

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9629

計畫名稱：鋅對於吳郭魚細胞色素 P450 之影響

執行期間：96 年 1 月 1 日至 96 年 12 月 31 日

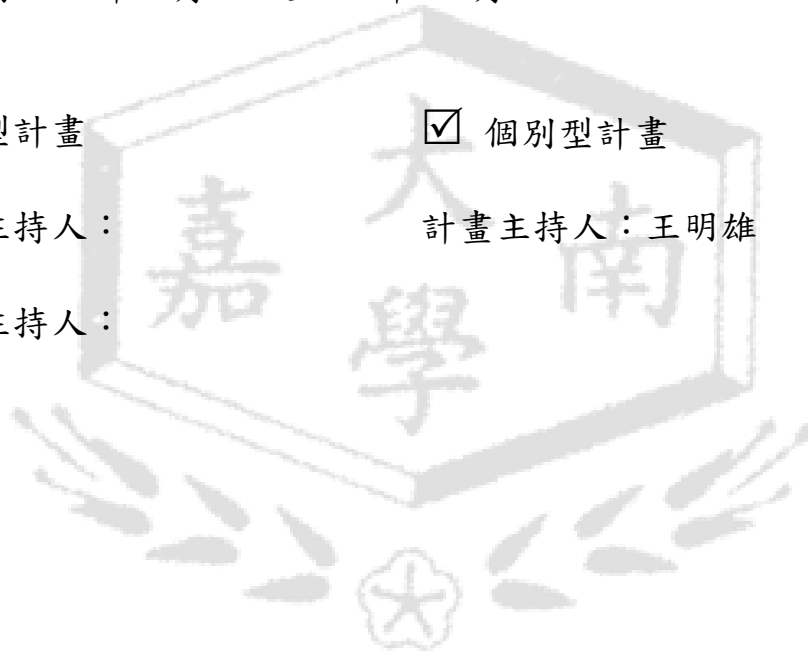
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：王明雄

子計畫主持人：



中華民國 97 年 3 月 24 日

一 摘要

本研究主要研究膳食中之鋅缺乏對吳郭魚肝臟細胞色素 P4501A (CYP1A) 之表現之影響。膳食中缺鋅 (5 mg Zn/ kg diet) 飼養八週之吳郭魚與對照組 (pair-fed control, 46 mg Zn/ kg diet) 比較，發現其體重相差不大，但血漿中之鋅濃度缺鋅組之吳郭魚明顯低於對照組，進一步解剖發現其肝臟之重量與對照組並無差異，而肝臟中之 CYP 含量及相關之單加氧酶活性亦顯現無差異的情況，似乎說明膳食中缺乏鋅對吳郭魚之肝臟中之細胞色素 P450 之含量及相關酵素活性似乎沒有影響。進一步將此二組之吳郭魚分別施打不同劑量之五氯酚，則發現膳食中缺乏鋅之吳郭魚肝臟之 aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 及 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 活性在較大劑量之五氯酚作用下，比控制組較低。而同時以 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 進行 CYP1A mRNA 之表現量的分析，發現膳食中缺乏鋅之吳郭魚肝臟之 CYP1A 表現量明顯較控制組為低，顯示鋅似乎在 CYP1A 的表現上具有特殊之功能，當吳郭魚在膳食中缺乏鋅之狀況下亦會影響 CYP1A 的表現，其機制為何有待更進一步的探討。

二 研究動機與研究問題

隨著人類活動與農業、工業的發展，造成環境惡化，例如工廠經常排出大量廢水，因此造成環境存在許多工業產生的重金屬與有機物質等污染物；另外，又有農業過度使用殺蟲劑與農藥及家庭廢水的排放等污染。這些污染物由廢水排放進入河川及海洋中，並累積在沉積物中，隨著環境的變化，沉積物中的污染物再釋入水中，並經由生物的累積，影響整個生態體系。其中，直接受到衝擊的首生是水生資源，過去本省多處河口與沿岸常有遭受到污染的報導。魚類經由食物鏈，生物濃縮的步驟，使得污染物在魚體的濃度增加幾百倍甚至幾千倍。目前，國內水域環境的污染嚴重，存在於水中的生體異物 (xenobiotics) 對於生態及養殖魚貝類均會造成影響。養殖魚貝類的污染，間接會造成人類健康的危害。再加上國內水產養殖係採取高密度放養方式，為防範魚病發生及經濟效益考量，養殖業者常在飼料或養殖池中不當使用藥物，包括濫用藥物、使用禁藥、不遵守停藥期等，勢必造成魚體殘留藥物而影響消費大眾飲食安全。

