong, WEI Hong, HUANG Zhong-Bo, GAN Shi-Xiang, WANG Ai-De, ZENG Yang-Zhi. Genetic analysis of 35 microsatellite loci in three miniature of pig breeds. *Hereditas(Beijing)*, 2001, 23(1): 17-20.
商海涛, 牛荣, 魏泓, 黄中波, 甘世祥, 王爱德, 曾养志. 三品系小型猪35个微卫星基因座的遗传学研究. *遗传*, 2001, 23(1): 17-20.
- [6] WU Feng-Chun, WEI Hong, GAN Shi-Xiang, WANG Ai-De. Analysis on genetic diversity to Bama miniature pigs and Guizhou miniature pigs by RAPD. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 2001, 34(2): 115-119.
吴丰春, 魏泓, 甘世祥, 王爱德. 巴马小型猪与贵州小型香猪遗传多样性的RAPD分析. *实验生物学报*, 2001,

- 34(2): 115–119.
- [7] WU Feng-Chun, WEI Hong, WANG Ai-De. Study on genetic diversity of Bama miniature pigs by AFLP technique. *Chinese Journal of Laboratory Animal Science*, 2002, 12(4): 207–209.
吴丰春, 魏泓, 王爱德. AFLP 技术用于巴马小型猪遗传多样性的研究. *中国实验动物学杂志*, 2002, 12(4): 207–209.
- [8] Nowakowski-Gashaw I, Mrozikiewicz PM, Roots I, Brockmüller J. Rapid quantification of CYP3A4 expression in human leukocytes by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem*, 2002, 48(2): 366–370.
- [9] Bogaards JJ, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ, Walther B. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica*, 2000, 30, (12): 1131–1152.
- [10] Olsen AK, Hansen KT, Friis C. Pig hepatocytes as an in vitro model to study the regulation of human CYP3A4: prediction of drug-drug interactions with 17 α -ethynylestradiol. *Chem Biol Interact*, 1997, 107(1-2): 93–108.
- [11] Jurima-Romet M, Casley WL, Leblanc CA, Nowakowska M. Evidence for the catalysis of dextromethorphan O-demethylation by a CYP2D6-like enzyme in pig Liver. *Toxicology in Vitro*, 2000, 14(3): 253–263.
- [12] Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med*, 2002, 6(2): 189–198.
- [13] Soucek P, Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P, Guengerich FP. Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC Pharmacol*, 2001, 1: 11. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2210/1/11>).
- [14] Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, 2003, 123(5): 369–375.
- [15] Yengi LG, Xiang Q, Pan J, Scatina J, Kao J, Ball SE, Fruncillo R, Ferron G, Roland Wolf C. Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal Biochem*, 2003, 316(1): 103–110.
- [16] Bowen WP, Carey JE, Miah A, McMurray HF, Munday PW, James RS, Coleman RA, Brown AM. Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(7): 781–788.
- [17] Pan J, Xiang Q, Renwick AB, Price RJ, Ball SE, Kao J, Scatina JA, Lake BG. Use of a quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the induction of CYP1A, CYP2B and CYP4A forms in precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*, 2002, 32(9): 739–747.
- [18] Anzenbacher P, Soucek P, Anzenbacherova E, Gut I, Hruby K, Svoboda Z, Kvetina J. Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. Comparison with human liver samples. *Drug Metab Dispos*, 1998, 26(1): 56–59.
- [19] Skaanild MT, Friis C. Characterization of the P450 system in Göttingen minipigs. *Pharmacol Toxicol*, 1997, 80(Suppl.2): 28–33.
- [20] Monshouwer M, van't Klooster GAE, Nijmeijer SM, Witkamp RF, van Miert ASJPAM. Characterization of cytochrome P450 isoenzymes in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 1998, 12(6): 715–723.
- [21] Li J, Liu Y, Zhang JW, Wei H, Ying L. Characterization of hepatic drug-metabolizing activities of Bama miniature pigs (*Sus Scrofa Domestica*): Comparison with human enzyme analogs. *Comp Med*, 2006, 56(4): 269–273.
- [22] LI Jian, LIU Yong, ZHANG Jiang-Wei, WEI Hong, YANG Ling. Characterization of cytochrome CYP isozymes in Guizhou minipigs and its comparison with human analogs. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2006, 16(3): 157–161.
李健, 刘勇, 张江伟, 魏泓, 杨凌. 贵州小型香猪与人五种 CYP 酶活性的比较. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(3): 157–161.
- [23] Shu Y, Cheng ZN, Liu ZQ, Wang LS, Zhu B, Huang SL, Ou-Yang DS, Zhou HH. Interindividual variations in levels and activities of cytochrome P-450 in liver microsomes of Chinese subjects. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(3): 283–288.
- [24] Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 270(1): 414–423.
- [25] Forrester LM, Neal GE, Judah DJ, Glancey MJ, Wolf CR. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(21): 8306–8310.