水產養殖用藥，與工業發展所產生的化學物質或環境污染物質一樣，對生物而言，都屬於外來的物質，亦為生體異物的一種。這些生體異物可藉由生物體內之解毒酵素系統 (detoxification system) 或者生物轉化作用 (biotransformation)，代謝成不具毒性或者毒性較弱的物質 (1)。動物主要藉由其肝臟的解毒酵素系統，將脂溶性的生體異物經由酵素代謝的過程，轉化成生親水性的代謝產物，再經由糞便或尿液排出體外，以減少對生物體的傷害。就整個生體異物代謝反應而言第一相 (phase I) 反應是決定步驟 (rate limiting)，而第二相 (phase II) 反應則真正跟解毒有關的步驟 (2)。第一相反應的

進行以氧化反應為主，主要是由存在於肝臟細胞的內質網膜上，或者是分離的微粒體 (microsomes) 中之細胞色素 P450 為中心的單氧酶系統 (monooxygenase) 所執行。人類及哺乳類動物 (3-5) 的細胞色素 P450 之生物化學、生理學及毒物學之研究，目前已有相當大的進展。但魚類包括虹鱒 (6-14)、鱈魚 (15-16)、鱸魚 (17)、鯉魚 (18) 及吳郭魚 (19) 等的研究，目前雖已有多人正在進行中，但相關研究之資料仍略顯不足。其中微量元素對魚類細胞色素 P450 調控的相關研究，目前仍未有更進一步的研究。

本系列研究主要是欲了解微量元素是否會影響魚類生體異物之代謝。進一步了解藉由控制飼料中微量元素是否可以控制魚類對生體異物代謝的速度，以解決魚類藥物殘留的問題。本計劃首先將進行的是鋅對於吳郭魚之 CYP 的表現及 CYP 的活性的影響，具有相當重要的研究價值，將可提供在魚類 CYP 研究上相當重要的資訊。

三 文獻回顧與探討

細胞色素 P450 為一群具有單加氧酶活性之酵素的統稱，至目前為止已發現至少有一百五十多種異構酶 (20)，為多功能氧化酶，主要功能在進行生物體之生體異物代謝反應中第一相之氧化反應。細胞色素 P450 是為一種可誘導的蛋白質 (induction protein)，可被一些常見的污染物質如 PCBs、PAH、dioxins、石油產品或農藥等所誘導產生 (1-2, 21-23)。這些物質的結構，可以與 Ah receptor 結合，進而啓始轉譯 CYP mRNA，誘導產生大量的 CYP (23)。

鋅為一般生物體內所普遍存在僅次於鐵之微量元素，其具有相當重要的生理生化功能。鋅可能之生化功能 (biochemical functions)，有 1. Catalytic functions: a. Zn as a co-factor in Zn metalloenzymes. b. Zn as an effector of enzyme, transporter and membrane channel activity. c. Zn as an effector of gene expression. d. Zn as a non-enzymatic catalyst. 2. Structural functions: a. Structural roles of Zn in metalloproteins. b. Structural role in peptide hormones. c. Stabilizer of supramolecular structures. (24)。研究顯示鋅可以抑制 carbon tetrachloride (25)、bromobenzene (26)、acetaminophen (27) 及 pyrrolizidine alkaloids (28) 等藥物所造成之肝毒性 (hepato-toxicity)。缺乏鋅會造成動物成長遲緩、性腺功能低下症 (hypogonadism)、免疫缺乏、脫毛、皮膚潰爛、神經性厭食症 (anorexia nervosa)、abnormal fetal 等症狀 (29-30)。魚類鋅的缺乏會造成成長率低、死亡率高且易產生短軀症、白內障及鰭發炎等症狀 (31-32)。在大鼠中許多肝臟細胞色素 P450 的表現是性別依賴型的 (sex-dependent)，如 CYP2C11 (33)、CYP3A2 (34) 及 CYP3A18 (35-36) 為雄性特異型的，而 CYP2C12 (37-38) 及 CYP3A9 (39) 為雌性特異表現之細胞色素 P450。這種性別依賴性的肝臟細胞色素 P450 的表現主要受到 GH (growth hormone) 的分泌之影響。在雄性的鼠中 GH 在腦下垂體中分泌，其分

泌為間歇性的分泌。而雌性的大鼠則為連續性的分泌 (40)。雄性的大鼠中間歇性分泌的 GH 會刺激 CYP2C11 (41) 的表現，而雌性的大鼠連續性分泌的 GH 會誘發 CYP2C12 (35)、CYP3A9 (36) 的表現。細胞色素 P450 的性別依賴型的表現目前的研究報告均只在著眼在如大鼠等哺乳類動物上，在魚類之研究則仍須進一步確認。鋅在製造、貯存及分泌包括 GH 在內的荷爾蒙上具有相當重要的功能。當雄性大鼠缺乏鋅時，其血漿中的 GH 之量即會減少，則會造成相關的 CYP 活性受到影響 (42)。在鋅缺乏的狀態下，即可能會造成生物體 CYP 之活性受到影響。而 CYP 又是生體異物代謝最主要的氧化酵素。當鋅缺乏時，很容易會影響 CYP 之表現而造成例如藥物之療效降低或者造成生體異物對生物體的毒性增加等影響。魚類缺鋅時是否會影響 CYP 之表現，值得進一步的研究。

四 研究方法與步驟

1 實驗用動物

實驗魚種為吳郭魚 (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*)，購自於屏東民間地區繁殖場。魚苗送至實驗室後，於 FRP 桶中馴養四週後進行實驗。馴養期間餵以基礎配方飼料 (31)。

2 飼料配製

飼料配製將參考 Sun and Jeng (43) 之配方進行。將鋅調配為二組飼料: (a) Zn-deficient; (b) pair-fed control for Zn-deficient。

3 飼養方法

實驗開始時，選用平均體重在 10% 之內之吳郭魚為實驗用魚。飼養系統為流水式之玻璃水缸 (30.5×61.0×33.5 - W×L×H)，以每小時 60 ml 之速度流入預先曝氣的水，以維持水質。每缸均有獨立打氣系統。水溫控制在 28~30°C，pH 值 7.8~8.0。以定時器控制光照時間，每天光照時間為 12 小時 (0800 h-2000 h)。每次投餵飼料後 1 小時，即進行抽底，以清除糞便與殘餌。每兩週擦拭缸壁一次，以維持養殖環境的乾淨。每缸飼養 12 尾魚，共 2 個實驗組，每組三重覆，實驗共進行八週。實驗期間每日餵食量為魚體重的 3%，每日分兩次投餵 (0830 & 1630 h)，每兩週秤重一次，餵食量並隨之調整。

4 吳郭魚肝臟細胞色素 P450 之誘發

八週餵食結束後，記錄每一缸剩餘的吳郭魚數目，並將所有吳郭魚集合稱重，以計算增重率、飼料效率、蛋白質效率及存活率。同時將 3 個實驗組分為兩組，一組為

誘發組，另一組為控制組。誘發組之吳郭魚將以直接注射 PCP (溶於玉米油中) 來誘導吳郭魚肝臟細胞色素 P450 的產生。控制組的吳郭魚則注射玉米油來取代 PCP。注射後之吳郭魚放回水缸中，以上述之方法飼養一週。

5. 吳郭魚肝臟微粒體之分離

誘發 CYP 實驗結束後，將吳郭魚凍昏並採集血液，再進行解剖取其肝臟進行實驗。由於細胞色素 P450 主要存在於微粒體中，因此依照 Omura and Sato (44) 之方法進行微粒體的分離。將肝臟組織以 1.15% KCl 漂洗兩次，去除血塊，再以 Potter-Elvehjem homogenizer 研磨，磨碎後之組織，在冷卻離心機中 $2,000\times g$, 10 min，可得上澄液及沈澱。再將上澄液以 $100,000\times g$ 離心 1 h，所得的沈澱即為微粒體。將以此微粒體貯存在 -70°C 冰箱中備用。

6. 吳郭魚血液及組織之微量元素分析

吳郭魚血液及組織樣品，將參考 Jeng and Huang (45) 之方法以溼熱分解法分解後，經適當稀釋後直接以原子吸光儀 (Hitachi Z-8100 polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer) 測定其微量元素含量。

7 吳郭魚肝臟微粒體之蛋白量及細胞色素 P450 含量與活性分析

- a. CYP 含量：利用 reduced cytochrome P450 與 CO 結合後，在 450 nm 下有最大的吸光的特性來測定其含量 (46)。
- b. Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 及 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD): 參考 Whyte *et al.* (47) 的方法來測定。
- c. 蛋白質測定：以 Lowry 法測定 (48)。

8 分離吳郭魚肝臟 RNA

肝臟之 total RNA 將依照使用手冊之方法以 Trizol reagent 抽出。將大約 100 mg 之吳郭魚肝臟加入 500 μl TriZol reagent 後均質，再加入 100 μl chloroform/isoamyl alcohol (49:1, v/v) 進行抽出。將抽出之液體層轉移至另一新的試管中，加入 250 μl 冰浴的 isopropanol 使 RNA 沉澱下來，再以 200 μl 冰浴的 70% ethanol 清洗沉澱。RNA 沉澱乾燥後，加入 50 μl 含 1 mM EDTA 之無菌 10 mM Tris buffer (pH 8.0) 使其變成懸濁液後再凍存在 -70°C 中。

9. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay.

RT-PCR將參考Kawai *et al.* (51) 之方法進行。RT-PCR中所使用的核酸引子 (primer) 將參考Xu *et al.* (52) 之報告進行設計，如Table 1 所示。將分離之肝臟RNA (2 μg) 加入 0.5 μg oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer及diethylpyrocarbonate-treated water於 65°C 反應 10

min後，置於冰浴上。加入 2 ml 10X PCR buffer II，4 ml 25 mM MgCl₂，1 ml 10 mM dNTP，1 ml 0.1 M dithiothreitol，及 2 U deoxyribonuclease I 後，於 37°C 反應 30 min，75°C反應 5 min，隨即置於冰浴上。Reverse transcription時則開始時加入 200 U SuperScript II reverse transcriptase，於 42°C 反應 20 min，以 95°C 5 min終止反應。產生的cDNA則貯存在-20°C中。取 2 µl cDNA進行RT-PCR反應，每 25 µl 反應中，含有 10 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、100 µM dNTP、各 25 pmol 的CYP及cyclophilin (internal control) forward與reverse primers及 4 U AmpliTaq DNA polymerase。PCR amplification則開始以 95°C 加熱 1 min，接下來則進行下列之步驟: denaturation 94°C 30 s，annealing 60°C 60 s及extension 72°C 60 s，共計 28 個循環，最後以 72°C反應 10 min。將得到的PCR產物以agarose (1.7%) gel electrophoresis (含有 0.08 mg/ml ethidium bromide) 分離，以觀察CYP表現的情況，並計算CYP band與 cyclophilin band之optical intensity的比例來了解CYP表現的情況。

五 結果及討論

1 膳食中之鋅濃度對吳郭魚生長影響

膳食中缺鋅 (5 mg Zn/ kg diet) 飼養八週之吳郭魚與對照組 (pair-fed control, 46 mg Zn/ kg diet) 比較，如 Table 2，所示發現其體重相差不大，但血漿中之鋅濃度缺鋅組之吳郭魚明顯低於對照組。

2 膳食中之鋅濃度對吳郭魚肝臟之細胞色素 P450 含量與相關之單加氧酶活性之影響

進一步解剖發現膳食中缺鋅之吳郭魚肝臟之重量與對照組並無差異，而肝臟中之 CYP 含量及相關之單加氧酶活性亦顯現無差異的情況 (Table 2)，似乎說明膳食中缺乏鋅對吳郭魚之肝臟中之細胞色素 P450 之含量及相關酶活性似乎沒有影響。在五氯酚作用下，膳食中之鋅濃度對吳郭魚肝臟之細胞色素 P450 與相關之單加氧酶活性之影響。

3 在五氯酚作用下，膳食中之鋅濃度對吳郭魚肝臟之 CYP1A 表現之影響

進一步將二組之吳郭魚分別施打不同劑量之五氯酚，則發現膳食中缺乏鋅之吳郭魚肝臟之 AHH 及 EROD 活性在較大劑量之五氯酚作用下，比控制組較低 (Fig. 3)。而同時以 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 進行 CYP1A mRNA 之表現量的分析 (Fig. 4)，發現膳食中缺乏鋅之吳郭魚肝臟之 CYP1A 表現量明顯較控制組為低，顯示鋅似乎在 CYP1A 的表現上具有特殊之功能，當吳郭魚在膳食中缺乏鋅之狀況下亦會影響 CYP1A 的表現，其機制為何有待更進一步的探討

六 結論

本研究主要研究膳食中之鋅缺乏對吳郭魚肝臟細胞色素 P4501A (CYP1A) 之表現之影響。膳食中缺鋅 (5 mg Zn/ kg diet) 飼養八週之吳郭魚與對照組 (pair-fed control, 46 mg Zn/ kg diet) 比較，除了血漿中之鋅濃度缺鋅組之吳郭魚明顯低於對照組外，其他如肝臟中之 CYP 含量及相關之單加氧酶活性無明顯的差異，似乎說明膳食中缺乏鋅對吳郭魚之肝臟中之細胞色素 P450 之含量及相關酵素活性似乎沒有影響。但進一步將此二組之吳郭魚分別施打不同劑量之五氯酚，則發現膳食中缺乏鋅之吳郭魚肝臟之 AHH 及 EROD 活性在較大劑量之五氯酚作用下，比控制組較低。而 CYP1A mRNA 之表現量的分析，發現膳食中缺乏鋅之吳郭魚肝臟之 CYP1A 表現量明顯較控制組為低，顯示鋅似乎在 CYP1A 的表現上具有特殊之功能，當吳郭魚在膳食中缺乏鋅之狀況下亦會影響 CYP1A 的表現，其機制為何有待更進一步的探討。

七 參考文獻

- (01) Monostory K, Jemnitz K, Vereczkey L.H 1996. Xenobiotic metabolizing enzymes in fish: diversity, regulation and biomarkers for pollutant exposure. *Acta Physiol Hung.*, 84: 369-81.
- (02) Goldfarb P, Livingstone D, Birmelin C.H 1998. Biomonitoring in the aquatic environment: use of molecular biomarkers. *Biochem Soc Trans.*, 26: 690-694.
- (03) Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, Helvig C., Falck JR, Farrell G, Kaminsky LS, Spivack SD, Boitier E, Beaune P. 1999. Human cytochromes P450. *Mol. Asp. Med.*, 20: 1-137.
- (04) Ryan DE, Levin W. 1990. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol. Ther.*, 45: 153-239.
- (05) Gonzalez FJ. 1990. Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol. Ther.*, 45: 1-38.
- (06) Ioannides C, Parke DV. 1990 The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab. Rev.*, 22: 1-85.
- (07) Williams DE, Buhler DR. 1983. Purified form of cytochrome P-450 from rainbow trout with high activity toward conversion of aflatoxin B1 to aflatoxin B1-2,3-epoxide. *Cancer Res.*, 43: 4752-4756.
- (08) Celander M, Ronis MJJ, Förlin L. 1989. Initial Characterization of a constitutive cytochrome P-450 isoenzyme in rainbow trout liver. *Mar. Environ. Res.*, 28, 9-13.
- (09) Celander M, Förlin L. 1991. Catalytic activity and immunochemical quantification of hepatic cytochrome P-450 in β -naphthoflavone and isosafrol treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, 9: 189-197.

- (10) Celander M, Förlin L. 1992. Quantification of cytochrome P4501A1 and catalytic activities in liver microsomes of isosafrol- and β -naphthoflavone-treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Environ. Res.*, 34: 123-126.
- (11) Celander M, Leaver MJ, George SG, Förlin L. 1993. Induction of cytochrome P450 1A1 and conjugating enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: a time course study. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106C: 343-349.
- (12) Celander M, Broman D, Förlin L, Näf C. 1995. Effects of petroleum hydrocarbons on the hepatic cytochrome P450 1A1 system in rainbow trout. *Mar. Environ. Res.*, 39: 61-65.
- (13) Celander M, Förlin L. 1995. Decreased responsiveness of the hepatic cytochrome P450 1A1 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB. *Aquat. Toxicol.*, 33: 141-153.
- (14) Celander M, Stegeman JJ, Förlin L. 1996. CYP1A1-, CYP2B- and CYP3A expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: CYP1A1-specific down-regulation after prolonged exposure to PCB. *Mar. Environ. Res.*, 42: 283-286.
- (15) Husoy AM, Myers MS, Goksoyr A. 1996. HCellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua L*) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sorfjorden, Norway. *H Aquatic Toxicology*, 36: 53-74.
- (16) Husoy AM, Myers MS, Willis ML, Collier TK, Celander M, Goksoyr A. 1994. Immunohistochemical localization of CYP1A and CYP3A-like isozymes in hepatic and extrahepatic tissues of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*), a marine fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 129: 294-308.
- (17) Förlin L, Celander M. 1995. Studies of the Inducibility of P450 1A in Perch from the PCB-Contaminated Lake Järnsjön in Sweden. *Mar. Environ. Res.*, H39H: 85-88.
- (18) Sakamoto KQ, Nakai K, Aoto T, Yokoyama A, Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. 2003. Cytochrome p450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere.*, 51:491-500.
- (19) Ueng YF, Ueng TH. 1995. Induction and purification of cytochrome P450 1A1 from 3-methylcholanthrene-treated tilapia, *Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*. *Arch Biochem Biophys.*, 322:347-56.
- (20) Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. Cytochrome P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-42.
- (21) Bucheli TD, Fent K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science & Technology*, 25: 201-268.
- (22) Nilsen BM, Berg K, Goksoyr A. 1998. Induction of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish. A biomarker for environmental pollution. *Methods Mol Biol.*, 107: 423-38.

- (23) Goksoyr A. 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl.*, 17: 80-95.
- (24) Bettger WJ, O'Dell BL. 1993. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Nutr. Biochem*, 4: 194-200.
- (25) Cagen SZ, Klassen CD. 1979. Protection of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by zinc: role of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol*, 51:107-16.
- (26) McMillan DA, Schnell RC. 1985. Amelioration of bromobenzene hepatotoxicity in the male rat by zinc. *Fundam Appl Toxicol*, 5:297-304.
- (27) Chengelis CP, Dodd DC, Means JR, Kotsonis FN. 1986. Protection by zinc against acetaminophen induced hepatotoxicity in mice. *Fundam Appl Toxicol*, 6:278-84.
- (28) Miranda CL, Henderson MC, Reed RL, Schmitz JA, Buhler DR. 1982. Protective action of zinc against pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity in rats. *J Toxicol Environ Health*, 9:359-66.
- (29) Hambidge KM, Casey CE, Krebs NF. 1986. Zinc. In: Mertz W, Underwood EJ, editors. *Trace elements in human and animal nutrition*. Orlando: Academic Press, p. 1-138.
- (30) Bray TM, Bettger WJ. 1990. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med*, 8:281-91.
- (31) Ogino C, Yang GY. 1978. Requirement of rainbow trout for dietary zinc. *Bull. Jpn Soc Sci Fish*, 44: 1015-1018.
- (32) Ogino C, Yang GY. 1979. Requirement of carp for dietary zinc. *Bull. Jpn Soc Sci Fish*, 45: 967-969.
- (33) Waxman DJ. 1984. Rat hepatic cytochrome P-450 isoenzyme 2c. Identification as a male-specific, developmentally induced steroid 16 α -hydroxylase and comparison to a female-specific cytochrome P-450 isoenzyme. *J Biol Chem*, 259:15481-90.
- (34) Cooper KO, Reik LM, Jayyosi Z, Bandiera S, Kelley M, Ryan DE, Daniel R, McCluskey SA, Levin W, Thomas PE. 1993. Regulation of two members of the steroid-inducible cytochrome P450 subfamily (3A) in rats. *Arch Biochem Biophys*, 301: 345-54.
- (35) Mahnke A, Strotkamp D, Roos PH, Hanstein WG, Chabot GG, Nef P. 1997. Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 337:62-8.
- (36) Robertson GR, Farrell GC, Liddle C. 1998. Sexually dimorphic expression of rat CYP3A9 and CYP3A18 genes is regulated by growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, 242:57-60.
- (37) MacGeoch C, Morgan ET, Gustafsson JA. 1985. Hypothalamo-pituitary regulation of cytochrome P-450 15 α -apoprotein levels in rat liver. *Endocrinology*, 117: 2085-92.
- (38) Waxman DJ, Dannan GA, Guengerich FP. 1985. Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochemistry*, 24: 4409-17.
- (39) Wang H, Strobel HW. 1997. Regulation of CYP3A9 gene expression by estrogen and catalytic studies using cytochrome P450 3A9 expressed in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, 344: 365-72.

- (40) Gabriel SM, Roncancio JR, Ruiz NS. 1992. Growth hormone pulsatility and the endocrine milieu during sexual maturation in male and female rats. *Neuroendocrinology*, 56:619–28.
- (41) Morgan ET, MacGeoch C, Gustafsson JA. 1985. Hormonal and developmental regulation of expression of the hepatic microsomal steroid 16 α -hydroxylase cytochrome P-450 apoprotein in the rat. *J Biol Chem*, 260:11895–11898.
- (42) Waxman DJ, Chang TKH. 1995. Hormonal regulation of liver cytochrome P450 enzymes. In: *Ortiz de Montellano PR, editor. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. New York: Plenum Press, p. 391–417.
- (43) Sun LT, Jeng SS. 1999. Accumulation of zinc from diet and its release in common carp, *Fish Physiology and Biochemistry*, 20: 313-324.
- (44) Omura T, Sato R. 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 237: 1375-1376.
- (45) Jeng SS, Huang YW. 1973. Heavy metal contents in Taiwan's cultured fish. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica*, 12: 78-85.
- (46) Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem.*, 239: 2370-2378.
- (47) Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol.*, 30: 347-570.
- (48) Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, Tolbert NE. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 206-210.
- (49) Bollag DM, Rozycki DM, Edelstein SJ. 1996. *Protein Methods*, 2nd ed., Wiley-Liss, Inc. Press, New York. 107-154, 301-351.
- (50) Copeland RA. 1993. Electrophoretic and chromatographic methods for assessing protein purity. In: *Methods for Protein Analysis*. Chapman and Hall Press. New York. 3: 261-288.
- (51) Kawai M, Bandiera SM, Chang TKH, Poulet FM, Vancutsem PM, Bellward GD. 1999. Modulation of hepatic CYP2A1, CYP2C11, and CYP3A9 expression in adult rats by neonatal administration of tamoxifen. *Drug Metab Dispos*, 27:1392–8.
- (52) Xu Z, Kawai M, Bandiera SM, Chang TKH. 2001. Influence of dietary zinc deficiency during development on hepatic CYP2C11, CYP2C12, CYP3A2, CYP3A9, and CYP3A18 expression in postpubertal male rats. *Biochemical Pharmacology* 62 : 1283–1291

Table 1 Nucleotide sequences of PCR primers

Gene	Primer sequence	PCR product (bp)
CYP1A	Forward 5'-CTATGACCACCACGACGATG-3' Reverse 5'-TCCAGGCAAAGCTTGAAAGT -3'	1186
b-Actin	Forward 5'-TAT-GGA-GAA-GAT-TTG-GCA-CC-3' Reverse 5'-CCA-CCA-ATC-CAC-ACA-GAG-TA-3'	786



Table 2. Effect of dietary zinc deficiency on feed intake, body weight gain, plasma zinc concentration, total CYP content, and monooxygenase activity.

	Dietary zinc content (mg zinc/ kg diet)	
	Pair-fed control (46mg /kg)	Zinc deficiency (5mg /kg)
Body weight (g)	124.12 ± 12.25	118.58 ± 17.98
Absolute liver weight (g)	1.41 ± 0.15	1.38 ± 0.27
Relative liver weight/ (%total weight)	1.13 ± 0.25	1.16 ± 0.10
Plasma zinc (µg/ml)	2.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1 ^a
Cytochrome P450 (nmol/mg protein)	0.10 ± 0.05	0.12 ± 0.15
NADPH-Cytochrome C reductase (nmol/min/mg protein)	4.61 ± 1.13	4.51 ± 0.13
Aryl hydrocarbon hydroxylase (pmol /mg protein)	57.72 ± 26.92	55.82 ± 20.72
Ethoxycoumarin-O-deethylase (pmol/min/mg protein)	9.26 ± 2.66	9.16 ± 2.16
Ethoxyresorufin-O-deethylase (pmol/min/mg protein)	10.19 ± 5.39	9.98 ± 3.39
Aniline-4-hydroxylase (nmol/min/mg protein)	1.22 ± 0.50	1.21 ± 0.52
Aminopyrine-N-hydroxylase (nmol/min/mg protein)	12.35 ± 6.77	12.25 ± 6.57

1. Each value represents the mean ± SD (n=12).

2. ^a Value significant different from the respect control value, P<0.05.

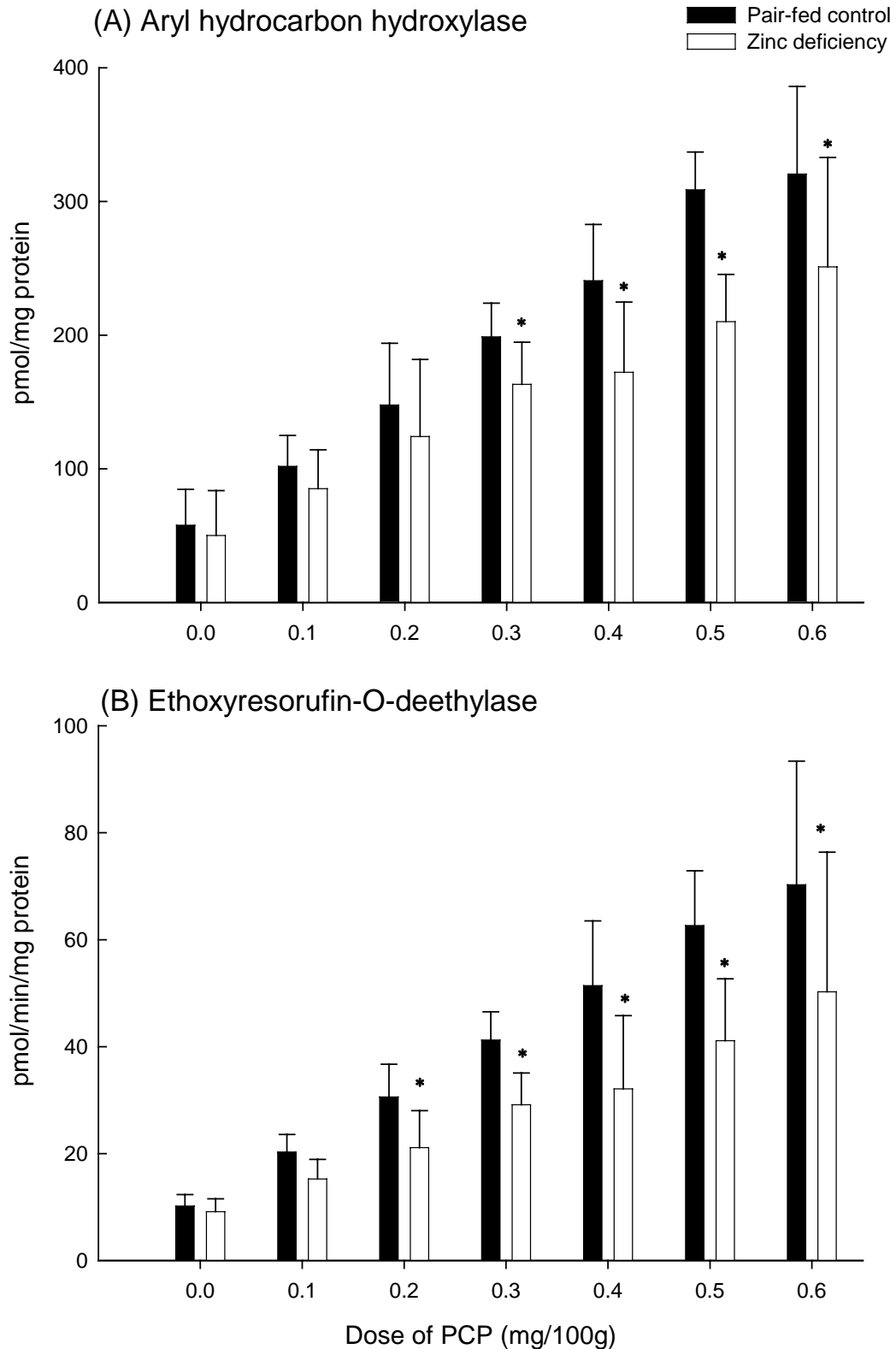


Fig.1 Effect of dietary zinc deficiency on hepatic microsomal CYP1A-mediated aryl hydrocarbon hydroxylase and ethoxyresorufin-O-deethylase activities. Asterisks indicate significant different from the pair-fed control group ($P < 0.05$).

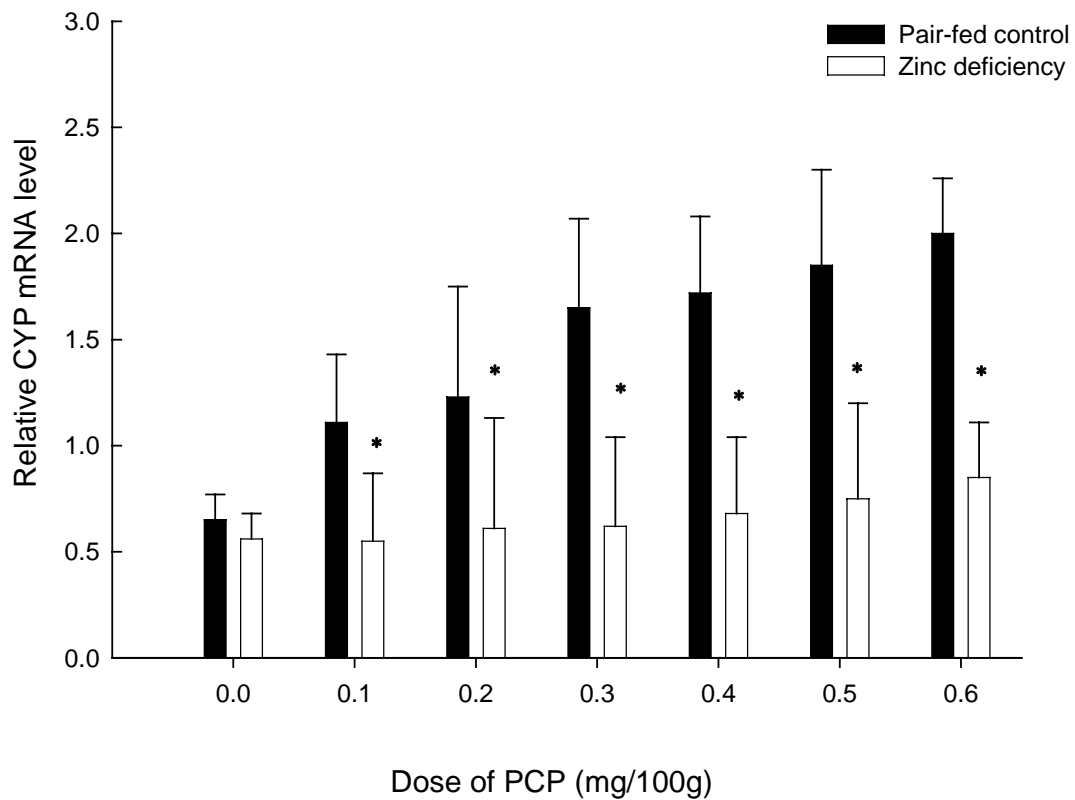


Fig. 2 Hepatic CYP1A mRNA levels in tilapia fed a zinc-deficient diet. Photographs of ethidium bromide stained agarose gels were subjected to densitometric analysis. Relative CYP1A mRNA expression was expressed as a ratio of the optical density of the CYP1A band to that of the internal control band. Shown are relative CYP mRNA levels (means \pm SD) for six individual fish pre treatment group. Asterisks indicate significant different from the pair-fed control group ($P < 0.05$).